



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 130916

(13) C2

(51) МПК

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61P 27/16 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

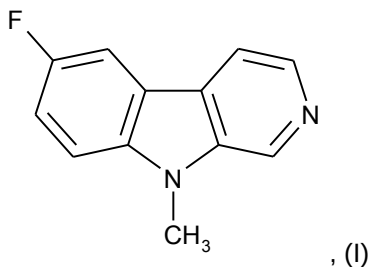
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2022 00921	(72) Винахідник(и):	Роммелшпацер Ганс (DE), Зигмунт Томас (DE), Шлінгенсіпен Раймер (DE)
(22) Дата подання заявки:	07.08.2020	(73) Володілець (володільці):	АУДІОКЬЮРЕ ФАРМА ГМБХ, Schlegelstr. 9, 10115 Berlin, Germany (DE)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	18.06.2026	(74) Представник:	Пікалов Сергій Юрійович, реєстр. №344
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	19191150.2	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2015/044434 A2, 02.04.2015
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	09.08.2019		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP		
(41) Публікація відомостей про заявку:	01.05.2024, Бюл.№ 18		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	17.06.2026, Бюл.№ 24		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2020/072328, 07.08.2020		

(54) СТАБІЛЬНА ПОЛІМОРФНА ФОРМА 6-ФТОР-9-МЕТИЛ-9Н-БЕТА-КАРБОЛІНУ ТА ЇЇ ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

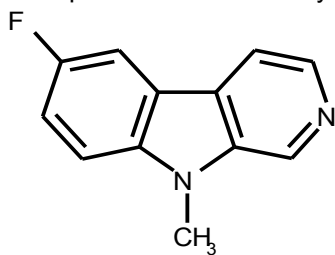
Даний винахід належить до стабільної кристалічної поліморфної форми 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну формули (I)



до способу отримання зазначеної кристалічної поліморфної форми 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну і до фармацевтичної композиції, що містить зазначену кристалічну поліморфну

UA 130916 C2

форму 6-фтор-9-метил-9H-β-карболіну. Крім того, даний винахід належить до застосування зазначеної стабільної кристалічної поліморфної форми та застосування фармацевтичної композиції, що містить вказану стабільну кристалічну поліморфну форму в лікуванні та/або профілактиці порушення слуху, запаморочення або вестибулярних порушень.



Даний винахід відноситься до стабільної кристалічної поліморфної форми 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіна формули (I), способу отримання зазначеної кристалічної поліморфної форми 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну і до фармацевтичної композиції, містить вказану кристалічну поліморфну форму 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну. Крім того, даний винахід відноситься до застосування зазначеної стабільної кристалічної поліморфної форми і застосування фармацевтичної композиції, що містить зазначену стабільну кристалічну поліморфну форму в лікуванні та/або профілактиці порушення слуху, запаморочення або вестибулярних порушень.

Рівень техніки винаходу

Поліморфізм є здатністю хімічної речовини існувати більш ніж в одній окремій кристалічній формі, що має різне розташування молекул у кристалічній решітці. Хоча поліморфи однакових сполук хімічно ідентичні, кожен поліморф має унікальні комбінації хімічних, механічних, термічних і фізичних властивостей. Відмінності у фізико-хімічних властивостях різних кристалічних форм роблять поліморфізм потенційно важливою проблемою для фармацевтичних компаній (Erdemir et al.; Curr. Opin. Drug Discov. Dev. 2007, 746-755). Труднощі та невідповідності, що зустрічаються у характеристиках та розробці продукту, можуть пояснюватись поліморфізмом, і у фармацевтичній промисловості прийнято вважати, що поліморфізм є найважливішим аспектом, який необхідно враховувати при розробці нових лікарських препаратів-кандидатів. Активні фармацевтичні інгредієнти (API) часто доставляються пацієнтам у твердому стані, оскільки тверді форми 1 забезпечують зручність, фізичну та хімічну стабільність, простоту поводження з продуктом та низькі виробничі витрати.

Оскільки кожна тверда форма має унікальні фізико-хімічні властивості, розуміння та контроль властивостей API у твердому стані надзвичайно важливі у процесі розробки лікарських засобів. Непередбачене утворення невідповідного поліморфу на стадії кристалізації може призвести до фармацевтичних лікарських форм, які або неефективні у призначеній дозі в даній формі застосування або можуть стати потенційно токсичними. З цих причин регулюючі органи вимагають, щоб фармацевтичні компанії контролювали процес кристалізації таким чином, щоб поліморф утворювався безперервно, і заохочують застосування процесно-аналітичних технологій для розробки процесу кристалізації.

Перекристалізацію з розчину можна представити як процес самоскладання, в якому випадково організовані молекули, розчинені в перенасиченому розчиннику або суміші розчинників, збираються разом, утворюючи впорядкований тривимірний молекулярний масив з періодичним повторюваним патерном. Кристалізація критично важлива для багатьох процесів, що відбуваються в природі та у виробництві широкого спектру матеріалів. Якість кристалічного продукту зазвичай визначається чотирма основними критеріями: розміром, чистотою, морфологією та структурою кристалів. Регулювання морфології кристалів має важливе значення у багатьох застосуваннях, оскільки поведінка часток може мати величезний вплив на посткристалізаційні процеси. Для розробки API критично важливо отримати специфічний поліморф, що забезпечує біодоступність та стабільність лікарського засобу кінцевої лікарської форми.

У заявці на патент Німеччини (DE 10 2007 009264 A1) описані 9-алкіл-β-карболіни, які завдяки своїм нейропротекторним властивостям можуть використовуватися для лікування та/або профілактики розладів рухової системи та/або неврологічних захворювань, таких як, наприклад, хвороба Альцгеймера чи хвороба Паркінсона.

У заявці на патент США (US 2004/038970 A1) описано використання 3-заміщених 2,3,4,9-тетрагідро-1Н-β карболінів як активних агентів для лікування різних клінічних патологій, включаючи шум у вухах. Однак картина заміщення даної групи β-карболінів значно відрізняється за структурою від картини заміщення 6-фтор-9-метил-β-карболіну.

У міжнародній патентній заявці (WO 2011/079841 A1) описані β-карболіни, переважно 9-алкіл-β-карболіни, спосіб їх одержання та фармацевтична композиція, що містить зазначені β-карболіни. Крім того, дана заявка РСТ відноситься до застосування зазначених β-карболінів для профілактики та лікування втрати слуху, шуму у вухах, звукових шоків, запаморочення та порушень рівноваги.

У міжнародній патентній заявці (WO 2015/044434 A2) описані фтор-9-метил-β-карболіни, включаючи 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболін, спосіб його отримання та фармацевтичні композиції, що містять фтор-9-метил-β-карболіни. Крім того, в даній заявці РСТ розкривається медичне застосування фтор-9-метил-β-карболінів для лікування гострих та хронічних захворювань вуха та порушень слуху, запаморочення та порушень рівноваги.

З іншого боку, міжнародна заявка на патент (WO 2015/044434 A2) описує 6-фтор-9-метил-β-карболін і не описує жодної його кристалічної або поліморфної форми.

Завданням цього винаходу є запропонувати стабільну кристалічну поліморфну форму 6-фтор-9-метил- β -карболіну, особливо як активний інгредієнт для приготування фармацевтичних композицій, і запропонувати такі стабільні фармацевтичні композиції, що містять зазначену стабільну кристалічну поліморфну форму 6-фтор-9-метил- β -карболіну, а також її застосування та спосіб отримання цієї стабільної поліморфної форми.

Це завдання цього винаходу вирішується за допомогою ідей, викладених у незалежних пунктах формули винаходу. Інші переважні ознаки, аспекти та деталі винаходу стануть очевидними із залежних пунктів формули винаходу, опису, креслень та прикладів цієї заявки.

Сутність винаходу

У цьому винаході спочатку наводяться кілька специфічних кристалічних поліморфних форм 6-фтор-9-метил- β -карболіну, також званого тут 6-FMC, а також розкрито їх технічні ознаки. Однак, несподівано було встановлено, що тільки одна з цих специфічних кристалічних поліморфних форм є досить стабільною і, отже, придатною для одержання фармацевтичних композицій. Всі інші поліморфні форми не можуть використовуватися для фармацевтичних композицій через їхню нестабільність.

З'єднання 6-фтор-9-метил- β -карболіну (6-FMC) існує щонайменше в чотирьох поліморфних формах, позначених як поліморф А, В, С і Т. На практиці 6-FMC застосовують у вигляді суспензії для досягнення терапевтичних концентрацій у тканині-мішені. Критично важливо отримати специфічний поліморф, що забезпечує біодоступність та стабільність лікарського засобу у кінцевій лікарській формі. У зв'язку з цим охарактеризовані хімічні, механічні, термічні та фізичні властивості кожного поліморфу як у порошковій формі, так і у складі композиції. Знайдено помітні різниці між поліморфами. Розрізняються температури плавлення, і при перекристалізації утворюються орторомбічні форми для поліморфу А і моноклінні форми у разі поліморфу В. Чітко розрізняються спектри рентгенівської порошкової дифрактометрії, а також спектри тТЯМР та інфрачервоної спектроскопії. Поліморфи С і Т важко виділити в чистому вигляді через їхнє швидке розкладання, тому чисті спектри цих поліморфів складно отримати. Дослідження стабільності поліморфів показали, що поліморфні форми А, С і Т не підходять для виготовлення фармацевтичної композиції, при цьому поліморф А не є стабільним, але може бути перетворений на поліморф В в умовах, описаних у цьому документі.

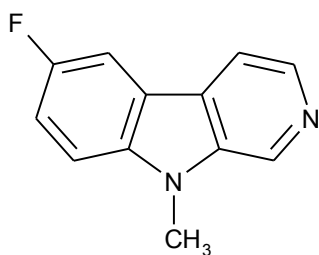
Несподівано було виявлено, що поліморфна форма В є єдиним поліморфом, який є досить стабільним і підходить для отримання фармацевтичної композиції, що містить частинки кристалічного 6-фтор-9-метил- β -карболіну поліморфної форми В. Поліморфні форми А, С і Т навіть недостатньо стабільні в нормальних умовах зберігання фармацевтичних композицій при кімнатній температурі, тому поліморфні форми А, С і Т 6-фтор-9-метил- β -карболіну не можна використовувати як кристалічний активний інгредієнт у фармацевтичних композиціях для лікування захворювань внутрішнього вуха. Такі фармацевтичні композиції переважно являють собою ліпосомні композиції, мазі, суспензії, гелі та емульсії, в яких поліморфна форма 6-фтор-9-метил- β -карболіну присутня в кристалічній формі або мікронізованій формі, переважно у вигляді мікрочастинок або наночастинок.

Відповідно, було проведено кілька випробувань на стабільність поліморфної форми В 6-фтор-9-метил- β -карболіну, і в цій заявці доведено, що поліморф В є дуже стабільною і ідеальною формою для бажаних фармацевтичних композицій. Тільки в жорстких умовах, як описано в цьому документі, поліморф В може бути перетворений на поліморф А. Перетворення поліморфу В на поліморф А може бути досягнуто за допомогою екстракції надкритичним діоксидом вуглецю, а також за допомогою вакуумної сублімації, тоді як мимовільне перетворення поліморфу А в В відбувається в композиції відразу ж після змішування. Протилежний процес ніколи не спостерігався. Крім того, третій поліморф С і четвертий поліморф Т розкладаються навіть під час виготовлення фармацевтичної композиції. Будь-яке перетворення поліморфу В на поліморф С або поліморф Т не може бути виявлено навіть у таких екстремальних умовах, як вплив надкритичного діоксиду вуглецю, вакуумна сублімація або екстремальне нагрівання.

Таким чином, дана заявка відноситься до поліморфної форми В 6-фтор-9-метил- β -карболіну як єдиної стійкої поліморфної форми 6-фтор-9-метил- β -карболіну, яка підходить для отримання фармацевтичних композицій, описаних у цьому документі.

Опис винаходу

Відповідно, даний винахід відноситься до кристалічної поліморфної форми 6-фтор-9-метил-9Н- β -карболіну формули (I)



(I)

де кристалічна поліморфна форма 6-фтор-9-метил-9H-β-карболіну (названа тут поліморфом В або поліморфною формою В) має порошкову рентгендифрактограму, що містить піки при значеннях кута 2-тета 11,3, 17,1, 17,6, 18,0, 22,5, 23,2, та 29,4 градусів з відхиленням $\pm 0,2$ градуси.

Переважно, дана кристалічна поліморфна форма В 6-фтор-9-метил-9H-β-карболіну має порошкову рентгендифрактограму, що містить піки при значеннях кута 2-тета 11,3, 14,1, 17,1, 17,6, 18, 0, 19,0, 20,3, 20,6, 22,5, 23,2, 24,3, 25,8, та 29,4 градусів з відхиленням $\pm 0,2$ градуси. Точніше, кожне зазначене значення має відхилення $\pm 0,2$ градуси і може бути записане таким чином: 11,3 $\pm 0,2$ градуси, 14,1 $\pm 0,2$ градуси, 17,1 $\pm 0,2$ градуси, 17,6 $\pm 0,2$ градуси, 18,0 $\pm 0,2$ градуси, 19,0 $\pm 0,2$ градуси, 20,3 $\pm 0,2$ градуси, 20,6 $\pm 0,2$ градуси, 22,5 $\pm 0,2$ градуси, 23,2 $\pm 0,2$ градуси, 24,3 $\pm 0,2$ градуси, 25,8 $\pm 0,2$ градуси та 29,4 $\pm 0,2$ градуси. Переважно відхилення становить лише $\pm 0,15$ градуси і більш переважно лише $\pm 0,1$ градуси.

В одному варіанті здійснення кристалічна поліморфна форма 6-фтор-9-метил-9H-β-карболіну (поліморф В) знаходиться в моноклінній формі, що має просторову групу $p2_1/c$, де одна молекула 6-фтор-9-метил-9H-β-карболіну знаходиться в асиметричному елементарному осередку, що має параметри елементарного осередку $a=3,85\pm 0,1$ Å, $b=17,32\pm 0,1$ Å, $c=13,77\pm 0,1$ Å, $\alpha=90\pm 3^\circ$, $\beta=91\pm 3^\circ$ та $\gamma=90\pm 3^\circ$.

В одному варіанті здійснення твердотільний спектр ^{13}C -ЯМР зазначеної кристалічної поліморфної форми (поліморфу В) 6-фтор-9-метил-9H-β-карболіну містить піки при 28,6, 107,3, 110,2, 111,6, 112,8, 116,6, 121,5, 126,2, 138,0, 155,5, 156,1, 156,7, 157,1, 157,2, 157,7, 158,1 та 158,4 м.д. з відхиленням ± 1 м.д., як показано на фіг.8В. Відповідно, містить піки при 28,6 ± 1 м.д., 107,3 ± 1 м.д., 110,2 ± 1 м.д., 111,6 ± 1 м.д., 112,8 ± 1 м.д., 116,6 ± 1 м.д., 121,5 ± 1 м.д., 126,2 ± 1 м.д., 138,0 ± 1 м.д., 155,5 ± 1 м.д., 156,1 ± 1 м.д., 156,7 ± 1 м.д., 157,1 ± 1 м.д., 157,2 ± 1 м.д., 157,7 ± 1 м.д., 158,1 ± 1 м.д., та 158,4 ± 1 м.д. Переважно відхилення становить лише $\pm 0,5$ м.д. і більш переважно лише $\pm 0,2$ м.д.

В одному варіанті здійснення кристалічна поліморфна форма В 6-фтор-9-метил-9H-β-карболіну відповідно до винаходу має температуру плавлення 123 ± 1 °C.

Більш переважно, ІЧ-спектр зазначеної кристалічної поліморфної форми В 6-фтор-9-метил-9H-β-карболіну містить піки при 803,27, 819,54, 852,30, 864,13, 893,22, 1024,99, 1126,71, 1148,77, 1183,98, 1272,31, 1283,82, 1333,10, 1362,06, 1426,98, 1448,53, 1481,82, 1951 з відхиленням ± 5 см $^{-1}$. Переважно відхилення становить лише ± 4 см $^{-1}$ і більш переважно лише ± 3 см $^{-1}$.

Найбільш переважно, ІЧ-спектр зазначеної кристалічної поліморфної форми містить піки при 426,62, 524,31, 558,12, 604,22, 636,09, 704,73, 729,05, 742,59, 803,27, 819,54, 852,30, 864,13, 893,22, 1024,99, 1126,71, 1148,77, 1183,98, 1272,31, 1283,82, 1333,10, 1362,06, 1426,98, 1448,53, 1481,82, 1554,80 та 1578,94 см $^{-1}$ з відхиленням ± 5 см $^{-1}$.

У даній заявці інша кристалічна поліморфна форма 6-фтор-9-метил-9H-β-карболіну (далі поліморф А) була ідентифікована, як показано на фіг.1А. Однак дана поліморфна форма недостатньо стабільна і описана в цьому документі як порівняльний приклад, але не є частиною цього винаходу. Кристалічна поліморфна форма 6-фтор-9-метил-9H-β-карболіну (поліморф А) була повністю охарактеризована, у той час як поліморфні форми С і Т настільки нестабільні, що навіть їхня повна характеристика була навряд чи можлива. Дана кристалічна поліморфна форма А знаходиться в орторомбічній формі і має просторову групу $p2_12_12_1$, одна молекула 6-фтор-9-метил-9H-β-карболіну знаходиться в елементарному осередку, і параметри елементарного осередку $a=5,90\pm 0,1$ Å, $b=10,35\pm 0,1$ Å, $c=15,46\pm 0,1$ Å, $\alpha=90\pm 3^\circ$, $\beta=90\pm 3^\circ$ та $\gamma=90\pm 3^\circ$.

Кристалічна структура поліморфу А (фіг.3А) була докладно охарактеризована за допомогою рентгенівської кристалографії. Цей поліморф кристалізується в орторомбічній формі з просторовою групою $p2_12_12_1$. Параметри елементарного осередку такі: $a=5,8986$ (1) Å, $\alpha=90^\circ$; $b=10,3506$ (3) Å, $\beta=90^\circ$; $c=15,4572$ (5) Å, $\gamma=90^\circ$. Як показано на фіг.2А, молекули 6-FMC знаходяться в багатовимірних шарах молекул з пі-укладкою і ортогональних молекул з Т-

укладкою. Також ясно видно, що у структурі відсутні гідрати, сольвати чи протиіони на основі солей.

Картина складу підтвердила ідентичність описаної сполуки.

Зазначена поліморфна форма А має порошкову рентгендифрактограму, що містить піки при значеннях кута 2-тета 11,9, 13,8, 16,5, 20,0, 23,8, 24,0, 25,6, 26,2, 26, 7 та 28,1 градусів з відхиленням $\pm 0,2$ градуси. Особливо характерними є сигнали зі значеннями кута 2-тета 11,9, 16,5, 26,7 та 28,1.

Температури плавлення вимірювали на приладі вимірювання температури плавлення Buchi M565 з відкритим капіляром. Швидкість нагріву уповільнювали при 100 °C до 1 °C за хвилину для більш точного визначення температури плавлення. Виявилось, що не коригована температура плавлення становила $\sim 125\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Температуру плавлення підтверджували за допомогою диференціальної скануючої калориметрії (DSC, ДСК). Криві нагрівання та охолодження реєстрували за допомогою диференціальної скануючої калориметрії (ДСК; Netzsch DSC 204 F1) (фіг.5А). Температуру плавлення підтверджували нагріванням ДБК. Крива охолодження демонструвала широкий діапазон між 65 °C та 45 °C (фіг.6А).

Спектр твердотілого ^{13}C -ЯМР зазначеної кристалічної поліморфної форми містить піки при 28,6, 103, 111, 113, 114, 118, 124, 130, 133, 135 і 155-158 (багато C-F піків) м.д. з відхиленням ± 1 м.д. (Фіг.8А). На фіг.8А показаний спектр тТЯМР поліморфу А, і на фіг.8В показаний спектр тТЯМР поліморфу В 6-фтор-9-метил-9Н- β -карболіну. Ці спектри демонструють чітку різницю між двома поліморфами А і В.

Стабільність поліморфу В винаходу порівняно з іншими кристалічними формами

Ступінь перетворення зазвичай залежить від відносної стабільності поліморфів, кінетичних бар'єрів для фазового перетворення та прикладеної напруги. Тим не менш, фазове перетворення, як правило, не викликає серйозної стурбованості за умови, що перетворення відбувається закономірним чином, як частина вивіреного процесу одержання, де критичні технологічні параметри процесу одержання добре зрозумілі та регулюються.

Найбільш термодинамічно стабільна поліморфна форма лікарського засобу часто вибирається під час розробки, виходячи з мінімального потенціалу перетворення на іншу поліморфну форму та на основі її вищої хімічної стабільності.

У даній заявці стабільність поліморфу 6-фтор-9-метил-9Н- β -карболіну за винаходом (поліморф В) тестується та порівнюється з іншими поліморфами 6-фтор-9-метил-9Н- β -карболіну (поліморфи А, С та Т) як порівняльний приклад.

Була спроба перетворити поліморф 6-фтор-9-метил-9Н- β -карболіна щодо винаходу (поліморф В) на іншу поліморфну форму (таку як поліморф А) у різних температурних умовах, як описано в прикладі 3.

Кристалічну поліморфну форму 6-фтор-9-метил-9Н- β -карболіну (поліморф В) розчиняли в органічному розчиннику і вказану суміш нагрівали. Як описано в прикладі 3, не вдалося повністю перетворити кристалічну поліморфну форму (поліморф В) на іншу форму (тут поліморф А).

Термічна стабільність поліморфної форми винаходу порівняно з іншою поліморфною формою є несподіваною і технічно вигідною, зокрема, для фармацевтичного виробництва та регулювання. Результати пошуку показують, що при кімнатній температурі і навіть при температурі нижче кімнатної поліморфна форма А частково або повністю перетворюється на термічно більш стабільну форму, яка є поліморфною формою В. Це перетворення може бути прискорене шляхом підвищення температури. Ця термічна нестабільність поліморфної форми А є недоліком, який робить цей поліморф непридатним для фармацевтичних цілей.

Повне перетворення поліморфної форми винаходу (поліморфу В) на поліморф А може бути досягнуто тільки в жорстких умовах, наприклад, надкритичному CO_2 , як описано в прикладі 4. У циліндр пристрою, в який був введений надкритичний CO_2 , завантажували поліморф В (фіг. 9 А) та нагрівали до 60 °C при тиску 35 кПа. Час, за який АРІ повністю розчинявся в надкритичному CO_2 , становив 2,5 ч. Спектр кінцевого продукту показаний на фіг.9В. Цілком очевидно, що сталося перетворення поліморфу В на поліморф А. Порошок був білого кольору (фіг.9С).

Однак ясно, що такі умови не застосовні під час отримання фармацевтичних композицій, що представляють інтерес. Більш того, той факт, що поліморф В може бути перетворений в іншу поліморфну форму тільки в екстремальних умовах, демонструє, що поліморф В абсолютно стабільний в умовах виробництва, зберігання і застосування фармацевтичних композицій, що представляють інтерес.

Застосовувалися різні умови розчинення/кристалізації для того, щоб спробувати перетворити поліморф В на поліморф А. Як згадувалося вище, тільки за допомогою складних процедур поліморф В може бути повністю перетворений на поліморф А (приклад 4).

Поліморфні форми лікарського засобу можуть піддаватися фазовому перетворенню при впливі низки виробничих процесів, таких як сушіння, подрібнення, мікронізація, волога грануляція, розпилювальне сушіння та пресування. Вплив умов навколишнього середовища, таких як вологість та температура, також може спричинити перетворення поліморфу. Таким чином, поліморф А є нестабільним і, отже, не підходить для фармацевтичних процесів, тоді як поліморф В був стабільний у всіх цих умовах, включаючи сушіння, подрібнення, мікронізацію, вологу грануляцію, розпилювальне сушіння і пресування.

На відміну від поліморфу А, кристалічний (поліморф В) винаходу є дуже стабільним, і, отже, не відбувається перетворення при впливі ряду виробничих процесів і процесів приготування композиції. Це несподівана технічна перевага.

Третю поліморфну форму 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну, поліморф С, отримували після перекристалізації поліморфу В у трикомпонентній суміші розчинників з гептану, етанолу та води, як описано в прикладі 7 і показано на фіг.15. Отриманий поліморф С був дуже нестабільним у стандартних умовах, і протягом кількох тижнів при кімнатній температурі відносної вологості від 40 % до 60 % і атмосферному тиску поліморф С повністю перетворювався на поліморф В.

Шляхом розчинення 6-фтор-9-метил-β-карболіну в кислій воді та титрування розчину до рН 12, четверта поліморфна форма 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну, поліморф Т, виглядає як менш стабільна поліморфна форма 6-фтор-9-метил-β-карболіна. Вже за кілька днів за стандартних умов (кімнатна температура, відносна вологість від 40 % до 60 % та атмосферний тиск) ніякого поліморфу Т виявити не вдавалося. Це швидке зникнення поліморфу Т зробило його повну характеристику досить складним завданням. Однак, можна стверджувати, що жоден із поліморфів С і Т не є гідратом або сольовою формою. Виділення зазначеного поліморфу Т не вдалося. При зберіганні поліморфу А у водних середовищах спостерігається перетворення на поліморф В і сигнали поліморфу Т. Щонайменше характерні для поліморфу Т значення 2-тета можуть бути визначені шляхом відокремлення сигналів, що належать поліморфу В, із змішаної дифрактограми. Характерна картина рентгенівської порошкової дифракції показана на фіг.16. Всі ці отримані дані ясно підкреслюють, що поліморф В являє собою найбільш стабільний поліморф 6-FMC і фактично є єдиним поліморфом, придатним для отримання бажаних фармацевтичних композицій.

Мікронізація та стабільність поліморфу в композиції на основі полоксамера:

У серії експериментів було проаналізовано стабільність поліморфу. Мікронізовані (≤ 20 мкм) поліморфи А і В додавали у фосфатний буфер, що містить неіонну поверхнево-активну речовину як композицію носія. Через 30 годин аліквоти відбирали, промивали, сушили та готували для визначення ідентичності поліморфів за допомогою рентгенівської порошкової дифрактометрії (XRPD). XRPD аналіз показав, що у зразку, спочатку отриманому з поліморфу А, сталося перетворення 60 % поліморфу на поліморф В протягом цих 30 год (фіг.10). Через 48 годин після отримання XRPD аналіз показав 100 % перетворення поліморфної форми А в В. Ці дані демонструють, що поліморф В винаходу є стабільним кристалічним станом в композиції. Аналіз консистентності, проведений на зразку, спочатку отриманому з поліморфу В винаходу, через рівні проміжки часу протягом декількох місяців показував відсутність перетворення поліморфу (фіг.12).

В одному варіанті здійснення кристалічна поліморфна форма 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну має розмір частинок кристалічного матеріалу ≤ 200 мкм, переважно ≤ 175 мкм, більш переважно ≤ 150 мкм, ще більш переважно ≤ 125 мкм, ще більш переважно ≤ 100 мкм, ще краще ≤ 75 мкм і ще більш переважно ≤ 50 мкм. Найбільш переважно зазначена кристалічна поліморфна форма мала розмір частинок кристала ≤ 20 мкм.

Ефективність *in vivo*

Дана заявка демонструє, що поліморфна форма В 6-фтор-9-метил-β-карболіна (6-FMC) впливає на ефективність *in vivo*, як описано в прикладі 9. Результати показані на фіг.13 і фіг.14.

Вплив інтратімпанального введення поліморфу А 6-FMC (0,12 мг), приготованого свіжим (менш ніж за 24 години до використання), на постійний зсув порога було досліджено на морських свинках (фіг. 13). Постійне зрушення порога (PTS) визначається як різниця між посттравматичним слуховим порогом, вимірним на 14-й день, і базовим слуховим порогом, вимірним на 3-й день.

Крім того, вплив інтратімпанального введення поліморфу В 6-FMC (0,12 мг), приготовленого щонайменше за 48 год до використання, на PTS морських свинок представлено на фіг.14.

Використовуючи модель втрати слуху від шуму (NIHL) у морських свинок, заявник досліджував ефективність одного інтратімпанального застосування 6-FMC при лікуванні втрати слуху. Було зазначено, що у тварин, які отримували поліморф А 6-FMC, спостерігалось помірне поліпшення відновлення PTS. У порівнянні з тваринами, яким вводили носій, лікування

поліморф А продемонструвало відновлення PTS на 10-18 дБ при 16 кГц (фіг.13). Однак для клінічного застосування знадобиться сильніша дія.

Несподівано, в ході подальшої розробки було виявлено, що спостерігалось явне поліпшення ефективності тварин, яких лікували 6-FMC, в порівнянні з попередніми експериментами (фіг.14).

5 Несподівано, набагато сильніше поліпшення PTS було виявлено на всіх досліджуваних частотах. Рівень поліпшення збільшився приблизно з 10-18 дБ, як видно на фіг.13, до 23-39 дБ, як видно на фіг.14. Це поліпшення на 30 дБ і більше, що спостерігається з поліморфною формою В, клінічно найбільш значуще, оскільки слух виявляється в логарифмічній шкалі (в децибелах). У людей втрата слуху на 18 дБ навряд чи може бути помічена суб'єктом, тоді як
10 втрата слуху на 30 дБ ускладнює спілкування, особливо, якщо одночасно виникає фоновий шум. Дивно, але на деяких частотах (наприклад, 4 кГц і 8 кГц, фіг.14) тварини, що отримували поліморфну форму В 6-FMC, продемонстрували PTS, близький до нуля.

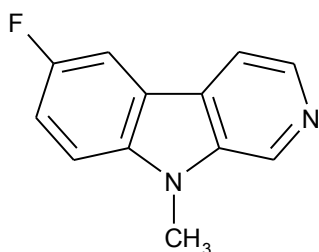
Це сильне відновлення є дуже важливим, оскільки воно прояснює можливість того, що лікування поліморфом В 6-FMC може призвести до повного відновлення слуху після втрати
15 слуху від впливу шуму.

Щоб з'ясувати, що було основною причиною даних про підвищення ефективності, заявник провів ретельний аналіз експериментальних процедур і продемонстрував, що підвищення ефективності залежить від технології приготування лікарського засобу. Спочатку свіжоприготовлену композицію, що містить поліморф А, завжди використовували відразу ж після приготування. Однак в експериментах, які продемонстрували підвищену ефективність, композицію готували заздалегідь і зберігали щонайменше 48 годин перед використанням. Наступний аналіз композиції показав, що композиція, яка була спочатку отримана з поліморфною формою А, зазнала повного перетворення в поліморфну форму В, частково до 60 % протягом 30 год (фіг.10) і повністю вже через 48 год, як показано на фіг. 11. Разом взяті ці дані показують, що ідентичність поліморфної форми 6-FMC, присутньої в композиції, відіграє
25 дуже важливу роль. Крім того, заявник продемонстрував, що композиція з поліморфною формою В призводить до значного покращення даних про ефективність *in vivo* у NIHЛ моделі у морських свинок порівняно з композицією з поліморфною формою А.

Спосіб одержання кристалічної поліморфної форми

30 Інший аспект цього винаходу відноситься до способу отримання кристалічної поліморфної форми 6-фтор-9Н-метил-β-карболіну щодо винаходу, що включає наступні стадії:

A1) забезпечення 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну формули(I)



(I)

35 B1) розчинення 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну в суміші полярного розчинника та неполярного розчинника; або

розчинення 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну спочатку в полярному розчиннику і додавання неполярного розчинника в отриманий розчин 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну в полярному розчиннику,
40

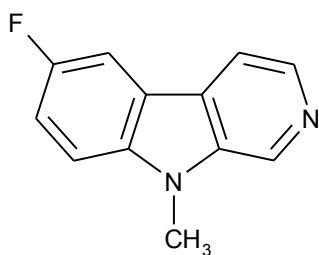
де полярний розчинник являє собою дихлорметан, ацетон, ізопропанол або їх суміш, або суміш з водою, і неполярний розчинник являє собою простий метил-трет-бутиловий ефір, н-гептан, циклогексан або їх суміш, і співвідношення полярного розчинника та неполярного розчинника знаходиться в діапазоні від 1:2 до 1:10;

45 C1) нагрівання розчину або суспензії 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну до температури в діапазоні від 40 °C до 100 °C ;

D1) перемішування отриманого розчину протягом щонайменше 10 хв при тій же температурі;

E1) охолодження отриманого розчину до температури в діапазоні від -10 °C до +30 °C з отриманням кристалічної поліморфної форми 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну за п.1; і

50 F1) виділення кристалічної поліморфної форми В 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну формули (I)



(I).

Слід підкреслити, що всі початкові спроби отримати кристалічну форму 6-FMC призводили до поліморфної форми А. Поліморфну форму А отримували шляхом кристалізації з апротонних неполярних або слабополярних органічних розчинників, таких як толуол, циклогексан або гептан. Отже, поліморфна форма А спочатку розглядалася авторами винаходу як стабільна поліморфна форма, оскільки цю поліморфну форму А отримували після перекристалізації з н-гептану. Ідентифікація поліморфної форми В як набагато стабільнішої і більш активної форми була несподіваним результатом.

Після виявлення того, що поліморфна форма В є фармакологічне високоефективною та хімічно високостабільною, була розроблена процедура синтезу, що описана вище і яка вибірково призводить до поліморфної форми В.

Виділена кристалічна поліморфна форма В 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну має порошкову рентгендифрактограму, що містить піки при значеннях кута 2-тета 11,3, 17,1, 17,6, 18,0, 22,5, 23,2 та 29,4 градусів з відхиленням $\pm 0,2$ градуси, як описано вище.

Переважаю, кристалічна поліморфна форма В 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну має порошкову рентгендифрактограму, що містить піки при значеннях кута 2-тета 11,3, 14,1, 17,1, 17,6, 18,0, 19,0, 20,3, 20,6, 22,5, 23,2, 24,3, 25,8, та 29,4 градусів з відхиленням $\pm 0,2$ градуси, як описано вище.

Також переважно, кристалічна поліморфна форма 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну щодо винаходу (поліморф В) знаходиться в моноклінній формі, що має просторову групу $P2_1C$, де одна молекула 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну знаходиться в асиметричному елементарному осередку, що має параметри елементарного осередку $a=3,85\pm 0,1$ Å, $b=17,32\pm 0,1$ Å, $c=13,77\pm 0,1$ Å, $\alpha=90\pm 3^\circ$, $\beta=91\pm 3^\circ$ та $\gamma=90\pm 3^\circ$, як описано вище.

Більш переважно, твердотільний спектр ^{13}C -ЯМР зазначеної кристалічної поліморфної форми (поліморфу В) 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну містить піки при 28,6, 107,3, 110,2, 111,6, 112, 8, 116,6, 121,5, 126,2, 138,0, 155,5, 156,1, 156,7, 157,1, 157,2, 157,7, 158,1 та 158,4 м .д. з відхиленням ± 1 м.д., як показано на фіг.8В.

Більш переважно, кристалічна поліморфна форма В 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну має температуру плавлення $123\pm 1^\circ C$, як описано вище.

Ще більш переважно, ІЧ-спектр зазначеної кристалічної поліморфної форми В 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну містить піки при 803,27, 819,54, 852,30, 864,13, 893,22, 1024, 99, 1126,71, 1148,77, 1183,98, 1272,31, 1283,82, 1333,10, 1362,06, 1426,98, 1448,53, 1481,82, 1554,80, і 1578,94 cm^{-1} з відхиленням ± 5 cm^{-1} . Найбільш переважно, ІЧ-спектр зазначеної кристалічної поліморфної форми В містить піки при 426,62, 524,31, 558,12, 604,22, 636,09, 704,73, 729,05, 742,59, 803,27, 819,54, 852,30, 864,13, 893,22, 1024,99, 1126,71, 1148,77, 1183,98, 1272,31, 1283,82, 1333,10, 6 98, 1448,53, 1481,82, 1554,80 та 1578,94 cm^{-1} з відхиленням ± 5 cm^{-1} , як описано вище.

Переважаю, на стадії В1) концентрація 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну в суміші органічних розчинників знаходиться в діапазоні від 50 до 200 мМ, переважно від 50 до 150 мМ, більш переважно від 80 до 120 мМ.

Після здійснення стадії С1) суспензію 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну також перетворюють на отриманий розчин, як зазначено на стадії D1).

Переважаю, на стадії С1) розчин або суспензію 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну нагрівають до температури в діапазоні від $40^\circ C$ до $60^\circ C$.

Переважаю, на стадії D1) або після стадії D1) зазначених вище способів виконують наступну стадію D2):

D2) концентрування суміші отриманого розчину або суспензії шляхом випарювання розчинників переважно під вакуумом.

Необов'язково, на стадії E1) після охолодження отриманого розчину може бути виконана наступна стадія:

E2) введення затравки кристалічної поліморфної форми В 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну.

Різні способи одержання докладно описані у прикладах 1 та 2.

У деяких варіантах здійснення, на стадії А) описаних вище способів 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболін формули (I) являє собою кристалічну поліморфну форму А, де зазначена поліморфна форма має порошкову рентгендіфрактограму, що містить піки при значеннях кута 2-тета, рівних 11,9, 16,5, 26,7 і 28,1 градусів з відхиленням $\pm 0,2$ градуси, або, як альтернатива, 11,9, 13,8, 16,5, 20,0, 23,8, 24,0, 25,6, 26,2, 26,7 та 28,1 градусів з відхиленням $\pm 0,2$ градуси.

Фармацевтична композиція та медичне застосування

Ще один аспект цього винаходу відноситься до медичного застосування кристалічної поліморфної форми 6-фтор-9-метил-β-карболіну (поліморфної форми В) щодо винаходу, де кристалічна поліморфна форма 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну щодо винаходу має порошкову рентгендіфрактограму, що містить піки при значеннях кута 2-тета 11,3, 17,1, 17,6, 18,0, 22,5, 23,2 та 29,4 градуси з відхиленням $\pm 0,2$ градуси.

Переважаю, зазначена кристалічна поліморфна форма 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну В має порошкову рентгендіфрактограму, що містить піки при значеннях кута 2-тета 11,3, 14,1, 17,1, 17,6, 18, 0, 19,0, 20,3, 20,6, 22,5, 23,2, 24,3, 25,8, 28,4 та 29,4 градусів з відхиленням $\pm 0,2$ градуси, як описано вище.

Також переважно, зазначена кристалічна поліморфна форма знаходиться в моноклінній формі, що має просторову групу $P2_1/c$, де одна молекула 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну знаходиться в асиметричному елементарному осередку, що має параметри елементарного осередку $a=3,85 \pm 0,1$ Å, $b=17,32 \pm 0,1$ Å, $c=13,77 \pm 0,1$ Å, $\alpha=90 \pm 3^\circ$, $\beta=91 \pm 3^\circ$ та $\gamma=90 \pm 3^\circ$, як описано вище.

Більш переважно, твердотільний спектр ^{13}C -ЯМР зазначеної кристалічної поліморфної форми 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну містить піки при 28,6, 107,3, 110,2, 111,6, 112,8, 116, 6, 121,5, 126,2, 138,0, 155,5, 156,1, 156,7, 157,1, 157,2, 157,7, 158,1 та 158,4 м.д. з відхиленням ± 1 м.д., як показано на фіг.8В і як зазначено вище.

Ще краще, зазначена кристалічна поліморфна форма В фармацевтичної композиції має температуру плавлення $123 \pm 1^\circ\text{C}$.

Ще більш переважно, ІЧ-спектр зазначеної кристалічної поліморфної форми В фармацевтичної композиції містить піки при 803,27, 819,54, 852,30, 864,13, 893,22, 1024,99, 1126,71, 1148,98, 1272,31, 1283,82, 1333,10, 1362,06, 1426,98, 1448,53, 1481,82, 1554,80 та $1578,94\text{ cm}^{-1}$ з відхиленням $\pm 5\text{ cm}^{-1}$.

В одному варіанті здійснення, зазначена вище кристалічна поліморфна форма 6-фтор-9-метил-β-карболіну (поліморфна форма В) відповідно до винаходу застосовна для лікування та/або профілактики порушення слуху, запаморочення або вестибулярного порушення.

Переважаю, зазначена вище кристалічна поліморфна форма В 6-фтор-9-метил-β-карболіну застосовна для лікування та/або профілактики порушення слуху, запаморочення або вестибулярного порушення, де порушення слуху, запаморочення або вестибулярні порушення вибрані з групи, що складається з хвороби Мен'єра, раптової нейросенсорної втрати слуху, втрати слуху від впливу шуму, вікової втрати слуху, аутоімунного захворювання вуха, шуму у вухах, акустичної травми, травми від вибуху, лабіринтної глухоти, пресбіакузису, травми під час імплантації протезу внутрішнього вуха (травми при введенні протезу), запаморочення через захворювання внутрішнього вуха та порушення слуху через антибіотики та цитостатики.

Ще один аспект цього винаходу відноситься до фармацевтичної композиції, що містить зазначену вище кристалічну поліморфну форму 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну (поліморфну форму В) разом з щонайменше одним фармацевтичне прийнятним носієм, ексципієнтом, розчинником та/або розріджувачем.

В одному варіанті здійснення зазначена фармацевтична композиція застосовна для лікування та/або профілактики порушення слуху, запаморочення або вестибулярного порушення.

Переважаю, зазначена фармацевтична композиція застосовна для лікування та/або профілактики порушення слуху, запаморочення або вестибулярного порушення, де порушення слуху, запаморочення або вестибулярні порушення вибрані з групи, що складається з хвороби Мен'єра, раптової нейросенсорної втрати слуху, втрати слуху від впливу шуму, вікової втрати слуху, аутоімунного захворювання вуха, шуму у вухах, акустичної травми, травми від вибуху, лабіринтної глухоти, пресбіакузису, травми під час імплантації протеза внутрішнього вуха (травми при введенні протеза), запаморочення через захворювання внутрішнього вуха та порушень слуху та цитостатиків.

Зазначена вище поліморфна форма В 6-фтор-9-метил-β-карболіну або зазначені вище фармацевтичні композиції, що містять поліморфну форму В 6-фтор-9-метил-β-карболіну, можуть бути отримані та введені у формі систем для трансдермального застосування (пластирів, плівок), крапель, пігулок, драже, гелів, гідрогелів, мазей, сиропів, гранул,

супозиторіїв (овулів), емульсій, дисперсій, мікрокомпозицій, нанокомпозицій, ліпосом, розчинів, соків, суспензій, розчинів для вливання або розчинів для ін'єкцій. Переважними є фармацевтичні композиції у формі ліпосом, мазей, суспензій, гелів та емульсій. Особливо доцільними є препарати у формі гідрогелю.

Такими композиціями є, серед інших, композиції, придатні для внутрішньовенного, інтраперитонеального, внутрішньом'язового, підшкірного, шкірно-слизового, ректального, трансдермального, місцевого, буккального, інтрадермального, внутрішньошлункового, внутрішньошкірного, інтраназального, інтрабуккального, проміжшкірного, інтратимпального, або сублінгвального введення. Особливо доцільними є введення або ін'єкція в середнє вухо, а також місцеве введення через барабанну перетинку.

Як фармацевтичне прийнятний носій можуть бути використані, наприклад, лактоза, крохмаль, сорбіт, сахароза, целюлоза, магнію стеарат, дикальційфосфат, сульфат кальцію, тальк, маніт, етиловий спирт тощо. Порошки, також таблетки можуть складатись на 5-95 % мас. із такого носія.

Рідкі композиції містять розчини, суспензії, спреї та емульсії. Наприклад, розчини для ін'єкцій на водній основі або на основі суміші води та пропіленгліколю для парентеральних ін'єкцій. Для приготування супозиторіїв переважно використовувати віск з низькою температурою плавлення, складні ефіри жирних кислот і гліцериди.

Фармацевтичні композиції також містять гелі та інші в'язкі лікарські носії, які можуть біологічно розкладатись або біологічно не розкладатись, водними або неводними, або на основі мікросфер.

Переважаю, фармацевтичну композицію згідно з винаходом отримують для місцевого та/або локального введення. Відповідним носієм для отогенного введення, тобто для введення в (середнє) вухо, є органічні та неорганічні речовини, які є фармацевтичне прийнятними і не реагують зі сполукою щодо винаходу та/або з його додатковими активними агентами, наприклад, кухонна сіль, спирти, рослинні олії, бензилові спирти, алкілгліколі, поліетиленгліколі, триацетат гліцерину, желатин, вуглеводи, такі як лактоза або крохмаль, карбонат магнію (магnezія, крейда), стеарат (воски), тальк та петролатум (вазелін). Описані композиції можуть бути стерилізовані та/або можуть містити ад'юванти, наприклад, змашувальні речовини, консерванти, такі як тіомерсал (тобто 50 % мас.), стабілізатори та/або зволожувачі, емульгатори, солі для регуляції осмотичного тиску, буферні речовини, барвники та/або ароматизатори. Ці композиції можуть містити один або безліч додаткових активних агентів, якщо це необхідно. Отогенні та/або аудіологічні композиції згідно з винаходом можуть містити й інші сполуки та/або речовини, наприклад, інші біологічно активні речовини, такі як антибіотики, протизапальні активні агенти, такі як стероїди, кортикоїди, анальгетики, антипірини, бензокаїни, прокаїни.

Композиції даного винаходу для місцевого введення можуть містити інші фармацевтично прийнятні сполуки та/або речовини. У кращому варіанті здійснення цього винаходу вибирають ексципієнт для місцевого застосування, який не посилює вивільнення кристалічного 6-фтор-9-метил- β -карболіну і, можливо, додаткового активного агента або активних агентів у систему кровообігу або центральну нервову систему, коли його вводять у вухо, в середнє вухо або у слуховий канал. Можливі речовини-носії містять вуглеводневі кислоти, безводні адсорбенти, такі як гідрофільний петролатум (вазелін) та безводний ланолін (тобто Aquaphor®), та засоби на основі емульсій типу «вода в маслі», такі як ланолін та кольдкрем. Більш переважними є речовини-носії, які по суті є невиключними і зазвичай містять речовини-носії, які є водорозчинними, а також речовини на основі емульсій масло-у-воді

(креми або гідрофільні мазі) та речовини на водорозчинній основі, такі як речовини-носії на основі поліетиленгліколю та водних розчинів, які були гелеподібними з декількома речовинами, такими як метилцелюлоза, гідроксиетилцелюлоза та гідроксипропілметилцелюлоза.

Опис креслень:

Фіг. 1:

А) кристали поліморфу А; В) кристали поліморфу В

Кристалічні структури поліморфів А і В були отримані перекристалізацією в гептані та суміші MTBE та ацетону або DCM відповідно.

Фіг. 2:

А) Молекулярна сітка поліморфу А 6-FMC у монокристалі (ліворуч) та відповідна хімічна структура (праворуч), розрахована за допомогою дифрактометрії

В) Молекулярна сітка поліморфу В 6-FMC у монокристалі (ліворуч) та відповідна хімічна структура (праворуч), розрахована за допомогою дифрактометрії

Фіг. 3:

А) Рентгенівська порошкова дифракція (XRPD) поліморфу А
 В) Рентгенівська порошкова дифракція (XRPD) поліморфу В
 С) Накладання XRPD сигнатур, розраховане з використанням Mercury® на основі рентгенівської структури поліморфу В та вимірюваної структури поліморфу В

5 Фіг. 4:

А) Інфрачервоний (ІЧ)-спектр поліморфу А

В) Інфрачервоний (ІЧ)-спектр поліморфу В

Фіг. 5:

А) ДСК-крива плавлення поліморфу А

10 В) ДСК-крива плавлення поліморфу В

Фіг. 6:

А) ДСК-крива охолодження поліморфу А

В) ДСК-крива охолодження поліморфу В

Фіг. 7:

15 А) Термогравіметричний аналіз поліморфу А

В) Термогравіметричний аналіз поліморфу В

Фіг. 8: Твердотільний ядерний магнітний резонанс (тТЯМР)

А) ^{13}C тямр поліморфу А

В) ^{13}C тямр поліморфу В

20 Фіг. 9: Надкритичний діоксид вуглецю

А) Спектр поліморфу перед вставкою в пристрій (поліморф В; інновація в області надкритичних флюїдів ExtrateX).

В) Спектр поліморфу після обробки поліморфу В надкритичним діоксидом вуглецю (дає поліморф А).

25 С) Осад після впливу надкритичного діоксиду вуглецю на 6-FMC

У циліндр пристрою, який був введений надкритичний CO_2 , завантажували поліморф В (фіг.9А) і нагрівали до $60\text{ }^\circ\text{C}$ при тиску 35 МПа. Час, за який API повністю розчинявся в надкритичному CO_2 , становив 2,5 ч. Спектр кінцевого продукту показаний на фіг.9В. Цілком очевидно, що відбулася трансформація поліморфу В на поліморф А. Порошок був білого кольору (фіг.9С).

30 Фіг. 10: Порошкова рентгенівська дифракція (XRPD) поліморфної форми А композиції на основі полоксамера через 30 год показує 60 % перетворення спочатку введеної поліморфної форми А в поліморфну форму В щодо винаходу.

35 Фіг. 11: Через 48 годин у композиції з спочатку введеного поліморфу А щодо винаходу відбувається 100 % перетворення на поліморфну форму В.

Фіг. 12: Через 30 год в композиції з спочатку введеного поліморфу В щодо винаходу перетворення не відбувається.

Фіг. 13: Вплив інтратімпанального введення поліморфу А 6-FMC (0,12 мг) на PTS у морських свинок.

40 Фіг.14: Вплив одного інтратімпанального введення поліморфу В 6-FMC (0,12 мг) на PTS у морських свинок.

Фіг. 15: Рентгенівська порошкова дифракція (XRPD) поліморф С.

Фіг. 16: Рентгенівська порошкова дифракція (XRPD) поліморф В+Т.

Наступні приклади включені для демонстрації кращих варіантів здійснення винаходу.

45 Фахівцям у даній галузі техніки має бути зрозуміло, що методи,що описані в прикладах, які наведені далі, представляють методи, відкриті автором винаходу для успішного здійснення даного винаходу, і, таким чином, можуть розглядатися як складові кращих способів його практичного застосування.

50 Однак фахівці в даній галузі техніки повинні, у світлі цього опису, розуміти, що можна багато змінювати в описаних конкретних варіантах здійснення і все ще отримати подібний або аналогічний результат, без відхилення від сутності та обсягу винаходу.

55 Додаткові модифікації та альтернативні варіанти здійснення різних аспектів винаходу будуть очевидні фахівцям у даній галузі з даного опису. Відповідно, цей опис слід розглядати лише як ілюстративний, який наведений з метою розкриття фахівцям у даній галузі техніки загального способу здійснення винаходу. Слід мати на увазі, що показані та описані в даному документі форми винаходу слід розглядати як приклади варіантів здійснення. Елементи та матеріали можуть бути замінені тими, які проілюстровані та описані в даному документі, порядок частин і процесів може бути змінений на зворотний, і деякі ознаки винаходу можуть бути використані незалежно, все це буде очевидним для фахівця після ознайомлення з даним описом винаходу.

В елементи, що тут описані, можуть бути внесені зміни без відхилення від сутності та обсягу винаходу, як описано в наступній формулі винаходу.

ПРИКЛАДИ

Загальні методики

5 1. Твердотільний ЯМР (тТЯМР)

тТЯМР визначали при КТ за допомогою Bruker Advance III HD, 400 МГц ssMAS (у твердому зразку з обертанням під магнічним кутом) з ротором 4 мм та частотою обертання 12,5 кГц та частотою збудження 100 МГц. Зразок засипали сухим у 4 мм ротор і визначали при кімнатній температурі.

10 2. XRPD

XRPD визначали у відкритому капілярі за допомогою STOE Modell Stadi, детектор: Mythen Dectris (монохроматор Cu-K- α -променя) від 2 до 50 2-тета

На основі кристалографічних даних відповідні значення XRPD розраховували за допомогою програми аналізу Mercury® та порівнювали з експериментальними значеннями XRPD

15 Приготування зразка: Сухі зразки (приблизно 20 мг) ретельно розтирали у ступці та набивали у 0,5 мм скляний капіляр, який закривали шляхом ретельного плавлення.

Збір даних: XRPD визначали при кімнатній температурі за допомогою STOE Modell StudyP, детектор: Mythen Dectris 1K з використанням $\text{Cu}_{K\alpha 1}$ -випромінювання (1,540598 Å) в геометрії пропускання, генератора рентгенівського випромінювання з Cu анодом і довгим-гострим фокусом і зогнутого германієвого монохроматора. Зразки вимірювалися від 2 до 50 °2-тета в режимі сканування Дебая-Шеррера. Точність положення піків визначається як $\pm 0,2^\circ$ 2-тета через експериментальні відмінності, такі як підготовка зразка і щільність набивання капіляра.

3. ІЧ

ІЧ-спектр визначали у стандартних умовах за допомогою пристрою Jasco ATR Diamond (Golden Gate). Спочатку вимірювали фон без зразка. Потім видиму кількість зразка поміщали на пристрій ATR з алмазною призмою і згвинчували разом. Зразки вимірювали за допомогою 16 сканувань у діапазоні 4000-400 cm^{-1} . Фон вичитали із фактичного сканування для отримання ІЧ-спектру зразка.

Приклад 1-1: одержання кристалічної поліморфної форми (поліморф А як поліморфної форми порівняння) 6-фтор-9-метил- β -карболіну (6-FMC)

Спосіб А:

6-фтор-9-метил- β -карболін (6-FMC) суспендували в н-гептані (50 мл на 1 г), і суспензію нагрівали зі зворотним холодильником. Отриманому розчину давали повільно охолонути до КТ і залишали стояти протягом ночі. Осад, що випав, відфільтровували, промивали н-гептаном і сушили. Поліморфну форму А 6-FMC отримували у вигляді блідих жовто-коричневих голчастих кристалів з виходом 88 %.

У WO2015044434 описаний спосіб синтезу 6-фтор-9-метил- β -карболіну (6-FMC), і 6-FMC отримували у вигляді неочищеного продукту у формі кристалів гірчично-жовтого кольору. Зазначені кристали знаходяться у поліморфній формі А цього винаходу. Елементний аналіз зазначених кристалів показав невеликі кількості домішок, таких як вода і розчинник, і такі домішки можуть спричинити зниження температури плавлення порівняно з високоочищеною поліморфною формою А, одержуваною в даній заявці, яка виглядає як білі кристали.

Спосіб В:

1. «Перекристалізація існуючого рівня техніки». При перемішуванні магнітною мішалкою 5 г суспензії поліморфу В в 200 мл свіжовідігнаного н-гептану нагрівали зі зворотним холодильником. Були вжиті запобіжні заходи для того, щоб джерело нагрівання (масляна лазня) не досягало рівня розчинника в круглодонній колбі об'ємом 500 мл. Оскільки кристали повністю розчинилися у 200 мл, додавали лише на 20 мл більше замість розрахункової кількості 290 мл.

Після 5 хв кип'ятіння зі зворотним холодильником джерело нагрівання видаляли і припиняли перемішування. Розчин ізолювали від зовнішнього перемішування або охолодження, щоб забезпечити повільне зростання кристалів високої чистоти.

Після 12 годин кристалізації при кімнатній температурі кристали видаляли вакуумною фільтрацією, відсмоктуючи по можливості насухо (переміщуючи пухкий осад на фільтрі за допомогою пластмасового шпателя). Напівсухий продукт переносили в колбу та сушили протягом 2 годин при 2,5 Па при кімнатній температурі. Вихід сухої речовини становив 4,52 р (90,4 %).

Даний зразок аналізували за допомогою рентгенівської дифракції та порівнювали з вихідним матеріалом, який також повторно аналізували для підтвердження отриманих спектрів.

XRPD продукту перекристалізації показує, що кристали в основному є «поліморф А», але також присутній ~20 % поліморфу В; ймовірно, тому, що для перекристалізації

використовувалося менше кількості гептану. XRPD до та після перекристалізації показані у вигляді накладання. Для видалення поліморфу В, що залишився, партію піддавали подальшому процесу перекристалізації (див. частина 3).

2. Перекристалізація в жорстких умовах (занадто висока температура, занадто велика колба і джерело нагрівання на 1 см вище за рівень розчинника). Використовували таке саме обладнання, як і в першому експерименті. 3,6 г кип'ятили зі зворотним холодильником в 120 мл н-гептану в колбі об'ємом 500 мл: Розчин здавався прозорим, але вище за рівень розчинника, в процесі нагрівання безперервно утворювалися кристали, які час від часу вимивалися назад в суміш киплячим гептаном, що капає.

Ця суміш (з деякими попередньо утвореними кристалами) охолоджувалась і швидко формувала кристали в розчині (через вже присутні кристали). Після завершення кристалізації кристали, що утворилися в колбах, виглядали так, ніби були присутні чорні крапки і коричнева розмазана речовина.

3. Друга перекристалізація: У колбі об'ємом 250 мл суспензію 3,9 г у 225 мл гептану кип'ятили зі зворотним холодильником (металевий нагрівальний блок), і отриманий прозорий розчин витримували зі зворотним холодильником протягом 10 хв, після чого джерело нагрівання видаляли. Реакційній суміші давали можливість охолонути, і з появою перших кристалів розчин періодично перемішували, щоб уникнути утворення великих кристалів. Після відстоювання протягом 3 год пластів'єподібні кристали видаляли фільтруванням, промивали 15 мл н-гептану, відсмоктували насухо, збирали в колбу меншого об'єму і сушили протягом ночі в субліматорі при КТ і 100 Па. Отримані кристали виявилися більш рихлими і об'ємнішими, ніж у результаті першої перекристалізації. XRPD показував виключно поліморф А.

В окремому експерименті автори винаходу реєстрували XRPD поліморфу у вигляді сухого порошку і в капілярі, просоченому н-гептаном, для оцінки впливу вільного гептану, що був присутній під час визначення. Це важливо для того, щоб переконатися, що жоден із сигналів, виявлених із «гептанового поліморфу», не є артефактом через включення залишкового гептану. Було підтверджено, що додатковий гептан не впливає на зареєстровані XRPD.

А) Рентгенівська порошкова кристалографія

Рентгенівська порошкова дифрактометрія нині розглядається як спосіб визначення поліморфізму. На додаток до цього, демонстрація нееквівалентної структури за допомогою монокристалічної рентгенівської дифракції підтверджувала б наявність поліморфних структур.

Кристалічна структура поліморфу А (фіг.1А) була докладно охарактеризована за допомогою рентгенівської кристалографії. Цей поліморф кристалізується в орторомбічній формі з просторовою групою $P2_12_12_1$. Параметри елементарного осередку такі: $a=5,8986$ (1) Å, $\alpha=90^\circ$; $b=10,3506$ (3) Å, $\beta=90^\circ$; $c=15,4572$ (5) Å, $\gamma=90^\circ$. Як показано на фіг.2, молекули 6-FMC знаходяться в багатовимірних шарах молекул з пі-укладкою і ортогональних молекул з Т-укладкою. Також ясно видно, що у структурі відсутні гідрати, сольвати чи протиіони з урахуванням солей.

Таблиця 1

Довжини [Å] та кути [°] зв'язків для поліморфної форми А

F(1)-C(4)	1.3710(15)	N(1)-C(11)	1.3795(16)
N(1)-C(1)	1.3818(16)	N(1)-C(12)	1.4536(17)
N(2)-C(10)	1.3342(18)	N(2)-C(9)	1.3535(17)
C(1)-C(2)	1.3960(18)	C(1)-C(6)	1.4179(18)
C(2)-C(3)	1.3877(19)	C(2)-H(2)	0.946(19)
C(3)-C(4)	1.388(2)	C(3)-H(3)	0.995(18)
C(4)-C(5)	1.3739(18)	C(5)-C(6)	1.3991(17)
C(5)-H(5)	0.981(17)	C(6)-C(7)	1.4404(17)
C(7)-C(8)	1.3985(16)	C(7)-C(11)	1.4104(17)
C(8)-C(9)	1.3850(17)	C(8)-H(8)	0.964(18)
C(9)-H(9)	0.957(18)	C(10)-C(11)	1.3987(18)
C(10)-H(10)	0.998(17)	C(12)-H(12A)	0.97(2)
C(12)-H(12B)	1.00(2)	C(12)-H(12C)	0.97(2)
C(11)-N(1)-C(1)	108.03(11)	C(11)-N(1)-C(12)	126.04(11)
C(1)-N(1)-C(12)	125.63(12)	C(10)-N(2)-C(9)	118.71(11)
N(1)-C(1)-C(2)	128.84(12)	N(1)-C(1)-C(6)	109.53(11)

C(2)-C(1)-C(6)	121.63(12)	C(3)-C(2)-C(1)	117.68(13)
C(3)-C(2)-H(2)	120.9(10)	C(1)-C(2)-H(2)	121.3(10)
C(2)-C(3)-C(4)	119.63(12)	C(2)-C(3)-H(3)	120.0(11)
C(4)-C(3)-H(3)	120.4(10)	F(1)-C(4)-C(5)	118.23(12)
F(1)-C(4)-C(3)	117.30(12)	C(5)-C(4)-C(3)	124.47(12)
C(4)-C(5)-C(6)	116.44(12)	C(4)-C(5)-H(5)	121.1(10)
C(6)-C(5)-H(5)	122.4(10)	C(5)-C(6)-C(1)	120.13(12)
C(5)-C(6)-C(7)	133.67(12)	C(1)-C(6)-C(7)	106.19(11)
C(8)-C(7)-C(11)	118.17(11)	C(8)-C(7)-C(6)	135.41(12)
C(11)-C(7)-C(6)	106.41(10)	C(9)-C(8)-C(7)	117.43(12)
C(9)-C(8)-H(8)	118.8(11)	C(7)-C(8)-H(8)	123.7(11)
H(2)-C(S)-C(8)	124.44(12)	N(2)-C(9)-H(9)	115.8(10)
C(8)-C(9)-H(9)	119.7(10)	N(2)-C(10)-C(11)	120.89(12)
N(2)-C(10)-H(10)	116.3(9)	C(11)-C(10)-H(10)	122.7(10)
N(1)-C(11)-C(10)	129.79(12)	N(1)-C(11)-C(7)	109.83(11)
C(10)-C(11)-C(7)	120.36(11)	N(1)-C(12)-M(12A)	110.0(12)
N(1)-C(12)-H(12B)	110.9(12)	H(12A)-C(12)-H(12B)	104.3(17)
H(1)-C(12)-H(12C)	110.3(13)	H(12A)-C(12)-H(12C)	114.7(18)
H(12B)-C(12)-H(12C)	106.5(18)		

В) Дані X-RPD

Рентгенівська порошкова дифракція поліморфу А має характерні сигнали в градусах 2-тета

5

Таблица 2

Значення 2-тета кристалічного поліморфу А (фіг.3А)

Кут (2 θ)	Відн. інт. (%)	Кут (2 θ)	Відн. інт. (%)
11,9	69	24,0	49
13,8	11	25,6	35
16,5	38	26,2	16
20,0	12	26,7	100
22,4	46	28,1	38
23,8	13	29,9	4,5

С) тТЯМР поліморфу А (фіг. 8А)

28,7, 103,6, 111,9, 113,4, 114,6, 114,8, 118,9, 125,4, 131,0, 134,0, 135,8, 155,5, 155,7, 156,4, 156,6, 157,6, 158,2 и 159,3 м.д.

10 Д) ІЧ-Фур'є (FT-IR) спектр поліморфу А (фіг. 4А)

422,64, 446,61, 523,52, 557,49, 604,03, 635,82, 702,67, 743,66, 802,11, 813,34, 848,24, 893,14, 1023,95, 1069,75, 1152,14, 1183,22, 1275,15, 1363,80, 1427,67, 1450,25, 1480,13, 1560,90 и 1582,19 см⁻¹.15 Приклад 1-2: одержання кристалічної поліморфної форми (поліморфу В) 6-фтор-9-метил- β -карболіну (6-FMC) по наданому винаходу

Спосіб А (ізопропанол: н-гептан=1:5):

1 г 6-фтор-9-метил- β -карболіну (6-FMC) суспендували в суміші ізопропанолу та н-гептану, і суспензію нагрівали зі зворотним холодильником. Отриманий розчин охолоджували і тверді речовини що були осаджені фільтрували, промивали н-гептаном і сушили. Поліморфну форму В 6-FMC отримували у вигляді білого жовто-коричневого порошку з виходом 77 %.

20 Спосіб В (Дихлорметан: н-гептан=1:4):

2 г 6-фтор-9-метил- β -карболіну (6-FMC) розчиняли в 6 мл DCM і розчин додавали 24 мл н-гептану. Осаджені тверді речовини фільтрували, промивали н-гептаном та сушили. Поліморфну форму В 6-FMC отримували у вигляді білого жовто-коричневого порошку з виходом 62 %.

25 Спосіб С (Дихлорметан: МТВЕ=1:9,4):

400 мг 6-фтор-9-метил- β -карболіну (6-FMC) розчиняли в 1,6 мл DCM і в розчин додавали 15 мл МТВЕ. Отриману суспензію концентрували за допомогою роторного випарника за температури 40 °С під тиском 65 кПа до отримання прозорого розчину. Через 2 хв випарювання

припиняли, розчин охолоджували та отриману суспензію відфільтровували. Неочищену кристалічну поліморфну форму В 6-FMC отримували у вигляді блідо-коричневої твердої речовини та висушували. Вихід = 75 %.

Спосіб D: (Ацетон: МТВЕ=1:2,8):

5 400 мг 6-фтор-9-метил-β-карболіну (6-FMC) розчиняли в 3,6 мл ацетону і в розчин додавали 10 мл МТВЕ. Отриманий розчин концентрували за допомогою роторного випарника за температури 40 °С під тиском 45 кПа до отримання прозорого розчину. Через 7 хв одержану суспензію охолоджували і відфільтровували. Неочищену кристалічну поліморфну форму В 6-FMC отримували у вигляді блідо-коричневої твердої речовини та висушували. Вихід = 61 %.

10 Спосіб E: (осадження вільної луги з водою)

200 мг 6-фтор-9-метил-β-карболіну (6-FMC) розчиняли в 3,2 мл ДМСО. Прозорий розчин осаджували в 40 мл дистильованої води і осад центрифугували. Супернатант видаляли і осад промивали 3 рази дистильованою водою для видалення залишкового ДМСО. (Процес перемішування на вортексі – центрифугування). Після останньої стадії промивання яскраво-білі

15 тверді частинки заморожували в рідкому азоті, ліофілізували, і вони були чистим поліморфом В.

Спосіб F (осадження вільної луги з NaOH)

Водну суспензію 200 мг 6-фтор-9-метил-β-карболіну (6-FMC) перемішували і додавали HCl до pH 2. Під час утворення солі отримували прозорий жовтий розчин. Щоб гарантувати відсутність будь-яких твердих частинок, фільтрували через шприцевий фільтр 0,45 мкм. Розчин перемішували знову і підлужували NaOH до pH 12. Під час додавання спостерігали утворення густого білого осаду вільної луги, яку центрифугували. Супернатант декантували, і тверду речовину ретельно промивали за допомогою повторної обробки дистильованою водою, процесів перемішування на вортексі та центрифугування (4×). Після останнього промивання тверду речовину заморожували в рідкому азоті та ліофілізували. Вихід: 85 % чистого поліморфу В.

25 А) Рентгенівська кристалографія

Кристалічна структура поліморфу В (фіг.1В) також була охарактеризована докладно за допомогою рентгенівської кристалографії. Цей поліморф кристалізується в моноклінній формі з просторовою групою $P2_1$. Параметри елементарного осередку такі: $a=3,8456$ (2) Å, $\alpha=90^\circ$; $b=17,3249$ (8) Å, $\beta=91,069$ (3)°; $c=13,7709$ (7) Å, $\gamma=90^\circ$. Як показано на фіг.2В, молекули 6-FMC знаходяться в упорядкованих шарах зигзагоподібних смуг. Також ясно видно, що у структурі відсутні гідрати, сольвати чи протиіони з урахуванням солей. Аналіз показав відсутність будь-якого розчинника. Картина складу підтвердила ідентичність заявленої сполуки.

Таблиця 3

Довжини [Å] і кути [°] зв'язків для поліморфної форми В

F(1)-C(4)	1.360(8)	N(1)-C(11)	1.376(9)
N(1)-C(1)	1.384(9)	N(1)-C(12)	1.457(8)
H(2)-C(9)	1.342(10)	N(2)-C(10)	1.344(10)
C(1)-C(2)	1.398(10)	C(1)-C(6)	1.408(10)
C(2)-C(3)	1.388(11)	C(2)-H(2A)	0.9500
C(3)-C(4)	1.384(11)	C(3)-H(3A)	0.9500
C(4)-C(5)	1.355(10)	C(5)-C(6)	1.401(10)
C(5)-H(5A)	0.9500	C(6)-C(7)	1.433(10)
C(7)-C(8)	1.384(10)	C(7)-C(11)	1.413(9)
C(8)-C(9)	1.393(10)	C(8)-H(8A)	0.9500
C(9)-H(9A)	0.9500	C(10)-C(11)	1.395(10)
C(10)-H(10A)	0.9500	C(12)-H(12A)	0.9800
C(12)-H(12B)	0.9800	C(12)-H(12C)	0.9800
C(11)-N(1)-C(1)	108.3(5)	C(11)-N(1)-C(12)	126.1(6)
C(1)-N(1)-C(12)	125.6(6)	C(9)-H(2)-C(10)	117.9(6)
H(1)-C(1)-C(2)	128.2(6)	N(1)-C(1)-C(6)	109.5(6)
C(2)-C(1)-C(6)	122.4(7)	C(3)-C(2)-C(1)	116.5(7)
C(3)-C(2)-H(2A)	121.8	C(1)-C(2)-H(2A)	121.8
C(4)-C(3)-C(2)	120.7(7)	C(4)-C(3)-H(3A)	119.6
C(2)-C(3)-H(3A)	119.6	C(5)-C(4)-F(1)	118.5(7)

35

C(5)-C(4)-C(3)	123.6(7)	F(1)-C(4)-C(3)	117.9(7)
C(4)-C(5)-C(6)	117.5(7)	C(4)-C(5)-H(5A)	121.2
C(6)-C(5)-H(5A)	121.2	C(5)-C(6)-C(1)	119.4(6)
C(5)-C(6)-C(7)	134.4(7)	C(1)-C(6)-C(7)	106.3(6)
C(8)-C(7)-C(11)	118.0(6)	C(8)-C(7)-C(6)	135.1(6)
C(11)-C(7)-C(6)	106.9(6)	C(7)-C(8)-C(9)	117.6(7)
C(7)-C(8)-H(8A)	121.2	C(9)-C(8)-H(8A)	121.2
N(2)-C(9)-C(8)	125.0(7)	N(2)-C(9)-H(9A)	117.5
C(8)-C(9)-H(9A)	117.5	N(2)-C(10)-C(11)	121.1(7)
N(2)-C(10)-H(10A)	119.4	C(11)-C(10)-K(10A)	119.4
N(1)-C(11)-C(10)	130.5(7)	N(1)-C(11)-C(7)	109.1(6)
C(10)-C(11)-C(7)	120.4(7)	N(1)-C(12)-H(12A)	109.5
N(1)-C(12)-H(12B)	109.5	H(12A)-C(12)-H(12B)	109.5
N(1)-C(12)-H(12C)	109.5	H(12A)-C(12)-H(12C)	109.5
H(12B)-C(12)-H(12C)	109.5		

В) XRPD

- 5 Розрахункова XRPD-дифрактограма поліморфа В і певна XRPD-дифрактограма поліморфа В показані на фіг.3В і у вигляді накладання на фіг.3С. Незважаючи на невелике відхилення в абсолютних значеннях 2-тета, дифрактограми один щодо одного майже ідентичні.

Таблиця 4

Значення 2-тета кристалічного поліморфу (фіг.3В)

Кут (2 θ)	Відн. інт. (%)
11,3	31
14,1	8
17,1	20
17,6	47
18,0	62
19,0	21
20,3	8
20,6	14
22,5	100
23,2	94
24,3	12
25,8	13
29,4	38

С) тТЯМР поліморфу (фіг.8В)

- 10 28,6, 107,3, 110,2, 111,6, 112,8, 116,6, 121,5, 126,2, 138,0, 155,5, 156,1, 156,7, 157,1, 157,2, 157,7, 158,1 и 158,4 м.д.

D) ІЧ-Фур'є (FT-IR) спектр поліморфу В (фіг.4В)

- 15 426,62, 524,31, 558,12, 604,22, 636,09, 704,73, 729,05, 742,59, 803,27, 819,54, 852,30, 864,13, 893,22, 1024,99, 1126,71, 1148,77, 1183,98, 1272,31, 1283,82, 1333,10, 1362,06, 1426,98, 1448,53, 1481,82, 1554,80 и 1578,94 см⁻¹.

Приклад 2: ДСК та вимірювання температури плавлення кристалічних поліморфних форм

- 20 Порошки поліморфів 6-FMC нагрівали при перемішуванні, при цьому нагрівання сповільнювалося при температурі вище 100 °С (1 градус Цельсія за хвилину). Зразок поліморфу А плавився при 125 °С. Криві нагрівання та охолодження реєстрували за допомогою диференціальної скануючої калориметрії (ДСК; Netzsch DSC 204 F1) (фіг. 5А). Температуру плавлення підтверджували нагріванням ДБК. Крива охолодження демонструвала широкий діапазон між 65 °С та 45 °С (фіг.6А).

- 25 Зразок поліморфу В плавився при 123°С. Аналіз кривої нагрівання ДСК продемонстрував перехідну фазу, що характеризується невеликим уповільненням процесу плавлення (фіг.5В). У процесі охолодження поліморфу В крива показала двофазний перехід у діапазоні температур 45-75 °С (фіг.6В). Це відображає зниження якості поліморфу В. Дифрактометричний аналіз

показав, що перетворення поліморфу В на поліморф А корелює з тривалістю стану плавлення аж до повного перетворення. Вакуумна сублімація призводила до повного перетворення на поліморф А.

Приклад 3: Перетворення поліморфу в різних температурних умовах (перетворення поліморфу В на поліморф

А) 3-1: Поліморф В 6-FMC розчиняли в н-гептані, нагрівали суспензію (100 °C) протягом 1:45 год при перемішуванні. Потім охолоджували суспензію і перемішували при кімнатній температурі протягом 15 год. Осад відфільтровували, промивали н-гептаном і висушували повітрям. Отриманий спектр XRPD не виявив перетворення на форму А.

3-2: Поліморф В 6-FMC розбавляли в толуолі, нагрівали до 95 °C і охолоджували до кімнатної температури. Осад відфільтровували, промивали толуолом та сушили в потоці повітря. Спектр XRPD вказував на деяку присутність поліморфу А, але цей експеримент не був відтворюваним, тому передбачається, що також і в цих умовах не відбувається перетворення поліморфу В на поліморф А.

3-3: Суспензію поліморфу В 6-FMC розбавляли в н-гептані та нагрівали до 110 °C . Реакційну суміш витримували протягом 5 год 18 хв в колбі в умовах кип'ятіння зі зворотним холодильником, після чого виконували поступове охолодження до кімнатної температури, перемішували протягом 16 год. Осад відфільтровували, промивали гептаном і висушували повітрям. XRPD довів незмінність поліморфу В.

3-4: Суспензію поліморфу В 6-FMC розбавляли в н-гептані та нагрівали до 108 °C до повного розчинення речовини. Затравні кристали поліморфу А додавали розчин, який поступово охолоджували до кімнатної температури. Осад відфільтровували, промивали н-гептаном та висушували повітрям. XRPD довів незмінність поліморфу В.

Приклад 4: Перетворення поліморфу за допомогою надкритичного CO₂ (перетворення поліморфу В на поліморф А)

Екстракцію/перетворення поліморфу надкритичним CO₂ проводили з використанням 500 мг неочищеного брудно-білого поліморфу В у системі швидкого розширення надкритичного розчину (REES) ExtrateX. Екстракційну посудину нагрівали до 60 °C при тиску 350 бар (35 МПа). Сопло являло собою капіляр з нержавіючої сталі завдовжки 5 см із внутрішнім діаметром 0,25 мм при температурі 70 °C . Розширювальну посудину нагрівали до 40 °C при 1-5 МПа. Час встановлення рівноваги: 2,5 год; час розпилення: 15 хв. Після цього процесу поліморф А отримували як яскраво-білий порошок. У циліндр пристрою, який був введений надкритичний CO₂, завантажували поліморф В (фіг.9А) і нагрівали до 60 °C при тиску 35 МПа. Час, за який API повністю розчинявся надкритичному CO₂, становило 2,5 ч. Спектр кінцевого продукту показаний на фіг.9В. Цілком очевидно, що відбулася трансформація поліморфу В на поліморф А. Порошок був білого кольору (фіг.9С).

Приклад 5: Властивості поліморфів 6-FMC у порошковій формі (експерименти з плавлення та охолодження)

Порошки поліморфів 6-FMC нагрівали при перемішуванні, при цьому нагрівання сповільнювалося при температурі вище 100 °C (1 градус Цельсія за хвилину). Зразок поліморфу А плавився при 125°C. Криві нагрівання та охолодження реєстрували за допомогою диференціальної скануючої калориметрії (ДСК; Netzsch DSC 204 F1) (фіг.5А). Температуру плавлення підтверджували нагріванням ДБК. Крива охолодження демонструвала широкий діапазон між 65 °C та 45 °C (фіг.6А).

Зразок поліморфу В плавився при 123 °C. Аналіз кривої нагрівання ДСК продемонстрував перехідну фазу, що характеризується невеликим уповільненням процесу плавлення (фіг.5В). У процесі охолодження поліморфу В крива показала двофазний перехід у діапазоні температур 45-75 °C (фіг.6В). Це відображає зниження якості поліморфу В. Дифрактометричний аналіз показав, що перетворення поліморфу В на поліморф А корелює з тривалістю стану плавлення аж до повного перетворення. Вакуумна сублімація при 1-2 кПа призводила до повного перетворення в білі кристали поліморфу А.

Приклад 6: Процедура екстракції 6-FMC з композиції на основі полоксамера (випробування на стабільність поліморфів А та В у композиції)

2 мл композиції на основі полоксамера з 12 мг/мл 6-FMC охолоджували до 4 °C , перемішували на вортексі та переносили в пробірку Еппендорфа об'ємом 2 мл. Охолоджену пробірку центрифугували протягом 2 хв за допомогою настільної центрифуги, полімерний супернатантний розчин видаляли піпеткою і зливали. 6-FMC, що залишилися, ресуспендували і перемішували на вортексі з 1,5 мл крижаної води milli-Q і центрифугували, як описано вище. Супернатантну воду знову видаляли за допомогою піпетки і процедуру промивання повторювали 3 рази (всього 4 промивання). Примітка: Необхідно зберігати прохолодний розчин,

щоб полегшити процес центрифугування. Після останнього промивання білий 6-FMC, що залишився, охолоджували рідким азотом і сушили сублімацією протягом ночі при 100 Па при кімнатній температурі.

Через 30 год у композиції 60 % поліморфної форми А перетворювалося на поліморфну форму В (див. фіг.10). Збереження композиції протягом 48 год або більше призводить до 100 % перетворення поліморфної форми А на поліморфну форму В, як показано на фіг.11.

Приклад 7: Одержання 3-ї кристалічної поліморфної форми (поліморфу С) 6-фтор-9-метил-β-карболіну (6-FMC)

818 мг 6-FMC (поліморф В) розчиняли в 5 мл етанолу і 500 мкл води. Потім додавали 50 мл гептану, що призводило до поділу фаз. Незважаючи на поділ фаз, роторний випарник використовували при температурі 40 °С і тиску 14 кПа. На стінці поршня відділялася масляна плівка, яка раптово тверділа. Дана кристалічна тверда речовина була проаналізована, демонструючи наявність тільки поліморфу В.

Ще 20 мл гептану додавали до продукту реакції і нагрівали при кипінні зі зворотним холодильником (температура приблизно 100 °С) протягом 5 хв при нормальному тиску, доки розчин не ставав прозорим. Розчин охолоджували протягом ночі при перемішуванні до кімнатної температури. На стіні поршня утворилися темні грудки, тоді як на дні поршня утворилася однорідна кристалічна маса. Однорідна кристалічна маса складалася із поліморфу С.

X-RPD поліморфної форми С визначалася, як показано на фіг.15, та характеристичні піки узагальнено наведені у таблиці 5.

Таблиця 5

Значення 2-тета поліморфу С

Кут (2Θ)	Відн. інт. (%)	Кут (2Θ)	Відн. інт. (%)
4,7	33	23,2	25
9,4	45	23,6	53
11,5	53	23,9	14
14,1	87	24,8	100
17,3	21	25,0	48
18,9	17	26,1	61
19,2	8	28,5	67
22,7	35		

Приклад 8: Одержання 4-ої кристалічної поліморфної форми (поліморфу Т) 6-фтор-9-метил-β-карболіну (6-FMC)

250 мг поліморфу В 6-FMC, мікронізованого, підкисляли HCl з подальшою обробкою ультразвуком при 40 °С . Мутний розчин підлогували гідроксидом натрію до рН 12, що викликало осадження тонкої порошкоподібної маси. Порошок висипали на папір для зважування для сушіння повітря. Отримана XRPD виявила суміш нового поліморфу та поліморфу В. Процентне співвідношення становило ~ 50 на 50 %. Новий поліморф явно відрізнявся від поліморфів А, В та С і позначався як поліморф Т.

Для перевірки наявності води було проведено ЯМР-аналіз суміші поліморфів В/Т, суміші екстра-сухих поліморфів В/Т та чистого поліморфу В. У жодному із зразків не було більше води, ніж було присутнім у дейтерованому хлороформі. Таким чином, аналізи не виявили жодних ознак наявності гідратів.

X-RPD поліморфної форми Т визначалася, як показано на фіг.16, та характеристичні піки узагальнено наведені у таблиці 6.

Таблиця 6

Значення 2-тета поліморфу Т, отримані шляхом віднімання зі змішаного спектра поліморфу В і Т

Кут (2 Θ)	Відн. інт. (%)	Кут (2 Θ)	Відн. інт. (%)
9,4	4	22,1	56
15,7	4	22,3	100
15,9	7	13,9	22
17,4	8	24,9	4
19,4	7	26,2	13

Приклад 9: ефективність *in vivo* кристалічної поліморфної форми 6-FMC щодо винаходу на моделі морської свинки

5 Загальні методики: Усі експериментальні перевірки *in vivo* досліджень проводили на добре відомій моделі NIH1 із морськими свинками. Морська свинка була обрана тому, що її анатомію можна порівняти як за будовою, так і за розмірами з анатомією людини. Слухову функцію оцінювали за допомогою аудіометрії за викликаними потенціалами мозку (BERA).

10 Способи: Дорослі морські свинки отримували інтратімпанальну (i.t.) ін'єкцію 6-FMC, приготовленого в термочутливому гідрогелі, або лише гідрогелю. Усі процедури проводилися під анестезією. BERA використовували для вимірювання акустичних стовбурових викликаних потенціалів (ABR) на 3-й та 14-й день. Слуховими стимулами були синусоїдальні тональні сигнали (тривалістю 10 мс при 4, 8, 16 кГц) із кроком 5 дБ від 0 до 90 дБ. Ці вимірювання використовували для обчислення PTS. Акустична травма проводилася в 0-й день і складалася з 15 однієї безперервної смуги (чверть октави з центром 8 кГц) при SPL 118 дБ протягом 30 хв. Тварин обробляли через 1 год після закінчення акустичного впливу. Візуалізували кругле вікно під хірургічним мікроскопом через невеликий отвір, просвердлений у кості булі лівого вуха. 10 мкл гелю, що містить або 6-FMC або носій, вводили за допомогою шприца Гамільтона і моторизованого насоса на мембрану круглого вікна (RWM), перш ніж отвір закривали зубним 20 цементом.

Одержання композиції: попередньо готували розчин на основі неіонної поверхнево-активної речовини шляхом розчинення відповідної кількості неіонної поверхнево-активної речовини у воді або буфері PBS і забезпечення перемішування протягом ночі в умовах охолодження. Як 25 тільки неіонна поверхнево-активна речовина повністю розчинялася, при необхідності регулювали осмоляльність та pH. Потім розчин фільтрували через 500 мкм сито для видалення нерозчинених частинок гелю. У цьому компаундірованні носія завершували. Композицію, що містить API (активний фармацевтичний інгредієнт), отримували додаванням 6-FMC (≤ 50 мкм) концентрації 12 мг/мл. Для експериментів, представлених на фіг.13, композицію 6-FMC застосовували безпосередньо після приготування. Для експериментів на фіг.14 композицію 6-FMC 30 готували щонайменше за 48 год до експериментів на тваринах.

Результати та обговорення

Інтратімпанальна обробка 6-FMC у поліморфній формі А або В призводила до істотного зниження NIH1 (фіг.13 та фіг.14).

Введення поліморфу А

35 Для поліморфної форми може бути досягнутий помірний ефект, коли PTS знижувався в середньому на 7,7 дБ (фіг.13). В цілому, вплив шуму призводив до середнього значення PTS 22,3 дБ у контрольних групах, оброблених носієм, і знижувалося приблизно на 7,7 дБ до зсуву порога 14,6 дБ у тварин, оброблених поліморфною формою А 6-FMC.

40 Для поліморфної форми В цей ефект був значно сильнішим і значнішим за всіма дослідженими частотами і приводив до терапевтично корисного зниження PTS щонайменше на 23,6 дБ до значних 39,9 дБ (фіг.14). Важливо відзначити, що на деяких частотах PTS знижувався до 0, що демонструє, що лікування поліморфом В 6-FMC має потенціал повного відновлення після втрати слуху від впливу шуму.

45 В цілому, вплив шуму призводив до середнього значення PTS 34,7 дБ у контрольних групах, оброблених носієм, і було значно знижено в середньому на 34,1 дБ до 0,6 дБ зсуву порога у тварин, що отримували поліморфну форму 6-FMC.

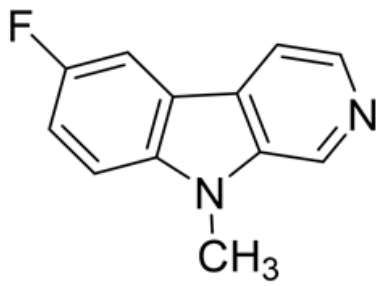
Порівняння даних про ефективність досліджень на тваринах, в яких використовувалися поліморфні форми 6-FMC А і В, демонструє, що поліморфна форма В має набагато більшу ефективність порівняно з поліморфною формою А.

Використання поліморфної форми В призводить до середнього зниження PTS на 34,1 дБ порівняно із середнім зниженням на 7,7 дБ, що спостерігається у тварин, що отримували поліморфну форму А. Більше того, було продемонстровано, що тварини, які отримували поліморфну форму В, мають потенціал для повного відновлення після втрати слуху від впливу шуму, як видно на частотах 4 кГц та 8 кГц на фіг.14, де PTS досягає 0.

Разом взяті результати досліджень *in vivo* з використанням моделі NIHЛ на морських свинках дозволяють припустити, що одноразове інтратімпанальне застосування поліморфної форми В 6-ФМС призводить до значного поліпшення PTS і має більш високу ефективність порівняно з поліморфною формою А.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Кристалічна поліморфна форма 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну формули (I):



де кристалічна поліморфна форма має порошкову рентгенодифрактограму, що містить піки при значеннях кута 2-тета 11,3, 17,1, 17,6, 18,0, 22,5, 23,2 та 29,4 градуса з відхиленням $\pm 0,2$ градуса.

2. Кристалічна поліморфна форма за п. 1, де кристалічна поліморфна форма має порошкову рентгенодифрактограму, що містить піки при значеннях кута 2-тета 11,3, 14,1, 17,1, 17,6, 18,0, 19,0, 20,3, 20,6, 22,5, 23,2, 24,3, 25,8 та 29,4 градуса з відхиленням $\pm 0,2$ градуса.

3. Кристалічна поліморфна форма за п. 1 або 2, де кристалічна поліморфна форма знаходиться в моноклінній формі, що має просторову групу $P2_1/c$, де одна молекула 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну знаходиться в асиметричному елементарному середовищі, що має параметри елементарного середовища: $a=3,85\pm 0,1$ Å, $b=17,32\pm 0,1$ Å, $c=13,77\pm 0,1$ Å, $\alpha=90^\circ\pm 3^\circ$, $\beta=91^\circ\pm 3^\circ$ та $\gamma=90^\circ\pm 3^\circ$.

4. Кристалічна поліморфна форма за будь-яким з пп. 1-3, де твердотільний спектр ^{13}C -ЯМР зазначеної кристалічної поліморфної форми містить піки при 28,6, 107,3, 110,2, 111,6, 112,8, 116,6, 121,5, 126,2, 138,0, 155,5, 156,1, 156,7, 157,1, 157,2, 157,7, 158,1 та 158,4 м. д. з відхиленням ± 1 м. д.

5. Кристалічна поліморфна форма за будь-яким з пп. 1-4, де зазначена кристалічна поліморфна форма має температуру плавлення 123 ± 1 °C.

6. Кристалічна поліморфна форма за будь-яким з пп. 1-5, де розмір частинок кристалічної поліморфної форми становить ≤ 200 мкм.

7. Кристалічна поліморфна форма за п. 6, де розмір частинок кристалічної поліморфної форми становить ≤ 20 мкм.

8. Фармацевтична композиція, що містить кристалічну поліморфну форму 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну за будь-яким з пп. 1-7 разом з щонайменше одним фармацевтичним прийнятним носієм, ексципієнтом, розчинником та/або розчинником.

9. Фармацевтична композиція за п. 8 у формі ліпосом, мазей, суспензій, гелів та емульсій.

10. Кристалічна поліморфна форма 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну за будь-яким із пп. 1-7 для застосування у лікуванні порушення слуху, запаморочення або вестибулярного порушення.

11. Кристалічна поліморфна форма 6-фтор-9-метил-9Н-β-карболіну за будь-яким із пп. 1-7 для застосування з метою профілактики порушення слуху, запаморочення або вестибулярного порушення.

12. Кристалічна поліморфна форма для застосування за п. 10 або 11, де порушення слуху, запаморочення або вестибулярні порушення вибрані з групи, що складається з хвороби Мен'єра, раптової сенсоневральної втрати слуху, втрати слуху від впливу шуму, вікової втрати слуху, аутоімунного захворювання вуха, шуму у вухах, акустичної травми, травми від вибуху, лабіринтної глухоти, пресбіакузису, травми під час імплантації протезів внутрішнього вуха (травми при введення протеза), запаморочення через захворювання внутрішнього вуха, а також порушення слуху, спричинені антибіотиками та цитостатиками.

13. Кристалічна поліморфна форма 6-фтор-9-метил-9H-β-карболіну для застосування за пп. 10-12, де кристалічну поліморфну форму вводять місцево та/або локально.

14. Фармацевтична композиція за п. 8 або 9 для застосування у лікуванні порушення слуху, запаморочення або вестибулярного порушення.

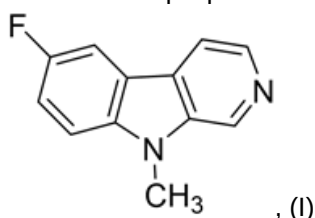
5 15. Фармацевтична композиція за п. 8 або 9 для застосування з метою профілактики порушення слуху, запаморочення або вестибулярного порушення.

16. Фармацевтична композиція для застосування за п. 14 або 15, де порушення слуху, запаморочення або вестибулярні порушення вибрані з групи, що складається з хвороби Мен'єра, раптової сенсоневральної втрати слуху, втрати слуху від впливу шуму, вікової втрати слуху, аутоімунного захворювання вуха, шуму у вухах, акустичної травми, травми від вибуху, лабіринтної глухоти, пресбіакузису, травми під час імплантації протезів внутрішнього вуха (травми при введенні протеза), запаморочення через захворювання внутрішнього вуха, а також порушення слуху, спричинені антибіотиками та цитостатиками.

17. Фармацевтична композиція для застосування за пп. 14-16, де фармацевтичну композицію вводять місцево та/або локально.

18. Спосіб отримання кристалічної поліморфної форми 6-фтор-9-метил-9H-β-карболіну формули (I) за п. 1, що включає:

A1) забезпечення 6-фтор-9-метил-9H-β-карболіну формули (I):



20 B1) розчинення 6-фтор-9-метил-9H-β-карболіну в суміші полярного розчинника та неполярного розчинника; або розчинення 6-фтор-9-метил-9H-β-карболіну спочатку в полярному розчиннику і додавання неполярного розчинника в отриманий розчин 6-фтор-9-метил-9H-β-карболіну в полярному розчиннику,

25 де полярний розчинник являє собою дихлорметан, ацетон, ізопропанол або їх суміш, або суміш з водою, і неполярний розчинник являє собою простий метил-трет-бутиловий ефір, н-гептан, циклогексан або їх суміш, і співвідношення полярного розчинника та неполярного розчинника знаходиться в діапазоні від 1:2 до 1:10;

30 C1) нагрівання розчину або суспензії 6-фтор-9-метил-9H-β-карболіну до температури в діапазоні від 40 до 100 °C;

D1) перемішування отриманого розчину протягом щонайменше 10 хв при тій же температурі;

E1) охолодження отриманого розчину до температури в діапазоні від -10 до +30 °C з отриманням кристалічної поліморфної форми 6-фтор-9-метил-9H-β-карболіну за п. 1; і

35 C1) нагрівання розчину або суспензії 6-фтор-9-метил-9H-β-карболіну до температури в діапазоні від 40 до 100 °C;

D1) перемішування отриманого розчину протягом щонайменше 10 хв при тій же температурі;

E1) охолодження отриманого розчину до температури в діапазоні від -10 до +30 °C з отриманням кристалічної поліморфної форми 6-фтор-9-метил-9H-β-карболіну за п. 1; і

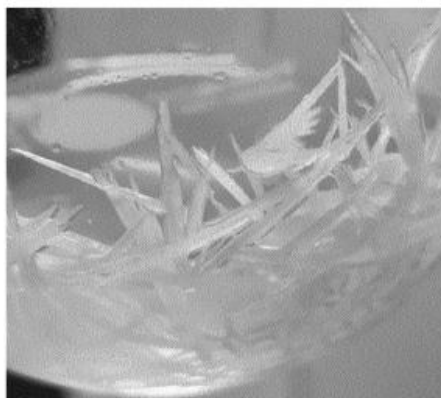
метил-9H-β-карболіну формули (I) за п. 1.

40 19. Спосіб за п. 18, за яким на стадії B1) концентрація 6-фтор-9-метил-9H-β-карболіну в суміші полярного розчинника та неполярного розчинника знаходиться в діапазоні від 50 до 200 mM.

20. Спосіб за п. 18 або 19, за яким після стадії E1) та перед стадією F) виконують наступну стадію E2):

E2) введення затравки кристалічної поліморфної форми 6-фтор-9-метил-9H-β-карболіну.

А) кристали поліморфа А



В) кристали поліморфа В

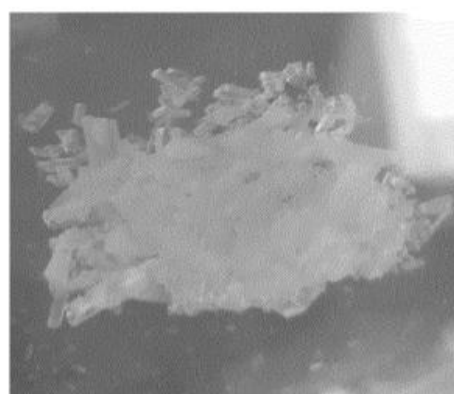


Fig. 1

А) Поліморф А

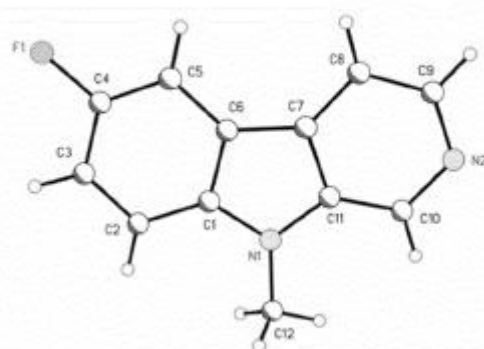
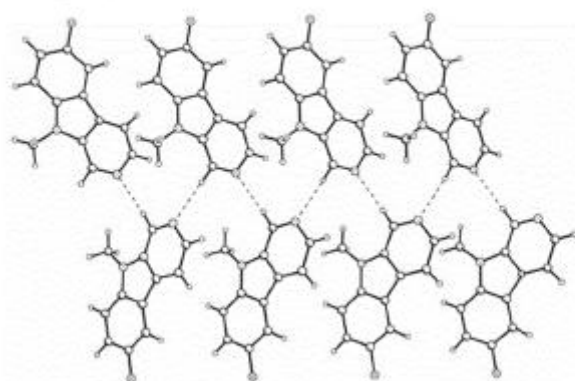


Fig. 2

В) Поліморф В

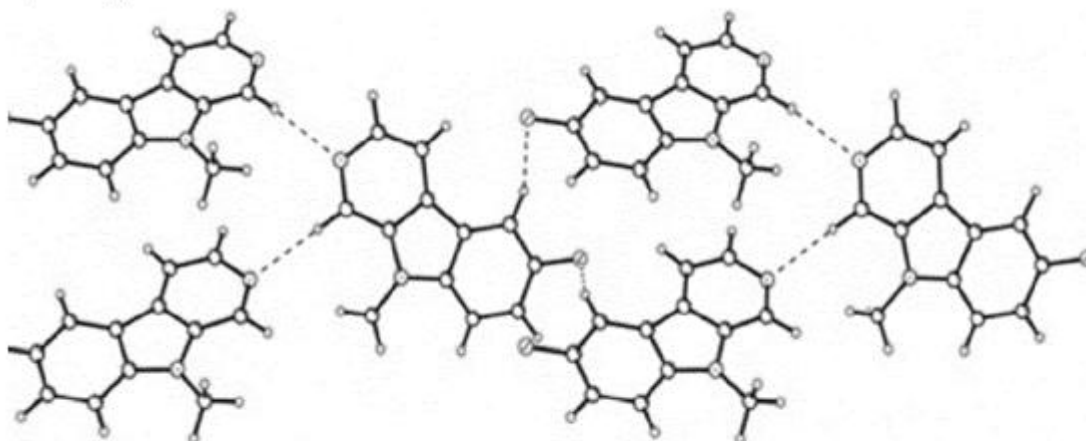
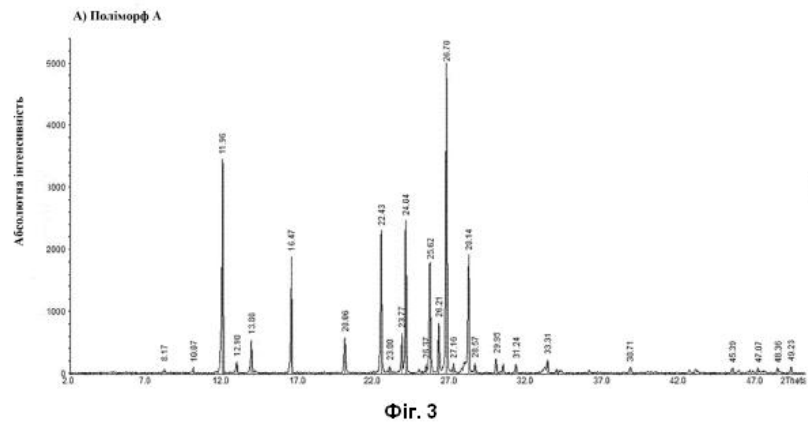
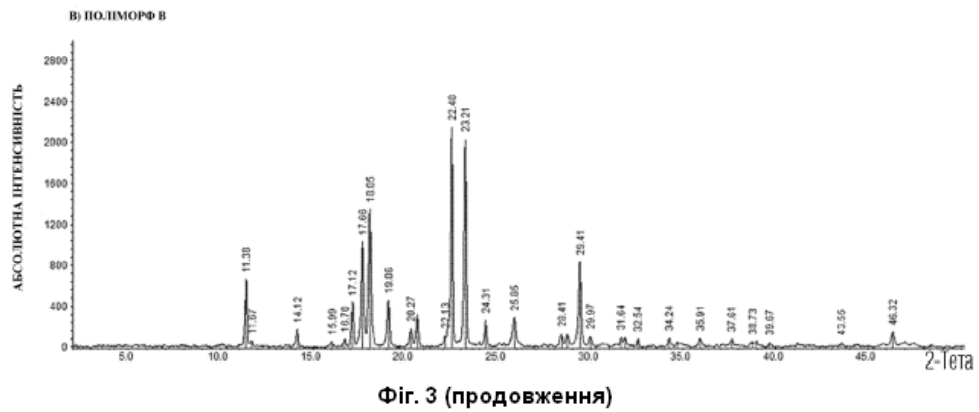


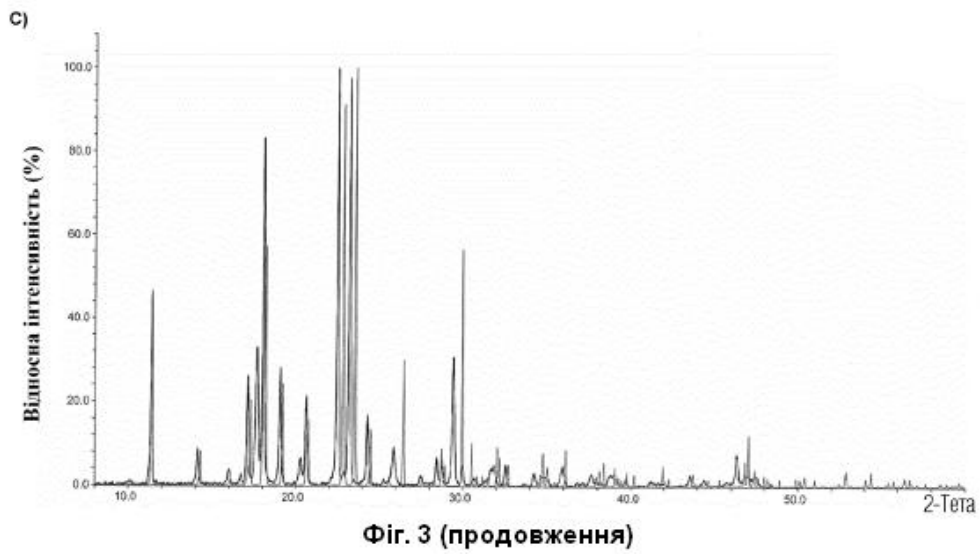
Fig. 2 (продовження)



Фіг. 3



Фіг. 3 (продовження)



Фіг. 3 (продовження)

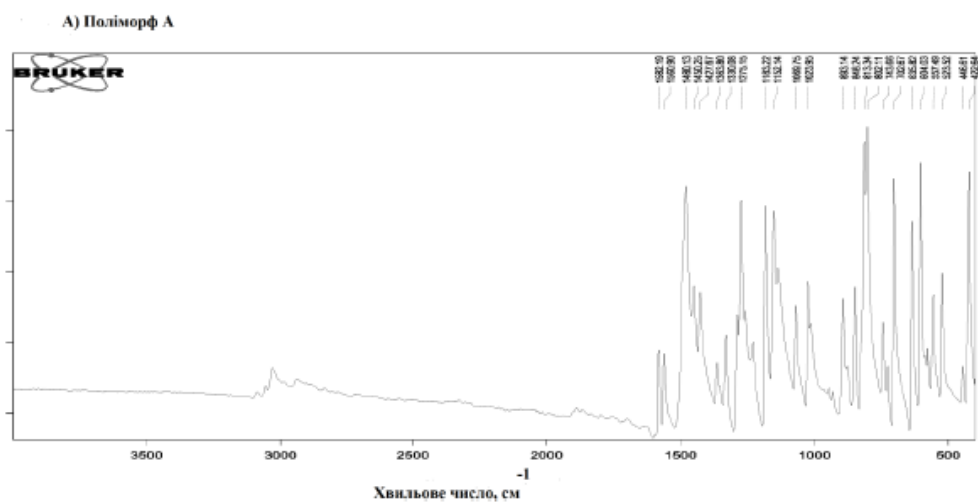


Fig. 4

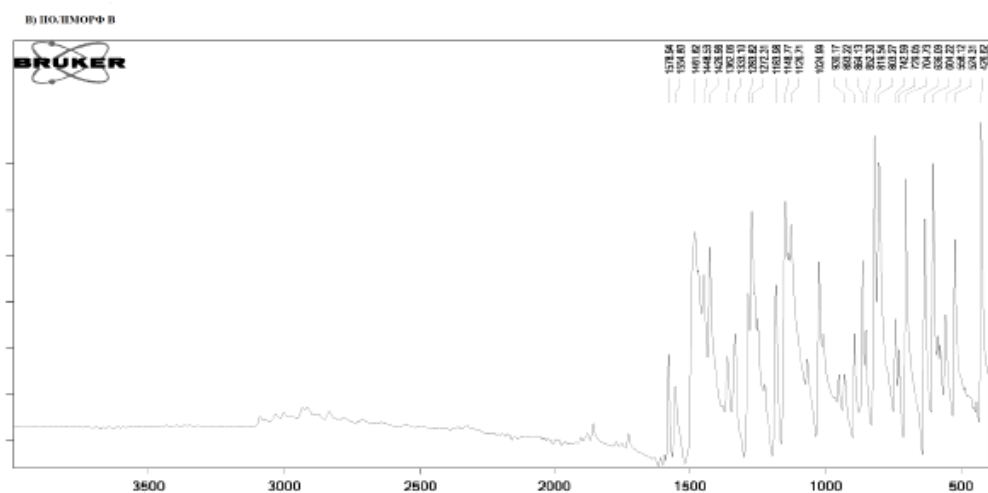


Fig. 4 (продовження)

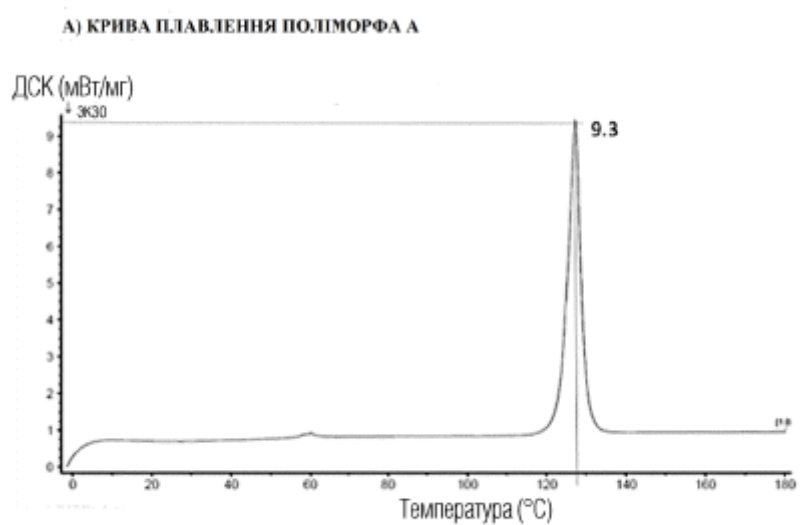
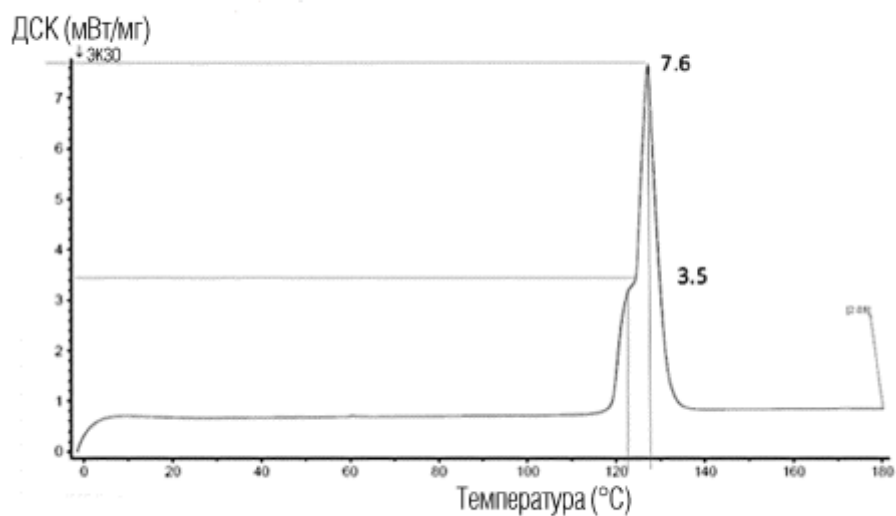


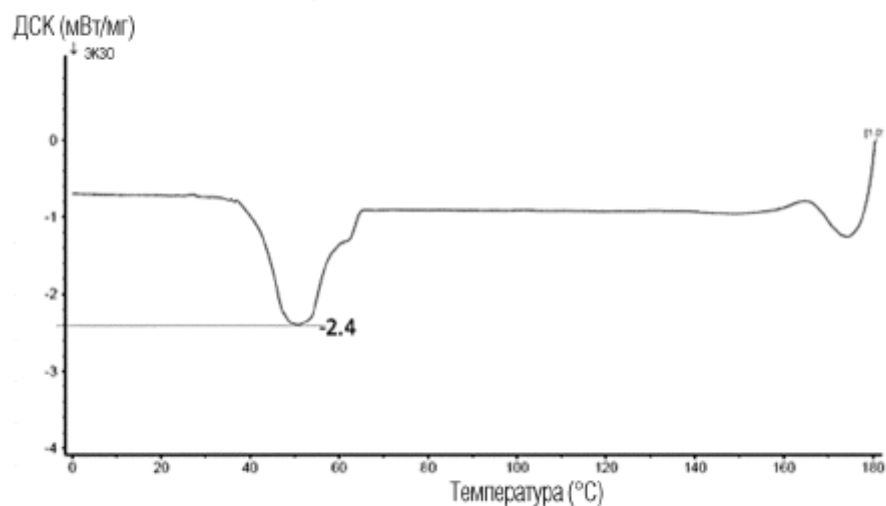
Fig. 5

В) КРИВА ПЛАВЛЕННЯ ПОЛІМОРФА В

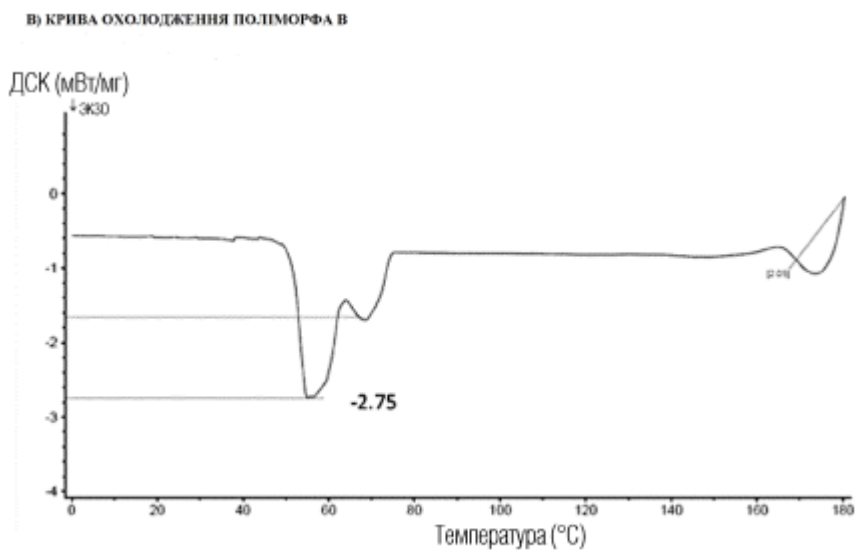


Фіг. 5 (продовження)

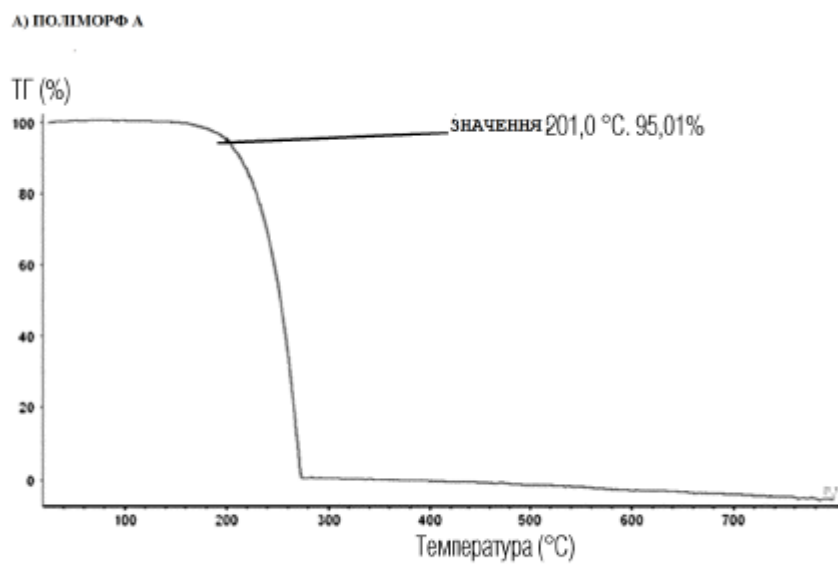
А) КРИВА ОХОЛОДЖЕННЯ ПОЛІМОРФА А



Фіг. 6

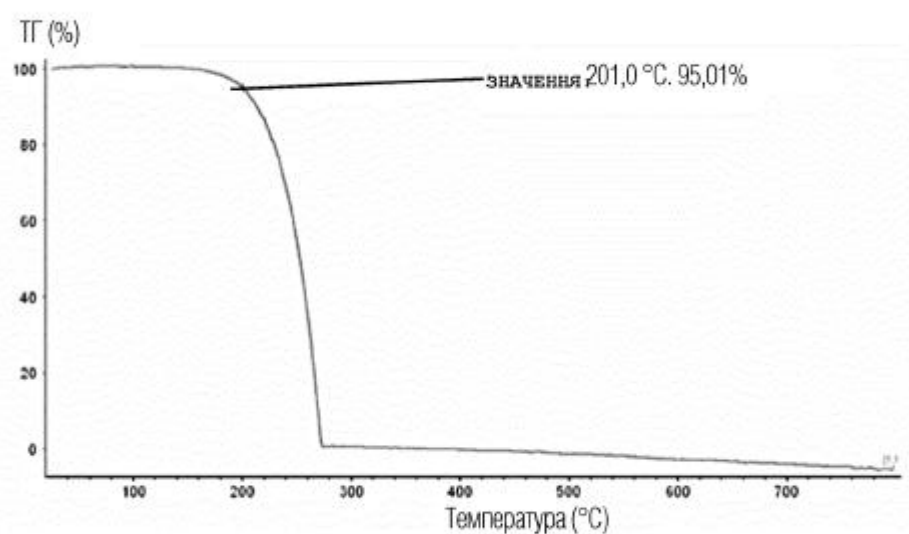


Фіг. 6 (продовження)



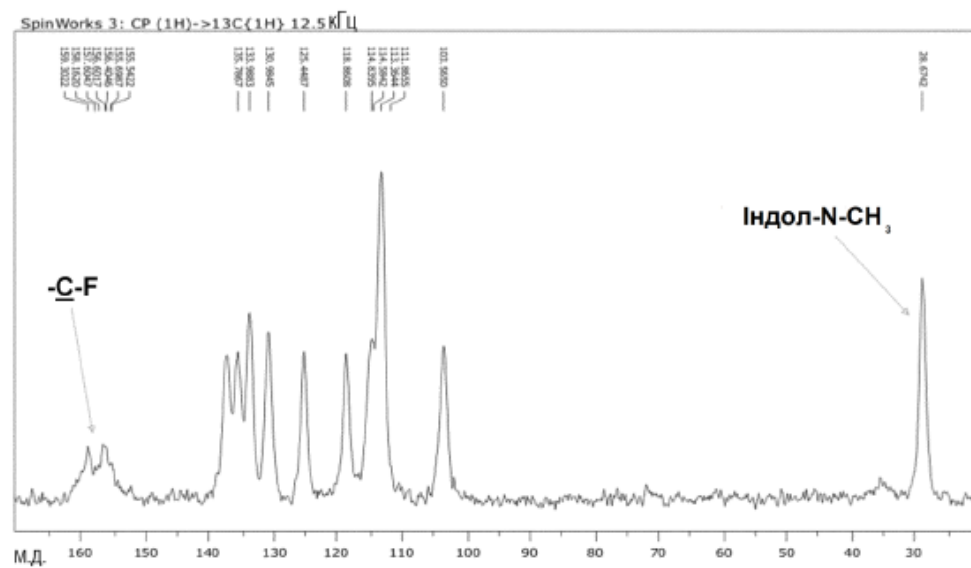
Фіг. 7

В) ПОЛІМОРФ В

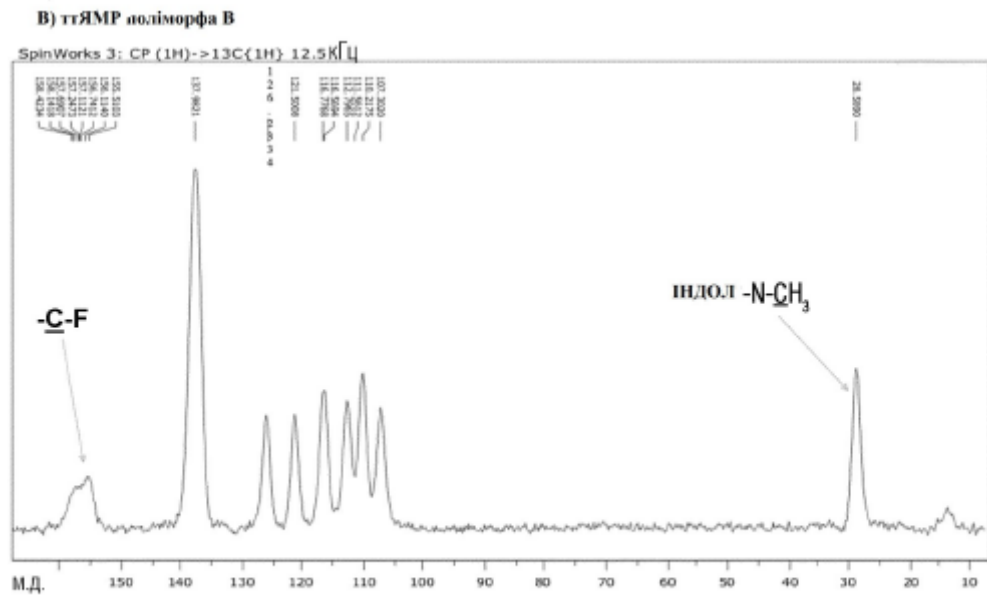


Фіг. 7 (продовження)

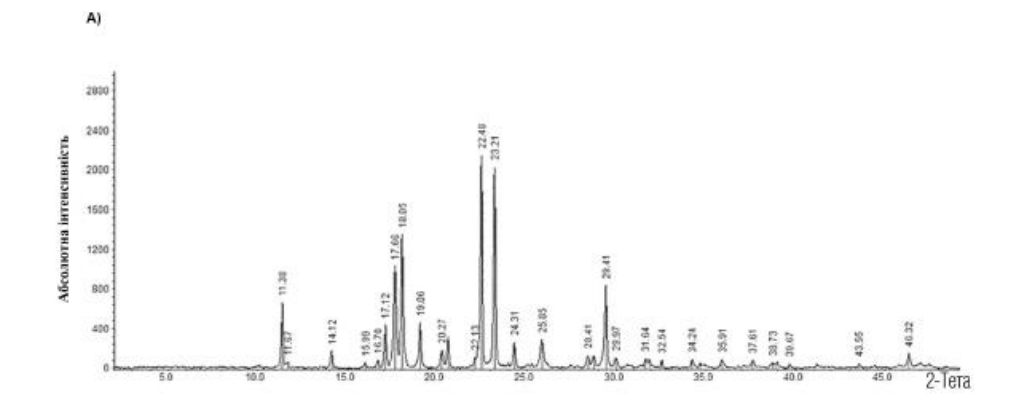
А) ТТЯМР ПОЛІМОРФА А



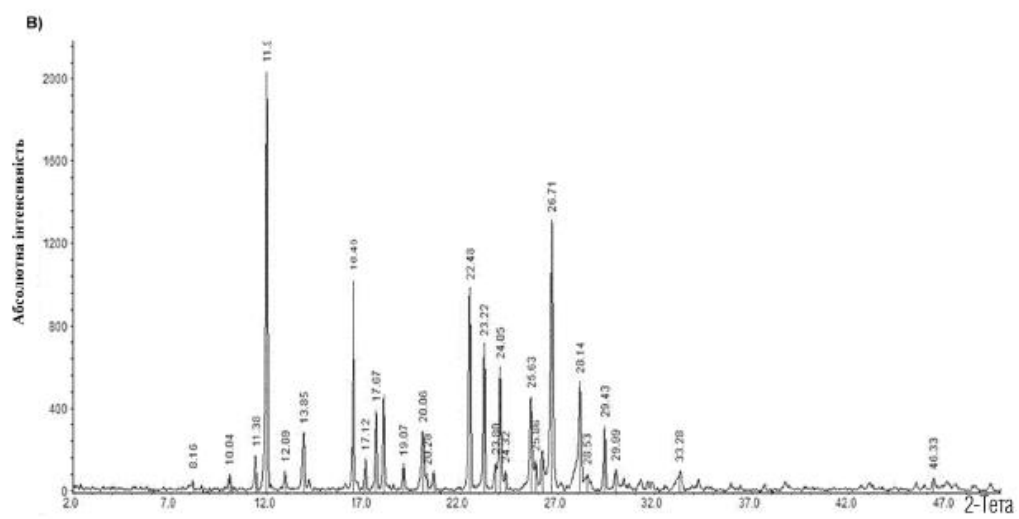
Фіг. 8



Фіг. 8 (продовження)



Фіг. 9

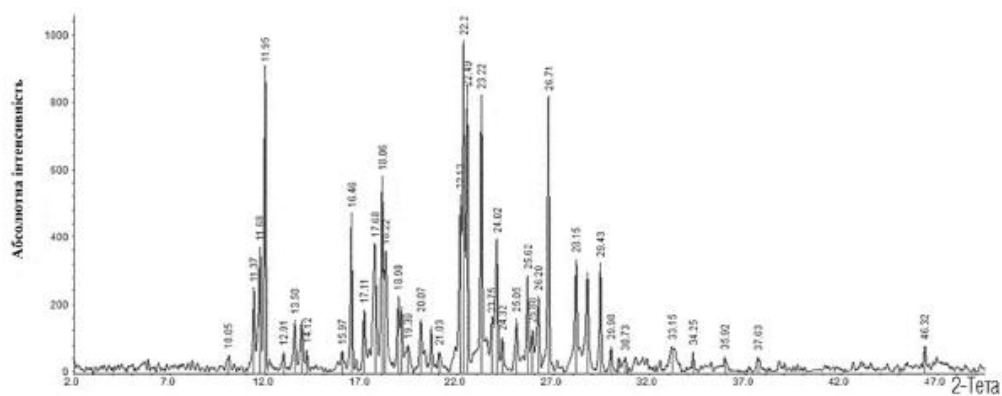


Фіг. 9 (продовження)

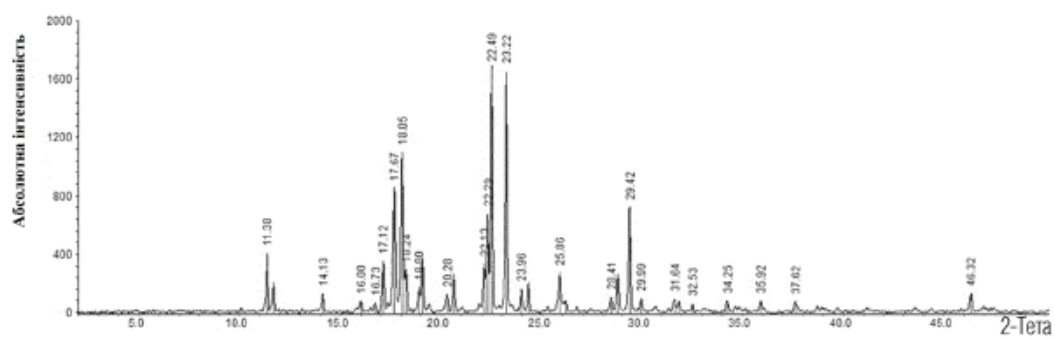
c)



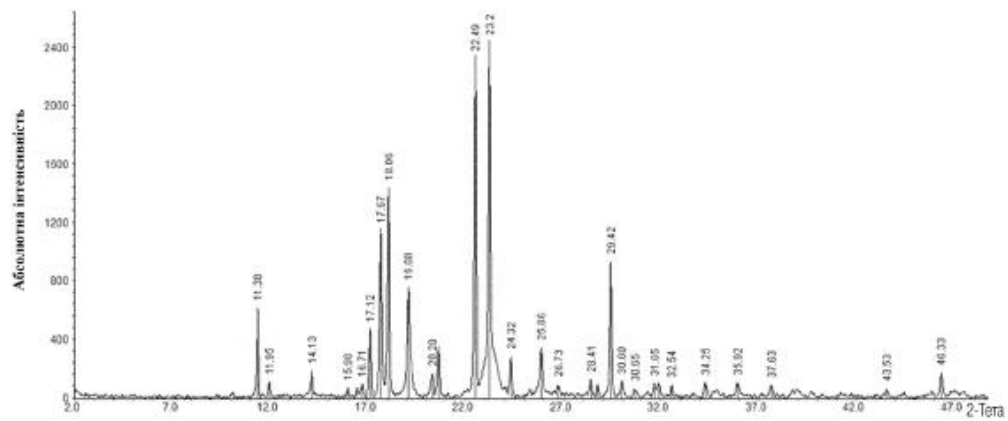
Фіг. 9 (продовження)



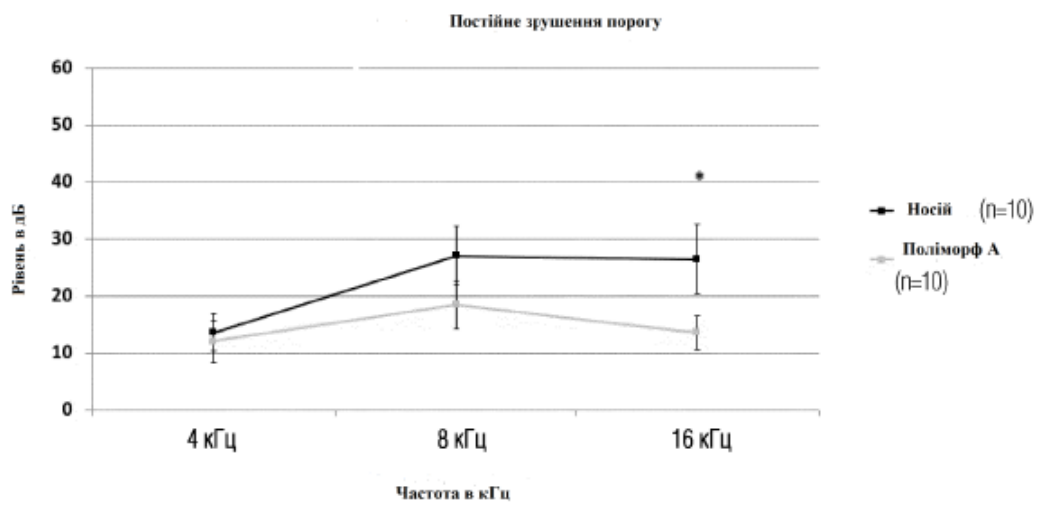
Фіг. 10



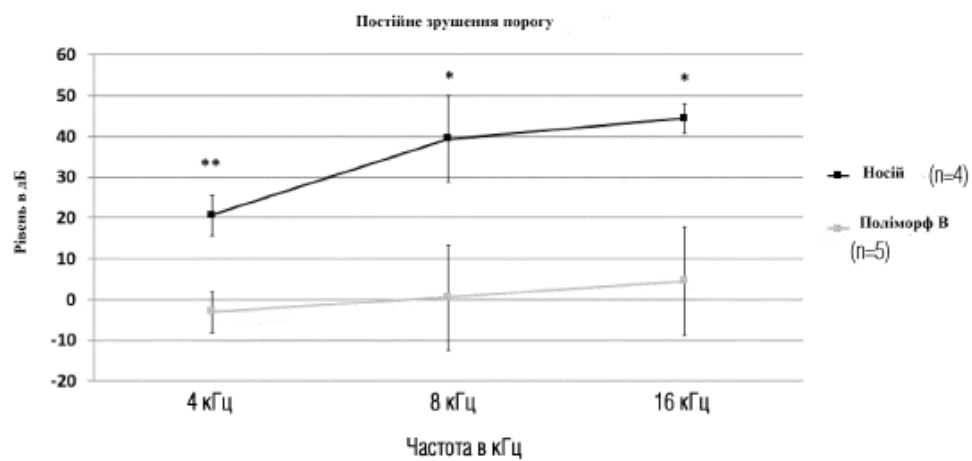
Фіг. 11



Фіг. 12



Фіг. 13



Фіг. 14

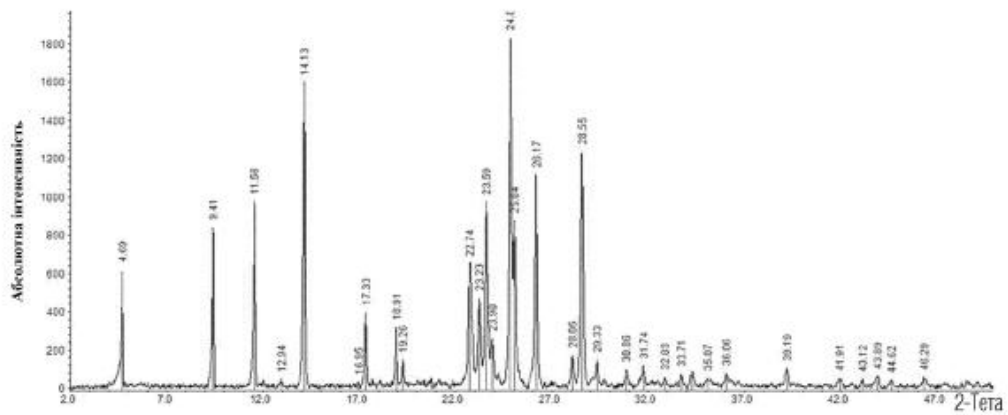


Fig. 15

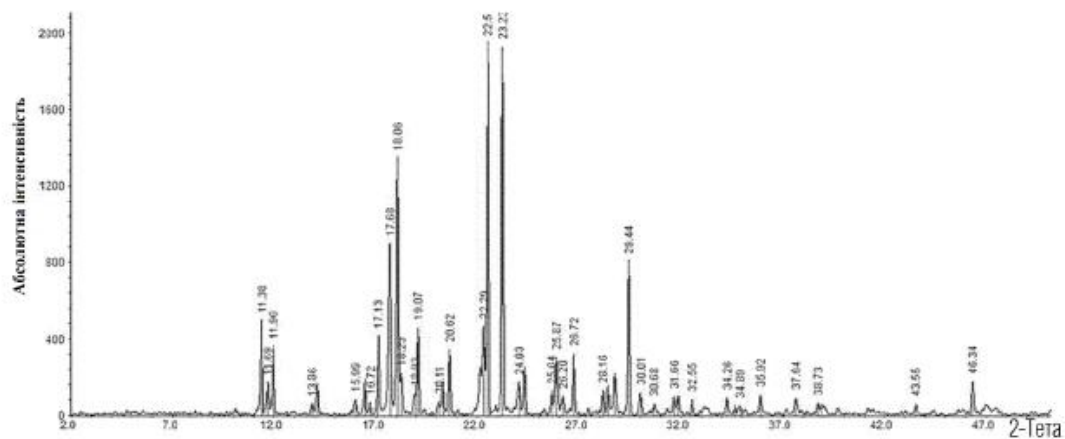


Fig. 16