

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 042744

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.21

(21) Номер заявки
202190238

(22) Дата подачи заявки
2019.06.21

(51) Int. Cl. C07K 5/078 (2006.01)
A61K 31/12 (2006.01)
A61K 33/30 (2006.01)

(54) НОВЫЕ ПОЛИМОРФНЫЕ ФОРМЫ ЦИКЛО(-ГИС-ПРО)

(31) 62/696,190

(32) 2018.07.10

(33) US

(43) 2021.05.28

(86) PCT/US2019/038391

(87) WO 2020/013974 2020.01.16

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НОВМЕТАФАРМА КО., ЛТД. (KR)

(72) Изобретатель:
Олмстед Кай (US), Пирсон Дейвид,
Макперсон Элайн (GB)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) US-A1-20090004291
US-A1-20070161640
US-A-6090780
US-A1-20130331344

(57) Изобретение относится к синтезу и характеристике новых полиморфных форм цикло(-Гис-Про) (ЦГП).

042744 B1

042744 B1

042744

B1

Родственные заявки

Для настоящей заявки испрашивается приоритет по предварительной заявке США №. 62/696,190, поданной 10 июля 2018, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте, насколько это разрешено законом.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение направлено на новые полиморфные формы цикло(-Гис-Про) (ЦГП).

Предпосылки создания изобретения

Цикло(-Гис-Про), $C_{11}H_{14}N_4O_2$, известен как безводный дипептид, имеющий регистрационный номер CAS 53109-32-3. Это эндогенный циклический дипептид, образуемый *in vivo* в результате гидролитического удаления amino-концевого остатка пироглутаминовой кислоты из гипоталамического тиреотропин-релизинг-гормона. Цикло(-Гис-Про) может быть синтезирован *ex vivo* обычными химическими методами. Он может быть важен для регуляции качества функции глиальных клеток. (Grotelli et al., The Role of Cyclo(His-Pro) in Neurodegeneration, Int J Mol Sci. 2016 Aug; 17(8): 1332). Цикло(Гис-Про) повсеместно встречается в центральной нервной системе и является ключевым субстратом переносчиков органических катионов, которые тесно связаны с нейротрофакцией. Этот циклический дипептид также может преодолевать гематоэнцефалический барьер и, попав в головной мозг, может влиять на различные воспалительные и стрессовые реакции путем модификации сигнального пути Nrf2-NF- κ B.

Кристаллическая безводная форма цикло(-Гис-Про) ("безводный ЦГП" или "Структура 1") представляет собой форму, о которой ранее сообщалось в литературе, и которая может применяться в терапевтических целях. Однако некоторые безводные формы могут быть нестабильными. Возможные недостатки использования структуры 1 включают: (1) явную физическую нестабильность в условиях окружающей среды и высокой влажности; и (2) потенциальную химическую нестабильность из-за активности воды, приводящую к образованию диастереомеров необходимых L,L-дипептидов, таких как D,L-ЦГП, L,D-ЦГП или D,D-ЦГП. Таким образом, в данной области техники существует потребность в более стабильных формах ЦГП.

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении предложена кристаллическая форма гидрата цикло(-Гис-Про) ("гидрат ЦГП" или соединение "Структура 2"), которую можно охарактеризовать и отличить от других твердых форм ЦГП с использованием различных аналитических методик, включая рентгеновскую порошковую дифракцию (XRPD), твердотельный ядерный магнитный резонанс (ЯМР, или ^{13}C SSNMR), спектроскопию комбинационного рассеяния, дифференциальную сканирующую калориметрию (ДСК), динамическую сорбцию пара (ДСП) и термогравиметрический анализ (ТГА).

Заявитель неожиданно обнаружил, что гидрат ЦГП (CAS RN: 2254826-95-2 (январь 2019)) имеет более высокую стабильность по сравнению с аморфным цикло(-Гис-Про) или структурой 1. На основании этого неожиданного открытия структуру 2 можно индивидуально использовать как однокомпонентное лекарство, вместо структуры 1, или можно использовать смеси структуры 1 и структуры 2.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу выделения структуры 2 путем кристаллизации с использованием растворителей, а не колоночной хроматографии, применяемой в настоящее время для выделения безводного ЦГП.

В другом варианте осуществления структура 2 стабильна при типичных условиях хранения при комнатной температуре в течение примерно 6 месяцев, или примерно 12 месяцев, или примерно 18 месяцев, или примерно 24 месяцев, или примерно 36 месяцев.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение направлено на, по существу, чистое вещество структуры 2. В некоторых вариантах осуществления вещество структуры 2 имеет чистоту по меньшей мере примерно 90% или по меньшей мере примерно 95, 96, 97, 98, 99 или 100%.

В одном варианте осуществления чистоту образца измеряют любым аналитическим методом. В одном варианте осуществления чистоту измеряют с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), порошковой рентгеновской дифракции (XRPD), анализа рКа, микроскопии в поляризованном свете (PLM), термогравиметрического анализа/дифференциального термического анализа (ТГ/ДТА), дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FT-IR), динамической сорбции пара (ДСП), порошковой рентгеновской дифрактометрии с переменной температурой и влажностью (VT-/VH-XRPD), 1H ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и/или ЯМР с гетероядерной одноквантовой когерентностью (HSQC). В другом варианте осуществления чистоту образца определяют с помощью ВЭЖХ.

В одном варианте осуществления вещество структуры 2 имеет чистоту по меньшей мере примерно 90% или по меньшей мере примерно 95, 96, 97, 98, 99 или 100%, при измерении с помощью ВЭЖХ.

В другом варианте осуществления материал структуры 2 может быть охарактеризован по меньшей мере двумя из следующих характеристик:

(а) порошковая рентгеновская дифрактограмма, содержащая по меньшей мере два пика, выбранных из следующего списка: 10; 13,7; 17; 18,1; 20,2 и 27,3 градуса ($\pm 0,2^\circ 2\theta$);

(b) рКа примерно 6,4;

(с) двойное лучепреломление с фрагментированной стержнеобразной морфологией при анализе с помощью микроскопии в поляризованном свете;

(d) начальная потеря массы примерно 6,5% (0,9 эквивалента воды) с последующим разложением образца при температуре примерно 280°C при испытании методом термогравиметрического анализа;

(е) эндотерма с началом примерно 99°C и пиком примерно 102°C в первом цикле нагрева ДСК;

(f) начало дегидратации при относительной влажности (RH) ниже примерно 10%, потеря примерно 5,8 мас.% при RH от 10 до 0% (0,8 эквивалента воды) и гидратация от 0 до примерно 40% RH при 40°C в динамическом анализе сорбции пара;

(g) начало дегидратации при относительной влажности ниже примерно 20%, потеря примерно 6,1 мас.% при относительной влажности примерно от 20 до 0% (0,8 эквивалента воды) и регидратация при относительной влажности от 0 до примерно 40% при 50°C в динамическом анализе сорбции пара; и

(h) начало дегидратации при относительной влажности ниже примерно 20%, потеря примерно 7 мас.% при относительной влажности примерно от 20 до 0% (1,0 эквивалент воды) и регидратация при относительной влажности от 0 до примерно 40% при 60°C в динамическом анализе сорбции пара.

Настоящее изобретение также включает фармацевтическую композицию, содержащую материал структуры 2 и вспомогательные вещества. Такая композиция может содержать примерно от 1 до 50%, примерно от 5 до 45%, примерно от 10 до 40%, примерно от 15 до 35%, примерно от 20 до 30%, по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 50%, примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9% или примерно 10% (по массе) гидрата ЦГП. В одном варианте осуществления композиция может содержать примерно от 1 до 10 мас.% гидрата ЦГП. В одном конкретном варианте осуществления композиция может содержать примерно 4 мас.% гидрата ЦГП.

В другом варианте осуществления композиция может быть изготовлена в форме таблетки, капсулы, капсуловидной таблетки, ликвиделя, таблетки для рассасывания, стерильного раствора для инъекций и т.п.

В альтернативном варианте описанные в настоящей заявке композиции могут быть составлены в форме порошка для растворения в подходящем носителе, таким как стерильная апиrogenная вода, перед использованием. Например, соединение, подходящее для парентерального введения, может включать стерильный изотонический физиологический раствор, содержащий от 0,1 до 90% массы на объем соединения. В качестве примера, раствор может содержать примерно от 5 до 20%, более предпочтительно примерно от 5 до 17%, более предпочтительно примерно от 8 до 14%, и наиболее предпочтительно примерно 10% соединения.

Дополнительные варианты осуществления настоящих композиций, способов и т.п. будут очевидны из следующего описания, чертежей, примеров и формулы изобретения. Как можно понять из предшествующего и последующего описания, каждый признак, описанный в настоящей заявке, и всякая и каждая комбинация двух или более таких признаков включены в объем настоящего раскрытия при условии, что признаки, включенные в такую комбинацию, не противоречат друг другу. Кроме того, любой признак или комбинация признаков могут быть специально исключены из любого варианта осуществления или аспекта. Дополнительные аспекты и варианты осуществления изложены в нижеследующем описании и формуле изобретения, особенно при рассмотрении вместе с прилагаемыми примерами и чертежами.

Краткое описание чертежей

Патента или заявка содержат по меньшей мере один цветной чертеж. Копии данного патента или публикации заявки на патент с цветными чертежами будут предоставлены Ведомством по запросу и при уплате необходимой пошлины.

Вышеупомянутые признаки вариантов осуществления будут более понятны при обращении к нижеследующему подробному описанию со ссылкой на прилагаемые чертежи.

Фиг. 1 представляет собой порошковую рентгеновскую дифрактограмму кристаллической структуры 1.

Фиг. 2 представляет собой сравнение XRPD (a) структуры 1 после динамической сорбции пара (ДСП) и (b) структуры 2 ЦГП. Эти результаты подтверждают, что подготовленный материал ЦГП представляет собой структуру 2 (т.е. гидрат ЦГП), и что структура 1 изменилась на структуру 2 после ДСП.

Фиг. 3 представляет собой сравнение рентгеновских порошковых дифрактограмм структуры 2 при относительной влажности 40% до и после ДСП.

Фиг. 4 представляет собой анализ порошковых рентгеновских дифрактограмм структуры 2 после VT-DVS. Она показывает, что материал был смесью структур 1 и 2.

Фиг. 5 представляет собой сравнение рентгеновских порошковых дифрактограмм примерно 30 мг структуры 2, которую хранили в трех условиях в течение семи дней: 40°C/75% относительной влажности, 80°C, и при естественном освещении.

Фиг. 6 представляет собой XRPD-анализ примерно 2,2 г гидрата ЦГП (структуры 2), который взвешивали в стеклянном сосуде и помещали в вакуумную печь, установленную на 50°C, на 1 час.

Фиг. 7 представляет собой XRPD-анализ гидрата ЦГП или структуры 2 (синяя линия: образец с фиг.

5), который был возвращен в вакуумную печь еще на 30 мин. Другими словами, фиолетовая линия на фиг. 7 представляет собой XRPD-анализ продукта после хранения гидрата ЦГП (материала структуры 2) в течение 1,5 ч при 50°C под вакуумом, демонстрируя, в основном, структуру 2 с некоторой примесью структуры 1.

Фиг. 8 представляет собой XRPD-анализ гидрата ЦГП или структуры 2 (синяя линия: образец с фиг. 5), который был возвращен в печь, в которой температура была увеличена до 80°C. Сосуд помещали в печь еще на 18 ч. Другими словами, розовая линия на фиг. 8 представляет собой XRPD-анализ продукта после хранения гидрата ЦГП (материала структуры 2) в течение 18 ч при 80°C, демонстрируя, в основном, структуру 1 с некоторой примесью структуры 2.

Фиг. 9 представляет собой сравнение изменений в структуре 2 при разных температурах. Это наложение результатов XRPD-анализа продукта образца с фиг. 5-7, высушенного в течение трех различных периодов времени, и результаты были проанализированы с помощью XRPD. Зеленая линия представляет собой структуру 2 образца, хранившегося при 50°C в течение 1 ч, фиолетовая линия представляет структуру 2 образца, хранившегося при 50°C в течение 90 мин, а розовая линия представляет структуру 2 образца, хранившегося при 80°C в течение 18 ч.

На фиг. 10 показан первоначальный анализ полученного материала (в основном, структура 1). Значение рКа составляет 6,4.

На фиг. 11 показаны результаты анализа полученного ЦГП с использованием микроскопии в неполяризованном свете (в основном, структура 1).

На фиг. 12 показаны результаты анализа полученного ЦГП с использованием микроскопии в поляризованном свете (в основном, структура 1).

На фиг. 13 показаны результаты анализа структуры 2 с использованием микроскопии в неполяризованном свете и микроскопии в поляризованном свете.

На фиг. 14 показаны результаты термогравиметрического анализа полученного ЦГП (в основном, структура 1).

На фиг. 15 показаны результаты термогравиметрического анализа/дифференциального термического анализа (ТГ/ДТА) структуры 2.

На фиг. 16 показаны результаты ДСК анализа полученного ЦГП (в основном, структура 1) в первом цикле нагрева.

На фиг. 17 показаны результаты ДСК анализа полученного ЦГП (в основном, структура 1) в цикле охлаждения.

На фиг. 18 показаны результаты ДСК анализа полученного ЦГП (в основном, структура 1) во втором цикле нагрева.

На фиг. 19 показаны результаты ДСК анализа структуры 2 в первом цикле нагрева.

На фиг. 20 показаны результаты ДСК анализа структуры 2 в цикле охлаждения.

На фиг. 21 показаны результаты ДСК анализа структуры 2 во втором цикле нагрева.

На фиг. 22 показаны результаты Фурье-ИК-спектроскопии гидрата ЦГП.

На фиг. 23 показан график изотермы ДСП структуры 1, демонстрирующий увеличение массы на 6,3% между 60% RH и 90% RH.

На фиг. 24 показан график изотермы ДСП структуры 1 после перекристаллизации в первом цикле нагрева, демонстрирующий небольшую гигроскопичность с увеличением массы на 0,8% при относительной влажности 0-90%.

Фиг. 25 иллюстрирует результаты кинетики ДСП структуры 1.

Фиг. 26 иллюстрирует результаты XRPD материала до и после ДСП. Анализ XRPD после ДСП показывает новую форму, характерную для структуры 2.

На фиг. 27 показаны результаты ТГ/ДТА гидрата ЦГП, структура 2.

Фиг. 28 представляет собой график изотермы ДСП, показывающий, что гидрат ЦГП, материал структуры 2, не изменился при относительной влажности от 40 до 90% и от 10 до 90%.

Фиг. 29 иллюстрирует график кинетики ДСП гидрата ЦГП, структура 2.

Фиг. 30 иллюстрирует анализ VT-DVS после того, как гидрат ЦГП, структуру 2 подвергали единственному циклу при 40°C, показывая, что материал начал подвергаться дегидратации ниже 10%, теряя 5,8% массы (эквивалент 0,8 моль воды). Материал регидратировался при относительной влажности 0-40%.

На фиг. 31 показаны результаты анализа VT-DVS после того, как гидрат ЦГП, структура 2, был подвергнут единственному циклу при 50°C, демонстрирующие, что материал начал дегидратироваться ниже 20%, теряя 6,1% массы (эквивалент 0,8 моль воды). Материал регидратировался при относительной влажности 0-40%.

На фиг. 32 показаны результаты анализа VT-DVS после того, как гидрат ЦГП, структура 2 был подвергнут единственному циклу при 60°C, демонстрирующие, что материал начал дегидратироваться ниже 20%, теряя 7% массы (эквивалент 1,0 моль воды). Материал регидратировался при относительной влажности 0-40%.

На фиг. 33 показаны результаты анализа VT-/VH-XRPD гидрата ЦГП, структуры 2 и структуры 1.

На фиг. 34 показаны дифрактограммы XRPD гидрата ЦГП, материала структуры 2 после различных условий VT-DVS. Дифрактограмма XRPD структуры 1 представлена для сравнения.

Фиг. 35 иллюстрирует ^1H -ЯМР спектр структуры 1 в DMSO-d_6 .

Фиг. 36 иллюстрирует ^1H -ЯМР-спектр структуры 2 в DMSO-d_6 .

На фиг. 37 показано сравнение спектра ^1H -ЯМР структуры 1 (синяя линия) и структуры 2 (красная линия).

На фиг. 38 показан спектр HSQC-ЯМР структуры 1.

На фиг. 39 показан спектр HSQC-ЯМР смеси структур 1 и 2.

Фиг. 40 иллюстрирует результаты XRPD после начальной лиофилизации структуры 1.

Фиг. 41 иллюстрирует результаты XRPD после продолжительной лиофилизации (72 часа) структуры 1, показывающие, что материал, восстановленный после лиофилизации, был преимущественно аморфным по данным XRPD.

Фиг. 42 иллюстрирует результаты XRPD после начальной лиофилизации структуры 2 (72 часа сушки), показывающие, что материал, восстановленный после лиофилизации, был структурой 2 после 72 ч сушки.

На фиг. 43 показана приблизительная растворимость структуры 1 в различных растворителях.

Фиг. 44 иллюстрирует результаты растворимости структуры 1 в зависимости от объема добавленного растворителя.

Фиг. 45 иллюстрирует полиморф (структуру 1 или структуру 2), когда структуру 1 обрабатывали различными растворителями.

На фиг. 46 показаны растворители для первичного скрининга полиморфов.

На фиг. 47 показаны дифрактограммы XRPD полиморфа, образованного в различных растворителях - часть 1.

На фиг. 48 показаны дифрактограммы XRPD полиморфа, образованного в различных растворителях - часть 2.

На фиг. 49 показаны дифрактограммы XRPD полиморфа, образованного в различных растворителях - часть 3.

Фиг. 50 иллюстрирует температурный цикл первичного скрининга полиморфов.

Фиг. 51 представляет собой наложение дифрактограмм XRPD структуры 1 (синий цвет) и структуры 2 (красный цвет).

Фиг. 52 представляет собой типичную хроматограмму холостой пробы.

Фиг. 53 представляет собой хроматограмму разрешающего раствора.

Фиг. 54 представляет собой сравнение общих примесей в ангидрате ЦГП (структура 1) и гидрате ЦГП (структура 2).

Фиг. 55 представляет собой спектр ЖХ-МС для структуры 1 и структуры 2, который подтвердил ожидаемое отношение m/z 235,1, соответствующее $[\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2]\text{H}^+$. Обе структуры дают одинаковые результаты ЖХ-МС, как после растворения в растворителе (воде), потому что в растворителе не бывает "твердой формы" или полиморфа. ЖХ-МС измеряет сольбутилизированный ЦГП, а не твердую форму.

Фиг. 56 представляет собой хроматограмму ВЭЖХ-УФ полученного ЦГП. Она показывает, что полученный ЦГП имел чистоту 99,5%.

Фиг. 57 представляет собой пример дифрактограммы XRPD для твердых веществ, полученной при скрининге растворимости в растворителях.

Фиг. 58-60 представляют собой дифрактограммы XRPD для твердых веществ, полученных при циклировании температуры.

Фиг. 61 представляет собой картину дифрактограммы XRPD структуры 2.

Фиг. 62 представляет собой дифрактограмму XRPD, полученную при повторной лиофилизации ЦГП в воде.

Фиг. 63 представляет собой дифрактограмму XRPD, полученную при третьей попытке лиофилизации ЦГП в воде.

Фиг. 64-66 представляют собой дифрактограммы, связанные с экспериментами по циклическому изменению температуры при первичном скрининге полиморфов.

Фиг. 67 представляет собой дифрактограмму, связанную с экспериментами по испарению при первичном скрининге полиморфов.

Фиг. 68 представляет собой дифрактограмму, связанную с добавлением антирастворителя при первичном скрининге полиморфов.

Фиг. 69 представляет собой результаты XRPD для масштабирования структуры 2.

Фиг. 70 представляет собой дифрактограмму XRPD материала, полученного при нагревании материала структуры 2 до 80°C .

Фиг. 71 представляет собой дифрактограмму XRPD восстановленных твердых веществ в эксперименте с быстрым роторным испарением в этаноле/ДХМ.

Фиг. 72 представляет собой дифрактограмму XRPD для структуры 2 при первичном скрининге полиморфов.

- Фиг. 73 представляет изображения структуры 2 в поляризованном и неполяризованном свете.
- Фиг. 74 представляет собой результаты высокотемпературной микроскопии для структуры 2 ЦГП.
- Фиг. 75 представляет изображения от микроскопии в поляризованном и в неполяризованном свете для материала после этапа нагревания.
- Фиг. 76 представляет результаты анализа ТГ/ДТА-ТГ структуры 2.
- Фиг. 77 представляет начальный тепловой цикл ДСК, идентифицировавший эндотермическое событие с началом 99°C и пиком при 102°C.
- Фиг. 78 представляет цикл охлаждения ДСК.
- Фиг. 79 представляет второй цикл нагревания ДСК.
- Фиг. 80 представляет ИК-Фурье-спектры структуры 2 ЦГП.
- Фиг. 81 представляет дифрактограмму, связанную с анализом VT-/VN-XRPD.
- Фиг. 82 представляет собой график изотермы ДСП для структуры 2 ЦГП.
- Фиг. 83 представляет кинетический график ДСП для структуры 2 ЦГП.
- Фиг. 84 иллюстрирует сравнение дифрактограмм XRPD.
- Фиг. 85 представляет график изотермы ДСП для структуры 2 при 40°C.
- Фиг. 86 представляет собой кинетический график для структуры 2 при 40°C.
- Фиг. 87 представляет график изотермы для структуры 2 при 50°C.
- Фиг. 88 представляет кинетический график для структуры 2 при 40°C.
- Фиг. 89 представляет график изотермы для структуры 2 при 60°C.
- Фиг. 90 представляет собой кинетический график для структуры 2 при 60°C.
- Фиг. 91 иллюстрирует сравнение дифрактограмм XRPD.
- На фиг. 92 показаны изображения образцов структуры 1 после растворения.
- На фиг. 93 показаны изображения образцов структуры 2 после растворения.
- Фиг. 94 представляет собой дифрактограммы XRPD 20 для образцов, испытанных при 40°C/75% относительной влажности, 80°C и естественном освещении.
- Фиг. 95 представляет собой одну из хроматограмм ВЭЖХ для образцов для анализа стабильности. Анализ стабильности проводили в течение 1 недели при 40°C/75% относительной влажности.
- Фиг. 96 представляет собой одну из хроматограмм ВЭЖХ образцов для анализа стабильности. Анализ стабильности проводили в течение 1 недели при 80°C.
- Фиг. 97 представляет собой одну из хроматограмм ВЭЖХ для образцов для анализа стабильности. Анализ стабильности при комнатной температуре проводили в течение 1 недели.
- Фиг. 98 представляет собой дифрактограмму XRPD 20 с разницей в две недели для чистой структуры 1.
- Фиг. 99 представляет собой дифрактограмму XRPD 20 с разницей в две недели для чистой структуры 2.
- Фиг. 100 представляет собой дифрактограмму XRPD 20 с разницей в четыре недели для чистой структуры 1.
- Фиг. 101 представляет собой дифрактограмму XRPD 20 с разницей в четыре недели для чистой структуры 2.
- Фиг. 102 представляет собой дифрактограмму XRPD 20 с разницей в восемь недель для чистой структуры 1.
- Фиг. 103 представляет собой дифрактограмму XRPD 20 с разницей в восемь недель для чистой структуры 2.
- Фиг. 104 представляет собой хроматограмму ВЭЖХ чистой структуры 1 -начальный момент времени.
- Фиг. 105 представляет собой хроматограмму ВЭЖХ чистой структуры 1-2 недели.
- Фиг. 106 представляет собой хроматограмму ВЭЖХ чистой структуры 1-4 недели.
- Фиг. 107 представляет собой хроматограмму ВЭЖХ чистой структуры 1-8 недель.
- Фиг. 108 представляет собой хроматограмму ВЭЖХ чистой структуры 2 -начальный момент времени.
- Фиг. 109 представляет собой хроматограмму ВЭЖХ чистой структуры 2-2 недели.
- Фиг. 110 представляет собой хроматограмму ВЭЖХ чистой структуры 2-4 недели.
- Фиг. 111 представляет собой результаты XRPD после хранения при 40°C/75% относительной влажности.
- Фиг. 112 представляет собой типичное наложение хроматограмм холостой пробы, разрешающего раствора и раствора образца (6 М) для испытания на примеси.
- Фиг. 113 представляет собой анализ испарения при первичном скрининге полиморфов.
- Фиг. 114 представляет собой сводную таблицу первичного скрининга полиморфов.
- Фиг. 115 представляет собой сводку результатов стабильности внешнего вида за 8 недель.

Подробное описание конкретных вариантов осуществления

Различные аспекты и варианты осуществления далее будут полностью описаны в настоящей заявке. Однако эти аспекты и варианты осуществления могут быть осуществлены во многих различных формах

и не должны рассматриваться как ограничивающие; скорее, эти варианты осуществления представлены для того, чтобы раскрытие было исчерпывающим и полным и полностью передавало объем настоящего предмета специалистам в данной области техники. Все публикации, патенты и заявки на патенты, процитированные в настоящем документе, выше или ниже, включены в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте.

А) Определения.

Если не указано иное, все термины и фразы, используемые в настоящей заявке, включают значения, которые эти термины и фразы имеют в данной области техники, если иное явно не указано или явно не очевидно из контекста, в котором используется термин или фраза. Хотя в практике или при тестировании настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящей заявке, далее описываются конкретные способы и материалы.

Если не указано иное, отдельные числовые значения используются как приближение, как если бы этим значениям предшествовало слово "примерно" или "приблизительно". Аналогичным образом, числовые значения в различных диапазонах, указанных в данной заявке, если явно не указано иное, приведены как приблизительные, как если бы минимальному и максимальному значениям в указанных диапазонах предшествовало слово "примерно" или "приблизительно". Таким образом, вариации выше и ниже указанных диапазонов также могут использоваться для достижения практически тех же результатов, что и в случае значений в пределах диапазонов. При использовании в настоящей заявке термины "примерно" и "приблизительно" в связи с числовым значением должны пониматься как их простые и общепринятые значения специалистами в области техники, с которой раскрытый объект изобретения наиболее тесно связан или к которой относится указанный диапазон или рассматриваемый элемент. Степень отклонения от строгой числовой границы зависит от многих факторов. Например, некоторые из факторов, которые могут быть рассмотрены, включают критичность элемента и/или влияние данной величины отклонения на характеристики заявленного предмета изобретения, а также другие соображения, известные специалистам в данной области техники. В данном контексте использование различных количеств значащих цифр для разных числовых значений не означает ограничения того, как использование слов "примерно" или "приблизительно" служит для расширения конкретного числового значения или диапазона. Таким образом, как правило, "примерно" или "приблизительно" расширяют числовое значение. Кроме того, раскрытие диапазонов подразумевает непрерывный диапазон, включающий каждое значение между минимальным и максимальным значениями плюс расширение диапазона, обеспечиваемое использованием термина "примерно" или "приблизительно". Следовательно, перечисление диапазонов значений в настоящей заявке просто предназначено для использования в качестве сокращенного метода индивидуальной отсылки к каждому отдельному значению, попадающему в этот диапазон, и каждое отдельное значение включено в описание, как если бы оно было отдельно раскрыто в настоящем документе.

Термины "парентеральное введение" и "вводимый парентерально" известны в данной области техники и относятся к способам введения, отличным от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включают внутривенное, внутримышечное, внутриартериальное, интратекальное, интракапсулярное, интраорбитальное, внутрисердечное, интрадермальное, интраперитонеальное, транстрахеальное, подкожное, субкутикулярное, внутрисуставное, субкапсулярное, субарахноидальное, интраспинальное и интратеральное введение, но не ограничиваются ими.

Термин "активный агент" или "лекарство" в контексте настоящего описания относится к любому химическому веществу, которое вызывает биохимический отклик при введении человеку или животному. Лекарство может действовать как субстрат или продукт биохимической реакции, или лекарство может взаимодействовать с клеточным рецептором и вызывать физиологический ответ, или лекарство может связываться с рецептором и блокировать его, вызывая физиологический ответ.

Термин "биоэквивалент" в контексте настоящего описания относится к двум композициям, продуктам или способам, в которых 90% доверительные интервалы (CI) для AUC, частичной AUC и/или C_{max} составляют от 0,80 до 1,25.

Термин "гидрат ЦПП" (или "Структура 2") означает соединение, идентифицированное регистрационным номером CAS: 2254826-95-2, опубликованным 7 января 2019.

Выражение "по существу чистый" относится к веществу, имеющему общую чистоту более 90%, или более 95%, или более 96%, или более 97%, или более 98%, или более 99% или более 99,5%. Например, выражение "по существу чистое вещество А" означает, что вещество А имеет чистоту по меньшей мере 90% в отношении всех примесей, или вещество А имеет чистоту по меньшей мере 95% в отношении всех примесей, или вещество А имеет чистоту по меньшей мере 98% в отношении всех примесей, или вещество А имеет чистоту по меньшей мере 99% в отношении всех примесей.

В одном варианте осуществления чистоту образца измеряют любым аналитическим методом. В одном варианте чистоту измеряют с помощью ВЭЖХ, рентгеновской порошковой дифракции (XRPD), анализа рКа, микроскопии в поляризованном свете (PLM), термогравиметрического анализа/дифференциального термического анализа (ТГ/ДТА), дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FT-IR), динамической сорбции пара (ДСП), порошковой рентгеновской дифрактометрии с переменной температурой и влажностью (VT-VH-

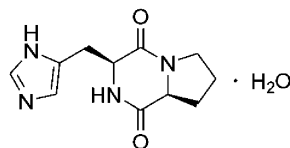
XRPD), ^1H ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и/или ЯМР с гетероядерной одноквантовой когерентностью (HSQC).

В некоторых вариантах осуществления термин "по существу такой, как показано в" при отсылке к картине рентгеновской порошковой дифракции или картине дифференциальной сканирующей калориметрии означает картину, которая не обязательно идентична той, которая изображена в настоящем документе, но находится в пределах экспериментальной ошибки или отклонения при рассмотрении специалистом в данной области техники.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, которое достаточно для осуществления лечения, как определено ниже, при введении человеку, нуждающемуся в таком лечении. Терапевтически эффективное количество будет варьироваться в зависимости от субъекта-человека, которого лечат, массы тела и возраста субъекта-человека, тяжести патологического состояния, способа введения и тому подобного, что может легко определить специалист в данной области техники.

В) Введение.

Настоящее изобретение направлено на новое соединение гидрат ЦГП, его применение и получение. Оно проиллюстрировано ниже.



7 января 2019 гидрату ЦГП был присвоен регистрационный номер CAS (CAS RN): 2254826-95-2 с названием в индексе СА: Пирроло[1,2-а]пиазин-1,4-дион, гексагидро-3-(1H-имидазол-5-илметил)-, гидрат (1:1), (3S, 8aS)-. Гидрат ЦГП имеет молекулярную массу 252,3 г/моль.

Специалист в данной области понимает, что структура соединения может быть названа или идентифицирована с использованием других общепризнанных систем номенклатуры и символов. В качестве примера, соединение может быть названо или идентифицировано общими названиями, систематическими или несистематическими названиями. Системы номенклатуры и символы, которые обычно распознаются в области химии, включая, помимо прочего, Химическую реферативную службу (CAS) и Международный союз теоретической и прикладной химии (IUPAC). Соответственно, представленная выше структура соединения, идентифицированного как пирроло[1,2-а] пиазин-1,4-дион, гексагидро-3-(1H-имидазол-5-илметил)-, гидрат (1:1), (3S, 8aS)- согласно CAS, может быть обозначена другими названиями, эквивалентными этому обозначению CAS.

С) Общая характеристика гидрата ЦГП.

В одном варианте осуществления гидрат ЦГП имеет картину рентгеновской порошковой дифракции (XRPD), которая включает характеристические пики при примерно $13,7^\circ 2\theta$, $17^\circ 2\theta$ и примерно $27,3^\circ 2\theta$. В некоторых вариантах осуществления картина рентгеновской порошковой дифракции дополнительно включает любой один или несколько характеристических пиков при примерно $10^\circ 2\theta$, примерно $13,7^\circ 2\theta$, примерно $17^\circ 2\theta$, примерно $18,1^\circ 2\theta$ и $24,5^\circ 2\theta$.

В некоторых вариантах осуществления гидрат ЦГП имеет температуру плавления примерно от 170 до 172°C . В одном варианте гидрат ЦГП имеет картину рентгеновской порошковой дифракции, которая включает любой один или несколько характеристических пиков при примерно $10^\circ 2\theta$, примерно $13,7^\circ 2\theta$, примерно $17^\circ 2\theta$, примерно $18,1^\circ 2\theta$, примерно $20,2^\circ 2\theta$ и примерно $27,3^\circ 2\theta$.

Следует понимать, что относительные интенсивности XRPD могут варьироваться в зависимости от ряда факторов, включая подготовку образца, установку, а также инструмент и аналитическую процедуру и настройки, используемые для получения спектра. Таким образом, предполагается, что перечисленные здесь отнесения пиков охватывают и вариации на плюс или минус $0,2^\circ 2\theta$.

В других вариантах осуществления гидрат ЦГП характеризуется температурой начала плавления, определенной с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии, примерно 170°C . В еще одних вариантах осуществления гидрат ЦГП, по существу, не содержит растворителя.

В некоторых вариантах осуществления гидрата ЦГП применяется по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или все из следующих пунктов (a)-(f):

- (a) гидрат ЦГП практически не содержит растворителя;
- (b) гидрат ЦГП является кристаллическим;
- (c) гидрат ЦГП имеет порошковую дифрактограмму, по существу, такую, как показано на фиг. 2(b);
- (d) гидрат ЦГП имеет термограмму дифференциальной сканирующей калориметрии, по существу, такую, как показано на фиг. 19-21;
- (e) гидрат ЦГП имеет температуру начала плавления, определенную методом дифференциальной сканирующей калориметрии, примерно 170°C ; и
- (f) гидрат ЦГП стабилен в условиях хранения при комнатной температуре.

В некоторых вариантах осуществления гидрат ЦГП обладает по меньшей мере одним, по меньшей мере двумя или всеми из следующих свойств:

(а) характер рентгеновской порошковой дифракции является, по существу, таким, как показано на фиг. 2(b);

(b) термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии является, по существу, такой, как показано на фиг. 19-21; и

(с) температура начала плавления, определенная с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии, составляет примерно 170°C.

В некоторых вариантах осуществления гидрат ЦГП имеет картину рентгеновской порошковой дифракции, включающую по меньшей мере два из самых больших пиков, как на картине рентгеновской порошковой дифракции, показанной на фиг. 2(b). В некоторых вариантах осуществления гидрат ЦГП имеет картину рентгеновской порошковой дифракции, включающую по меньшей мере три из самых больших пиков, как на картине рентгеновской порошковой дифракции, как показано на фиг. 2(b). В некоторых вариантах осуществления гидрат ЦГП имеет картину рентгеновской порошковой дифракции, включающую по меньшей мере четыре из самых больших пиков, как на картине рентгеновской порошковой дифракции, показанной на фиг. 2(b). В некоторых вариантах осуществления гидрат ЦГП имеет картину рентгеновской порошковой дифракции, включающую по меньшей мере пять из самых больших пиков, как на картине рентгеновской порошковой дифракции, показанной на фиг. 2(b). В некоторых вариантах осуществления гидрат ЦГП имеет картину рентгеновской порошковой дифракции, включающую по меньшей мере шесть из самых больших пиков, как на картине рентгеновской порошковой дифракции, показанной на фиг. 2(b).

D) Фармацевтические композиции.

В одном из вариантов осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая, по существу, чистое соединение структуры 2 и фармацевтически приемлемый носитель. Например, фармацевтическая композиция может содержать, по существу, чистое соединение структуры 2 в количестве примерно от 1 до 20% (мас.%) (т.е. примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9%, примерно 10%, примерно 11%, примерно 12%, примерно 13%, примерно 14%, примерно 15%, примерно 16%, примерно 17%, примерно 18%, примерно 19%, примерно 20%) от общего количества фармацевтической композиции. В качестве дополнительного примера фармацевтическая композиция может содержать соединение структуры 2 в количестве примерно от 1 до 100%, примерно от 1 до 10%, примерно от 10 до 20%, примерно от 20 до 30%, примерно от 30 до 40%, примерно от 40 до 50%, примерно от 50 до 60%, примерно от 60 до 70%, примерно от 70 до 80%, примерно от 80 до 90%, примерно от 90 до 100% (мас.%) от общего количества фармацевтической композиции. Например, фармацевтическая композиция может содержать соединение структуры 2 в количестве примерно от 1 до 40% (мас.%) от общего количества фармацевтической композиции. В конкретном примере фармацевтическая композиция может содержать соединение структуры 2 в количестве примерно 4% (мас.%) от общего количества фармацевтической композиции.

В другом варианте осуществления предлагается фармацевтическая композиция, содержащая, по существу, чистое соединение структуры 2, другой терапевтически активный агент и фармацевтически приемлемый носитель. В одном варианте осуществления активный агент выбран из биомолекулы, биоактивного агента, малой молекулы, лекарства, пролекарства, производного лекарственного средства, белка, пептида, вакцины, адъюванта, агента визуализации (например, флуоресцентного фрагмента), полинуклеотида или металла. В еще одном варианте осуществления активным агентом является цинк.

В одном варианте осуществления лекарственная субстанция структуры 2 соответствует рекомендациям ICH по чистоте Q.2A для уровней примесей в ЦГП.

В другом варианте осуществления композиция по настоящему изобретению может быть введена множеством способов, в том числе пероральным, местным, парентеральным, внутривенным, интравенным, внутримышечным, ректальным, внутримышечным или интраперитонеальным способом.

Композиция может быть составлена для парентерального введения путем инъекции, например путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Составы для инъекций могут быть представлены в виде стандартной лекарственной формы в ампулах или в многодозовых контейнерах с необязательным добавлением консерванта. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы для многократных доз, изготовленные из стекла, пластика и т.п. Состав может иметь такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях, и может содержать такие агенты, как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты.

Например, парентеральный препарат может представлять собой стерильный раствор или суспензию для инъекций в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе. Приемлемые носители и растворители, которые можно использовать, включают воду, 0,9% солевой раствор или другие подходящие водные среды.

В одном варианте осуществления концентрация внутривенного "раствора" составляет примерно от 200 мг/мл, примерно от 5 до 150 мг/мл, примерно от 10 до 100 мг/мл. В другом варианте осуществления концентрация внутривенного раствора составляет примерно 1 мг/л, примерно 2 мг/л, примерно 3 мг/л, примерно 4 мг/л, примерно 5 мг/л, примерно 6 мг/л, примерно 7 мг/л, примерно 8 мг/л, примерно 9 мг/л, примерно 10 мг/л, примерно 11 мг/л, примерно 12 мг/л, примерно 13 мг/л, примерно 14 мг/л, при-

мерно 15 мг/л, примерно 20 мг/л, примерно 25 мг/л, примерно 30 мг/л, примерно 35 мг/л, примерно 40 мг/л, примерно 45 мг/л, примерно 50 мг/л, примерно 55 мг/л, примерно 60 мг/л, примерно 65 мг/л, примерно 70 мг/л, примерно 75 мг/л, примерно 80 мг/л, примерно 85 мг/л, примерно 90 мг/л, примерно 95 мг/л, примерно 100 мг/л, примерно 110 мг/л, примерно 120 мг/л, примерно 130 мг/л, примерно 140 мг/л, примерно 150 мг/л, примерно 160 мг/л, примерно 170 мг/л, примерно 180 мг/л, примерно 190 мг/л или примерно 200 мг/л.

В другом варианте осуществления композиция может быть приготовлена в виде диффузионного (для медленного капельного введения) состава или внутривенной болюсной инъекции.

В еще одном варианте осуществления соединение структуры 2 можно вводить перорально или в составе для перорального применения. Применение может быть в виде таблеток и капсул с немедленным высвобождением, таблеток с энтросолюбильным покрытием и т.п. При изготовлении фармацевтических композиций, которые включают по меньшей мере одно соединение, описанное в настоящей заявке, активный ингредиент обычно разбавляют наполнителем и/или заключают в такой носитель, который может быть в форме капсулы, саше, бумажного или другого контейнера. Когда вспомогательное вещество служит разбавителем, оно может быть в форме твердого, полутвердого или жидкого материала, который действует как растворитель, носитель или среда для активного ингредиента. Таким образом, композиции могут быть в форме таблеток, пилюль, порошков, пастилок, саше, облаток, эликсиров, суспензий, эмульсий, растворов, сиропов, аэрозолей (в твердой или в жидкой среде), мазей, мягких и твердых желатиновых капсул, стерильных растворов для инъекций и порошков в стерильной упаковке.

Некоторые примеры подходящих вспомогательных веществ включают лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, крахмалы, аравийскую камедь, фосфат кальция, альгинаты, трагакант, желатин, силикат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, поливинилпирролидон, целлюлозу, воду по Фармакопее США или стерильную воду, основу сиропа и метилцеллюлозу. Композиции могут дополнительно включать смазки, такие как тальк, стеарат магния и стеариновая кислота; смачивающие агенты; эмульгаторы и суспендирующие агенты; консерванты, такие как метил- и пропилгидроксibenzoаты; подсластители; и ароматизаторы.

В некоторых вариантах осуществления композиции составлены в виде единичной лекарственной формы. Термин "единичные лекарственные формы" относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для людей и других млекопитающих, где каждая единица содержит предопределенное количество активного материала (терапевтически эффективное количество), рассчитанное для получения необходимого терапевтического эффекта, в комбинации с подходящим фармацевтическим вспомогательным веществом (например, в виде таблетки, капсулы, ампулы). Соединения обычно применяют в фармацевтически эффективном количестве. В некоторых вариантах осуществления каждая единичная доза содержит примерно от 1 до 100 мг соединения структуры 2. В некоторых вариантах осуществления каждая единичная доза содержит примерно от 2 до 60 мг, примерно от 3 до 50 мг, примерно от 4 до 40 мг, примерно от 5 до 30 мг, примерно от 6 до 20 мг, примерно от 8 до 15 мг или примерно от 8 до 10 мг соединения структуры 2.

В других вариантах осуществления каждая единичная доза содержит примерно 1 мг, примерно 2 мг, примерно 3 мг, примерно 4 мг, примерно 5 мг, примерно 6 мг, примерно 7 мг, примерно 8 мг, примерно 9 мг, примерно 10 мг, примерно 11 мг, примерно 12 мг, примерно 13 мг, примерно 14 мг, примерно 15 мг, примерно 16 мг, примерно 17 мг, примерно 18 мг, примерно 19 мг, примерно 20 мг, примерно 30 мг, примерно 40 мг, примерно 50 мг, примерно 60 мг, примерно 70 мг, примерно 80 мг, примерно 90 мг или примерно 100 мг соединения структуры 2.

В одном из вариантов осуществления субъект получает одну или несколько единичных доз в сутки. В еще одном варианте осуществления субъект получает 15 мг соединения структуры 2 в сутки.

Для приготовления твердых композиций, таких как таблетки, активный главный ингредиент смешивают с фармацевтическим вспомогательным веществом с образованием твердой смешанной композиции, содержащей гомогенную смесь соединения по настоящему изобретению. Когда эти смешанные композиции называются гомогенными, это означает, что активный ингредиент равномерно диспергирован по всей композиции, так что композицию можно легко разделить на одинаково эффективные единичные лекарственные формы, такие как таблетки, пилюли и капсулы.

Таблетки или пилюли по настоящему изобретению могут иметь порошковое покрытие или могут быть составлены иным образом для получения лекарственной формы, обеспечивающей преимущество пролонгированного действия или для защиты от кислотной среды желудка. Например, таблетка или пилюля может содержать внутренний компонент дозы и внешний компонент дозы, причем последний находится в форме оболочки, покрывающей первый компонент. Два компонента могут быть разделены энтэро-растворимым слоем, который служит для предотвращения распада в желудке и позволяет внутреннему компоненту проходить в двенадцатиперстную кишку неповрежденным или задерживать высвобождение. Для таких энтэро-растворимых слоев или покрытий можно использовать различные материалы, включающие ряд полимерных кислот и смесей полимерных кислот с такими материалами, как шеллак, цетиловый спирт и ацетат целлюлозы. В одном варианте осуществления пленочное покрытие представляет собой покрытие на основе поливинилового спирта.

Соединения, используемые в композициях и способах, включают описанные в настоящей заявке соединения в любой из их фармацевтически приемлемых форм, включая изомеры, такие как диастереомеры и энантиомеры, соли, сольваты и полиморфы, а также рацемические смеси и чистые изомеры описанных в настоящей заявке соединений, где это применимо.

Подходящие вспомогательные вещества включают связующие агенты, наполнители, дезинтегранты, lubricants, антиоксиданты, хелатирующие агенты и красители.

В табл. 1 представлены примеры составов для пероральных лекарственных форм, включающие (в расчете на содержание в мас.% указанных ингредиентов).

Таблица 1. Примеры составов для пероральных лекарственных форм включают (на основе содержания в мас.% установленных ингредиентов).

Ингредиент	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Гидрат ЦГП	85	70	60	50	40	30	20	10	5	2
Связующий агент	9	10	20	30	30	40	40	40	40	40
Дезинтегрант	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Лубрикант	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Наполнитель	0	14	14	14	24	24	34	44	49	52

Е) Приготовление гидрата ЦГП.

В некоторых вариантах осуществления гидрат ЦГП получают путем кристаллизации. Ангидрат ЦГП растворяли в 2-2,5 объемах смеси этанол/вода или ацетон/ вода при 50°C, а затем систему охлаждали до 35°C. Затем добавляли 0,5 объемов метил-трет-бутилового эфира (МтБЭ), а затем добавляли 0,5% затравки (гидрата ЦГП). После перемешивания в течение 2 ч систему охлаждали до 5°C за 2 ч. Наконец, в течение 8 ч добавляли 7 об. МтБЭ, а затем перемешивали в течение 8 ч.

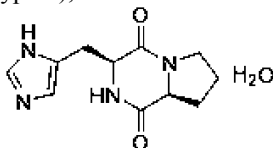
Оценки растворимости, проведенные для партии образца 1 ЦГП, показали высокую растворимость во всех смесях растворителей, содержащих воду, за исключением смесей этанол:вода:МтБЭ с наивысшим процентным содержанием МтБЭ. Особенно высокая растворимость наблюдалась в смесях вода:ацетон. Материал плохо растворим в ацетоне, ацетонитриле и ТГФ (≤ 10 мг/мл). Эксперименты по двухточечной растворимости показали, что из двух оцененных систем растворителей (этанол:вода:МтБЭ и ацетон:вода) смесь этанол:вода:МтБЭ позволила получить немного лучший выход, но был риск формирования структуры 1; тогда как смесь ацетон:вода позволяла получить исключительно структуру 2, но существовал риск снижения выхода.

Были проведены две серии мелкомасштабных испытаний по кристаллизации (масштаб 500 мг) с использованием ЦГП структуры 1. В первой серии использовали систему растворителей ацетон: вода, а во второй серии - систему растворителей этанол:вода:МтБЭ. Антирастворитель добавляли при 5°C или 50°C. Структура 2 была получена исключительно с помощью XRPD независимо от системы растворителей или температуры добавления антирастворителя. Система этанол: вода/МтБЭ давала более крупные частицы, особенно когда твердое вещество выделяли при более высокой температуре (50°C). Потеря растворителя из-за испарения (особенно в смеси этанол: вода: МтБЭ) привела к гораздо более низкому расчетному выходу по сравнению с массой твердого вещества, извлеченного после фильтрации.

В этих исследованиях развития кристаллизации изучали комбинацию протоколов охлаждения и добавления антирастворителей с целью получения хороших показателей выхода и однородности частиц. Эти исследования показали, что в масштабе 20 г с использованием 2% загрузки измельченной затравки и поэтапного добавления антирастворителей применение восьмичасового периода выдержки при 29°C с последующим охлаждением до 5°C оказалось наиболее перспективным протоколом в отношении однородности частиц (при оценке с помощью световой микроскопии и FBRM) и выхода.

Ф) Рентгеновская порошковая дифракция (XRPD).

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к, по существу, чистому соединению цикло(-Гис-Про) гидрату (структуре 2), как показано ниже.



которое характеризуется дифрактограммой XRPD, содержащей пики примерно 17° и примерно 27,3° ($\pm 0,2^\circ 2\theta$).

Один вариант осуществления, по существу, чистой структуры 2 характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, содержащей по меньшей мере три пика, выбранных из следующего списка: 13,7; 17; 18,1; 20,2 и 27,3 градуса ($\pm 0,2^\circ 2\theta$). Другой вариант осуществления характеризуется дифракто-

граммой XRPD, содержащей по меньшей мере два пика, выбранных из следующего списка: 10; 13,7; 17; 18,1; 20,2 и 27,3 градуса ($\pm 0,2^\circ 2\theta$).

G) Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) или ^{13}C SSNMR.

В одном варианте осуществления спектр ^1H ЯМР структуры 2 показывает следующие химические сдвиги: ^1H ЯМР (400 МГц; D_2O) δ 7,58 (d; 1H; $J = 3,2$ Гц); 6,82 (d; 1H; $J = 3,2$ Гц); 4,42 (m; 1H); 4,12 (m; 1H); 3,36-3,47 (m; 2H); 3,05 - 3,09 (m; 2H); 2,12 (br; 1H); 1,80 - 1,84 (m; 2H); 1,37 - 1,40 (m; 1H).

В одном варианте осуществления гидрат ЦГП из настоящего изобретения демонстрирует, по существу, такой же спектр ^1H -ЯМР, что и безводный ЦГП в растворителе ДМСО- d_6 . Сюда входят следующие значения: 1,7 ppm (m; 3H); 2,1 ppm (m; 1H); 2,5 ppm (s; 3H); 3,2 ppm (d; 1H); 3,5 ppm (m; 1H); 4,2 ppm (m; 2H); 7,0 ppm (s; 1H); 7,6 ppm (s; 1H); 8,1 ppm (s; 1H).

H) Инфракрасная спектроскопия соединений в твердой фазе.

В одном варианте осуществления инфракрасный спектр твердой структуры 2 имеет сигналы на 3457, 3411 (m); 3292, 3211 (m); 2976; 1658; 1633 (m); и 1445-1424 (m) cm^{-1} .

I) Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК).

В другом варианте осуществления изобретения было обнаружено, что начало эндотермы структуры 2 лежит примерно на $100 \pm 2^\circ\text{C}$ и $171 \pm 2^\circ\text{C}$. В других вариантах осуществления структура 2 (гидрат ЦГП) по настоящему изобретению показывает начало эндотермы при температуре примерно от 75°C до 100°C .

J) Динамическая сорбция пара (ДСП).

В еще одном варианте осуществления динамическая сорбция пара структуры 2 показывает одно или несколько из следующего:

дегидратация при относительной влажности 10% с потерей массы $6 \pm 0,2\%$ и регидратация при относительной влажности от 0 до 40% при 40°C ;

дегидратация при относительной влажности ниже 20% с потерей массы $6 \pm 0,2\%$ и регидратация при относительной влажности от 0 до 40% при 50°C ; и

дегидратация при относительной влажности ниже 20% с потерей массы $7 \pm 0,2\%$ и регидратация при относительной влажности от 0 до 40% при 60°C .

В других вариантах осуществления гидрат ЦГП согласно настоящему изобретению демонстрирует потерю массы примерно от 3 до 9%, или примерно от 4% до 8,5%, или примерно от 5% до 8%. В других вариантах осуществления гидрат ЦГП из настоящего изобретения демонстрирует потерю массы примерно от 5,5 до 7,3%.

В еще одном варианте осуществления гидрат ЦГП по настоящему изобретению демонстрирует потерю массы примерно от 5,8 до примерно 7,0%.

K) Термогравиметрический анализ (ТГА).

В другом варианте осуществления ТГА структуры 2 показывает потерю массы $6 \pm 0,5\%$ до разложения.

В других вариантах осуществления гидрат ЦГП по настоящему изобретению проявляет по меньшей мере одно эндотермическое событие при температуре примерно $75-85^\circ\text{C}$, которое представляет собой потерю воды. В другом варианте осуществления гидрат ЦГП из настоящего изобретения проявляет по меньшей мере одно экзотермическое событие при температуре примерно от 115 до 120°C , которое является событием перекристаллизации в структуру 1.

L) Температура плавления.

В другом варианте осуществления температура плавления структуры 2 составляет $170 \pm 2^\circ\text{C}$.

M) Измерение ширины метастабильной зоны (MSZW).

В еще одном варианте осуществления отсутствие преципитации при 0% МтБЭ указывает на то, что для того, чтобы произошла кристаллизация, требуется добавление антирастворителя. При 10% МтБЭ наблюдалась ширина метастабильной зоны примерно $43,2^\circ\text{C}$. При 20% МтБЭ ЦГП оставался в растворе до тех пор, пока исходная концентрация не достигала >100 мг/мл. Ширина метастабильной зоны для экспериментов с 325 и 425 мг/мл была определена как примерно $35,2^\circ\text{C}$ и примерно $30,7^\circ\text{C}$, соответственно. Увеличение содержания МтБЭ до 30 об.% дало MSZW примерно $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (при 325 мг/мл). Кроме того, при 60% МтБЭ MSZW составила $51,4^\circ\text{C}$ (при 100 мг/мл). При 80% МтБЭ образцы, приготовленные с концентрацией 100 мг/мл и 425 мг/мл, оставались в виде суспензий на протяжении всего эксперимента, даже при более высоких температурах. В ходе анализа ширины метастабильной зоны была отмечена тенденция, согласно которой для получения четкой точки требовалась температура примерно $56-61^\circ\text{C}$.

P) Способы лечения.

Соединение структуры 2 по настоящему изобретению можно использовать в терапевтически эффективных количествах для лечения различных заболеваний и расстройств, таких как диабет и другие метаболические заболевания, нейродегенеративные заболевания, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, острая почечная недостаточность (ОПН), хроническая почечная недостаточность (ХПН), фиброз почек; для обеспечения цитопротекции против окислительного повреждения, для подавления воспалительных реакций в клеточной линии PC12 и в качестве средства для подавления аппетита.

Примеры

Следующие примеры включены, чтобы продемонстрировать определенные варианты осуществления настоящего изобретения. Однако специалисты в данной области техники должны, в свете настоящего изобретения, принять во внимание, что возможны определенные модификации в конкретных раскрытых вариантах осуществления, и при этом может быть получен аналогичный или схожий результат без отклонения от сущности и объема изобретения. Следовательно, всю изложенную информацию следует интерпретировать как иллюстративную, а не в ограничивающем смысле.

Пример 1. Преобразование структуры 1 (безводного ЦГП) в структуру 2 (гидрат ЦГП).

2 г материала структуры 1 (серия № PS00726-55-D) растворяли в 1 мл воды при 80°C. Чтобы противодействовать значительному испарению, добавляли еще 1 мл воды. При 80°C получали прозрачный темно-коричневый раствор. Затем раствор быстро охлаждали до 50°C и к раствору добавляли 9,5 объемов (19 мл) ацетона с получением бледно-желтого раствора. Не было обнаружено замасливания или осадка. Раствор охлаждали до комнатной температуры, в результате чего выпадало заметное количество твердого осадка. Раствор охлаждали до 6°C (для повышения выхода) и суспензию фильтровали. Твердое вещество сушили на фильтре для предотвращения дегидратации. Поскольку дегидратация до структуры 1 происходит при 80°C или выше в вакууме, сушка при 50°C в вакууме считалась безопасной для сохранения структуры 2. XRPD анализ подтвердил, что продукт представляет собой структуру 2 с выходом примерно 72%.

Партию гидрата ЦГП анализировали различными методами, включая порошковую рентгеновскую дифракцию (XRPD), анализ рКа, микроскопию в поляризованном свете (PLM), термогравиметрический анализ/дифференциальный термический анализ (ТГ/ДТА), дифференциальную сканирующую калориметрию (ДСК), инфракрасную спектроскопию с преобразованием Фурье (FT-IR), динамическую сорбцию пара (ДСП), порошковую рентгеновскую дифрактометрию с переменной температурой и влажностью (VT-VH-XRPD), ¹H ядерный магнитный резонанс (ЯМР) и ЯМР с гетероядерной одиночной квантовой когерентностью (HSQC).

А) Рентгеновская порошковая дифракция (XRPD).

XRPD-анализ проводили на PANalytical X'pert pro, сканируя образцы от 3 до 35° 2 θ . Материал осторожно измельчали, чтобы высвободить агломераты, и загружали на многолуночный планшет с пленкой из каптона или майлара для поддержания образца. Затем многолуночный планшет помещали в дифрактометр и анализировали с использованием излучения Cu K ($\alpha_1 \lambda = 1,54060 \text{ \AA}$; $\alpha_2 = 1,54443 \text{ \AA}$; $\beta = 1,39225 \text{ \AA}$; отношение $\alpha_1 : \alpha_2 = 0,5$) в режиме просвечивания (размер шага 0,0130° 2 θ) с использованием настроек генератора 40 кВ/40 мА.

Как показано на фиг. 1, партия была кристаллической по данным XRPD и была обозначена как структура 1. XRPD-анализ проводили на образце 5 г гидрата ЦГП. Образец взвешивали в стеклянной пробирке и добавляли 6 мл смеси этанол/вода 90:10 для получения суспензии. Затем смесь перемешивали в течение примерно 24 ч при температуре окружающей среды и затем анализировали с помощью XRPD. Как показано на фиг. 2, этот материал был подтвержден как структура 2 (фиг. 2(b)). Как показано на фиг. 3, анализ структуры 2 после ДСП не показал изменения формы при 40% относительной влажности после ДСП. Как показано на фиг. 4, анализ структуры 2 показал, что после ДСП при различных температурах (VT-DVS) материал представлял собой смесь структур 1 и 2. Как показано на фиг. 5, примерно 30 мг структуры 2 (черная линия, фиг. 5) хранили в трех условиях в течение семи дней: при 40°C/75% относительной влажности, при 80°C, и при естественном освещении. Анализ XRPD был проведен для оценки изменений в форме материала. Через семь дней никаких изменений не наблюдалось в образцах, хранившихся при 40°C/75% относительной влажности (синяя линия, фиг. 5), и в образцах, хранившихся при естественном освещении (зеленая линия, фиг. 5). Образец, хранившийся при 80°C, преобразован в структуру 1 (красная линия, фиг. 5). Как показано на фиг. 7, образец структуры 2 (синяя линия на фиг. 7) был возвращен в вакуумную печь еще на 30 мин. Анализ XRPD (фиолетовая линия на фиг. 7) показал, что материал все еще был преимущественно структурой 2 с некоторыми пиками структуры 1.

Как показано на фиг. 6, гидрат ЦГП (структуру 2) взвешивали в стеклянном сосуде и помещали в вакуумную печь с температурой 50°C на 1 час. Анализ XRPD (зеленая линия) показал, что материал все еще был преимущественно структурой 2 с некоторыми пиками структуры 1.

Как показано на фиг. 8, вводимый материал с фиг. 5 (черная линия) был возвращен в печь, в которой температура была повышена до 80°C. Флакон помещали в печь еще на 18 ч. Анализ XRPD (розовая линия) показал, что материал представлял собой смесь структур 1 и 2. Был дополнительный пик при 8° 2 θ , который ранее не наблюдался ни в одной структуре. Как показано на фиг. 9, структуру 2 с фиг. 5 сушили в течение трех различных периодов времени, а результаты анализировали с помощью XRPD. Сушка образца при 50°C в течение 1 ч дала структуру 2 с пиками структуры 1 (зеленая линия), сушка образца при 50°C в течение 90 мин также произвела структуру 2 с пиками структуры 1 (фиолетовая линия), и сушка образца при 80°C в течение 18 ч произвела смесь структуры 1 и структуры 2 (розовая линия).

На фиг. 34 обобщены различные условия, при которых структура 2 меняется на структуру 1. Обработка образца структуры 2 (черная линия, фиг. 34) при 80°C и 0% относительной влажности (цикл 2,

красная линия) вызывает преобразование структуры 2 в структуру 1 в течение 20 мин (цикл 3, синяя линия), в то время как она остается как структура 2 при относительной влажности 0% и температуре окружающей среды даже через 1 час (красная линия). Структура 2 стабильна при температуре окружающей среды и относительной влажности 40% (цикл 1, коричневая линия).

В) Анализ рКа.

Анализ рКа проводили на структуре 1 с помощью потенциометрического метода, который представляет собой кислотно-основное титрование для определения точки рКа.

Как показано на фиг. 10, анализ безводного ЦГП (структура 1) привел к значению рКа, равному 6,4.

С) Оптическая микроскопия (в неполяризованном свете) и микроскопия в поляризованном свете (PLM).

Оптическую микроскопию осуществляли визуально с использованием калиброванного нагревательного столика Linkam THM600 с подключенным блоком управления, соединенным с поляризационным микроскопом Olympus BX50, оснащенным камерой Motic и программным обеспечением для захвата изображений (Motic Images Plus 2.0). Приблизительно 0,5 мг материала помещали на покровное стекло микроскопа и нагревали со скоростью 10°C/мин с изображениями, получаемыми через обычные интервалы для документирования любых тепловых переходов. Все изображения были записаны с использованием объектива 10х, если не указано иное.

(PLM) анализ выполняли с использованием поляризационного микроскопа Olympus BX50, оснащенного камерой Motic и программным обеспечением для захвата изображений (Motic Images Plus 2.0). Все изображения были записаны с использованием объектива 20х, если не указано иное. Наличие кристалличности (двойного лучепреломления) определяли с помощью PLM. Поляризованный световой микроскоп предназначен для наблюдения и фотографирования образцов, которые видны в первую очередь из-за их оптически анизотропных свойств.

Фиг. 11 (неполяризованный микроскоп) и 12 (микроскоп для анализа в поляризованном свете) показывают, что поставляемый ЦГП (в основном структура 1) был двулучепреломляющим без четкой морфологии. Как показано на фиг. 13, структура 2 была двулучепреломляющей с фрагментированной стержнеобразной морфологией. В других вариантах осуществления гидрат ЦГП (структура 2) из настоящего раскрытия демонстрирует фрагментированную стержнеобразную морфологию при PLM.

Д) Термогравиметрический анализ/дифференциальный термический анализ (ТГ/ДТА).

Приблизительно 5 мг материала взвешивали в открытой алюминиевой чашке и загружали в синхронный термогравиметрический/дифференциальный термический анализатор Seiko 6200/7200 (ТГ/ДТА) и выдерживали при комнатной температуре. Затем образец нагревали со скоростью 10°C/мин от 20°C до 300°C, в течение этого времени регистрировали изменение массы образца вместе с любыми дифференциальными тепловыми событиями (ДТА). В качестве продувочного газа использовали азот при расходе 300 см³/мин.

Как показано на фиг. 14, анализ ТГА структуры 1 выявил начальную потерю массы 0,6% (0,08 экв. воды) приблизительно при 75-85°C. Эти 0,6% воды были отнесены к несвязанной поверхностной воде. Наблюдались еще две потери массы: 0,2 и 0,3% (0,03 и 0,04 экв. воды, соответственно), прежде чем образец разложился примерно на уровне 260°C. Первая потеря массы может быть обусловлена небольшим количеством материала структуры 2, смешанного с материалом, потерявшим воду и превратившимся в структуру 1. Это количество оценивается как 8% на основе потери массы. Вторая потеря воды при температуре примерно 100°C может быть связана с испарением несвязанной поверхностной воды. ДТ-анализ выявил одно резкое эндотермическое событие с началом 170°C и пиком при 172°C.

Как показано на фиг. 15, анализ ТГА структуры 2 показал начальную потерю массы 6,5% (0,9 эквивалента воды) с последующим разложением образца примерно при 280°C. Регистрация ДТ идентифицировала эндотермическое событие, связанное с начальной потерей массы. За этим последовало экзотермическое событие (перекристаллизация в структуру 1) при 118°C. Второй эндотермический эффект, который считается расплавлением образца, наблюдался при 170°C, и пик при 172°C. В других вариантах осуществления гидрат ЦГП из настоящего изобретения проявляет по меньшей мере одно эндотермическое событие примерно при 75-85°C, которое представляет собой потерю воды. В другом варианте осуществления гидрат ЦГП настоящего раскрытия проявляет по меньшей мере одно экзотермическое событие при температуре примерно от 115°C до примерно 120°C, которое является событием перекристаллизации в структуру 1.

Е) Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК).

ДСК проводили, добавляя приблизительно 5 мг материала, который взвешивали в алюминиевой чашке для ДСК и негерметически закрывали алюминиевой крышкой с отверстиями. Затем чашку для образцов загружали в Seiko DSC6200 (оборудованный охладителем), охлаждали и выдерживали при 20°C. После получения стабильного отклика теплового потока образец и эталон нагревали до 250°C со скоростью сканирования 10°C/мин и отслеживали полученную реакцию теплового потока. В качестве продувочного газа использовали азот при расходе 50 см³/мин.

Как показано на фиг. 16, первый тепловой цикл структуры 1 показал небольшую широкую эндотерму, начинающуюся при 75°C с пиком при 85°C. Это согласуется с потерей массы 0,6%, наблюдаемой

в ТГ/ДТА, как показано на фиг. 14. Второе, большое эндотермическое событие наблюдалось при 169°C с пиком при 171°C. Это согласуется с расплавлением, наблюдаемым в ТГ/ДТА. Первый широкий пик на фиг. 16 может быть вызван дегидратацией структуры 2 до структуры 1. Второй пик на фиг. 16 может быть расплавлением структуры 1.

Как показано на фиг. 17, в цикле охлаждения не наблюдалось никаких тепловых событий. Как показано на фиг. 18, очень маленький широкий пик, потенциальная точка стеклования, наблюдался примерно при 80°C во втором тепловом цикле.

Как показано на фиг. 19, первый тепловой цикл структуры 2 выявил эндотерму с началом 99°C и пиком при 102°C. Отмечено плавление образца, начиная с 170°C с пиком при 173°C. Это согласуется с данными, полученными в ТГ/ДТА. Как показано на фиг. 20, в цикле охлаждения структуры 2 тепловых событий не наблюдалось.

Как показано на фиг. 21, возможная точка стеклования наблюдалась во втором цикле нагрева при 77°C гидрата ЦГП.

В одном варианте осуществления гидрат ЦГП согласно настоящему изобретению проявляет начало эндотермы при температуре примерно от 75 до 100°C.

F) Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (FT-IR).

FT-IR проводили на спектрометре Bruker ALPHA P. Достаточное количество материала помещали в центр пластины спектрометра, и спектры были получены с использованием следующих параметров: разрешение: 4 см⁻¹, время сканирования фона: 16 сканирований, время сканирования образца: 16 сканирований, сбор данных: от 4000 до 400 см⁻¹, результирующий спектр: пропускание, и программное обеспечение: OPUS версии 6.

Как показано на фиг. 22, FT-IR структуры 2 соответствует химической структуре. Сплошной инфракрасный спектр структуры 2 отображает сигналы на 3457, 3411 (m); 3292, 3211 (m); 2976; 1658; 1633 (m); и 1445-1424 (m) см⁻¹. В других вариантах осуществления ЦГП и гидрат ЦГП из настоящего изобретения показывает, по существу, тот же ИК-спектр, который демонстрирует по меньшей мере девять полос примерно от 500 до 1660 см⁻¹. Структура 2 имеет валентное колебание на 3457 и 3411 см⁻¹ из-за воды (гидрата) в кристаллической решетке, а структура 1 не имеет.

G) Динамическая сорбция пара (ДСП).

ДСП выполняли, помещая образец приблизительно 10-20 мг в сетчатую чашу весов сорбции пара и загружая в динамические весы для сорбции пара DVS Intrinsic от Surface Measurement Systems. Образец подвергали линейному изменению от 40 до 90% относительной влажности (RH) с шагом 10%, выдерживая образец на каждом этапе до достижения стабильной массы (dm/dt 0,004%, минимальная длина шага 30 мин, максимальная длина шага 500 мин) при 25°C. После завершения цикла сорбции образец сушили, используя ту же процедуру, до 0% RH, а затем осуществляли второй цикл сорбции обратно до 40% RH. Было выполнено два цикла. Строили график изменения массы во время циклов сорбции/десорбции, что позволило определить гигроскопичность образца. Затем проводили XRPD-анализ любого оставшегося твердого вещества.

Как показано на фиг. 23, изотермический график ДСП структуры 1 показал увеличение массы на 6,3% при относительной влажности 60 до 90%, что указывает на преобразование в гидрат ЦГП, структуру 2. Как показано на фиг. 24, после превращения в структуру 2 материал выглядел лишь слегка гигроскопичным с максимальным поглощением 0,8 мас.% при относительной влажности от 0 до 90%, что, как предполагается, является поверхностной водой, а не частью кристаллической структуры. Это явление показано на фиг. 25, кинетический график ДСП структуры 1, который показывает, что структура 1 сначала гидратируется с образованием структуры 2, но не отдает воду во время фазы десорбции, указывая на то, что небольшое увеличение массы 0,8% не является частью твердой структуры.

Как показано на фиг. 26, анализ XRPD после ДСП структуры 1 показал новую форму, обозначенную как структура 2. Как показано на фиг. 27, анализ ТГ/ДТА после ДСП структуры 2 показал начальную потерю массы 6,8% (0,95 экв. воды) с последующим разложением образца примерно при 280°C. Кривая DT идентифицировала эндотермическое событие, связанное с потерей массы, за которым следовала перекристаллизация (до структуры 1), экзотермическое событие примерно при 120°C, затем расплавление с началом при 168°C и пиком при 172°C.

Структуру 2 ЦГП помещали в несколько условий с более высокой температурой для проверки дегидратации/регидратации при влажности 0-90%: 25°C (фиг. 28); 40°C (фиг. 30); 50°C (фиг. 31); и 60°C (фиг. 32).

Как показано на фиг. 28, изотермический график ДСП показал, что материал структуры 2 не изменился при относительной влажности от 40 до 90% и от 10 до 90%. Затем материал потерял 3,5 мас.% при относительной влажности ниже 10% и регидратировался при относительной влажности от 0 до 90%. Как показано на фиг. 29, кинетический график ДСП показывает, что гидрат ЦГП теряет 3,5% воды (красная линия) во время фазы десорбции от 80 до 0% относительной влажности за 500 мин. Как показано на фиг. 30, 31 и 32, структура 2 подвергается единственному циклу при 40, 50 и 60°C. Температура 40°C показала, что материал начал дегидратироваться при относительной влажности ниже 10%, теряя приблизительно 5,8 мас.% от 10 до 0% относительной влажности (0,8 экв. воды). Материал гидратировался при отно-

сительной влажности от 0 до 40% (фиг. 30). Температура 50°C показала, что материал начал дегидратироваться при относительной влажности ниже 20%, теряя примерно 6,1 мас.% от 20 до 0% RH (0,8 экв. воды). Материал повторно гидратировался от 0 до 40% RH (Фиг. 31). Анализ при 60°C показал, что материал начал дегидратироваться при относительной влажности ниже 20%, теряя примерно 7 мас.% от 20 до 0% RH (1,0 экв. воды). Материал повторно гидратировался от 0 до 40% RH (фиг. 32).

В других вариантах осуществления гидрат ЦГП согласно настоящему изобретению демонстрирует потерю массы примерно от 3 до 9%, или примерно от 4 до 8,5%, или примерно от 5 до 8%. В других вариантах осуществления гидрат ЦГП согласно настоящему изобретению демонстрирует потерю массы примерно от 5,5 до 7,3%.

В еще одном варианте осуществления гидрат ЦГП из настоящего изобретения демонстрирует потерю массы примерно от 5,8 до 7,0%.

Н) Порошковая рентгеновская дифрактометрия с переменной температурой и влажностью (VT-/VN-XRPD).

VT-ZVN-XRPD-анализ выполняли на материале структуры 2. Структура 2 присутствовала при начальном сканировании при относительной влажности 40% и комнатной температуре. Структура 2 оставалась для цикла 2, когда относительную влажность снижали до 0% при комнатной температуре. Температуру повысили до 80°C, и образец оставили на 20 мин перед сканированием. Полученная дифрактограмма предполагает, что полученный материал был чистой структурой 1. Чистая структура 1 оставалась через 80 мин при 80°C и 0% относительной влажности. Фиг. 33 иллюстрирует эти результаты.

Фиг. 34 показывает XRPD материала структуры 2 после различных VT/DVS. В других вариантах осуществления гидрат ЦГП из настоящего изобретения присутствует при относительной влажности от по меньшей мере примерно от 0 до 90% при комнатной температуре. В еще одном варианте осуществления 100% структуры 2 преобразуется в структуру 1 при 0% относительной влажности при 80°C.

И) ¹H Ядерный магнитный резонанс 1H (ЯМР).

ЯМР проводили с использованием спектрометра Bruker AVIIIHD, оборудованного криозондом DCH, работающим на частоте 500,12 МГц для протонов. Эксперименты проводили в дейтерированном ДМСО, и каждый образец готовили с концентрацией примерно 10 мМ. Спектр ¹H-ЯМР структуры 1 ЦГП (ДМСО-d₆) показывает, что результаты согласуются со структурой соединения (фиг. 35). Спектр ¹H-ЯМР структуры 2 (ДМСО-d₆) представлен на фиг. 36. Структура 2 и структура 1 ЦГП показали одинаковый спектр ЯМР, поскольку обе полностью растворены в растворителе. Как показано на фиг. 37, ЯМР проводили на высушенном материале, структура 2 (розовая линия на фиг. 9). Никаких изменений не наблюдалось в высушенном материале из исходного материала структуры 2.

В одном варианте осуществления гидрат ЦГП по настоящему изобретению проявляет, по существу, такой же профиль ¹H-ЯМР, что и безводный ЦГП в растворителе ДМСО-d₆.

Ж) ЯМР с гетероядерной одноквантовой когерентностью (HSQC).

HSQC-ЯМР проводили для структуры 2 с использованием оборудования Bruker для ЯМР 500 МГц. ДМСО-d₆ использовали в качестве растворителя образца ЯМР. Как показано на фиг. 38, результаты структуры 1 показали, что два химических сдвига C-H имидазола составляют 4,2 ppm.

Эксперимент HSQC-ЯМР проводили на высушенном материале, структуре 2 (розовая линия на фиг. 9). Как показано на фиг. 39, результаты показали, что высушенный материал (смесь структуры 1 и структуры 2) и ЯМР материала структуры 2 идентичны.

К) Лиофилизация.

Для скрининга растворимости: 330 мг структуры 1 ЦГП растворяли (при осторожном нагревании) в воде (3,3 мл) и распределяли поровну на 33 флакона. Затем эти флаконы замораживали при -50°C перед лиофилизацией в течение ночи. Широко известно, что при лиофилизации кристаллических соединений образуется аморфный материал, который обычно более растворим, чем кристаллические формы данного соединения.

Как показано на фиг. 40, материал, восстановленный после лиофилизации структуры 1, показал некоторые кристаллические пики при анализе с помощью XRPD. Заявитель полагает, что начальные пики указывают на смесь гидратов и безводных форм, смешанных с аморфными формами.

Для другого цикла лиофилизации каждый образец 10 мг, показанный на фиг. 40, повторно растворяли в 200 мкл воды. Флаконы снова замораживали при -50°C перед лиофилизацией в течение 72 ч. Материал, извлеченный после лиофилизации, был преимущественно аморфным по данным XRPD, как показано на фиг. 41.

Для испытания аморфизации: гидрат ЦГП (структуру 2) растворяли в дистиллированной воде. Этот раствор был поровну разделен на 26 стеклянных флаконов, и флаконы замораживали при -50°C для подготовки к лиофилизации. После замораживания образцы помещали в эксикаторы, прикрепленные к сублимационной сушилке, и сушили в течение приблизительно 48 ч. Как показано на фиг. 42, материал, извлеченный после лиофилизации структуры 2, был структурой 2 при анализе с помощью XRPD.

Для другого цикла аморфизации образцы повторно растворяли, добавляя 1 мл дистиллированной воды в каждый флакон. Затем растворы с помощью пипетки переносили в 26 стеклянных флаконов по 20 мл и заливали еще 15 мл дистиллированной воды. Флаконы замораживали при -50°C перед лиофилиза-

цией в течение приблизительно 48 ч. Через 48 ч образцы не были полностью лиофилизированы, и флаконы возвращали в эксикаторы и лиофилизировали в течение следующих 72 ч. Было обнаружено, что материал, проанализированный с помощью XRPD, все еще содержал пики структуры 2.

В других вариантах осуществления лиофилизация гидрата ЦГП из настоящего изобретения показывает, что структура 2 более стабильна, чем структура 1, и остается после аморфизации чистой по меньшей мере примерно на 10-40%. Л. Скрининг растворимости 33×10 мг образцы ЦГП структуры 1 (безводная форма) лиофилизировали во флаконах вместимостью 2 мл, и в каждый флакон добавляли 100 мкл различных систем растворителей. Между каждым добавлением смесь проверяли на растворение и, если растворения не наблюдали, смесь нагревали примерно до 40°C и проверку повторяли. После добавления 300 мкл растворителя добавляли аликвоты по 100 мкл. Эту процедуру продолжали до тех пор, пока не наблюдалось растворение или пока не было добавлено 1 мл растворителя. Если растворения не происходило, отделяли твердые вещества фильтрацией и проводили XRPD. Если происходило растворение, растворителю давали испариться и проводили XRPD для оставшегося твердого вещества.

На фиг. 43 представлена приблизительная растворимость структуры 1 в различных растворителях, а на фиг. 44 представлены результаты растворимости в растворителях структуры 1 в зависимости от объема добавленного растворителя. Как показано на фиг. 43 и 44, высокая растворимость наблюдалась в этаноле, метаноле, N,N-диметилацетамиде, воде, ДМСО, трифторэтаноле, 1-пропанолем и смесях метанол/вода. Образцы оставляли закрытыми для испарения, и наблюдаемые твердые частицы анализировали с помощью XRPD.

Как показано на фиг. 45, анализ XRPD выявил 2 уникальных структуры в дополнение к структуре 1 (кристаллическая форма) при кинетическом скрининге растворимости, хотя структура 3 проявлялась только как смесь со структурой 2. Ацетон, дихлорметан (ДХМ), этилформиат и МтБЭ дали структуру 2 (гидратная форма). Смесь кристаллической и гидратной форм наблюдалась в этаноле. Хлорбензол давал смесь структур 2 и 3, а ТГФ давал в основном аморфный материал с некоторыми пиками структуры 2. В метаноле был виден бесцветный гель, его не подвергали анализу с помощью XRPD. Система растворителей формировала кристаллы во время испарения и была идентифицирована как потенциальный сольват ТГФ.

Как показано на фиг. 45, 9 из 30 перечисленных систем растворителей формировали недостаточно твердого вещества для анализа XRPD. Шестнадцать из растворителей давали структуру 2, структура 1 наблюдалась в 1-пропанолем, смесь структур 1 и 2 наблюдалась в этаноле, смесь структур 2 и 3 была получена в хлорбензоле, и в основном аморфный материал с некоторыми пиками структуры 2 был получен в ТГФ.

На фиг. 46 показаны растворители для первичного скрининга полиморфов.

В других вариантах осуществления гидрат ЦГП из настоящего изобретения может быть получен путем кинетической кристаллизации (2-6 ч) из 1-пропанола, 2-пропанола, смеси метанола/воды, ацетона, ацетонитрила, этилацетата, этилформиата, гептана, изопропилацетата, метилэтилкетона (МЭК), метилизобутилкетона, нитрометана, толуола и трифторэтанола.

М) Первичный скрининг полиморфов.

В двадцать четыре (24) флакона, содержащие 40 мг безводного ЦГП, добавляли разные растворители в аликвотах по 100 мкл до образования жидкой суспензии. Затем флаконы подвергали циклическому изменению температуры между температурой окружающей среды и 40°C с 4-часовыми циклами в течение 72 ч. Все оставшиеся твердые частицы выделяли центрифугированием и анализировали с помощью XRPD.

Фиг. 46 показывает растворители, используемые для кинетического (2-6 ч) скрининга полиморфов, а фиг. 50 показывает температурный цикл первичного скрининга полиморфов структуры 1.

Результаты показывают, что в случае присутствия в образце воды, преобладает структура 2. Структура 1 формируется только в том случае, если в образце присутствует недостаточное количество воды либо из самого образца, либо из системы растворителей, либо из атмосферы. Эти результаты приведены в табл. 24 и 25.

Пример 2. Способ получения гидрата ЦГП.

Это исследование было проведено (1) для оценки перенесенного процесса преобразования структуры 1 (ангидрат, C16081735-D) в структуру 2 (гидрат, структура 2); (2) для оценки демонстрационного цикла в масштабе примерно 100 грамм с использованием не-GMP ЦГП структуры 1 (ангидрата), хранящегося у назначенного производителя; (3) для производства примерно 400 г структуры 2 в соответствии с действующими правилами надлежащей производственной практики (сGMP); и (4) для оценки условий сушки, чтобы гарантировать получение необходимой структуры 2 (гидрат, структура 2).

Спецификации устанавливали следующим образом: чистота по ВЭЖХ: >98,0%. Профили примесей: Н-Гис-ОН ≤1,0%, каждая другая индивидуальная примесь <1,0%. Хиральная чистота: ≥8,0%. Хиральные примеси: указана каждая примесь с содержанием ≥0,1%. Оптические изомеры DL, LD, LL ≤1,0% и т.д.

Воспроизводимый способ был разработан для получения структуры 2 (гидрата цикло(L-Гис-L-Про) дипептида) путем растворения структуры 1 (ангидрата) в этаноле/Н₂О=9/1 (об./об.) и осаждения структу-

ры 2 (гидрата) добавлением МтБЭ. Способ был успешно реализован на партии сGMP в масштабе 370 г. В конечном итоге, всего было получено 288 г структуры 2 (гидрата ЦГП) с чистотой 99,9% по данным ВЭЖХ и 100,0% хиральной чистотой в условиях сGMP.

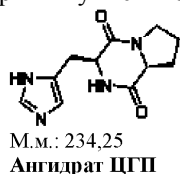
А) Введение и схема синтеза.

Оценивали способ преобразования структуры 1 (безводной) в структуру 2 (гидрат, структура 2). Были предложены две процедуры кристаллизации: одна заключалась в растворении твердого ангидрата в воде и осаждении путем добавления ацетона (см. схему синтеза 1); другая заключалась в растворении твердого ангидрата в смеси этанол/вода=9/1 и осаждении добавлением МтБЭ (см. схему синтеза 2). Оценивали качество и выход двух процедур, зафиксированных на схеме 2 для оптимизации работы.

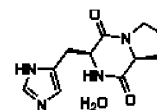
Наконец, оптимизированный способ (см. схему 3) был успешно осуществлен для получения 288 г структуры 2 (гидрата ЦГП). Планово-периодическое производство осуществляли по схеме 3.

Схема 1.

Первый путь синтеза структуры 2 (гидрата ЦГП).



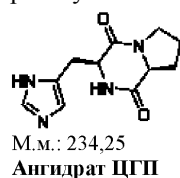
1. Растворяют D в воде (1 объем) при 80°C
 2. Охлаждают до 50°C
 3. Медленно добавляют ацетон (9,5 объемов)
 4. Медленно охлаждают до 20-25°C
 5. Охлаждают до 5-10°C
 6. Отделяют фильтрацией твердое вещество.
 7. Сушат при 50°C под вакуумом
- Выход 72%



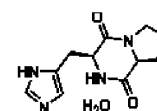
М.м. 234,25 на основе
сухого вещества
М.м.: 252,27 в виде
моногидрата
Гидрат ЦГП

Схема 2.

Второй путь синтеза структуры 2 (гидрата ЦГП).



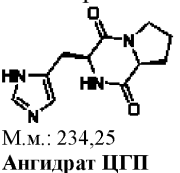
1. Растворяют D в смеси этанол/вода (9/1 об./об.) при 50°C
2. Охлаждают до 35°C
3. Добавляют МтБЭ (7,5 объемов)
4. Перемешивают при 35°C в течение 5 часов
5. Охлаждают до 1°C
6. Перемешивают в течение 12 часов.
7. Фильтруют и промывают.
8. Сушат при 50°C под вакуумом



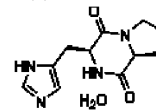
М.м. 234,25 на основе
сухого вещества
М.м.: 252,27 в виде
моногидрата
Гидрат ЦГП

Схема 3.

Оптимизированный путь синтеза структуры 2 (гидрата ЦГП) для производства сGMP.



1. Добавляют D в смесь этанол/вода = 9 объемов/1 объем (2,5 объемов)
2. Нагревают до 47-53°C для растворения
3. Медленно охлаждают до 32-37°C
4. Медленно добавляют МтБЭ (0,5 объемов) при 32-37°C
5. Добавляют затравку и выдерживают 2-3 часа
6. Охлаждают до 3-8°C в течение 2-3 часов
7. Добавляют МтБЭ (7 об. в течение 8-9 часов при 3-8°C)
8. Перемешивают при 3-8°C в течение 8-10 часов
9. Фильтруют для получения влажного продукта
10. Промывают смесью этанол/вода/МтБЭ = 9/1/30 об. (2 об.)
11. Сушат при 35-40°C под вакуумом



М.м. 234,25 на основе
сухого вещества
М.м.: 252,27 в виде
моногидрата
Гидрат ЦГП

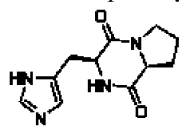
Обе процедуры (схемы 1 и 2) оценивали, и они давали продукт в виде гидрата с целевой структурой 2. Изучали химическую стабильность в обоих условиях, и структура 2 была стабильной при 50°C в течение 20 ч. Однако в методике со смесью вода/ацетон в качестве хорошего растворителя использовали очень небольшое количество воды (1 объем), и было трудно выбрать подходящий реактор с таким маленьким минимальным объемом перемешивания. Кроме того, методика со смесью вода/ацетон давала лишь примерно 70% фактического выхода. Для работы по оптимизации была выбрана процедура со смесью этанол/Н₂О/МтБЭ с фактическим выходом примерно 90%. После оптимизированной процедуры кристаллизации серия сGMP в масштабе 370 г была успешно осуществлена в лаборатории для производства в килограммовых масштабах.

В. Резюме.

Для получения структуры 2 были оценены две процедуры кристаллизации со смесями вода/ацетон и этанол/Н₂О/МтБЭ, и обе дали продукт в виде гидрата с целевой структурой 2. Была изучена химическая стабильность в обоих условиях, и продукт был стабильным при 50°C в течение 20 ч. Учитывая, что процедура с системой вода/ацетон дала только примерно 70% фактического выхода, для работы по оптимизации была выбрана процедура этанол/Н₂О/МтБЭ. Были изучены температура и скорость добавления МтБЭ, и в итоге процедура добавления МтБЭ при 5°C с относительно низкой скоростью была выбрана, чтобы избежать прикрепления значительного количества твердого вещества к стенкам сосуда. В соответствии с оптимизированной процедурой кристаллизации был проведен один демонстрационный

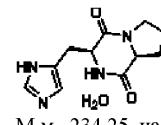
цикл в масштабе 100 г, и в результате кристаллизации было получено 96,44 г продукта в виде структуры 2 с примерно 90% фактическим выходом. На основании исследования стабильности при сушке гидратный продукт был стабильным при температуре ниже 40°C в лабораторной печи при -0,09 МПа.

С) Оценка процедуры кристаллизации в условиях вода/ацетон.



М.м.: 234,25
Ангидрат ЦГП

1. Растворяют D в воде (1 объем) при 80°C
 2. Охлаждают до 50°C
 3. Медленно добавляют ацетон (9,5 объемов)
 4. Медленно охлаждают до 20-25°C
 5. Охлаждают до 5-10°C
 6. Отделяют фильтрацией твердое вещество.
 7. Сушат при 50°C под вакуумом
- Выход 72%



М.м. 234,25 на основе
сухого вещества
М.м.: 252,27 в виде
моногидрата
Гидрат ЦГП

Были проведены два испытания для оценки процедуры кристаллизации RFP в условиях вода/ацетон (табл. 2). В эксперименте PS03027-2 не наблюдали кристаллизации без затравки, а после добавления затравки выпадал твердый осадок.

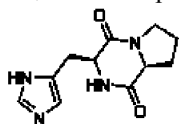
Затравка была добавлена в эксперименте PS03027-4, и кристаллизация прошла гладко. Анализ XRPD показал, что была получена целевая структура 2. Потеря продукта в системе вода/ацетон была относительно высокой (примерно 20%), что соответствовало выходу в RFP (72%).

Таблица 2. Результаты получения гидрата ЦГП

№ серии	Исходные материалы		Наблюдение		Гидрат ЦГП	
	Ангидрат ЦГП	Растворитель	Наблюдение	Масса	XRPD	Потеря в мл
PS03027-2	2 г № серии: PS00726-55-D-P	Вода/ ацетон	Нет кристаллизации без затравки. С затравкой образуется твердый осадок	1,15 г	Структура 2	н/п
PS03027-4	5 г № серии: PS00726-55-D-P	Вода/ ацетон	После затравки осаждается твердое вещество	3,65 г	Структура 2	20%

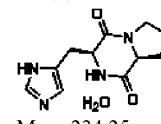
Примечание: затравку готовили путем ресуспендирования структуры 1 в 1 объеме воды при комнатной температуре.

D) Оценка альтернативной процедуры кристаллизации со смесью этанол/вода/МТБЭ.



М.м.: 234,25
Ангидрат ЦГП

1. Растворяют D в смеси этанол/вода (9/1 об./об.) при 50°C
2. Охлаждают до 35°C
3. Добавляют МТБЭ (7,5 объемов)
4. Перемешивают при 35°C в течение 5 часов
5. Охлаждают до 1°C
6. Перемешивают в течение 12 часов.
7. Фильтруют и промывают.
8. Сушат при 50°C под вакуумом



М.м. 234,25 на основе
сухого вещества
М.м.: 252,27 в виде
моногидрата
Гидрат ЦГП

Одну серию в масштабе 5 г готовили для оценки альтернативных условий кристаллизации в системе этанол/вода/МТБЭ, и получали кристаллы, зародившиеся во время добавления МТБЭ, и XRPD показала получение целевой структуры 2. Потери в маточном растворе были относительно ниже (8%), чем в условиях вода/ацетон (табл. 3).

Таблица 3. Результаты получения гидрата ЦГП

№ серии	Исходные материалы		Наб.одение	Гидрат ЦГП (СТРУКТУРА 2)			
	Ангидрат ЦГП	Растворитель		Масса	XRPD	Остаточный растворитель	Потеря
PS03027-5	5 г, серия № PS00726-55-D-P	Этанол/вода/МТБЭ	Спонтанная нуклеация при добавлении МТБЭ	н/п	Структура 2	Этанол: 0,01%; МТБЭ: 0,01%	8%

Е) Изучение химической стабильности в системах вода/ацетон и этанол/вода/МТБЭ.

Химическую стабильность в растворенном состоянии для соединения изучали в различных системах растворителей при разных температурах (табл. 4). Раствор выдерживали при 50°C и 80°C, и определяли чистоту раствора. Соединение обычно было стабильным в течение по меньшей мере 20 ч.

Таблица 4. Химическая стабильность в системах вода/ацетона и Этанол/вода/МтБЭ

Эксперимент №	Растворитель	Концентрация	Ввод	Т/°С	Чистота (%)			Наблюдение
					0 ч	2 ч	20 ч	
PS03027-8-Н-1	H ₂ O	10 мг/мл	PS00726-55-D-P Чистота: 99,7%	80	99,82%	99,77%	99,82%	Нет изменений
PS03027-8-Н-2	Этанол:H ₂ O = 9:1 (o/o)	10 мг/мл		50	99,76%	99,86%	99,69%	Нет изменений
PS03027-8-Н-3	H ₂ O:Ацетон = 0,5:9,5 (o/o)	10 мг/мл		50	99,77%	99,72%	99,73%	Нет изменений
PS03027-8-Н-4	(Этанол:H ₂ O=9:1): МтБЭ=1:3 (o/o)	10 мг/мл		50	99,82%	99,77%	99,82%	Нет изменений

Ф) Исследование растворимости гидрата ЦГП (структура 2).

Изучали растворимость гидрата ЦГП в системе вода/ацетон и этанол/вода/МтБЭ, и было обнаружено, что она чувствительна к соотношению растворителей и температуре в обоих условиях (табл. 5 и 6). Выход при кристаллизации в системе этанол/вода/МтБЭ составлял 90% или выше.

Таблица 5. Растворимость структуры 2 в системе вода/ацетон

№ эксперимента	Ввод	Растворитель Вода/ацетон (o/o)	Т/°С	Растворимость (мг/мл)
PS03029-4-Н-1	Гидрат ЦГП (Структура 2)	0/10	50	14
PS03029-4-Н-2		0,5/9,5		49
PS03029-4-Н-3		1/9		159
PS03029-4-Н-4		2/8		>200
PS03029-4-Н-5		4/6		>200
PS03029-4-Н-6		6/4		>200
PS03029-4-Н-7		8/2		>200
PS03029-4-Н-8		9/1		>200
PS03029-4-Н-14		0/10	5	17
PS03029-4-Н-15		0,5/9,5		19
PS03029-4-Н-16		1/9		48
PS03029-4-Н-17		2/8		110
PS03029-4-Н-18		4/6		179
PS03029-4-Н-19		6/4		206
PS03029-4-Н-20		8/2		>200
PS03029-4-Н-21		9/1		215

Таблица 6. Растворимость структуры 2 в системе этанол/вода/МтБЭ

№ эксперимента	Ввод	Растворитель (этанол/ вода = 9/1)/ МтБЭ (o/o)	Т/°С	Растворимость (мг/мл)
PS03029-4-Н-9	Гидрат ЦГП (структура 2)	3/0	50	>200
PS03029-4-Н-10		3/1		>200
PS03029-4-Н-11		3/3		101
PS03029-4-Н-12		3/6		24
PS03029-4-Н-13		3/9		17
PS03029-4-Н-22		3/0	5	121
PS03029-4-Н-23		3/1		59
PS03029-4-Н-24		3/3		30
PS03029-4-Н-25		3/6		6
PS03029-4-Н-26		3/9		6

Примечание: 1) серия PS03027-2-Н была использована в качестве материала структуры 2.

Г) Оптимизация способа в условиях этанол/вода/МтБЭ.

Чтобы дополнительно понять кристаллизацию в системе этанол/вода/МтБЭ, проводили три эксперимента, где МтБЭ добавляли при 50, 35 и 5°С, соответственно. Как показано в табл. 7, три эксперимента обеспечили необходимую кристаллическую форму, и содержание остаточных растворителей было низким.

Таблица 7. Оптимизация способа в условиях этанол/вода/МтБЭ (масштаб 5 г)

№ серии	Исходные материалы		Условия		Гидрат ЦГП (структура 2)		
	Ангидрат ЦГП	Растворитель		Масса	XRPD	Остаточный растворитель	Потеря выхода
PS03027-9	5 г, серия № PS00726-55-D-P	Этанол/ вода/ МтБЭ	Добавление МтБЭ при 50°C	4,35 г	Структура 2	Этанол:0,01%; МТБЭ: 0,02%	5%
PS03027-11	5 г, серия № PS00726-55-D-P	Этанол/ вода/ МтБЭ	Добавление МтБЭ при 35°C	4,49 г	Структура 2	Этанол:0,01%; МТБЭ: 0,01%	Не измеряли
PS03027-10	5 г, серия № PS00726-55-D-P	Этанол/ вода/ МтБЭ	Добавление МтБЭ при 5°C	4,89 г	Структура 2	Этанол:0,02%; МТБЭ: 0,02%	5%

Чтобы проверить процедуру в более крупном масштабе, были проведены три эксперимента в масштабе 15 г, как показано в табл. 8. Во время экспериментов с PS03027-13 и PS03027-14 (в которых МтБЭ добавляли при 50 и 35°C), наблюдалась проблема образования твердых отложений. Значительное количество твердого вещества оседает на стенках сосуда, особенно во время добавления МтБЭ. Чтобы избежать этой проблемы, в эксперименте PS0027-15 МтБЭ добавляли при 5°C, а добавление продлили до 8 ч (4 ч в предыдущих экспериментах). Выяснилось, что отложений на стенках было намного меньше. Поэтому был сделан вывод, что МтБЭ следует добавлять при температуре 5°C относительно медленно.

Таблица 8. Оптимизация способа в системе этанол/вода/МтБЭ (масштаб 15 г)

№ серии	Исходные материалы		Условия		Гидрат ЦГП (структура 2)		
	Ангидрат ЦГП	Растворитель		Масса	XRPD	Остаточный растворитель	Потеря выхода
PS03027-13	15 г, серия № PS00726-55-D-P	Этанол/ вода/ МтБЭ	Добавление МтБЭ при 50°C	7,42 г	Структура 2	МТБЭ:0,02%; Этанол:0,03%	Не измеряли
PS03027-14	15 г, серия № PS00726-55-D-P	Этанол/ вода/ МтБЭ	Добавление МтБЭ при 35°C	11,93 г	Структура 2	МТБЭ:0,01%; Этанол:0,04%	6%
PS03027-15	15 г, серия № PS00726-55-D-P	Этанол/ вода/ МтБЭ	Медленное добавление МтБЭ при 5°C	14,44 г	Структура 2	МТБЭ:0,01%; Этанол:0,04%	7%

Н) Стресс-тест быстрого добавления МтБЭ.

Как показано в табл. 9, стресс-тест был проведен для процедуры, в которой добавление МтБЭ проводили с относительно высокой скоростью. Проводили анализ XRPD твердого вещества во время эксперимента, и данные указывали, что структура 2 наблюдалась на всем протяжении кристаллизации.

Таблица 9. Стресс-тест быстрого добавления МтБЭ

№ серии	Исходные материалы		Условия		Гидрат ЦГП (структура 2)		
	Ангидрат ЦГП	Растворитель		Масса	XRPD	Остаточный растворитель	Потеря выхода
PS03027-17	5 г, серия № PS00726-55-D-P	Этанол/ вода/ МтБЭ	Быстрое добавление МтБЭ при 5°C	4,58 г	Структура 2	МТБЭ:0,00%; Этанол:0,02%	3%

Г) Исследование стабильности формы в системе этанол/вода/МтБЭ.

Чтобы изучить стабильность формы в системе этанол/вода/МтБЭ, эксперименты по конкурентной очистке проводили при 50, 35 и 5°C, соответственно, добавляя 100 мг безводного твердого вещества структуры 1 и 100 мг твердого вещества структуры 2. Как показано в табл. 10, смешанные формы структуры 1 и структуры 2 быстро преобразуются в структуру 2 в различных условиях.

Таблица 10. Конкурентные эксперименты для суспензии структуры 1 и структуры 2 в системе Этанол/вода/МТБЭ

№ эксперимента	Растворитель (о/о)	Т/°C	Анализ XRPD			
			0 часов	2 часа	6 дней	7 дней
PS03027-16-H-1	(Этанол:Н ₂ O=9:1):МТБЭ=3:0	50	Структура 2	н/п	н/п	н/п
PS03027-16-H-2	(Этанол:Н ₂ O=9:1):МТБЭ=2,5:0,5		Структура 2	Структура 2	Структура 2	н/п
PS03027-16-H-3	(Этанол:Н ₂ O=9:1):МТБЭ=1:2		Структура 2	Структура 2	н/п	н/п
PS03027-16-H-4	(Этанол:Н ₂ O=9:1):МТБЭ=1:3		Структура 2	Структура 2	Структура 2	Структура 2
PS03027-16-H-5	(Этанол:Н ₂ O=9:1):МТБЭ=3:0	35	Структура 2	Структура 2	Структура 2	Структура 2
PS03027-16-H-6	(Этанол:Н ₂ O=9:1):МТБЭ=2,5:0,5		Структура 2	Структура 2	Структура 2	Структура 2
PS03027-16-H-7	(Этанол:Н ₂ O=9:1):МТБЭ=1:2		Структура 2	Структура 2	н/п	н/п
PS03027-16-H-8	(Этанол:Н ₂ O=9:1):МТБЭ=1:3		Структура 2	Структура 2	Структура 2	Структура 2
PS03027-16-H-9	(Этанол:Н ₂ O=9:1):МТБЭ=3:0	5	Структура 2	Структура 2	Структура 2	Структура 2
PS03027-16-H-10	(Этанол:Н ₂ O=9:1):МТБЭ=2,5:0,5		Структура 2	Структура 2	Структура 2	Структура 2
PS03027-16-H-11	(Этанол:Н ₂ O=9:1):МТБЭ=1:2		Структура 2	Структура 2	Структура 2	Структура 2
PS03027-16-H-12	(Этанол:Н ₂ O=9:1):МТБЭ=1:3		Структура 2	Структура 2	Структура 2	Структура 2

Примечание: вводные материалы: 100 мг безводного твердого вещества (структура 1, серия № PS00726-55-D) было добавлено вместе с 100 мг твердого вещества структуры 2 (серия № PS03027-5/9/10/11-H).

Ж) Изучение стабильности в сухом состоянии при 35, 40, 50 и 65°C.

Стабильность при сушке определяли при 35, 40, 50 и 65°C, соответственно. Как показано в табл. 11, структура 2 стабильна при температуре до 40°C в течение не менее 4 дней.

Таблица 11. Стабильность в сухом состоянии при 35, 40, 50 и 65°C

№ эксперимента	Ввод/форма	Т/°C	1 день	2 день	3 день	4 день
			XRPD	XRPD	XRPD	XRPD
PS03027-15-H-35	PS03027-15-H-Структура 2	35°C	Структура 2	Н/А	Н/А	Структура 2
PS03027-21-H-40	PS03027-21-H-Структура 2	40°C	Структура 2	Структура 2	Структура 2	Структура 2
PS03027-15-H-50	PS03027-15-H-	50°C	Структура 2	Структура 2	Н/А	Структура 1
PS03027-15-H-65	Структура 2	65°C	Структура 2	Структура 1	Н/А	Н/А

К) Изучение процедуры получения суспензии, чтобы преобразовать кристалличность с худшей структурой обратно в структуру 2.

Чрезмерная сухость (KF=5,4%, теоретическая 7,4%) привела к меньшей кристалличности для партии cGMP структуры 2 (структура 218001) даже при сушке при 35-40°C в течение 10 ч. Чтобы преобразовать твердое вещество с плохой кристаллической структурой 2 в необходимую структуру 2, были проведены два эксперимента с повторным суспендированием. 2 г структуры 218001-СТЕР5.7 повторно суспендировали в 8 об. смеси этанол/вода/МТБЭ=9 об./1 об./30 об. при комнатной температуре и 5°C, и было обнаружено, что она превратилась в структуру 2 всего за 30 мин. Твердое вещество выделяли и сушили в течение 14 ч, и в течение этого периода форма не менялась. Потери, основанные на концентрации маточного раствора, составили примерно 5% (тогда как предполагалось, что общие потери составят 10%, включая потери на стенке колбы и при работе). Одним из преимуществ является то, что эта процедура приводит к превращению всего твердого вещества в структуру 2, хотя может быть потеряно примерно 10% продукта.

- L) Общий маршрут от структуры 1 к структуре 2.
- 1) Загружают этанол (1,75-1,79X; 2,25 объема) в R1 под N₂.
 - 2) Загружают очищенную воду (0,245-0,255X; 0,25 объема) в R1 под N₂.
 - 3) Перемешивают R1 в течение 5-10 мин, чтобы получить смешанный раствор этанол/вода=9:1 (об./об.).
 - 4) Переносят раствор из R1 в барабан.
 - 5) Загружают структуру 1 (1,0 экв., 1,0X) в R1.
 - 6) Загружают смесь этанол/вода со стадии 4 (1,61-1,63X; 2,0 объема) в R1 в атмосфере азота.
 - 7) Регулируют температуру R1 до 47-53°C под N₂.
 - 8) Перемешивают R1 при 47-53°C в течение 10-60 мин в атмосфере N₂.
 - 9) Фильтруют раствор из R1 в R2. Рубашку R2 предварительно нагревают до 50-55°C.
 - 10) Загружают смесь этанол/вода со стадии 4 (0,39-0,41X; 0,5 объемов) в R1 под N₂.
 - 11) Перемешивают R1 в течение 5-30 мин под N₂.
 - 12) Фильтруют раствор из R1 в R2.
 - 13) Доводят температуру R2 до 47-53°C и перемешивают в течение 10-60 мин в атмосфере N₂. Полное растворение подтверждается руководителем проекта.
 - 14) Доводят температуру R2 до 32-37°C под N₂.
 - 15) Медленно добавляют МтБЭ (0,36-0,38X; 0,5 об.) при 32-37°C в R2 в атмосфере азота.
 - 16) Загружают затравочные кристаллы структуры 2 (0,015-0,025X) в R2 при 32-37°C.
 - 17) Перемешивают R2 при 32-37°C в течение 2-3 ч в атмосфере N₂.
 - 18) Доводят температуру R2 до 3-8°C за 2-3 ч в атмосфере N₂.
 - 19) Отбирают образец и фильтруют, отправляют осадок на анализ XRPD (в соответствии с PS03027-15-H). Критерии: если результаты соответствуют спецификации, выполняют стадию 20; в противном случае проводят консультацию с руководителем проекта.
 - 20) Загружают МтБЭ (5,1-5,3X; 7 об.) в R2 в течение 8 ч при 3-8°C под N₂.
 - 21) Перемешивают R2 при 3-8°C в течение 8-10 ч в атмосфере N₂.
 - 22) Отбирают образец и фильтруют, отправляют осадок на анализ XRPD (в соответствии с PS03027-15-H); отправляют фильтрат на анализ остаточной структуры 2: остаточный Н в надосадочной жидкости ($\leq 1,5$ мас.%).
- Критерии: если результаты соответствуют спецификации, выполняют стадию 25; в противном случае выполняют стадию 23.
- 23) Перемешивают R2 при 3-8°C в течение 4-10 ч под N₂.
 - 24) Отбирают образец и фильтруют, отправляют осадок на анализ XRPD (в соответствии с PS03027-15-H); отправляют фильтрат на анализ остаточного Н: Остаточный Н в надосадочной жидкости ($\leq 1,5$ мас.%). Критерии: если результаты соответствуют спецификации, выполняют стадию 25.
 - 25) Фильтруют суспензию при 3-8°C в атмосфере N₂.
 - 26) Загружают этанол (0,355X), очищенную воду (0,05X) и МтБЭ (1,11X) в чистый барабан.
 - 27) Перемешивают материал со стадии 26, чтобы получить прозрачный раствор смеси.
 - 28) Переносят раствор со стадии 27 (1,5-1,6X) в R2, чтобы промыть R2.
 - 29) Охлаждают R2 до 3-8°C.
 - 30) Промывают влажный осадок промывочным раствором R2 при температуре 3-8°C.
 - 31) Проверяют качество влажного продукта:
- XRPD (соответствует PS03027-15-H); ВЭЖХ $\geq 98,0\%$ площади; Н-Гис-ОН $\leq 1,0\%$ площади; Каждая другая отдельная примесь $\leq 1,0\%$ площади; отмечают каждую примесь с содержанием $\geq 0,05\%$ площади с помощью ОВУ.
- Примечание: параллельно выполняют стадию 32.
- Критерии: если результаты соответствуют спецификации, выполняют стадию 33.
- 32) Проверяют остаточную структуру 2 в маточной жидкости. Отмечают остаточное количество структуры 2 (% , отчет).
 - 33) Сушат при температуре 35-40°C под вакуумом в течение 10-12 ч. Рекомендуется ставить водяную баню в духовку во избежание пересушивания.
 - 34) Проверяют остаточный растворитель:
- Этанол (≤ 5000 ppm); МтБЭ (≤ 5000 ppm); Содержание воды (отчет).
- Проверяют полиморф сухого продукта: XRPD (соответствует PS03027-15-H). Критерии: если результаты соответствуют спецификации, выполняют стадию 37; в противном случае выполняют стадию 35.
- 35) Сушат при температуре 35-40°C под вакуумом в течение 5-8 ч. Рекомендуется поставить водяную баню в духовку во избежание пересушивания.
 - 36) Проверяют остаточный растворитель:
- Этанол (≤ 5000 ppm); МтБЭ (≤ 5000 ppm); Содержание воды (отчет). Проверяют полиморф сухого продукта: XRPD (соответствует PS03027-15-H). Критерии: Если результаты соответствуют спецификации, выполняют стадию 37.

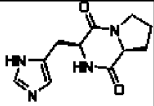
37) Загружают сухой продукт в бочки и просеивают.

38) Отбирают образцы для анализа выпуска.

М) Полная характеристика.

Чистота по ВЭЖХ, спектры ¹H-ЯМР, ТГА, ДСК и XRPD показаны в табл. 12.

Таблица 12. Характеристика структуры 2

ID соединения	Структура	Данные определения характеристик				
		¹ H-ЯМР	Чистота по ВЭЖХ	ТГА	XRPD	ДСК
Структура 2		Соответствует	99,9%	Ввод 170 Вывод 172	Структура 2	Два пика 104,29°C 172,17°C

Пример 3. Разработка способа кристаллизации гидрата ЦГП.

Это исследование было сосредоточено на разработке кристаллизации гидрата ЦГП (структура 2). После первоначальной характеристики серии гидрата ЦГП были проведены исследования растворимости, оценка мелкомасштабной кристаллизации, измерение ширины метастабильной зоны и масштабная кристаллизация. Целью рабочей программы было установить условия кристаллизации, которые позволили бы успешно производить гидрат ЦГП структуры 2, и которые можно было бы эффективно масштабировать для производства.

Испытания растворимости, проведенные на структуре 1 ЦГП, показали высокую растворимость во всех смесях растворителей, содержащих воду, за исключением смесей этанол:вода:МтБЭ с наивысшим процентным содержанием МтБЭ. Особенно высокая растворимость наблюдалась для воды (≥ 200 мг/мл) и смесей ацетон:вода (≥ 200 в системе вода:ацетон [90:10]). Было обнаружено, что материал плохо растворяется в ацетоне, ацетонитриле и ТГФ (≤ 10 мг/мл).

Двухточечная растворимость указывает на то, что из двух оцененных систем растворителей этанол:вода:МтБЭ дает несколько лучшие выходы, но существует риск образования структуры 1. Ацетон:вода обеспечивает исключительно структуру 2, но в ущерб выходу.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается следующий процесс получения гидрата ЦГП.

Добавляют примерно 20 г структуры 1 ЦГП в реактор с рубашкой, предварительно нагретый до 50°C.

Добавляют в сосуд 50 мл смеси растворителей этанол:вода (90:10 об.%) для достижения начальной концентрации 400 мг/мл.

Перемешивают при 300 об./мин, используя верхнеприводную мешалку.

Когда полное растворение будет достигнуто, добавляют в сосуд 25 мл МтБЭ (по каплям).

По завершении добавления МтБЭ добавляют в реакционную смесь 2 мас.% (400 мг) затравки измельченной кристаллической структуры 2 ЦГП.

Продолжают перемешивание при 50°C в течение 20 мин.

Добавляют в сосуд еще 5 мл МтБЭ (по каплям).

Добавляют 70 мл МтБЭ со скоростью 20 мл/ч.

По окончании добавления охлаждают от 30 до 29°C со скоростью 0,1°C/мин.

Продолжают перемешивание при 29°C в течение 8 ч.

Охлаждают от 29 до 5°C со скоростью 0,25°C/мин.

Добавляют 190 мл МтБЭ со скоростью 20 мл/ч.

Продолжают перемешивать при 5°C в течение 12 ч.

Выделяют твердое вещество фильтрацией и промывают осадок на фильтре 40 мл смеси этанол:вода:МтБЭ (9 об.:1 об.:30 об.).

Сушат твердое вещество под вакуумом при 40°C в течение 1 ч.

Была проведена оценка производительности перемешивания в лабораторном масштабе, а затем смоделирована геометрия в масштабе завода для оценки параметров перемешивания, которые позволили бы успешно перенести процесс. Перенос этой процедуры в масштаб 10 кг может быть выполнен с помощью следующей процедуры.

Добавляют примерно 10 кг структуры 1 ЦГП в реактор с рубашкой, предварительно нагретый до 50°C.

Добавляют в сосуд 25 л смеси растворителей этанол:вода (90:10 об.%) для достижения начальной концентрации 400 мг/мл.

Перемешивают при 48 об./мин.

Когда полное растворение будет достигнуто, добавляют в сосуд 12,5 л МтБЭ.

По завершении добавления МтБЭ добавляют в эксперимент 2 мас.% (200 г) затравку измельченной кристаллической структуры 2 ЦГП.

Продолжают перемешивать при 50°C в течение 20 мин.

Добавляют еще 2,5 л МтБЭ (по каплям) в емкость.

Добавляют 35 л МтБЭ из расчета 10 л/ч.

По окончании добавления охлаждают от 30 до 29°C со скоростью 0,1°C/мин.

Продолжают перемешивание при 29°C в течение 8 ч.

Охлаждают от 29 до 5°C со скоростью 0,25°C/мин.

Добавляют 95 л МтБЭ из расчета 10 л/ч.

Продолжают перемешивание при 5°C в течение 12 ч.

Выделяют твердое вещество фильтрацией и промывают осадок на фильтре 20 л смеси этанол: вода: МтБЭ (9 объемов: 1 объем: 30 объемов).

Сушат твердое вещество под вакуумом при 40°C.

Рекомендуется использование 48 об./мин, поскольку это позволяет рассеивать мощность в емкости заводского масштаба, что более сопоставимо с рассеиваемой мощностью в емкости лабораторного масштаба. Рассеиваемая мощность на заводе оценивается в 0,067 Вт/кг, тогда как в лабораторных условиях она оценивается в 0,064 Вт/кг. Модель, использованная для оценки этих параметров, также предполагает, что частицы, вероятно, находятся во взвешенном состоянии.

В качестве альтернативы, мешалка на заводе может работать со скоростью 55 об./мин. Это было оценено моделью смешивания как NJS, скорость смешивания, едва соответствующая взвешенному состоянию, при которой частицы будут находиться во взвешенном состоянии в сосуде. Это добавляет уверенности в том, что смешивание будет эффективным, однако существует риск того, что частицы будут получать гораздо большее рассеивание мощности, равное 0,101 Вт/кг.

Однако следует понимать, что одна или несколько стадий, описанных выше, для получения гидрата ЦГП, могут быть пропущены, или порядок стадий может быть изменен.

В) Методы анализа.

1) Рентгеновская порошковая дифракция (XRPD).

XRPD-анализ проводили на приборе PANalytical X'pert pro, сканируя образцы в диапазоне от 3 до 35° 2 θ . Материал осторожно измельчали, чтобы высвободить агломераты, и загружали на многолуночный планшет с пленкой из майларового полимера, чтобы поддерживать образец. Затем многолуночный планшет помещали в дифрактометр и анализировали с использованием излучения Cu K ($\alpha_1 \lambda=1,54060 \text{ \AA}$; $\alpha_2=1,54443 \text{ \AA}$; $\beta=1,39225 \text{ \AA}$; соотношение $\alpha_1: \alpha_2=0,5$) в режиме пропускания (размер шага 0,0130° 2 θ) при настройках генератора 40 кВ/40 мА.

2) Микроскопия в поляризованном свете (PLM).

Наличие двойного лучепреломления, а также размер и морфологию частиц оценивали с помощью поляризационного микроскопа Olympus BX50, оснащенного камерой Motic и программным обеспечением для захвата изображения (Motic Images Plus 2.0). Все изображения были записаны с использованием объектива 20x, если не указано иное.

3) Термогравиметрический анализ (ТГА).

Готовили навеску примерно 5 мг материала в открытой алюминиевой кювете и загружали в синхронный термогравиметрический/дифференциальный термический анализатор (ТГ/ДТА) и выдерживали при комнатной температуре. Затем образец нагревали со скоростью 10°C/мин от 20 до 350°C, в течение этого времени регистрировали изменение массы образца вместе с любыми дифференциальными тепловыми событиями (ДТА). В качестве продувочного газа использовали азот при расходе 300 см³/мин.

4) Ядерный магнитный резонанс (ЯМР).

ЯМР-эксперименты проводили на спектрометре Bruker AVIIIHD, оборудованном криозондом DCH, работающим на частоте 500,12 МГц для протонов. Эксперименты проводили в дейтерированном диметилсульфоксиде, и каждый образец готовили с примерной концентрацией 10 mM.

5) Измерение коэффициента отражения сфокусированного пучка (FBRM) Измерения коэффициента отражения сфокусированного пучка проводили с использованием датчика Mettler Toledo D600. Для каждой кристаллизации зонд помещали в реакционный сосуд в начале кристаллизации и отслеживали зародышеобразование и рост кристаллов. Распределение длины хорды и различные статистические данные отслеживали повсюду с использованием следующих настроек.

Диапазон распознавания электронов: тонкий.

Скорость сканирования: 2 м/с.

Время выборки: 10 с.

6) Crystal 16.

В приборе Crystal 16 используется процент пропускания света через раствор (или суспензию) в прозрачном флаконе для создания профиля мутности раствора (или суспензии) в зависимости от времени и температуры. Полученный профиль использовали для определения точек помутнения (температуры зародышеобразования) и прозрачности (температуры растворения).

7) Высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовой детекцией (ВЭЖХ-УФ).

Анализ ВЭЖХ проводили со следующими параметрами оборудования.

Прибор: Dionex Ultimate 3000.

Колонка: LC/ 68 X-Bridge Phenyl Column (150 мм×4,6 мм×3,5 мкм).

Температура колонки: 30°C.

Температура автосэмплера: 5°C.

Длина волны УФ: 220 нм.

Объем вводимой пробы: 5 мкл.

Скорость потока: 1 мл/мин.

Подвижная фаза А: 10 mM ацетат аммония

Подвижная фаза В: ацетонитрил.

Разбавитель: 0,1% ТФУ в воде.

Программа градиента

Время (минуты)	Растворитель В (%)
0,01	0
10,3	30
15	95
15,1	0
25	0

С) Эксперимент.

1) Первоначальная характеристика структуры 1 ЦГП.

Структура 1 ЦГП была охарактеризована с помощью XRPD, ¹H-, HSCQ- и ¹³C-ЯМР и ВЭЖХ в соответствии с процедурами, подробно описанными в разделе В.

2) Приблизительная растворимость ЦГП структуры 1 (безводной).

Приблизительную растворимость ЦГП в 37 выбранных системах растворителей (табл. 13) оценивали методом добавления растворителя. Использовали следующую процедуру:

Добавляли навеску приблизительно 20 мг структуры 1 ЦГП в каждый из 37 флаконов.

Каждый растворитель/смесь растворителей добавляли в соответствующий флакон аликвотами по 5 объемов (100 мкл) до тех пор, пока не наблюдалось растворение или не было добавлено максимум 2 мл растворителя.

В промежутках между добавлениями образец нагревали до 40°C для проверки растворения при повышенной температуре.

Если было добавлено 2 мл растворителя без растворения материала, расчетная растворимость составляла ниже 10 мг/мл.

После добавления растворителя все 37 флаконов были помещены в холодильник для быстрого охлаждения до 2-8°C в течение примерно 18 ч.

Любые присутствующие твердые частицы выделяли центрифугированием с фильтрацией и анализировали с помощью XRPD (если позволяло количество материала).

Если твердые вещества не формировались, флаконы открывали и оставляли испаряться при температуре окружающей среды.

Любые присутствующие твердые частицы были проанализированы с помощью XRPD (если позволяло количество материала).

Таблица 13. Список примерной растворимости в растворителях

Номер	Растворитель	Класс ИСН	Номер	Растворитель	Класс ИСН
1	Вода	Н/П	20	Вода: ацетонитрил (70:30)	2
2	Ацетон	3	21	Вода: ацетонитрил (80:20)	2
3	Ацетонитрил	2	22	Вода: ацетонитрил (90:10)	2
4	ТГФ	2	23	Вода: ТГФ (10:90)	2
5	Вода: ацетон (10:90)	3	24	Вода: ТГФ (20:80)	2
6	Вода: ацетон (20:80)	3	25	Вода: ТГФ (30:70)	2
7	Вода: ацетон (30:70)	3	26	Вода: ТГФ (40:60)	2
8	Вода: ацетон (40:60)	3	27	Вода: ТГФ (50:50)	2
9	Вода: ацетон (50:50)	3	28	Вода: ТГФ (60:40)	2
10	Вода: ацетон (60:40)	3	29	Вода: ТГФ (70:30)	2
11	Вода: ацетон (70:30)	3	30	Вода: ТГФ (80:20)	2
12	Вода: ацетон (80:20)	3	31	Вода: ТГФ (90:10)	2
13	Вода: ацетон (90:10)	3	32	Этанол: вода (90:10): ТБМЭ [10:90]	3
14	Вода: ацетонитрил (10:90)	2	33	Этанол: вода (90:10): ТБМЭ [30:70]	3
15	Вода: ацетонитрил (20:80)	2	34	Этанол: вода (90:10): ТБМЭ [50:50]	3
16	Вода: ацетонитрил (30:70)	2	35	Этанол: вода (90:10): ТБМЭ [70:30]	3
17	Вода: ацетонитрил (40:60)	2	36	Этанол: вода (90:10): ТБМЭ [90:10]	3
18	Вода: ацетонитрил (50:50)	2	37	Этанол: вода (90:10)	3
19	Вода: ацетонитрил (60:40)	2			

3) Двухточечная растворимость.

Двухточечные испытания растворимости проводили при 5°C и 50°C в 11 смесях растворителей с использованием следующей процедуры.

1 мл выбранной смеси растворителей добавляли в 1,5 мл стеклянный флакон с закручивающейся крышкой, содержащий предварительно взвешенную массу структуры 1 ЦГП для получения суспензии. Начальную массу выбирали для каждой системы растворителей на основе результатов приблизительной растворимости, как подробно описано в разделе 2. Смеси растворителей показаны в табл. 14.

Флаконы держали в термостатируемом реакционном блоке, установленном на 5 или 50°C, и перемешивание осуществляли с помощью магнитной мешалки.

Когда полное растворение наблюдалось через 1 ч, в эксперименты добавляли еще твердое вещество структуры 1 ЦГП для образования суспензий.

Когда во всех флаконах формировались подвижные суспензии, реакционные смеси продолжали перемешивать при необходимой температуре в течение примерно 18 ч. Конечные массы необходимой структуры 2 ЦГП показаны в табл. 14.

Спустя примерно 18 ч перемешивание прекращали, и надосадочную жидкость фильтровали, используя фильтрующие насадки ПВДФ с размером пор 0,45 мкм и шприцы.

Концентрацию надосадочной жидкости анализировали с помощью ВЭЖХ.

Каждую из оставшихся суспензий во флаконах переносили в центрифужные пробирки с нейлоновым фильтром с размером пор 0,22 мкм, и твердые частицы отделяли центрифугированием.

Извлеченное твердое вещество (где позволяло количество) анализировали с помощью XRPD и ВЭЖХ на чистоту.

Таблица 14. Итоговые массы ЦГП в двухточечном испытании растворимости

Растворитель	Добавленная масса (мг)	
	5°C	50°C
Вода: ацетон (40:60)	211	655
Вода: ацетон (80:20)	383	725
Вода: ацетон (90:10)	365	681
Вода: ацетон (20:80)	100	340
Вода: ацетон (10:90)	100	210
Вода: ацетон (5:95)	250	250
Этанол: вода (90:10): ТБМЭ [20:80]	60	60
Этанол: вода (90:10): ТБМЭ [25:75]	60	60
Этанол: вода (90:10): ТБМЭ [30:70]	60	60
Этанол: вода (90:10): ТБМЭ [40:60]	100	126
Этанол: вода (90:10)	250	475

4) Мелкомасштабная кристаллизация.

Мелкомасштабные испытания кристаллизации были проведены на полученном ЦГП (структура 1). Целью этих испытаний было изучение наиболее подходящих систем растворителей, температур и концентраций для дальнейших исследований кристаллизации. Это было выполнено с использованием двух различных систем растворителей: ацетон:вода и этанол вода МТБЭ.

Набор для кристаллизации А: ацетон:вода.

Помещали навески приблизительно 500 мг полученного ЦГП (структура 1) в 4 сцинтилляционных флакона по 20 мл.

В каждый флакон добавляли соответствующий объем смеси ацетон: вода (80:20 об.%) для растворения образца. См. табл. 15, где указаны используемые объемы растворителя.

В каждый флакон добавляли магнитные элементы для перемешивания, и реакционную смесь перемешивали при 50°C.

Через 1 час при 50°C ацетон по каплям добавляли в 2 из четырех флаконов (флаконы 1 и 3).

Реакционную смесь оставляли перемешиваться при 50°C в течение примерно 1 ч.

Спустя 1 ч флаконы охлаждали до 5°C со скоростью 0,25°C/мин.

После достижения 5°C в оставшиеся 2 флакона (флаконы 2 и 4) по каплям добавляли ацетон.

Реакционную смесь оставляли перемешиваться при 5°C примерно на 18 ч.

Спустя 18 ч при 5°C полученные суспензии фильтровали с использованием воронки Бюхнера 47 мм и фильтровальной бумаги Whatman Grade 1 (диаметр=42,5 мм; размер пор=11 мкм).

Твердые вещества переносили в предварительно взвешенные флаконы и анализировали с помощью XRPD, PLM и ВЭЖХ на химическую чистоту.

Отфильтрованные маточные растворы отправляли на анализ концентрации посредством ВЭЖХ.

Эксперименты описаны в табл. 15.

Набор для кристаллизации В: этанол: вода: МТБЭ.

Добавляли навески приблизительно 500 мг полученного ЦГП (структура 1) в 5 сцинтилляционных флаконов по 20 мл.

В каждый флакон добавляли 2 мл смеси этанол: вода (90:10 об./об.%) для растворения образца.

В каждый флакон добавляли магнитные элементы для перемешивания, и реакционную смесь перемешивали при 50°C.

Через 1 час при 50°C МТБЭ добавляли по каплям в 3 из пяти флаконов (флаконы 1,3 и 5).

Реакционную смесь оставляли перемешиваться при 50°C в течение примерно 1 ч.

Через 1 ч при 50°C суспензию, присутствующую во флаконе 1, фильтровали с использованием воронки Бюхнера диаметром 47 мм и фильтровальной бумаги Whatman Grade 1 (диаметр=42,5 мм; размер пор=11 мкм).

Реакционную смесь фильтровали при 50°C, поскольку предыдущие результаты показали потенциальный риск образования структуры 1 после охлаждения при этом процентном отношении МтБЭ (80%).

Остальные флаконы охлаждали до 5°C со скоростью 0,25°C/мин.

После достижения 5°C МтБЭ по каплям добавляли в оставшиеся 2 флакона (флаконы 2 и 4).

Реакционную смесь оставляли перемешиваться при 5°C примерно на 18 ч.

Спустя 18 ч при 5°C полученные суспензии затем фильтровали с использованием воронки Бюхнера 47 мм и фильтровальной бумаги Whatman Grade 1 (диаметр=42,5 мм; размер пор=11 мкм).

Все твердые вещества переносили в предварительно взвешенные флаконы и анализировали с помощью XRPD, PLM и ВЭЖХ на химическую чистоту.

Отфильтрованные маточные растворы отправляли на анализ концентрации посредством ВЭЖХ.

Эксперименты описаны в табл. 15.

Таблица 15. Мелкомасштабная кристаллизация - резюме по растворителям

Система растворителей	Температура добавления антирастворителей	Исходный объем (ацетон: вода 80/20)	Добавленный ацетон
1 – ацетон: вода (95:5)	50°C	2 мл	6 мл
2 – ацетон: вода (95:5)	5°C	2 мл	6 мл
3 – ацетон: вода (95:5)	50°C	1,65 мл	4,95 мл
4 – ацетон: вода (95:5)	5°C	1,65 мл	4,95 мл
Система растворителей	Температура добавления антирастворителей	Исходный объем (этанол: вода 90/10)	Добавленный ТБМЭ
1 – этанол: вода (90:10) ТБМЭ (20:80)	50°C	2 мл	8 мл
2 – этанол: вода (90:10) ТБМЭ (30:70)	5°C	2 мл	4,7 мл
3 – этанол: вода (90:10) ТБМЭ (30:70)	50°C	2 мл	4,7 мл
4 – этанол: вода (90:10) ТБМЭ (40:60)	5°C	2 мл	3 мл
5 – этанол: вода (90:10) ТБМЭ (40:60)	50°C	2 мл	3 мл

5) Измерение ширины метастабильной зоны (MSZW).

Измерения MSZW были выполнены на полученном ЦГП (структура 1) путем исследования двух параметров - охлаждения и добавления антирастворителя.

Метод охлаждения.

Определение MSZW путем охлаждения было завершено с использованием Crystal 16. Используемая процедура описана ниже.

Добавляли навески с известным количеством ЦГП (структуры 1) во флаконы с завинчивающейся крышкой.

В каждый флакон добавляли 1 мл соответствующей системы растворителей для образования суспензий. В каждый флакон помещали магнитные элементы для перемешивания.

Системы растворителей и массы ЦГП, использованные в каждом эксперименте, сведены в табл. 16. Флаконы были помещены в держатель образцов прибора Crystal 16, и была запущена требуемая температурная программа. Температурный профиль можно увидеть в табл. 17А.

Мутность системы контролировали везде, что позволило определить точки прозрачности и помутнения.

Таблица 16. Подробности эксперимента по определению ширины метастабильной зоны при охлаждении

Растворитель	Масса ЦГП (мг)	Вводный материал
Этанол: вода (90:10)	2	Структура 2
Этанол: вода (90:10) ТБМЭ (20:80)		Структура 2
Этанол: вода (90:10) ТБМЭ (40:60)		Структура 2
Этанол: вода (90:10) ТБМЭ (80:20)		Структура 2
Этанол: вода (90:10)	25	Структура 2
Этанол: вода (90:10) ТБМЭ (20:80)		Структура 2
Этанол: вода (90:10) ТБМЭ (40:60)		Структура 2
Этанол: вода (90:10) ТБМЭ (80:20)		Структура 2
Этанол: вода (90:10)	100	Структура 2
Этанол: вода (90:10) ТБМЭ (20:80)		Структура 2
Этанол: вода (90:10) ТБМЭ (40:60)		Структура 2
Этанол: вода (90:10) ТБМЭ (80:20)		Структура 2
Этанол: вода (90:10)	325	Структура 1
Этанол: вода (90:10) ТБМЭ (90:10)		Структура 1
Этанол: вода (90:10) ТБМЭ (80:20)		Структура 1
Этанол: вода (90:10) ТБМЭ (70:30)		Структура 1
Этанол: вода (90:10) ТБМЭ (40:60)	425	Структура 1
Этанол: вода (90:10)		Структура 2
Этанол: вода (90:10) ТБМЭ (20:80)		Структура 2
Этанол: вода (90:10) ТБМЭ (40:60)		Структура 2
Этанол: вода (90:10) ТБМЭ (80:20)		Структура 2

Таблица 17А. Температурный профиль для определения ширины метастабильной зоны при охлаждении

1. Перемешивание при:	700 об./мин
2. Выдерживание при:	25°C в течение 10 минут
3. Нагревание до:	70°C со скоростью 0,5°C/мин
4. Выдерживание при:	70°C в течение 1 часа
5. Охлаждение до:	5°C со скоростью 0,25°C/мин
6. Выдерживание при:	5°C в течение 1 часа
7. Нагревание до:	70°C со скоростью 0,25°C/мин
8. Выдерживание при:	70°C в течение 1 часа
9. Охлаждение до:	5°C со скоростью 0,25°C/мин
10. Выдерживание при:	5°C в течение 1 часа
11. Нагревание до:	70°C со скоростью 0,25°C/мин
12. Выдерживание при:	70°C в течение 1 часа
13. Перемешивание при:	700 об./мин
14. Выдерживание при:	20°C

а) Метод добавления антирастворителя.

Определение MSZW относительно добавления антирастворителя было завершено с использованием смеси этанол: вода: МтБЭ. Использовали следующую процедуру.

Примерно 20 г полученной структуры 1 ЦГП переносили в сосуд с рубашкой объемом 250 мл, который был предварительно нагрет до 50°C.

В сосуд добавляли 50 мл смеси растворителей этанол: вода (90:10 об./об.%) до достижения начальной концентрации 400 мг/мл.

Реакционную смесь перемешивали при 50°C, примерно 300 об./мин с использованием верхнеприводной мешалки.

В сосуд вставляли зонд FBRM для отслеживания и регистрации нуклеации и количества частиц.

Когда было достигнуто полное растворение (приблизительно 40 мин), через перистальтический насос добавляли 75 мл МтБЭ со скоростью 10 мл/ч.

По завершении добавления МтБЭ реакционную смесь охлаждали до 5°C со скоростью 0,25°C/мин и выдерживали при 5°C в течение ночи.

Спустя 9 ч при 5°C твердое вещество выделяли вакуумной фильтрацией с использованием воронки Бюхнера 83 мм и фильтровальной бумаги Whatman Grade 1 (диаметр=70 мм; размер пор=11 мкм).

Отбирали образец осадка от фильтрации и анализировали с помощью XRPD.

Оставшийся осадок сушили под вакуумом при 35°C в течение 1 ч.

Концентрацию отфильтрованного маточного раствора определяли с помощью ВЭЖХ.

б) Разработка кристаллизации.

Эксперименты по масштабированию кристаллизации проводили в смеси этанол:вода:МтБЭ. Оценивали различные экспериментальные условия, такие как скорость охлаждения, скорость и температура добавления антирастворителя, загрузка и температура затравки, а также соотношение антирастворителей. Были рассмотрены следующие протоколы.

а) Кристаллизация 1.

Для кристаллизации 1 в раствор добавляли 2 мас.% затравочных кристаллов. Добавление затравки и МтБЭ проводили при 35°C. Суспензию охлаждали до 5°C со скоростью 0,25°C/мин. Использовали следующую процедуру.

Примерно 20 г полученной структуры 1 ЦГП переносили в сосуд с рубашкой, который был предварительно нагрет до 50°C.

50 мл смеси растворителей этанол:вода (90:10 об./об.%) добавляли в сосуд для достижения начальной концентрации 400 мг/мл.

Реакционную смесь перемешивали при 50°C, примерно 300 об./мин с использованием верхнеприводной мешалки.

В сосуд был вставлен зонд FBRM для отслеживания и регистрации нуклеации и количества частиц.

Когда было достигнуто полное растворение (приблизительно 30 мин), реакционную смесь охлаждали до 35°C со скоростью 0,25°C/мин и добавляли 10 мл МтБЭ через перистальтический насос со скоростью 10 мл/ч.

По завершении добавления МтБЭ в реакционную смесь добавляли затравку 400 мг структуры 2 ЦГП.

Систему контролировали примерно 2 ч при 35°C.

Затем реакционную смесь охлаждали до 5°C со скоростью 0,25°C/мин и добавляли 140 мл МтБЭ через перистальтический насос со скоростью 10 мл/ч (14 ч), чтобы получить конечное соотношение растворителей 25:75 об./об.%.

Твердое вещество выделяли вакуумной фильтрацией с использованием воронки Бюхнера 83 мм и фильтровальной бумаги Whatman Grade 1 (диаметр=70 мм; размер пор=11 мкм).

Осадок на фильтре промывали 40 мл смеси этанол:вода:МтБЭ (9 объемов:1 объем:30 объемов), после чего его сушили в вакууме при 40°C в течение 1 ч.

Высушенное твердое вещество анализировали с помощью XRPD, ТГ/ДТА, PLM и ВЭЖХ;

Концентрацию отфильтрованного маточного раствора определяли с помощью вэжх.

б) Кристаллизация 2.

Для кристаллизации 2 в раствор добавляли 2 мас.% затравочных кристаллов. Добавление затравки и МтБЭ проводили при 50°C. Суспензию охлаждали до 5°C со скоростью 0,25°C/мин. Использовали следующую процедуру/

Готовили навеску примерно 20 г полученной структуры 1 ЦГП, и переносили в сосуд с рубашкой, который был предварительно нагрет до 50°C.

В сосуд добавляли 50 мл смеси растворителей этанол:вода (90:10 об./об.%) до достижения начальной концентрации 400 мг/мл.

Реакционную смесь перемешивали при 50°C, примерно 300 об./мин с использованием верхнеприводной мешалки.

В сосуд был вставлен зонд FBRM для отслеживания и регистрации нуклеации и количества частиц.

Когда было достигнуто полное растворение (приблизительно 20 мин), реакционную смесь выдерживали при 50°C и добавляли 10 мл МтБЭ с помощью шприцевого насоса со скоростью 10 мл/ч.

По завершении добавления МтБЭ в эксперимент добавляли 400 мг структуры 2 ЦГП.

Система находилась под наблюдением около 2 ч при 50°C.

140 мл МтБЭ добавляли через перистальтический насос со скоростью 20 мл/ч, чтобы получить конечное соотношение растворителей 25:75 об./об.%.

Затем реакционную смесь охлаждали до 5°C со скоростью 0,25°C/мин и выдерживали при 5°C в течение примерно 9 ч.

Спустя 9 ч при 5°C твердое вещество выделяли вакуумной фильтрацией с использованием воронки Бюхнера 88 мм и фильтровальной бумаги Whatman Grade 1 (диаметр=70 мм; размер пор=11 мкм).

Осадок на фильтре промывали 40 мл смеси этанол:вода:МтБЭ (9 объемов:1 объем:30 объемов), после чего его сушили в вакууме при 40°C в течение 1 ч.

Высушенное твердое вещество анализировали с помощью XRPD, ТГ/ДТА, PLM и ВЭЖХ на чистоту/

Концентрацию отфильтрованного маточного раствора определяли с помощью ВЭЖХ.

в) Кристаллизация 3.

Для кристаллизации 3 в раствор добавляли 2 мас.% затравочных кристаллов.

Добавление затравки и МтБЭ проводили при 35°C. Суспензию охлаждали до 5°C со скоростью 0,25°C/мин. Использовали следующую процедуру.

Готовили навеску примерно 20 г полученной структуры 1 ЦГП и переносили в сосуд с рубашкой, который был предварительно нагрет до 50°C.

В сосуд добавляли 50 мл смеси растворителей этанол:вода (90:10 об./об.%) до достижения начальной концентрации 400 мг/мл.

Реакционную смесь перемешивали при 50°C, примерно 300 об./мин с использованием верхнеприводной мешалки.

В сосуд был вставлен зонд FBRM для отслеживания и регистрации нуклеации и количества частиц. Когда было достигнуто полное растворение (приблизительно 20 мин), реакционную смесь охлаждали до 5°C со скоростью 0,25°C/мин.

Нуклеация наблюдалась, когда система достигала 23°C.

Реакционную смесь нагревали до 50°C для повторного растворения материала. Как только наблюдалось растворение, систему охлаждали до 25°C со скоростью 0,25°C/мин.

Нуклеация наблюдалась, когда система достигала 25°C.

Реакционную смесь нагревали до 50°C для повторного растворения материала. Как только наблюдали растворение, систему охлаждали до 35°C и в эксперимент добавляли 400 мг структуры 2 ЦГП.

140 мл МтБЭ добавляли через перистальтический насос со скоростью 20 мл/ч, чтобы получить конечное соотношение растворителей 26:74 об./об.%.

Затем реакционную смесь охлаждали до 5°C со скоростью 0,25°C/мин и выдерживали при 5°C в течение примерно 9 ч.

Твердое вещество выделяли вакуумной фильтрацией с использованием воронки Бюхнера 88 мм и фильтровальной бумаги Whatman Grade 1 (диаметр=70 мм; размер пор=11 мкм).

Осадок на фильтре промывали 40 мл смеси этанол:вода:МтБЭ (9 объемов:1 объем:30 объемов), после чего его сушили в вакууме при 40°C в течение 1 ч.

Высушенное твердое вещество анализировали с помощью XRPD, ТГ/ДТА, PLM и ВЭЖХ на чистоту.

Концентрацию отфильтрованного маточного раствора определяли с помощью ВЭЖХ.

d) Кристаллизация 4.

Для кристаллизации 4 в раствор добавляли 2 мас.% затравочных кристаллов.

Добавление затравки и МтБЭ проводили при 50°C. Суспензию охлаждали до 5°C со скоростью 0,1°C/мин. Использовали следующую процедуру.

Приблизительно 20 г структуры 2 ЦГП (материала, полученного из кристаллизации 1 и 3) взвешивали и переносили в сосуд с рубашкой, который был предварительно нагрет до 50°C.

В сосуд добавляли 50 мл смеси растворителей этанол: вода (90:10 об./об.%) до достижения начальной концентрации 400 мг/мл.

Реакционную смесь перемешивали при 50°C, примерно 300 об./мин с использованием верхнеприводной мешалки.

В сосуд был вставлен зонд FBRM для отслеживания и регистрации нуклеации и количества частиц.

Когда было достигнуто полное растворение (приблизительно 20 мин), эксперимент проводили при 50°C, и добавляли 20 мл МтБЭ с помощью шприцевого насоса со скоростью 20 мл/час.

По завершении добавления МтБЭ в реакционную смесь добавляли 400 мг структуры 2 ЦГП.

Система находилась под наблюдением примерно 2 ч при 50°C.

140 мл МтБЭ добавляли через перистальтический насос со скоростью 20 мл/ч, чтобы получить конечное соотношение растворителей 24:76 об./об.%.

Затем реакционную смесь охлаждали до 5°C со скоростью 0,1°C/мин.

Реакционную смесь выдерживали при 5°C в течение ночи.

Через 8 ч при 5°C твердое вещество выделяли вакуумной фильтрацией с использованием 88 мм воронки Бюхнера и фильтровальной бумаги Whatman Grade 1 (диаметр=70 мм; размер пор=11 мкм).

Осадок на фильтре промывали 40 мл смеси этанол:вода:МтБЭ (9 объемов:1 объем:30 объемов), после чего его сушили в вакууме при 40°C в течение 1 ч.

Высушенное твердое вещество анализировали с помощью XRPD, ТГ/ДТА, PLM и ВЭЖХ на чистоту.

Концентрацию отфильтрованного маточного раствора определяли с помощью ВЭЖХ.

e) Кристаллизация 5.

Для кристаллизации 5 в раствор добавляли 2 мас.% измельченных затравочных кристаллов. Добавление затравки и МтБЭ проводили при 50°C. Суспензию охлаждали до 5°C со скоростью 0,1°C/мин. Использовали следующую процедуру.

Готовили навеску примерно 20 г смеси структур 1 и 2 ЦГП (структуры 1 из полученного CS/352/18 и структура 2 из кристаллизации 4) и переносили в сосуд с рубашкой, который был предварительно нагрет до 50°C.

В сосуд добавляли 50 мл смеси растворителей этанол:вода (90:10 об./об.%) до достижения начальной концентрации 400 мг/мл.

Реакционную смесь перемешивали при 50°C, со скоростью примерно 300 об./мин с использованием верхнеприводной мешалки.

В сосуд был вставлен зонд FBRM для отслеживания и регистрации нуклеации и количества частиц.

Когда было достигнуто полное растворение (примерно 20 мин), эксперимент проводили при 50°C, и по каплям с помощью шприца добавляли 25 мл МтБЭ.

По завершении добавления МтБЭ в реакционную смесь добавляли 400 мг структуры 2 ЦГП, измельченной с помощью пестика и ступки.

Система находилась под наблюдением примерно 75 мин при 50°C.

140 мл МтБЭ добавляли через перистальтический насос со скоростью 20 мл/ч, чтобы получить конечное соотношение растворителей 23:77 об./об.%.
Затем реакционную смесь охлаждали до 5°C со скоростью 0,1°C/мин.

Систему выдерживали при 5°C в течение ночи.

Через 9 ч при 5°C твердое вещество выделяли вакуумной фильтрацией с использованием воронки Бюхнера 88 мм и фильтровальной бумаги Whatman Grade 1 (диаметр=70 мм; размер пор=11 мкм).

Осадок на фильтре промывали 40 мл смеси этанол:вода:МтБЭ (9 объемов:1 объем:30 объемов), после чего его сушили в вакууме при 40°C в течение 1 ч.

Высушенное твердое вещество анализировали с помощью XRPD, ТГ/ДТА, PLM и ВЭЖХ на чистоту.

Концентрацию отфильтрованного маточного раствора определяли с помощью ВЭЖХ.

f) Кристаллизация 6.

Для кристаллизации 6 в раствор добавляли 2 мас.% измельченных затравочных кристаллов. Добавление осуществляли при 50°C и использовали поэтапное добавление МтБЭ. Суспензию охлаждали до 29°C со скоростью 0,1°C/мин и выдерживали при этой температуре в течение 8 ч. Затем суспензию охлаждали до 5°C со скоростью 0,25°C/мин. Использовали следующую процедуру.

Готовили навеску примерно 20 г смеси структур 1 и 2 ЦПП (структура 1 из полученного CS/352/18 и структура 2 из кристаллизации 5) и переносили в сосуд с рубашкой, который был предварительно нагрет до 50°C.

В сосуд добавляли 50 мл смеси растворителей этанол: вода (90:10 об./об.%) до достижения начальной концентрации 400 мг/мл.

Реакционную смесь перемешивали при 50°C, примерно 300 об./мин с использованием верхнеприводной мешалки.

В сосуд был вставлен зонд FBRM для отслеживания и регистрации нуклеации и количества частиц.

Когда было достигнуто полное растворение (примерно 20 мин), эксперимент проводили при 50°C, и по каплям с помощью шприца добавляли 25 мл МтБЭ.

По завершении добавления МтБЭ в эксперимент добавляли 400 мг структуры 2 ЦПП, измельченной с помощью пестика и ступки.

Система находилась под наблюдением примерно 10 мин при 50°C.

Затравочные кристаллы не сохранились. Дополнительные 5 мл МтБЭ добавляли по каплям в сосуд с помощью шприца.

70 мл МтБЭ добавляли через перистальтический насос со скоростью 20 мл/ч.

Затем реакционную смесь охлаждали до 29°C со скоростью 0,1°C/мин.

Реакционную смесь выдерживали при 29°C в течение 8 ч.

Через 8 ч при 29°C систему охлаждали до 5°C со скоростью 0,25°C/мин.

После того, как температура в системе достигла 5°C, начинали вторую стадию добавления МтБЭ. Добавляли 190 мл со скоростью 20 мл/ч. Конечное соотношение растворителей 15:85 об.%.
Систему выдерживали при 5°C примерно 12 ч.

Затем твердое вещество выделяли вакуумной фильтрацией с использованием воронки Бюхнера 88 мм и фильтровальной бумаги Whatman Grade 1 (диаметр=70 мм; размер пор=11 мкм).

Осадок на фильтре промывали 40 мл смеси этанол:вода:МтБЭ (9 объемов:1 объем:30 объемов), после чего его сушили в вакууме при 40°C в течение 1 ч.

Высушенное твердое вещество анализировали с помощью XRPD, ТГ/ДТА, PLM, и ВЭЖХ на чистоту, и с помощью хиральной ВЭЖХ.

Концентрацию отфильтрованного маточного раствора определяли с помощью ВЭЖХ.

g) Кристаллизация 7.

Для кристаллизации 7 в раствор добавляли 2 мас.% измельченных затравочных кристаллов. Добавление осуществляли при 50°C и использовали поэтапное добавление МтБЭ. Суспензию охлаждали до 5°C со скоростью 0,1°C/мин. Использовали следующую процедуру.

Готовили навеску примерно 20 г смеси структур 1 и 2 ЦПП (структура 1 из полученного CS/352/18 и структура 2 из кристаллизации 6) и переносили в сосуд с рубашкой, который был предварительно нагрет до 50°C.

В сосуд добавляли 50 мл смеси растворителей этанол: вода (90:10 об./об.%) до достижения начальной концентрации 400 мг/мл.

Реакционную смесь перемешивали при 50°C, со скоростью примерно 300 об./мин с использованием верхнеприводной мешалки.

В сосуд был вставлен зонд FBRM для отслеживания и регистрации нуклеации и количества частиц.

Когда было достигнуто полное растворение (примерно 20 мин), эксперимент проводили при 50°C, и вручную (по каплям) с помощью шприца добавляли 27,5 мл МтБЭ.

По завершении добавления МтБЭ в реакционную смесь добавляли 400 мг структуры 2 ЦПП, измельченной с помощью пестика и ступки.

Система находилась под наблюдением примерно 10 мин при 50°C.

70 мл МтБЭ добавляли через перистальтический насос со скоростью 20 мл/ч.

Затем реакционную смесь охлаждали до 5°C со скоростью 0,1°C/мин.

Систему выдерживали при 5°C в течение ночи.

Примерно через 9 ч при 5°C был начат второй этап добавления МтБЭ. Добавляли 190 мл со скоростью 20 мл/ч. Конечное соотношение растворителей 15:85 об.%.

Твердое вещество выделяли вакуумной фильтрацией с использованием воронки Бюхнера 88 мм и фильтровальной бумаги Whatman Grade 1 (диаметр=70 мм; размер пор=11 мкм).

Осадок на фильтре промывали 40 мл смеси этанол:вода:МтБЭ (9 объемов:1 объем:30 объемов), после чего его сушили в вакууме при 40°C в течение 1 ч.

Высушенное твердое вещество анализировали с помощью XRPD, ТГ/ДТА, PLM и ВЭЖХ на чистоту.

Концентрацию отфильтрованного маточного раствора определяли с помощью ВЭЖХ.

h) Кристаллизация 8.

Для кристаллизации 8 в раствор добавляли 5 мас.% измельченных затравочных кристаллов. Добавление осуществляли при 50°C и использовали поэтапное добавление МтБЭ. Суспензию охлаждали до 5°C со скоростью 0,1°C/мин. Использовали следующую процедуру.

Готовили навеску примерно 20 г смеси структур 1 и 2 ЦГП (структуры 1 из полученного CS/352/18 и структуры 2 из кристаллизации 7) и переносили в сосуд с рубашкой, который был предварительно нагрет до 50°C.

В сосуд добавляли 50 мл смеси растворителей этанол: вода (90:10 об./об.%) до достижения начальной концентрации 400 мг/мл.

Реакционную смесь перемешивали при 50°C, со скоростью примерно 300 об./мин с использованием верхнеприводной мешалки.

В сосуд был вставлен зонд FBRM для отслеживания и регистрации нуклеации и количества частиц.

Когда было достигнуто полное растворение (приблизительно 20 мин), эксперимент проводили при 50°C и вручную (по каплям) с помощью шприца добавляли 27,5 мл МтБЭ.

По завершении добавления МтБЭ в эксперимент добавляли 1 г структуры 2 ЦГП, измельченной с помощью пестика и ступки.

Система находилась под наблюдением примерно 10 мин при 50°C.

70 мл МтБЭ добавляли через перистальтический насос со скоростью 20 мл/ч.

Затем реакционную смесь охлаждали до 5°C со скоростью 0,1°C/мин.

Систему выдерживали при 5°C в течение ночи.

Примерно через 9 ч при 5°C был начат второй этап добавления МтБЭ. Добавляли 190 мл со скоростью 20 мл/ч. Конечное соотношение растворителей 15:85 об.%.

Твердое вещество выделяли вакуумной фильтрацией с использованием воронки Бюхнера 88 мм и фильтровальной бумаги Whatman Grade 1 (диаметр=70 мм; размер пор=11 мкм).

Осадок на фильтре промывали 40 мл смеси этанол:вода:МтБЭ (9 объемов:1 объем:30 объемов), после чего его сушили в вакууме при 40°C в течение 1 ч.

Высушенное твердое вещество анализировали с помощью XRPD, ТГ/ДТА, PLM и ВЭЖХ на чистоту.

Концентрацию отфильтрованного маточного раствора определяли с помощью ВЭЖХ.

i) Кристаллизация 9.

Для кристаллизации 9 в раствор добавляли 5 мас.% измельченных затравочных кристаллов. Добавление осуществляли при 50°C и использовали поэтапное добавление МтБЭ. Суспензию охлаждали до 30°C со скоростью 0,1°C/мин и выдерживали при этой температуре в течение 8 ч. Затем суспензию охлаждали до 5°C со скоростью 0,1°C/мин. Использовали следующую процедуру.

Готовили навеску примерно 20 г смеси структуры 1 и 2 ЦГП (структуры 1 из полученного CS/352/18 и структуры 2 из кристаллизации 8) и переносили в сосуд с рубашкой, который был предварительно нагрет до 50°C.

В сосуд добавляли 50 мл смеси растворителей этанол:вода (90:10 об./об.%) до достижения начальной концентрации 400 мг/мл.

Реакционную смесь перемешивали при 50°C, со скоростью примерно 300 об./мин с использованием верхнеприводной мешалки.

В сосуд был вставлен зонд FBRM для отслеживания и регистрации нуклеации и количества частиц.

Когда было достигнуто полное растворение (примерно 20 мин), эксперимент проводили при 50°C и вручную (по каплям) с помощью шприца добавляли 27,5 мл МтБЭ.

По завершении добавления МтБЭ в реакционную смесь добавляли 1 г структуры 2 ЦГП, измельченной с помощью пестика и ступки.

Система находилась под наблюдением примерно 10 мин при 50°C.

70 мл МтБЭ добавляли через перистальтический насос со скоростью 15 мл/ч.

Затем реакционную смесь охлаждали до 30°C со скоростью 0,1°C/мин.

Систему выдерживали при 30°C в течение 8 ч.

Через 8 ч при 30°C в системе возобновляли охлаждение до 5°C со скоростью 0,1°C/мин.

Начинали второй этап добавления МтБЭ. Добавляли 190 мл со скоростью 20 мл/ч. Конечное соотношение растворителей 15:85 об.%.
 Систему выдерживали при 5°C в течение ночи.

Спустя примерно 10 ч при 5°C твердое вещество выделяли вакуумной фильтрацией с использованием воронки Бюхнера и фильтровальной бумаги Whatman Grade 1 (диаметр=70 мм; размер пор=11 мкм).

Осадок на фильтре промывали 40 мл смеси этанол:вода:МтБЭ (9 объемов:1 объем:30 объемов), после чего его сушили в вакууме при 40°C в течение 1 ч.

Высушенное твердое вещество анализировали с помощью XRPD, ТГ/ДТА, PLM и ВЭЖХ на чистоту.

Концентрацию отфильтрованного маточного раствора определяли с помощью ВЭЖХ.

j) Кристаллизация 10.

Для кристаллизации 10 использовали ту же процедуру, что и для кристаллизации 6. Из-за размера емкости параметры были уменьшены до 70% от исходного эксперимента. В этом эксперименте также использовали новую партию полученного ЦГП (структуры 1) (CS/802/18).

В раствор добавляли 2 мас.% измельченных затравочных кристаллов. Добавление осуществляли при 50°C и использовали поэтапное добавление МтБЭ. Суспензию охлаждали до 29°C со скоростью 0,1°C/мин и выдерживали при этой температуре в течение 8 ч. Затем суспензию охлаждали до 5°C со скоростью 0,25°C/мин. Использовали следующую процедуру.

Готовили навеску примерно 14 г полученного образца структуры 1 ЦГП и переносили в сосуд с рубашкой, который был предварительно нагрет до 50°C.

В сосуд добавляли 35 мл смеси растворителей этанол:вода (90:10 об./об.%) до достижения начальной концентрации 400 мг/мл.

Реакционную смесь перемешивали при 50°C, со скоростью примерно 300 об./мин с использованием верхнеприводной мешалки.

В сосуд вставляли зонд FBRM для отслеживания и регистрации нуклеации и количества частиц.

Когда было достигнуто полное растворение (приблизительно 20 мин), эксперимент проводили при 50°C, и 17,5 мл МтБЭ добавляли по каплям с помощью шприца.

По завершении добавления МтБЭ в реакционную смесь добавляли 280 мг структуры 2 ЦГП, измельченной с помощью пестика и ступки.

Система находилась под наблюдением примерно 10 мин при 50°C.

Затравочные кристаллы не сохранились. Дополнительно 3,5 мл МтБЭ добавляли по каплям в сосуд с помощью шприца.

50 мл МтБЭ добавляли через перистальтический насос со скоростью 20 мл/ч.

Затем реакционную смесь охлаждали до 29°C со скоростью 0,1°C/мин.

Систему выдерживали при 29°C в течение 8 ч.

Через 8 ч при 29°C реакционную смесь охлаждали до 5°C со скоростью 0,25°C/мин.

После того, как температура в системе достигла 5°C, начинали вторую стадию добавления МтБЭ. 134 мл добавляли со скоростью 20 мл/ч. Конечное соотношение растворителей составило 15:85 об.%.
 Систему выдерживали при 5°C примерно 12 ч.

Затем твердое вещество выделяли вакуумной фильтрацией с использованием воронки Бюхнера 88 мм и фильтровальной бумаги Whatman Grade 1 (диаметр=70 мм; размер пор=11 мкм).

Осадок на фильтре промывали 28 мл смеси этанол:вода:МтБЭ (9 объемов:1 объем:30 объемов), после чего его сушили в вакууме при 40°C в течение 1 ч.

Высушенное твердое вещество анализировали с помощью XRPD, ТГ/ДТА, PLM, хиральной ВЭЖХ и ВЭЖХ на чистоту.

Концентрацию отфильтрованного маточного раствора определяли с помощью ВЭЖХ.

Пример 4. Определение чистоты.

Чистоту ЦГП и ЦГП-гидрата измеряли с помощью ВЭЖХ. Хроматографические параметры метода ВЭЖХ для измерения чистоты для ЦГП и ЦГП-гидрата суммированы в табл. 17В.

Таблица 17В. Хроматографические параметры метода ВЭЖХ для измерения чистоты ЦГП и ЦГП-гидрата

Колонка	Колонка XBridge Phenyl (150 мм * 4,6 мм * 3,5 мкм, PN: 186003335)		
Длина волны	220 нм		
Температура печи колонки	30°C		
Скорость потока	1,0 мл/мин		
Вводимый объем	5 мкл		
Подвижные фазы	А: 10 мМ NH ₄ OAc в воде (масс./об.) В: Очищенный ацетонитрил		
Градиентная программа	Время (мин)	А%	В%
	0,01	100	0
	10,3	70	30
	15,0	5	95
	15,1	100	0
	25,0	100	0
Температура автосэмплера	5°C		
Время хроматографирования	25 мин		
Растворитель для промывания иглы	Очищенный ацетонитрил		
Разбавитель	0,1% ТФУ в воде (об./об.)		

Приготовление стандартного раствора для количественного определения (0,8 мг/мл безводного ЦГП или 0,85 мг/мл гидрата ЦГП): взвешивали приблизительно 40 мг эталонного стандарта С16081735-D и переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл. Разбавляли до метки разбавителем и тщательно перемешивали (при необходимости обрабатывали ультразвуком для растворения). Обозначили раствор как STD-1. Готовили второй Стандартный раствор для использования в качестве Проверки стандарта. Обозначили раствор как STD-2.

Приготовление Раствора образца для определения количественного содержания (0,85 мг/мл гидрата ЦГП): добавляли навеску примерно 42,5 мг образца гидрата ЦГП в мерную колбу вместимостью 50 мл. Разбавляли до метки разбавителем и тщательно перемешивали.

Типичная хроматограмма холостой пробы и типичная хроматограмма разрешающего раствора показаны на фиг. 52 и 53, соответственно.

Пример 5. Сравнение стабильности гидрата ЦГП.

А) Сравнение химической стабильности между ангидратом ЦГП и гидратом ЦГП структуры 2.

Соединения ангидрата ЦГП (структуру 1) и гидрата ЦГП (структуру 2) получали в условиях GMP. Исследование стабильности безводного соединения ЦГП было проведено в ускоренных условиях (40±5°C/75±5% относительной влажности) в течение шести месяцев и при комнатной температуре (25±5°C/60±5% относительной влажности) в течение 12 месяцев. Дальнейшее исследование стабильности соединения гидрата ЦГП проводили в ускоренных условиях (40±5°C/75±5% относительной влажности) в течение 6 месяцев (табл. 18).

Таблица 18. Исследование стабильности ангидрата и гидрата ЦГП структуры 2

	Начало	1 месяц		3 месяца		6 месяцев		12 месяцев	
	25°C	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C
Соединение ангидрат ЦГП	T ¹	NS ²	T ¹	T ¹	T ¹	T ¹	T ¹	T ¹	NS ²
Соединение гидрат ЦГП, структура 2	T ¹	NS ²	T ¹	T ¹	T ¹	S ³	S ³	S ³	NS ²

T¹=анализировали,

NS²=не запланировано,

S³=запланировано.

Условия длительного хранения безводного соединения ЦГП требуют осторожного обращения, поскольку ЦГП гигроскопичен. Ангидрат ЦГП поглотил влагу во время исследования стабильности, наблюдался рост новых примесей и уменьшение содержания ангидрата ЦГП из-за разложения ЦГП (табл. 19). Данные о стабильности структуры 2 гидрата ЦГП показаны в табл. 20.

Таблица 19. Примеси, увеличивающиеся в безводном ЦГП (структура 1) в условиях ускоренного испытания на стабильность

Ангидрат ЦГП (структура 1) при 40°C/75% относительной влажности				
Увеличение общих примесей	0 М	1 М	3 М	6 М
	05	0%	0,27%	0,53%

Таблица 20. Примеси, увеличивающиеся в гидрате ЦГП (структура 2) в условиях ускоренного испытания на стабильность

Гидрат ЦГП (структура 2) при 40°C/75% относительной влажности				
Увеличение общих примесей	0 М	1 М	3 М	6 М
	05	0%	0,00%	0,05%

Ангидрат ЦГП поглощал влагу до тех пор, пока содержание воды в ЦГП не достигло 7%. Таким образом, ангидрат ЦГП имеет тенденцию впитывать влагу. Также наблюдали разложение ангидрата ЦГП. Напротив, не было значительных качественных изменений в стабильной гидратной форме структуры 2 во время исследования стабильности в условиях ускоренного испытания в течение 6 месяцев.

Сравнение общего количества примесей между безводным ЦГП и гидратом ЦГП (структура 2) показано на фиг. 54.

Пример 6. Скрининг полиморфов гидрата ЦГП.

Исследование полиморфизма было выполнено на ЦГП с целью идентификации любых новых полиморфов с улучшенными свойствами в твердом состоянии. В рамках этого исследования структура 2 ЦГП была идентифицирована как стабильная форма для разработки, которая представляет собой стехиометрический моногидрат. Исследование повлекло за собой первоначальный анализ полученного ангидрата ЦГП (структура 1, серия: 1058707), определение растворимости в 30 системах растворителей и первичный скрининг полиморфов с использованием 24 систем растворителей и четырех соответствующих условий процесса (циклирование, охлаждение, добавление и испарение антирастворителя). После этого был проведен вторичный скрининг для масштабирования структуры 2 ЦГП, включая оценку стабильности в течение 1 недели и оценку растворимости в зависимости от pH.

Материал в полученном виде оказался кристаллическим по результатам XRPD и состоял из двулучепреломляющих частиц без определенной морфологии. С термической точки зрения было обнаружено, что структура 1 демонстрирует три небольших потери массы в начале нагрева до того, как образец плавится при 170°C. Анализ ДСП показал, что произошло изменение формы, и позволил предположить, что полученный материал после ДСП был гидратированной формой исходного материала. Анализ ТГ/ДТА твердого вещества после ДСП подтвердил это, причем термограмма ТГ/ДТА соответствовала термическим данным материала структуры 2, проанализированного во время вторичного скрининга полиморфов.

Высокая растворимость наблюдалась в этаноле и метаноле с приблизительной растворимостью, составляющей $100 \geq x \geq 50$ мг/мл. Используя информацию, собранную при скрининге растворимости, был проведен первичный скрининг полиморфов с использованием преимущественно аморфного исходного материала, приготовленного из полученного ЦГП (структура 1). Один новый полиморф, чистая структура 1, в дополнение к структурам 1 и 2, был обнаружен при первичном скрининге.

На основе результатов первичного скрининга полиморфов структуру 2 масштабировали для дальнейшего анализа. Было обнаружено, что термически материал структуры 2 теряет 0,9 эквивалента воды с начала эксперимента ТГ/ДТА до того, как происходит рекристаллизация примерно при 120°C. Затем последовало плавление при 170°C. Было обнаружено, что температура расплава была такой же, как и для структуры 1, что свидетельствует о том, что образец дегидратировался и перекристаллизовался до структуры 1 при нагревании. Хотя событие перекристаллизации не было видно на кривой ДСК, свидетельство перекристаллизации структуры 2 в структуру 1 было обнаружено с помощью высокотемпературной микроскопии PLM. Краткосрочные однонедельные исследования стабильности структуры 2 ЦГП показали хорошую химическую стабильность в оцениваемых условиях, но XRPD-анализ показал, что исходный материал структуры 2 преобразовался в структуру 1 после 7 дней хранения при 80°C в закрытых флаконах. Образец, хранящийся при температуре окружающей среды и 40°C/75% относительной влажности, оставался как структура 2.

Более длительные 8-недельные исследования стабильности структуры 2 ЦГП показали хорошую физическую стабильность при 40°C/75% относительной влажности. Анализ XRPD подтвердил, что структура 2 преобладала на протяжении всего 8-недельного испытания.

Чистая структура 1 первоначально наблюдалась при VT/VH-XRPD испытании структуры 2. Дифрактограмма, полученная при 80°C/0% относительной влажности, показала профиль пика, который был подобен материалу структуры 1, с некоторыми отсутствующими пиками, в первую очередь при $17^\circ 2\theta$. Дальнейшее сравнение с дифрактограммой исходной структуры 2 показало, что на дифрактограмме структуры 2 присутствовали отсутствующие пики. Это говорит о том, что полученный материал (обозначенный как структура 1) представляет собой смесь чистой структуры 1 и структуры 2. Масштабирование чистой структуры 1 не было успешным при нагревании до 50 или 80°C, но было достигнуто путем быстрого испарения в этаноле/дихлорметане, поскольку смесь этанол/ДХМ растворяет материал в дополнение к азеотропной перегонке воды, способствуя образованию безводной структуры 1.

Исследования стабильности в течение восьми (8) недель на чистой структуре 1 ЦГП показали плохую физическую стабильность при 40°C/75% относительной влажности. Анализ XRPD подтвердил, что чистая структура 1 преобразовалась в структуру 2 через 14 дней.

Материал как структуры 1, так и структуры 2 оставался хирально чистым на протяжении всей оценки стабильности. Несмотря на то, что исследование было продолжено на исходных образцах, материал, подвергающийся испытанию стабильности с 2-недельной временной точки, был структурой 2, а не структурой 1 из-за плохой стабильности чистой структуры 1 при этой температуре и влажности.

Краткосрочные однодневные испытания стабильности чистой структуры 1 ЦГП показали, что материал преобразовался в структуру 2 через 2 ч при 40°C/75% относительной влажности.

На основе наблюдений, описанных в настоящей заявке, выделяющих структуру 2 как наиболее стабильную форму, рекомендуется рабочая программа развития кристаллизации с целью обеспечения надежной, масштабируемой процедуры для подготовки материала структуры 2.

2) Материалы.

Были проанализированы следующие материалы.

Серия/ идентификатор образца: цикло(-Гис-Про) серия: 1058707.

Идентификатор SFS: CS/298/18/1 и CS/298/18/2.

Полученное количество: 10 г.

Внешний вид: Почти белое твердое вещество.

В) Методы анализа.

1) Рентгеновская порошковая дифракция (XRPD).

XRPD-анализ проводили на приборе PANalytical X'pert pro, сканируя образцы в диапазоне от 3 до 35° 2 θ . Материал осторожно измельчали для высвобождения каких-либо агломератов и загружали на многолуночный планшет с пленкой из каптона или майлара для поддержки образца. Затем многолуночный планшет помещали в дифрактометр и анализировали с использованием излучения Cu K (α_1 λ =1,54060 Å; α_2 =1,54443 Å; β =1,39225 Å; Отношение α_1 : α_2 =0,5) в режиме просвечивания (размер шага 0,0130° 2 θ) с использованием настроек генератора 40 кВ/40 мА.

2) Микроскопия в поляризованном свете (PLM).

Наличие кристалличности (двойное лучепреломление) определяли с помощью поляризационного микроскопа Olympus BX50, оснащенного камерой Motic и программным обеспечением для захвата изображений (Motic Images Plus 2.0). Все изображения были записаны с использованием объектива 20х, если не указано иное.

3) Высокотемпературная световая микроскопия.

Температурные явления контролировали визуально с использованием откалиброванного нагревательного столика Linkam THM600 с подключенным блоком контроллера, соединенного с поляризационным микроскопом Olympus BX50, оборудованным камерой Motic и программным обеспечением для захвата изображений (Motic Images Plus 2.0). Приблизительно 0,5 мг материала помещали на покровное стекло микроскопа и нагревали со скоростью 10°С/мин с изображениями, полученными через обычные интервалы для документирования любых тепловых переходов. Все изображения были записаны с использованием объектива 10х, если не указано иное.

4) Термогравиметрический анализ (ТГА).

Готовили навеску приблизительно 5 мг материала в открытой алюминиевой чашке, загружали в термогравиметрический/дифференциальный термический анализатор (ТГ/ДТА) и выдерживали при комнатной температуре. Затем образец нагревали со скоростью 10°С/мин от 20 до 300°С, в течение этого времени регистрировали изменение массы образца вместе с любыми дифференциальными тепловыми событиями (ДТА). В качестве продувочного газа использовали азот при расходе 300 см³/мин.

5) Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК).

Готовили навеску примерно 5 мг материала в алюминиевой чашке для ДСК и герметично закрывали алюминиевой крышкой с отверстиями. Чашку для образца затем загружали в Seiko DSC6200 (с кулером), охлаждали и выдерживали при температуре 20°С. После получения стабильного отклика теплового потока образец и эталон нагревали до 250°С со скоростью сканирования 10°С/мин и отслеживали полученный отклик теплового потока. В качестве продувочного газа использовали азот при расходе 50 см³/мин.

6) Инфракрасная спектроскопия (ИК).

Инфракрасную спектроскопию проводили на спектрометре Bruker ALPHA P. Достаточное количество материала помещали в центр пластины спектрометра, и спектры получали с использованием следующих параметров.

Разрешение:	4 см ⁻¹
Время фонового сканирования:	16 сканирований
Время сканирования образцов:	16 сканирований
Сбор данных:	от 4000 до 400 см ⁻¹
Итоговый спектр:	пропускание
Программное обеспечение:	OPUS версия 6

7) Ядерный магнитный резонанс (ЯМР).

ЯМР-эксперименты проводили на спектрометре Bruker AVIIIHD, оборудованном криозондом DCH, работающим на частоте 500,12 МГц для протонов. Эксперименты проводили в дейтерированном ДМСО, и каждый образец готовили с примерной концентрацией 10 мМ.

8) Динамическая сорбция пара (ДСП).

Приблизительно 10-20 мг образца помещали в сетчатую чашку весов сорбции пара и загружали в весы динамической сорбции пара DVS Intrinsic от Surface Measurement Systems. Образец подвергали ли-

нейному профилю от 40 до 90% относительной влажности (RH) с шагом 10%, выдерживая образец на каждом этапе до тех пор, пока не достигалась стабильная масса (dm/dt 0,004%, минимальная длина шага 30 мин, максимальная длина шага 500 мин) при 25°C. После завершения цикла сорбции образец сушили, используя ту же процедуру, до 0% RH, а затем проводили второй цикл сорбции обратно до 40% RH. Было выполнено два цикла. Строили график изменения массы во время циклов сорбции/десорбции, что позволило определить гигроскопичность образца. Затем проводили XRPD-анализ любого оставшегося твердого вещества.

9) Динамическая сорбция пара с переменной температурой (VT-DVS).

Приблизительно 10-20 мг образца помещали в сетчатую чашу весов сорбции пара и загружали в динамические весы сорбции пара ДСП Advantage от Surface Measurement Systems. Образец подвергали переменному профилю от 40 до 90% относительной влажности (RH) с шагом 10%, выдерживая образец на каждом этапе до достижения стабильной массы (dm/dt 0,004%, минимальная длина шага 30 мин, максимальная длина шага 500 мин) при 40°C. После завершения цикла сорбции образец сушили, используя ту же процедуру, до 0% RH, а затем проводили второй цикл сорбции обратно до 40% RH. Регистрировали изменение массы во время циклов сорбции/десорбции, что позволило определить гигроскопичность образца. Эксперимент повторяли при 50°C и, наконец, при 60°C. Затем проводили XRPD-анализ любого оставшегося твердого вещества.

10) Рентгеновская порошковая дифракция при переменной температуре и влажности (VT-/VH-XRPD).

VT-/VH-XRPD-анализ выполняли на многофункциональном дифрактометре Philips X'Pert Pro, оборудованном камерой температуры и влажности. Образцы сканировали в диапазоне от 4 до 35,99° 2 θ с использованием излучения Cu K ($\alpha_1 \lambda=1,54060 \text{ \AA}$; $\alpha_2=1,54443 \text{ \AA}$; $\beta=1,39225 \text{ \AA}$; соотношение $\alpha_1: \alpha_2=0,5$) в геометрии Брэгга-Брентано (размер шага 0,008° 2 θ) с использованием настроек генератора 40 кВ/40 мА. Измерения проводили на каждом этапе профиля влажности ниже/

Программа.

40% RH/ комнатная температура - начальное сканирование.

0% RH/ комнатная температура - начальное сканирование, 1 час выдержки, сканирование.

0% RH/ 80°C - начальное сканирование, 20 минут выдержки, сканирование.

0% RH/ 80°C - начальное сканирование, 80 минут выдержки, сканирование.

11) Высокоэффективная жидкостная хроматография - детекция в ультрафиолетовом диапазоне (ВЭЖХ-УФ).

Инструмент:

Dionex Ultimate 3000

Колонка: LC/168 X-Bridge Phenyl Column
(150 мм x 4,6 мм x 3,5 мкм)

Температура колонки: 30°C

Температура автосэмплера: 5°C

Длина волны УФ: 220 нм

Вводимый объем: 5 мкл

Скорость потока: 1 мл/мин

Подвижная фаза А: 10 mM ацетат аммония

Подвижная фаза В: ацетонитрил

Разбавитель: 0,1% ТФУ в воде

Программа градиента

Время (минуты)	Растворитель В (%)
0,01	0
10,3	30
15	95
15,1	0
25	0

12) Жидкостная хроматография - масс-спектрометрия (ЖХ-МС).

Инструмент:	Dionex Ultimate 3000
Колонка:	ACE Excel 3 Super C18, 75 x 4,6 мм
Температура колонки:	30°C
Вводимый объем:	10 мкл
Скорость потока:	1,0 мл/мин
Подвижная фаза А:	0,1% муравьиной кислоты в деионизированной воде
Подвижная фаза В:	0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле
Разбавитель:	ацетонитрил
Промывка иглы:	ацетонитрил, позиция флакона № 100
Диапазон ФДМ:	190-400 нм

Градиентная программа

Время (минуты)	Растворитель В (%)
0,00	5
12,00	95
15,00	95
15,10	5
20,00	5

13) Хиральная ВЭЖХ.

Колонка:	Daicel IC (5,0 мкм, 250 * 4,6 мм)
Температура колонки:	30°C
Вводимый объем:	5 мкл
Скорость потока:	1,0 мл/мин
Подвижная фаза А:	0,01% ДЭА в н-гексане
Подвижная фаза В:	Этанол: метанол = 2: 8 (об./об.)
Разбавитель:	ацетонитрил
Диапазон ФДМ:	220 нм

Градиентная программа

Время (минуты)	А%	В%
0,01	70	30
28,0	70	30

С) Эксперименты.

1) Первоначальная характеристика.

При получении поставляемого цикло(Гис-Про), называемого здесь ЦГП, первоначальная характеристика была выполнена с использованием XRPD, PLM, ТГ/ДТА, DSC, ДСП (с анализом после XRPD), ¹H и HSQC ЯМР, ВЭЖХ (для определения чистоты и УФ-спектра), рКа и ЖХ-МС с использованием методик и способов, описанных в разделе В.

2) Подготовка образца для скрининга растворимости в растворителях.

Лиофилизация в воде.

Материал был приготовлен путем лиофилизации для определения растворимости в растворителях следующим образом.

К полученному ЦГП (структура 1) (330 мг) добавляли 3,3 мл дистиллированной воды, получая прозрачный бесцветный раствор.

Этот раствор был поровну разделен между 33 стеклянными флаконами по 2 мл (содержащими примерно 100 мкл в каждом флаконе и 10 мг твердого вещества).

Флаконы замораживали при -50°C для подготовки к лиофилизации.

После замораживания образцы помещали в эксикатор, прикрепленный к сублимационной сушилке, и сушили примерно 18 ч. По истечении этого времени брали образцы и анализировали с помощью XRPD для подтверждения аморфной природы серии.

Повторная лиофилизация в воде.

Повторную лиофилизацию проводили следующим образом.

Каждую пробу 10 мг (приготовленную согласно разделу 5.2.1) повторно растворяли в 200 мкл дистиллированной воды.

Флаконы замораживали при -50°C для подготовки к лиофилизации.

После замораживания образцы помещали в эксикатор, присоединенный к сублимационной сушилке, и сушили примерно 72 ч. По истечении этого времени брали образцы и анализировали с помощью XRPD для подтверждения аморфной природы серии.

3) Скрининг растворимости в растворителях.

К известной массе лиофилизата ЦГП (10 мг, из раздела 5.2.2) добавляли 100 мкл соответствующего растворителя и, если твердое вещество оставалось, флакон осторожно нагревали примерно до 40°C, чтобы способствовать растворению. Добавление растворителя продолжали до полного растворения материала или до добавления 2 мл (<5 мг/мл). Образцы открывали и давали испариться при комнатной температуре. Растворители, использованные для определения растворимости, можно найти в табл. 21.

4) Подготовка образца для первичного скрининга полиморфов.

а) Лиофилизация в воде.

Материал был приготовлен лиофилизацией для первичного скрининга полиморфов следующим образом.

К полученному ЦГП (1,04) добавляли 13 мл дистиллированной воды, получив прозрачный бесцветный раствор.

Этот раствор был поровну разделен между 26 стеклянными флаконами по 2 мл (примерно по 500 мкл в каждом флаконе и 40 мг твердого вещества).

Флаконы замораживали при -50°C для подготовки к лиофилизации.

После замораживания образцы помещали в эксикатор, присоединенный к сублимационной сушилке, и сушили примерно 48 ч. По истечении этого времени брали образцы и анализировали с помощью XRPD для подтверждения аморфной природы серии.

б) Повторная лиофилизация в воде.

Вторую попытку лиофилизации проводили следующим образом.

К каждой пробе 40 мг (приготовленной согласно разделу "а") добавляли 1,5 мл дистиллированной воды для повторного растворения материала.

Флаконы замораживали при -50°C для подготовки к лиофилизации.

После замораживания образцы помещали в эксикатор, прикрепленный к сублимационной сушилке, и сушили примерно 72 ч. По истечении этого времени брали образец и анализировали с помощью XRPD для подтверждения аморфной природы серии.

Таблица 21. Список растворителей, используемых при скрининге растворимости

Номер	Растворитель	Класс ICH
1	1-бутанол	3
2	2-бутанол	3
3	1-пропанол	3
4	2-пропанол	3
5	40% метанол: 60% вода (об.%) (расчетное среднее 0,8)	2
6	95% метанол: 5% вода (об.%) (расчетное среднее 0,2)	2
7	Ацетон	3
8	Ацетонитрил	2
9	Дихлорметан	2
10	Этанол	3
11	Этилацетат	3
12	Этилформиат	3
13	Гептан	3
14	Изопропилацетат	3
15	Метанол	2
16	Метилэтилкетон	3
17	Метилизобутилкетон	3
18	N,N'-диметилацетамид	2
19	Нитрометан	2
20	Трет-бутилметилэфир	3
21	ТГФ	2
22	Толуол	2
23	Вода	Н/П
24	Трифторэтанол	Не классифицирован
25	Бензиловый спирт	2
26	Хлороформ	2
27	Хлорбензол	2
28	1,4-диоксан	2
29	2-метоксэтанол	2
30	Диметилсульфоксид	3

с) Повторная лиофилизация в воде (2).

Третью попытку лиофилизации проводили следующим образом.

К каждому образцу 40 мг (приготовленной согласно разделу "б") добавляли 1 мл дистиллированной воды для повторного растворения материала.

Затем растворы с помощью пипетки помещали в 26 стеклянных флаконов по 20 мл и доливали дополнительно 15 мл дистиллированной воды.

Флаконы замораживали при -50°C для подготовки к лиофилизации.

После замораживания образцы помещали в эксикатор, присоединенный к сублимационной сушилке, и сушили в течение примерно 120 ч. По истечении этого времени брали образец и анализировали с помощью XRPD для подтверждения аморфной природы серии.

5) Первичный скрининг полиморфов.

Первичный скрининг полиморфов ЦГП проводили следующим образом.

В этом эксперименте использовали 24 флакона, содержащие примерно 40 мг ЦГП из раздела b.

Материал суспендировали в соответствующем растворителе/ смеси растворителей и меняли температуру от комнатной до 40°C за 4 ч в течение 72 ч. Используемые растворители можно найти в табл. 22.

Полученные твердые вещества выделяли фильтрацией при центрифугировании, и анализировали с помощью XRPD. Любые новые формы анализировали посредством ТГ/ДТА.

Затем отфильтрованные насыщенные растворы делили на три флакона и использовали для последующих экспериментов по скринингу полиморфов, как показано ниже.

а) Испарение.

Насыщенные растворы ЦГП переносили во флаконы вместимостью 2 мл; затем эти флаконы открывали и давали испариться при температуре окружающей среды для извлечения материала. Весь восстановленный материал был охарактеризован методом XRPD.

б) Быстрое охлаждение.

Насыщенные растворы ЦГП хранили при 2-8°C в течение 96 ч. В это время любой извлеченный материал анализировали с помощью XRPD, флаконы перемещали и хранили при -20°C в течение 72 ч. По истечении этого времени любой извлеченный материал анализировали с помощью XRPD.

с) Добавление антирастворителя при комнатной температуре.

До 2 мл антирастворителя (гептана или МтБЭ) добавляли по каплям к насыщенным растворам ЦГП. Образцы оставляли закрытыми при температуре окружающей среды на 72 ч. Любое полученное твердое вещество анализировали с помощью XRPD.

Таблица 22. Список растворителей при первичном скрининге полиморфов

Номер	Растворитель	Класс ICH
1	1-пропанол	3
2	2-пропанол	3
3	95% метанол/ 5% вода (об.%)	2
4	50% метанол/ 50% ТБМЭ (об.%)	2
5	10% метанол/ 90% ТБМЭ	2
6	Ацетон	3
7	Ацетонитрил	2
8	Дихлорметан	2
9	Этанол	3
10	50% этанол/ 50% ТБМЭ (об.%)	3
11	10% этанол/ 90% ТБМЭ	3
12	Этилацетат	3
13	Этилформиат	3
14	Гептан	3
15	Изопропилацетат	3
16	Метилэтилкетон	3
17	Метилизобутилкетон	3
18	Нитрометан	2
19	Трет-бутилметилэфир	3
20	Толуол	2
21	Трифторэтанол	Не классифицирован
22	Хлорбензол	2
23	ТГФ	2
24	Метанол	2

б) Вторичный скрининг полиморфов.

а) Масштабирование структуры 2.

Структура 2 ЦГП была масштабирована с помощью процедур, изложенных ниже.

5 г полученного ЦГП (структура 1) суспендировали в 6 мл смеси этанол/вода 90:10.

Полученную суспензию помещали на мешалку и перемешивали в течение примерно 24 ч.

Через 24 ч образец извлекали из шейкера и анализировали твердое вещество с помощью XRPD.

Твердое вещество было охарактеризовано в соответствии с P-SFS1482-00, раздел 2.4.

а) Масштабирование чистой структуры 1.

і) Нагревание структуры 2 до 80°C.

Примерно 2,2 г материала структуры 2 (приготовленного в соответствии с разделом 5.6.1) помещали в вакуумную печь, установленную на 50°C.

Через 1 ч отбирали образец и анализировали с помощью XRPD.

Флакон возвращали в вакуумную печь и повышали температуру до 60°C.

Через 30 мин отбирали образец и анализировали с помощью XRPD.

Флакон возвращали в вакуумную печь и повышали температуру до 80°C. Через 18 ч при 80°C отбирали образец и анализировали с помощью XRPD.

ii) Быстрое роторное испарение в этаноле/ДХМ.

Добавляли навеску 1 г полученной структуры 1 ЦГП в круглодонную колбу и растворяли в 40 мл этанола.

После растворения твердого вещества в колбу с помощью пипетки вносили 2 мл дихлорметана.

Затем колбу присоединяли к роторному испарителю и быстро упаривали при температуре окружающей среды в вакууме.

Бледно-бежевое твердое вещество извлекали и анализировали с помощью XRPD. 7. Оценка pH растворимости.

Структуры 1 и 2 ЦГП готовили для оценки pH растворимости следующим образом.

Добавляли навески 100 мг структуры 1 и структуры 2 ЦГП в 4 стеклянных флакона по 5 мл с закручивающейся крышкой.

100 мкл выбранного буфера, предварительно нагретого до 37°C, добавляли в каждый флакон.

Образцы нагревали до 37°C в шейкере инкубатора в течение примерно 10 мин после каждого объема буфера, и проверяли растворение образца.

С) Результаты.

1) Первоначальная характеристика.

Первоначальная характеристика ЦГП (CS/298/18) показала следующее.

Материал был кристаллическим по данным XRPD (фиг. 1). Структура XRPD поставляемого ЦГП была обозначена как структура 1.

Анализ PLM показал, что материал обладает двойным лучепреломлением без четкой морфологии. Поляризованные и неполяризованные изображения можно увидеть на фиг. 12 и 11 соответственно.

Анализ ТГ показал, что с начала нагревания наблюдалась серия небольших потерь массы (0,6, 0,2 и 0,3%) примерно до 280°C, где наблюдалась деградация образца. ДТА анализ идентифицировал одно резкое эндотермическое событие с началом 170°C и пиком при 172°C. Скорее всего, это плавление образца. Термограмму ТГ/ДТА можно увидеть на фиг. 14.

На фиг. 16 показан первый тепловой цикл анализа ДСК. Небольшой широкий эндотермический эффект был отмечен при 75°C и пик при 85°C. Второй эндотермический эффект наблюдался при 169°C с пиком при 171°C. Это соответствовало расплаву, наблюдаемому в TG/DT. Никаких значительных термических событий не наблюдалось в холодном цикле (фиг. 17). Очень небольшое эндотермическое событие, скорее всего, слабое стеклование, было отмечено при 75-80°C во время второго теплового цикла (фиг. 18).

График изотермы ДСП на фиг. 23 показал изменение массы на +6,3% при относительной влажности от 60 до 90%, что указывает на явное изменение формы.

После изменения формы материал выглядел слегка гигроскопичным с максимальным поглощением 0,8 мас.% от 0 до 90% относительной влажности (фиг. 24). Кинетический график ДСП можно увидеть на фиг. 25. Анализ XRPD подтвердил, что вводимый материал структуры 1 перекристаллизовался до структуры 2 (первоначально видимой при скрининге растворимости в растворителях, подробно описанном в разделе 3) после воздействия условий влажности ДСП. Дифрактограммы XRPD можно увидеть на фиг. 26. Сравнение дифрактограмм структуры 1 и структуры 2 показывает, что ряд пиков структуры 2 также присутствует в полученной структуре 1. Это позволяет предположить, что полученная структура 1 является потенциальной смесью. Это дополнительно исследовали путем проведения VT/VH-XRPD на материале структуры 2 (согласно разделу B.1).

Анализ ТГ/ДТА был проведен на твердом веществе, извлеченном после ДСП для структуры 2. Термограмма представлена на фиг. 27. Анализ ТГ показал начальную потерю массы 6,8% (0,95 экв. воды) с последующим разложением образца при 280°C. График DT идентифицировал эндотермическое событие, связанное с начальной потерей массы. За этим последовало экзотермическое событие, скорее всего, перекристаллизация материала, после чего наблюдалась вторая эндотерма (плавление образца) при 168°C.

¹H-ЯМР (фиг. 5) и HSQC-ЯМР (фиг. 38) полученного ЦГП соответствовали поставляемой структуре. Сигнал СН имидазола не наблюдался, вероятно, из-за медленной релаксации.

Анализ полученного материала дал значение рКа 6,38 (фиг. 10).

Спектр ЖХ-МС структуры 1 ЦГП подтвердил ожидаемое значение m/z 235,1, что соответствует $[C_{11}H_{14}N_4O_2]H^+$ (фиг. 55).

Полученный ЦГП имел чистоту 99,5% при анализе с помощью ВЭЖХ-УФ. Соответствующая хроматограмма представлена на фиг. 56.

2) Подготовка образца для скрининга растворимости в растворителях.

а) Лиофилизация в воде.

Анализ твердого вещества от лиофилизации в воде показал, что материал был все еще кристаллическим. 2θ дифрактограмма аморфного материала представлена на фиг. 40.

б) Повторная лиофилизация в воде.

Анализ повторно лиофилизированных твердых веществ из воды показал преобладающий материал.

3) Скрининг растворимости в растворителях.

Как указано выше, растворимость лиофилизированного ЦГП оценивали в 30 выбранных растворителях/смесь растворителей. Из результатов в табл. 23, материал показал низкую растворимость в большинстве растворителей/смесь растворителей, использованных в этом исследовании. Высокая растворимость наблюдалась в этаноле и метаноле с приблизительной растворимостью, оцененной между $100 \geq x \geq 50$ мг/мл. Также было обнаружено, что материал растворим в воде, ДМСО, ДМА, трифторэтаноле и в обеих смесях метанол/вода.

Результаты анализа XRPD для определения растворимости в растворителях полученных твердых веществ представлены в табл. 24. Пример дифрактограммы XRPD для каждой из полученных структур можно увидеть на фиг. 57. Остальные дифрактограммы включены в фиг. 58-60.

Таблица 23. Результаты анализа растворимости в растворителях лиофилизата ЦГП

Номер	Растворитель	Примерная растворимость (мг/мл)
1	1-бутанол	≤ 5
2	2-бутанол	≤ 5
3	1-пропанол	$14,3 \geq x \geq 12,5$
4	2-пропанол	$5,6 \geq x \geq 5,3$
5	40% метанол: 60% вода (об.%) (ср.расч. 0,8)	$20 \geq x \geq 16,7$
6	95% метанол: 5% вода (об.%) (ср.расч. 0,2)	$33,3 \geq x \geq 25$
7	Ацетон	≤ 5
8	Ацетонитрил	≤ 5
9	Дихлорметан	≤ 5
10	Этанол	$100 \geq x \geq 50$
11	Этилацетат	≤ 5
12	Этилформиат	≤ 5
13	Гептан	≤ 5
14	Изопропилацетат	≤ 5
15	Метанол	$100 \geq x \geq 50$
16	Метилэтилкетон	≤ 5
17	Метилизобутилкетон	≤ 5
18	N,N'-диметилацетамид	$33,3 \leq x \leq 25$
19	Нитрометан	≤ 5
20	Трет-бутилметилэфир	≤ 5
21	ТГФ	≤ 5

Таблица 24. Сводная таблица XRPD структур при скрининге растворимости в растворителях

Номер	Растворитель	Результаты XRPD
1	1-бутанол	Н/П – нет твердого вещества
2	2-бутанол	Н/П – нет твердого вещества
3	1-пропанол	Структура 1
4	2-пропанол	Структура 2
5	40% метанол: 60% вода (об.%) (ср.расч. 0,8)	Структура 2
6	95% метанол: 5% вода (об.%) (ср.расч. 0,2)	Структура 2
7	Ацетон	Структура 2
8	Ацетонитрил	Структура 2
9	Дихлорметан	Структура 2
10	Этанол	Структура 1 Структура 2
11	Этилацетат	Структура 2
12	Этилформиат	Структура 2
13	Гептан	Структура 2
14	Изопропилацетат	Структура 2
15	Метанол	Н/П – бесцветный гель
16	Метилэтилкетон	Структура 2
17	Метилизобутилкетон	Структура 2
18	N,N'-диметилацетамид	Н/П – нет твердого вещества
19	Нитрометан	Структура 2
20	Трет-бутилметилэфир	Структура 2
21	ТГФ	Аморфное вещество с пиками Структуры 2

4) Подготовка образцов для первичного скрининга полиморфов.

2) Лиофилизация в воде.

Анализ лиофилизированных твердых веществ из воды показал, что образцы все еще были кристаллическими. Картина дифрактограммы была идентифицирована как структура 2 (фиг. 61).

b) Повторная лиофилизация в воде.

На фиг. 62 показана дифрактограмма, полученная при повторной лиофилизации ЦГП в воде. Анализ XRPD подтвердил, что материал был менее кристаллическим, чем предыдущий образец, показанный на фиг. 61, но все же содержал пики структуры 2.

с) Повторная лиофилизация в воде (2).

На фиг. 63 показана дифрактограмма, полученная при третьей попытке лиофилизации ЦГП в воде. Анализ XRPD подтвердил, что материал был менее кристаллическим, чем образец, показанный на фиг. 61, но пики структуры 2 с фиг. 62 остались.

5) Первичный скрининг полиморфов.

Как указано выше, склонность ЦГП проявлять полиморфизм оценивали в 24 выбранных растворителях/смесях растворителей.

а) Температурное циклирование.

Результаты экспериментов по изменению температуры при первичном скрининге полиморфов представлены в табл. 25. Соответствующие дифрактограммы представлены на фиг. 64-66.

Чистую структуру 1 ЦГП выделяли из смеси 50:50 метанол/МтБЭ, 10:90 метанол/МтБЭ, этанол/МтБЭ и из этилацетата, хотя в этом образце была очевидна некоторая предпочтительная ориентация. Структура 1 была получена из этилформиата, ацетонитрила, МЭК и ТГФ.

5 систем растворителей обеспечивали структуру 2: гептан, изопропилацетат, МИБК, МтБЭ и толуол.

Предпочтительная ориентация твердого вещества, полученного из ДХМ, означала, что структуру нельзя было определить.

Было отмечено твердое вещество из хлорбензола, но его было произведено в недостаточном количестве, поэтому XRPD-анализ не мог быть проведен.

В метаноле было получено масло.

Из оставшихся систем растворителей были получены растворы, поэтому анализ XRPD не проводили.

Таблица 25. Циклирование температуры при первичном скрининге полиморфов

Растворитель	Структура
1-пропанол	Н/П – раствор
2-пропанол	Н/П – раствор
95% метанол: 5% вода (об.%)	Н/П – раствор
50% метанол/ 50% ТБМЭ (об.%)	Чистая Структура 1
10% метанол/ 50% ТБМЭ	Чистая Структура 1
Ацетон	Н/П - раствор
Ацетонитрил	Структура 1
Дихлорметан	Предпочтительная ориентация – невозможно оценить
Этанол	Н/П – раствор
50% этано/ 50% ТБМЭ (об.%)	Чистая Структура 1
10% этанол/ 90% ТБМЭ	Чистая Структура 1
Этилацетат	Чистая Структура 1 (предпочтительная ориентация)
Этилформиат	Структура 1 – плохая кристалличность
Гептан	Структура 2
Изопропилацетат	Структура 2
Метилэтилкетон	Структура 1
Метилизобутилкетон	Структура 2
Нитрометан	Н/П - раствор
Трет-бутилметиловый эфир	Структура 2
Толуол	Структура 2 (предпочтительная ориентация)
Трифторэтанол	Н/П – раствор
Хлорбензол	Н/П – недостаточно твердого вещества
ТГФ	Структура 1
Метанол	Н/П - масло

б) Выпаривание.

Результаты экспериментов по выпариванию при первичном скрининге полиморфов представлены в табл. 26 и на фиг. 113. Соответствующие дифрактограммы представлены на фиг. 67.

Из ацетонитрила была получена структура 1 с плохой кристалличностью.

Структура 2 была получена дважды: один раз из трифторэтанола, а также из нитрометана.

Аморфный материал был идентифицирован из ДХМ и ТГФ.

Было выделено твердое вещество из смеси 10:90 этанол/МтБЭ, 50:50 этанол/МтБЭ, МИБК и этанол, но оно было произведено в недостаточном количестве, поэтому анализ XRPD не мог быть проведен.

Большинство систем растворителей образует бесцветную пленку на стенках флакона, которую невозможно проанализировать с помощью XRPD.

Таблица 26. Выпаривание при первичном скрининге полиморфов

Растворитель	Структура
1-пропанол	Н/П – бесцветная пленка на стенках пробирки
2-пропанол	Н/П – бесцветная пленка на стенках пробирки
95% метанол: 5% вода (об.%)	Н/П – бесцветная пленка на стенках пробирки
50% метанол/ 50% ТБМЭ (об.%)	Н/П – нет раствора после циклирования температуры
10% метанол/ 50% ТБМЭ	Н/П – недостаточно твердого вещества
Ацетон	Н/П - масляный остаток на стенках пробирки
Ацетонитрил	Структура 1 (плохая кристалличность)
Дихлорметан	Аморфное вещество
Этанол	Н/П – недостаточно твердого вещества
50% этано/ 50% ТБМЭ (об.%)	Н/П – недостаточно твердого вещества
10% этанол/ 90% ТБМЭ	Н/П – бесцветная пленка на стенках пробирки
Этилацетат	Н/П – бесцветная пленка на стенках пробирки
Этилформиат	Н/П – бесцветная пленка на стенках пробирки
Гептан	Н/П – бесцветная пленка на стенках пробирки
Изопропилацетат	Н/П – бесцветная пленка на стенках пробирки
Метилэтилкетон	Н/П – бесцветная пленка на стенках пробирки
Метилизобутилкетон	Н/П – недостаточно твердого вещества
Нитрометан	Структура 2 (плохая кристалличность)
Трет-бутилметиловый эфир	Н/П – бесцветная пленка на стенках пробирки
Толуол	Н/П – бесцветная пленка на стенках пробирки
Трифторэтанол	Структура 2
Хлорбензол	Н/П – бесцветная пленка на стенках пробирки
ТГФ	Аморфное вещество
Метанол	Н/П – нет раствора после циклирования температуры

с) Быстрое охлаждение.

В табл. 27 показаны результаты, полученные при быстром охлаждении как при 2-8°C, так и при -20°C при первичном скрининге полиморфов.

Эксперименты с быстрым охлаждением не проводили в смеси метанол/МТБЭ и метанол в соотношении 50:50 из-за недостаточного производства маточного раствора при изменении температуры.

В оставшихся экспериментах были получены только растворы, поэтому анализ XRPD было невозможно выполнить.

Таблица 27. Первичный скрининг полиморфов при быстром охлаждении

Растворитель	Структура (2-8°C)	Структура (-20°C)
1-пропанол	Раствор	Раствор
2-пропанол	Раствор	Раствор
95% метанол: 5% вода (об.%)	Раствор	Раствор
50% метанол/ 50% ТБМЭ (об.%)	Н/П – нет раствора после циклирования температуры	Н/П – нет раствора после циклирования температуры
10% метанол/ 50% ТБМЭ	Раствор	Раствор
Ацетон	Раствор	Раствор
Ацетонитрил	Раствор	Раствор
Дихлорметан	Раствор	Раствор
Этанол	Раствор	Раствор
50% этано/ 50% ТБМЭ (об.%)	Раствор	Раствор
10% этанол/ 90% ТБМЭ	Раствор	Раствор
Этилацетат	Раствор	Раствор
Этилформиат	Раствор	Раствор
Гептан	Раствор	Раствор
Изопропилацетат	Раствор	Раствор
Метилэтилкетон	Раствор	Раствор
Метилизобутилкетон	Раствор	Раствор
Нитрометан	Раствор	Раствор
Трет-бутилметиловый эфир	Раствор	Раствор
Толуол	Раствор	Раствор
Трифторэтанол	Раствор	Раствор
Хлорбензол	Раствор	Раствор
ТГФ	Раствор	Раствор
Метанол	Н/П – получено масло после циклирования температуры	Н/П – получено масло после циклирования температуры

d) Добавление антирастворителя.

Табл. 28 показывает результаты, полученные при добавлении антирастворителя при первичном скрининге полиморфов. Соответствующая дифрактограмма представлена на фиг. 68.

Недостаточное количество твердых веществ было получено из ацетона, ДХМ и смеси 50:50 этанола/МтБЭ.

Структура 1 (для этанола) была единственной картиной, наблюдаемой в экспериментах по добавлению антирастворителя.

Эксперименты с антирастворителем не проводили со смесью 50:50 метанол/ МтБЭ и метанолом из-за недостаточного образования маточного раствора при изменении температуры.

Таблица 28. Добавление антирастворителя для первичного скрининга полиморфов

Растворитель	Анти-растворитель	Структура
1-пропанол	ТБМЭ	Н/П - раствор
2-пропанол	ТБМЭ	Н/П - раствор
95% метанол: 5% вода (об.%)	ТБМЭ	Н/П - раствор
50% метанол/ 50% ТБМЭ (об.%)	Н/П	Н/П – нет раствора после циклирования температуры
10% метанол/ 50% ТБМЭ	ТБМЭ	Н/П - раствор
Ацетон	ТБМЭ	Н/П – недостаточно твердого вещества
Ацетонитрил	ТБМЭ	Н/П - раствор
Дихлорметан	ТБМЭ	Н/П – недостаточно твердого вещества
Этанол	ТБМЭ	Структура 1
50% этано/ 50% ТБМЭ (об.%)	ТБМЭ	Н/П – недостаточно твердого вещества
10% этанол/ 90% ТБМЭ	ТБМЭ	Н/П - раствор
Этилацетат	ТБМЭ	Н/П - раствор
Этилформиат	ацетон	Н/П - раствор
Гептан	ТБМЭ	Н/П - раствор
Изопропилацетат	ТБМЭ	Н/П - раствор
Метилэтилкетон	ТБМЭ	Н/П - раствор
Метилизобутилкетон	ТБМЭ	Н/П - раствор
Нитрометан	ТБМЭ	Н/П - раствор
Трет-бутилметиловый эфир	гептан	Н/П - раствор
Толуол	ТБМЭ	Н/П - раствор
Трифторэтанол	ТБМЭ	Н/П - раствор
Хлорбензол	ТБМЭ	Н/П - раствор
ТГФ	ТБМЭ	Н/П - раствор
Метанол		Н/П – получено масло после циклирования температуры

6) Резюме первичного скрининга полиморфов.

В табл. 29 и на фиг. 114 представлено резюме результатов скрининга первичного полиморфа.

Таблица 29. Сводная таблица первичного скрининга полиморфов

Ч. С1	Чистая Структура 1
С1	Структура 1
С2	Структура 2
Раст.	Раствор
Недос.	Недостаточно твердого вещества
Мас.	Масло
Ам.	Аморфное вещество
Бесц.	Бесцветная пленка/масляный остаток
-	Эксперимент не проводили
¹	Предпочтительная ориентация
*	Плохая кристалличность

		Циклирование температуры	Выпаривание	Охлаждение (2-8°C)	Охлаждение (-20°C)	Добавление антирастворителей
№	Растворитель					
1	1-пропанол	Раст.	Бесц.	Раст.	Раст.	Раст.
2	2-пропанол	Раст.	Бесц.	Раст.	Раст.	Раст.
3	95% метанол: 5% вода (об.%)	Раст.	Бесц.	Раст.	Раст.	Раст.
4	50% метанол/ 50% ТБМЭ (об.%)	Ч. С1	-	-	-	-
5	10% метанол/ 50% ТБМЭ	Ч. С1	Недос.	Раст.	Раст.	Раст.
6	Ацетон	Раст.	Бесц.	Раст.	Раст.	Недос.
7	Ацетонитрил	С1	С1*	Раст.	Раст.	Раст.
8	Дихлорметан	¹	Ам.	Раст.	Раст.	Недос.
9	Этанол	Раст.	-	Раст.	Раст.	С1
10	50% этанол/ 50% ТБМЭ (об.%)	Ч. С1	Недос.	Раст.	Раст.	Недос.
11	10% этанол/ 90% ТБМЭ	Ч. С1	Бесц.	Раст.	Раст.	Раст.
12	Этилацетат	Ч. С1	Бесц.	Раст.	Раст.	Раст.
13	Этилформиат	С1*	Бесц.	Раст.	Раст.	Раст.
14	Гептан	С2	Бесц.	Раст.	Раст.	Раст.
15	Изопропилацетат	С2	Бесц.	Раст.	Раст.	Раст.
16	Метилэтилкетон	С1	Бесц.	Раст.	Раст.	Раст.
17	Метилизобутилкетон	С2	Недос.	Раст.	Раст.	Раст.
18	Нитрометан	Раст.	С2 *	Раст.	Раст.	Раст.
19	Трет-бутилметиловый эфир	С2	Бесц.	Раст.	Раст.	Раст.
20	Толуол	С2 ¹	Бесц.	Раст.	Раст.	Раст.
21	Трифторэтанол	Раст.	С2	Раст.	Раст.	Раст.
22	Хлорбензол		Бесц.	Раст.	Раст.	Раст.
23	ТГФ	С1	Ам.	Раст.	Раст.	Раст.
24	Метанол	Мас.	-	-	-	-

Скрининг первичных полиморфов идентифицировал 1 новую форму ЦГП, обозначенную как чистая структура 1, и полученную после циклического изменения температуры. Структуры 1 и 2 также были воспроизведены в системах с несколькими растворителями при изменении температуры. Эксперименты по быстрому охлаждению до 2-8°C и -20°C приводили к получению только прозрачных растворов. Большинство систем растворителей давали прозрачные растворы в экспериментах по добавлению антирастворителей, но структуру 1 наблюдали в этаноле после добавления МТБЭ.

7) Вторичный скрининг полиморфов.

а) Масштабирование структуры 2.

На фиг. 69 показаны результаты XRPD при масштабировании структуры 2.

Дифрактограмма XRPD подтвердила формирование структуры 2.

б) Масштабирование чистой структуры 1.

и) Нагревание структуры 2 до 80°C.

Чистую структуру 1 не удалось успешно получить в этом эксперименте. Смесь структуры 1 и структуры 2 получали как при 50°C, так и при 80°C. Ранее невидимый пик при 8° 2 Θ появился после того, как образец выдерживали при 50°C в течение 90 мин. Интенсивность этого пика увеличивалась через 18 ч при 80°C. Соответствующие дифрактограммы показаны на фиг. 70.

ii) Быстрое роторное выпаривание в этаноле/ДХМ.

Анализ твердых веществ, извлеченных при быстром выпаривании из смеси этанол/ДХМ, показал, что материал был чистой структурой 1 по XRPD. Дифрактограмма представлена на фиг. 71.

с) Характеристика структуры 2.

Анализ структуры 2 ЦГП из смеси этанол/вода 90:10 дал следующие результаты.

Материал был кристаллическим по данным XRPD и соответствовал дифрактограммам структуры 2, полученным при первичном скрининге полиморфов (фиг. 72).

Были также получены изображения PLM структуры 2 ЦГП, и было обнаружено, что материал имеет двойное лучепреломление с фрагментированной стержневидной морфологией. Изображения в поляризованном и неполяризованном свете показаны на фиг. 73.

Высокотемпературная микроскопия была также выполнена на структуре 2 ЦГП. Исходное изображение идентифицировало стержнеобразную морфологию (фиг. 74). Это соответствовало изображениям из анализа PLM на фиг. 69. Наблюдалось, что материал начал плавиться при 95°C и полностью расплавился при 101°C. Рекристаллизация происходила при 115°C. Изображения PLM, полученные после стадии нагревания, показывают, что морфология материала больше не была четко определена, но образец все еще был двулучепреломляющим. Поляризованные и неполяризованные изображения материала после нагревания можно увидеть на фиг. 75.

Анализ ТГ/ДТА - ТГ показал начальную потерю массы 6,5% с последующим разложением образца при 280°C (0,9 эквивалента воды). График ДТ идентифицировал эндотермическое событие, связанное с начальной потерей массы. За этим последовало экзотермическое событие, вероятнее всего, перекристаллизация материала, после чего наблюдалась вторая эндотерма (плавление образца) при 170°C (фиг. 76).

Первоначальный тепловой цикл ДСК выявил эндотермическое событие с началом 99°C и пиком при 102°C (фиг. 77). Это согласуется с данными эндотермы, наблюдаемыми в ТГА, хотя событие перекристаллизации, наблюдаемое в ТГА, не присутствует в ДСК. В холодном цикле тепловых явлений не наблюдалось (фиг. 78). Второй цикл нагревания выявил возможное стеклование при 75°C (фиг. 79).

На фиг. 80 показаны спектры ИК с преобразованием Фурье для структуры 2 ЦГП. Перечень пиков можно найти в табл. 30.

Анализ VT-VH-XRPD: исходный материал структуры 2 остался, когда влажность была снижена до 0% при температуре окружающей среды. При повышении температуры до 80°C материал изменил форму, которая была обозначена как чистая структура 1. Чистая структура 1 оставалась при выдержке при 80°C в течение 80 мин. Табл. 31 показывает влажность, температуру и идентичность структуры на каждом этапе. Соответствующая дифрактограмма представлена на фиг. 81.

Анализ ДСП структуры 2 ЦГП показал, что материал не изменил свою форму с 40 до 90% или с 90 до 10%, но теряет 3,5 мас.% (0,5 экв. воды) при относительной влажности ниже 10%. Было отмечено, что регидратация происходит при относительной влажности от 0 до 90%. Это можно увидеть на графике изотермы ДСП на фиг. 82. На фиг. 83 показан кинетический график ДСП. Анализ XRPD после ДСП не показал изменения формы при относительной влажности 40%. Сравнение дифрактограмм XRPD можно увидеть на фиг. 84. Считалось, что нестехиометрическая потеря воды, наблюдаемая в этом эксперименте, связана с температурой окружающей среды (примерно 25°C), при этом кинетика дегидратации была слишком медленной, и, следовательно, прибор переходил к следующему этапу до завершения. Для дальнейшего изучения этого были проведены эксперименты ДСП с переменной температурой, подробно описанные ниже.

Анализ VT-DVS при 40°C показал, что материал начал дегидратироваться при относительной влажности ниже 10%, теряя примерно 5,8 мас.% от 10 до 0% относительной влажности (0,8 экв. воды). Впоследствии материал повторно гидратировался от 0 до 40% относительной влажности. График изотермы ДСП можно увидеть на фиг. 85, а кинетический график - на фиг. 86. Анализ ДСП при 50°C показал, что материал начал дегидратировать при относительной влажности ниже 20%, теряя примерно 6,1 мас.% (0,8 экв. воды). Затем материал повторно гидратировался от 0 до 40% относительной влажности. На фиг. 87 показан график изотермы при 50°C, а на фиг. 88 - кинетический график. VT-DVS при 60°C показал, что материал начал дегидратироваться при относительной влажности ниже 20%, теряя примерно 7 мас.% или 1,0 экв. воды. Было отмечено, что материал повторно гидратируется при относительной влажности от 0 до 40%. График изотермы 60°C можно увидеть на фиг. 89. Кинетический график можно увидеть на фиг. 90. XRPD-анализ восстановленного твердого вещества показал, что после ДСП материал представлял собой смесь структуры 1 и структуры 2. Сравнительные дифрактограммы XRPD можно увидеть на фиг. 91.

Чистота структуры 2 ЦГП при ВЭЖХ составила 99,5%.

Таблица 30. Таблица пиков FT-IR структуры 2 ЦГП для смеси этанол/вода

3457.2	81.8	1233.3	80.9
3411.6	82.2	1223.5	81.4
3292.7	78.6	1198.3	79.2
3211.7	79.1	1161.1	83.6
3148.3	82.9	1121.0	71.5
2976.7	84.3	1083.1	74.5
2949.6	85.8	1003.9	86.4
2912.7	86.4	968.7	73.7
2879.7	86.0	942.5	82.4
2116.5	91.3	922.3	81.4
1658.1	56.5	906.0	84.9
1633.1	55.6	889.5	87.3
1567.1	77.5	862.8	85.8
1445.9	61.6	798.1	58.9
1424.3	63.4	737.6	61.6
1345.0	77.9	688.9	70.4
1330.0	82.3	628.5	56.0
1314.6	82.0	612.6	49.5
1300.0	71.8	487.4	75.4
1280.0	81.8	470.8	68.9
1268.9	79.0	429.1	59.9
1252.2	82.3		

Таблица 31. Результаты VT/VH-XRPD
для структуры 2 ЦГП

Эксп.	% отн.влажности	Температура	Природа
1	40	Комнатная	Структура 2
2	0		Структура 2
3	0	80°C	Структура 1
4	0		Структура 1

8) Оценка pH растворимости.

Оценка pH растворимости как для структуры 1, так и для структуры 2 показала, что растворение происходит после добавления 3 объемов буфера при всех испытанных значениях pH (pH 1; 4; 6,8 и 7,2). Растворимость структуры 1 и структуры 2 была оценена как $500 \geq x \geq 333,3$ мг/мл. Сводка результатов представлена в табл. 32.

Изображения образцов после растворения можно увидеть на фиг. 92 для материала структуры 1 и фиг. 93 для структуры 2.

Таблица 32. Сводная таблица результатов pH растворимости

Структура ЦГП	pH	Мкл для растворения при 37°C	Примерная растворимость (мг/мл)
1	1	300	$500 \geq x \geq 333,3$ мг/мл
1	4	300	$500 \geq x \geq 333,3$ мг/мл
1	6,8	300	$500 \geq x \geq 333,3$ мг/мл
1	7,2	300	$500 \geq x \geq 333,3$ мг/мл
2	1	300	$500 \geq x \geq 333,3$ мг/мл
2	4	300	$500 \geq x \geq 333,3$ мг/мл
2	6,8	300	$500 \geq x \geq 333,3$ мг/мл
2	7,2	300	$500 \geq x \geq 333,3$ мг/мл

9) Исследования стабильности.

а) Оценка стабильности в течение 1 недели.

Дифрактограммы XRPD 20 для образцов, испытанных при 40°C/75% относительной влажности, 80°C и естественном освещении, показаны на фиг. 94. Никаких изменений формы не наблюдалось для образцов, хранящихся при 40°C/75% RH или при естественном освещении. Было обнаружено, что материал структуры 2 превращается в структуру 1 через 7 дней при 80°C, как и ожидалось, на основании предыдущих термических экспериментов, ДСП и VT/VH XRPD.

Результаты ВЭЖХ по чистоте для структуры 2 ЦГП представлены в табл. 33. Не было падения чистоты после 7 дней хранения во всех условиях. Хроматограммы ВЭЖХ для испытания стабильности образцов показаны на фиг. 95-97.

Таблица 33. Результаты анализа чистоты при испытании стабильности
в течение 1 недели для структуры 2 ЦГП

Чистота исходного материала (%)	Условия	Чистота спустя 1 неделю (%)
99,5	40°C/75% отн.вл.	99,5
	80°C	99,4
	Комнатная температура	99,5

б) 8-недельная оценка стабильности.

i) Двухнедельный срок.

Дифрактограммы XRPD 20 для двухнедельных временных точек показаны на фиг. 98 для чистой структуры 1 и на фиг. 99 для структуры 2. Результаты показывают, что чистая структура 1 была преобразована в структуру 2 через 14 дней при 40°C/75% относительной влажности. Через 14 дней не наблюдалось изменений формы для структуры 2 ЦГП.

ii) Четырехнедельный срок.

Дифрактограммы XRPD 20 для четырехнедельных временных точек показаны на фиг. 100 для чистой структуры 1 и на фиг. 101 для структуры 2. Результаты показывают, что материал чистой структуры 1, который ранее преобразовался в структуру 2 через две недели, остался как структура 2 через 4 недели при 40°C/75% относительной влажности. Не наблюдалось никаких изменений формы для структуры 2 ЦГП через 4 недели.

iii) Восьминедельный срок.

Дифрактограммы XRPD 20 для восьминедельных временных точек показаны на фиг. 102 для чистой структуры 1 и на фиг. 103 для структуры 2. Результаты показывают, что материал чистой структуры 1, который ранее преобразовался в структуру 2 через две недели, остался как структура 2 через 8 недель при 40°C/75% относительной влажности. Не наблюдалось изменений формы для структуры 2 ЦГП через 8 недель.

iv) Проверка внешнего вида.

Табл. 34 и фиг. 115 показывают результаты тестирования внешнего вида от 8-недельного исследования стабильности. Внешний вид чистой структуры 1 и структуры 2 оставался неизменным на протяжении всего эксперимента.

Таблица 34. Сводка результатов определения внешнего вида при 8-недельном испытании стабильности

Вводная структура	Момент времени	Внешний вид
Чистая Структура 1	Исходный	Бледно-бежевый
Чистая Структура 1	2 недели	Бледно-бежевый
Чистая Структура 1	4 недели	Бледно-бежевый
Чистая Структура 1	8 недель	Бледно-бежевый
Структура 2	Исходный	Белый
Структура 2	2 недели	Белый
Структура 2	4 недели	Белый
Структура 2	8 недель	Белый

у) Хиральная ВЭЖХ.

Анализ ВЭЖХ подтвердил, что исходные образцы как чистой структуры 1, так и структуры 2 имели высокую хиральную чистоту. Не было изменений в хиральной чистоте на протяжении всего периода оценки стабильности. Сводку результатов можно увидеть в табл. 35. Хроматограммы ВЭЖХ представлены на фиг. 104-110.

Таблица 35. Сводка результатов хиральной ВЭЖХ

Вводная структура	Момент времени	Хиральная чистота (%)
Чистая структура 1	Исходный	>99,9
	2 недели	99,9
	4 недели	99,9
	8 недель	99,9
Структура 2	Исходный	99,9
	2 недели	>99,9
	4 недели	99,9

с) 1-дневное испытание стабильности.

Результаты XRPD при хранении при 40°C/75% RH показаны на фиг. 111. Было обнаружено, что чистая структура 1 преобразовалась в структуру 2 через 2 ч при 40°C/75% RH. Первоначальный эксперимент включал дополнительные временные точки через 4, 6 и 8 ч, но, поскольку материал преобразовался в структуру 2 после первой временной точки, эксперимент был остановлен через 2 ч.

d) Краткое описание результатов.

1) Первоначальная характеристика.

Поставляемый материал, ЦГП, оказался кристаллическим по результатам XRPD и двулучепреломляющим без четко определенной морфологии при PLM. Материал имел несколько потерь массы 0,6, 0,2 и 0,3% из-за ТГ/ДТА и, как было обнаружено, разлагался при нагревании до 280°C. Также наблюдается плавление при 170°C. ДСК привела к небольшому эндотермическому событию при 75°C, которое было связано с потерей растворителя (воды). Второй эндотермический эффект наблюдался при 169°C с пиком при 171°C. Это соответствовало расплаву, наблюдаемому в ТГ/ДТ. В холодном цикле не наблюдалось значительных термических событий, но было отмечено слабое стеклование при 75°C во время второго теплового цикла.

Данные ДСП показали изменение массы на +6,3% при относительной влажности 60 до 90%, что указывает на явное событие перекристаллизации. После перекристаллизации материал выглядел слегка гигроскопичным с максимальным поглощением 0,8 мас.% при относительной влажности от 0 до 90%. Анализ XRPD после ДСП подтвердил изменение формы. Образец дифрактограммы, полученный после ДСП, был обозначен как структура 2 и был идентифицирован как гидратированная форма структуры 1. После ДСП ТГ/ДТА показал, что входной материал структуры 2 подвергался дегидратации при нагревании и терял 6,8 мас.% (0,95 экв. воды). После этого следовала перекристаллизация, после чего образец плавился при 168°C. Температура этого расплава соответствовала расплаву структуры 1. Постоянство температуры плавления между двумя образцами позволяет предположить, что структура 2 является моногидратом и теряет примерно 1 экв. воды при нагревании перед перекристаллизацией в структуру 1.

Данные ЯМР соответствовали предоставленной структуре и не показали содержания растворителя.

2) Растворимость в растворителях.

Полученный ЦГП (структура 1) показал низкую растворимость в большинстве растворителей/смесей растворителей, использованных в этом исследовании. Высокая растворимость наблюдалась в метаноле и этаноле с приблизительной растворимостью, составляющей $100 \geq x \geq 50$ мг/мл. Также было обнаружено, что материал растворим в воде, ДМСО, ДМА, трифторэтаноле и в обеих смесях метанол/вода. Структура 2 была единственной новой кристаллической формой, идентифицированной в ходе этого эксперимента (в дополнение к полученной структуре 1). Структура 2 была получена из 17 систем растворителей, а структура 1 была получена только один раз из 1-пропанола. Смесь структуры 1 и структура 2 была отмечена для этанола. ТГФ обеспечил получение аморфного материала с некоторыми пиками структуры 2.

3) Первичный скрининг полиморфов.

Первичный скрининг полиморфов идентифицировал 1 новую форму ЦГП, обозначенную как чистая

структура 1, и полученную после циклического изменения температуры. Структуры 1 и 2 также были воспроизведены в системах с несколькими растворителями при изменении температуры. Эксперименты по быстрому охлаждению при 2-8°C и -20°C давали только прозрачные растворы. Большинство систем растворителей давали прозрачные растворы в экспериментах по добавлению антирастворителей, но структура 1 наблюдалась для этанола после добавления МгБЭ.

4) Вторичный скрининг полиморфов.

Вторичный скрининг полиморфов показал успешное масштабирование структуры 2 ЦГП из смеси этанола/воды. Анализ материала дал следующие результаты.

Материал был кристаллическим по данным XRPD и соответствовал дифрактограммам структуры 2, полученным при первичном скрининге полиморфов.

Были также сделаны изображения PLM структуры 2 ЦГП, и было обнаружено, что материал имеет двойное лучепреломление с фрагментированной стержневидной морфологией.

Первоначальное изображение, полученное в начале эксперимента по высокотемпературной микроскопии, выявило стержнеобразную морфологию, которая соответствовала PLM изображениям структуры 2. Материал начал плавиться при 95°C и полностью расплавился при 101°C. Рекристаллизация наблюдалась при 115°C. Изображения PLM, полученные после стадии нагревания, показывают, что морфология материала больше не была четко определена, но образец все еще имел двойное лучепреломление.

Анализ ТГ/ДТА-ТГ показал начальную потерю массы 6,5% с последующим разложением образца при 280°C. График ДТ идентифицировал эндотермическое событие, связанное с начальной потерей массы. За этим последовало экзотермическое событие, скорее всего, перекристаллизация материала, после чего наблюдалась вторая эндотерма (плавление образца) при 170°C.

Первоначальный тепловой цикл ДСК выявил эндотермическое событие с началом 99°C и пиком при 102°C. Это согласуется с данными эндотермы, наблюдаемыми в ТГА, хотя событие перекристаллизации, наблюдаемое в ТГА, не присутствует в ДСК. Никаких термических событий не наблюдалось в холодном цикле, но небольшое стеклование наблюдалось при 75°C во втором тепловом цикле.

Анализ VT-/VH-XRPD: исходный материал структуры 2 остался, когда влажность была снижена до 0% при температуре окружающей среды. При повышении температуры до 80°C материал изменил форму, которая была обозначена как чистая структура 1. Чистая структура 1 оставалась при выдержке при 80°C в течение 80 мин.

Анализ ДСП структуры 2 ЦГП показал, что материал не изменил форму с 40 на 90% или с 90 на 10%, но потерял 3,5 мас. % (0,5 экв. воды) ниже 10%. Было отмечено, что регидратация происходит при относительной влажности от 0 до 90%. Анализ XRPD после ДСП не показал изменения формы при относительной влажности 40%.

VT-DVS: образец дегидратировал ниже 10% при 40°C и ниже 20% при 50 и 60°C. Материал терял более высокий процент воды при каждом повышении температуры, но регидратировался от 0 до 40% относительной влажности в каждом эксперименте. Смесь структур 1 и 2 наблюдали с помощью XRPD после VT-DVS.

Чистота структуры 2 ЦГП при ВЭЖХ составила 99,5%.

Чистая структура 1 не была успешно воспроизведена при нагревании до 80°C, смесь структур 1 и 2 была подтверждена XRPD. XRPD анализ также идентифицировал ранее невидимый пик при 8° 2 θ после того, как образец выдерживали при 50°C в течение 90 мин. Интенсивность этого пика увеличивалась через 18 ч при 80°C. Этот пик не наблюдался ни на одной другой дифрактограмме, полученной в этом исследовании.

Успешное повторное приготовление чистой структуры 1 было достигнуто путем быстрого выпаривания в этаноле/ДХМ.

5) 1-недельные исследования стабильности.

Исследования стабильности в течение 1 недели показали, что структура 2 демонстрирует хорошую химическую стабильность в оцениваемых условиях (40°C/75% относительной влажности, 80°C и естественное освещение). Никаких изменений чистоты не наблюдалось ни для одного образца через 7 дней.

Повышенная температура 80°C привела к обезвоживанию от структуры 2 до структуры 1 через 1 неделю, но материал все же оставался в виде структуры 2 при хранении при 40°C/75% относительной влажности и при естественном освещении.

6) 8-недельные исследования стабильности.

8-недельные исследования стабильности показали, что материал чистой структуры 1 демонстрирует плохую физическую стабильность при 40°C/75% относительной влажности, причем материал превращается в гидратированную структуру 2 после первой (двухнедельной) временной точки. Несмотря на то, что исследование было продолжено на исходных образцах, материал, подвергающийся тестированию стабильности с 2-недельной временной точки, был структурой 2, а не структурой 1 из-за плохой стабильности чистой структуры 1 при этой температуре и влажности. Никаких изменений во внешнем виде не было отмечено ни в одном из тестируемых моментов времени, несмотря на изменение формы, выявленное XRPD.

Напротив, структура 2 показал хорошую физическую стабильность без изменения формы, наблю-

даемого в течение 8-недельной оценки стабильности. Внешний вид материала структуры 2 не изменился ни на каком этапе эксперимента. Как чистая структура 1, так и структура 2, как было обнаружено, имели высокую хиральную чистоту в начале 8-недельной оценки, и она оставалась высокой во всех образцах на протяжении всего эксперимента.

7) Однодневное исследование стабильности.

Оценка стабильности в течение 1 дня подтвердила, что материал чистой структуры 1 легко превращается в структуру 2 в условиях высокой влажности. Анализ XRPD подтвердил, что изменение формы произошло всего через 2 ч при 40°C/75% относительной влажности.

8) Оценка pH растворимости.

Оценка pH растворимости как для структуры 1, так и для структуры 2 показала, что растворение происходит после добавления 3 объемов буфера при всех испытанных значениях pH (pH 1; 4; 6,8 и 7,2). Растворимость структуры 1 и структуры 2 была оценена как $500 \geq x \geq 333,3$ мг/мл.

е) Заключение.

Более длительные 8-недельные исследования стабильности структуры 2 ЦГП показали хорошую физическую стабильность при 40°C/75% относительной влажности. Анализ XRPD подтвердил, что структура 2 преобладала на протяжении всех 8-недельных испытаний. Восьми- (8)-недельные испытания стабильности чистой структуры 1 ЦГП показали плохую физическую стабильность при 40°C/75% относительной влажности. Структура 2 является наиболее подходящей формой ЦГП для дальнейшей разработки.

Пример 7. Испытание стабильности.

Цель: хранить и генерировать данные о стабильности лекарственной субстанции, режим GMP.

Упаковка: образец в каждый отдельный момент времени был упакован в двойные пакеты ПЭНП с антистатическим эффектом, каждый из которых был закреплен жгутом. Образцы, упакованные для тех же условий хранения, хранили вместе внутри фибрового барабана и закрывали металлической крышкой. Все пакеты были подготовлены одинаково и промаркированы. Подробная информация об описании материала упаковки представлена в табл. 36.

Таблица 36. Описание материала упаковки

Предмет	Производитель	Серия №	Размер
Мешок из ПЭНП с антистатическими свойствами	Beyers Plastics N.V.	18031413	Длина * Ширина * Толщина, см = 22*10*0,0125
Фибровый барабан	VWR International	№ по каталогу VWR: 16465-149	Внутренняя длина * внутренний диаметр = 19,1 * 7,9 см

Примечание: мешок из ПЭНП с антистатическими свойствами был обеспечен STA, его нарезают на небольшие куски и подвергают термозапайке перед применением в испытаниях стабильности.

Нулевое время будет днем, когда образцы помещают на хранение. Первоначальные результаты испытания были получены на основе тестирования выпуска при условии, что образцы были поставлены на хранение в течение 30 дней с даты тестирования для выпуска, в противном случае исходные испытания будут повторены. Протокол испытаний стабильности представлен в табл. 37.

Таблица 37. Протокол стабильности

Условия хранения	Исходно*	1 М	3 М	6 М	12 М	24 М	36 М	48 М	Резервные мешки	Всего мешков
25±2°C/60±5%RH	XY	-	X	X	XY	XY	XY	XY	3	9
40±2°C/75±5%RH		X	X	XY	-	-	-	-	2	5

Предмет анализа.

X=отбирают образец и испытывают на внешний вид, количественное содержание и примеси посредством ВЭЖХ, хиральные формы и содержание воды.

Y=отбирают образцы и тестируют посредством XRPD.

"-"=е запланировано.

Требования к исследованию: всего 22,5 г образца (всего 21 г образца, если первоначальный тест не требовался).

1,5 г для начального анализа при необходимости.

Образец массой 21 г будет разделен на 14 частей, по 1,5 г для каждой части, образец для каждой части должен быть взвешен в двойных мешках из полиэтилена низкой плотности (ПЭНП) с антистатическим эффектом, завязанных жгутами. Образцы стабильности для каждого условия хранения хранят вместе внутри фибрового барабана, закрытого металлической крышкой, а затем хранят при 25±2°C/60±5% относительной влажности (9 пакетов) и 40±2°C/75±5%RH (5 пакетов), соответственно.

Время отбора проб.

Образцы, хранившиеся не более 6 месяцев, отбирали в соответствии с графиком или в течение 2 рабочих дней после запланированного срока. Образцы, хранившиеся более 6 месяцев, были взяты в +2 рабочих дня от запланированной даты.

Ограничение срока хранения и тестирования образца.

Образцы от испытания стабильности, хранящиеся в течение от одного месяца до одного года и более одного года, были проанализированы и завершены в течение 10 и 20 рабочих дней после того, как образцы были извлечены из камеры стабильности, соответственно. Если проводилось тестирование нулевого времени, анализы проводили в течение 10 рабочих дней после начала исследования.

Подробная информация о стабильности структуры 2 представлена в табл. 38 и 39.

Таблица 38. Результаты испытания стабильности через 6 месяцев при 25°C/60% относительной влажности

Номер проекта:	NMP-20180620	Протокол стабильности №:	ST-180726100-H-01, Ревизия 00		
Образец стабильности/ Серия №:	C180726100-H Серия №: C180726100-H18001	Спецификация:	ASU-SP-C180726100-H-1, Ревизия 00		
		Условия испытания стабильности:	25±2°C/60±5%RH; 40±2°C/75±5%RH		
Дата начала испытания стабильности:	28 сентября 2018	Отчет №:	RP-C180726100-H-03, Ревизия 00		
Предмет испытания	Метод анализа	Критерии приемлемости	Исходно* ¹	25±2°C/60±5%RH	
				3М	6М
Внешний вид	GM-036-AT	Белый или почти белый порошок	Почти белый порошок	Почти белый порошок	Почти белый порошок
Количественное содержание по ВЭЖХ*	AM-C180726100-H-01	Не менее 95,0%	103,4%	103,3%	103,4%
Примеси, ВЭЖХ*		H-Гис-ОН ≤1,0%	0,07%	0,08%	0,08%
		Отдельные неконкретизированные примеси ≤1,0% Отмечают каждую примесь ≥0,05% по ОВУ или ID, если известно	Каждая отдельная примесь <0,05%	Каждая отдельная примесь <0,05%	Каждая отдельная примесь <0,05%
Хиральные формы, ВЭЖХ*	AM-C180726100-H-03	Хиральная чистота: не менее 98,0% Хиральные примеси: DL, LD, DD Оптические изомеры: ≤1,0% Отмечают каждый: ≥0,1% примесей	100,0%	100,0%	100,0%
			(D,L):H/O	(D,L):H/O	(D,L):H/O
			(L,D):H/O	(L,D):H/O	(L,D):H/O
			(D,D):H/O	(D,D):H/O	(D,D):H/O
Содержание воды (КФ)	GM-016-KFT (Растворитель: MeOH; Титрующий реагент: Смесь Гидранал №5;	Отчетный результат	7,4%	7,1%	7,2%
	Масса образца: 0,1 г				
XRPD*	GM-017-XRPD	Соответствует стандартному образцу Структуры 2 (Серия №: PS03027-15-H)	Соответствует стандартному образцу Структуры 2 (Серия №: PS03027-15-H)	Не применимо	Соответствует стандартному образцу Структуры 2 (Серия №: PS03027-15-H)

* примечание: стандартный образец (серия №: PS03027-15-H) был использован для анализа XRPD.

Стандартный образец (серия № 1056491) был использован для другого химиката, соответственно,

*¹ примечание: в качестве исходных данных приведены данные сертификата анализа при выпуске C180726100-H.

Таблица 39. Результат стабильности через 6 месяцев при 40°C/75% относительной влажности

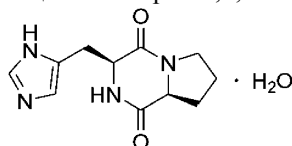
Номер проекта:	NMP-20180620	Протокол стабильности №:	ST-180726100-H-01, Ревизия 00			
Образец стабильности/ Серия №:	C180726100-H Серия №: C180726100-H18001	Спецификация:	ASU-SP-C180726100-H-1, Ревизия 00			
		Условия испытания стабильности:	25±2°C/60±5%RH; 40±2°C/75±5%RH			
Дата начала испытания стабильности:	28 сентября 2018	Отчет №:	RP-C180726100-H-03, Ревизия 00			
Предмет испытания	Метод анализа	Критерии приемлемости	Исходно*1	40±2°C/75±5%RH		
				1М	3М	6М
Внешний вид	GM-036-AT	Белый или почти белый порошок	Почти белый порошок	Почти белый порошок	Почти белый порошок	Почти белый порошок
Количественное содержание по ВЭЖХ*	AM-C180726100-H-01	Не менее 95,0%	103,4%	103,2%	103,3%	102,4%
Примеси, ВЭЖХ*		H-Гис-ОН ≤1,0%	0,07%	0,08%	0,07%	0,06%
		Отдельные неконкретизированные примеси ≤1,0% Отмечают каждую примесь ≥0,05% по ОВУ или ID, если известно	Каждая отдельная примесь <0,05%	Каждая отдельная примесь <0,05%	Каждая отдельная примесь <0,05%	C16081735-D-изомер: 0,05%
Хиральные формы, ВЭЖХ*	AM-C180726100-H-03	Хиральная чистота: не менее 98,0% Хиральные примеси: DL, LD, DD Оптические изомеры: ≤1,0% Отмечают каждый: ≥0,1% примесей	100,0%	100,0%	100,0%	99,9%
			(D,L):H/O	(D,L):H/O	(D,L):H/O	(D,L):H/O
			(L,D):H/O	(L,D):H/O	(L,D):H/O	(L,D):0,05%
			(D,D):H/O	(D,D):H/O	(D,D):H/O	(D,D):H/O
Содержание воды (КФ)	GM-016-KFT (Растворитель: MeOH; Титрующий реагент: Смесь Гидранал №5; Масса образца: 0,1 г	Отчетный результат	7,4%	7,2%	7,2%	7,2%
XRPD*	GM-017-XRPD	Соответствует стандартному образцу Структуры 2 (Серия №: PS03027-15-H)	Соответствует стандартному образцу Структуры 2 (Серия №: PS03027-15-H)	Не применяется	Не применяется	Соответствует стандартному образцу Структуры 2 (Серия №: PS03027-15-H)

Результат для образцов стабильности соответствовал критериям приемлемости спецификации. Типичная наложенная хроматограмма холостой пробы, разрешающего раствора и раствора образца (6 М) для испытания на примеси приведены на фиг. 112.

Описанные в настоящей заявке варианты осуществления предназначены для примера. Специалисты в данной области техники поймут, что изменения и модификации могут быть сделаны без отклонения от объема изобретения, охватываемого приведенной ниже формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Цикло(-Гис-Про) гидратное соединение, характеризующееся дифрактограммой рентгеновской порошковой дифракции (XRPD), содержащей пики при 13,7; 17 и 27,3 градусах ($\pm 0,2^\circ 2\theta$).



2. Соединение по п.1, где дифрактограмма XRPD дополнительно включает пик при 10 градусах ($\pm 0,2^\circ 2\theta$).

3. Соединение по п.1, где картина XRPD, по существу, аналогична той, которая показана на фиг. 2(b).

4. Соединение по п.1, имеющее начало эндотермы дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) при температуре примерно от 75 до 100°C.

5. Соединение по п.1, где начало экзотермы по ДСК находится при температуре примерно от 115 до 120°C.

6. Соединение по п.1, имеющее термограмму ДСК, имеющую два эндотермических пика с максимумами при примерно 100°C и примерно 170°C.

7. Соединение по п.1, отличающееся по меньшей мере двумя характеристиками из следующих:

(а) порошковая рентгеновская дифрактограмма, содержащая по меньшей мере два пика из следующего списка: 10; 13,7; 17; 18,1; 20,2 и 27,3 градуса ($\pm 0,2^\circ 2\theta$);

(с) двойное лучепреломление с фрагментированной стержнеобразной морфологией при анализе с помощью микроскопии в поляризованном свете;

(d) начальная потеря массы 6,5% (0,9 эквивалента воды) с последующим разложением образца при температуре примерно 280°C при испытании методом термогравиметрического анализа;

(е) эндотерма с началом 99°C и пиком при 102°C в первом тепловом цикле ДСК;

(f) начало дегидратации при относительной влажности (RH) ниже 10%, потеря примерно 6% массы от 10 до 0% RH (0,8 эквивалента воды) и гидратация от 0 до 40% RH в динамическом анализе сорбции пара при 40°C; и

(h) начало дегидратации при относительной влажности ниже 20%, потеря примерно 7 мас.% при относительной влажности от 20 до 0% (1,0 эквивалент воды) и регидратация от 0 до 40% относительной влажности при анализе динамической сорбции пара при 60°C.

8. Соединение по п.1, имеющее чистоту, выбранную из группы, состоящей из по меньшей мере 90%, по меньшей мере примерно 95%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% и примерно 100%.

9. Соединение по п.1, стабильное при комнатной температуре в течение примерно 6 месяцев, примерно 12 месяцев, примерно 18 месяцев, примерно 24 месяцев или примерно 36 месяцев.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая цикло(-Гис-Про) гидрат, который определен в п.1.

11. Фармацевтическая композиция по п.10, содержащая примерно от 1 до 50%, примерно от 5 до 45%, примерно от 10 до 40%, примерно от 15 до 35%, примерно от 20 до 30%, примерно от 1 до 20%, по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 50%, примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9% или примерно 10% (по массе) цикло(-Гис-Про) гидрата.

12. Фармацевтическая композиция по п.11, содержащая примерно от 1 до 20% (мас.%) цикло(-Гис-Про) гидрата.

13. Фармацевтическая композиция по п.11, дополнительно включающая при необходимости дополнительный терапевтически активный агент, фармацевтически приемлемый носитель или их комбинацию.

14. Фармацевтическая композиция по п.10, представляющая собой лекарственную форму, подходящую для перорального, местного, парентерального, внутривенного, интрадермального, внутрикишечного, ректального, внутримышечного или интраперитонеального введения.

15. Фармацевтическая композиция по п.10, составленная для парентерального введения путем инъекции или непрерывной инфузии.

16. Фармацевтическая композиция по п.10, где концентрация гидрата цикло(-Гис-Про) составляет примерно от 1 мг/л до 200 мг/мл.

17. Фармацевтическая композиция по п.10, составленная в виде пероральной единичной лекарственной формы.

18. Фармацевтическая композиция по п.17, содержащая единичную дозу примерно от 1 до 100 мг цикло(-Гис-Про) гидрата.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая:

а) практически чистый цикло(-Гис-Про) гидрат, который определен в п.1;

б) по меньшей мере один дополнительный терапевтически активный агент; и

с) по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

20. Фармацевтическая композиция по п.19, где активный агент представляет собой биомолекулу, биоактивный агент, белок, пептид, вакцину, адъювант, агент для визуализации, полинуклеотид или металл.

21. Фармацевтическая композиция по п.19, где активный агент представляет собой цинк.

22. Способ синтеза цикло(-Гис-Про) гидрата, который определен в п.1, включающий стадии:

а) добавление цикло(-Гис-Про) ангидрата в смесь этанол/вода с получением смеси;

б) нагревание смеси примерно до 50°C для растворения и получения раствора;

с) охлаждение раствора, полученного на стадии (b), примерно до 35°C;

д) добавление затравки и выдерживание от 2 до 3 ч;

е) охлаждение примерно до 5°C;

ф) добавление метил-трет-бутилового эфира в течение примерно 8 ч при температуре примерно 5°C;

г) перемешивание примерно от 8 до 10 ч при температуре примерно 5°C;

h) фильтрация для получения влажного продукта; и

j) промывание влажного продукта смесью этанол/вода/метил-трет-бутиловый эфир и сушка примерно при 35°C под вакуумом с образованием соединения цикло(-Гис-Про) гидрата.

23. Способ по п.22, где соединение характеризуют дифрактограммой XRPD, включающей пики при 13,7; 17 и 27,3 градуса ($\pm 0,2^\circ 2\theta$).

24. Способ по п.23, где дифрактограмма XRPD дополнительно содержит пик на 10 градусов ($\pm 0,2^\circ 2\theta$).

25. Способ по п.24, где соединение стабильно в течение по меньшей мере 20 ч.

26. Способ по п.22, где цикло(-Гис-Про) гидрат выделяют кристаллизацией с использованием растворителей.

27. Способ по п.22, где цикло(-Гис-Про) гидрат, полученный на стадии (j), имеет два эндотермических пика с максимумами при примерно 100°C и примерно 170°C на термограмме ДСК.

28. Способ по п.22, где цикло(-Гис-Про) гидрат характеризуется по меньшей мере двумя свойствами из следующих:

(а) дифрактограмма рентгеновской порошковой дифракции, содержащая по меньшей мере два пика из следующего списка: 10; 13,7; 17; 18,1; 20,2 и 27,3 градуса ($\pm 0,2^\circ 2\theta$);

(с) двойное лучепреломление с фрагментированной стержнеобразной морфологией при анализе с помощью микроскопии в поляризованном свете;

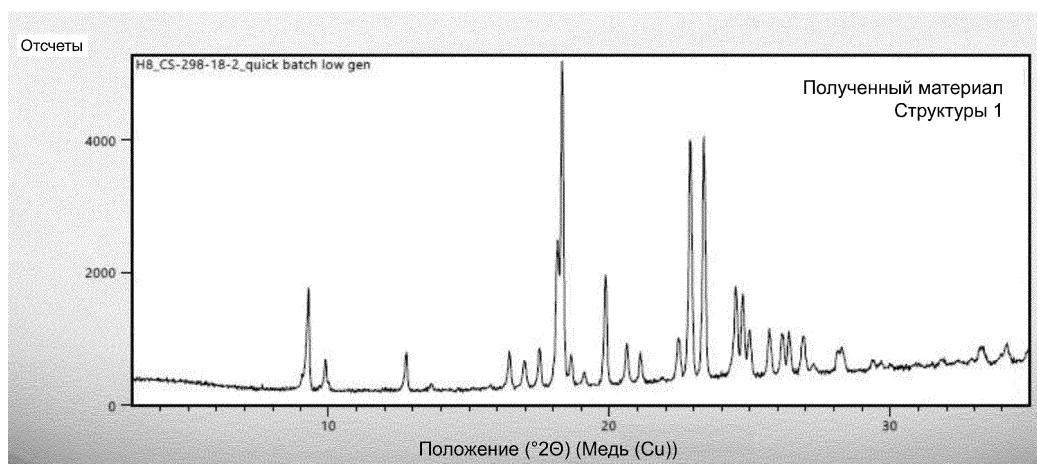
(d) начальная потеря массы 6,5% (0,9 эквивалента воды) с последующим разложением образца при температуре примерно 280°C при испытании методом термогравиметрического анализа;

(е) эндотерма с началом 99°C и пиком при 102°C в первом тепловом цикле ДСК;

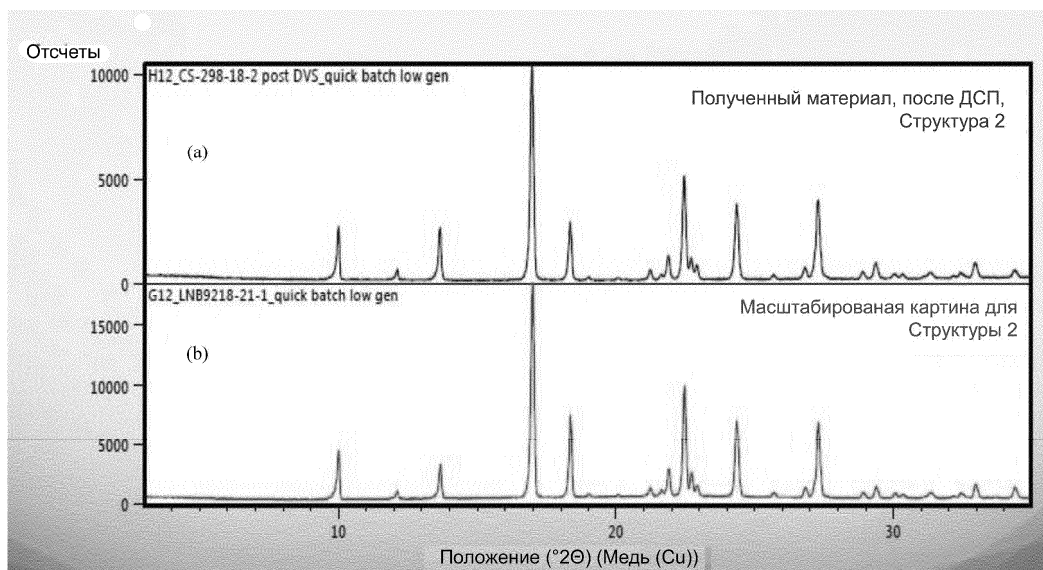
(f) начало дегидратации при относительной влажности ниже 10%, потеря примерно 6 мас.% от 10 до 0% относительной влажности (0,8 эквивалента воды) и гидратация от 0 до 40% относительной влажности в анализе динамической сорбции пара при 40°C ; и

(h) начало дегидратации при относительной влажности ниже 20%, потеря примерно 7 мас.% при относительной влажности от 20 до 0% (1,0 эквивалент воды) и регидратация от 0 до 40% относительной влажности при анализе динамической сорбции пара при 60°C .

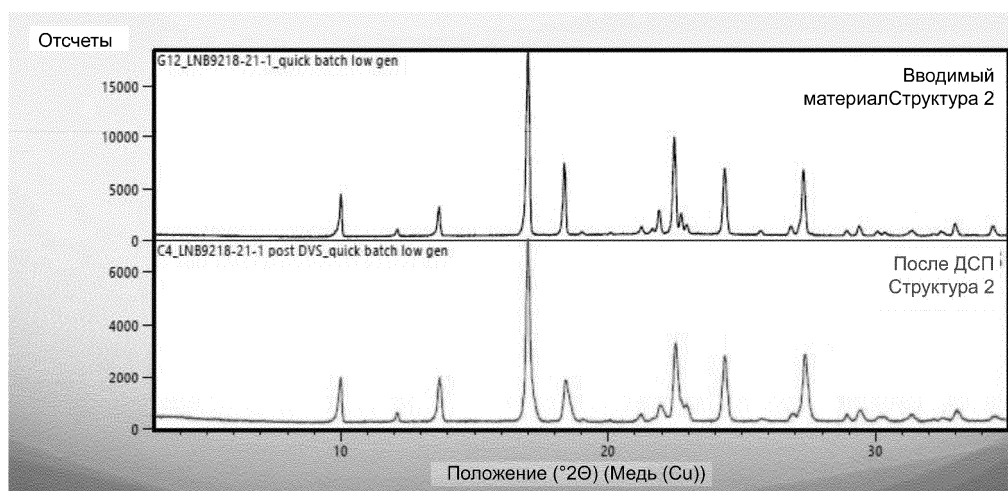
29. Способ по п.22, где цикло(-Гис-Про) гидрат имеет чистоту по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или примерно 100%.



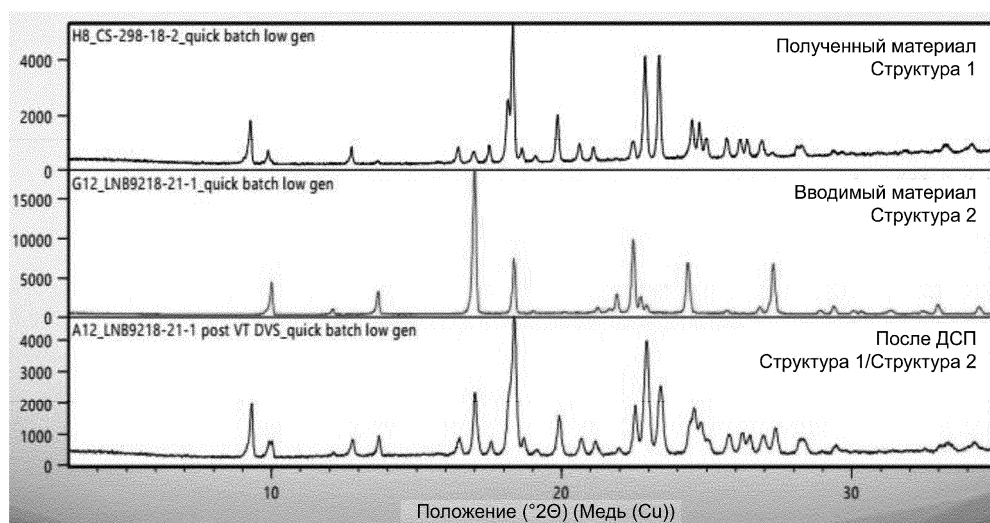
Фиг. 1



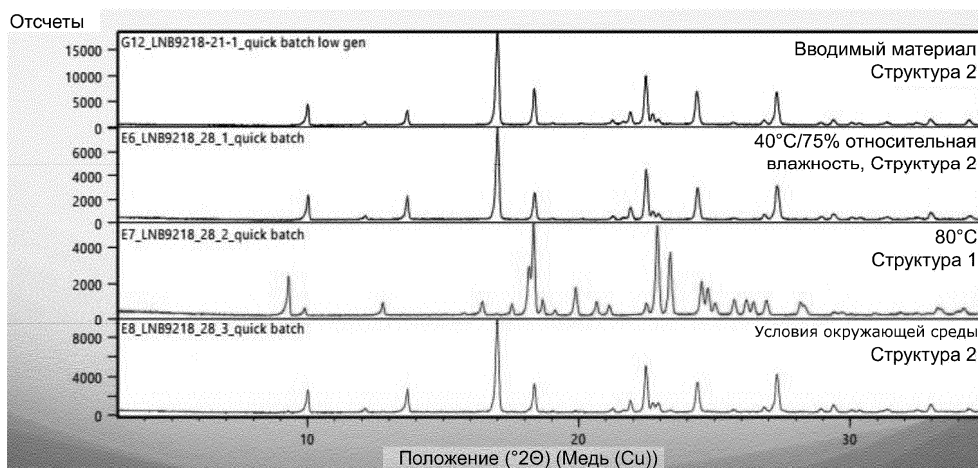
Фиг. 2



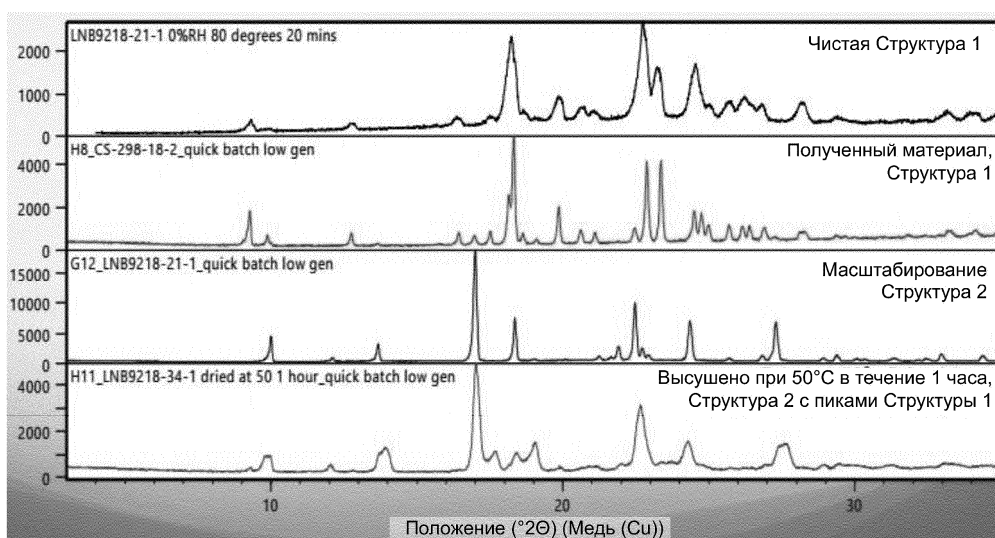
Фиг. 3



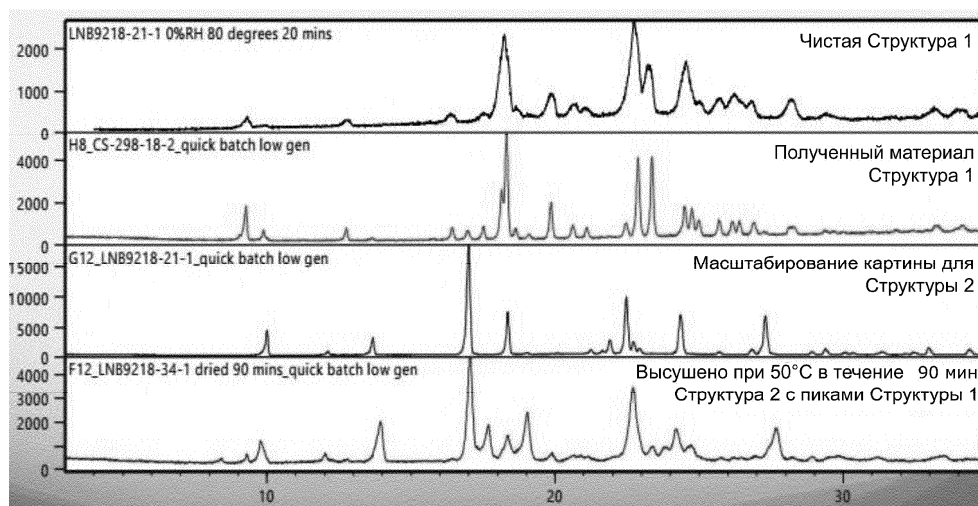
Фиг. 4



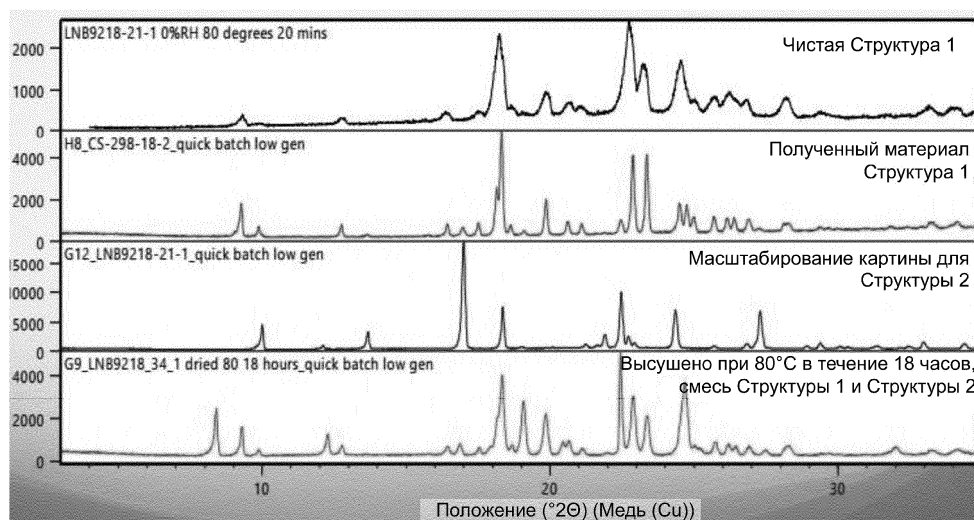
Фиг. 5



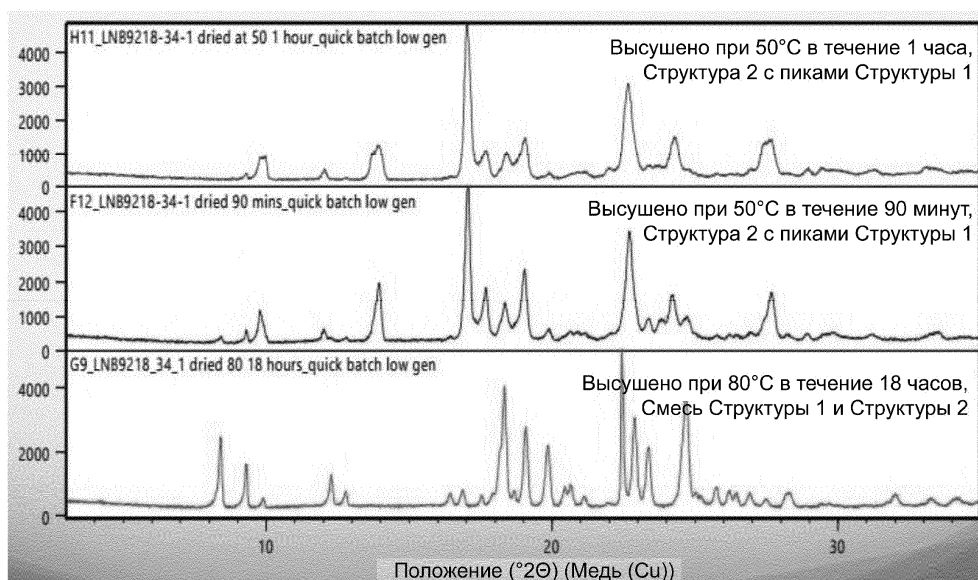
Фиг. 6



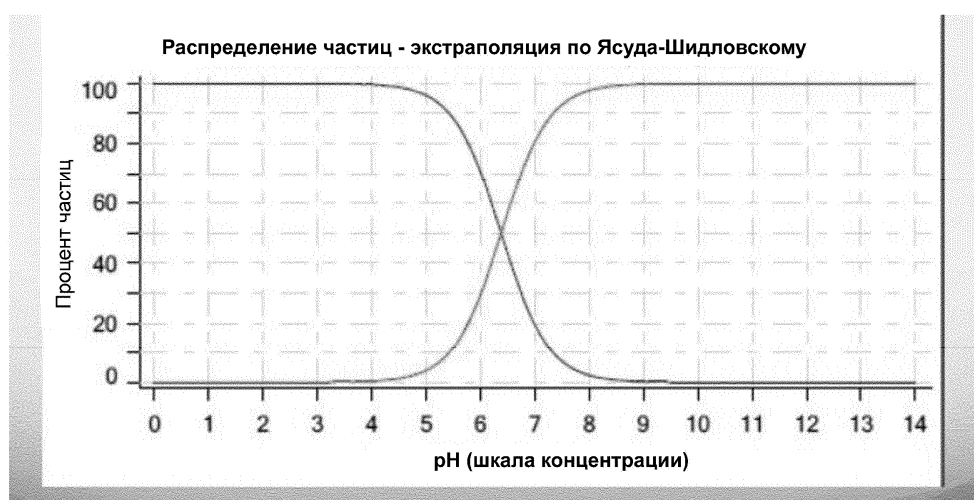
Фиг. 7



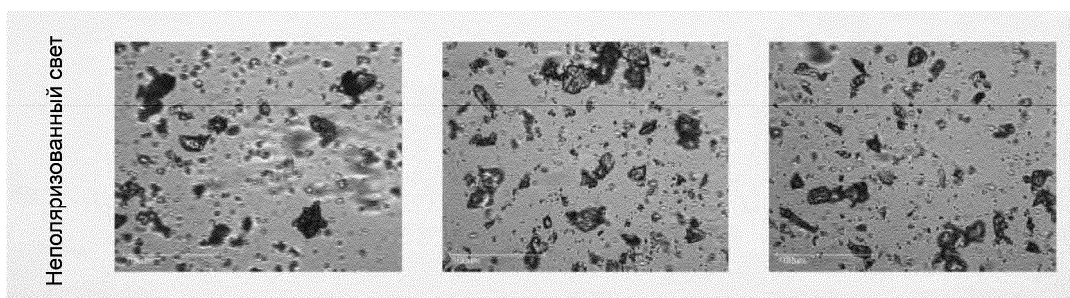
Фиг. 8



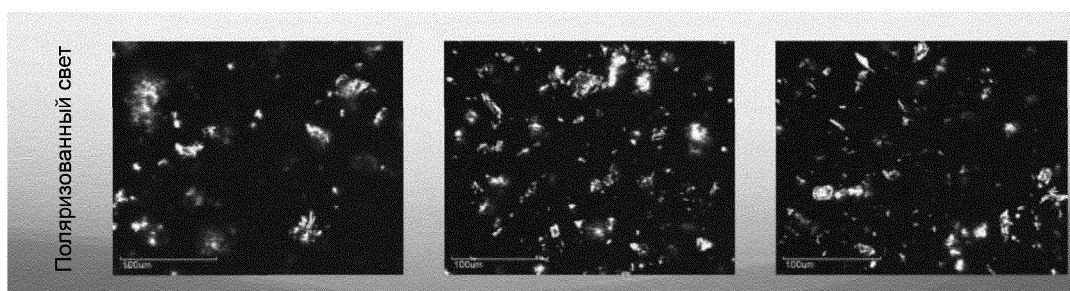
Фиг. 9



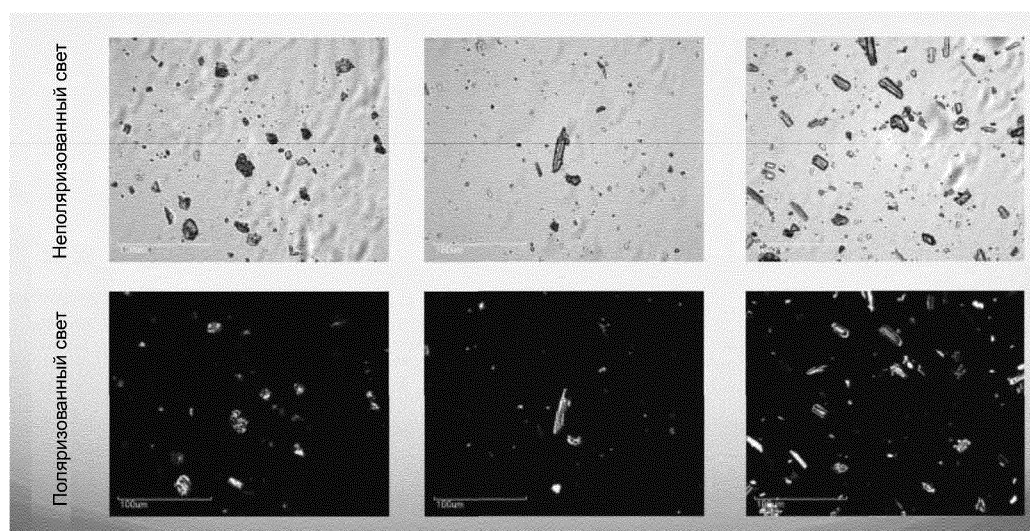
Фиг. 10



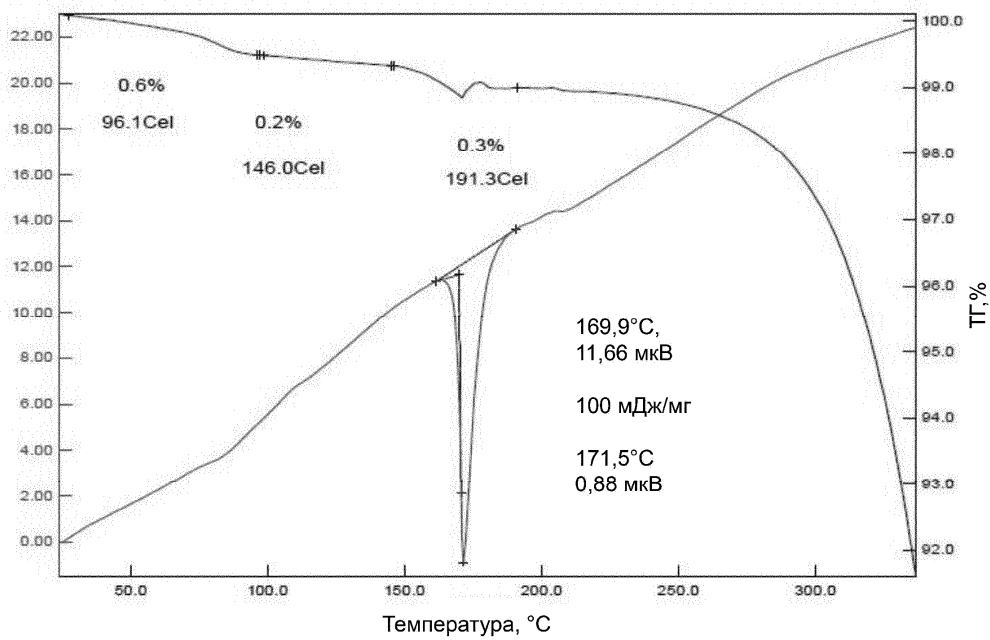
Фиг. 11



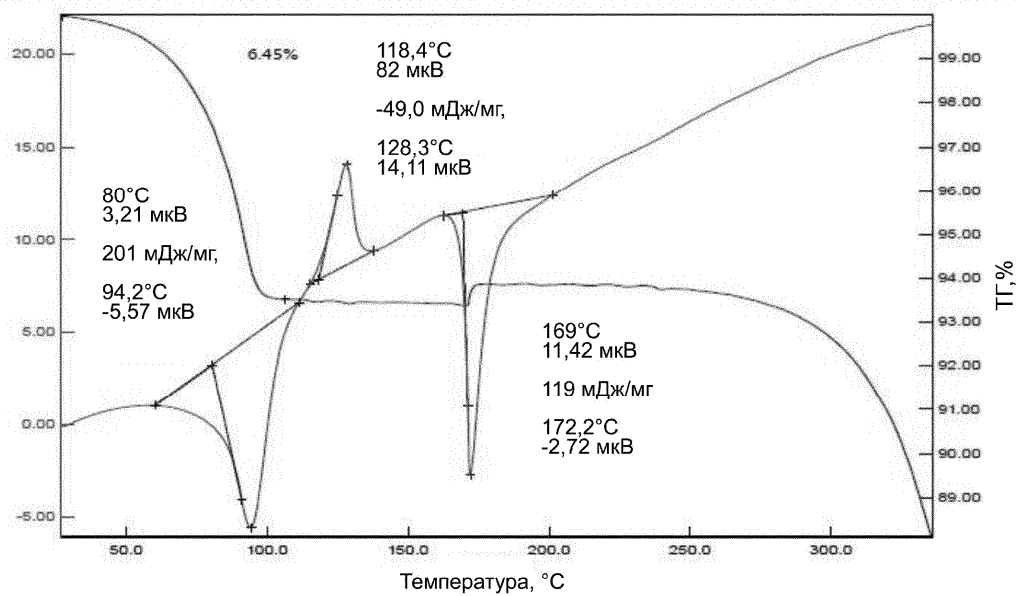
Фиг. 12



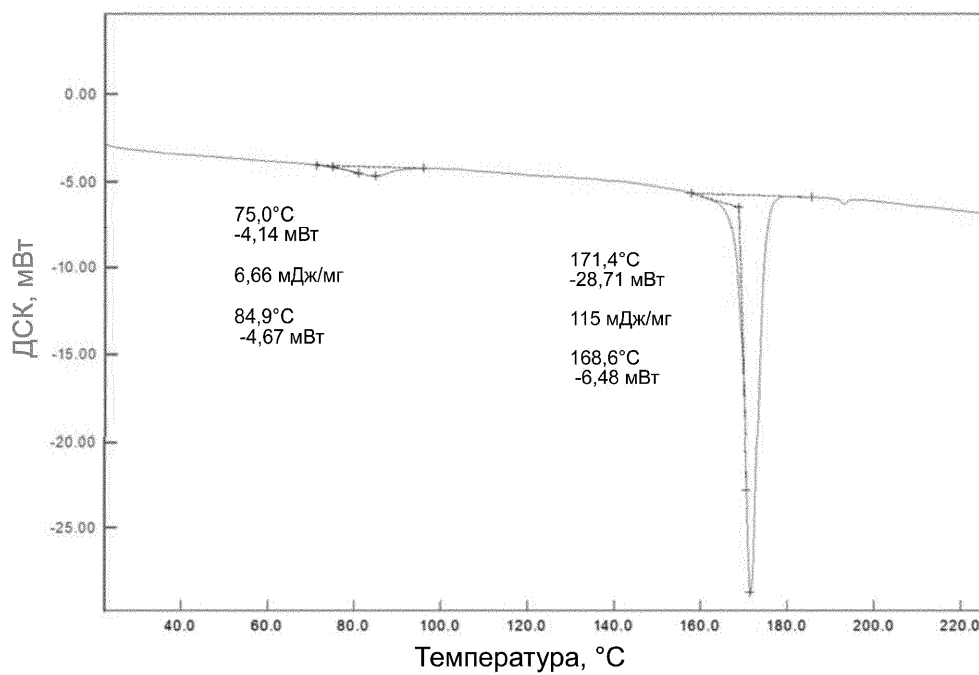
Фиг. 13



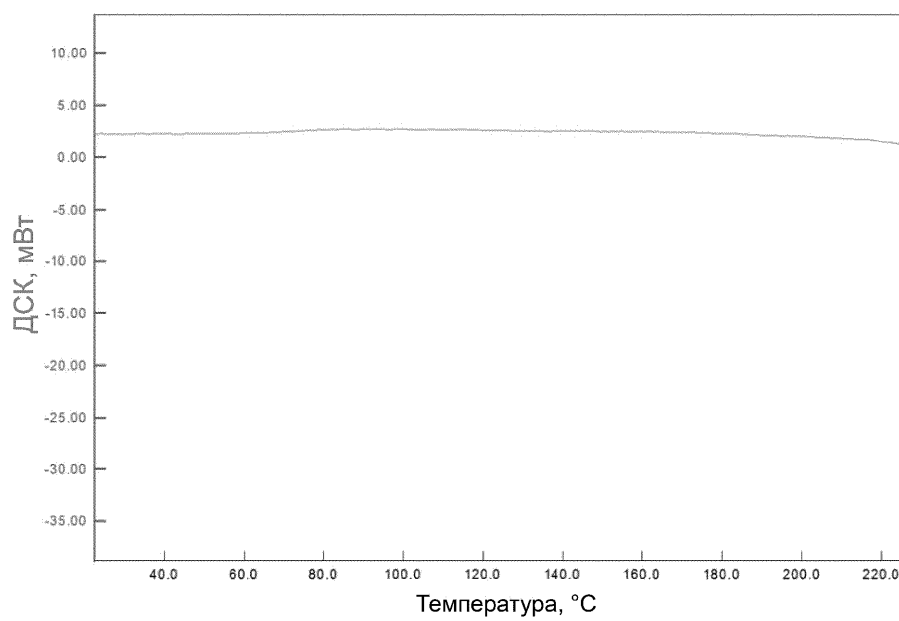
Фиг. 14



Фиг. 15

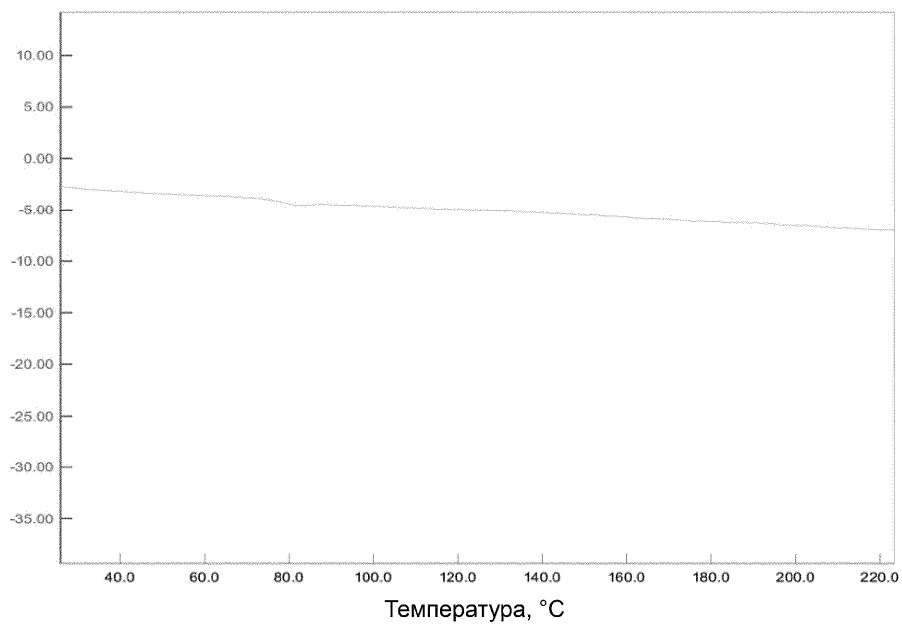


Фиг. 16

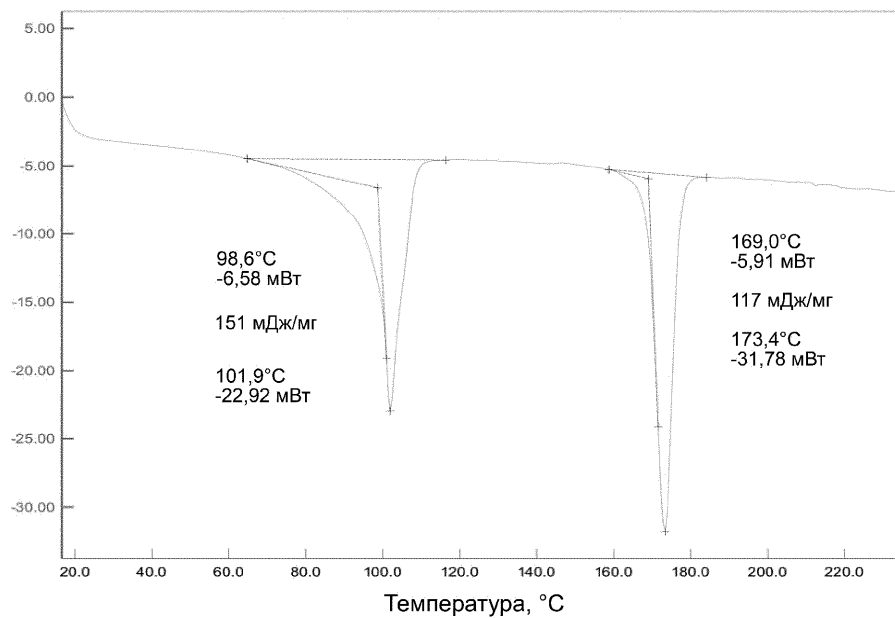


Фиг. 17

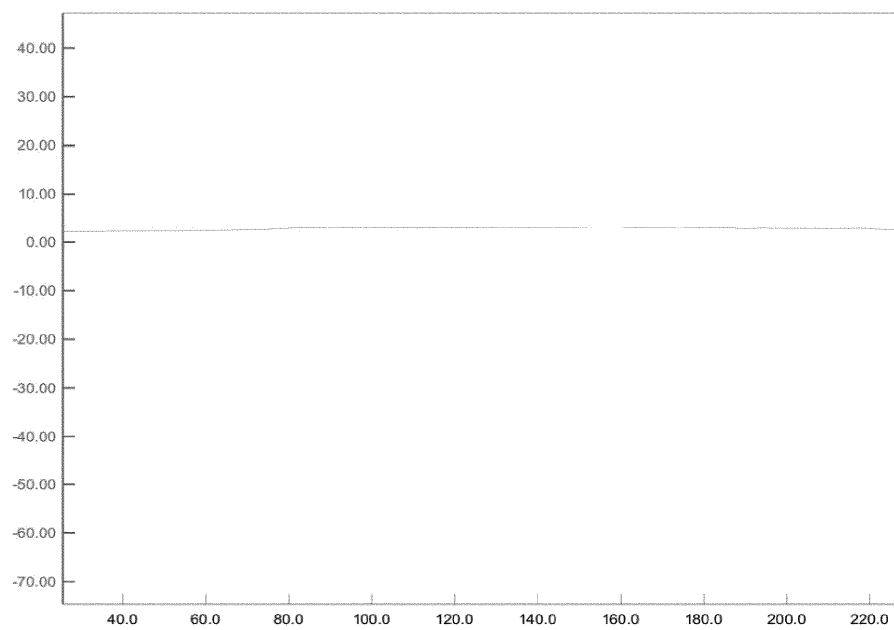
042744



Фиг. 18

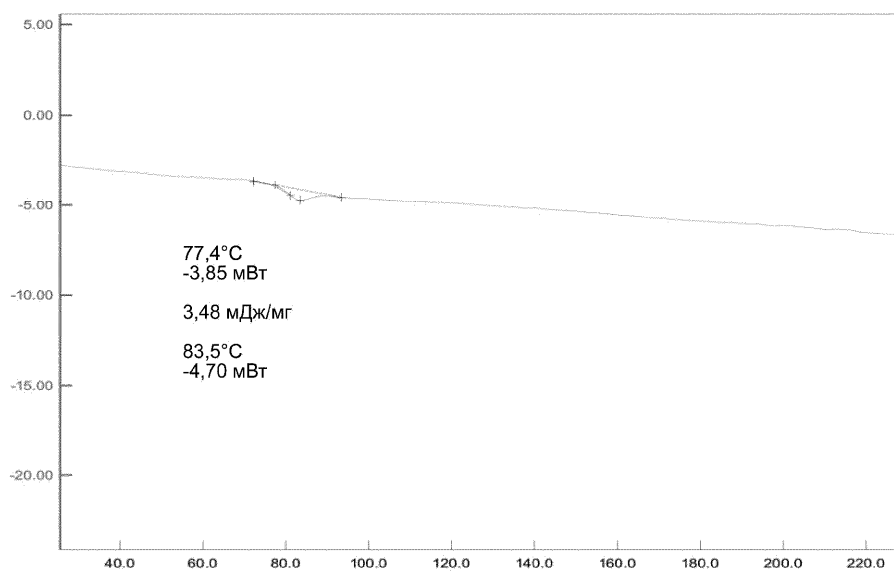


Фиг. 19



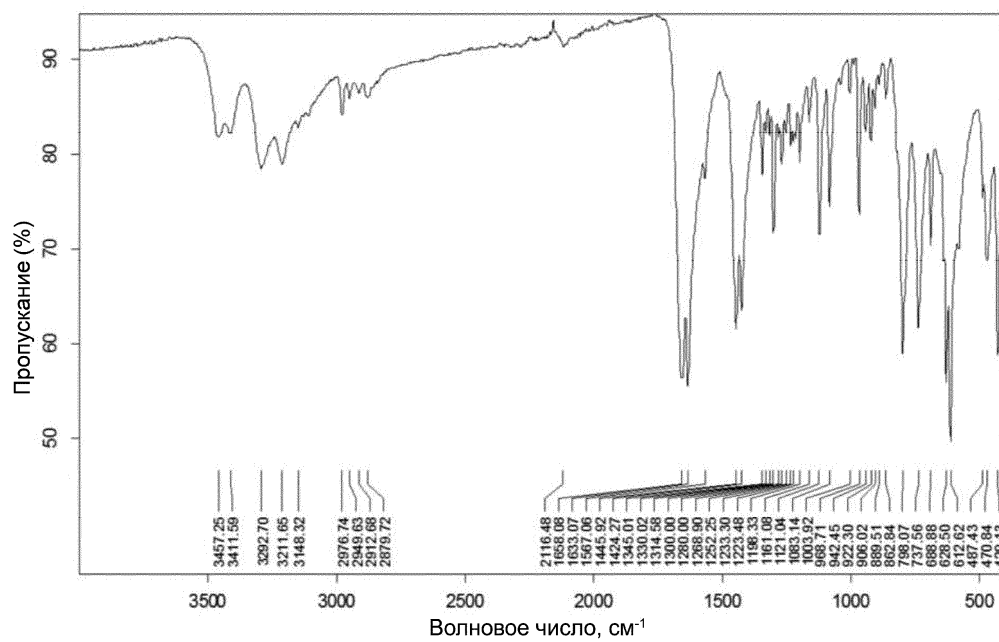
Температура, °C

Фиг. 20

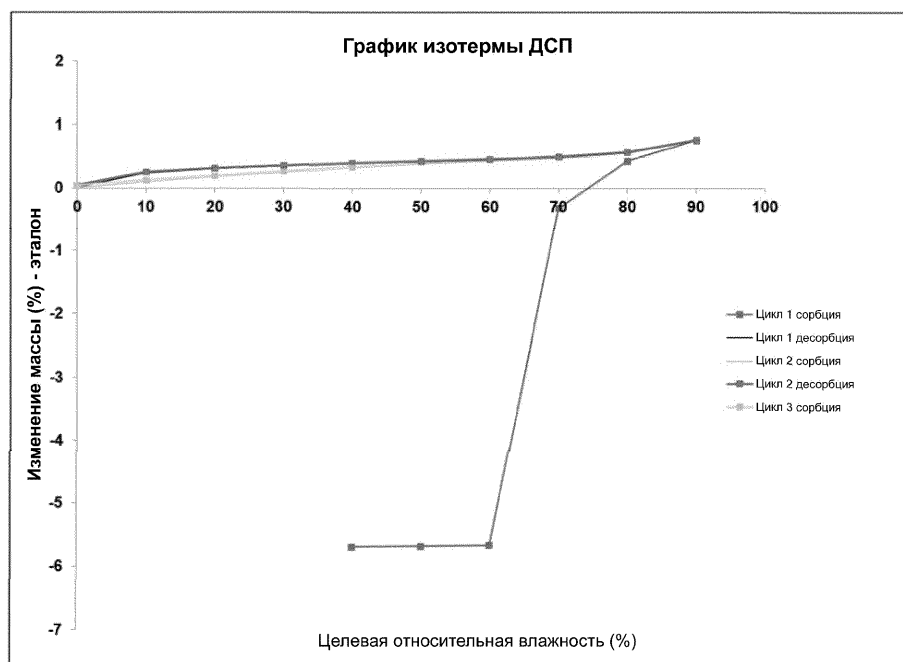


Температура, °C

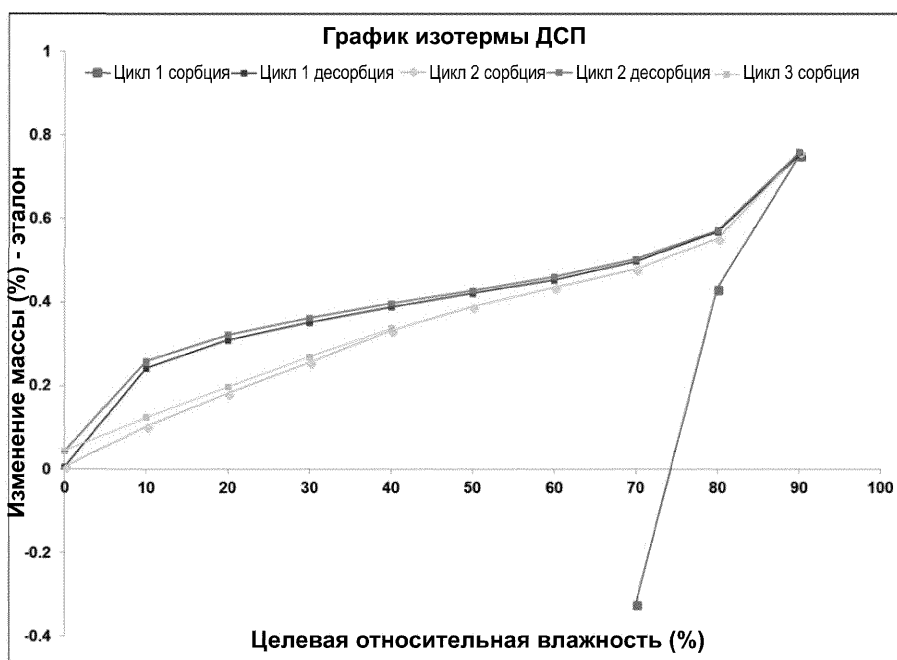
Фиг. 21



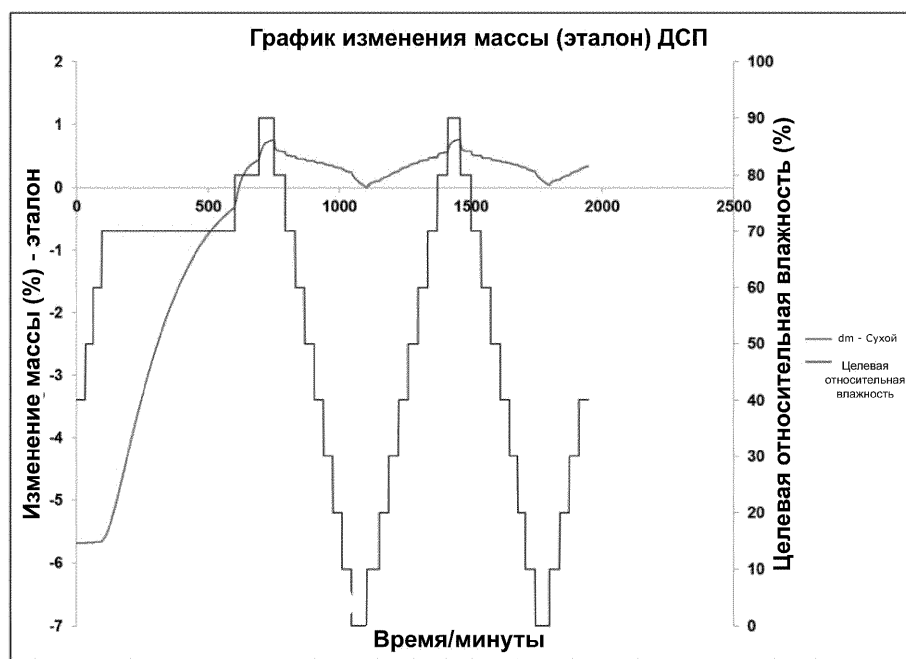
Фиг. 22



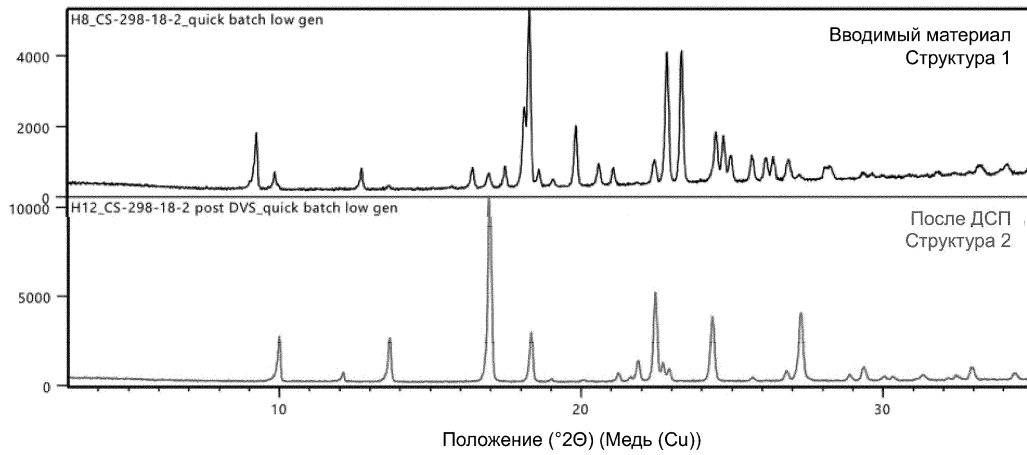
Фиг. 23



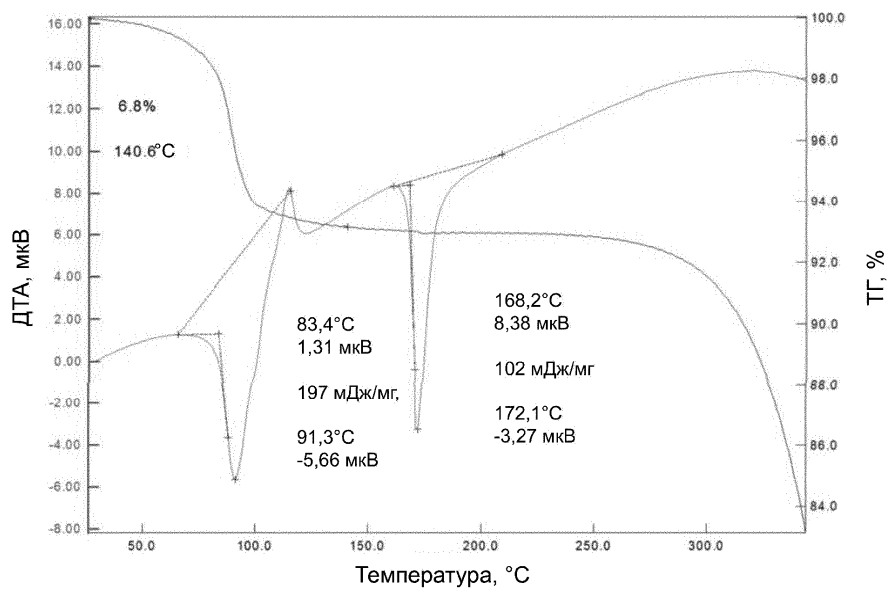
Фиг. 24



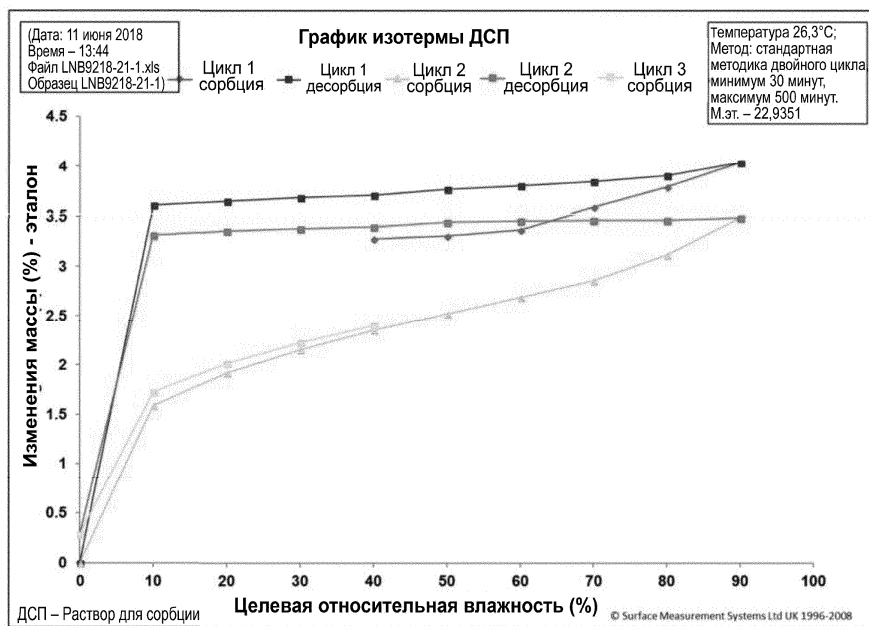
Фиг. 25



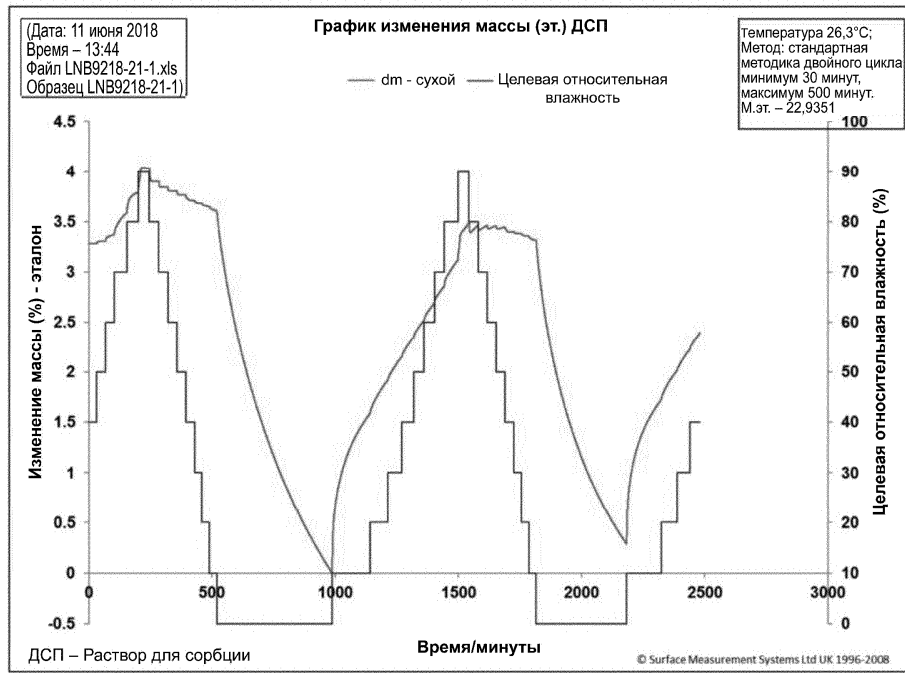
Фиг. 26



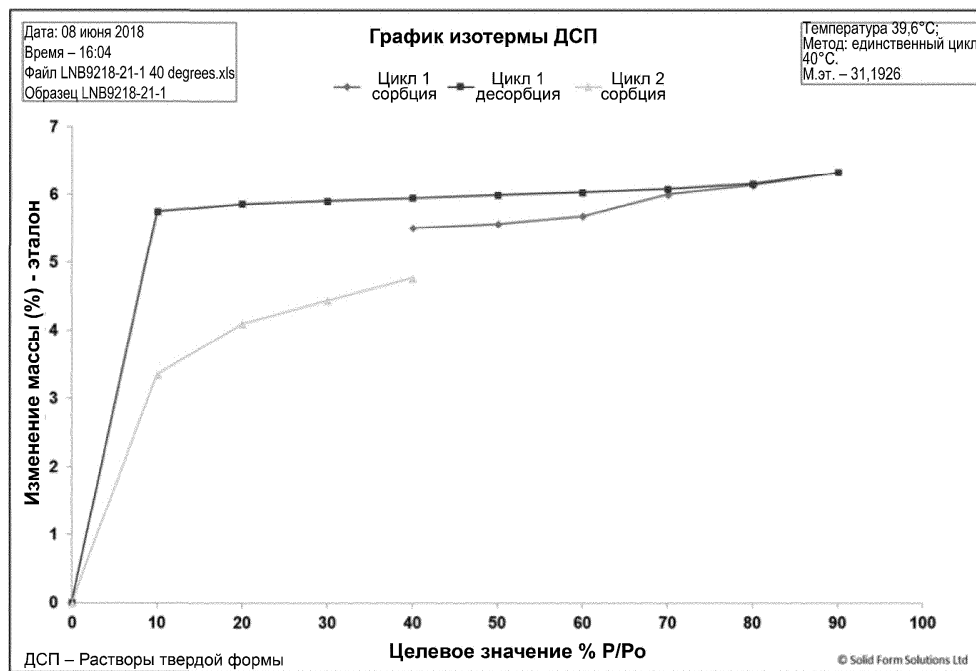
Фиг. 27



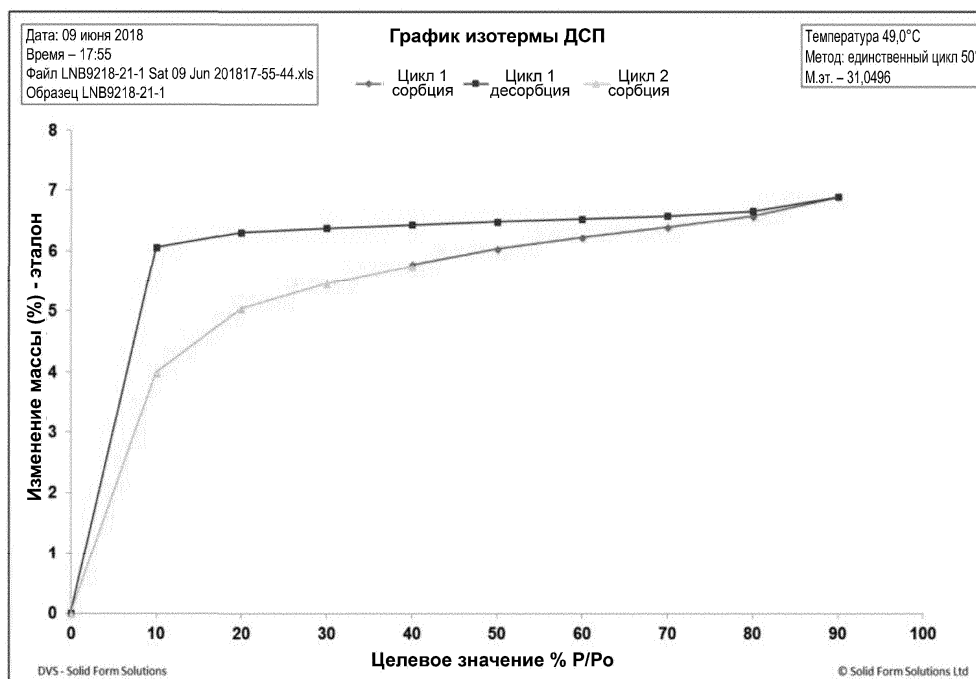
Фиг. 28



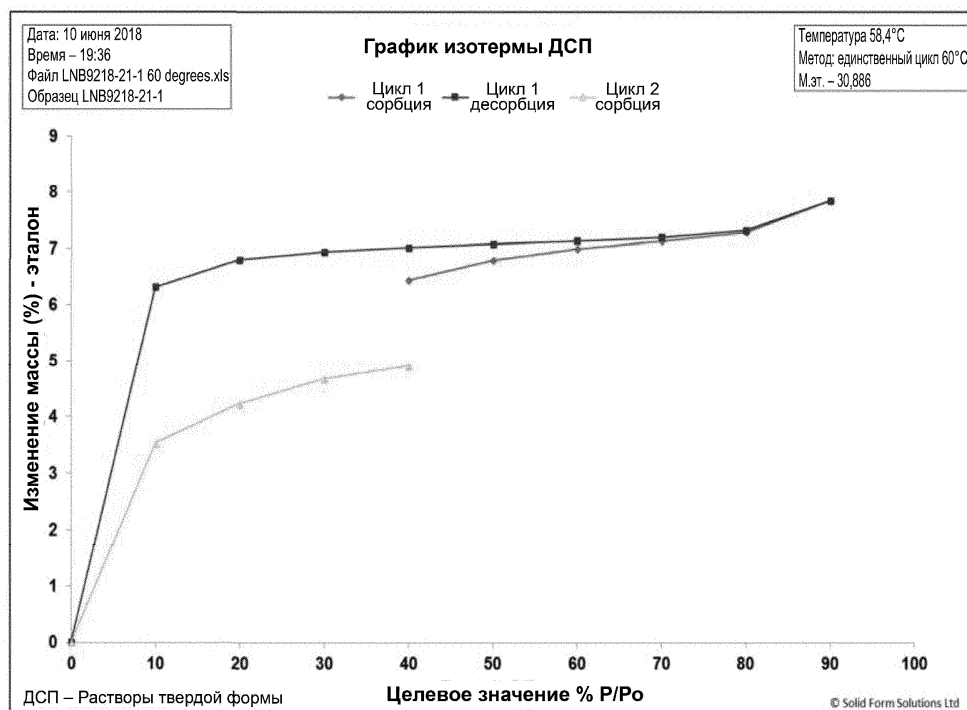
Фиг. 29



Фиг. 30



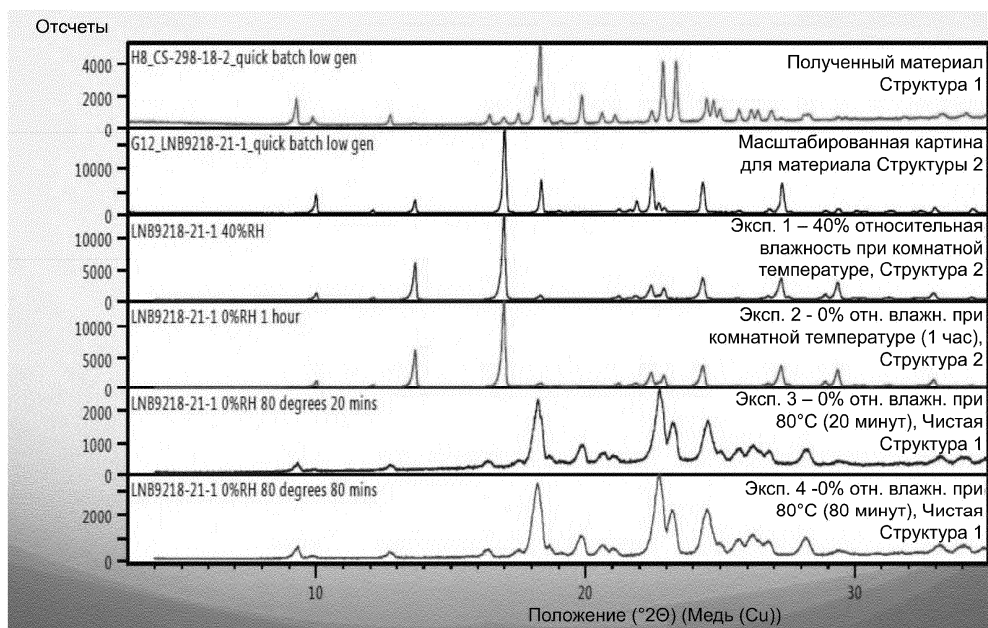
Фиг. 31



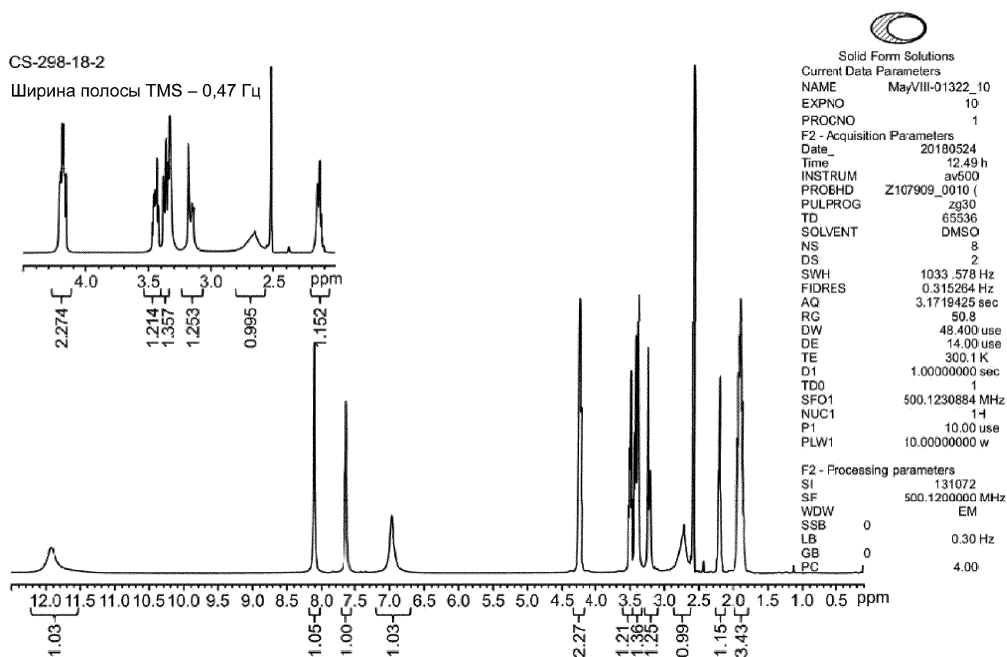
Фиг. 32

Эксп.	% отн. влажности	Температура	Идентичность
1	40	Комнатная	Структура 2
2	0		Структура 2
3	0	80°C	Структура 1
4	0		Структура 1

Фиг. 33



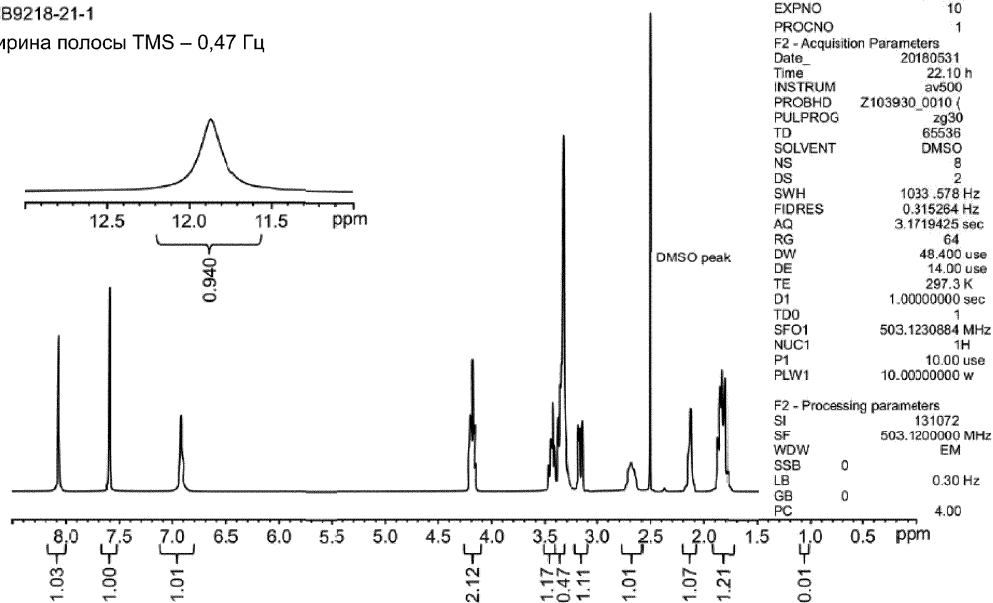
Фиг. 34



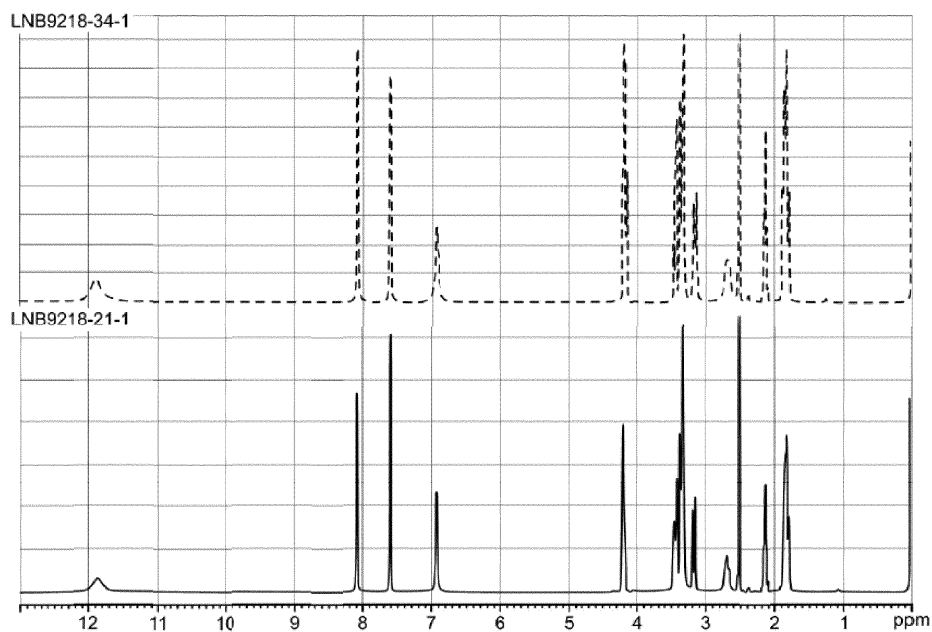
Фиг. 35

.NB9218-21-1

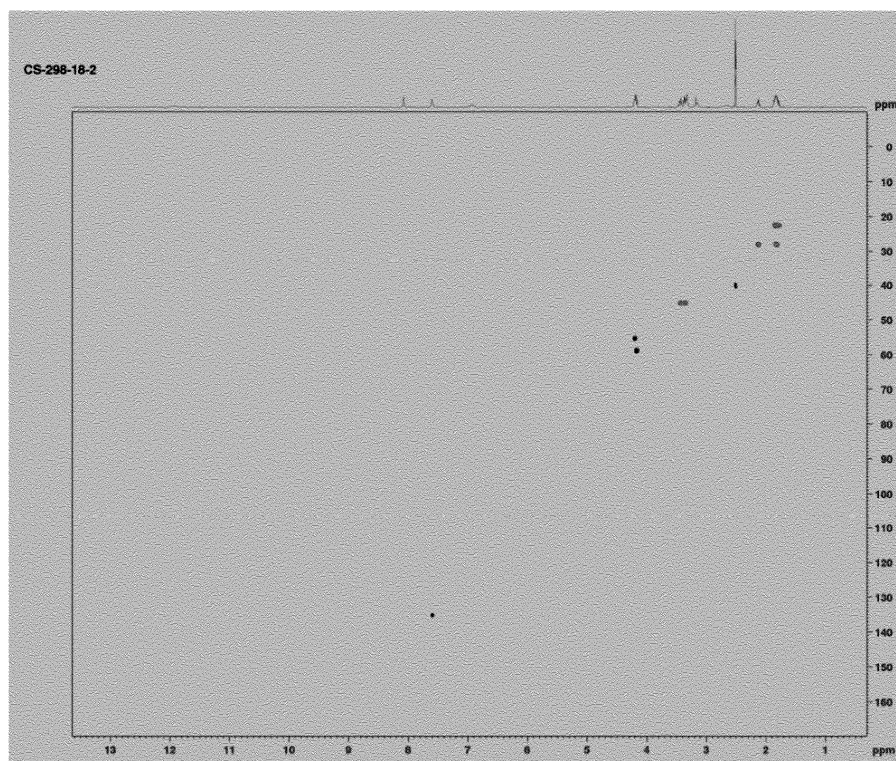
Ширина полосы TMS – 0,47 Гц



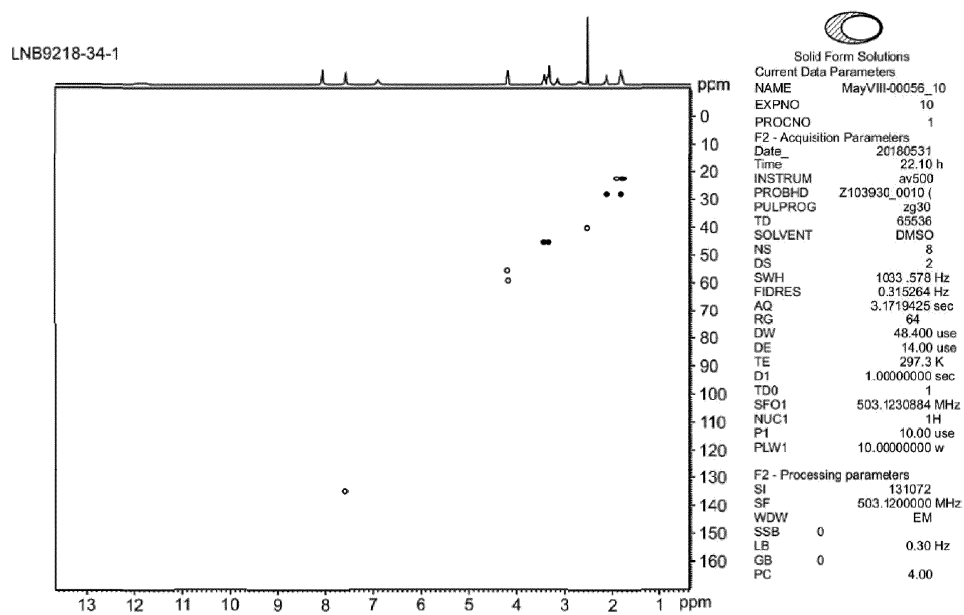
Фиг. 36



Фиг. 37

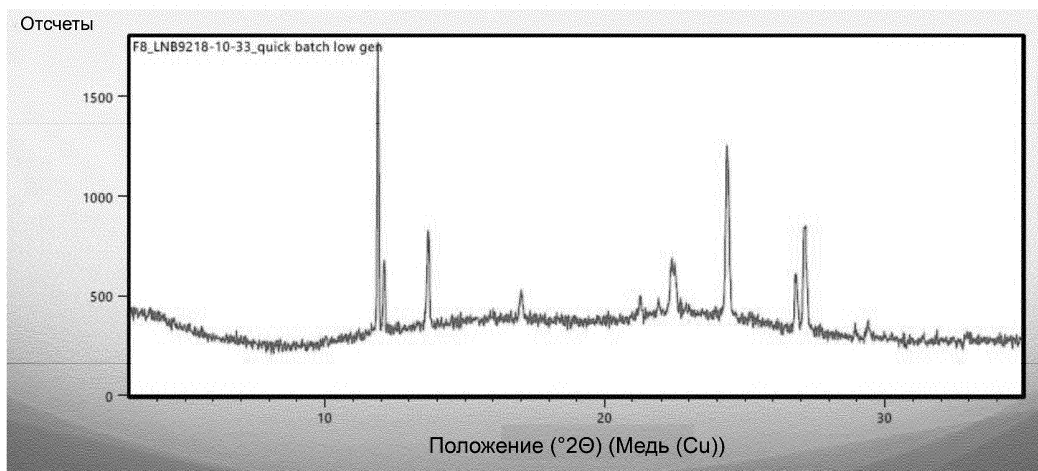


Фиг. 38

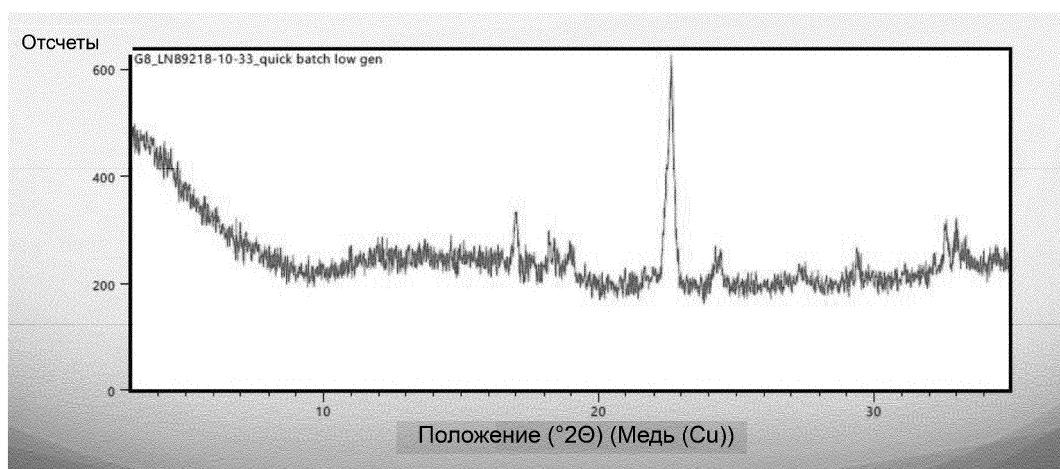


Фиг. 39

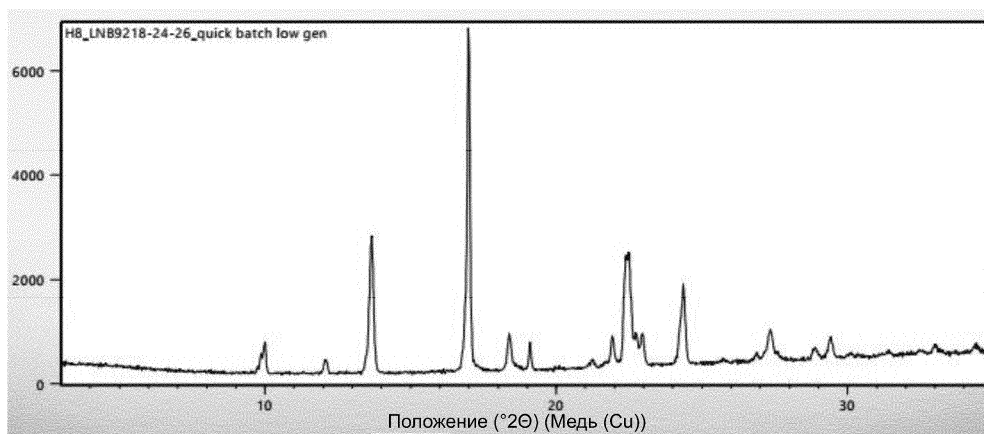
042744



Фиг. 40



Фиг. 41



Фиг. 42

Но- мер	Растворитель	Примерная растворимость (мг/мл)
1	1-бутанол	≤ 5
2	2-бутанол	≤ 5
3	1-пропанол	$14.3 \geq x \geq 12.5$
4	2-пропанол	$5.6 \geq x \geq 5.3$
5	40% метанол: 60% вода (об.%) (ср. расч. 0,8)	$20 \geq x \geq 16.7$
6	95% метанол: 5% вода (об.%) (ср. расч. 0,2)	$33.3 \geq x \geq 25$
7	Ацетон	≤ 5
8	Ацетонитрил	≤ 5
9	Дихлорметан	≤ 5
10	Этанол	$100 \geq x \geq 50$
11	Этилацетат	≤ 5
12	Этилформиат	≤ 5
13	Гептан	≤ 5
14	Изопропилацетат	≤ 5
15	Метанол	$100 \geq x \geq 50$
16	Метилэтилкетон	≤ 5
17	Метилизобутилкетон	≤ 5
18	N,N'-диметилацетамид	$33.3 \geq x \geq 25$
19	Нитрометан	≤ 5
20	Трет-бутилметилловый эфир	≤ 5
21	ТГФ	≤ 5
22	Толуол	≤ 5
23	Вода	$25 \geq x \geq 20$
24	Трифторэтанол	$25 \geq x \geq 20$
25	Бензиловый спирт	$7.7 \geq x \geq 7.1$
26	Хлороформ	≤ 5
27	Хлорбензол	≤ 5
28	1,4-диоксан	≤ 5
29	2-метоксиэтанол	$11.1 \geq x \geq 10$
30	Диметилсульфоксид	$20 \geq x \geq 16.7$

Фиг. 43

Номер	Растворитель	Объем добавленных растворителей (100 мкл)																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	1-бутанол																				
2	2-бутанол																				
3	1-пропанол																				
4	2-пропанол																				
5	40% метанол: 60% вода (об.%) (ср. расч. 0,8)																				
6	95% метанол: 5% вода (об.%) (ср. расч. 0,2)																				
7	Ацетон																				
8	Ацетонитрил																				
9	Дихлорметан																				
10	Этанол																				
11	Этилацетат																				
12	Этилформиат																				
13	Гептан																				
14	Изопропилацетат																				
15	Метанол																				
16	Метилэтилкетон																				
17	Метилизобутилкетон																				
18	N,N'-диметилацетамид																				
19	Нитрометан																				
20	Трет-бутилметилловый эфир																				
21	ТГФ																				
22	Толуол																				
23	Вода																				
24	Трифторэтанол																				
25	Бензиловый спирт																				
26	Хлороформ																				
27	Хлорбензол																				
28	1,4-диоксан																				
29	2-метоксиэтанол																				
30	Диметилсульфоксид																				

Не растворяется

Растворяется при нагревании до 40 °С

Растворяется

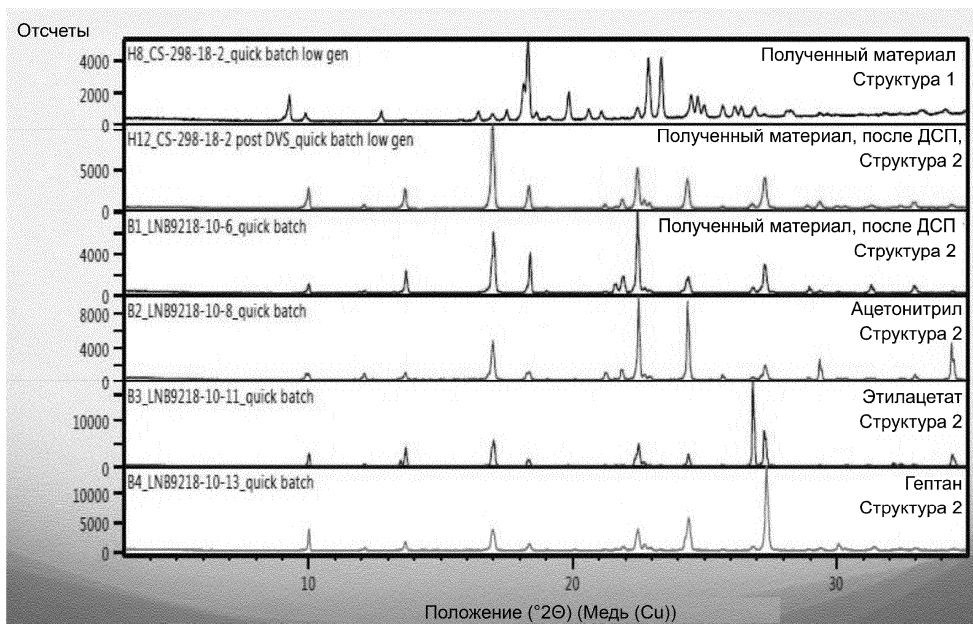
Фиг. 44

Номер	Растворитель	Результаты XRPD
1	1-бутанол	Н/П – нет твердого вещества
2	2-бутанол	Н/П – нет твердого вещества
3	1-пропанол	Структура 1
4	2-пропанол	Структура 2
5	40% метанол: 60% вода (об.%) (ср.расч. 0,8)	Структура 2
6	95% метанол: 5% вода (об.%) (ср.расч. 0,2)	Структура 2
7	Ацетон	Структура 2
8	Ацетонитрил	Структура 2
9	Дихлорметан	Структура 2
10	Этанол	Структура 1 Структура 2
11	Этилацетат	Структура 2
12	Этилформиат	Структура 2
13	Гептан	Структура 2
14	Изопропилацетат	Структура 2
15	Метанол	Н/П – бесцветный гель
16	Метилэтилкетон	Структура 2
17	Метилизобутилкетон	Структура 2
18	N,N'-диметилацетамид	Н/П – нет твердого вещества
19	Нитрометан	Структура 2
20	Трет-бутилметилловый эфир	Структура 2
21	ТГФ	Аморфное вещество с пиками Структуры 2
22	Толуол	Структура 2
23	Вода	Н/П – нет твердого вещества
24	Трифторэтанол	Структура 2
25	Бензиловый спирт	Н/П – нет твердого вещества
26	Хлороформ	Н/П – нет твердого вещества
27	Хлорбензол	Структура 2 Структура 3
28	1,4-диоксан	Н/П – нет твердого вещества
29	2-метоксиэтанол	Н/П – нет твердого вещества
30	Диметилсульфоксид	Н/П – нет твердого вещества

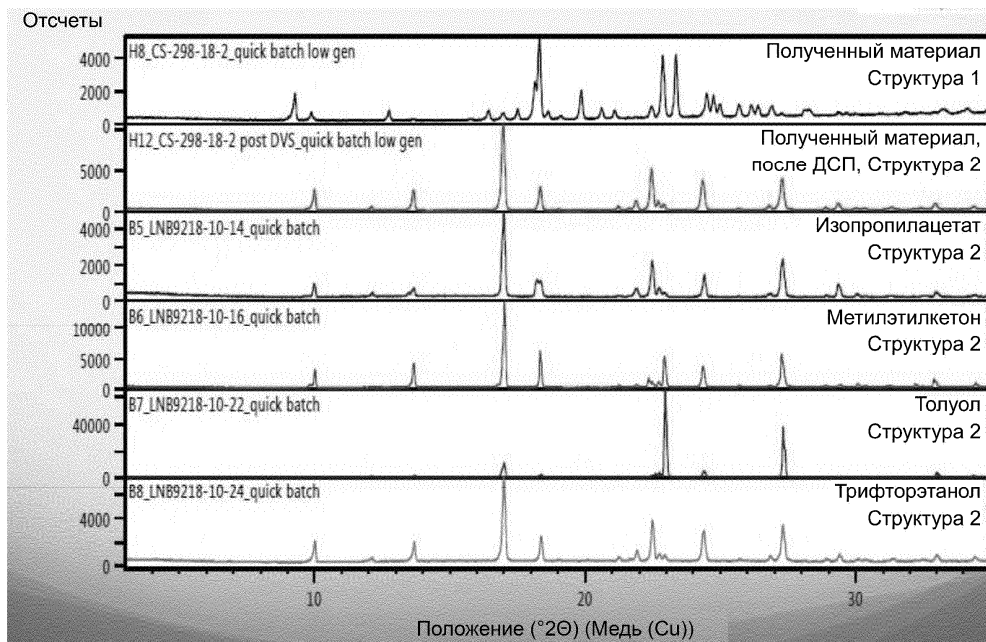
Фиг. 45

Растворитель
1-пропанол
2-пропанол
95% метанол: 5% вода (об.%)
50% метанол/ 50% ТБМЭ (об.%)
10% метанол/ 90% ТБМЭ
Ацетон
Ацетонитрил
Дихлорметан
Этанол
50% этанол/ 50% ТБМЭ (об.%)
10% этанол/ 90% ТБМЭ
Этилацетат
Этилформиат
Гептан
Изопропилацетат
Метилэтилкетон
Метилизобутилкетон
Нитрометан
Трет-бутилметилловый эфир
Толуол
Трифторэтанол
Хлорбензол
ТГФ
Метанол

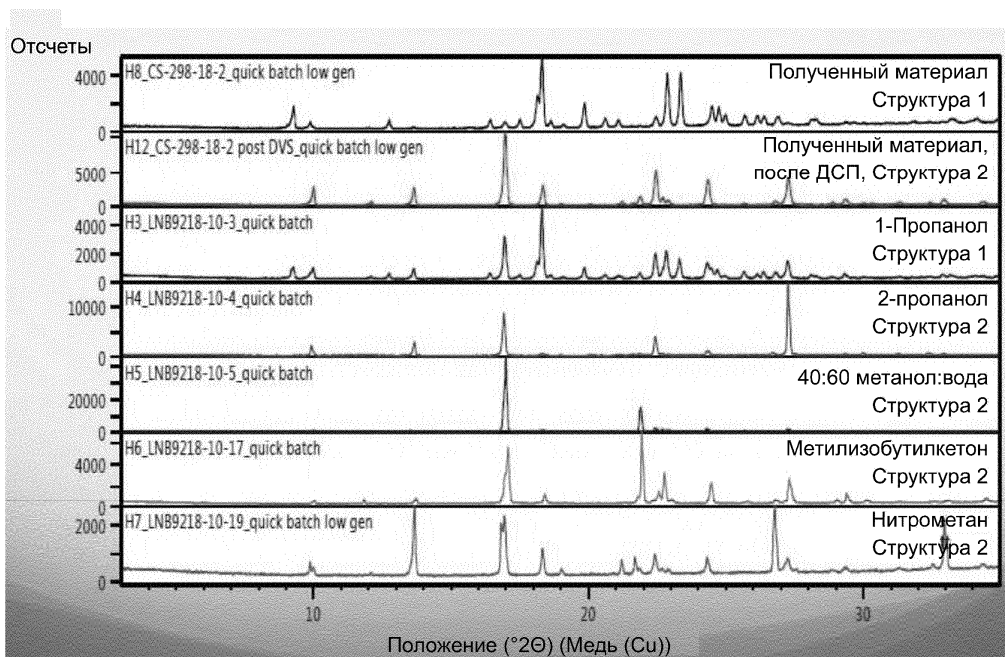
Фиг. 46



Фиг. 47



Фиг. 48



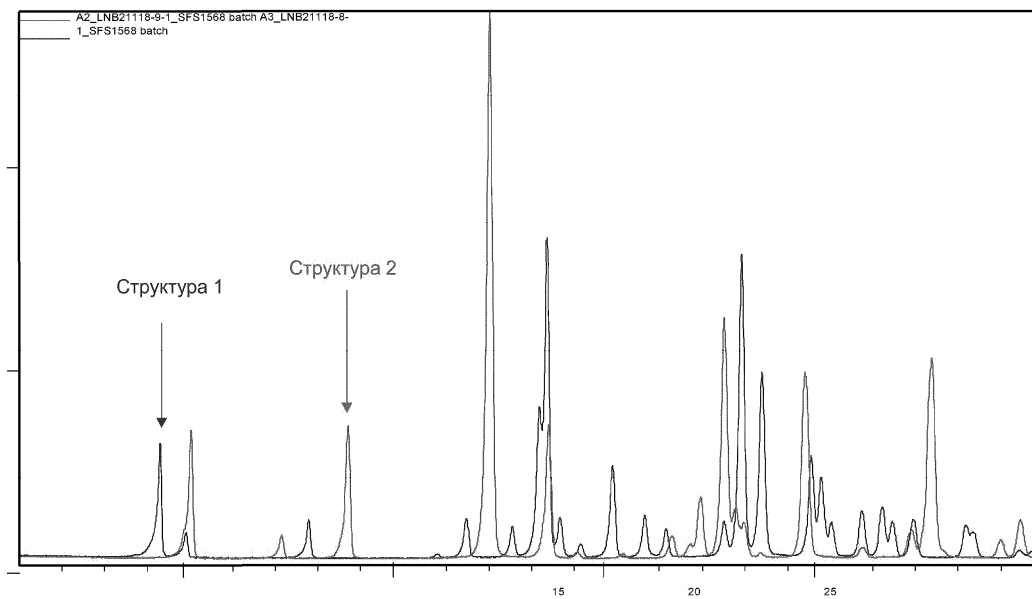
Фиг. 49

Таблица 5: Циклирование температуры при первичном скрининге полиморфов

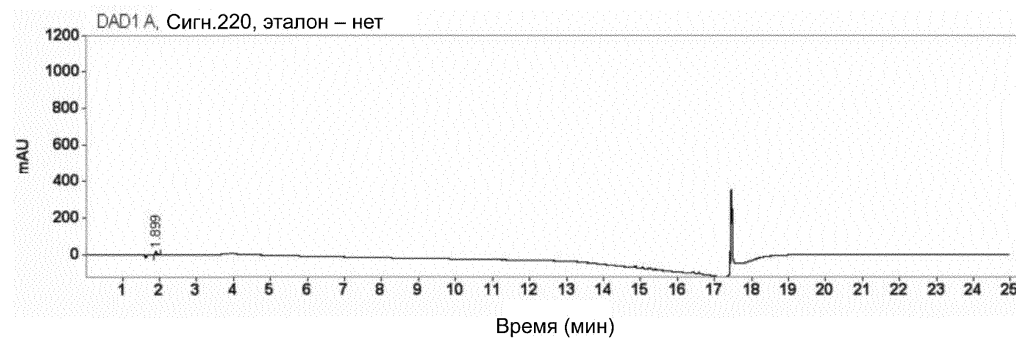
Растворитель	Структура
1-пропанол	Н/П – раствор
2-пропанол	Н/П – раствор
95% метанол: 5% вода (об.%)	Н/П – раствор
50% метанол/ 50% ТБМЭ (об.%)	Чистая Структура 1
10% метанол/ 50% ТБМЭ	Чистая Структура 1
Ацетон	Н/П – раствор
Ацетонитрил	Структура 1
Дихлорметан	Предпочтительная ориентация – невозможно оценить
Этанол	Н/П – раствор
50% этано/ 50% ТБМЭ (об.%)	Чистая Структура 1
10% этанол/ 90% ТБМЭ	Чистая Структура 1
Этилацетат	Чистая Структура 1 (предпочтительная ориентация)
Этилформиат	Структура 1 – плохая кристалличность
Гептан	Структура 2
Изопропилацетат	Структура 2
Метилэтилкетон	Структура 1
Метилизобутилкетон	Структура 2
Нитрометан	Н/П – раствор
Трет-бутилметилловый эфир	Структура 2
Толуол	Структура 2 (предпочтительная ориентация)
Трифторэтанол	Н/П – раствор
Хлорбензол	Н/П – недостаточно твердого вещества
ТГФ	Структура 1
Метанол	Н/П - масло

Фиг. 50

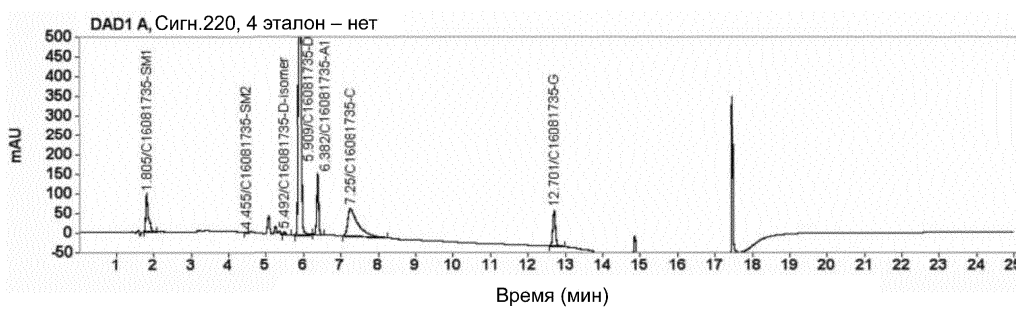
Отсчеты



Фиг. 51



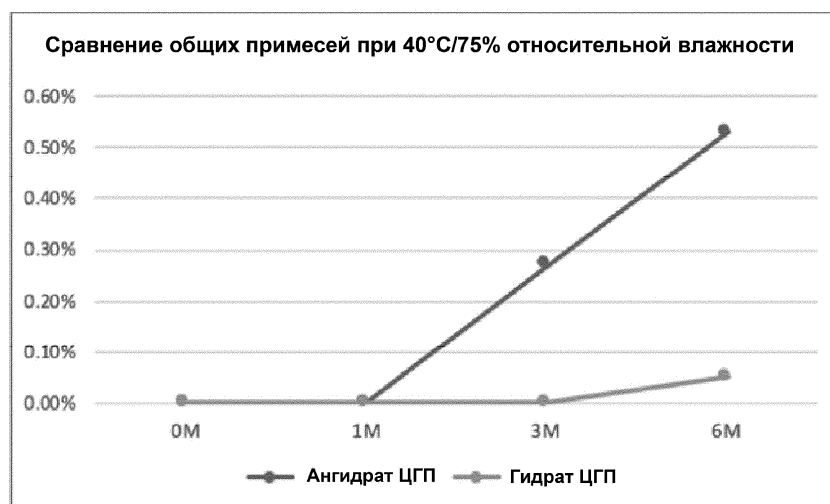
Фиг. 52



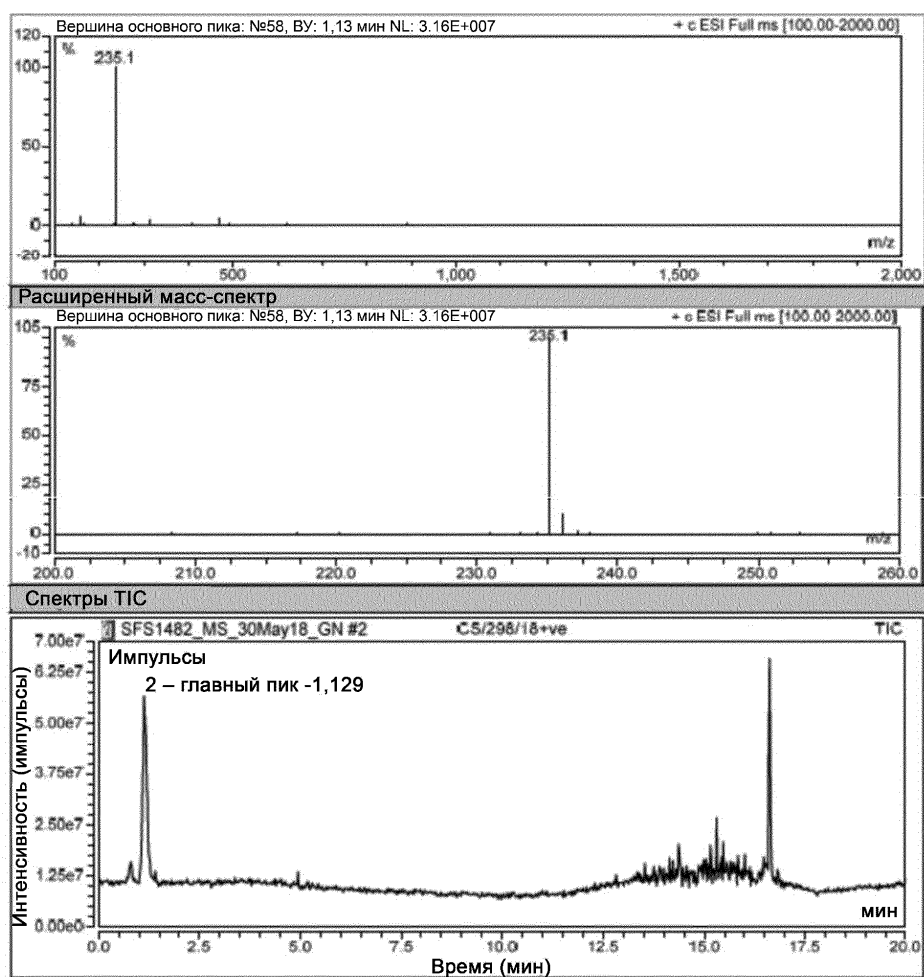
*C1601736-D обозначает ЦГП (безводный, а также гидрат),

**Известные примеси отмечены кодовыми наименованиями

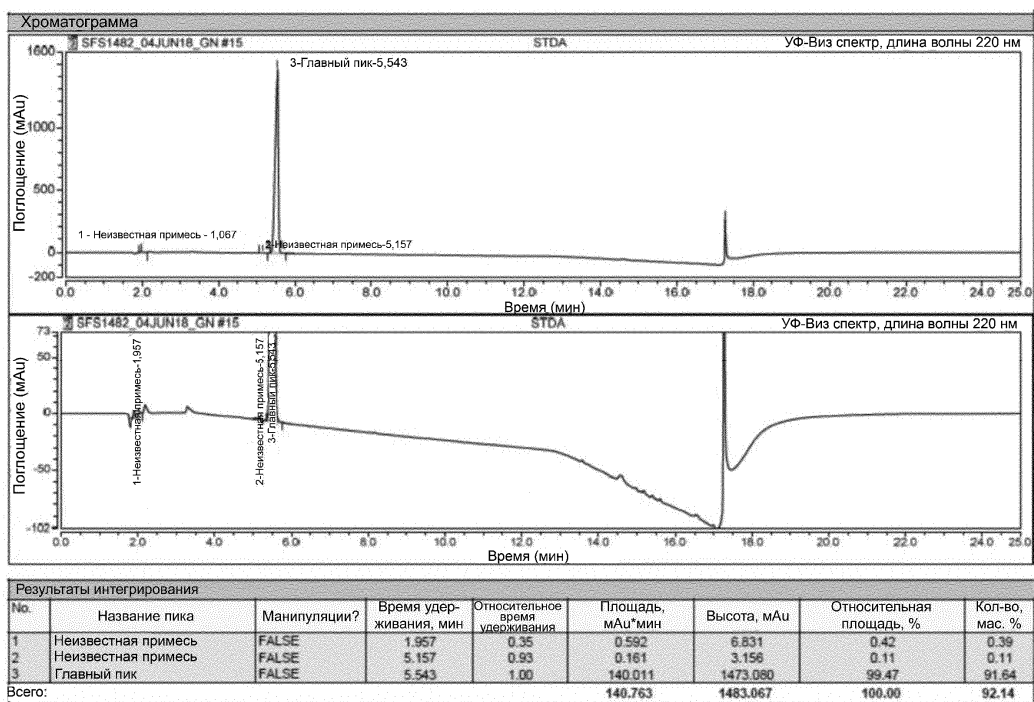
Фиг. 53



Фиг. 54

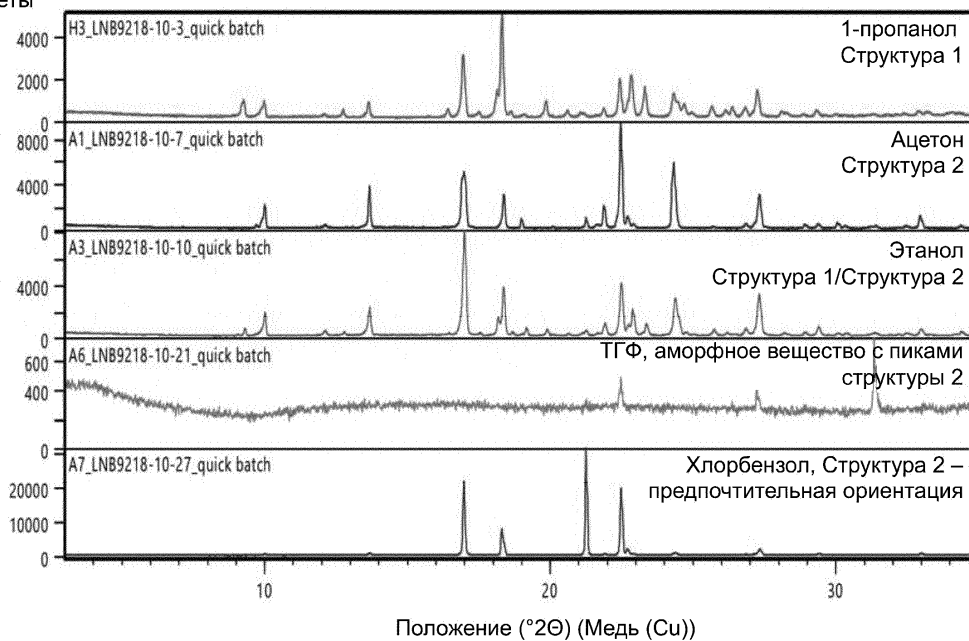


Фиг. 55



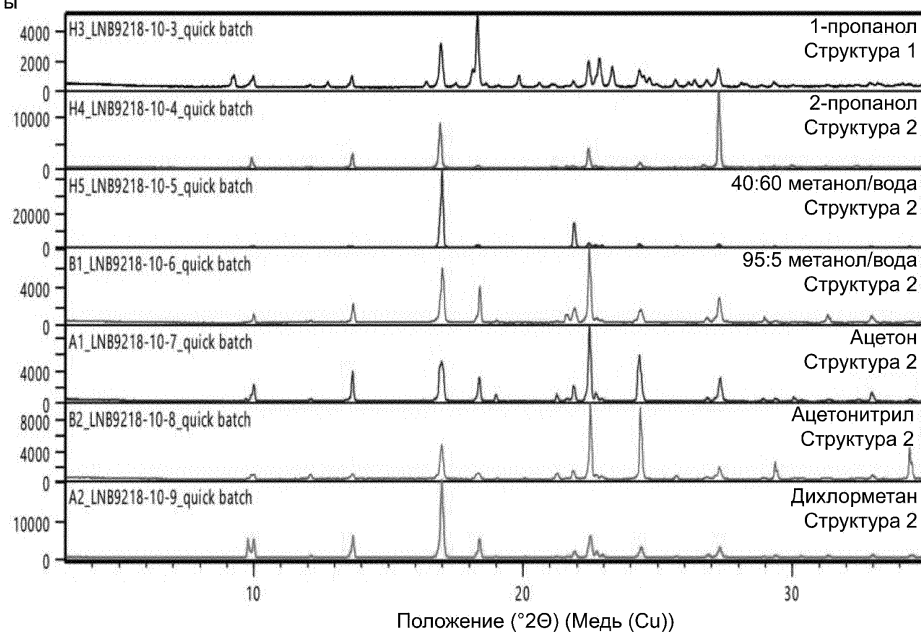
Фиг. 56

Отсчеты



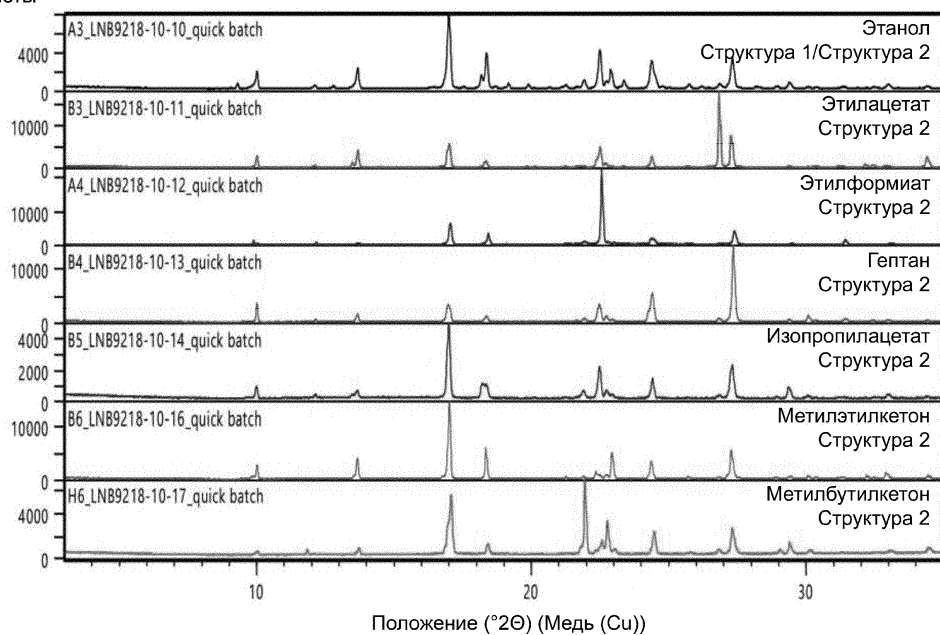
Фиг. 57

Отсчеты

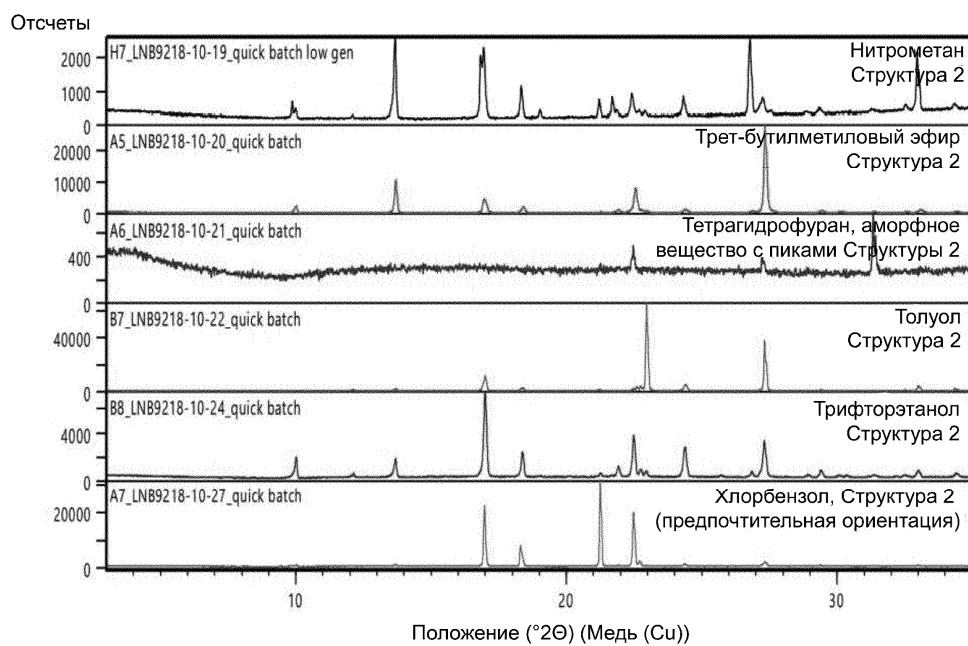


Фиг. 58

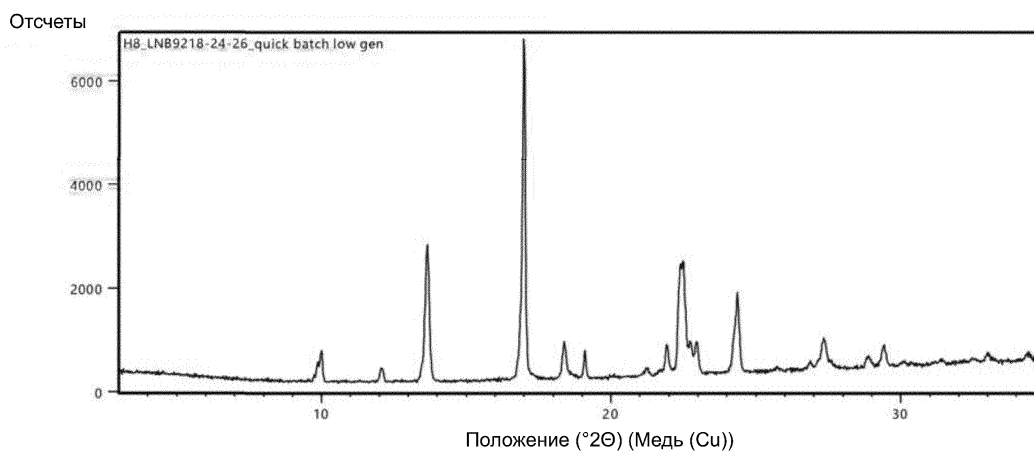
Отсчеты



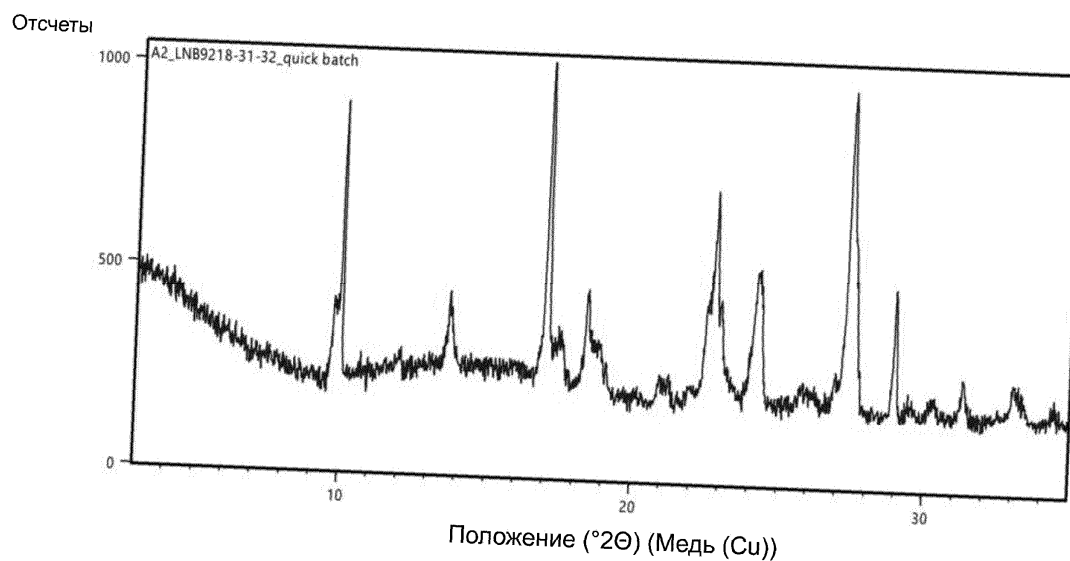
Фиг. 59



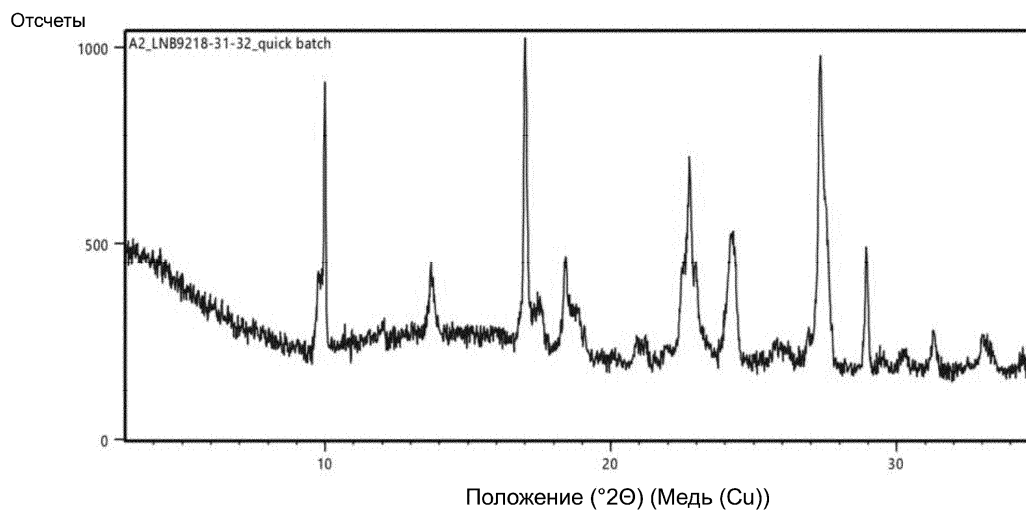
Фиг. 60



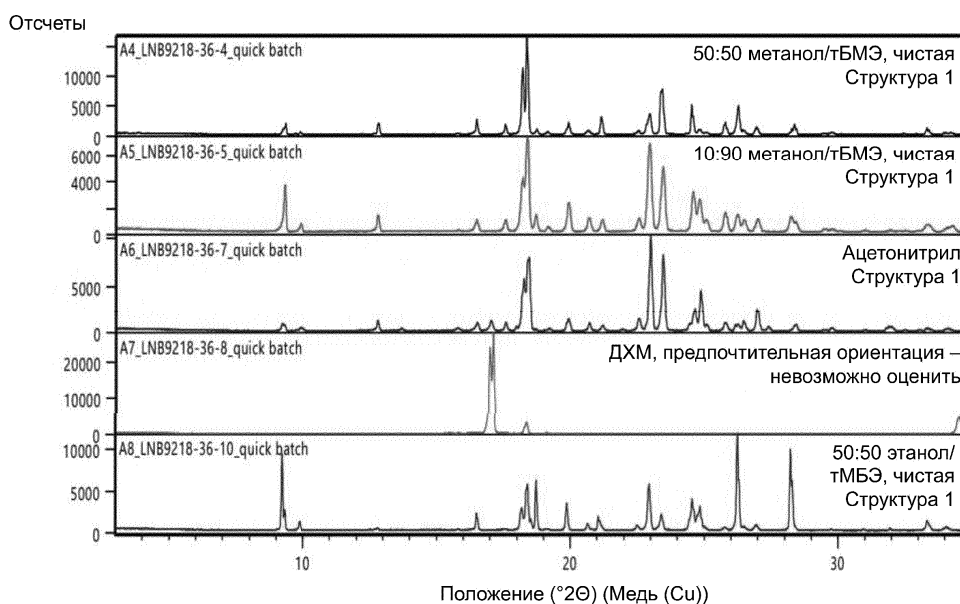
Фиг. 61



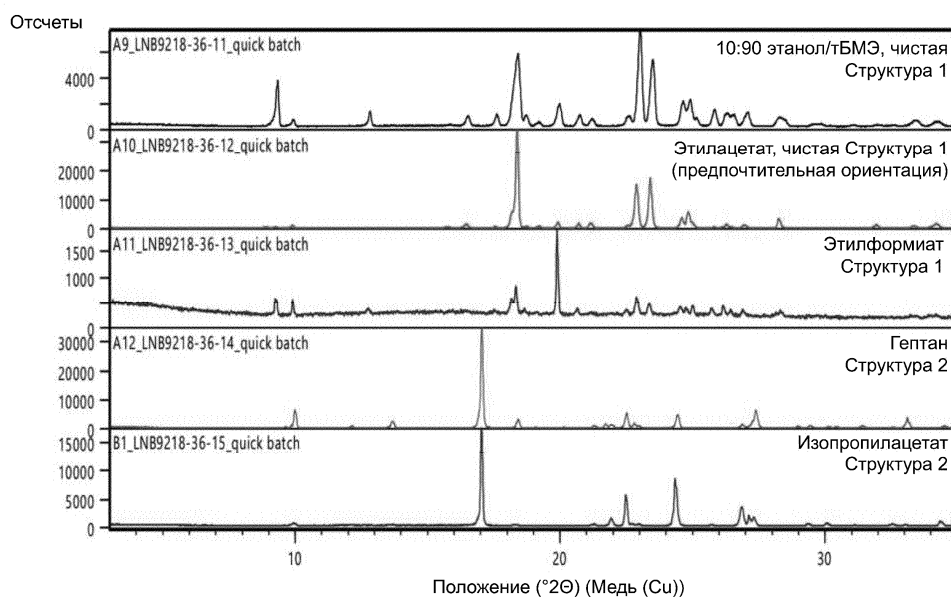
Фиг. 62



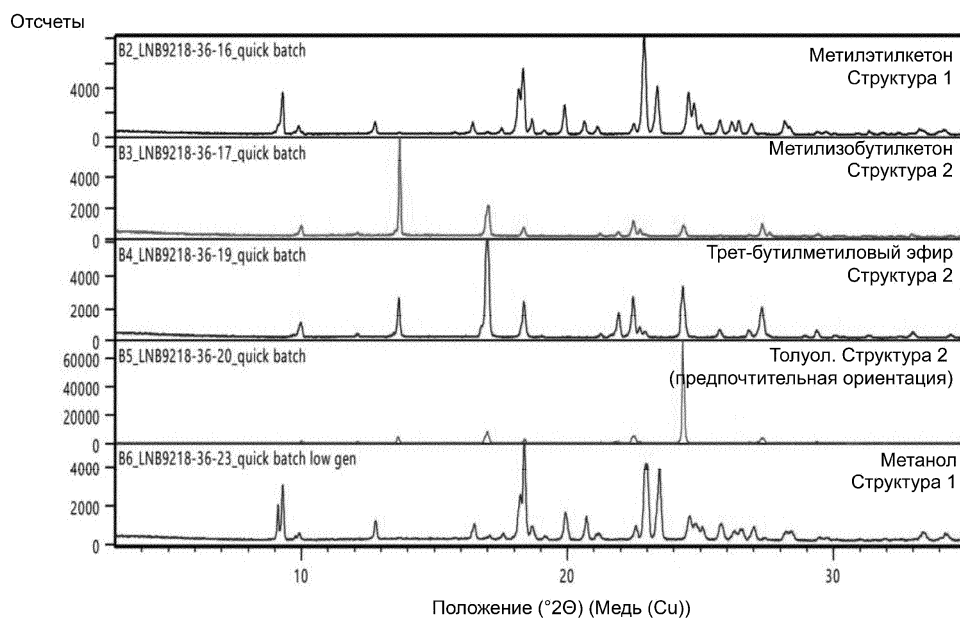
Фиг. 63



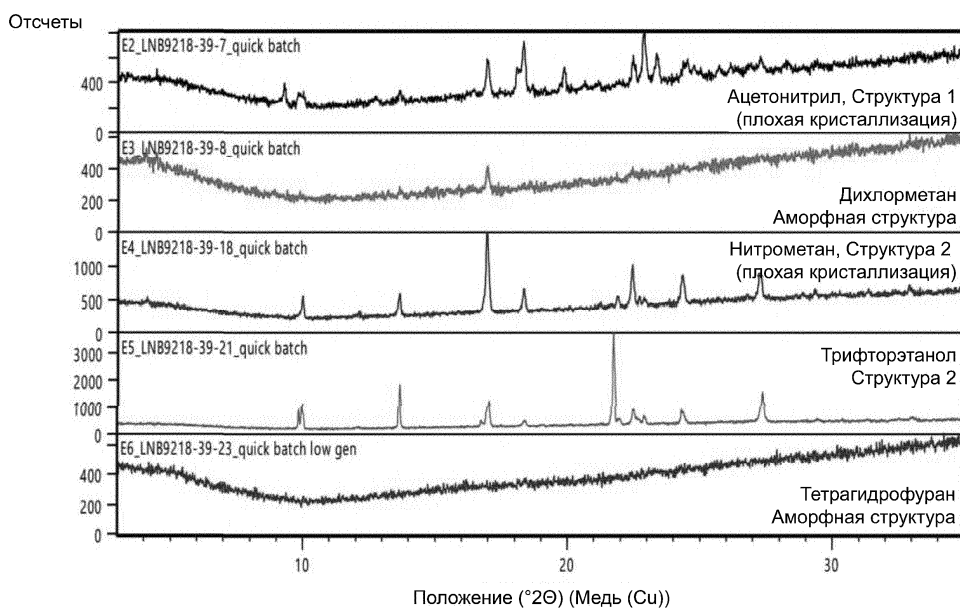
Фиг. 64



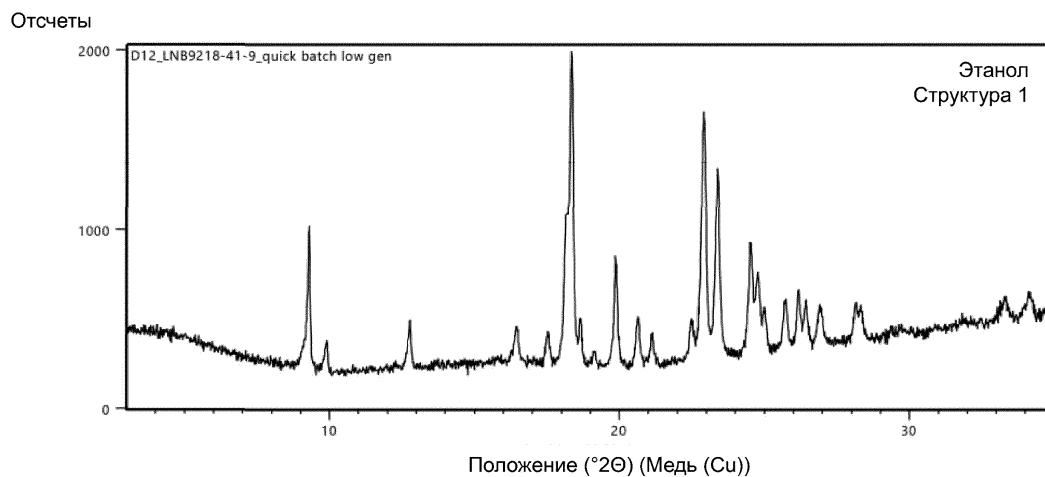
Фиг. 65



Фиг. 66

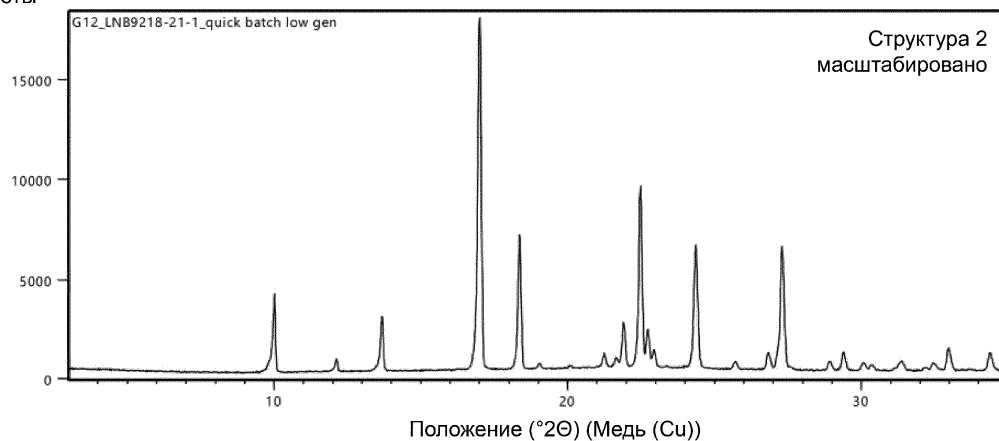


Фиг. 67



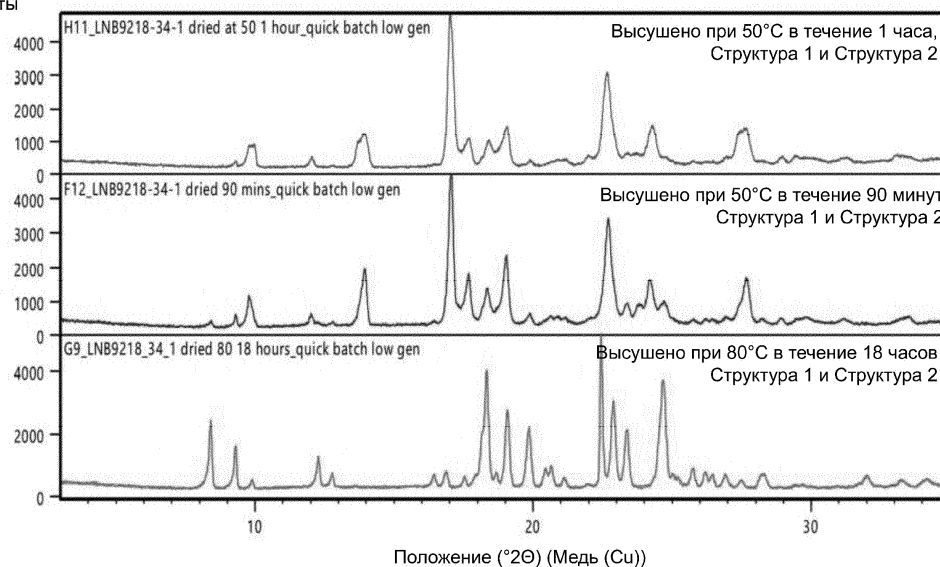
Фиг. 68

Отсчеты



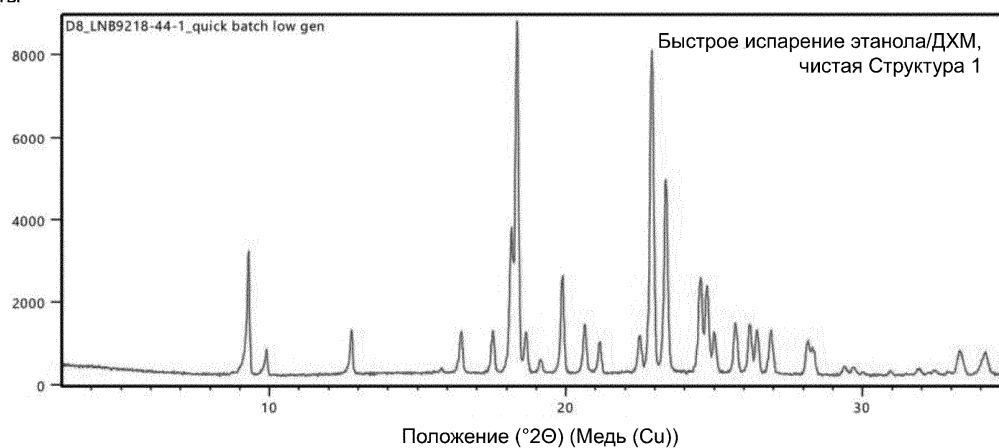
Фиг. 69

Отсчеты

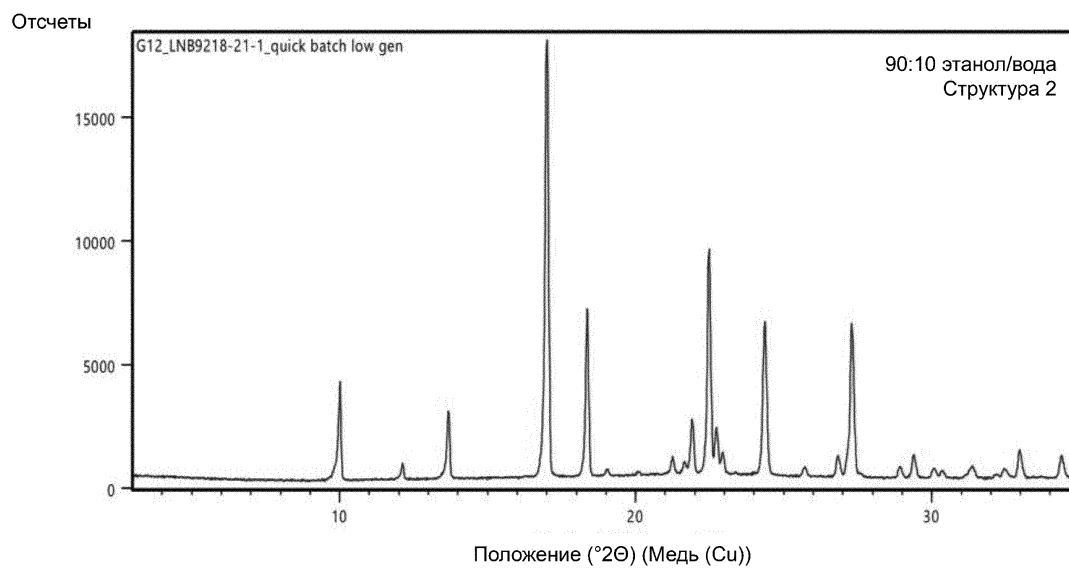


Фиг. 70

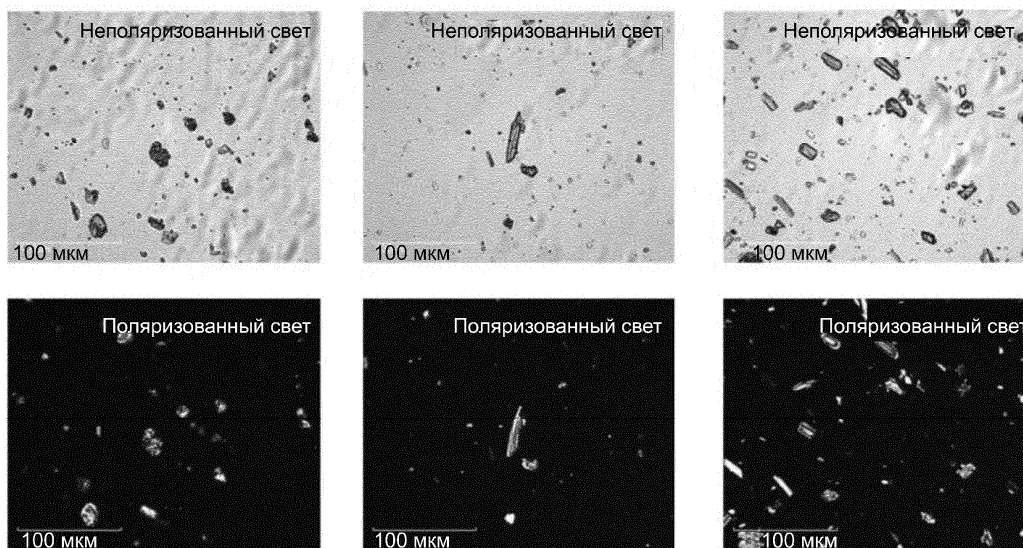
Отсчеты



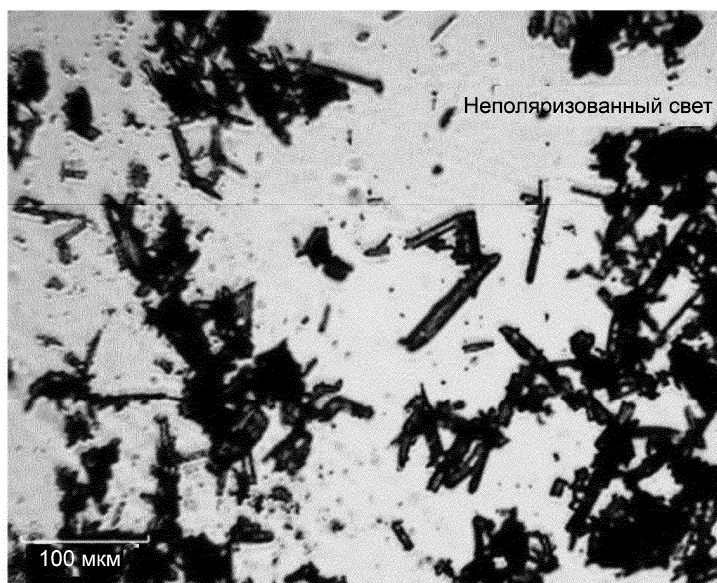
Фиг. 71



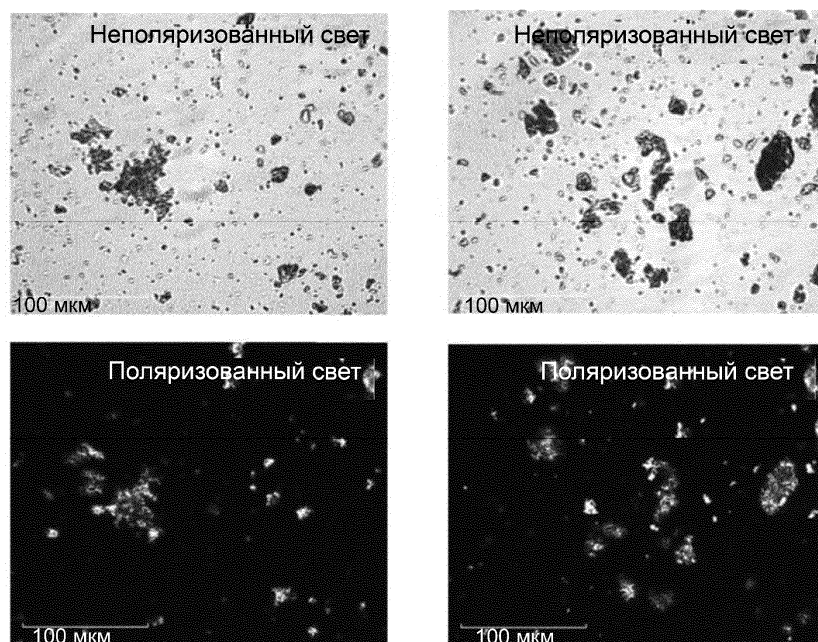
Фиг. 72



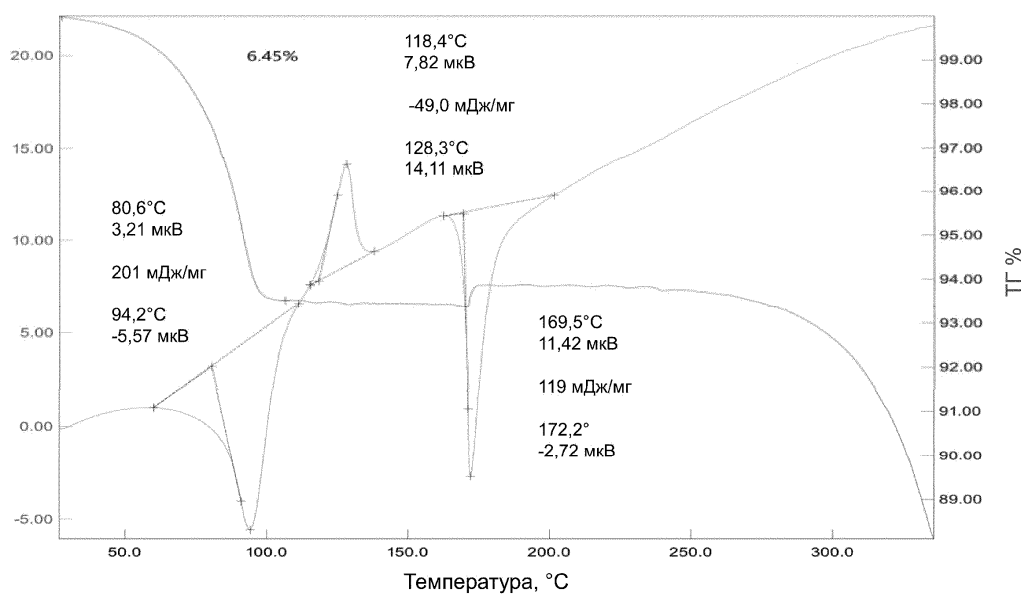
Фиг. 73



Фиг. 74

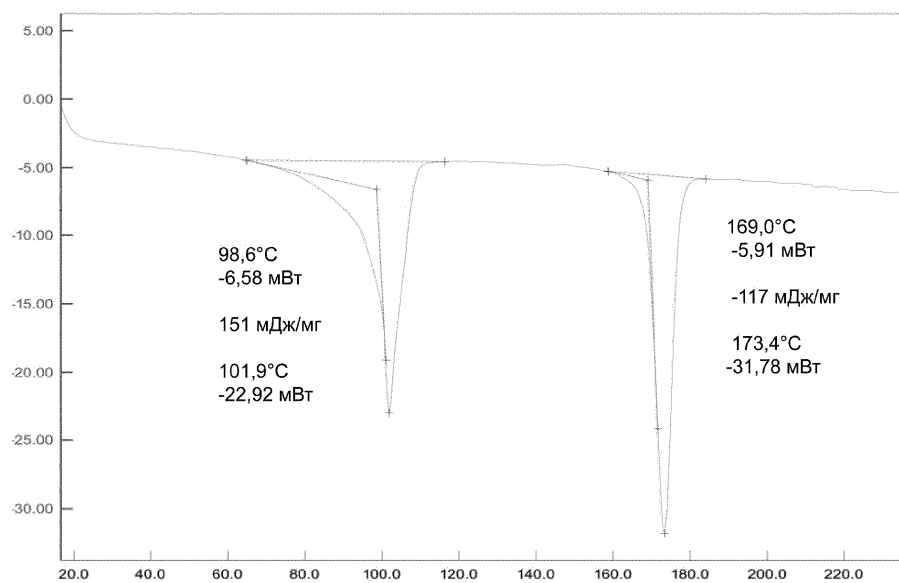


Фиг. 75



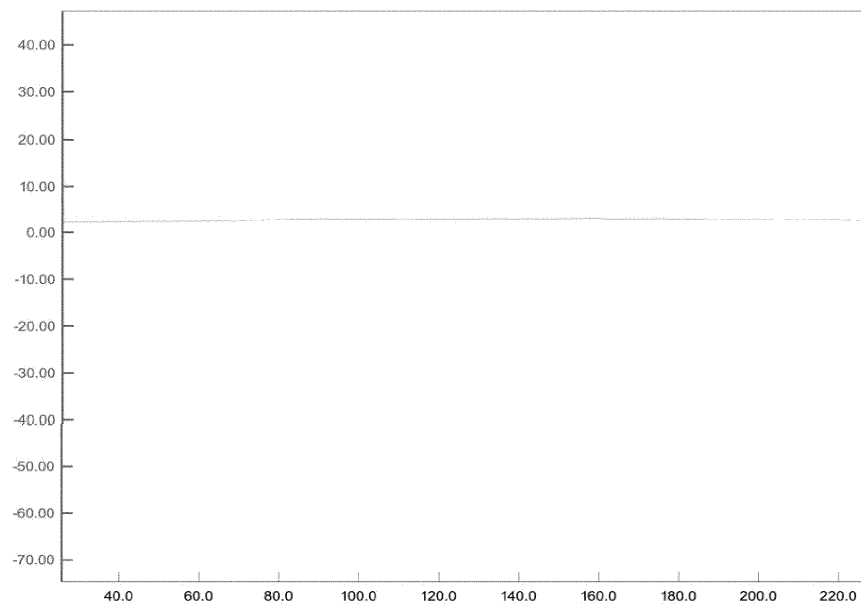
Фиг. 76

042744



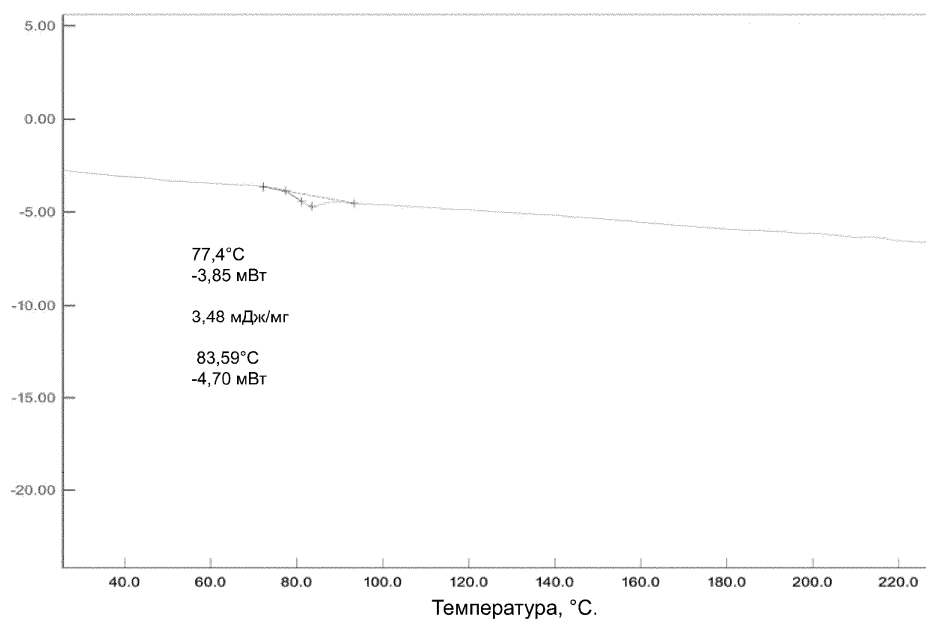
Температура, °C

Фиг. 77

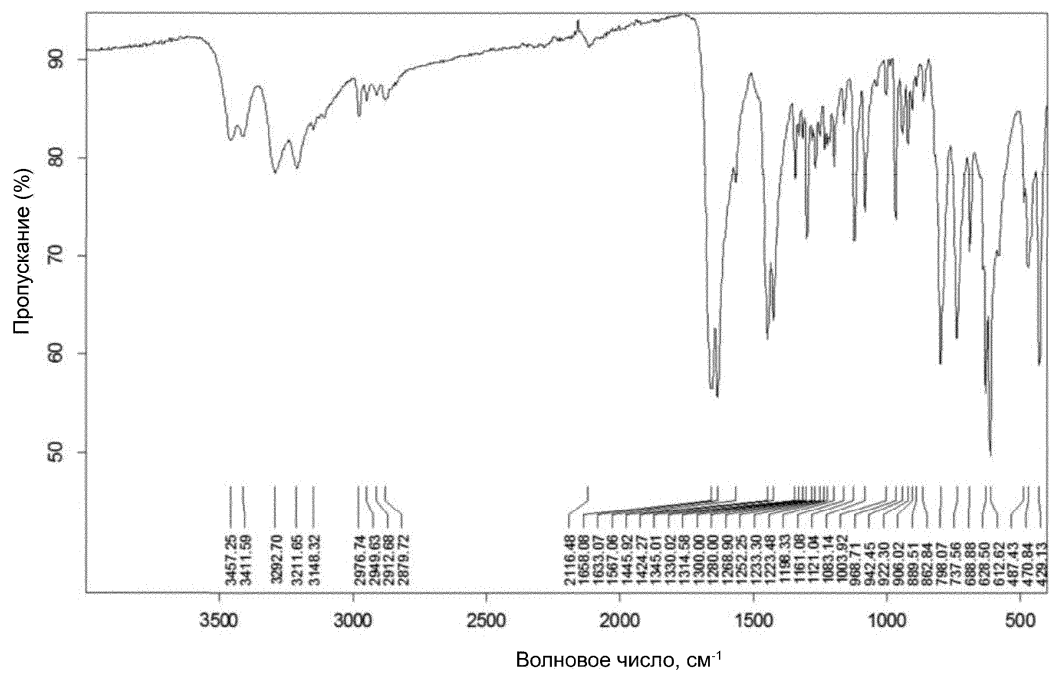


Температура, °C.

Фиг. 78

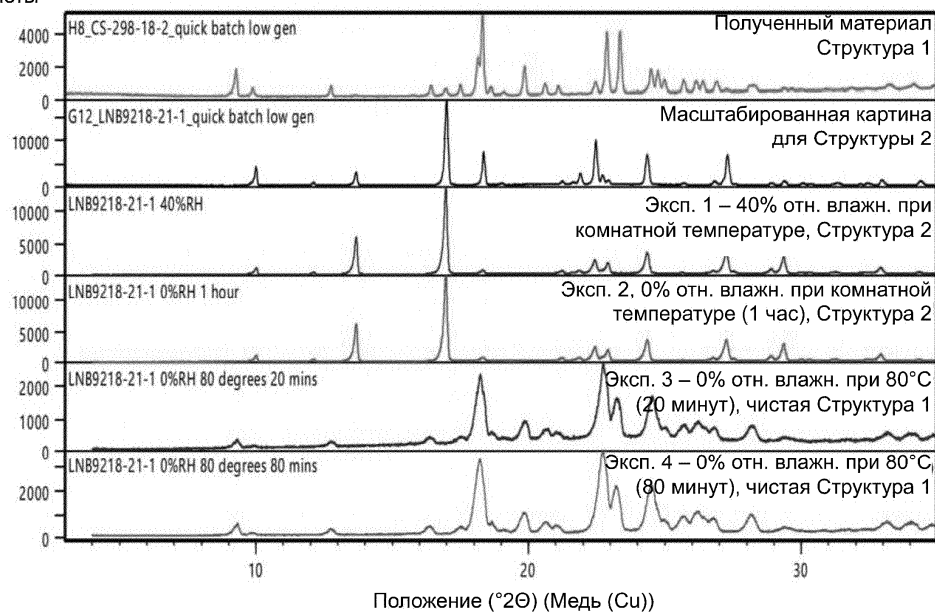


Фиг. 79

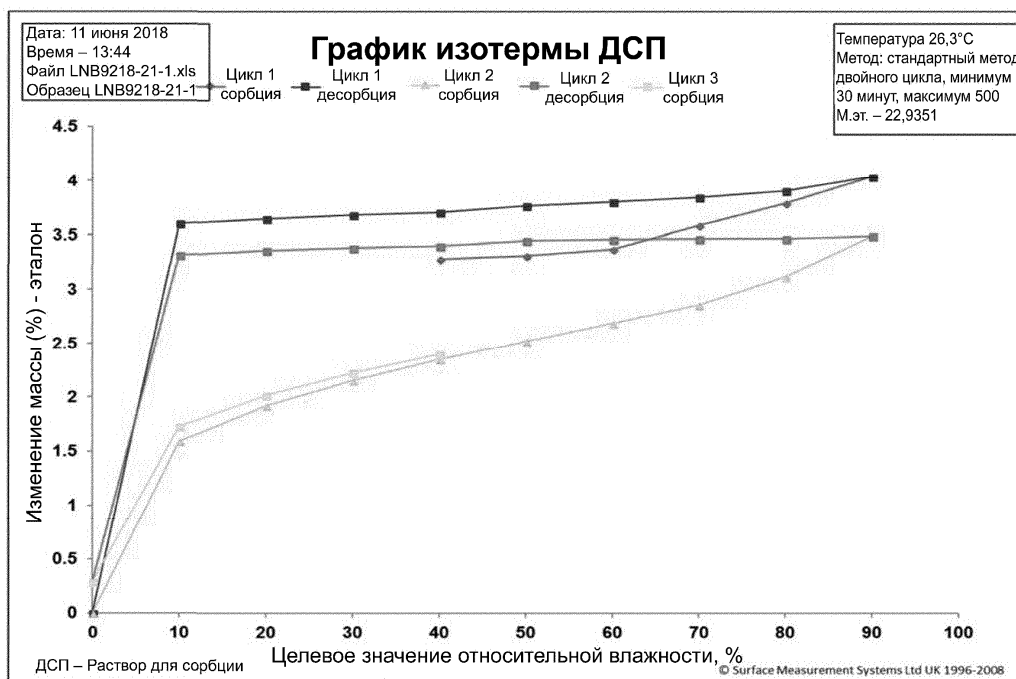


Фиг. 80

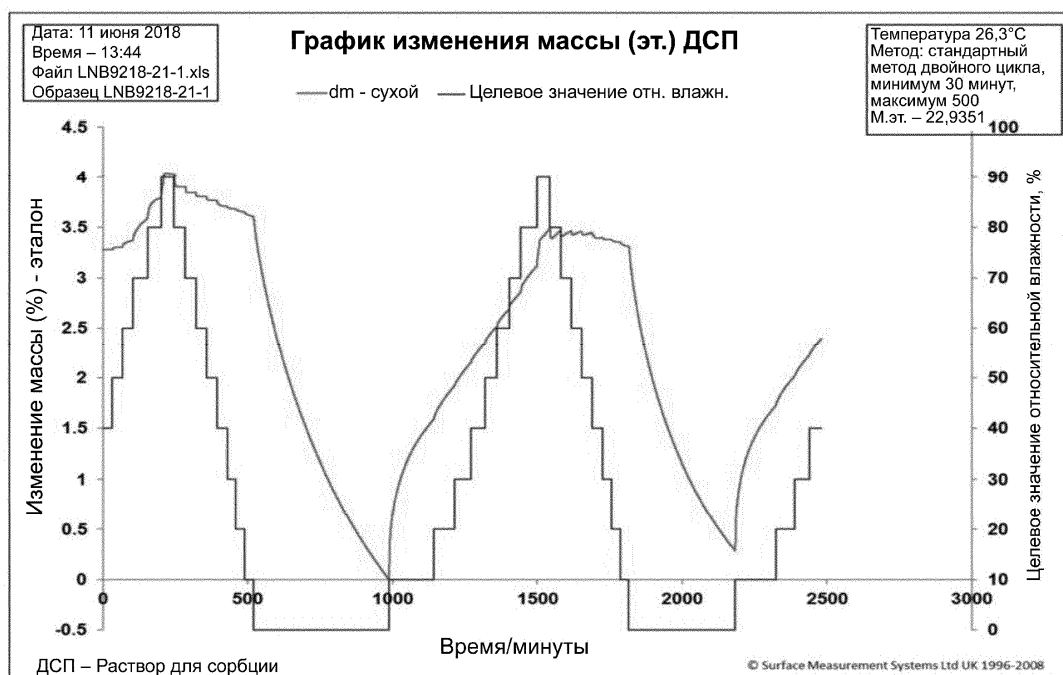
Отсчеты



Фиг. 81

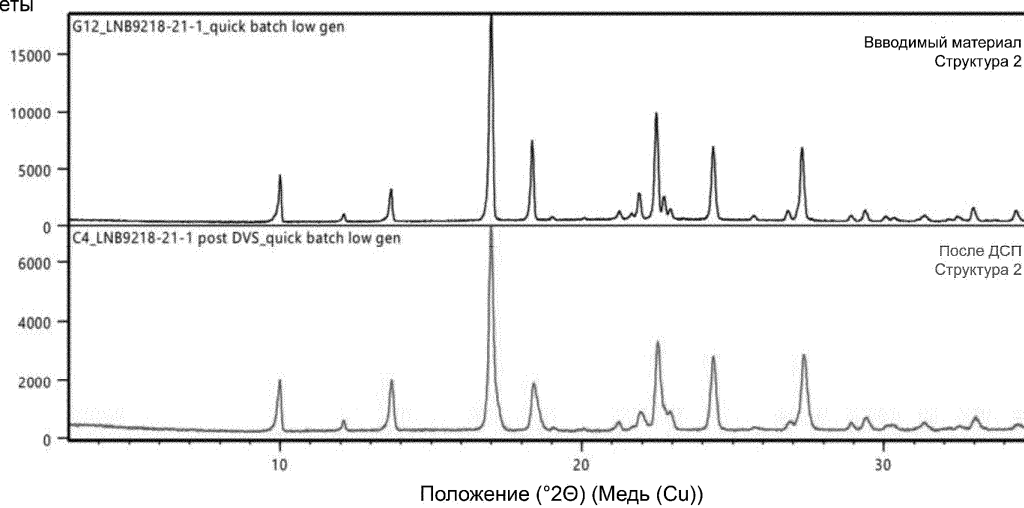


Фиг. 82

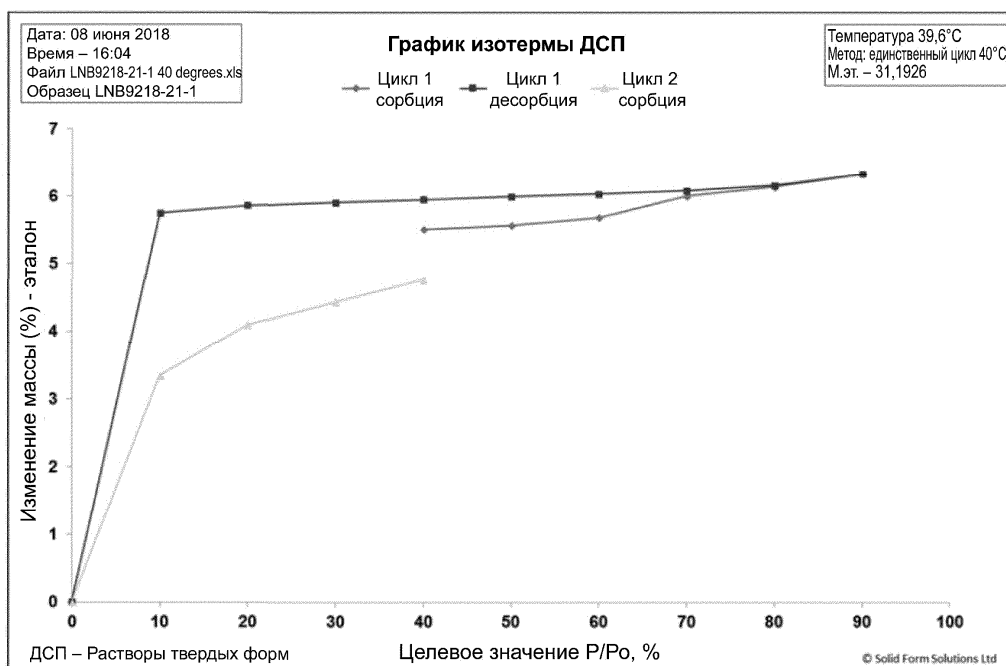


Фиг. 83

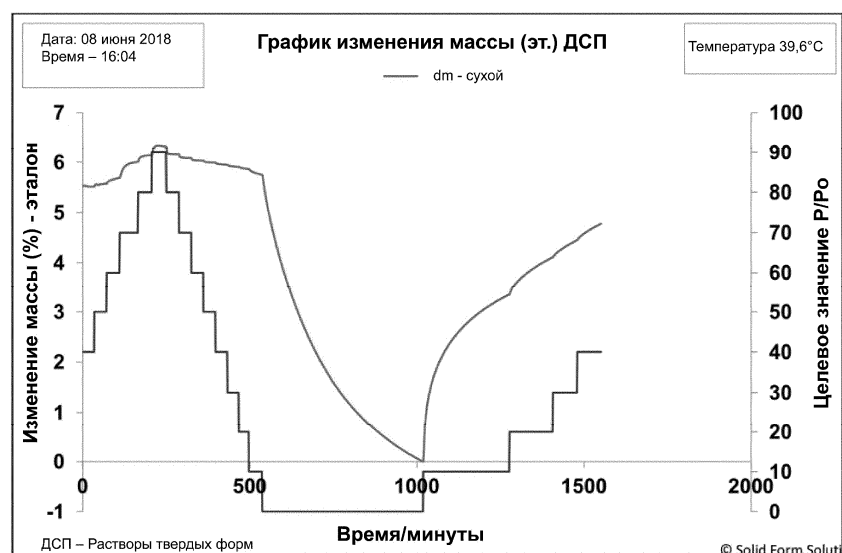
Отсчеты



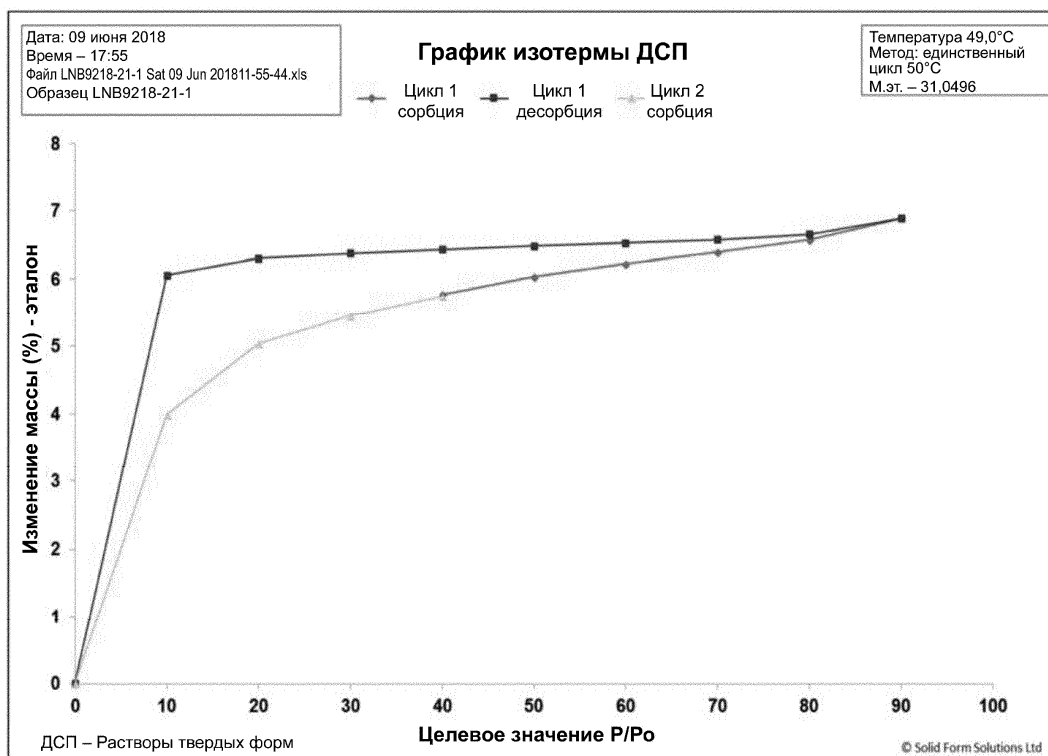
Фиг. 84



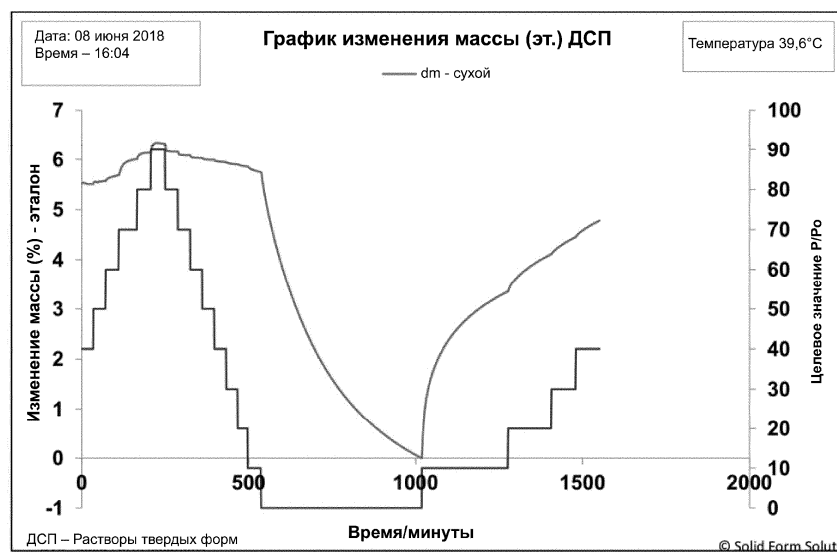
Фиг. 85



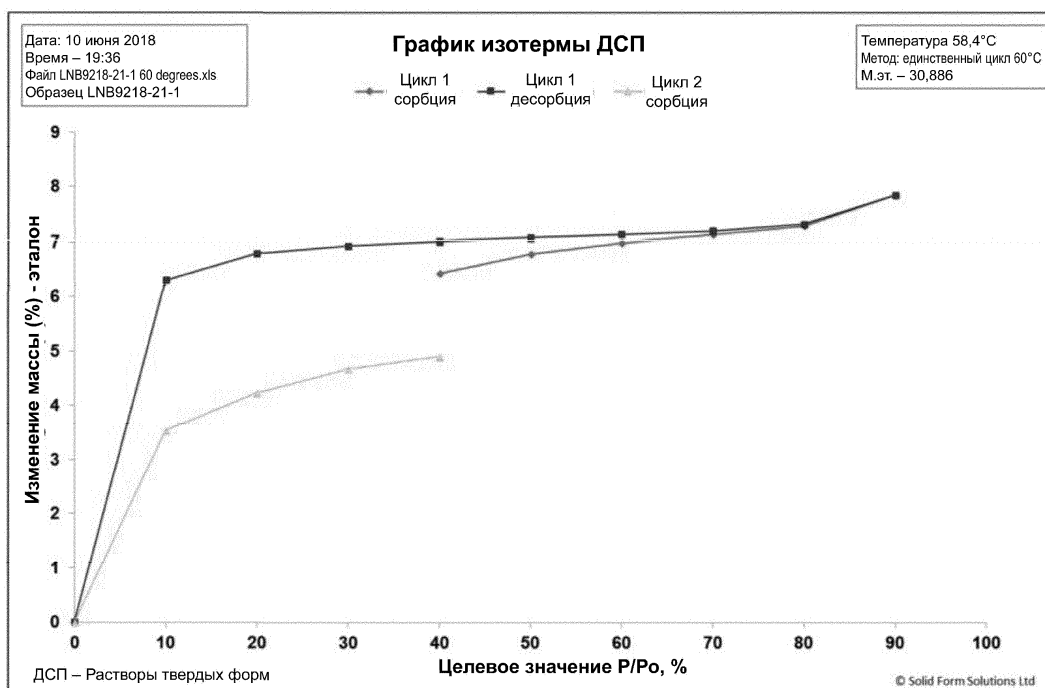
Фиг. 86



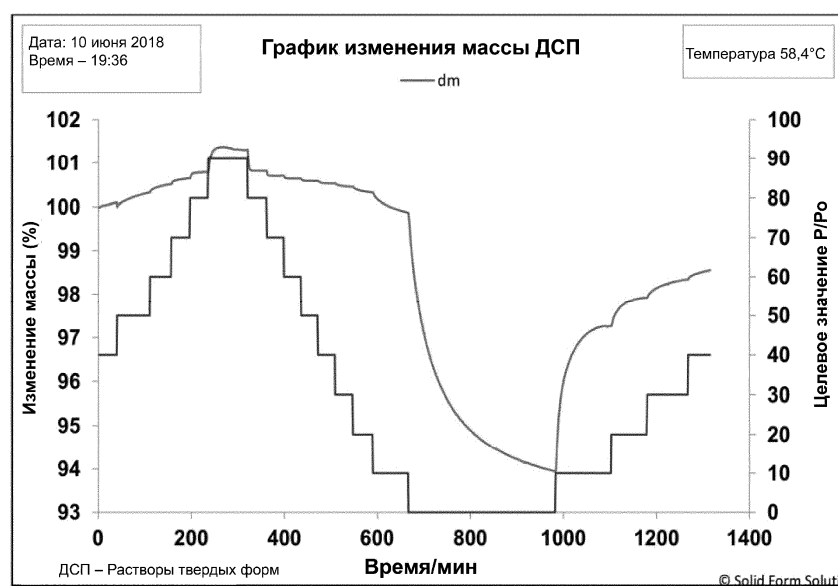
Фиг. 87



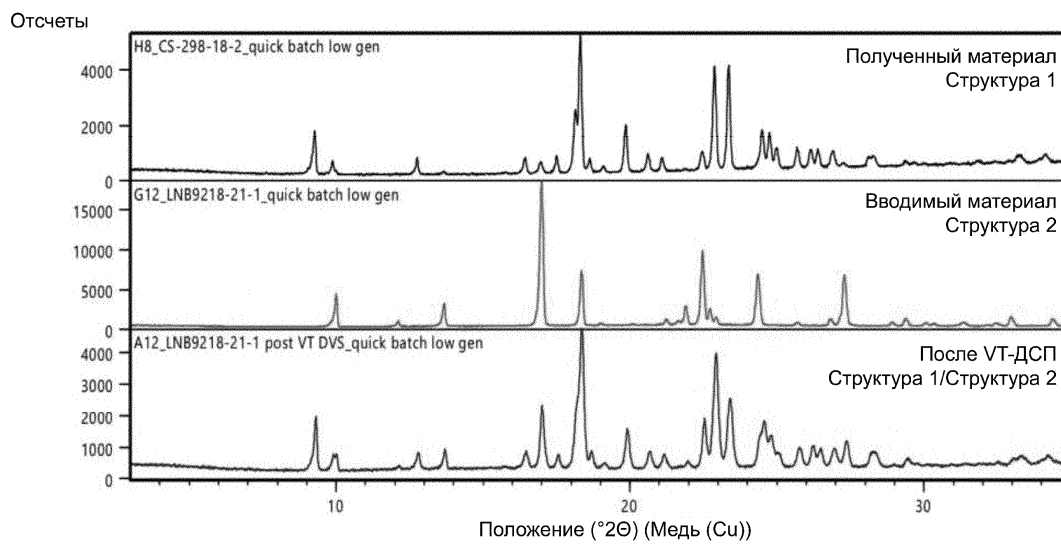
Фиг. 88



Фиг. 89



Фиг. 90



Фиг. 91

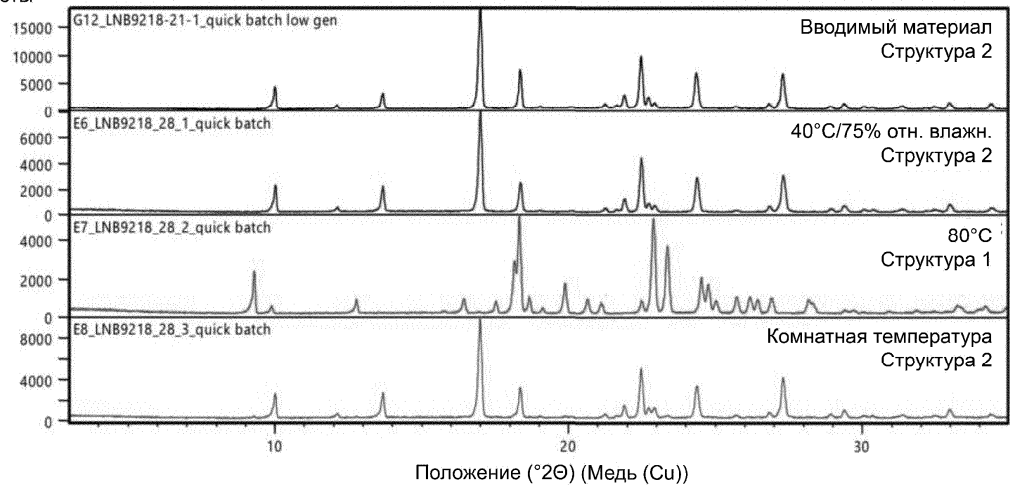


Фиг. 92

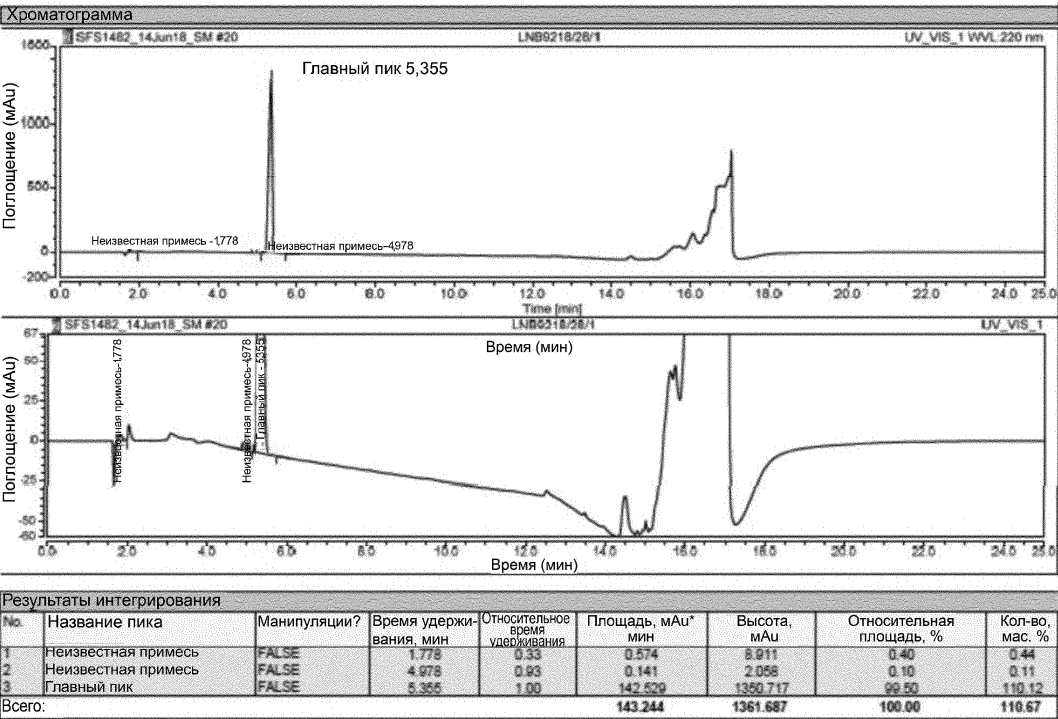


Фиг. 93

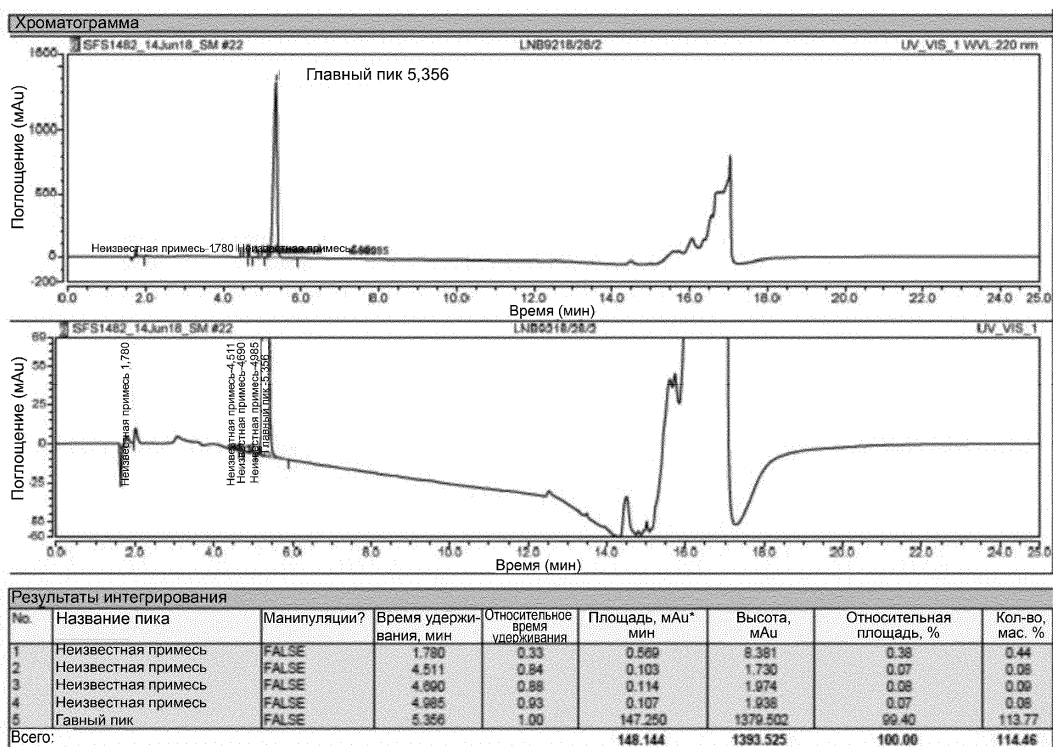
Отсчеты



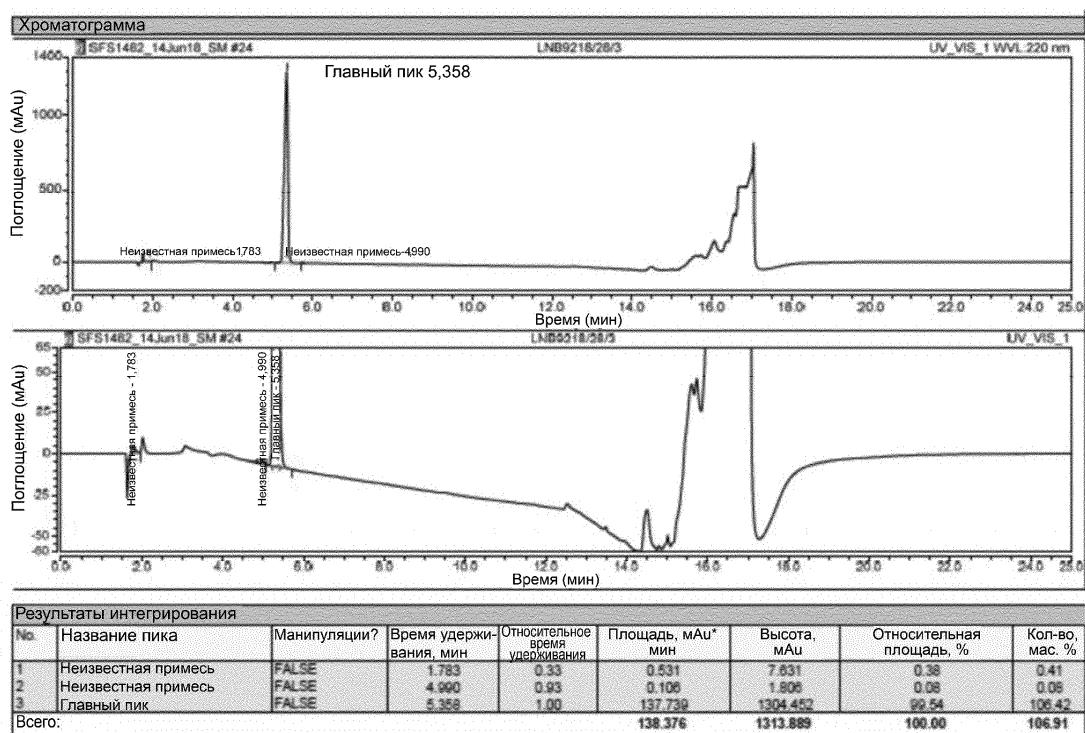
Фиг. 94



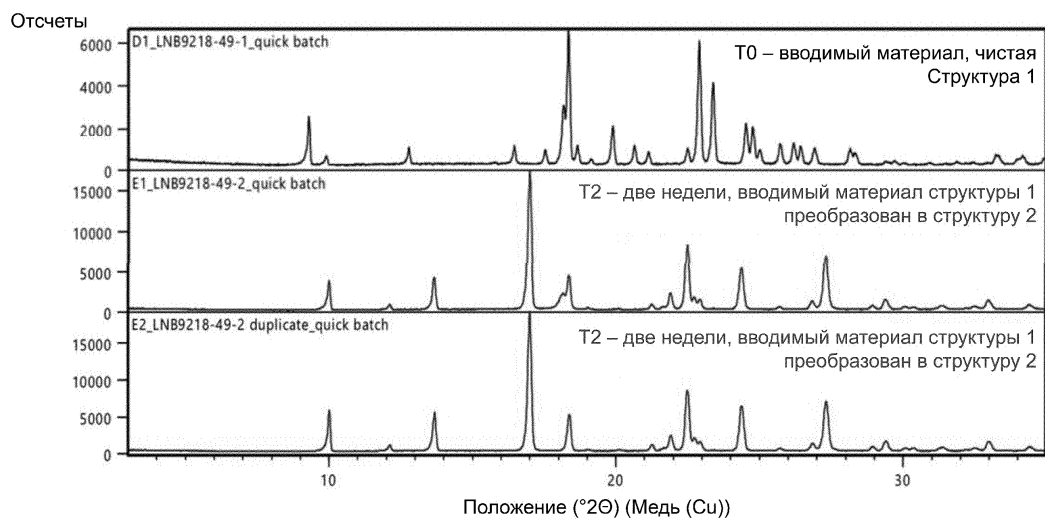
Фиг. 95



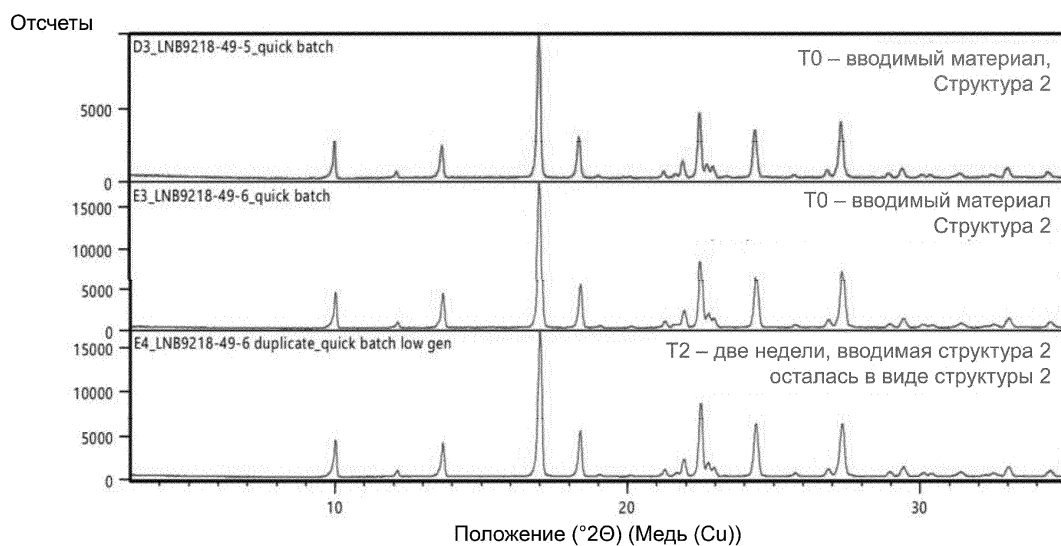
Фиг. 96



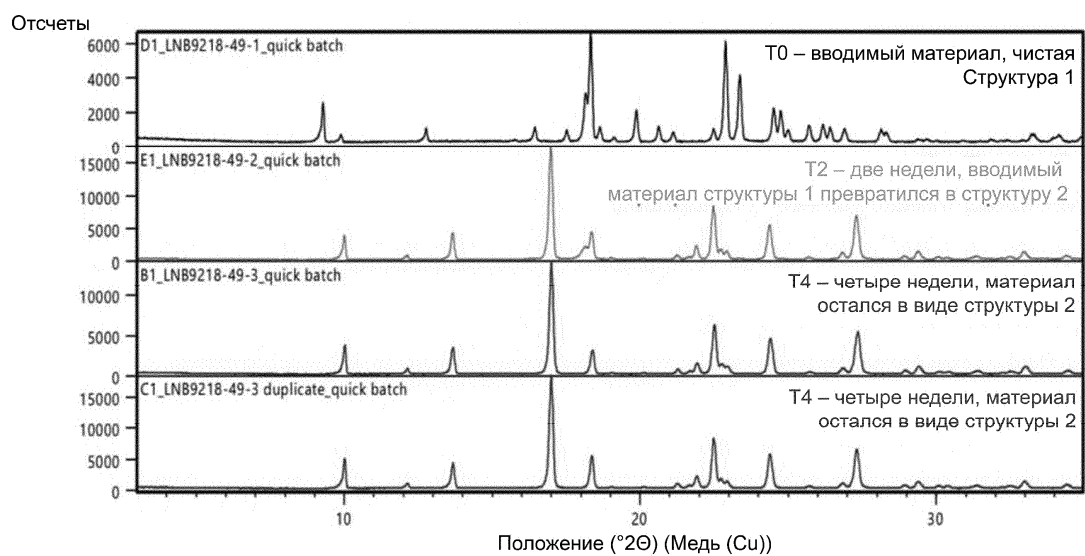
Фиг. 97



Фиг. 98

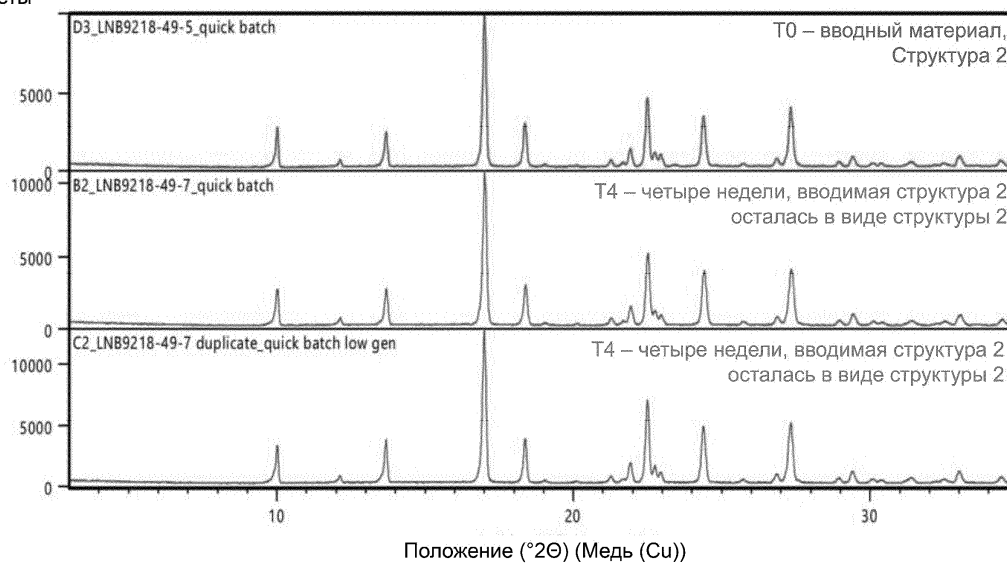


Фиг. 99



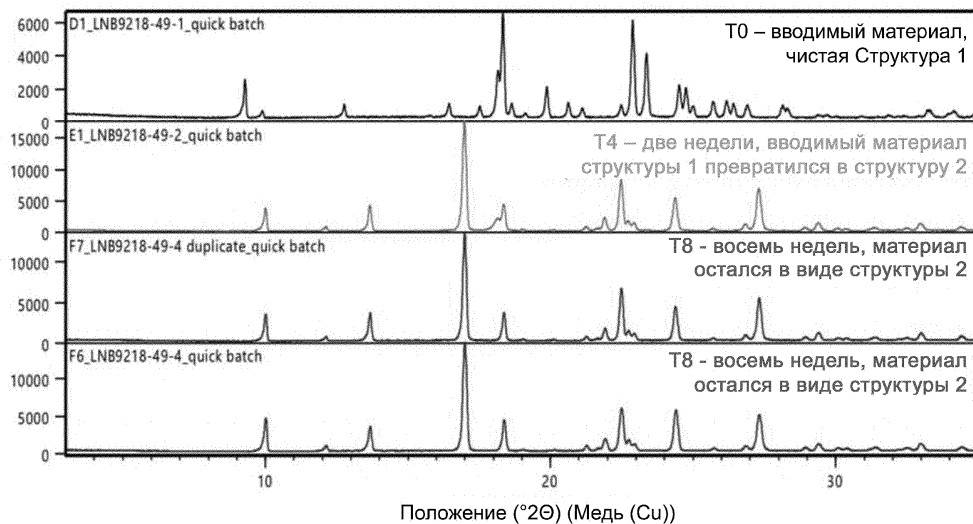
Фиг. 100

Отсчеты



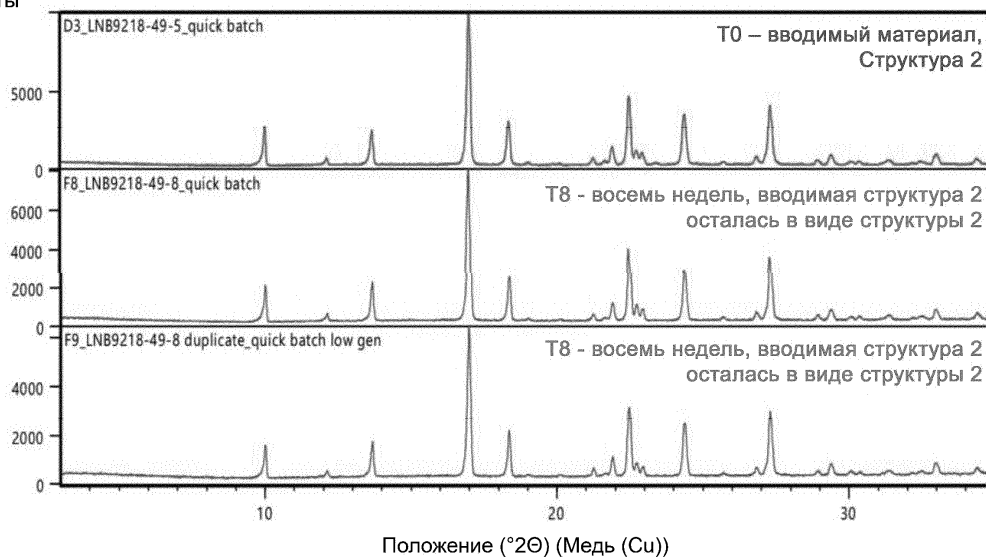
Фиг. 101

Отсчеты

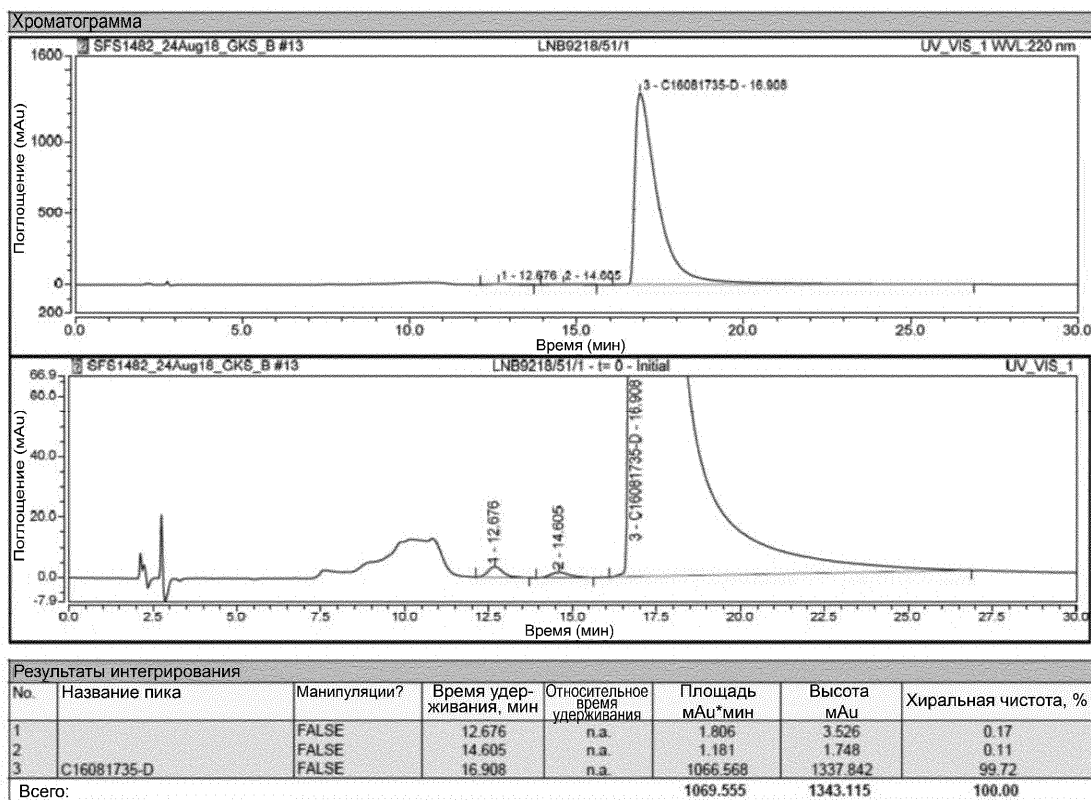


Фиг. 102

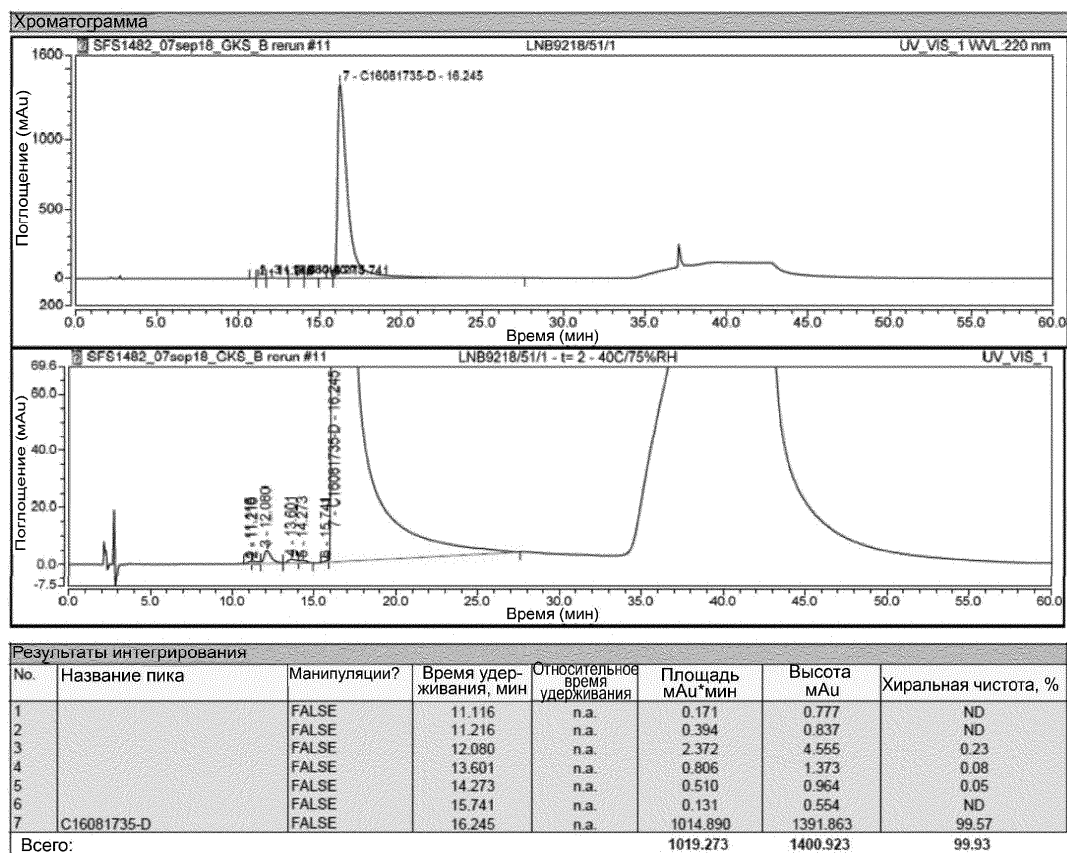
Отсчеты



Фиг. 103

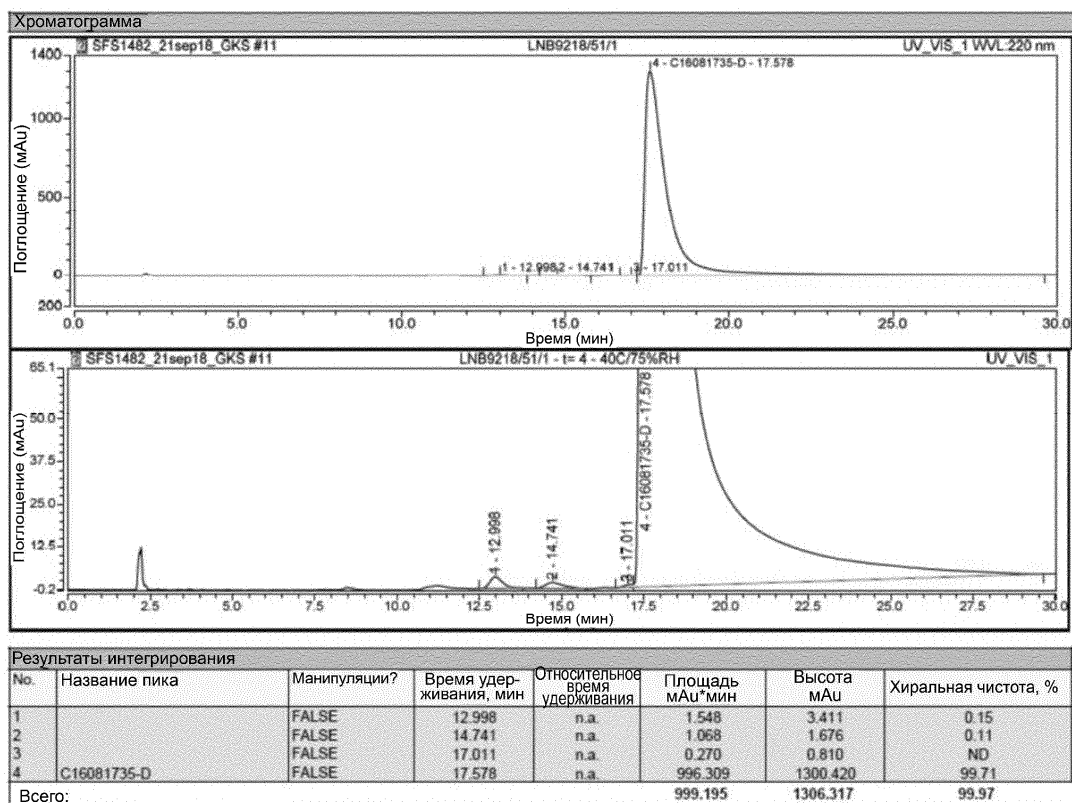


Фиг. 104

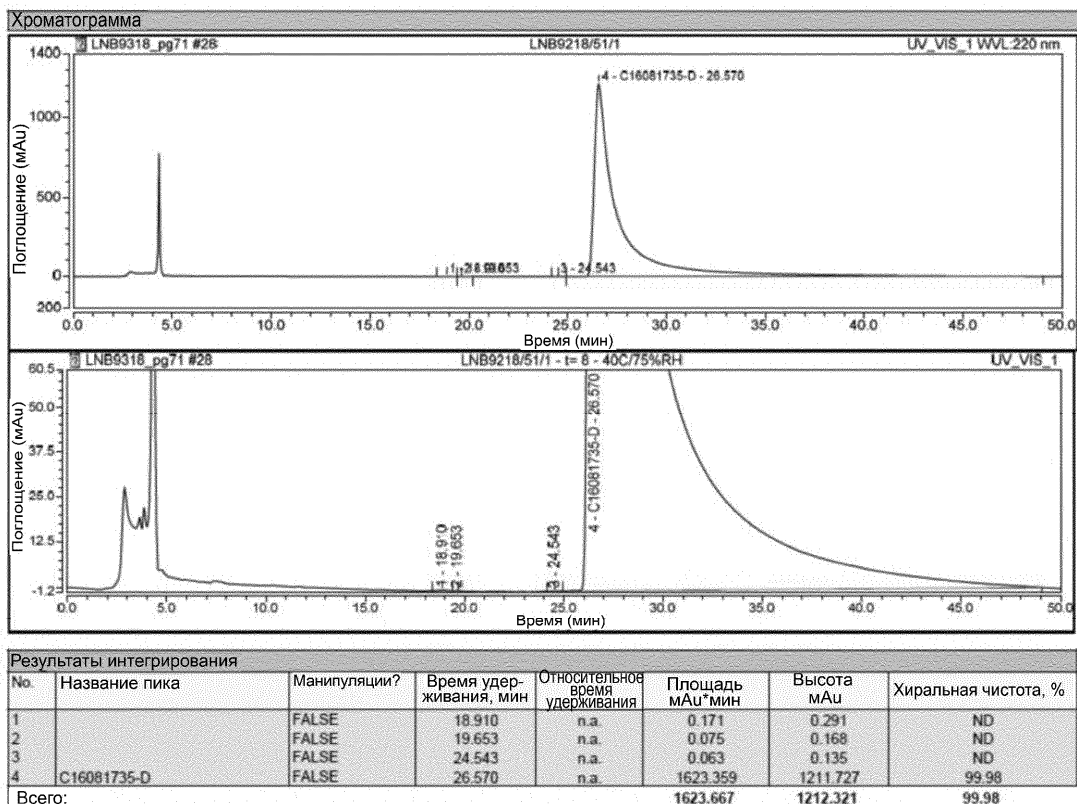


Фиг. 105

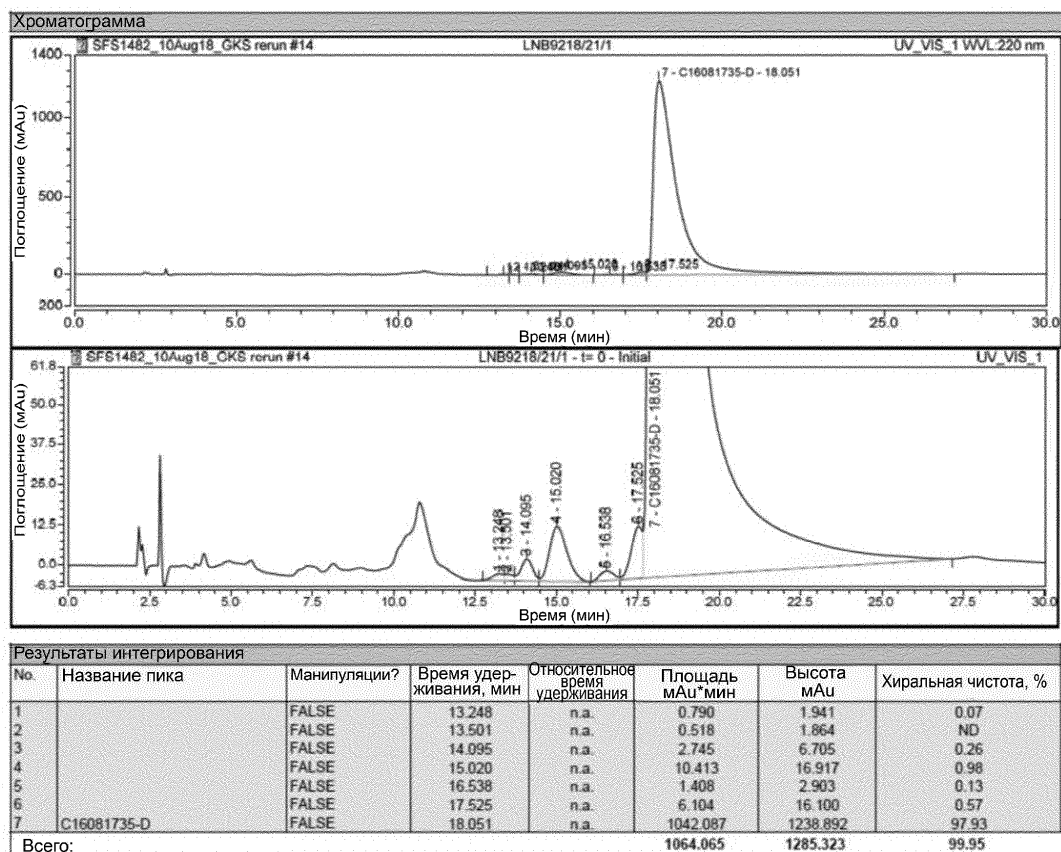
042744



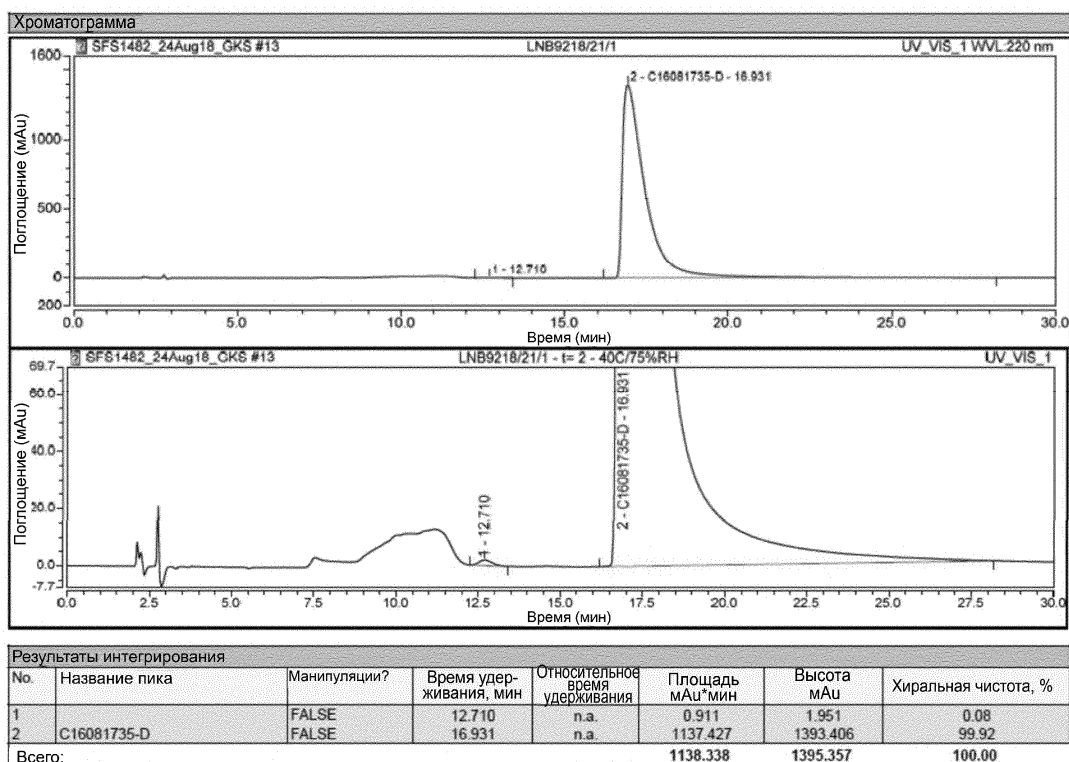
Фиг. 106



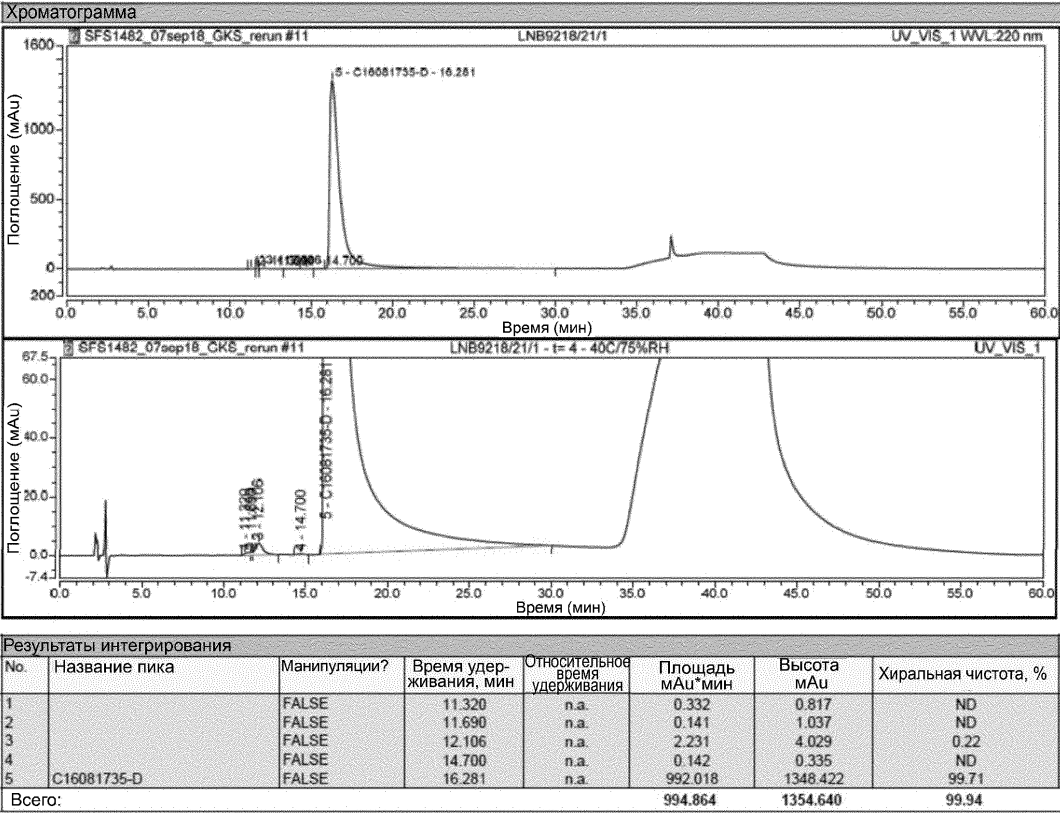
Фиг. 107



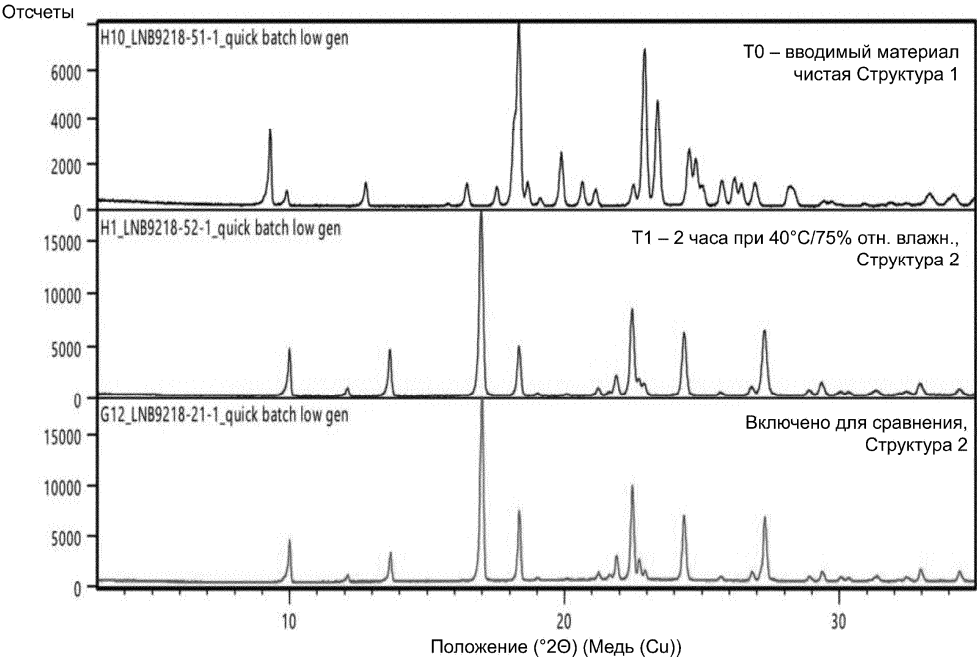
Фиг. 108



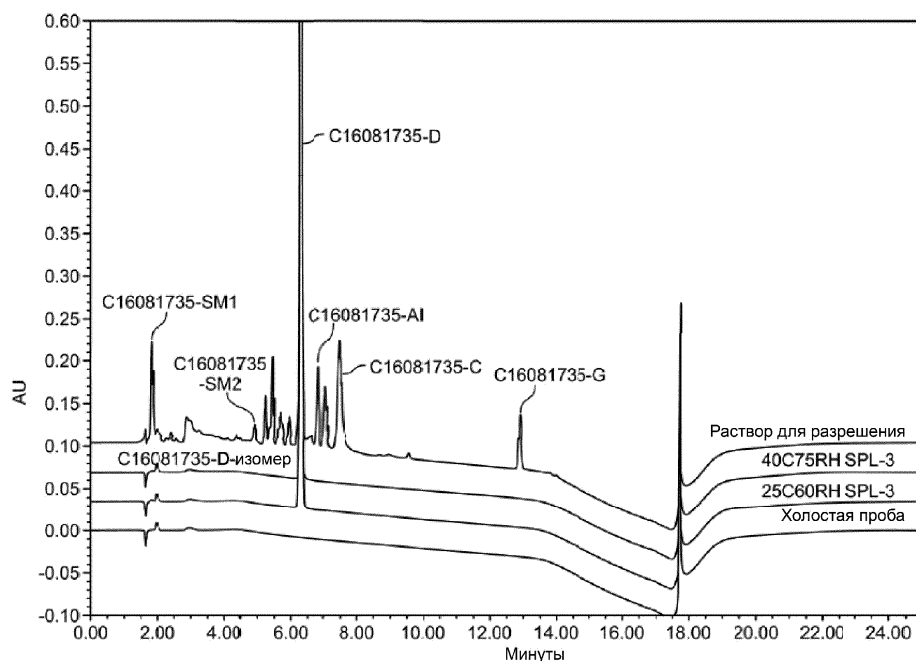
Фиг. 109



Фиг. 110



Фиг. 111



Фиг. 112

Растворитель	Структура
1-пропанол	Н/П – бесцветная пленка на стенках пробирки
2-пропанол	Н/П – бесцветная пленка на стенках пробирки
95% метанол: 5% вода (об.%)	Н/П – бесцветная пленка на стенках пробирки
50% метанол/ 50% ТБМЭ (об.%)	Н/П – нет раствора после циклирования температуры
10% метанол/ 50% ТБМЭ	Н/П – недостаточно твердого вещества
Ацетон	Н/П – масляный остаток на стенках пробирки
Ацетонитрил	Структура 1 (плохая кристалличность)
Дихлорметан	Аморфное вещество
Этанол	Н/П – недостаточно твердого вещества
50% этанол/ 50% ТБМЭ (об.%)	Н/П – недостаточно твердого вещества
10% этанол/ 90% ТБМЭ	Н/П – бесцветная пленка на стенках пробирки
Этилацетат	Н/П – бесцветная пленка на стенках пробирки
Этилформиат	Н/П – бесцветная пленка на стенках пробирки
Гептан	Н/П – бесцветная пленка на стенках пробирки
Изопропилацетат	Н/П – бесцветная пленка на стенках пробирки
Метилэтилкетон	Н/П – бесцветная пленка на стенках пробирки
Метилизобутилкетон	Н/П – недостаточно твердого вещества
Нитрометан	Структура 2 (плохая кристалличность)
Трет-бутилметилэфир	Н/П – бесцветная пленка на стенках пробирки
Толуол	Н/П – бесцветная пленка на стенках пробирки
Трифторэтанол	Структура 2
Хлорбензол	Н/П – бесцветная пленка на стенках пробирки
ТГФ	Аморфное вещество
Метанол	Н/П – нет раствора после циклирования температуры

Фиг. 113

	Чистая Структура 1	Циклирование температуры	Выпаривание	Охлаждение (2-8°C)	Охлаждение (-20°C)	Добавление антирастворителей
	Структура 1					
	Структура 2					
	Раствор					
	Недостаточно твердого вещества					
	Масло					
	Аморфное вещество					
	Бесцветная пленка/масляный остаток					
	Эксперимент не проводили					
1	Предпочтительная ориентация					
*	Плохая кристалличность					

ФИГ. 114

Вводная структура	Момент времени	Внешний вид
Чистая Структура 1	Исходный	Бледно-бежевый
Чистая Структура 1	2 недели	Бледно-бежевый
Чистая Структура 1	4 недели	Бледно-бежевый
Чистая Структура 1	8 недель	Бледно-бежевый
Структура 2	Исходный	Белый
Структура 2	2 недели	Белый
Структура 2	4 недели	Белый
Структура 2	8 недель	Белый

Фиг. 115