(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0041070
(43) 공개일자 2025년03월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07F 9/572 (2006.01) *A61K 31/675* (2006.01)
A61K 47/36 (2017.01) *A61K 47/38* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) *A61K 9/16* (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01) *A61K 9/48* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) *A61P 25/24* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07F 9/5728 (2013.01)
A61K 31/675 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2025-7007706(분할)
(22) 출원일자(국제) 2018년10월09일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2020-7012821
원출원일자(국제) 2018년10월09일
심사청구일자 2021년10월07일
(85) 번역문제출일자 2025년03월07일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2018/057811
(87) 국제공개번호 WO 2019/073379
국제공개일자 2019년04월18일
(30) 우선권주장
1716505.1 2017년10월09일 영국(GB)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
컴퍼스 패쓰파인더 리미티드
영국 더블유에이14 2디티 체셔 올트리엄 애슐리 로드 1 써드 플로어
(72) 발명자
론데스브로 데릭 존
영국 티에스26 9큐에이 더럼 하틀풀 린든 그로브 37
브라운 크리스토퍼
영국 엔이9 6티와이 타인 앤 위어 게이츠헤드 체리트리 가든 30
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인(유한)케이비케이

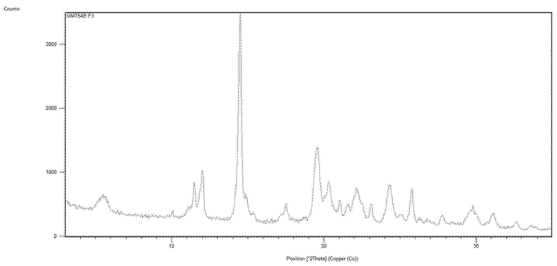
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 **실로시빈의 제조, 상이한 다형 형태, 중간체, 제제 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 의약에 사용하기 위한 실로시빈의 대규모 생산에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 고순도 결정질 실로시빈을 특히 다형체 A의 형태로 수득하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 실로시빈 및 이의 제조에서의 중간체의 제조 방법 및 실로시빈을 함유하는 제제에 관한 것이다.

대 표 도 - 도7a



(52) CPC특허분류
A61K 47/36 (2013.01)
A61K 47/38 (2013.01)
A61K 9/0053 (2013.01)
A61K 9/1652 (2013.01)
A61K 9/2054 (2013.01)
A61K 9/4866 (2013.01)
A61P 25/00 (2018.01)
A61P 25/24 (2018.01)
A61P 25/28 (2018.01)
(72) 발명자
노턴 줄리안 스캇
영국 엔이33 4티에이치 타인 앤 위어 사우스 쉴즈 헵스콧 테라스 36
무어 질리언
영국 티에스21 2제이비 더럼 세지필드 맷펜 코트 22
파틸 헤만트
영국 엠이11 5이엘 켄트 퀸버러 노스 로드 에이시카 파마슈티컬스 리미티드 내
니콜스 데이비드
미국 27517 노스캐롤라이나 채플 힐 내쉬 56702

(30) 우선권주장
1810588.2 2018년06월28일 영국(GB)
1816438.4 2018년10월09일 영국(GB)

명 세 서

청구범위

청구항 1

다음 중 하나 이상을 특징으로 하는 다형체 A 또는 다형체 A' 형태의 결정질 실로시빈:

a. 11.5, 12.0 및 14.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도에서의 피크;

b. 11.5, 12.0 및 14.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도에서의 피크, 19.7, 20.4, 22.2, 24.3 또는 25.7° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 적어도 하나의 추가 피크를 추가적인 특징으로 함;

c. 도 7a 또는 7b에 실질적으로 도시된 바와 같은 XRPD 회절도; 또는

d. 도 8a 또는 8b에 실질적으로 도시된 바와 같은 205 내지 220℃ 사이의 개시 온도를 갖는 DSC 써모그램에서의 흡열 이벤트.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

210 내지 215℃ 사이의 개시 온도를 갖는 DSC 써모그램에서의 흡열 이벤트를 추가적인 특징으로 하는 다형체 A 또는 다형체 A' 형태의 결정질 실로시빈.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

다음 중 하나 이상을 특징으로 하는 다형체 A 형태의 결정질 실로시빈:

a. 11.5, 12.0, 14.5 및 17.5, ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도에서의 피크;

b. 11.5, 12.0, 14.5 및 17.5, ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도에서의 피크, 19.7, 20.4, 22.2, 24.3 또는 25.7° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 적어도 하나의 추가 피크를 추가적인 특징으로 함;

c. 도 7a에 실질적으로 도시된 바와 같은 XRPD 회절도; 또는

d. 도 8a에 실질적으로 도시된 바와 같은 205 내지 220℃ 사이의 개시 온도를 갖는 DSC 써모그램에서의 흡열 이벤트.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

17.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 피크가 14.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 피크와 비교하여 적어도 5%의 상대 강도를 갖는 것인 다형체 A 형태의 결정질 실로시빈.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

다음 중 하나 이상을 특징으로 하는 다형체 A' 형태의 결정질 실로시빈:

a. 11.5, 12.0 및 14.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도에서의 피크, 그러나 17.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 피크가 없거나 실질적으로 없음;

b. 11.5, 12.0 및 14.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도에서의 피크, 그러나 17.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 피크가 없거나 실질적으로 없음, 19.7, 20.4, 22.2, 24.3 또는 25.7° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 적어도 하나의 추가 피크를 추가적인 특징으로 함;

c. 도 7b에 실질적으로 도시된 바와 같은 XRPD 회절도; 또는

d. 도 8b에 실질적으로 도시된 바와 같은 205 내지 220℃ 사이의 개시 온도를 갖는 DSC 써모그램에서의 흡열 이벤트.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

17.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 임의의 피크가 14.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 피크와 비교하여 5% 미만의 상대 강도를 갖는 것인 다형체 A' 형태의 결정질 실로시빈.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

다음 중 하나를 가지는 것을 추가적인 특징으로 하는 다형체 A 또는 다형체 A' 형태의 결정질 실로시빈:

ii) <0.5% w/w의 수분 함량; 또는

iii) 25℃와 같은 주위 온도 내지 200℃ 사이의 TGA 써모그램에서 <0.5% w/w 손실.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서,

HPLC에 의한 97% 초과의 화학적 순도를 가지며, ^{31}P NMR에 의해 측정된 인산 및 HPLC에 의해 측정된 실로신을 포함하여 1%를 초과하는 단일 불순물이 없는 것인 다형체 A 또는 다형체 A' 형태의 결정질 실로시빈.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서,

결정질 실로시빈은 백색 내지 회백색 고체인 다형체 A 또는 다형체 A' 형태의 결정질 실로시빈.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

도 10 내지 13 중 어느 하나 이상에 따르는 스펙트럼을 포함하는 것인 다형체 A 또는 다형체 A' 형태의 결정질 실로시빈.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,

표 9의 6번 내지 13번 중 하나 이상의 품질 속성의 허용 기준을 포함하는 것인 다형체 A 또는 다형체 A' 형태의 결정질 실로시빈.

청구항 12

제 1 항 내지 제 4 항 및 제 7 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 따른 결정질 실로시빈 다형체 A를 적어도 100g 포함하는 배치.

청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 따른 다형체 A 또는 다형체 A' 형태의 결정질 실로시빈을 포함하는 약학적 제제.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

경구 제제인 약학적 제제.

청구항 15

제 13 항 또는 제 14 항에 있어서,

다형체 A 또는 다형체 A' 형태의 결정질 실로시빈이 0.01mg/kg 내지 1mg/kg의 용량을 제공하는 양으로 존재하는 것인 약학적 제제.

청구항 16

제 13 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서,

하나 이상의 부형제를 포함하는 것인 약학적 제제.

청구항 17

제 16 항에 있어서,

하나 이상의 부형제가 미세결정질 셀룰로스 또는 전분을 포함하는 것인 약학적 제제.

청구항 18

제 16 항에 있어서,

하나 이상의 부형제가 규화된 미세결정질 셀룰로스를 포함하는 것인 약학적 제제.

청구항 19

의약에 사용하기 위한 제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 따른 다형체 A 또는 다형체 A' 형태의 결정질 실로시빈.

청구항 20

중추 신경계 장애의 치료에 사용하기 위한 제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 따른 다형체 A 또는 다형체 A' 형태의 결정질 실로시빈.

청구항 21

약물 내성 우울증의 치료에 사용하기 위한 제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 따른 다형체 A 또는 다형체 A' 형태의 결정질 실로시빈.

청구항 22

제어된 건조와 함께, 실로시빈(12)을 수 결정화 단계에 적용하여 제 1 항 내지 제 4 항 및 제 7 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항의 결정질 실로시빈 다형체 A를 제조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 다형체 A 형태의 실로시빈(12)의 대규모 제조 방법.

청구항 23

의약에 사용하기 위한 다형체 A(12A) 형태의 결정질 실로시빈.

청구항 24

약물 내성 우울증의 치료에 사용하기 위한 다형체 A(12A) 형태의 결정질 실로시빈.

청구항 25

다형체 A(12A) 형태의 결정질 실로시빈의 유효량을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 약물 내성 우울증의 치료 방법.

청구항 26

다형체 A(12A) 형태의 실로시빈(12)의 대규모 제조 방법으로서, 제어된 건조와 함께, 실로시빈(12)을 수 결정화 단계에 적용하여 다음 중 하나 이상을 특징으로 하는 결정을 제조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방

법:

a. 11.5, 12.0, 14.5 및 17.5, ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도에서의 피크;

b. 11.5, 12.0, 14.5 및 17.5, ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도에서의 피크, 19.7, 20.4, 22.2, 24.3 또는 25.7° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 적어도 하나의 추가 피크를 추가적인 특징으로 함;

c. 도 7a에 실질적으로 도시된 바와 같은 XRPD 회절도; 또는

d. 도 8a에 실질적으로 도시된 바와 같은 205 내지 220℃ 사이의 개시 온도를 갖는 DSC 써모그램에서의 흡열 이벤트.

청구항 27

제 26 항에 있어서,

실로시빈은 약 10-20부피의 물에서 재결정화되고, 적어도 70℃의 온도로 교반하면서 가열되고, 폴리싱 여과되고, 약 70℃의 온도에서 시딩되고, 및 2시간 초과의 기간에 걸쳐 약 5℃로 냉각되는 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 의약에 사용하기 위한 실로시빈의 대규모(large scale) 생산에 관한 것이다.

[0002] 대규모란, 10g 초과, 보다 바람직하게는 100g 초과, 보다 더 바람직하게는 250g 초과 및 Kg 수준 이상의 중량을 갖는 실로시빈의 배치를 제조하는 것을 의미한다.

[0003] 또한, 실로신을 포함하나 이에 제한되지 않는 중간체의 제조, 등구조 변이체를 포함하는 상이한 다형 형태의 실로시빈 및 의약, 특히, 전적으로는 아니지만, 디지털적으로 제공될 수 있는 심리적 지원과 조합하여 또는 단독으로, 진단 및 통계 매뉴얼(Diagnostic and Statistical Manual) 제 5 판에 정의된 것과 같은 치료 내성 우울증의 치료에 사용하기 위한 이들의 제제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0004] 실로시빈은 1958년 샌도즈(Sandoz)에 의해 처음 합성되었으며, GB912714 및 US3075992 참조, 1960년대 중반까지 연구 화학물질로서 널리 이용 가능하였다.

[0005] 식물계 환각제는 기분 장애 및 알코올성 장애의 치료를 위한 심리치료의 보조제로 사용되어 왔으며 최근 3개의 임상 시험에서 우울 증상에 대한 이의 사용이 보고되었다.

[0006] 그리피스 등(Griffiths et al) 2016; J Psychopharmacol 30(12):1181-1197;

[0007] 로즈 등(Ross et al) 2016; J Psychopharmacol 30(12):1165-1180; 및

[0008] 카하르트-해리스 등(Carhart-Harris et al) 2016, Lancet Psychiatry 3(7):619-627.

[0009] 실로시빈의 제조 방법은 제한되며 다음을 포함한다:

[0010] J Nat Prod 2003, 66, pages 885-887;

[0011] Helv Chim Acta 1959, 42, 2073-2103;

[0012] Experientia 1958, 15, 397-399; 및

[0013] Synthesis 1999, 935-938.

[0014] 이 문헌에 기초하여 출원인은 J Nat Prod 2003, 66, pages 885-887(이하 JNP)에 개시된 방법이 상업적 규모 공정으로의 개발을 위한 가장 적합한 방법이라고 믿었다.

[0015] 여기에 개시된 방법은 10g 정도의 양을 생산하였으며 (i) 내지 (vi)으로 번호가 붙은 6단계를 포함하였다.

[0016] 출원인 공정과의 유사점에 의하여, 단계 ii 및 iii은 이하에서 단일 단계인 *(단계 2)*로서 논의되고 JNP 공정은 본 명세서에서 도 1과 같이 재현된다.

[0017] *단계 1(i)*은 피리딘 및 무수 디클로로메탄(CH_2Cl_2) 중 4-하이드록시인돌("3")과 아세트산 무수물(Ac_2O)을 0℃에서 반응시키는 것을 포함한다. 물을 첨가하고, 혼합물을 증발시키고, 생성된 농축물을 에틸 아세테이트에 용해시키고, 물로 세척하고, 염화나트륨으로 포화시키고, 유기 상을 황산나트륨상에서 건조시키고 증발시켜 4-아세틸인돌("4")을 수득하였으며, 이를 여과로 수집하고 물 및 에틸 아세테이트로 세척하였다.

[0018] *단계 2(ii 및 iii)*, 2-단계 아실화(ii)-아미드화 단계(iii)는, 다음에 의해 3-디메틸아미노옥살일-4-아세틸인돌("6")을 형성하는 것을 포함하였다: (ii) 4-아세틸인돌("4")을 무수 디에틸에테르에서 옥살일 클로라이드($(COCl)_2$)와 반응시키고, 교반하고, n-헥산을 첨가하고 -20℃에서 유지하여 여과에 의해 분리된 중간체 3-(2-클로로-2-옥소아세틸)-1H-인돌-4-일 아세테이트("5")를 생성하였다. 중간체를 무수 테트라하이드로푸란(THF)에 용해시키고 테트라하이드로푸란 및 피리딘에서 디메틸아민($(CH_3)_2NH$)과 반응시켰다. 무수 에테르를 고화로 인해 첨가하고, 반응 생성물을 여과로 분리하고 n 헥산, 에틸 아세테이트 및 물로 세척하여 3-디메틸아미노옥살일-4-아세틸인돌("6")을 수득하였다.

[0019] *단계 3(iv)*은 아르곤 분위기 하에서 무수 THF에서 3-디메틸아미노옥살일-4-아세틸인돌("6")을 리튬 알루미늄 하이드라이드($LiAlH_4$)와 반응시킴으로써 실로신("1")을 형성하는 단계를 포함하였다. 환류 및 냉각 후, 무수 소듐 설페이트에 이어서 소듐 설페이트 용액 및 추가의 무수 소듐 설페이트를 첨가하였다. 반응 혼합물을 에틸 아세테이트로 희석하고, 진공에서 빠르게 농축시키고, 생성된 실로신 결정을 메탄올로 간단히 세척하였다.

[0020] *단계 4(v)*는 무수 THF에 용해된 실로신을 -78℃의 n-헥산에서 n-부틸 리튬(n-BuLi) 및 테트라벤질피로포스페이트[$(BnO)_2PO]_2O$와 반응시켜 벤질[2-(4-옥시인돌-3-일)에틸]디메틸암모늄-4-O-벤질 포스페이트("8")을 형성하는 것을 포함하였으며, 반응을 0℃로 가온하고, 중간체 디벤질 3-[2-(디메틸아미노)에틸]-1H-인돌-4-일 포스페이트("7")의 생성을 모니터링하였다. 이의 존재를 확인한 후, 아미노프로필 실리카 겔을 첨가하고, 혼합물을 에틸 아세테이트로 희석하고 셀라이트 패드를 통해 흡인 여과하고, 여과액을 진공에서 농축시키고, CH_2Cl_2에서 재용해시키고, 여과에 의해 침전물을 수집하였다.

[0021] *단계 5(vi)*는 팔라듐-활성화 탄소 촉매(Pd/C)를 사용하여 메탄올(MeOH) 중 수소(H_2)와 ("8")의 반응에 의한 실로실빈("2")의 형성을 포함하였다. 생성물 침착으로 인해 물을 첨가하고, ("8"), 이의 모노 탈벤질화된 유도체를 실로시빈의 외관과 함께 모니터링하고, 반응 용액을 셀라이트 패드를 통해 여과하였다. 생성물을 여과로 수집하고 에탄올로 세척하여 190℃-198℃의 융점을 갖는 백색 바늘 결정질 형태를 생성하였다.

[0022] 메탄올 또는 에탄올과 같은 비수성 용매를 사용하는 JNP와 같은 대부분의 공정과 달리, Experientia 1958, 15, 397-399는 물로부터 단일 재결정화를 사용하여 버섯 추출로부터 실로시빈을 수득하였다. 교시는 크로마토그래피에 의해 소규모로 얻은 출발 물질을 용해시키기 위해 끓는 물을 사용하는 것이었으며, 생성된 고진공 건조 물질은 185 내지 195℃ 사이에서 불명료하게 용융되는 것으로 언급되었으며, 25.4%의 중량 손실을 나타내어, 순도 및 형태에 있어 출원인에 의해 얻어진 것과 명백히 상이하다는 것을 나타내었다.

[0023] 실로시빈을 제조하기 위한 합성의 개발 동안, 출원인은 5g 규모로 다수의 수소화 반응을 수행하여 상이한 결정질 형태의 실로시빈을 수득하였다. 초기 수소화 반응은 도 7d에 도시된 XRPD 회절도 및 도 8d에 도시된 DSC 및 TGA 써모그램을 나타내는 수화물 A(JCCA2157E)를 산출하였다. DSC는 ~97℃에서 흡열을 나타내며, 이는 탈수를 나타내는 TGA의 중량 감소와 일치하며, 용융물로 추정되는 ~216℃의 개시 온도를 갖는 흡열 이벤트를 나타낸다. 또 다른 수소화 반응은 XRPD(도 7e), DSC(도 8e), TGA(도 8e) 및 ^1H NMR에 의해 분석될 때 11% 포집된 에탄올을 나타내는 에탄올 용매화물(JCCA2158D)을 산출하였다. DSC 써모그램은 TGA에서 ~13% 중량 손실과 동시에 용융된 것으로 보이는 ~154℃의 개시를 갖는 흡열을 나타낸다. 개발 동안 수행된 다른 실험에서, 출원인은 실로시빈의 결정화를 수행하였다; 광택 여과 단계를 가능하게 하는 뜨거운 물의 용액에 남아 있지 않고, 침전이 고온(>90℃)에서 일어났다. 형성된 고체는 추가 가열 또는 여분의 물의 첨가시 재용해되지 않았다. 냉각 및 고체 분리시(CB646E) XRPD를 수행하였다. XRPD 회절도(도 7f)는 다형체 A'(JCCA2160-F-D4) 및 다형체 B(JCCA2160-F-TM2-C5)의 혼합 상을 제안하였다. 이들 발견은 원하는 결정질 형태를 일관되게 생성할 수 있는 공정을 개발하는 것의 중요성을 강조하므로, 출원인은 이러한 형태가 약제에 사용하기에 적합한 제어된 형태로 화학적으로 순수한 실로시빈을 생성할 수 있는 순서를 결정하기 위해 실험에 대해 설정하였다.

[0024] 임상 시험의 경우, 임의의 새로운 활성 물질(NAS)은 인간 대상에게 투여될 활성량에 따라 대규모 생산(일반적으로 100g+, 보다 일반적으로는 250g 초과, 보다 더 바람직하게는 500g 초과 내지 Kg+ 배치)이 가능해야 한다. 또

한 이는 화학적으로 순수하고, 잘 정의되며, 보관시 안정적이어야 한다.

[0025] 또한, 임의의 제조 방법은 쉽게 재현할 수 있어야 하고 배치 대 배치 일관성을 제공해야 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0026] 본 발명의 첫 번째 목적은 인간 대상에게 투여하기 위한 일관된 다형 형태의 실로시빈을 제공하는 것이다.

[0027] 본 발명의 다른 목적은 인간 대상에게 투여하기 위한, 일관된 다형 형태의 화학적으로 순수한 실로시빈을 제공하는 것이다.

[0028] 상업적 사용의 경우 순수한 실로시빈이 규모로 생산되어야 하기 때문에, 대규모 배치 양으로, 화학적으로 순수한 실로시빈을 제공하는 것이 또 다른 목적이다.

[0029] 본 발명의 또 다른 목적은 원하는 다형 형태로 실로시빈을 결정화하는 방법을 제공하는 것이다.

[0030] 본 발명의 또 다른 목적은 실로신 또는 4 하이드록시-인돌로부터 실로시빈을 제조하기 위한 스케일러블 방법을 제공하는 것이다.

[0031] 적합한 방법론을 개발함에 있어서, 출원인은 극복해야할 수 많은 문제점 및 어려움을 겪었으며, 각 단계에서 식별된 문제점을 극복하고 본 발명을 단독으로 또는 조합하여 사용하는 것이 별개의 독립적인 목적이다.

[0032] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 실로시빈을 인간 대상에게 투여하기에 적합한 형태로 제제화하고 이를 의약, 특히 중추 신경계 장애(CNS)의 치료, 보다 특히, 전적으로는 아니지만, 단독으로 또는 디지털 건강 제품 또는 디지털 솔루션과 함께 우울증의 치료, 특히 약물 내성 우울증의 치료에 사용하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0033] 본 발명의 제 1 양태에 따르면, 다음 중 하나 이상을 특징으로 하는 다형체 A 또는 다형체 A' 형태의 결정질 실로시빈이 제공된다:

[0034] a. 11.5, 12.0 및 14.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도에서의 피크;

[0035] b. 11.5, 12.0 및 14.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도에서의 피크, 19.7, 20.4, 22.2, 24.3 또는 25.7° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 적어도 하나의 추가 피크를 추가적인 특징으로 함;

[0036] c. 도 7a 또는 7b에 실질적으로 도시된 바와 같은 XRPD 회절도; 또는

[0037] d. 도 8a 또는 8b에 실질적으로 도시된 바와 같은 205 내지 220℃ 사이의 개시 온도를 갖는 DSC 써모그램에서의 흡열 이벤트.

[0038] 다형체 A

[0039] 본 발명의 바람직한 일 실시태양에 따르면, 다음 중 하나 이상을 특징으로 하는 다형체 A 형태의 결정질 실로시빈이 제공된다:

[0040] a. 11.5, 12.0, 14.5 및 17.5, ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도에서의 피크;

[0041] b. 11.5, 12.0, 14.5 및 17.5, ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도에서의 피크, 19.7, 20.4, 22.2, 24.3 또는 25.7° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 적어도 하나의 추가 피크를 추가적인 특징으로 함;

[0042] c. 도 7a에 실질적으로 도시된 바와 같은 XRPD 회절도; 또는

[0043] d. 도 8a에 실질적으로 도시된 바와 같은 205 내지 220℃ 사이의 개시 온도를 갖는 DSC 써모그램에서의 흡열 이벤트.

[0044] 17.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 피크는 14.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 피크와 비교하여 적어도 5%, 바람직하게는 적어도 6%, 보다 더 바람직하게는 적어도 7%, 8% 내지 9% 내지 적어도 10%의 상대 강도를 가진다.

[0045] 일 실시태양에서, 실로시빈 다형체 A는 표 1에 요약된 회절도를 특징으로 하는 XRPD 회절도를 나타낸다. 본 발명에 기재된 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 표 1의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 3개의 피크를 포함한다. 본 발명에 기재된 특정 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 표 1의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 4개의 피

크를 포함한다. 본 발명에 기재된 특정 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 표 1의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 5개의 피크를 포함한다. 본 발명에 기재된 특정 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 표 1의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 6개의 피크를 포함한다. 본 발명에 기재된 특정 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 표 1의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 8개의 피크를 포함한다. 본 발명에 기재된 특정 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 표 1의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 10개의 피크를 포함한다. 본 발명에 기재된 특정 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 표 1의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 15개의 피크를 포함한다. 약 17.5, ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 피크는 실로시빈 다형체 A를 다형체 A'와 구별하며, 다형체 A'에서 피크가 없거나 실질적으로 없다(즉, 14.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 피크와 비교하여 2% 미만, 보다 바람직하게는 1% 미만의 상대 강도를 가진다).

표 1

[0046] 다형체 A에 대한 XRPD 피크 위치

위치 [° 2Th.]	상대 강도 [%]
5.6	8.42
11.5	13.05
12.0	26.45
14.5	100
17.5	10.71
19.7	37.29
20.4	20.06
22.2	17.83
23.2	6.99
24.3	17.93
25.7	16.4
26.8	3.15
27.8	4.54
29.7	9.53
31.2	6.51
32.6	2.45
33.7	1.75

[0047] 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 11.5, 12.0, 14.5 및 17.5° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도 피크를 특징으로 한다. 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 19.7, 20.4, 22.2, 24.3 또는 25.7° 2Θ±0.1° 2Θ에 나타나는 적어도 하나의 추가 피크를 추가적인 특징으로 한다. 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 19.7, 20.4, 22.2, 24.3 또는 25.7° 2Θ±0.1° 2Θ에서 나타나는 적어도 2개의 추가 피크를 추가적인 특징으로 한다. 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 19.7, 20.4, 22.2, 24.3 또는 25.7° 2Θ±0.1° 2Θ에서 나타나는 적어도 3개의 추가 피크를 추가적인 특징으로 한다. 또 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 도 7a에 도시된 XRPD 회절도와 실질적으로 동일한 XRPD 회절도를 나타낸다.

[0048] 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 14.5 및 17.5° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도 피크를 특징으로 하며, 17.5° 2Θ에서의 피크는 14.5° 2Θ에서의 피크 강도의 적어도 5%, 보다 더 바람직하게는 적어도 6%, 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9% 내지 적어도 10%인 강도를 갖는다.

[0049] 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 10.1에서의 XRPD 회절도 피크가 없거나 실질적으로 없다. 실질적으로 없다는 것은 10.1에서의 임의의 XRPD 회절도 피크가 14.5° 2Θ에서의 피크 강도의 2% 미만, 예를 들어 1% 미만이거나 XRPD 회절도에서 검출될 수 없는 것을 의미한다.

[0050] 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 205 내지 220℃, 예를 들어 210 내지 220℃, 예를 들어 210 내지 218℃, 또는 예를 들어 210 내지 216℃의 개시 온도를 갖는 DSC 써모그램에서의 흡열 이벤트를 특징으로 한다. 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 145 내지 165℃, 예를 들어 145 내지 160℃, 또는 145 내지 155℃의 개시 온도를 갖는 DSC 써모그램에서의 흡열 이벤트를 추가적인 특징으로 한다. 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 205 내지 220℃, 예를 들어 210 내지 220℃, 예를 들어 210 내지 218℃, 또는 210 내지 216℃의 개시 온도를 갖는 흡열 이벤트 및 DSC 써모그램에서 145 내지 165℃, 예를 들어 145 내지 160℃, 또는 예를 들어 145 내지 155℃의 개시 온도를 갖는 흡열 이벤트를 특징으로 한다. 또 다른 실시태양에서, 결정질

실로시빈 다형체 A는 도 8a의 DSC 써모그램과 실질적으로 동일한 DSC 써모그램을 나타낸다.

[0051] 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 <0.5% w/w, 예를 들어 <0.4% w/w, 예를 들어 <0.3% w/w, 예를 들어 <0.2% w/w, 또는 <0.1% w/w의 수분 함량을 갖는 것을 특징으로 한다. 당업자는 화합물의 수분 함량을 결정하는 방법, 예를 들어 칼 피셔 적정법을 알 것이다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 약 25℃와 같은 주위 온도 내지 200℃ 사이의 TGA 써모그램에서 <0.5% w/w 손실, 예를 들어 <0.4% w/w, 예를 들어 <0.3% w/w, 예를 들어 <0.2% w/w, 예를 들어 <0.1% w/w를 갖는 것을 특징으로 한다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 건조 손실 테스트에서 2중량% 미만, 예를 들어 1중량% 미만, 예를 들어 0.5중량% 미만을 잃는다. 건조 손실 테스트는 70℃에서 수행된다.

[0052] 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 매우 순수한 결정질 형태의 다형체 A, 예를 들어, 실로시빈은 적어도 90중량%, 예를 들어 95중량%, 예를 들어 99중량%, 예를 들어 99.5중량%의 다형체 A를 포함한다.

[0053] 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 백색 내지 회백색 고체이다.

[0054] 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 화학적으로 순수하고, 예를 들어, 실로시빈은 HPLC에 의해 97% 초과, 예를 들어 98% 초과, 또는 99% 초과의 화학적 순도를 갖는다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 ^{31}P NMR에 의해 측정된 인산 및 HPLC에 의해 측정된 실로신을 포함하여 1% 초과의 단일 불순물을 갖지 않으며, 보다 바람직하게는 0.5% 미만이다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 HPLC에 의한 97면적% 초과, 보다 바람직하게는 98면적% 초과, 가장 바람직하게는 99면적% 초과의 화학적 순도를 갖는다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 HPLC에 의해 측정될 때 1면적% 초과의 단일 불순물을 갖지 않으며, 보다 바람직하게는 0.5면적% 미만이다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 HPLC에 의해 측정될 때 1면적% 초과 수준의 실로신을 함유하지 않으며, 보다 바람직하게는 0.5면적% 미만이다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 ^{31}P NMR에 의해 측정될 때 1중량% 초과의 수준으로 인산을 함유하지 않으며, 보다 바람직하게는 0.5중량% 미만이다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A는 적어도 95중량%, 예를 들어 적어도 96중량%, 또는 예를 들어 적어도 98중량%의 화학적 분석을 갖는다.

[0055] 다형체 A'

[0056] 본 발명의 다른 실시태양에 따르면, 다음 중 하나 이상을 특징으로 하는 결정질 실로시빈 다형체 A'가 제공된다:

[0057] a. 11.5, 12.0 및 14.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도에서의 피크, 그러나 17.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 피크가 없거나 실질적으로 없음;

[0058] b. 11.5, 12.0 및 14.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도에서의 피크, 그러나 17.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 피크가 없거나 실질적으로 없음, 19.7, 20.4, 22.2, 24.3 또는 25.7° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 적어도 하나의 추가 피크를 추가적인 특징으로 함;

[0059] c. 도 7b에 실질적으로 도시된 바와 같은 XRPD 회절도; 또는

[0060] d. 도 8b에 실질적으로 도시된 바와 같은 205 내지 220℃ 사이의 개시 온도를 갖는 DSC 써모그램에서의 흡열 이벤트.

[0061] 존재하는 경우, 17.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 피크가 실질적으로 없다는 것은 피크가 14.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 피크와 비교하여 5% 미만, 보다 바람직하게는 4% 미만, 3% 미만, 내지 2%, 1% 또는 그 이하의 상대 강도를 가진다는 것을 의미한다.

[0062] 일 실시태양에서, 실로시빈 다형체 A'는 표 2에 요약된 회절도를 특징으로 하는 XRPD 회절도를 나타낸다. 일 실시태양에서, 본 발명에 기재된 결정질 실로시빈 다형체 A'는 표 2의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 3개의 피크를 포함하지만 17.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서 피크가 없거나 실질적으로 없다. 본 발명에 기재된 특정 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 표 2의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 4개의 피크를 포함하지만 17.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 피크가 없거나 실질적으로 없다. 본 발명에 기재된 특정 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 표 2의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 5개의 피크를 포함하지만 17.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 피크가 없거나 실질적으로 없다. 본 발명에 기재된 특정 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 표 2의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 6개의 피크를 포함하지만 17.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 피크가 없거나 실질적으로 없다. 본 발명에 기재된 특정 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 표 2의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 8개의 피크를 포함하지만 17.5 ° 2Θ±0.1° 2

Θ에서의 피크가 없거나 실질적으로 없다. 본 발명에 기재된 특정 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 표 2의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 10개의 피크를 포함하지만 17.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 피크가 없거나 실질적으로 없다. 본 발명에 기재된 특정 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 표 2의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 15개의 피크를 포함하지만 17.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 피크가 없거나 실질적으로 없다. 본 발명에 기재된 특정 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 표 2의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 20개의 피크를 포함하지만 17.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 피크가 없거나 실질적으로 없다. 본 발명에 기재된 특정 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 표 2의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 25개의 피크를 포함하지만 17.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 피크가 없거나 실질적으로 없다.

표 2

[0063] 다형체 A'에 대한 XRPD 피크 위치

위치 [° 2Th.]	상대 강도 [%]
5.5	4.89
10.1	4.09
11.5	22.05
12.0	22.77
14.5	100
14.9	11.29
17.5	1.08
18.7	2.44
19.4	23.02
19.6	33.7
20.3	17.01
21.1	12.08
21.6	8.51
22.2	15.54
22.6	8.78
23.1	10.11
24.3	21.83
25.1	4.36
25.8	15.4
26.3	4.28
26.8	2.86
27.8	5.96
28.6	1.91
29.7	10.56
31.1	7.35
32.6	3.72
33.8	1.54

[0064] 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 11.5, 12.0 및 14.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도 피크를 특징으로 하지만 17.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 피크는 실질적으로 없다. 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 19.7, 20.4, 22.2, 24.3 또는 25.7° 2Θ±0.1° 2Θ에서 나타나는 적어도 하나의 추가 피크를 추가적인 특징으로 한다. 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 19.7, 20.4, 22.2, 24.3 또는 25.7° 2Θ±0.1° 2Θ에서 나타나는 적어도 2개의 추가 피크를 추가적인 특징으로 한다. 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 추가로 특성화되고, 10.1° 2Θ±0.1° 2Θ에서 나타나는 피크의 존재에 의해 다형체 A와 구별된다. 다른 추가 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 도 7b에 도시된 XRPD 회절도와 실질적으로 동일한 XRPD 회절도를 나타낸다.

[0065] 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 14.5 및 17.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도 피크를 특징으로 하며, 여기서 17.5 ° 2Θ에서의 피크 강도는 14.5 ° 2Θ에서의 피크 강도의 5% 미만, 예를 들어 4% 미만, 예를 들어 3% 미만, 예를 들어 2% 미만, 예를 들어 1% 미만, 또는 예를 들어 약 1%이다.

[0066] 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 10.1 및 14.5 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도 피크를 특징

으로 하며, 여기서 10.1° 2Θ에서의 피크 강도는 14.5 ° 2Θ에서의 피크 강도의 적어도 1%, 예를 들어 적어도 2%, 예를 들어 적어도 3%, 또는 예를 들어 약 4%이다.

[0067] 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 205 내지 220℃, 예를 들어 210 내지 220℃, 예를 들어 210 내지 218℃, 또는 예를 들어 210 내지 216℃의 개시 온도를 갖는 DSC 써모그램에서의 흡열 이벤트를 특징으로 한다. 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 145 내지 165℃, 예를 들어 145 내지 160℃, 또는 145 내지 155℃의 개시 온도를 갖는 DSC 써모그램에서의 흡열 이벤트를 추가적인 특징으로 한다. 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 205 내지 220℃, 예를 들어 210 내지 220℃, 예를 들어 210 내지 218℃, 또는 210 내지 216℃의 개시 온도를 갖는 흡열 이벤트 및 DSC 써모그램에서 145 내지 165℃, 예를 들어 145 내지 160℃, 또는 예를 들어 145 내지 155℃의 개시 온도를 갖는 흡열 이벤트를 특징으로 한다. 또 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 도 8b의 DSC 써모그램과 실질적으로 동일한 DSC 써모그램을 나타낸다.

[0068] 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 <0.5% w/w, 예를 들어 <0.4% w/w, 예를 들어 <0.3% w/w, 예를 들어 <0.2% w/w, 또는 <0.1% w/w의 수분 함량을 갖는 것을 특징으로 한다. 당업자는 화합물의 수분 함량을 결정하는 방법, 예를 들어 칼 피셔 적정법을 알 것이다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 약 25℃와 같은 주위 온도 내지 200℃ 사이의 TGA 써모그램에서 <0.5% w/w 손실, 예를 들어 <0.4% w/w, 예를 들어 <0.3% w/w, 예를 들어 <0.2% w/w, 예를 들어 <0.1% w/w를 갖는 것을 특징으로 한다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 건조 손실 테스트에서 2중량% 미만, 예를 들어 1중량% 미만, 예를 들어 0.5중량% 미만을 잃는다. 건조 손실 테스트는 70℃에서 수행된다.

[0069] 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 매우 순수한 결정질 형태의 다형체 A', 예를 들어, 실로시빈은 적어도 90중량%, 예를 들어 95중량%, 예를 들어 99중량%, 예를 들어 99.5중량%의 다형체 A'를 포함한다.

[0070] 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 백색 내지 회백색 고체이다.

[0071] 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 화학적으로 순수하고, 예를 들어, 실로시빈은 HPLC에 의해 97% 초과, 보다 바람직하게는 98% 초과, 가장 바람직하게는 99% 초과의 화학적 순도를 갖는다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 ^{31}P NMR에 의해 측정된 인산 및 HPLC에 의해 측정된 실로신을 포함하여 1% 초과의 단일 불순물을 갖지 않으며, 보다 바람직하게는 0.5% 미만이다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 HPLC에 의한 97면적% 초과, 보다 바람직하게는 98면적% 초과, 가장 바람직하게는 99면적% 초과의 화학적 순도를 갖는다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 HPLC에 의해 측정될 때 1면적% 초과의 단일 불순물을 갖지 않으며, 보다 바람직하게는 0.5면적% 미만이다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 HPLC에 의해 측정될 때 1면적% 초과의 수준으로 실로신을 함유하지 않으며, 보다 바람직하게는 0.5면적% 미만이다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 ^{31}P NMR에 의해 측정될 때 1중량% 초과의 수준으로 인산을 함유하지 않으며, 보다 바람직하게는 0.5중량% 미만이다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A'는 적어도 95중량%, 예를 들어 적어도 96중량%, 또는 예를 들어 적어도 98중량%의 화학적 분석을 갖는다.

[0072] XRPD 회절도 및 XRPD 피크 위치는 Cu Ka 방사선을 사용하여 획득된다.

[0073] DSC 및 TGA 써모그램은 20℃/분의 가열 속도를 사용하여 획득된다.

[0074] 일 실시태양에서, 도 7a 또는 7b에 실질적으로 도시된 바와 같은 XRPD 회절도 및 도 8a 또는 8b 또는 이들의 혼합에 실질적으로 도시된 바와 같은 DSC 써모그래프를 나타내는 고순도 결정질 실로시빈, 다형체 A 또는 다형체 A'(12A 또는 12A')가 제공된다.

[0075] 바람직하게는 결정질 실로시빈 다형체 A(12A)는 도 7a에 도시된 바와 같은 XRPD 회절도 및 도 8a에 도시된 바와 같은 DSC 써모그래프를 나타낸다.

[0076] 바람직하게는 결정질 실로시빈 다형체 A'(12A')는 도 7b에 실질적으로 도시된 바와 같은 XRPD 회절도 및 도 8b에 실질적으로 도시된 바와 같은 DSC 써모그래프를 나타낸다.

[0077] 바람직하게는 고순도 결정질 실로시빈 다형체 A(12A)는 실질적으로 도 7a에 도시된 바와 같은 XRPD 회절도 및 실질적으로 도 8a에 도시된 바와 같은 DSC 써모그래프를 특징으로 한다.

[0078] 바람직하게는 고순도 결정질 실로시빈 다형체 A(12A')는 도 7b에 도시된 바와 같은 XRPD 회절도 및 도 8b에 도시된 바와 같은 DSC 써모그래프를 특징으로 한다.

[0079] 다형체 A(이의 등구조 변이체 다형체 A' 포함)(도 7a 및 7b)는 다형체 B(도 7c), 수화물 A(도 7d) 및 에탄올 용

매화물(도 7e: 용매화물 A)과 상이하고, 일부 상이한 형태들 사이의 관계는 도 9에 도시되어 있다.

[0080] 결정질 실로시빈 다형체 A 또는 다형체 A'는 백색 내지 회백색 고체이며, 및/또는 HPLC에 의한 97% 초과, 보다 바람직하게는 98% 초과, 가장 바람직하게는 99% 초과의 화학적 순도를 가지며, ^{31}P NMR에 의해 측정된 인산 및 HPLC에 의해 측정된 실로신을 포함하여 1% 초과의 단일 불순물을 갖지 않으며, 보다 바람직하게는 0.5% 미만이다. 일 실시태양에서, 고순도 결정질 실로시빈, 다형체 A 또는 다형체 A'가 제공된다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈, 다형체 A 또는 다형체 A'는 HPLC에 의해 97면적% 초과, 보다 바람직하게는 98면적% 초과, 가장 바람직하게는 99면적% 초과의 화학적 순도를 갖는다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈, 다형체 A 또는 다형체 A'는 HPLC에 의해 측정될 때 1면적% 초과의 단일 불순물을 갖지 않으며, 보다 바람직하게는 0.5면적% 미만이다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈, 다형체 A 또는 다형체 A'는 HPLC에 의해 측정될 때 1면적% 초과의 수준으로 실로신을 함유하지 않으며, 보다 바람직하게는 0.5면적% 미만이다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈, 다형체 A 또는 다형체 A'는 ^{31}P NMR에 의해 측정될 때 1중량% 초과의 수준으로 인산을 함유하지 않으며, 보다 바람직하게는 0.5중량% 미만이다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈, 다형체 A 또는 다형체 A'는 적어도 95중량%, 예를 들어 적어도 96중량%, 또는 예를 들어 적어도 98중량%의 화학적 분석을 갖는다.

[0081] 다형체 A 또는 A'의 가열은 다형체 A 또는 다형체 A'의 다형체 B로의 고체-고체 전이에 상응하는 약 150℃의 개시 온도를 갖는 흡열 이벤트를 초래한다. 생성된 고체, 즉 다형체 B의 연속 가열은 205 내지 220℃ 사이의 개시 온도를 갖는 융점에 상응하는 제 2 흡열 이벤트를 초래한다(도 8a 및 8b 참조).

[0082] 본 발명의 다른 독립적인 양태에 따르면, 다음 중 하나 이상을 특징으로 하는 결정질 형태의 실로시빈인 수화물 A가 제공된다:

[0083] a. 8.9, 12.6 및 13.8 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도에서의 피크;

[0084] b. 8.9, 12.6 및 13.8 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도에서의 피크, 6.5, 12.2, 19.4, 20.4 또는 20.8 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 적어도 하나의 추가 피크를 추가적인 특징으로 함;

[0085] c. 도 7d에 실질적으로 도시된 바와 같은 XRPD 회절도; 또는

[0086] d. 도 8d에 실질적으로 도시된 바와 같은 205 내지 220℃ 사이의 개시 온도를 갖는 DSC 써모그램에서의 흡열 이벤트.

[0087] 일 실시태양에서, 실로시빈 수화물 A는 표 3에 요약된 회절도를 특징으로 하는 XRPD 회절도를 나타낸다. 본 명세서에 기재된 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 수화물 A는 표 3의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 3개의 피크를 포함한다. 본 명세서에 기재된 특정 실시태양에서, 결정질 실로시빈 수화물 A는 표 3의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 4개의 피크를 포함한다. 본 발명에 기재된 특정 실시태양에서, 결정질 실로시빈 수화물 A는 표 3의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 5개의 피크를 포함한다. 본 발명에 기재된 특정 실시태양에서, 결정질 실로시빈 수화물 A는 표 3의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 8개의 피크를 포함한다. 본 발명에 기재된 특정 실시태양에서, 결정질 실로시빈 수화물 A는 표 3의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 10개의 피크를 포함한다.

표 3

[0088] 수화물 A에 대한 XRPD 피크 위치

위치 [° 2Th.]	상대 강도 [%]
5.6	14.4
6.5	18.84
8.9	100
12.2	11.51
12.6	18.65
13.8	44.22
16.2	21.22
18.9	6.62
19.4	38.68
20.4	21.32
20.8	19.73
21.5	20.75
22.3	12.8

22.5	19.38
23.1	47.53
23.5	25.79
24.3	5.62
24.8	14.62
25.4	5.27
26.9	6.53
27.9	7.82
28.4	5.78
29.0	5.09
29.7	4.83
32.1	8.27
32.8	4.81
33.4	3.74
34.2	5.96

[0089] 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 수화물 A는 8.9, 12.6 및 13.8 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도 피크를 특징으로 한다. 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 수화물 A는 6.5, 12.2, 19.4, 20.4 또는 20.8 ° 2Θ±0.1 ° 2Θ에서 나타나는 적어도 하나의 피크를 추가적인 특징으로 한다. 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 수화물 A는 6.5, 12.2, 19.4, 20.4 또는 20.8 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서 나타나는 적어도 2개의 피크를 추가적인 특징으로 한다. 또 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 수화물 A는 도 7d에 도시된 XRPD 회절도와 실질적으로 동일한 XRPD 회절도를 나타낸다.

[0090] 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 수화물 A는 205 내지 220℃, 예를 들어 210 내지 220℃, 예를 들어 210 내지 218℃, 또는 예를 들어 210 내지 216℃의 개시 온도를 갖는 DSC 써모그램에서의 흡열 이벤트를 특징으로 한다. 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 수화물 A는 또한 85 내지 105℃, 또는 예를 들어 90 내지 100℃의 개시 온도를 갖는 DSC 써모그램에서의 흡열 이벤트를 특징으로 한다. 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 수화물 A는 205 내지 220℃, 예를 들어 210 내지 220℃, 예를 들어 210 내지 218℃, 또는 예를 들어 210 내지 216℃의 개시 온도를 갖는 DSC 써모그램에서의 흡열 이벤트 및 85 내지 105℃, 또는 예를 들어 90 내지 100℃의 개시 온도를 갖는 DSC 써모그램에서의 흡열 이벤트를 특징으로 한다. 또 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 수화물 A는 도 8d의 DSC 써모그램과 실질적으로 동일한 DSC 써모그램을 나타낸다.

[0091] 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 수화물 A는 10 내지 18%, 예를 들어 12 내지 16%, 또는 예를 들어 약 13%의 수분 함량을 갖는 것을 특징으로 한다. 당업자는 화합물의 수분 함량을 결정하는 방법, 예를 들어 칼 피셔 적정법을 알 것이다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 수화물 A는 약 25℃와 같은 주위 온도 내지 120℃ 사이의 TGA 써모그램에서 10 내지 18%, 예를 들어 12 내지 16%, 또는 예를 들어 약 13%의 중량 손실을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0092] 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 수화물 A는 고순도의 수화물 A의 결정질 형태이고, 예를 들어, 실로시빈은 적어도 90중량%, 예를 들어 95%, 예를 들어 99%, 예를 들어 99.5%의 수화물 A를 포함한다. .

[0093] 본 발명의 다른 독립적인 양태에 따르면, 다음 중 하나 이상을 특징으로 하는 결정질 형태의 실로시빈인 다형체 B가 제공된다:

[0094] a. 11.1, 11.8 및 14.3 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도에서의 피크;

[0095] b. 11.1, 11.8 및 14.3 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도에서의 피크, 14.9, 15.4, 19.3, 20.0 또는 20.6 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 적어도 하나의 추가 피크를 추가적인 특징으로 함;

[0096] c. 도 7c에 실질적으로 도시된 바와 같은 XRPD 회절도; 또는

[0097] d. 도 8c에 실질적으로 도시된 바와 같은 205 내지 220℃ 사이의 개시 온도를 갖는 DSC 써모그램에서의 흡열 이벤트.

[0098] 일 실시태양에서, 실로시빈 다형체 B는 표 4에 요약된 회절도를 특징으로 하는 XRPD 회절도를 나타낸다. 일 실시태양에서, 본 발명에 기재된 결정질 실로시빈 다형체 B는 표 4의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 3개의 피크를 포함한다. 본 발명에 기재된 특정 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 B는 표 4의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 4개의 피

크를 포함한다. 본 발명에 기재된 특정 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 B는 표 4의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 5개의 피크를 포함한다. 본 발명에 기재된 특정 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 B는 표 4의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 8개의 피크를 포함한다. 본 발명에 기재된 특정 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 B는 표 4의 (±0.1° 2Θ)의 적어도 10개의 피크를 포함한다.

표 4

[0099] 다형체 B에 대한 XRPD 피크 위치

위치 [° 2Th.]	상대 강도 [%]
5.5	21.33
11.1	36.91
11.8	100.00
12.5	12.73
14.3	70.23
14.9	50.01
15.4	23.67
17.1	51.58
17.4	91.25
18.0	12.61
19.3	39.33
20.0	76.61
20.6	50.26
21.5	20.77
22.3	40.19
23.9	13.32
24.3	16.03
25.3	32.94
28.3	7.60
28.9	17.89
29.3	8.96
31.3	6.57
32.2	6.90
33.8	2.37

[0100] 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 B는 11.1, 11.8 및 14.3 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서의 XRPD 회절도 피크를 특징으로 한다. 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 B는 14.9, 15.4, 19.3, 20.0 또는 20.6 ° 2Θ±0.1 ° 2Θ에 나타나는 적어도 하나의 피크를 추가적인 특징으로 한다. 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 B는 14.9, 15.4, 19.3, 20.0 또는 20.6 ° 2Θ±0.1° 2Θ에서 나타나는 적어도 2개의 피크를 추가적인 특징으로 한다. 또 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 B는 도 7c에 도시된 XRPD 회절도와 실질적으로 동일한 XRPD 회절도를 나타낸다.

[0101] 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 B는 205 내지 220℃, 예를 들어 210 내지 220℃, 예를 들어 210 내지 218℃ 또는 예를 들어 210 내지 216℃의 개시 온도를 갖는 DSC 써모그램에서의 흡열 이벤트를 특징으로 한다. 또 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 B는 도 8c의 DSC 써모그램과 실질적으로 동일한 DSC 써모그램을 나타낸다.

[0102] 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 B는 <0.5% w/w, 예를 들어 <0.4% w/w, 예를 들어 <0.3% w/w, 예를 들어 <0.2% w/w 또는 예를 들어 <0.1% w/w의 수분 함량을 갖는 것을 특징으로 한다. 당업자는 화합물의 수분 함량을 결정하는 방법, 예를 들어 칼 피셔 적정법을 알 것이다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 B는 약 25℃와 같은 주위 온도 내지 200℃ 사이의 TGA 써모그램에서 <0.5% w/w 손실, 예를 들어 <0.4% w/w, 예를 들어 <0.3% w/w, 예를 들어 <0.2% w/w, 예를 들어 <0.1% w/w를 갖는 것을 특징으로 한다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 B는 건조 손실 테스트에서 2중량% 미만, 예를 들어 1중량% 미만, 예를 들어 0.5중량% 미만을 잃는다. 건조 손실 테스트는 70℃에서 수행된다.

[0103] 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 B는 매우 순수한 결정질 형태의 다형체 B, 예를 들어, 실로시빈은 적

어도 90중량%, 예를 들어 95중량%, 예를 들어 99중량%, 예를 들어 99.5중량%의 다형체 B를 포함한다.

[0104] 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 B는 화학적으로 순수하고, 예를 들어, 실로시빈은 HPLC에 의해 97% 초과, 예를 들어 98% 초과, 또는 99% 초과의 화학적 순도를 갖는다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 B는 ^{31}P NMR에 의해 측정된 인산 및 HPLC에 의해 측정된 실로신을 포함하여 1% 초과의 단일 불순물을 갖지 않으며, 보다 바람직하게는 0.5% 미만이다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 B는 HPLC에 의한 97면적% 초과, 보다 바람직하게는 98면적% 초과, 가장 바람직하게는 99면적% 초과의 화학적 순도를 갖는다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 B는 HPLC에 의해 측정될 때 1면적% 초과의 단일 불순물을 갖지 않으며, 보다 바람직하게는 0.5면적% 미만이다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 B는 HPLC에 의해 측정될 때 1면적% 초과 수준의 실로신을 함유하지 않으며, 보다 바람직하게는 0.5면적% 미만이다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 B는 ^{31}P NMR에 의해 측정될 때 1중량% 초과의 수준으로 인산을 함유하지 않으며, 보다 바람직하게는 0.5중량% 미만이다. 일 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 B는 적어도 95중량%, 예를 들어 적어도 96중량%, 또는 적어도 98중량%의 화학적 분석을 갖는다.

[0105] 다형체 A 또는 A' 형태의 본 발명의 실로시빈은 하기 표 5에 도시된 것과 같은 일반적인 특성을 갖는다:

표 5

[0106]

외관:	백색 내지 회백색 고체
DSC에서의 주요 흡열 이벤트(개시 온도)(용융에 해당):	210-215° C
흡습성:	실로시빈은 습도가 높고 물에 첨가될 때 수화물 A를 형성하지만 수화의 물은 건조시 빠르게 손실된다. 따라서 무수물 형태가 개발되고 있다.
결정질 형태:	무수 다형체 A 및/또는 A'
pKa (계산됨):	1.74, 6.71, 9.75
용해도	물에서 대략 15mg/ml

[0107] 실로시빈은 하기 표 6에 제시되고 도 10-13의 스펙트럼에 도시된 바와 같은 스펙트럼을 따른다.

표 6

[0108]

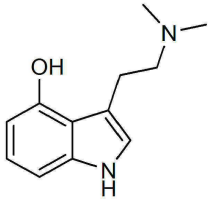
기술	결론
양성자(^{1}H) 및 탄소(^{13}C) NMR	양성자(도 10)와 탄소 스펙트럼(도 11)의 할당은 실로시빈과 일치한다.
FT-적외선 분광법(FT-IR)	FT-IR 스펙트럼(도 12)의 할당은 실로시빈과 일치한다.
질량 분석법(MS)	질량 스펙트럼(도 13)의 할당은 실로시빈과 일치한다.

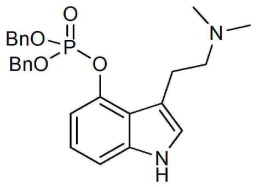
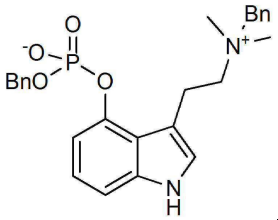
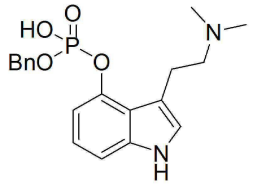
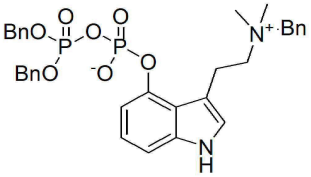
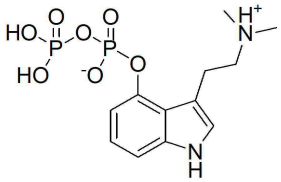
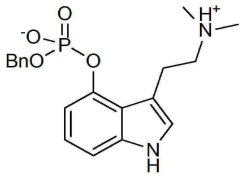
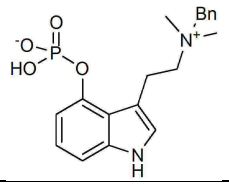
[0109] 잠재적인 유기 불순물이 현저하게 감소되도록 하기 위해 반응 조건의 신중한 제어에 의해 고순도가 달성된다.

[0110] 실로시빈에서 알려진 및 잠재적인 불순물이 하기 표 7에 제시되어 있다:

표 7

[0111]

불순물	상대 체류 시간 (RRT)	구조	기원
실로신	1.65		출발 물질 (단계 3). 또한 실로시빈의 가수분해에 의해 생성된다. 실로시빈 배치에서 관찰되는 오직 유의미한 불순물이다.

단계 4A			단계 4 반응에서 형성된 초기 생성물. THF에서 교반하면서 단계 4로 전환. 단계 5에서 실로시빈으로 전환.
단계 4	2.74		중간체
N-덴질화된 단계 4			단계 4에서 MS에 의해 식별됨. 단계 5에서 실로시빈으로 전환.
단계 4 무수 불순물			단계 4에서 MS에 의해 식별됨. 단계 5로 전환. 단계 5에서의 피로인산 불순물.
단계 5 피로인산 불순물			MS에 의해 식별됨. 단계 4 무수물에 의해 형성됨. 실로시빈에 대한 가수분해 및 여분의 인산염기로 인한 증가된 용해도의 조합에 의해 단계 6 재결정화에서 제거됨.
단계 5 (중간체)	1.89 및 2.45	 	2개의 중간체는 수소화 동안 형성된다. 이들은 나중에 생성물(화학에 기초한 구조)로 전환됨. 단계 5 반응에서 모니터되고 제어됨.

[0112] 유사하게, 신중한 처리는 용매 수준이 표 8에 나타낸 바와 같이 수준 이하로 유지되는 것을 보장한다.

표 8

[0113]

용매	다음으로 제어된다	화학 단계 용매는 다음에서 사용된다
메탄올	3000ppm	단계 5
에탄올	5000ppm	단계 5
THF	720ppm	단계 4
톨루엔	890ppm	단계 5에서 부산물로 생성

[0114] 작동 방법의 신중한 선택을 통해 본 발명의 실로시빈 약물 물질은 하기 표 9에 제시된 허용 기준을 만족시킨다:

표 9

[0115]

품질 속성	허용 기준	시험 방법
1. 외관	참조용.	시각
2. ^{1}H NMR	기준에 잘 필적함. 도 10	^{1}H NMR
3. ^{13}C NMR에 의한 식별	기준에 잘 필적함. 도 11	^{13}C NMR
4. MS에 의한 식별	기준에 잘 필적함. 도 12	MS
5. FT-IR에 의한 식별	기준에 잘 필적함. 도 13	FT-IR
6. 건조 손실	NMT 2% w/w	유럽 약전 2.2.32
7. 점화 잔류물	NMT 0.5% w/w	US 약전 <281>
8. 화학적 순도	NLT 97 면적%	HPLC
9. 약물 관련 불순물	단일 불순물 없음 NMT 1.0 면적%	HPLC
10. 분석(건조 기준)	95-103 중량%	HPLC
11. 잔류 용매 함량	메탄올 NMT 3000ppm 에탄올 NMT 5000ppm THF NMT 720ppm 톨루엔 NMT 890ppm	HRGC
12. 인산 함량	NMT 1% w/w	^{31}P NMR
13. ICP-MS에 의한 원소 분석	Cd NMT 1.5ppm Pb NMT 1.5ppm As NMT 4.5ppm Hg NMT 9.0ppm Co NMT 15ppm V NMT 30ppm Ni NMT 60ppm Li NMT 165ppm Pd NMT 30ppm	US 약전 <233>
14. 다형성	기준에 따름 도 7a	XRPD
15. 융점	결과 보고 도 8a	DSC

[0116] 표에서 사용된 약어: NMT=이하(not more than), NLT=이상(not less than).순도를 검증하기 위해 사용된 방법은 상세한 설명에서 제공된다.

[0117] 실제로, 하기 표 10에 나타낸 바와 같이, 기준 6-13은 실제로 훨씬 초과된다:

표 10

[0118]

품질 속성	허용 기준	일반적	시험 방법
1. 건조 손실		일반적으로 1% w/w 미만	유럽 약전 2.2.32
2. 점화 잔류물		일반적으로 0.2% w/w 미만	US 약전 <281>
3. 화학적 순도		일반적으로 NLT 99%	HPLC
4. 약물 관련 불순물	단일 불순물 없음 NMT 1.0%	RRT 1.49: 0.06% RRT 1.69(실로신): 0.39% RRT 1.70: 0.05% 기타 LT 0.05%: 0.22%	HPLC
5. 분석(건조 기준)	95 - 103	98.65%	HPLC

6. 잔류 용매 함량	메탄올 NMT 3000ppm 메탄올 NMT 5000ppm THF NMT 720ppm 톨루엔 NMT 890ppm	NMT 5 ppm NMT 10 ppm NMT 5 ppm NMT 5 ppm	HRGC
7. 인산 함량	NMT 1% w/w	0.2% 인산 없음(H_3PO_4) 이는 대략 0ppm에 옴	^{31}P NMR
8. ICP-MS에 의한 원소 분석	Cd NMT 1.5ppm Pb NMT 1.5ppm As NMT 4.5ppm Hg NMT 9.0ppm Co NMT 15ppm V NMT 30ppm Ni NMT 60ppm Li NMT 165ppm Pd NMT 30ppm	LT 0.5 ppm LT 0.5 ppm LT 1 ppm LT 1 ppm LT 5 ppm LT 20 ppm LT 10 ppm LT 20 ppm LT 5ppm	US 약전 <233>

[0119] 표에서 사용된 약어: NMT=이하(not more than), LT=미만(less than).

[0120] 따라서, 다형체 A 또는 다형체 A' 형태의 결정질 실로시빈은 양성자(^{1}H) 및 탄소(^{13}C) NMR, FT-적외선 분광법(FT-IR) 및 질량 분석법(MS)을 따르는 스펙트럼을 갖는다 - 도 10-13.

[0121] 이는 또한 표 9 또는 표 10에 지정된 기준 중 하나를 따른다.

[0122] 본 발명의 제 2 양태에 따르면, 본 발명의 제 1 양태에 따른 다형체 A 또는 다형체 A' 형태의 결정질 실로시빈의 배치가 제공된다. 일 실시태양에서, 적어도 10g, 보다 바람직하게는 적어도 100g, 가장 바람직하게는 적어도 250g을 포함하는 결정질 실로시빈, 다형체 A 또는 다형체 A'의 배치가 제공된다. 일 실시태양에서, 적어도 10g, 보다 바람직하게는 적어도 100g, 가장 바람직하게는 적어도 250g을 포함하는 결정질 실로시빈, 다형체 A 또는 다형체 A'의 배치가 제공된다. 일 실시태양에서, 적어도 10g, 보다 바람직하게는 적어도 100g, 가장 바람직하게는 적어도 250g을 포함하는 고순도 실로시빈의 배치가 제공된다. 일 실시태양에서, 적어도 10g, 보다 바람직하게는 적어도 100g, 가장 바람직하게는 적어도 250g을 포함하는 고순도 실로시빈 다형체 A의 배치가 제공된다. 일 실시태양에서, 적어도 10g, 보다 바람직하게는 적어도 100g, 가장 바람직하게는 적어도 250g을 포함하는 고순도 실로시빈 다형체 A'의 배치가 제공된다.

[0123] 대안적으로, 그리고 독립적으로, 결정질 실로시빈은 수화물 A 또는 다형체 B의 형태를 취할 수 있다.

[0124] 본 발명의 제 3 양태에 따르면, 결정질 실로시빈 및 하나 이상의 부형제를 포함하는 약학적 제제가 제공된다.

[0125] 일 실시태양에서, 고순도 실로시빈 및 하나 이상의 부형제를 포함하는 약학적 제제가 제공된다. 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A 및 하나 이상의 부형제를 포함하는 약학적 제제가 제공된다. 다른 실시태양에서, 결정질 실로시빈 다형체 A' 및 하나 이상의 부형제를 포함하는 약학적 제제가 제공된다. 다른 실시태양에서, 고순도 결정질 실로시빈, 다형체 A 또는 다형체 A' 및 하나 이상의 부형제를 포함하는 약학적 제제가 제공된다. 다른 실시태양에서, 고순도 결정질 실로시빈 다형체 A 및 하나 이상의 부형제를 포함하는 약학적 제제가 제공된다. 다른 실시태양에서, 고순도 결정질 실로시빈 다형체 A' 및 하나 이상의 부형제를 포함하는 약학적 제제가 제공된다.

[0126] 대안적으로, 그리고 독립적으로, 제제 중 결정질 실로시빈은 수화물 A 또는 다형체 B의 형태를 취할 수 있다.

[0127] 경구 제제를 위한 바람직한 약학적 부형제는 다음을 포함한다: 미세결정질 셀룰로스, 전분, 만니톨, 인산 수소 칼슘 무수물 또는 이산화규소, 탄산 칼슘, 미세결정질 셀룰로스 및 활석의 공동 혼합물과 같은 희석제; 나트륨 전분 글리콜레이트 또는 크로스카르멜로스 나트륨과 같은 붕해제; 포비돈, 코-포비돈 또는 하이드록시 프로필 셀룰로스와 같은 결합제; 스테아르산 마그네슘 또는 스테아릴 푸무르산 나트륨과 같은 윤활제; 콜로이드 이산화규소와 같은 활주제; 및 오파드리(Opadry) II 화이트 또는 PVA계 브라운 오파드리 II와 같은 필름 코팅.

[0128] 실로시빈은 여러 가지 이유로 제제화하기 어려운 활성이다. 첫째, 유동 특성이 열악하고, 둘째, 상대적으로 적은 용량으로 사용되므로 이의 조합은 정제에서의 함량 균일성을 보장하기가 어렵다.

[0129] 우수한 혼합은 15 미만, 보다 바람직하게는 10 미만의 허용 값(Acceptance Value), AV 값을 가질 것이다.

[0130] 이는 또한 90% 초과, 보다 바람직하게는 94% 초과의 %라벨 클레임을 가질 것이다.

[0131] 이들 사이에서 이들 파라미터는 정제 사이의 실로시빈의 일관된 투여를 나타낸다.

[0132] 대부분의 약학적 정제의 경우, 표준 부형제, 특히 충전제가 사용될 수 있다. 그러나, 실로시빈 정제를 제조하는 과정에서, 출원인은 만족스러운 생성물을 달성하기 위해 비표준 충전제가 바람직하다는 것을 발견하였다.

[0133] 이와 관련하여 기능성 충전제가 선택되었다. 기능성 충전제는 규화된 충전제, 바람직하게는 규화된 미세결정질 셀룰로스였다. 바람직한 형태는 약 45 내지 150마이크론의 입자 크기 범위를 갖는 높은 압축성 등급을 포함한다.

[0134] 실제로, 상이한 입자 크기 범위를 갖는 2개의 기능성 충전제의 혼합물이 큰 입자를 선호하는 2개의 wt 백분율과 함께 사용될 수 있다.

[0135] 일 실시태양에서, 규화된 미세결정질 충전제는 중량 기준으로 최대 30%, 보다 바람직하게는 최대 20%, 보다 더 바람직하게는 최대 15% 또는 그 이하의 양으로 약 45 내지 80마이크론의 입자 크기 범위를 갖는 제 1 충전제 및 최대 70%, 보다 바람직하게는 최대 80%, 보다 더 바람직하게는 최대 85% 또는 그 이상의 양으로 약 90 내지 150 마이크론의 입자 크기 범위를 갖는 제 2 충전제를 포함할 수 있다.

[0136] 제제는 붕해제, 바람직하게는 나트륨 전분 글리콜레이트, 활택제, 바람직하게는 콜로이드성 이산화규소 및 윤활제, 바람직하게는 나트륨 스테아릴 푸마레이트를 추가로 포함하거나 이로 이루어질 수 있다.

[0137] 제형 개발의 추가 세부 사항은 실시예 12에 제공된다.

[0138] 제제는 개시된 바람직한 다형 형태뿐만 아니라 임의의 형태의 실로시빈을 포함할 수 있음에 유의해야 한다.

[0139] Studerus et al(2011) J Psychopharmacol 25(11) 1434-1452는 다음과 같이 실로시빈의 경구 용량을 분류하였다: 0.045mg/kg에서의 매우 낮은 용량; 0.115-0.125mg/kg에서의 낮은 용량, 0.115-0.260mg/kg에서의 중간 용량 및 0.315mg/kg에서의 높은 용량.

[0140] 실로시빈은 일반적으로 0.01mg/kg 내지 1mg/kg의 양으로 제제화된 용량으로 존재할 것이다. 일반적인 인간 용량(체중 60-80kg의 성인)은 0.60mg 내지 80mg 사이의 용량과 같을 것이다. 일 실시태양에서, 2 내지 50mg의 결정질 실로시빈, 가장 바람직하게는 다형체 A 또는 다형체 A'는 예를 들어 2 내지 40mg, 예를 들어 2 내지 10mg, 예를 들어 5mg, 예를 들어 5 내지 30mg, 예를 들어 5 내지 15mg, 예를 들어 10mg, 예를 들어 20 내지 30mg, 또는 예를 들어 25mg과 같은 제제화된 용량으로 존재한다. 일 실시태양에서, 2 내지 50mg의 결정질 실로시빈, 특히 다형체 A는 예를 들어 2 내지 40mg, 예를 들어 2 내지 10mg, 예를 들어 5mg, 예를 들어 5 내지 30mg, 예를 들어 5 내지 15mg, 예를 들어 10mg, 예를 들어 20 내지 30mg, 또는 예를 들어 25mg과 같은 제제화된 용량으로 존재한다. 일 실시태양에서, 2 내지 50mg의 결정질 실로시빈, 특히 다형체 A'는 예를 들어 2 내지 40mg, 예를 들어 2 내지 10mg, 예를 들어 5mg, 예를 들어 5 내지 30mg, 예를 들어 5 내지 15mg, 예를 들어 10mg, 예를 들어 20 내지 30mg, 또는 25mg과 같은 제제화된 용량으로 존재한다.

[0141] 선호되는 성인 경구 용량은 1mg 내지 40mg, 바람직하게는 2 내지 30mg, 보다 바람직하게는 15 내지 30mg, 예를 들어 5mg, 10mg 또는 25mg의 범위일 수 있다. 일반적으로 이러한 용량의 약 10분의 1의 미세 투여는 일반적으로 0.05mg 내지 2.5mg의 범위 내에 있는 미세 투여 제제로 가능하다.

[0142] 바람직한 약학적 제제는 경구 제형이다.

[0143] 경구 제형은 정제 또는 캡슐일 수 있다.

[0144] 정제의 경우 활성 물질을 정확하게 분산시킬 수 있어야 한다. 이는 낮은 용량 및 활성 물질의 흡습성 및 끈적임 특성으로 인해 유동성을 제한하기 때문에 어렵다.

[0145] 실로시빈은 하나 이상의 부형제와 함께 존재할 것이다. 바람직한 부형제는 미세결정질 셀룰로스 및 전분, 보다 더 특히 규화된 미세결정질 셀룰로스를 포함한다.

[0146] 본 발명의 제 4 양태에 따르면, 의약에서 사용하기 위한 본 발명의 제 1 양태에 따른 다형체 A 또는 다형체 A' 형태의 결정질 실로시빈이 제공된다. 일 실시태양에서, 의약에 사용하기 위한 결정질 실로시빈 다형체 A가 제공된다. 일 실시태양에서, 의약에 사용하기 위한 결정질 실로시빈 다형체 A'가 제공된다. 일 실시태양에서, 의약

에 사용하기 위한 고순도 결정질 실로시빈 다형체 A가 제공된다. 일 실시태양에서, 의약에 사용하기 위한 고순도 결정질 실로시빈 다형체 A'가 제공된다.

[0147] 대안적으로, 그리고 독립적으로, 결정질 실로시빈은 수화물 A 또는 다형체 B의 형태를 취할 수 있다.

[0148] 본 발명의 제 5 양태에 따르면, 중추 신경계 장애의 치료에 사용하기 위한 본 발명의 제 1 양태의 다형체 A 또는 다형체 A' 형태의 결정질 실로시빈이 제공된다.

[0149] 대안적으로, 그리고 독립적으로, 결정질 실로시빈은 수화물 A 또는 다형체 B의 형태를 취할 수 있다.

[0150] 일 실시태양에서, 우울증 치료에 사용하기 위한 결정질 실로시빈, 다형체 A 또는 다형체 A'가 제공된다. 일 실시태양에서, 약물 내성 우울증 치료에 사용하기 위한 결정질 실로시빈, 다형체 A 또는 다형체 A'가 제공된다. 일 실시태양에서, 약물 내성 우울증의 치료에 사용하기 위한 결정질 실로시빈 다형체 A가 제공된다. 일 실시태양에서, 약물 내성 우울증의 치료에 사용하기 위한 결정질 실로시빈 다형체 A'가 제공된다. 일 실시태양에서, 약물 내성 우울증 치료에 사용하기 위한 고순도 결정질 실로시빈 다형체 A가 제공된다. 일 실시태양에서, 약물 내성 우울증을 치료하는데 사용하기 위한 고순도 결정질 실로시빈 다형체 A'가 제공된다.

[0151] 치료될 수 있는 다른 상태는 다음을 포함한다: 진행성 질환, 예를 들어 암의 불안을 포함한 불안 장애 및 일반 불안 장애, 주요 우울 장애를 포함한 우울증, 군발성 두통, 강박 장애, 행동 장애를 포함한 성격 장애, 알코올 장애, 니코틴 의존성, 오피오이드 의존성, 코카인 의존성을 포함한 약물 장애 및 도박 장애를 포함한 기타 중독, 식이 장애 및 신체 이상 장애. 또 다른 상태는 통증의 치료이다.

[0152] 본 발명의 제 6 양태에 따르면, 중추 신경계 장애의 치료를 필요로 하는 대상에게 본 발명의 제 1 양태에 따른 유효량의 다형체 A 또는 다 형체 A' 형태의 결정질 실로시빈을 투여하는 단계를 포함하는 중추 신경계 장애의 치료 방법이 제공된다.

[0153] 일 실시태양에서, 다형체 A 또는 다형체 A' 형태의 결정질 실로시빈의 유효량을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 우울증의 치료 방법이 제공된다. 일 실시태양에서, 다형체 A 또는 다형체 A' 형태의 결정질 실로시빈의 유효량을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 약물 내성 우울증의 치료 방법이 제공된다. 일 실시태양에서, 유효량의 실로시빈 다형체 A를 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 약물 내성 우울증의 치료 방법이 제공된다. 일 실시태양에서, 유효량의 실로시빈 다형체 A'를 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 약물 내성 우울증의 치료 방법이 제공된다. 일 실시태양에서, 유효량의 고순도 결정질 실로시빈 다형체 A를 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 약물 내성 우울증의 치료 방법이 제공된다. 일 실시태양에서, 유효량의 고순도 결정질 실로시빈 다형체 A'를 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 약물 내성 우울증의 치료 방법이 제공된다.

[0154] 대안적으로, 그리고 독립적으로, 결정질 실로시빈은 수화물 A 또는 다형체 B의 형태를 취할 수 있다.

[0155] 본 발명의 실로시빈을 생산하기 위해, 실로시빈은 제어된 방식으로 물로부터 결정화되었다.

[0156] 본 발명의 제 7 양태에 따르면, 본 발명의 제 1 양태에 따른 결정질 실로시빈 다형체 A를 제조하기 위해 제어된 건조와 함께, 실로시빈을 수 결정화 단계로 처리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 실로시빈의 대규모 제조 방법이 제공된다.

[0157] 일 실시태양에서, 도 7a에 도시된 바와 같이 XRPD 회절도 및 도 8a에 도시된 DSC 및 TGA 써모그래프를 갖는 결정질 실로시빈 다형체 A를 생산하기 위해, 제어된 건조와 함께, 실로시빈을 수 결정화 단계에 적용시키는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 실로시빈의 대규모 제조 방법이 제공된다. 일 실시태양에서, 고순도 결정질 실로시빈을 생성하기 위해, 제어된 건조와 함께, 실로시빈을 수 결정화 단계로 처리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 실로시빈의 대규모 제조 방법이 제공된다 - 도 7a에 도시된 바와 같은 XRPD 회절도 및 도 8a에 도시된 바와 같은 DSC 써모그램을 갖는 다형체 A.

[0158] 바람직하게는, 다형체 A는 도 7a에 도시된 바와 같은 XRPD 회절도 및 도 8a에 도시된 바와 같은 DSC 써모그래프를 갖는 등구조 변이체이다.

[0159] 보다 바람직하게는, 실로시빈은 일반적으로 약 10-20부피의 물에서 재결정화되고, 적어도 70℃의 온도로 교반하면서 가열되고, 적절한 컷오프(일반적으로, 5㎛ 미만)로 폴리싱 여과되고, 약 70℃의 온도에서 시딩되고, 및 2시간 초과의 기간에 걸쳐 제어된 방식으로 약 5℃로 냉각된다.

[0160] 보다 바람직하게는 상기 방법은 온도를 시간당 약 5℃-15℃, 보다 바람직하게는 시간당 약 10℃로 떨어뜨리는

제어된 냉각을 포함한다.

[0161] 바람직하게는, 폴리싱 여과 단계는 1.2㎛ 라인 필터와 같은 적절한 크기의 필터를 통해 수행된다.

[0162] 바람직하게는 교반은 약 400-500rpm, 일반적으로 약 450rpm에서 교반함으로써 이루어진다.

[0163] 바람직하게는 시드는 실로시빈 수화물 A이다. 일 실시태양에서, 0.1% 중량 이하의 시드가 공정에 첨가된다.

[0164] 바람직하게는, 결정질 실로시빈은 진공 여과에 의해 분리된다.

[0165] 일 실시태양에서, 분리된 결정은 적어도 30℃, 예를 들어 30 내지 50℃, 또는 예를 들어 40 내지 50℃의 온도에서 진공 건조된다. 일 실시태양에서, 분리된 결정은 적어도 10시간, 예를 들어 12 내지 18시간, 또는 예를 들어 약 30시간 동안 진공 건조된다. 일 실시태양에서, 분리된 결정은 적어도 30℃, 예를 들어 30 내지 50℃, 또는 40 내지 50℃의 온도에서 적어도 10시간, 예를 들어 12 내지 18시간, 또는 약 30시간 동안 진공 건조된다. 일 실시태양에서, 분리된 결정은 분리된 결정이 건조 손실 테스트에서 2중량% 미만, 예를 들어 0.5중량% 미만을 잃을 때까지 건조된다.

[0166] 바람직하게는 분리된 결정을 물로 수회 세척하고, 진공에서 약 50℃에서 적어도 12시간 동안 건조시킨다.

[0167] 얻어진 결정은 도 16a에 도시된 바와 같이, 현미경 x10으로 볼 때 일반적으로 비교적 크고(50 내지 200마이크론 범위) 균일하다.

[0168] 이는 도 16b에 도시된 바와 같이, 현미경 x10에서 볼 때, 크기가 훨씬 작은(일반적으로 5 내지 50마이크론) 냉각 제어 없이 얻어진 결정과는 다르다.

[0169] 본 발명의 제 8 양태에 따르면, 본 발명의 결정화 방법에 의해 얻어진 본 발명의 제 1 양태에 따른 실로시빈이 제공된다.

[0170] 본 발명의 제 9 양태에 따르면, 본 발명의 결정화 방법에 의해 얻어진 본 발명의 제 1 양태에 따른 실로시빈을 포함하는 약학적 제제가 제공된다.

[0171] 결정화 전에 제조된 실로시빈은 합성 또는 생물학적, 예를 들어 발효에 의해 또는 버섯으로부터의 추출에 의해 얻어진 임의의 방법을 사용하여 제조될 수 있다.

[0172] 바람직한 제조 방법은 출발 물질로서 실로신 또는 4 하이드록시-인돌을 사용한다.

[0173] 본 발명의 제 10 양태에 따르면, 다음 단계를 포함하는 실로신으로부터 실로시빈의 대규모 제조 방법이 제공된다:

[0174] i) 단계 4 - 테트라벤질피로포스페이트와 함께 실로신을 반응시켜 벤질 3-[2-(벤질디메틸아자늄일)에틸]-1H-인돌-4-일 포스페이트를 형성하는 단계; 및

[0175] ii) 단계 5 - 벤질 3-[2-(벤질디메틸아자늄일)에틸]-1H-인돌-4-일 포스페이트를 수소와 반응시켜 실로시빈을 형성하는 단계.

[0176] 본 발명의 제 11 양태에 따르면, 다음 단계를 포함하는 4-하이드록시인돌로부터 실로시빈의 대규모 제조 방법이 제공된다:

[0177] i) 단계 1 - 아세트산 무수물과 4-하이드록시인돌을 반응시켜 1H-인돌-4-일 아세테이트를 형성하는 단계;

[0178] ii) 단계 2 - 1H-인돌-4-일 아세테이트를 옥살일 클로라이드 및 디메틸아민과 반응시켜 3[(디메틸카르바모일)카르보닐]-1H-인돌-4일-아세테이트를 형성하는 단계;

[0179] iii) 단계 3 - 리튬 알루미늄 수소화물과 3[(디메틸카르바모일)카르보닐]-1H-인돌-4일-아세테이트를 반응시켜 실로신을 형성하는 단계;

[0180] iv) 단계 4 - 테트라벤질피로포스페이트와 실로신을 반응시켜 벤질 3-[2-(벤질디메틸아자늄일)에틸]-1H-인돌-4-일 포스페이트를 형성하는 단계; 및

[0181] v) 단계 5 - 벤질 3-[2-(벤질디메틸아자늄일)에틸]-1H-인돌-4-일 포스페이트를 수소와 반응시켜 실로시빈을 형성하는 단계.

[0182] 본 발명의 제 12 양태에 따르면, 다음을 추가로 포함하는 본 발명의 제 10 양태 또는 제 11 양태에 따른 실로시

빈의 대규모 제조 방법이 제공된다:

[0183] vi) 단계 6 - 제어된 건조와 함께, 본 발명의 제 1 양태에 따른 결정질 실로시빈 다형체 A를 제조하는 수 결정화 단계.

[0184] 일 실시태양에서, 다음을 추가로 포함하는 본 발명의 제 10 또는 제 11 양태에 따른 실로시빈의 대규모 제조 방법이 제공된다:

[0185] vi) 단계 6 - 제어된 건조와 함께, 결정질 실로시빈을 제조하는 수 결정화 단계 - 도 7a에 실질적으로 도시된 바와 같은 XRPD 회절도 및 도 8a에 실질적으로 도시된 바와 같은 DSC 써모그래프를 갖는 다형체 A.

[0186] 일 실시태양에서, 다음을 추가로 포함하는 본 발명의 제 10 또는 제 11 양태에 따른 실로시빈의 대규모 제조 방법이 제공된다:

[0187] vi) 단계 6 - 제어된 건조와 함께, 고순도 결정질 실로시빈을 제조하는 수 결정화 단계 - 도 7a에 도시된 바와 같은 XRPD 회절도 및 도 8a에 도시된 바와 같은 DSC 써모그래프를 갖는 다형체 A.

[0188] 바람직하게는 결정질 실로시빈은 다형체 A이다.

[0189] 실로신 또는 실로시빈의 대규모 생산을 위한 방법론을 개발함에 있어서, 출원인은 각각의 단계 1 내지 5에서 하나 이상의 중요한 문제를 극복하였고, 이러한 문제는 각 단계에서 실로신 또는 실로시빈의 대규모 생산의 맥락에서 고려되며, 또는 오히려 각각의 문제가 극복된 방식은 프로드러그를 제공하는 실로신, 실로시빈 또는 다른 유도체, 염, 에스테르 등에 대한 중간체인 다른 활성 물질의 제조에 적용되기 때문에 개별적이고 독립적인 발명으로 간주된다.

[0190] 바람직하게는 단계 4 (i) 반응은 나트륨 헥사메틸디실라지드(NaHMDS)의 사용을 포함한다

[0191] 이는 i) 취급이 용이하고, ii) 다운스트림 공정에서 문제를 일으키는 반응에 리튬을 도입하지 않는다는 점에서 부틸 리튬의 사용에 비해 이점이 있다.

[0192] 바람직하게는 반응은 용매 THF를 사용한다.

[0193] 이는 결과 생성물이 상당히 높은 순도로 얻어진다는 이점을 갖는다.

[0194] 바람직하게는 (i)에서 반응은 -50℃ 미만에서 개시된다.

[0195] 이는 이후 순도 다운스트림에 영향을 미칠 불순물 수준(LCMS에 의해 관찰된 m/z 295.2)을 감소시키는 이점을 갖는다.

[0196] 보다 더 바람직하게는 단계 4 (ii) 단계는 용매로서 THF를 사용한다.

[0197] 이는 증점을 피할 수 있는 이점이 있으며, 생성물을 얻기 위한 간단한 교반 과정을 용이하게 한다.

[0198] 바람직하게는 단계 4 (ii) 단계는 벤질 3-[2-(벤질디메틸아자늄일)에틸]-1H-인돌-4-일 포스페이트를 수득하기 위한 교반 공정을 포함한다.

[0199] 교반 공정은 공정이 단순화되고 수율이 개선된다는 이점이 있다.

[0200] 단계 4 (ii) 반응이 완료되는 것을 보장하기 위해, 중간체 4A의 수준을 모니터링하고, 완료시 벤질 3-[2-(벤질디메틸아자늄일)에틸]-1H-인돌-4-일 포스페이트는 여과되고 오븐 건조되었다.

[0201] 이는 불순물이 최소화되고 보다 순수한 생성물이 얻어진다는 이점을 갖는다.

[0202] 바람직하게는 단계 5 반응은 상대 체류 시간(RRT)을 사용하여 HPLC에 의해 중간체 수준에 대해 모니터링되고 완료는 중간체가 0.2% 미만으로 존재함으로써 결정된다.

[0203] 실로시빈 미정제(단계 5 생성물, (12))는 HPLC 방법에서 상대 체류 시간(RRT)이 각각 약 1.89 및 2.45인 주요 단계 5 불순물 및 실로신(RRT 1.66)을 갖는다. 이들 불순물은 표 7에 예시되어 있다. 일반적으로, 실로시빈 미정제(단계 5 생성물(12))는 RRT 1.89 불순물의 0.24면적%, RRT 2.45 불순물의 0.03면적% 및 실로신의 1.86면적%를 갖는다. 또한, 피로인산 불순물(RRT 0.31)은 예를 들어 HPLC에 의해 약 2-6면적% 수준으로 실로시빈 미정제에 존재한다.

[0204] 이 수준에서, 후속 결정화 공정은 실질적으로 순수한 실로시빈, 예를 들어 HPLC에 의해 적어도 95면적%, 예를 들어 98면적% 이상, 또는 예를 들어 적어도 99면적%의 순도를 갖는 실로시빈을 제공하도록 수행될 수 있다. 일

실시태양에서, 피로인산 불순물(RRT 0.31)은 HPLC에 의해 0.3면적% 미만, 예를 들어 0.2면적% 미만, 또는 예를 들어 0.1면적% 미만의 수준으로 실질적으로 순수한 실로시빈에 존재한다.

[0205] 또한, 이 단계 동안 물을 반응에 첨가하여 실로시빈을 용액으로 유지시킨다.

[0206] 바람직하게 촉매는 여과에 의해 회수된다.

[0207] 바람직하게 단계 1에서 반응은 DCM 및 피리딘에서 수행된다.

[0208] 이는 가연성 용매가 회피되는 장점이 있다.

[0209] 바람직하게 반응 혼합물을 시트르산으로 세척하여 약 2-3의 pH를 제공하여 과량의 피리딘을 제거하고, 산성 상을 DCM 상으로부터 분리한다.

[0210] 이는 중간체 2A가 분리되어 과량의 옥살일 클로라이드로부터 정제할 수 있다는 이점을 갖는다.

[0211] 보다 바람직하게는 DCM 상을 약 pH8에서 중탄산 나트륨으로 추가로 세척한다.

[0212] 이것은 보다 순수한 처리의 이점을 갖는다.

[0213] 바람직하게 1H-인돌-4-일 아세테이트는 헵탄에서 침전된다.

[0214] 이는 침전을 돕고 부분 용해도 문제를 극복한다.

[0215] 바람직하게 황산 마그네슘이 건조제로서 사용된다.

[0216] 바람직하게 용매 tert 부틸 메틸 에테르(TBME) 및 테트라하이드로푸란(THF)이 사용된다.

[0217] 바람직하게 옥살일 클로라이드와의 반응은 약 30℃ 내지 40℃에서 수행된다.

[0218] 이는 높은 반응 속도가 보장되어 개선된 수준의 완료를 제공한다는 이점을 갖는다.

[0219] 바람직하게 중간체 2A는 여과에 의해 분리된다.

[0220] 이는 과량의 옥살일 클로라이드로부터 중간체가 정제되는 이점이 있다.

[0221] 바람직하게 단계 2, 단계 i에서 중간체 2A를 세척하여 과량의 옥살일 클로라이드를 제거한다.

[0222] 바람직하게 중간체 2A를 TBME로 세척한다.

[0223] 바람직하게 헵탄을 첨가하여 추가의 중간체 2A를 침전시킨다.

[0224] 바람직하게 단계 2, 단계 ii에서, 디메틸아민이 과량으로 사용된다.

[0225] 이는 훨씬 개선된 불순물 프로파일 및 수율이 얻어진다는 이점을 갖는다.

[0226] 바람직하게 pH는 약 pH7 이상으로 유지된다.

[0227] 바람직하게 반응은 TBME에서 수행된다.

[0228] 바람직하게 이 단계는 디메틸아민 염을 제거하는 정제 단계를 추가로 포함한다.

[0229] 이는 순도가 향상되는 이점이 있다.

[0230] 바람직하게 이 단계는 슬러리 및 여과 단계를 포함한다.

[0231] 이는 취급 및 순도가 개선된다는 이점을 갖는다.

[0232] 보다 바람직하게 물 및/또는 IPA와의 슬러리화, 여과, 및 분리된 3[(디메틸카르바모일)카르보닐]-1H-인돌-4일-아세테이트를 건조하는 단계를 포함한다.

[0233] 이는 순도 및 수율이 개선되고 가수분해가 감소되는 이점을 갖는다.

[0234] 바람직하게 단계 3에서 반응은 용매 THF에서 수행된다.

[0235] 이는 현탁액/에멀젼이 증점 없이 형성되는 이점을 갖는다.

[0236] 바람직하게 3[(디메틸카르바모일)카르보닐]-1H-인돌-4일-아세테이트를 THF 중 $LiAlH_4$ 용액에 첨가한다.

[0237] 바람직하게 반응을 아세톤으로 급랭한 다음, 시트르산을 첨가하여 혼합물이 강 염기성(pH11 이상)으로 유지되도

록 한다.

[0238] 이는 높은 수율이 얻어진다는 이점이 있다.

[0239] 바람직하게 실로신은 THF에서 여과 및 세척되고 PrOAc:TBME에서 슬러리화되고, 여과되고, TBME에서 세척되고, 건조된다.

[0240] 이는 고순도 생성물, HPLC에 의해 예를 들어 적어도 95% 순수한, HPLC에 의해 예를 들어 적어도 98% 순수한, 또는 HPLC에 의해 예를 들어 99% 순수한 고순도 생성물이 수득되는 이점을 갖는다.

[0241] 바람직한 제조 방법은 각각의 단계 1 내지 6을 포함하지만, 각 단계의 각각의 특징은 단독으로 또는 반응의 동일하거나 상이한 단계로부터의 임의의 다른 특징과 조합하여 사용될 수 있음을 이해할 것이다.

[0242] 주어진 형태의 실로시빈, 다형체 A 또는 다형체 A', 및 이러한 고순도의 실로시빈은 이전에는 수득되지 않았으며, 출원인의 지식으로는 다형체 A 및 다형체 A'(도 7a 및 7b 및 8a 및 8b에 도시된 바와 같음)의 생산은 특히 신규하다. 실제로, 다량의 다형체 A의 대규모 배치 생산은 새로운 것이다. 본 발명의 결정화 방법론의 결과 및, 부분적으로, 제조 공정은 결정질 실로시빈의 이러한 높은 화학적 순도를 얻을 수 있게 한다.

[0243] 또한, 화합물의 불안정한 성질을 고려할 때, 이들은 적어도 12개월 동안의 가속된 조건(후술함) 하에서 안정한 것으로 나타난 결정질 형태를 얻었다.

[0244] 다형체 A 및 A'(도 7a 및 7b)는 이들의 XRPD 회절도 및 DSC 써모그래프로부터 명백한 바와 같이 다형체 B(도 7c), 수화물 A(도 7d) 및 에탄올 용매화물(도 7e) 및 혼합물(도 7f (위))과는 상이하다 - 이후에 기술되는 바와 같음.

[0245] 상이한 다형체 사이의 관계가 도 9에 도시되어 있다.

[0246] 실제로, 결정의 크기 및 형상은 결정화 방법론에 의해 결정되며, 이들은 결정질 및 생성물을 제제화하는 능력에 영향을 줄 수 있다.

[0247] 특히 바람직한 일 실시태양에서, 실로시빈은 아래에 요약된 바와 같이 6단계 공정을 통해 제조된다:

[0248] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명의 제 1 양태에 따른 결정질 실로시빈의 제조 방법이 제공되며, 방법은 제어된 건조로, 실로시빈을 수 결정화 단계에 적용하여, 본 발명의 제 1 양태에 따른 결정질 실로시빈 다형체 A 또는 다형체 A'를 제조하는 단계를 포함한다. 일 실시태양에서, 본 발명의 제 1 양태에 따른 결정질 실로시빈의 제조 방법이 제공되며, 방법은 제어된 건조로, 수 결정화 단계를 포함하여, 결정질 실로시빈을 제조하는 단계를 포함한다 - 도 7a 또는 도 7b에 실질적으로 도시된 바와 같은 XRPD 회절도 및 도 8a 또는 8b에 실질적으로 도시된 바와 같은 DSC 써모그래프를 갖는 다형체 A 또는 다형체 A'. 일 실시태양에서, 본 발명의 제 1 양태에 따른 실로시빈의 제조 방법이 제공되며, 방법은 제어된 건조로, 수 결정화 단계를 포함하여, 고순도 결정질 실로시빈을 제조하는 단계를 포함한다 - 도 7a 또는 도 7b에 실질적으로 도시된 바와 같은 XRPD 회절도 및 도 8a 또는 8b에 실질적으로 도시된 바와 같은 DSC 써모그래프를 갖는 다형체 A 또는 다형체 A'.

[0249] 바람직하게 다형체 A 및 다형체 A'는 실질적으로 도 7a 및 도 7b에 도시된 바와 같은 XRPD 회절도 및 실질적으로 도 8a 및 도 8b에 도시된 바와 같은 DSC 써모그래프를 갖는 등구조 변이체이다.

[0250] 보다 바람직하게는, 실로시빈은 일반적으로 약 10-20부피의 물에서 재결정화되고, 적어도 70℃의 온도로 교반하면서 가열되고, 적절한 컷오프(일반적으로, 5㎛ 미만)로 폴리싱 여과되고, 약 70℃의 온도에서 시딩되고, 및 2시간 초과의 기간에 걸쳐 제어된 방식으로 약 5℃로 냉각된다.

[0251] 보다 바람직하게 상기 방법은 온도를 시간당 약 5℃-15℃, 보다 바람직하게는 시간당 약 10℃로 떨어뜨리는 제어된 냉각을 포함한다.

[0252] 바람직하게, 폴리싱 여과 단계는 1.2㎛ 또는 0.45㎛ 라인 필터와 같은 적절한 크기의 필터를 통해 수행된다.

[0253] 바람직하게 교반은 약 400-500rpm, 일반적으로 약 450rpm에서 교반함으로써 이루어진다.

[0254] 바람직하게 시드는 실로시빈 수화물 A이다. 일 실시태양에서, 0.1% 중량 이하의 시드가 공정에 첨가된다.

[0255] 바람직하게, 결정질 실로시빈은 진공 여과에 의해 분리된다.

[0256] 일 실시태양에서, 분리된 결정은 적어도 30℃, 예를 들어 30 내지 50℃, 또는 예를 들어 40 내지 50℃의 온도에서 진공 건조된다. 일 실시태양에서, 분리된 결정은 적어도 10시간, 예를 들어 12 내지 18시간, 또는 예를 들어

약 30시간 동안 진공 건조된다. 일 실시태양에서, 분리된 결정은 적어도 30℃, 예를 들어 30 내지 50℃, 또는 40 내지 50℃의 온도에서 적어도 10시간, 예를 들어 12 내지 18시간, 또는 약 30시간 동안 진공 건조된다. 일 실시태양에서, 분리된 결정은 분리된 결정이 건조 손실 테스트에서 2중량% 미만, 예를 들어 0.5중량% 미만을 잃을 때까지 건조된다.

[0257] 바람직하게는 분리된 결정을 물로 수회 세척하고, 진공에서 약 50℃에서 적어도 12시간 동안 건조시킨다.

[0258] 얻어진 결정은 도 16a에 도시된 바와 같이, 현미경 x10으로 볼 때 일반적으로 비교적 크고(50 내지 200마이크론 범위) 균일하다.

[0259] 이는 도 16b에 도시된 바와 같이, 현미경 x10에서 볼 때, 크기가 훨씬 작은(일반적으로 5 내지 50마이크론) 냉각 제어 없이 얻어진 결정과는 다르다.

[0260] 단계 1: 1H-인돌-4-일 아세테이트(3)의 합성

[0261] 코어 반응은 1H-인돌-4-일 아세테이트(3)를 형성하기 위한 4-하이드록시인돌(1)과 아세트산 무수물(2)의 반응이다; (도 2)

[0262] 가장 바람직하게 단계 1은 다음과 같다:

[0263] 4-하이드록시인돌(1), DCM(12) 및 피리딘(13)을 용기에 첨가하고 약 0-5℃로 냉각시킨다. 아세트산 무수물(2)를 적가하고, 혼합물을 약 20-25℃로 가온하고 HPLC에 의해 완료될 때까지 교반하였다. 반응물을 시트르산 수용액(14) 및 $NaHCO_3$(15)로 세척하고, $MgSO_4$(16)상에서 건조시키고 여과하고 대략 절반 부피로 증발시켰다. 헵탄(17)을 첨가하고, 증류로 DCM의 대부분을 계속 제거하였다. 혼합물을 약 5-25℃로 냉각시키고, 여과하고, 헵탄으로 세척하고, 진공 오븐에서 밤새 건조시켜 다음 단계에서 사용하기에 적합한 고체로서 1H-인돌-4-일 아세테이트(3)를 분리하였다.

[0264] 단계 2: 3[(디메틸카르바모일)카르보닐]-1H-인돌-4일-아세테이트(6)의 합성

[0265] 코어 반응은 3[(디메틸카르바모일)카르보닐]-1H-인돌-4일-아세테이트(6)를 형성하기 위한 1H-인돌-4-일 아세테이트(3)와 옥살일 클로라이드(4) 및 디메틸아민(5)의 반응이다; (도 3)

[0266] 가장 바람직하게 단계 2는 다음과 같다:

[0267] 1H-인돌-4-일 아세테이트(3)을 실온에서 THF(19) 및 TBME(18)의 혼합물에 용해시켰다. 옥살일 클로라이드(4)를 적가하여 약 35-40℃에서 반응을 발열시켰다. 온도 범위는 나머지 첨가 동안 유지된다. 이어서, 반응이 HPLC에 의해 완료될 때까지 약 40℃에서 교반된다. 반응물을 실온으로 냉각시키고 헵탄(17)을 첨가하여 추가의 고체를 침전시켰다. 슬러리를 교반한 후 침강시킨 후, 경사 분리에 의해 대부분의 용매(18/19)를 제거하였다. 고체를 헵탄(17)으로 용기에서 2회 세척하였다. TBME(18)를 첨가하여 황색 슬러리를 수득하고 혼합물을 약 -20℃로 냉각시켰다. 온도를 -20℃ 내지 -10℃로 유지하면서 디메틸아민 용액(5)을 첨가한다. 이어서, 반응물을 실온으로 가온하고 완료될 때까지 교반하고, 필요한 경우 여분의 디메틸아민을 첨가하였다. 반응물을 여과하고, 헵탄(17)으로 세척하고 진공 오븐에서 건조시켰다. 미정제 3[(디메틸카르바모일)카르보닐]-1H-인돌-4일-아세테이트(6)를 물(20), 이어서 IPA(21) 중의 슬러리로 추가로 정제한 다음 진공 오븐에서 건조시켜 다음 단계에서 사용하기에 적합한 고체로서 수득하였다(6).

[0268] 단계 3: 3-(2-(디메틸아미노)에틸)-1H-인돌-4-올(실로신)(8)의 합성

[0269] 코어 반응은 실로신(8)을 형성하기 위한 3[(디메틸카르바모일)카르보닐]-1H-인돌-4일-아세테이트(6)와 리튬 알루미늄 하이드라이드(7)의 반응이다; (도 4)

[0270] 가장 바람직하게 단계 3은 다음과 같다:

[0271] 3[(디메틸카르바모일)카르보닐]-1H-인돌-4일-아세테이트(6)를 THF(19)에서 슬러리화하고 약 0℃로 냉각시켰다. $LiAlH_4$(7)의 THF 용액을 온도를 약 0-20℃로 유지하면서 적가하였다. 이어서, 반응이 HPLC에 의해 완료될 때까지 환류시켰다. 반응물을 0℃로 냉각시키고 아세톤(22)을 첨가한 다음 시트르산 수용액(14)을 첨가하여 과량의 $LiAlH_4$를 급랭시켰다. 배치를 여과하여 리튬 및 알루미늄 염을 제거하였다. 여과액을 $MgSO_4$(16) 상에서 건조시키고, 여과 및 농축하고 실리카 패드(23) 상에 로딩하였다. 패드를 THF(19)로 용리시키고 분획을 함유하는 생성물을 증발시켰다. 생성된 고체를 iPrOAc:TBME(24/18) 혼합물에서 슬러리화하고, 여과하고 TBME로 세척하였다. 고

체를 오븐에서 건조시켜 회백색 고체로서 고순도 실로신(8)을 수득하였다.

[0272] 단계 4: 벤질 3-[2-(벤질디메틸아자늄일)에틸]-1H-인돌-4-일 포스페이트(10)의 합성

[0273] 코어 반응은 벤질 3-[2-(벤질디메틸아자늄일)에틸]-1H-인돌-4-일 포스페이트(10)를 형성하기 위한 실로신(8)과 테트라벤질피로포스페이트(9)의 반응이다, (도 5)

[0274] 가장 바람직하게 단계 4는 다음과 같다:

[0275] 실로신(8)을 용기에 충전한 후 THF(19)를 충전한다. 반응물을 -50℃ 내지 -70℃로 냉각시키고 NaHMDS(25)를 약 -45℃ 내지 -70℃에서 적가하였다. 온도를 약 -45℃ 내지 -60℃로 조정하고 THF 중 테트라벤질피로포스페이트를 첨가하였다. 배치를 0℃로 가온한 후, 생성물에 의한 고체를 여과로 제거하고 여과액을 진공에서 농축시켰다. 이어서, 농축된 혼합물을 약 40℃로 가열하고, 중간체가 단계 4 생성물(10)로 전환될 때까지 교반하였다 - 모니터링 및 HPLC의 사용에 의해 제어됨. 배치를 약 0-5℃로 냉각시키고, 생성된 고체를 여과에 의해 분리하고 진공에서 건조시켜 벤질 3-[2-(벤질디메틸아자늄일)에틸]-1H-인돌-4-일 포스페이트(10)를 고체로서 제공하였다.

[0276] 단계 5: 중간 등급 3-[2-(디메틸아자늄일)에틸]-1H-인돌-4-일 수소 포스페이트(실로시빈 미정제)(12)의 합성

[0277] 코어 반응은 실로시빈(12)을 형성하기 위한 벤질 3-[2-(벤질디메틸아자늄일)에틸]-1H-인돌-4-일 포스페이트(10)와 수소(11)의 반응을 포함한다, (도 6).

[0278] 가장 바람직하게 단계 5는 다음과 같다:

[0279] 용기에 Pd/C(26), 메탄올(24) 및 3-[2-(벤질디메틸아자늄일)에틸]-1H-인돌-4-일 포스페이트(10)를 충전하고 생성된 혼합물을 HPLC에 의해 완료될 때까지 수소 (11)와 살포하였다. 정제수(20)는 이 공정 동안 생성물을 용액 중에 유지하기 위해 첨가된다. 혼합물을 약 35℃ 내지 45℃로 가열한 다음, 메탄올(24) 및 정제수(20)로 세척하여 셀라이트 층(27)을 통해 여과하였다. 여과액을 진공 증발시키고 에탄올(28)과 공비시켜 중간 등급의 실로시빈(12)을 수득하였다.

[0280] 단계 6: 3-[2-(디메틸아자늄일)에틸]-1H-인돌-4-일 수소 포스페이트(실로시빈)의 합성

[0281] 코어 정제/다형체 결정 단계는 고순도 결정질 실로시빈, 다형체 A 또는 다형체 A'를 생성하기 위한 수 결정화 단계에 이어 제어된 냉각 및 건조 단계이다.

[0282] 가장 바람직하게 단계 6은 다음과 같다:

[0283] 중간 등급의 실로시빈(12)(단계 5)을 정제수(20)가 있는 용기에 충전하고, 실로시빈(12)이 용해될 때까지 혼합물을 가열하였다. 이어서, 생성된 벌크 용액을 예열 용기로 폴리싱 여과하였다. 온도를 바람직하게는 약 68℃ 내지 70℃로 조정하고, 실로시빈 수화물 시드(즉, 수화물 A)를 반응에 첨가하였다. 이어서, 배치를 제어된 방식으로 약 0 내지 10℃로 냉각시키고 교반하고, 고체를 여과에 의해 수집하고 정제수로 세척하였다. 이어서, 분리된 고체를 진공 건조시켜 회백색 고체로서 고순도 결정질 실로시빈, 다형체 A 또는 A'를 수득하였다.

발명의 효과

[0284] 발명의 내용 중에 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0285] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시태양이 추가로 설명된다.

도 1은 JNP에서 교시된 반응의 개략도이다.

도 2는 본 발명의 일 양태의 단계 1 반응의 개략도이다.

도 3은 본 발명의 일 양태의 단계 2 반응의 개략도이다.

도 4는 본 발명의 일 양태의 단계 3 반응의 개략도이다.

도 5는 본 발명의 일 양태의 단계 4 반응의 개략도이다.

도 6은 본 발명의 일 양태의 단계 5 반응의 개략도이다.

도 7a는 다형체 A(GM764B)의 XRPD 회절도이다.

도 7b는 다형체 A'(JCCA2160F)의 XRPD 회절도이다.

도 7c는 다형체 B(JCCA2160-F-TM2)의 XRPD 회절도이다.

도 7d는 수화물 A(JCCA2157E)의 XRPD 회절도이다.

도 7e는 에탄올 용매화물(JCCA2158D)의 XRPD 회절도이다.

도 7f는 다형체 A'(JCCA2160F)(중간) 및 다형체 B(JCCA2160-TM2)(아래) 회절도와 비교한 공정(CB646-E)(위)의 개발 동안 얻어진 생성물의 XRPD 회절도이다.

도 8a는 다형체 A(GM764B)의 DSC 및 TGA 써모그래프이다.

도 8b는 다형체 A'(JCCA2160F)의 DSC 및 TGA 써모그래프이다.

도 8c는 다형체 B(GM748A)의 DSC 써모그래프이다.

도 8d는 수화물 A(JCCA2157E)의 DSC 및 TGA 써모그래프이다.

도 8e는 에탄올 용매화물(JCCA2158D)의 DSC 및 TGA 써모그래프이다.

도 9는 수계 시스템에서 상호 관계 형태를 나타내는 형태 단계도이다.

도 10은 실로시빈의 1H NMR 스펙트럼이다(할당 실시예 7과 함께 읽음).

도 11은 실로시빈의 ^{13}C NMR 스펙트럼이다(할당 실시예 7과 함께 읽음).

도 12는 실로시빈의 FT-IR 스펙트럼이다.

도 13은 실로시빈의 질량 스펙트럼이다.

도 14는 실로시빈의 번호가 매겨진 구조식이다.

도 15는 물에서 실로시빈에 대한 온도 용해도 곡선이다.

도 16a는 제어된 냉각에 의해 얻어진 결정을 나타내는 현미경 사진이다.

도 16b는 제어되지 않은 냉각 건조에 의해 얻어진 결정을 나타내는 현미경 사진이다.

도 17은 상이한 용매 시스템에서 상호 관계의 형태를 나타내는 형태 단계도이다.

도 18은 XRPD 회절도이다 - 25 및 50℃에서 분리된 고체에 대한 패턴 C.

도 19는 XRPD 회절도이다 - 25 및 50℃에서 분리된 고체에 대한 패턴 D, E 및 F.

도 20은 용매 A 내지 H에서 비정질 실로시빈의 평형으로부터 분리된 고체에 대해 획득된 XRPD 회절도의 비교이다.

도 21은 용매 I 내지 P에서 비정질 실로시빈의 평형으로부터 분리된 고체에 대해 획득된 XRPD 회절도의 비교이다.

도 22는 용매 R 내지 Y에서 비정질 실로시빈의 평형으로부터 분리된 고체에 대해 획득된 XRPD 회절도의 비교이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0286] 종래 기술과는 대조적으로, 본 발명은 10g 규모의 그램 양을 제조하는 "대" 규모 방법을 기술하는 JNP에 기재된 수준보다, 1로그 또는 2로그 수준 더 높은 적어도 100g, 보다 바람직하게는 적어도 250g의 양 또는 배치로 상업적 대규모 실로시빈을 제조하고자 하였다.

[0287] JNP로부터의 많은 중요한 개발 단계를 설명하기 위하여, 아래 설명은 각 공정 단계에서 수행된 실험 및 조사에 대한 세부 사항을 설명하며, 이는 4-하이드록시인돌(1)로부터 시작하여 대규모(다양한 중간체(2-6)를 포함)에서 실로시빈(7)을 GMP로 생산할 때 직면한 수 많은 기술적 문제를 극복하기 위해 이루어진 선택을 예시한다.

[0288] 문맥상 명백하게 달리 지시하지 않는 한, 특정 수치에 대한 언급은 적어도 그 특정 수치를 포함한다. 값의 범위가 표현될 때, 다른 실시태양은 하나의 특정 값 및/또는 다른 특정 값을 포함한다. 또한, 범위로 언급된 값에

대한 언급은 그 범위 내의 각각의 모든 값을 포함한다. 모든 범위는 포함적이며 결합 가능하다.

[0289] 선행사 "약"을 사용하여 값이 근사치로 표현될 때, 특정 값은 다른 실시태양을 형성하는 것으로 이해될 것이다.

[0290] 본 발명에 사용된 단수 형태 "하나(a)", "하나(an)" 및 "그(the)"는 복수를 포함한다.

[0291] 수치 범위, 컷오프 또는 특정 값과 관련하여 사용될 때 용어 "약"은 인용된 값이 열거된 값으로부터 최대 10%까지 변할 수 있음을 나타내는 데 사용된다. 본 발명에 사용된 많은 수치 값이 실험적으로 결정되므로, 이러한 결정은 상이한 실험에 따라 달라질 수 있고, 종종 변할 수 있음을 당업자는 이해해야 한다. 본 명세서에 사용된 값은 이러한 고유한 변형으로 인해 과도하게 제한되는 것으로 간주되어서는 안된다. 따라서, 용어 "약"은 지정된 값으로부터 ±10% 이하의 변동, ±5% 이하의 변동, ±1% 이하의 변동, ±0.5% 이하의 변동, 또는 ±0.1% 이하의 변동을 포함하는 것으로 사용된다.

[0292] 본 발명에 사용된 "치료하는" 및 유사한 용어는 증상의 중증도 및/또는 빈도를 감소시키고, 증상 및/또는 상기 증상의 근본 원인을 제거하고, 증상의 빈도 또는 가능성 및/또는 그 근본 원인을 감소시키고, 질병 및/또는 장애의 진행을 지연, 예방 및/또는 늦추고, 및 질병 및/또는 장애에 의해 직간접적으로 야기된 손상을 개선 또는 치료하는 것을 지칭한다.

[0293] 하기 약어가 본 발명에서 사용되었다:

[0294] DSC - 시차 주사 열량계

[0295] RT - 실온

[0296] TBME - 메틸 tert-부틸 에테르

[0297] TGA - 열 중량 분석

[0298] THF - 테트라하이드로푸란

[0299] wrt - 와 관련하여(with respect to)

[0300] XRPD - X-선 분말 회절

[0301] 실시예 1

[0302] 6단계 결정화 과정 및 결과 다형체

[0303] 형태 A'(Form A')를 제조하기 위한 실험:

[0304] 미정제 실로시빈 1.0g을 25㎖ 플라스크에 충전시켰다. 물(투입 물질의 활성에 기초하여 12.8mL/16부피)을 첨가하였다. 혼합물을 교반하고 80℃로 가열하였다. 눈에 보이는 용해되지 않은 고체가 있는 암갈색 용액이 얻어졌다. 혼합물을 가온한 0.45㎛ 필터를 통해 뜨거운 25mL 플라스크로 폴리싱 여과하였다. 용해되지 않은 고체를 제거하여 암갈색 용액을 수득하였다. 용액을 75℃에서 재-평형시킨 다음, 주위 온도로 천천히(10℃/시간) 냉각시켰다. 생성된 옅은 갈색 용액을 주위 온도에서 16시간 동안 평형화시켰다. 진공 여과에 의해 고체를 분리하기 전에 현탁액을 5℃로 냉각시켰다. 필터 케이크를 물(0.8mL/1부피)로 세척하고 진공에서 50℃에서 16시간 동안 건조시켰다. 75%의 수율, 화학적 순도 99%, NMR 분석 >98%.

[0305] 상기 절차를 14부피(11.2mL)의 물로 반복하였다. 69%의 수율, 화학적 순도 99%, NMR 분석 >98%.

[0306] 두 경우 모두, 미정제 실로시빈의 용해는 약 75℃에서 달성되었다. 점진적인 냉각에서, 침전은 약 60℃에서 관찰되었다.

[0307] 두 경우 모두, 실로시빈 다형체 A'가 생성되었고, XRPD(도 7b와 일치하는 회절도) 및 DSC(도 8b와 일치하는 써모그램)에 의해 확인되었다.

[0308] 형태 A(Form A)를 제조하기 위한 실험:

[0309] 단계 5 공정으로부터 얻어진 미정제 실로시빈 94g(약 4% 피로포스페이트 불순물을 갖는 HPLC에 의한 약 93% 순도)을 하기에 기재된 바와 같이 수성 재결정화시켰다:

[0310] 프로토콜은 충분한 물(12부피), 빠른 교반 속도(450rpm) 및 제어된 냉각 프로파일(10℃/hr)을 사용하였다.

[0311] 실로시빈(94.0g)(CB650E)을 2L 플라스크에 충전시켰다. 물(902ml, 투입 물질의 활성에 기초한 12부피)을 첨가하

였다. 혼합물을 교반하고 약 78℃로 가열하였다. 눈에 보이는 용해되지 않은 고체가 있는 암갈색 용액이 얻어졌다. 혼합물을 1.2㎛ 인-라인 필터를 통해 오버헤드 교반기(450rpm)가 장착된 뜨거운 5L 플라스크로 폴리싱 여과하였다. 용해되지 않은 고체를 제거하여 정화된 암갈색 용액을 수득하였다. 용액을 약 75℃에서 15분 동안 재-평형시킨 다음, 주위 온도로 서서히(10℃/시간) 냉각시켰다. 용액을 68℃ 내지 70℃에서 물에서 성숙시킨 후 실로시빈 수화물 A(도 7d와 일치하는 GM758A-XRPD 회절도)로 시딩하였다. 생성된 옅은 갈색 현탁액을 주위 온도에서 약 16시간 동안 평형화시켰다. 진공 여과에 의해 고체를 분리하기 전에 현탁액을 1시간 동안 5℃로 냉각시켰다. 필터 케이크를 물(282mL, 3부피)로 세척하고 진공에서 약 50℃에서 30시간 동안 건조시켰다.

[0312] 공정은 75%의 수율로 성공적으로 완료되었다. 고체의 화학적 순도는 99.3%로 확인되었다. 30시간 동안 건조 후 XRPD에 의한 고체의 분석은 다형체 A를 보여주었다(도 7a). 특징적인 동요는 약 17.5 ° 2Θ와 같은 약 ~17 ° 2Θ에서 관찰되었으며, 벌크 물질에서 두드러졌다.

[0313] 다형체 A 및 다형체 A'의 고체 상태 특징화

[0314] 다형체 A에 대해 얻어진 DSC 및 TGA 써모그램(도 8a)은 다형체 A'에 대해 얻어진 DSC 및 TGA 써모그램(도 8b)에 필적하였다. 다형체 A 및 다형체 A'에 대해 얻어진 TGA 써모그램(도 8a)은 분해 전에 중량 손실을 나타내지 않았다. 이것은 소규모로 얻은 다형체 A(도 7a; 약 ~17 ° 2Θ에서 존재하는 섭동)와 다형체 A'(도 7b; 섭동이 존재하지 않음)에 대해 얻은 XRPD 사이의 차이는 과도한 수화로 인한 것이 아니라는 것을 제안하였다.

[0315] 고체의 현미경(도 16a)은 50 내지 200마이크론 사이의 크기 범위를 갖는 균일성이 우수한 막대형 결정을 보여준다.

[0316] 다형체 A'에 대해 얻어진 XRPD 회절도는 다형체 A와 동일한 정도로 약 ~17 ° 2Θ에서의 섭동을 나타내지 않는다. 약 ~17 ° 2Θ에서의 XRPD 회절도에서의 섭동은 대규모로 생산된(소규모에서 얻은 것과 비교하여) 실로시빈에 대해 더 뚜렷하고 예상치 못한 것이었다. 출원인은 수화물 A가 17 ° 2세타 영역에서 회절 피크가 없는 온도 범위에 걸쳐 존재하는 유일한 다형 형태임을 입증하였다(도 7d 참조). 이것은 탈수시 수화물 A가 붕괴되어 규모에 따라 변하는 다형체 A 또는 A'를 생성하고 다형체 A가 비정형인 소규모로 형성된 다형체 A'를 갖는 진정한 형태임을 강력하게 시사한다.

[0317] 이 이론의 견고성을 테스트하고 다형체 A로의 복귀를 입증하기 위해, 벌크의 소량을 물에 다시 담근 후 다시 건조시켰다(수화물 A를 재현하기 위해). 작은 샘플(250mg - 실로시빈 다형체 A)을 물(10부피)에서 1시간 동안 평형화시켰다. 현탁액을 여과하고 습윤 고체의 분석에 의해 수화물 A가 생성되었고(도 7d) 17° 2세타에서 섭동이 없음을 확인하였다. 물질을 진공에서 16시간 동안 건조시키고 고체를 XRPD에 의해 재평가하였다. 다형체 A'물질은 XRPD에 의해 확인되었으며(도 7b) XRPD 섭동의 감소가 확인되었다. 원래의 벌크 고체의 추가 건조 및 주위 온도에서의 에이징은 고체의 XRPD 회절도를 변화시키지 않았다. 얻어진 2가지 고체 버전, 다형체 A 및 다형체 A'에 대한 XRPD 회절도는 ~17.5 ° 2세타 피크 이외의 사실상 동일하다. 또한 열적 특성도 동일하다. 다형체 A 대 다형체 A'에 대한 XRPD 회절도의 구별은 미묘하고 두 다형체는 동역학적으로 수화된 상태로 매우 빠르게 변환된다.

[0318] 다형체 A 및 다형체 A'에 대한 XRPD 회절도의 차이가 이후 효과적으로 건조되지 않고 변화를 일으키는 보다 큰 입자 크기의 고체를 전달하는 대규모 결정화 공정에 기인한 것인지, 또는 결정질 고체의 습관(habit) 및 크기 차이가 원인인지 여부를 확인하기 위해 추가의 실험을 수행하였다. 실로시빈 다형체 A(실험 전에 확인된 다형 형태)를 모르타르 및 유봉을 통해 분쇄하고 XRPD에 의해 평가하였다. 다형체의 변화는 관찰되지 않았다. 다른 부분(51mg)에 물(<1mL)을 채우고 습기를 평가하여 수화물이 형성되었음을 확인하였다. 두 로트를 약 18시간 동안 50℃에서 진공 건조시키고 XRPD에 의해 재평가하였다. 분쇄된 샘플은 다형체 A로 유지되었다. 탈수 후 수화된 샘플은 다형체 A'인 것으로 나타났다(즉, ~17.5 ° 2Θ에서 반사 없음). 이것은 크기/습관만 원래 반사 피크의 유일한 이유는 아니라는 것을 제안하였다.

[0319] TGA 평가에 따르면 투입 로트는 약 70℃에 의한 작은 질량 손실(0.139% 중량)을 나타냈다. 입자 크기가 감소되고 이어서 건조된 고체는 약 75℃에 의해 0.343wt%의 보다 큰 질량 손실을 나타낸 반면 수화되고 건조된 고체는 약 80℃에 의해 0.069wt%의 최소 질량 손실을 나타내었다. 입자 크기가 감소되고 이어서 건조 된 고체는 80℃에서 10분 동안 유지되었지만(TGA에 의한 질량 손실 지점을 지나감), XRPD에 의한 평가는 투입으로부터의 변화가 없음을 나타내었고, 이는 낮은 수준의 수화 및 결정질 격자의 부분 팽창은 변화의 원인이 아니었다는 것을 의미한다.

[0320] 다형체 A의 수화 및 후속적으로 분리된 소규모의 고체를 건조시켜 다형체 A'를 제조하는 것이 가능하다.

[0321] 실로시빈 다형체 A 및 다형체 A' 각각의 약 60mg을 0.2ml의 물로 채우고 두 로트로부터 수화물 A를 전달하였다. 각 수화물 A의 절반을 진공에서 25℃에서 약 17¼시간 건조시키고 각 수화물 A의 나머지를 주위 온도에서 N_2의 스트림 하에 약 17¼시간 건조시켰다. 건조 후 고체를 분리하고 XRPD로 평가하였다. 다형체 A 투입으로부터 분리된 고체의 XRPD 평가는 수화물 A가 성공적으로 생성되었고 고체가 건조되어 두 건조 방법으로부터 다형체 A'를 제공한다는 것을 확인하였다. 다형체 A' 투입으로부터 분리된 고체의 XRPD 평가는 수화물 A가 성공적으로 생성되었고, 두 가지 건조 방법 모두로부터 고체가 다형체 A'로 유지되도록 건조되었음을 확인하였다.

[0322] 조사된 소규모에서, 다형체 A 및 다형체 A'는 건조하여 수화물 A로의 전환을 통해 다형체 A'를 제공할 것이다.

[0323] 실로시빈 다형체 A(100mg)를 모르타르 및 유봉 분쇄를 통해 입자 크기를 감소시켰다. 분쇄된 로트는 입자 크기 감소가 샘플의 탈수에 영향을 미치는지 여부를 평가하기 위해 두 가지 상이한 건조 방식을 거쳤다. 첫번째 샘플은 80℃에서 10분 동안 유지되었고 두번째 샘플은 110℃에서 10분 동안 유지되었다. XRPD에 의해 두 고체 모두를 평가하였으며, 이는 다형체 A가 유지됨을 나타냈다. 이전의 등온 스트레스에서의 분쇄된 로트가 형태에 영향을 줄 정도로 충분히 오랫동안 110℃에서 유지되지 않았었는지, 그리고 분쇄된 로트의 일부가 110℃에서 약 24시간 동안 진공 건조되었었는지에 대해 고려되었다. XRPD에 의한 평가는 여전히 약 17에 존재하지만 약간 감소된 강도에서 다형체 A 반사를 갖는 형태에서의 미묘한 변화를 밝혀냈다.

[0324] 다형체 A는 입자 크기 감소 및/또는 고온에서의 건조를 통해 다형체 A'로 쉽게 전환되지 않을 것이라고 결론지었다.

[0325] 방법론

[0326] 피로포스페이트 불순물을 함유하지 않는 실로시빈의 안정성 평가는 80℃를 초과하는 온도에서 실로시빈의 가수분해에 의해 생성된 단계 3 중간 불순물(실로신)의 수준이 중요하다는 것을 나타냈다. 예를 들어, 83mg/mL 실로시빈 수용액을 90℃로 가열하고 1, 2 및 4시간에서 HPLC로 분석한 경우, 단계 3 불순물의 수준은 각각 0.28, 1.82 및 7.79면적%로 측정되었다. 비교하여, 50mg의 실로시빈을 물(1.2-1.8ml; 용액을 유지하기에 충분한 부피)에 용해시키고 4시간 동안 70, 75 및 80℃로 가열할 때, 단계 3 불순물의 수준은 각각 HPLC에 의해 0.53, 0.74 및 2.30면적%로 측정되었다. 재결정화는 미정제 실로시빈을 75℃ 내지 80℃로 가열하여 용해를 달성하고, 폴리싱 여과한다. 용액의 즉각적인 냉각은 물질의 체류 시간을 과도한 온도로 감소시킴으로써 실로시빈 가수분해 수준을 제한한다.

[0327] 실로시빈의 추가 시험 재결정화는 다음 변형을 도입하여 수행되었다:

[0328] 사용된 물의 양을 변화시키는 단계;

[0329] 다양한 교반;

[0330] 제어된 냉각 프로파일을 갖는 것;

[0331] 급속한(제어되지 않은) 냉각 프로파일을 갖는 것.

[0332] 적은 양의 물(12부피 미만)을 사용하는 것은 재결정화 과정을 방해하지 않았고, 실로시빈의 용해는 폴리싱 여과 단계를 가능하게 하는 온도에서 달성되었다. 상이한 냉각 속도는 상이한 결정 크기 분포를 초래하는 것으로 나타났다; 시간당 약 10℃에서 느리게 제어되는 냉각은 상대적으로 더 크고 보다 균일한 평균 결정 크기를 생성(도 16a)한 반면 빠른 냉각 프로파일은 더 작은 결정을 생성하였다(도 16b). 제어된 냉각 프로파일이 바람직하며 이는 제어된 냉각에 대한 개선된 순도로 반영되었다.

[0333] 상기 방법을 사용하여 75% 수율로 99.3% 화학적 순도의 실로시빈을 수득하였다. 고체의 열 특성은 원하는 것과 일치하였다. 건조 고체의 XRPD 회절도의 차이는 건조 프로파일이 수화물 A가 어떻게 붕괴되어 바람직한 고체 형태를 제공하는지를 결정하는 데 중요할 수 있음을 시사하였다. 다형체 A는 12개월 동안 가속 안정성 시험 조건하에서 안정한 것으로 입증되었다.

[0334] 실험

[0335] 단계 5를 N_2 하에서 용기에 충전한 후 물(활성 단계 5를 기준으로 대략 12-15부피)을 채웠다. 혼합물을 약 80℃로 가열하여 용해를 달성하고 1.2㎛ 인-라인 필터를 통해 80℃로 가열된 깨끗한 새로운 플라스크로 폴리싱 여과하였다. 교반 속도를 높은 수준(450rpm)으로 설정하고 용액을 70-75℃에서 평형화시켰다. 용액을 68℃ 내지 70℃에서 실로시빈 수화물 A(0.001 x 단계 5 충전)로 시딩하면서 대략 10℃/시간에서 주위 온도로 냉각시켰다.

현탁액을 주위 온도에서 밤새 유지시킨 다음 대략 5℃에서 1시간 동안 유지시켜 냉각하였다. 현탁액을 물로 세척하여(단계 5의 활성 충전을 기준으로 2-3부피) 여과하였다. 순수한 실로시빈을 진공에서 50℃에서 건조시켰다. 결정질 물질 실로시빈(규모에 따라 다형체 A 또는 다형체 A')을 수득하였으며, 예를 들어, 실로시빈의 94g 투입을 사용하여 다형체 A를 수득하고 실로시빈의 1g 투입을 사용하여 다형체 A'를 수득하였다. 일반적으로 5g보다 큰 배치 크기는 다형체 A를 제공하고 5g보다 작은 배치 크기는 다형체 A'를 제공한다.

[0336] JNP와의 차이점 및 이점은 다음과 같이 요약될 수 있다:

[0337] i) 이러한 추가 결정화 단계는 정의된 결정질 형태 - 다형체 A(또는 A')를 생성한다.

[0338] ii) 약 80℃로 짧은 시간 동안 가열하면 용해도가 최대화되며(및 가수분해를 피한다), 이는 우수한 수율을 보장한다는 있다는 이점이 있다.

[0339] iii) 약 70-80℃에서 폴리싱 여과를 사용하여 불용성 불순물을 제거할 수 있다. 이는 인-라인 필터 - 일반적으로 약 1.2㎛를 사용하는 것이 가장 좋다. 이것은 우수한 화학적 순도를 보장한다.

[0340] iv) 높은 교반 속도(일반적으로 약 450rpm)를 사용하면 용액이 80℃로 유지되는 시간을 최소화할 수 있는 빠른 용해가 보장되므로, 실로시빈의 가수분해에 의해 형성된 단계 3 중간 불순물 수준의 증가를 피한다.

[0341] v) 제어된 냉각, 일반적으로 시간당 약 10℃로 냉각되는 제어는 보다 균일한 결정 크기를 제공하고 결정질 수화물 A로서 형태를 유지한다.

[0342] vi) 실로시빈 수화물 A로 약 70℃에서 용액을 시딩하면 수화물 A로서 결정화가 촉진된다.

[0343] vii) 결정을 물로 세척하고 약 50℃에서 건조시켜 순도를 최대화하고 규모에 따라 다형체 A 또는 A'를 제공한다.

[0344] 실시예 2 내지 6

[0345] 실로시빈의 단계 1 내지 5 생산

[0346] 하기 실시예는 본 발명에 전술한 바와 같이 JNP에 기술되고 도 1에 도시된 공정으로부터의 상당한 발전을 예시한다.

[0347] 실시예 2

[0348] 단계 1(도 2)

[0349] JNP의 단계 1 조건은 용매 DCM에서 1.1eq Ac_2O 및 1.2eq 피리딘을 사용하였다. 밤새 교반한 후 반응이 완료된 것으로 나타났다(99% 생성물, 0% SM). 반응 혼합물을 물로 세척하고 진공에서 농축시켜 갈색 오일을 수득하였다. 문헌에서, 오일을 EtOAc에서 제거하고 증발에 의해 농축시켜, 작은 부피의 고체의 침전을 제공하였다.

[0350] 조사

[0351] 그러나, 출원인의 손에서 EtOAc로부터 고체의 침전은 관찰되지 않았다. 헵탄을 이용한 분쇄에 의해 고체의 침전이 장려되었지만, 이는 스케일러블 공정을 형성하지 않을 것이다. 고체를 수집하였으며 고순도 단계 1 생성물(75% 수율, NMR에 의해 >95% 순도)을 제공하였다.

[0352] 반응이 잘 진행되는 동안, 취급이 용이한 고체를 얻을 수 있도록 분리 절차에 추가 개발이 필요하였다. 여과에 의한 고체의 분리는 또한 정제 수단을 제공할 것으로 기대되었다.

[0353] 반응을 우선 EtOAc에서 시험하여 고체의 침전이 반응 혼합물로부터 직접 분리될 수 있는지 확인하였다. 그러나, EtOAc에서 반응 프로파일은 DCM에서보다 덜 유리한 것으로 밝혀져서 반응이 중단되었다.

[0354] 출원인은 생성물의 재결정화를 방지할 수 있는 것으로 여겼기 때문에 DCM 반응 혼합물로부터 피리딘을 세척하였다. 반응이 반복되었으며(HPLC에 의해 0.4% SM, 98.7% 생성물의 완성) 반응 혼합물을 20% 시트르산으로 세척하여 pH2/3를 달성하고, 피리딘을 제거한 다음 포화 $NaHCO_3$(aq)로 증발 단계에서 낮은 pH를 피하였다. 유기물을 건조시키고 헵탄으로의 용매 교환을 수행하여 단계 1의 침전을 제공하였다. 진공에서 건조 후 순수한 단계 1을 제공하는 여과에 의해 고체를 수집하였다(87% 수율, NMR에 의한 >95% 순도).

[0355] 안정성 시험을 수행하여 20% 시트르산, 및 포화 $NaHCO_3$와 함께 교반할 때 반응 혼합물이 밤새 안정하다는 것을

확인하였다. 오븐이 40℃ 및 60℃에서 건조될 때 생성물이 안정한 것으로 밝혀졌다.

[0356] 스케일업

[0357] 단계 1 반응은 >100g의 4-하이드록시인돌을 처리하여 성공적으로 스케일업되었다. 반응은 예상대로 진행되었고 단계 1 생성물(93% 수율, ~98% NMR 순도)을 제공하도록 처리되었다.

[0358] GMP 원료 합성

[0359] 대규모 단계 1 반응을 수행하여 GMP 출발 물질을 공급하였다(>500g의 4-하이드록시인돌 처리). HPLC(99.2% 생성물, <0.1% SM)에 의한 SM 소비를 제공하여 예상대로 반응이 진행되었다. 건조 후 단계 1 생성물(94% 수율, HPLC에 의한 99.1%, 99% NMR 분석)을 제공하기 위해 확립된 절차를 사용하여 반응을 워크업하였다.

[0360] 또한, 개발에서 단계 1 절차는 일부 배치의 4-하이드록시인돌에 존재하는 작은 불순물을 제거하는데 효과적이라는 것이 주목되었다. 단계 1 반응 후에 4-하이드록시인돌에 존재하는 낮은 수준의 불순물을 완전히 제거하여 깨끗한 물질을 높은 수율(89%) 및 순도(HPLC에 의해 99%, NMR 분석에 의해 99%)로 제공하였다.

[0361] 실험

[0362] 4-하이드록시인돌(1eq 제한 시약)을 N_2 하에 용기에 충전한 다음 DCM(디클로로메탄; 4-하이드록시인돌 충전을 기준으로 6부피)으로 충전하였다. 반응물을 0-5℃로 냉각시키고 피리딘을 0-5℃에서 적가하였다(1.2eq). 아세트산 무수물(1.1eq)을 0-5℃에서 적가하고 반응물을 1-1.5시간 동안 20-25℃로 가온하고 추가의 3시간 동안 20-25℃에서 교반하였다. 반응을 샘플링하고 완료를 위해 분석하였다. 이어서, 반응물을 20% 시트르산 수용액(4-하이드록시인돌 충전을 기준으로 3x3부피)으로 3회 및 포화 $NaHCO_3$(4-하이드록시인돌 충전을 기준으로 3부피)으로 한번 세척하였다. DCM 용액을 $MgSO_4$ 상에서 건조시키고 여과하고 DCM 층을 증류에 의해 절반 부피로 농축시켰다. 헵탄(4-하이드록시인돌 충전에 기초한 6부피)을 첨가하고, 단계 1의 완전한 침전이 발생할 때까지 증류에 의해 추가의 DCM를 제거하였다. 반응물을 15-25℃로 냉각시키고, 고체를 여과로 수집하고, 헵탄(4-하이드록시인돌 충전을 기준으로 1부피)으로 세척하고 60℃에서 밤새 진공 건조시켰다.

[0363] JNP와의 차이점과 이점은 다음과 같이 요약될 수 있다:

[0364] i) 출원인은 약 2-3의 pH에서 시트르산을 사용하여 피리딘을 세척하였다. 이는 개선된 분리 및 결정화를 촉진시켰다. 실제로 DCM 상을 분리하고 수성 시트르산 상을 버린다.

[0365] ii) 중탄산 나트륨에서의 추가 세척은 추가 개선을 초래한다.

[0366] iii) 헵탄으로의 용매 교환은 고체 침전을 개선시켜 수율을 최대화하고 재현 가능한 고순도 단계 1을 초래한다.

[0367] 실시예 3

[0368] 단계 2(도 3)

[0369] 단계 i - 산 염화물 형성

[0370] 단계 1 생성물과 옥살일 클로라이드(1.5eq)의 반응에 의한 반응성 중간체 2A의 형성은 TBME 및 THF(6부피/1부피)의 혼합물에서 초기에 시험되어 문헌에서 사용된 휘발성 및 고인화성 Et_2O에 대한 실행 가능한 대안인지를 결정하였다. 반응은 ~18시간 후 Et_2O와 유사한 용해도 프로파일(용액의 단계 1, 단계 2A의 침전)로 완료되었다.

[0371] 산 클로라이드 중간체가 가수분해되기 쉽기 때문에, 가변적인 분석 결과를 초래하고 보다 강력한 샘플 구성 및 분석이 개발되었으며 여기서 반응은 THF/NMe_2로 급랭되고(단계 2 제공) 이후 HPLC에 의해 분석된다.

[0372] TBME 및 THF의 비는 스케일업을 위해 선택된 TBME:THF의 바람직한 비가 6:1인 중간체의 최고 순도 및 수율을 제공하도록 최적화되었다. TBME:THF의 다른 비가 사용될 수 있다.

[0373] 바람직한 용매 혼합물(1부피 THF, 6부피 TBME)을 사용하여 스케일업 반응을 수행하였지만 옥살일 클로라이드 첨가는 30-35℃에서 수행하였다. 이어서, 생성된 용액을 40℃에서 2.5시간 동안 가열하여 ~1% 단계 1 생성물이 남은 상태로 완료시켰다. 용액을 유지하기 위해 뜨거운 첨가를 수행하는 것은 높은 반응 속도를 보장하고 훨씬 짧은 반응 시간(2.5시간 대 하룻밤)을 갖는 개선된 완료 수준을 제공하였다. 생성물은 여전히 ~15분 후에 온도에

서 침전되는 것으로 보였고, HPLC에 의해 반응 프로파일에 유해한 영향이 관찰되지 않았다.

[0374] 중간체 2A의 안정성이 알려지지 않았기 때문에, 중간체를 분리하고 분해(가수분해)를 감수하는 대신 단계 2를 통한 물질의 텔레스코핑이 시도되었다. 반응 프로파일은 낮은 수준으로 존재하는 여러 성분으로 복잡하였다. TBME를 첨가하고 침전물을 수집하였다. 그러나, 이것은 또한 HPLC/NMR에 의해 복잡한 혼합물인 것으로 밝혀졌다.

[0375] 열악한 반응 프로파일로 인해, 과량의 옥살일 클로라이드로부터 정제를 허용하기 위해 중간체 2A를 분리하는 것이 필요하다고 여겨졌다. 반응을 반복하고, 황색 침전물을 여과로 수집하고 TBME로 세척하여 과량의 옥살일 클로라이드를 제거하였다(80% 수율). NMR 분석은 생성물이 충분한 순도(NMR에 의해 ~95%)임을 확인하였다. 그러나, 질소하에 저장함에도 불구하고, 이후 며칠 동안 일부 분해가 관찰되어 아세테이트기의 탈-보호를 포함하는 부분 가수분해를 제공하였다.

[0376] 분리 동안 중간체 산 클로라이드의 가수분해 가능성을 시도하고 감소시키기 위해, 텔레스코프 절차로의 추가 조사가 수행되었다. 반응 혼합물이 TBME 액체를 침강시킴으로써 쉽게 디캔팅될 수 있고 잔류 고체는 유사한 방식으로 TBME의 추가 부분으로 세척된다는 것이 밝혀졌다. 이로써 수분에 대한 노출을 최소화하면서 과량의 옥살일 클로라이드로부터 중간체 2A를 정제할 수 있었다.

[0377] THF/TBME 혼합물에서 중간체의 부분 용해도로 인해 일부 반응 수율이 손실될 수 있는 것으로 느껴졌다. 이는 경사분리 액체에 헵탄을 첨가하여 확인하였으며, 이는 추가의 고체를 침전시켰다. 이 용해도를 제한하기 위해, 경사분리 전에 헵탄(8부피)을 첨가하였다. TBME로 고체를 세척하는 대신, 헵탄을 세척(3x6부피)에 사용하여 높은 순도의 중간체를 유지하면서 수율을 최대화시켰다. 이 방법론은 성공적으로 스케일업하였으며 선호되는 공정이다.

[0378] 단계 ii - 디메틸아민과의 반응

[0379] 문헌(Synthesis, 1999, 6, 935-938; DE Nichols)은 $HNMe_2$ 가스가 이 변형에 효과적이라고 제안하였다. 그러나, 대규모 처리를 단순화하기 위해, 이는 추가 과량의 염기를 갖는 고체 $HNMe_2$.HCl 또는 THF 중 $HNMe_2$ 용액으로 대체되었다. JNP는 과량의 염기(피리딘)의 존재 하에서 $HNMe_2$를 사용한다.

[0380] 초기에 분리된 중간체 2A를 사용하여 일련의 시험 반응을 통해 디메틸아민과의 반응을 최적화하였다(표 11 참조).

표 11

[0381] 단계 2 반응 최적화 시험

#	디메틸아민 소스	염기	용매	HPLC 완료	분리된 고체
1	2M $HNMe_2$/THF 1.2 eq	피리딘 1.3 eq	THF/TBME	80% 생성물	64% 수율, NMR에 의한 ~70% 순도.
2	$HNMe_2$.HCl 1.5eq	K_2CO_3	THF/H_2O	70% 생성물	40% 수율, NMR에 의한 ~98% 순도.
3	2M $HNMe_2$/THF 1.33 eq	피리딘 3.6 eq	Et_2O	81% 생성물	63% 수율, NMR에 의한 ~90% 순도.
4	2M $HNMe_2$/THF 2.9 eq	N/A	Et_2O	93% 생성물	72% 수율, NMR에 의한 ~98% 순도.

[0382] 피리딘(#1)을 갖는 문헌 공급 조건은 Et_2O에서의 유사한 반응(#3), Me_2NH.HCl 및 수성 K_2CO_3를 사용한 2상 반응(#2) 및 THF 중 과량의 2M Me_2NH와의 반응(#4)과 함께 시험되었다. HPLC에 의한 주요 성분은 모든 경우에서 수성 염기 및 과량의 Me_2NH를 사용하는 조건이 피리딘을 사용한 것보다 일반적으로 훨씬 더 깨끗한 바람직한 생성물이었다. 모든 경우에 상당한 가수분해 생성물이 관찰되었지만, 이는 HPLC 분석을 위해 샘플 구성 동안 급랭된 미반응 중간체 2A의 결과인 것으로 생각되었다. 물을 첨가하여 반응을 마무리한 후, 유기 용매를 진공에서 제거하여 고체를 침전시켰다.

[0383] 과량의 아민과의 반응은 훨씬 개선된 불순물 프로파일을 나타내었고, 이는 더 높은 수율(72% 대 63%) 및 순도(98% 대 90%)로 변환되었다. 이 접근법은 반응의 수분 함량을 제한하여 가수분해가 발생할 기회를 최소화하였다. 분리된 고체에서의 피리딘의 부재로 인해 정제가 더욱 용이해질 것으로 예상되었다. 이러한 이유로, 염기로 과량의 $HNMe_2$를 사용하는 조건이 스케일업을 위해 선택되었다.

[0384] Et_2O에서의 반응은 깨끗한(#4) 프로파일을 제공하였다. 그러나, 대규모 처리를 용이하게 하기 위해 TBME와 같은 덜 휘발성인 용매로 전환하는 것이 유리한 것으로 판명되었다. 이는 산 클로라이드를 이 반응으로 텔레스코핑하는 것을 용이하게 할 것이다. 이러한 이유로 THF 중 과량의 2M Me_2NH를 사용하여 TBME에서 반응을 수행하도록 선택되었다.

[0385] 물의 첨가는 존재하고 매우 진한 혼합물 및 느린 여과를 초래하는 $HNMe_2$.HCl 염을 가용화함으로써 워크업을 도울 것이라고 여겨졌다. 이것이 시험되었다. 그러나, TBME 및 THF의 반응에 물을 첨가한 경우, 추가적인 불순물 및 광범위한 아세테이트 탈-보호(페놀 생성물)를 나타내는 액체의 분석으로 불량한 회수가 얻어졌다. 따라서 정제의 추가 개발이 필요하였다.

[0386] 정제 개발

[0387] 가수분해 생성물 및 관찰된 다른 불순물을 제거하는 정제 전략을 개발하는 것이 바람직하다. 분리된 물질($HNMe_2$.HCl로 가정)의 염 함량을 감소시키기 위해 결정화에 물을 포함하는 것이 바람직하다. 이를 위해 일련의 15가지 용매 및 용매 혼합물을 스크리닝하였다(100mg 규모, 10부피 용매, 60℃로 열 순환).

표 12

[0388] 단계 2 정제 시험

용매	관찰	회수	HPLC 순도 (중간체 2A의 가수분해 imp)
TBME	슬러리	47 mg*	96.4% (2.8%)
DCM	슬러리	60 mg	99.5% (0.5%)
톨루엔	슬러리	30 mg*	95.8% (3.4%)
EtOAc	슬러리	66 mg*	97.8% (1.6%)
iPrOAc	슬러리	40 mg*	97.3% (2.0%)
IPA	슬러리	65 mg	99.4% (0.4%)
EtOH/H_2O, 1:1	슬러리	62 mg	99.4% (0.5%)
MeCN/H_2O, 1:1	60° C의 RTSolution에서 부분 용해	30 mg	99.0% (0.7%)
아세톤/H_2O, 1:1	60° C의 RTSolution에서 슬러리	51 mg	99.4% (0.5%)
THF/H_2O, 1:1	60° C의 RTSolution에서 부분 용해	침전 없음	n/a
헵탄	슬러리	34 mg*	95.0% (3.6%)
MIBK	슬러리	65 mg	97.9% (1.4%)
MEK	슬러리	60 mg	99.6% (0.3%)
사이클로헥산	슬러리	41 mg*	94.4% (4%)
자일렌	슬러리	56 mg*	96.1% (3%)

[0389] * 유리 바이알에 부착된 진한 현탁액 및 고체로 인해 회수가 대표적이지 않다.

[0390] 용매로부터 스크리닝된 아세톤/물로부터 실온에서 매우 적은 관찰된 용해도를 갖는 재결정화를 제공하였다. 이것이 수성 시스템이기 때문에, 고체로부터 Me_2NH.HCl을 퍼지하는 것을 돕는 이점이 있었다.

[0391] 아세톤/물 재결정화가 스케일업되었다. 추가의 물(4부피)을 첨가하기 전에 온도(5부피 아세톤, 1부피 물)에서 용액을 얻고 혼합물을 RT로 냉각시켜 결정화(62% 회수, >99% HPLC 순도)를 얻었다. 이 공정은 회수를 돕기 위해 더 많은 물을 첨가하여 추가로 스케일업되었다(총 5부피 아세톤, 10부피 물, 78% 회수).

[0392] 공정을 추가로 스케일업하고(30g), 미정제 고체를 재결정화 절차를 통해 취하였다. 생성물 순도는 높았지만, 수율 하락(56% 수율, NMR 분석에 의해 99%, HPLC에 의해 99.4%)이 있었다.

[0393] 회수를 향상시키기 위해, 첨가되는 물의 양이 10부피에서 15부피로 추가로 증가되었다. 이는 생성물 순도를 99% 초과로 유지하고 소규모에서 더 높은 회수율을 나타냈다(90% 회수율, 이전에 관찰된 56-70%). 그러나 이 수정된 절차의 스케일업은 다시 낮은 회수율(58% 수율)을 나타냈다. 따라서, 재결정화를 스케일업할 때 직면한 문제로 인해, 수행된 원래의 슬러리 스크린을 기초로 다른 정제 수단이 요구되었다(상기 표 12).

[0394] 정제 전략의 재개발은 대규모 단계 2 반응으로부터 분리된 물질을 사용하여 수행되었다. 반응이 예상된 바와 같이 진행되어 오븐 건조 후 미정제 생성물을 제공하였다(NMR 분석에 의해 70%, 79% 활성 수율). 상당한 염 성분($HNMe_2$.HCl으로 추정됨)을 제거하기 위해, 일부를 RT에서 물 슬러리화하였다. 건조 후 이는 75% 회수(NMR 분석에 의해 95%)를 제공하여 이것이 염 함량을 감소시키는 효과적인 수단임을 나타내었다. HPLC 순도는 ~93%로 변하지 않았다. 이어서, 고체의 화학적 순도를 증가시키는 방법이 모색되었다.

[0395] 초기 스크린으로부터, EtOH:H_2O, IPA 및 아세톤:H_2O 모두 우수한 회수를 갖는 고순도 생성물을 제공하는 것으로 보였으므로, 이들 용매 시스템은 추가 조사를 위해 선택되었다. 1.4%, 1.0% 및 0.8% 수준의 주요 불순물을 가지며 투입 순도는 92.7%였다.

표 13

[0396] 추가 정제 개발(40℃ 1hr에서 슬러리, RT에서 여과, 1부피 세척)

용매 시스템	회수	HPLC 순도 (주요 불순물 수준)			
		생성물	Imp 1	Imp 2	Imp 3
아세톤/물 6/16부피	67%	98.8%	0.7%	0.2%	0.1%
1:1 EtOH:H_2O 10부피	79%	98.0%	0.9%	0.5%	0.2%
IPA 10부피	90%	97.5%	0.8%	0.8%	0.3%
IPA 5부피	92%	97.2%	1.0%	0.7%	0.3%
4.5:2.5 IPA:H_2O * 7부피	79%	98.7%	0.6%	0.4%	0.1%
6:1 IPA:H_2O 7부피	82% **	98.0%	0.9%	0.6%	0.2%

[0397] * 반응을 5부피에서 1:1 IPA:H_2O에서 초기에 수행하였다. 그러나, 교반하기에는 너무 두껍게 되었고, 따라서 2부피의 IPA가 추가되었다.

[0398] ** 혼합물은 두껍고 존재하는 고체는 매우 미세하여 필터를 치는 일부 고체로 여과하기가 어려웠다.

[0399] 이들 시험의 결과는 이들 시스템, 특히 IPA에 기초한 시스템으로부터 우수한 회수가 가능함을 시사하였다. EtOH:H_2O는 IPA 단독보다 약간 더 우수한 불순물 프로파일을 제공하였다; 그러나 회수는 좋지 않았다(79 대 90%). IPA에 의한 불순물 프로파일은 물의 존재(98.7% 대 ~97.5%)에 의해 크게 향상되었지만, 이는 더 낮은 회수율(79 대 90%)을 초래하였다. 이는 화합물에 대한 특정 수준의 물 용해도를 제안하였다. IPA 및 EtOH:물에서의 최종 시험은 감소된 물 부피를 사용하여 수행되었으며 고순도 및 ~90%의 회수를 제공하는 균형을 찾을 수 있는지 확인하였다. 이 시스템은 수율을 향상시켰지만 여과는 느리기 때문에 추가 용매 혼합물도 평가되었다.

표 14

[0400] 추가 용매 혼합물의 조사(500mg 규모, 40℃ 1시간에서 슬러리, RT에서 여과, 1부피 세척)

용매 시스템	회수	HPLC 순도 (불순물 수준)			
		생성물	Imp 1	Imp 2	Imp 3
IPA 10 부피	460 mg (92%)	97.6%	1.1%	0.7%	0.3%
1:3 EtOH:H2O 5부피	451 mg (90%)	96.2%	1.4%	0.8%	0.5%

1:2 EtOH:H2O 5부피	440 mg (88%)	97.5%	1.3%	0.7%	0.4%
1:1 EtOH:H2O 5부피	375 mg (75%)	97.9%	1.0%	0.7%	0.3%
2:1 EtOH:H2O 5부피	354 mg (71%)	97.6%	1.0%	0.6%	0.4%
3:1 EtOH:H2O 5부피	369 mg (74%)	97.9%	0.9%	0.5%	0.3%

[0401] 5부피의 EtOH/물 슬러리는 매우 진하고 다루기가 쉽지 않았다. 고체의 순도는 모든 시험에서 비교할 수 있었기 때문에(여과 및 세척의 품질에 따라 약간의 변화가 있을 수 있음), 100% IPA 조건이 높은 회수율을 제공하며 생성 현탁액은 쉽게 처리할 수 있어서 100% IPA 조건이 스케일업되었다.

[0402] 바람직한 슬러리의 초기 스케일업은 96.4%의 HPLC 순도(1.2%, 0.7%, 0.4%의 불순물 수준)로 (92% 회수)를 제공하였다. 액체 분석 결과는 HPLC에 의해 모든 주요 불순물 - 72%(8.6%, 3.8%, 3.4%)에서 이들이 풍부해진 것을 나타내었다. 이는 높은 회수를 제공하는 적합한 정제 방법으로 보였으며, 불순물의 추적 및 제거가 다운 스트림(단계 3에서> 99%, >0.5% 단일 불순물 없음)이 달성되는 것을 보장하기 위해 다음 단계에서 재료가 사용 테스트되었다.

[0403] 남아있는 미정제 단계 2 물질(70% 분석)이 무기물을 제거하기 위해 물 슬러리화되고 이어서 IPA에서 슬러리화되어 개선된 순도의 물질(NMR 분석에 의해 97%, 단계 2에 대해 76% 수율, HPLC에 의한 96.8%, 1.1%, 0.8%, 0.4%의 불순물)을 제공할 때 슬러리는 스케일업 가능한 것으로 입증되었다.

[0404] GMP 원료 합성

[0405] GMP 캠페인을 제공하기 위해 대규모의 단계 2 반응이 수행되었다. HPLC에 의해 93% 순수한 단계 2를 제공하도록 물 슬러리화 및 여과된 미정제 생성물을 제공하는 것으로 예상된 바와 같이 반응이 진행되었다. 이를 8부피 IPA에서 추가로 슬러리화하고 여과하여 단계 2 생성물(HPLC에 의해 93.7%, 92% 분석, 66% 활성 수율)을 제공하였다. 얻어진 순도는 개발 캠페인 동안 관찰된 것보다 낮았으므로, 얻어진 고순도 단계 3이 후속 처리(GMP 원료)에 적합하다는 것을 확인하는 사용 테스트가 수행되었다.

[0406] 동일한 조건하에 제 2 배치를 수행하여 미정제 생성물을 얻었으며, 이는 물 슬러리 후 HPLC에 의해 90% 순도였다. 이어서 이 물질을 물 슬러리화하고 IPA 슬러리로 정제하여 384g의 단계 2 생성물(HPLC에 의해 93.0%, 91% NMR 분석, 60% 활성 수율)을 제공하였다.

[0407] GMP 합성을 재공급하기 위해 제 3 배치를 수행하였다. 미정제 생성물을 물에이어서 IPA 슬러리로 성공적으로 정제하여 이전의 배치(HPLC에 의해 97.3%, 96% NMR 분석)에 비해 증가된 순도로 단계 2(79% 수율)를 제공하였다.

[0408] 실험

[0409] 단계 1(1eq. 제한 시약)을 N_2 하에 용기에 충전한 다음 THF(1부피 wrt 1 단계 충전) 및 TBME(6부피 wrt 1 단계 충전)으로 충전하였다. 이어서 옥살일 클로라이드를 용기(1.5eq)에 적가하여 발열이 초기 온도를 35-40℃로 올린 다음, 필요한 만큼 냉각을 적용하여 35-40℃를 유지시킨다. 첨가 직후, 반응물을 40℃로 가열하고 2-6시간 동안 교반하였다. 반응을 샘플링하고 완료를 위해 분석한 후, 실온으로 냉각하고 헵탄(8부피 wrt 단계 1 충전)을 첨가하여 추가의 고체를 침전시켰다. 반응물을 10분 동안 교반한 후, 고체를 침전시켰다. 용매의 대부분을 고체로부터 경사 분리시킨 다음, 헵탄(2x6부피 wrt 단계 1 충전)으로 2회 세정하고, 각 세정 후에 유사한 방식으로 경사 분리하였다. 이어서 고체를 샘플링하고 분석하였다. TBME를 용기에 충전하여(4부피 wrt 단계 1 충전) 황색 슬러리를 수득하고, 이를 드라이아이스/아세톤 조를 사용하여 -20℃로 냉각시켰다. THF(2eq.) 중 2M의 Me_2NH 용액을 온도를 -20℃ 내지 -10℃로 유지하면서 ~15분에 걸쳐 용기에 적가하였다. 반응 혼합물을 실온으로 서서히 가온하고 밤새 교반하였다. 필요한 경우 추가 Me_2NH를 이 시점에 첨가할 수 있다. 반응을 샘플링하고 완료를 위해 분석하였다. 반응물을 헵탄(2x2부피 wrt 단계 1 충전)으로 세척하고 여과하고 분리된 고체를 60℃에서 진공 건조시켰다. 미정제 단계 2를 물(8부피 wrt 단계 1 충전)에서 2-18시간 동안 슬러리화한 다음, 여과하고, 물로 세척하였다(2부피 wrt 단계 1 충전). 고체를 진공하에 60℃에서 건조시켜 <2% w/w 물(칼 피셔 적정(KF)에 의해 측정)을 갖는 미정제 단계 2를 얻었다. 미정제 단계 2를 IPA(10부피)에서 2-18시간 동안 슬러리화

한 다음, 여과하고, IPA(1부피 wrt 미정제 단계 2의 질량)로 세척하고 60℃에서 진공 하에 오븐 건조시켰다.

[0410] JNP와의 차이점 및 이점은 다음과 같이 요약될 수 있다:

[0411] 단계 1

[0412] i) 첫째로, 디에틸 에테르 대신 THF/TBME 용매 시스템의 사용은 덜 휘발성이고 가연성이었다.

[0413] ii) 둘째로, 옥살일 클로라이드의 첨가는 40℃로 가열된 승온에서 수행되어, 개선된 용해도를 제공하고 침전물에서 단계 1 생성물의 포획을 방지한다. 또한 높은 반응 속도, 개선된 완료 수준 및 짧은 반응 시간을 제공하였다.

[0414] iii) 셋째로, 과량의 옥살일 클로라이드로부터 정제할 수 있도록 중간체 2A를 분리하였다.

[0415] iv) 넷째, 헵탄을 첨가하여 중간체 2A를 침전시키는 것을 돕는다.

[0416] 2 단계

[0417] v) 아민이 과량으로 사용되도록 함으로써, 최소한의 물이 존재하여 가수분해가 감소되어, 훨씬 향상된 순도 및 수율이 얻어졌다.

[0418] vi) 마지막으로, 물 및 IPA 슬러리의 사용은 단계 2 생성물의 우수한 순도를 제공하였다

[0419] 실시예 4

[0420] 단계 3

[0421] 정제된 단계 2 물질(HPLC에 의해 >99%) 및 공급된 반응 조건을 사용하여 초기 단계 3 시험 반응을 수행하였다. 단계 2 투입 물질은 THF에서 대부분 불용성인 것으로 밝혀졌고, 단계 2의 용액을 $LiAlH_4$에 첨가하는 대신 역 첨가가 수행되었다. 4eq의 $LiAlH_4$가 THF 중 1M 용액으로서 사용되었으며 20-25℃에서 ~2시간에 걸쳐 첨가되었다. 이 시점에서 10% 생성물이 여러 중간 종이 존재하는 것으로 관찰되었다. 반응물을 환류에서 ~7시간 동안 가열하여 93% 생성물 전환을 제공하였다(HPLC에 의함). 반응물을 워크업하여 미정제 단계 3 생성물(HPLC에 의해 ~90%, NMR에 의해 ~90%, ~87% 보정 수율)을 수득하였다.

[0422] 사용된 $LiAlH_4$ 충전이 성공적으로 감소된 시험 반응이 수행되었다(3eq 대 4eq). 이것이 생성된 Li 및 Al 염의 양을 감소시킴으로써 워크업에 유리할 것으로 기대되었다. 환류(10-18시간)에서 장시간 가열한 후, 반응 중간체는 HPLC에 의해 ~95% 생성물과 함께 많이 소비되었다(2-3% 남음).

[0423] 워크업 개발

[0424] 제 1 시험 반응이 로쉘 염을 사용하여 성공적으로 마무리되었지만, 사용된 부피는 매우 높았으며(~100부피), 이 절차는 스케일업을 위한 실행 가능한 공정을 형성하지 않을 것이다. 필요한 부피를 줄이고 Li/Al 염의 제거를 돕기 위해 다양한 대안적인 워크업 절차를 조사하였다.

[0425] 감소된 부피 급랭을 EtOAc 및 이어서 로쉘 염으로 시험하였다. 회색 고체는 플라스크의 바닥에 침전된 진한 페이스트로서 존재하였다. 여과가 실패한 동안, 액체를 경사분리하고 고체를 THF/EtOAc에서 재-슬러리화하여 생성물을 추출하였다. 이어서 수성 워크업을 수행하고 생성물을 농축하여 분리시켰다. 이로써 우수한 수율(순도에 대해 보정되지 않은 94%)로 우수한 순도(NMR에 의해 90-95%)의 생성물이 수득되었다. 그러나 이 공정은 쉽게 스케일업할 수 없었다.

[0426] EtOAc를 첨가하여 반응을 급랭하였고 이후 무수 Na_2SO_4의 존재 하에서 포화 Na_2SO_4는 결합제로서 작용한다. 반응은 쉽게 여과될 수 있는 입상 고체를 제공하였다. 이어서 수성 워크업을 수행하고 생성물을 농축하여 분리시켰다. 우수한 수율이 얻어졌지만(순도에 대해 보정되지 않은 ~94%) 생성물은 NMR에 의한 더 높은 수준의 주요 불순물을 함유하였다(10% 대 보통 관찰되는 2-4%).

[0427] 0℃에서 20% AcOH로 반응을 급랭하여 여과할 수 없는 겔을 형성시켰다. 반응은 포기되었다.

[0428] 반응물을 EtOAc로 급랭한 다음 20% 시트르산으로 급랭하여 고체를 수득하고, 이를 여과에 의해 분리할 수 있었다. 액체를 농축시켜 생성물을 얻었다. 이 절차는 약간 더 낮은 수율(순도에 대해 보정되지 않은 ~77%)인 반면, 생성물은 매우 높은 순도(>95%)였다.

[0429] EtOAc 및 이어서 물(THF 중 $LiAlH_4$의 g당 3ml)을 첨가하여 추가 반응을 급랭하였다. 쉽게 여과할 수 없는 겔이 형성되었고 반응은 포기되었다.

[0430] 마지막으로, 피셔 방법에 의해 반응을 급랭하였다. 물($LiAlH_4$의 g당 1ml)을 첨가한 다음 15% NaOH($LiAlH_4$의 g당 1ml) 및 마지막으로 물($LiAlH_4$의 g당 3ml)을 첨가하였다. 이로써 반응 혼합물로부터 여과될 수 있는 고체를 수득하였다. 이어서, 액체를 분배하고 진공에서 농축시켰다(87% 수율, NMR에 의해 90-95%).

[0431] 이들 실험은 하기 표 15에 요약되어 있다:

표 15

[0432] 대안적인 워크업 조건의 요약

#	워크업 절차	수율	순도
3.1	EtOAc 급랭 로쉘 염 (감소된 부피)	2.8 g (94% 보정되지 않음)	NMR에 의해 90-95%
3.2	Na_2SO_4의 존재 하에 EtOAc 급랭	2.8 g (94% 보정되지 않음)	NMR에 의해 ~80-85%, 10% imp.
3.3	20% AcOH 급랭	에멀젼 (폐기물에 대한 반응)	
3.4	EtOAc 급랭 20% 시트르산	i) 529 mg (71% 보정되지 않음) ii) 2.3 g (77% 보정되지 않음)	NMR에 의해 >95% 순도
3.5	물 급랭	에멀젼 (폐기물에 대한 반응)	
3.6	물/NaOH 급랭	i) 615 mg (83% 보정되지 않음) ii) 2.6 g (87% 보정되지 않음)	NMR에 의해 90-95%

[0433] 시트르산 및 NaOH를 사용한 모든 급랭은 고체를 수득하였으며, 이는 반응 혼합물로부터 용이하게 여과될 수 있고 최소 용매 부피를 요구하였다. NaOH를 사용한 조건은 수율이 높지만(~10%), 이 절차에서 얻은 생성물은 덜 순수했으며 다음 단계에서 사용하기 전에 추가 정제가 필요할 것이다. 시트르산의 낮은 수율은 생성물 시트레이트 염의 일부 침전으로 인한 가능성이 높다. 이것은 농축 직후에 얻어진 깨끗한 생성물로 정제 효과를 가졌다. 이러한 조건은 스케일업을 위해 선택되었으며 시트르산 충전의 추가 최적화가 이 공정으로부터 깨끗한 생성물이 높은 수율로 분리할 수 있기를 기대하였다.

[0434] 회수를 최대화하기 위해 약간 감소된 시트르산 충전으로 반응을 반복하였다. 이 반응에 의해 THF 중 필터 케이크를 재-슬러리화하여 얻은 추가 20% 수율을 갖는 57% 수율로 생성물을 수득하였다(HPLC에 의해 두 샘플 97.7%).

[0435] 반응이 스케일업되었다. 그러나, 반응이 미리 두껍게 보이는 EtOAc 급랭 동안, 반응은 플라스크에서 검화되어(gummed) 진한 덩어리를 형성하여 혼합을 제한하였다. 시트르산의 첨가는 통상적인 슬러리/겔로 이어졌지만, 이는 가능한 공정을 나타내지 않았다. 이 반응을 THF에서 재-슬러리 처리된 필터 케이크로 워크업하여 HPLC에 의해 95.0%, 76% 활성 수율을 제공하는 회수를 최대화하였다.

[0436] 더 나은 급랭을 개발하고 EtOAc로 보이는 검 형성을 피하기 위해 반응을 반복하였다. 아세톤을 첨가하여 부분을 급랭하여 농후화 징후 없이 용이하게 교반된 현탁액/에멀젼을 야기하였다. 이어서 시트르산 처리를 수행하여 여과 가능한 혼합물을 수득하였다. 이 급랭은 나머지 반응에서 성공적으로 수행되었고 미정제 생성물을 우수한 수율(71% 분석, 82% 보정된 수율, HPLC에 의해 98.0%)로 제공하기 위해 워크업되었다.

[0437] 급랭 후, 반응 혼합물은 일반적으로 pH8/9인 것으로 밝혀졌다. 워크업 최적화 공정의 일부로서 상이한 pH가 조사되었다. 반응물을 약간 감소된 시트르산 충전(급랭 후 pH11/12를 얻음)을 받는 반쪽으로 워크업을 위해 분할하고, 다른 반쪽은 추가 시트르산을 첨가하여 pH7로 만들었다. pH11 반응물을 워크업하여 85% NMR 분석(73% 수율)의 물질을 제공하였으며 pH7 반응물은 60% NMR 분석(62% 수율)을 제공하였다. 이 결과로부터 >70% 수율을 제공하기 위해 급랭 후 정확한 pH를 얻는 것이 중요하다는 것이 명백하였다. 시트르산 전하를 단지 약간만 감소시킴으로써(여전히 20% 시트르산의 대략 2부피), 수율의 대략 8% 증가가 얻어졌다. 이 정보를 손에 넣고 급랭 동

안 장차 반응물의 pH를 모니터링하여 혼합물이 강염기를 유지하도록 보장하였다.

[0438] 정제 개발

[0439] 60℃로 열 순환하면서 10부피의 용매 중에서 슬러리화된 100mg분의 미정제 실로신 생성물을 사용하여 정제 스크리닝을 수행하였다. 슬러리를 주말에 걸쳐 RT로 냉각시킨 후, 여과에 의해 임의의 고체를 수집하였다. 산 및 염기에 대한 안정성 또한 산/염기 워크업을 수행하기 위해 시험되었다. 스크리닝 결과는 아래 표 16에 표시되어 있다:

표 16

[0440] 실로신 정제 스크리닝(투입 순도 및 3가지 주요 불순물 수준: 90.2%, 3.8%, 0.9%, 0%).

용매	관찰	회수 (대략)	HPLC 순도 (및 주요 불순물 수준)
MeOH	RT에서 용액	n/a	n/a
EtOH	60° C에서 용액 RT에서 침전물	35 mg	97.2%, 0.4%, 1.1%, 0.8%
IPA	60° C에서 슬러리	51 mg	97.6%, 0.5%, 0.5%, 1.1%
MeCN	60° C에서 용액 RT에서 침전물	46 mg	96.8%, 0.6%, 0.4%, 1.6%
EtOAc	60° C에서 슬러리	58 mg	97.1%, 0.9%, 0.2%, 1.3%
^{i}PrOAc	60° C에서 슬러리	58 mg	98.2%, 0.8%, 0.2%, 0.4%
톨루엔	60° C에서 슬러리	70 mg	93.3%, 3.6%, 0.2%, 0.8%
헵탄	60° C에서 슬러리	77 mg	91.3%, 3.8%, 0.2%, 0.7%
아세톤	60° C에서 용액 RT에서 침전물	30 mg	97.7%, 0.4%, 0.3%, 0.9%
MEK	60° C에서 용액 RT에서 침전물	24 mg	97.3%, 0.5%, 0.5%, 1.2%
MIBK	60° C에서 슬러리	49 mg	97.4%, 0.6%, 0.2%, 1.3%
THF	RT에서 용액	n/a	n/a
TBME	60° C에서 슬러리	67 mg	95.5%, 2.0%, 0.1%, 1.5%
DCM	RT에서 용액	n/a	n/a
1M HCl	RT에서 용액	n/a	83.7%, 새로운 imp 8%
1M KOH	RT에서 슬러리 (검정색)	n/a	89.1%, 5.4%, 0.9%, 2.2%

[0441] 3개의 강조된 불순물 중 첫 번째는 $LiAlH_4$ 첨가가 완료될 때 ~70%에서 관찰되는 가장 안정적인 반응 중간체에 해당한다(생성물로 전환하기 위한 환류가 필요함). 세 번째 불순물은 투입물에 존재하지 않았으며 슬러리 절차 동안 생성된 것으로 보였다. 슬러리로 남아있는 용매 중에서, ^{i}PrOAc는 최고 순도를 제공하였다. MeCN은 결정화 동안 불순물을 제거할 수 있는 가능성을 갖고 개발 중에 개선될 가능성이 있는 회수를 갖는 몇몇 재결정화가 발견되었다. KOH 샘플은 빠르게 검은색으로 변하면서 산 및 염기 모두에서 약간의 분해가 관찰되었다.

[0442] 미정제 단계 3 물질의 정제는 2개의 가장 유망한 용매(MeCN 및 ^{i}PrOAc)를 사용하여 스케일업되었다. 회수를 개선하기 위해 용매 부피를 최소로 감소시켰다. 이러한 시험의 결과는 하기 표 17에 제시되어 있다.

표 17

[0443] MeCN/^{i}PrOAc 정제의 추가 개발

용매	관찰	회수 (%)	HPLC 순도 (및 주요 불순물 수준)
MeCN (5 부피)	5 부피에서 재결정화	512 mg(51%)	97.6%, 0.7%, 0.8%, 0%
^{i}PrOAc (3 부피)	3 부피에서 슬러리	706 mg(71%)	95.8%, 1.3%, 0.6%, 0%

[0444] 5부피의 MeCN으로부터 재결정화가 얻어졌고, 3부피의 ^{i}PrOAc(둘 다 75℃)에서 뜨거운 슬러리가 달성되었다. 감

소된 부피에도 불구하고 MeCN으로부터의 회수는 다시 불량했지만, 생성물은 순도가 매우 높았다(NMR에 의해 >>95%). ^{i}PrOAc로부터의 회수는 NMR에 의해 분석될 때 생성물 순도의 큰 증가(~95%)와 함께 보다 나았다.iPrOAc 슬러리로부터의 물질의 HPLC 및 NMR 순도는 높았지만, 낮은 분석 값(NMR 분석에 의한 85%)이 관찰되었다. 물질의 분석 값을 향상시키고 색상을 제거하기 위해, 실리카 패드에 의한 정제(지금까지 얻은 모든 재료는 짙은 자주색, 녹색 또는 갈색이었다)를 조사하였다.

[0445] 미정제 실로신(71% 분석, HPLC에 의한 98.0%)을 THF로 용리하는 4eq의 실리카에 통과시켰다. 약간 개선된 HPLC 순도(98.4%) 및 분석 값(~82% 분석)으로 회백색 고체의 80% 회수가 얻어졌다. 이는 생성물 분석 값을 증가시키는 효과적인 수단 인 것으로 입증되었으므로 반응 워크업의 일부로 포함되었다.

[0446] 이어서, 일련의 ^{i}PrOAc/반-용매 슬러리(표 18)를 실리카 처리된 투입물(슬러리 당 100mg)을 사용하여 수행하여 화학적 순도(투입 순도 98.4%)를 유지하면서 회수를 시도하고 개선시켰다.

표 18

[0447] ^{i}PrOAc/반-용매 첨가의 결과.

용매 시스템	회수	HPLC 순도
^{i}PrOAc 5 부피	78%	99.7%
1:1 ^{i}PrOAc:헵탄 5 부피	70%	99.6%
1:1 ^{i}PrOAc:TBME 5 부피	83%	99.7%
1:1 ^{i}PrOAc:톨루엔 5 부피	84%	99.4%
^{i}BuOAc 5 부피	80%	99.6%

[0448] 모든 순도 값이 비교 가능하기 때문에, 얻어진 최고 회수에 기초하여 스케일업하기 위해 2개의 용매 시스템이 선택되었다. 회수를 더 잘 평가하기 위해 두 개의 선호되는 슬러리(반-용매로서 TBME 및 톨루엔)를 스케일업(슬러리 당 1.0g)하였다.

표 19

[0449] 선호되는 정제 방법의 스케일업

용매 시스템	회수	HPLC 순도
1:1 ^{i}PrOAc:TBME 5 부피	79.9%	99.1%
1:1 ^{i}PrOAc:톨루엔 5 부피	79.4%	99.6%

[0450] 이들 옵션 둘 다는 ~80% 회수에서 >99% HPLC 순도의 물질을 제공하였고, 실리카 패드와 조합하여, 실로신 생성물을 위한 효과적인 정제 수단을 제공하는 것으로 보인다. 추가 색상은 슬러리 동안 액체로 제거되어 실로신을 백색 고체로 제공하였다. 모든 불순물은 효과적으로 0.5% 미만으로 제거되었다. ^{i}PrOAc:TBME 슬러리는 이것이 비-독성 ICH 클래스 3 용매를 사용함에 따라 스케일업을 위해 선택되었다.

[0451] 스케일업

[0452] 개발된 단계 3 조건을 스케일업하고 반응을 진행시켜 밤새 환류시킨 후(일반적인 공정) HPLC에 의해 존재하는 2.9%의 반응 중간체를 갖는 94.4% 생성물의 완성을 제공하였다. 실리카 패드 후 실로신이 NMR 분석에 의해 83% 순도, 66% 활성 수율, HPLC에 의한 97.0%로 수득되었다. 이 물질을 iPrOAc/TBME 중의 슬러리에 의해 추가로 정

제하여 NMR 분석에 의해 100%, 62% 수율 및 HPLC에 의한 99.7% 물질을 제공하였다.

[0453] 반응으로부터의 미정제 수율이 예상보다 낮았기 때문에(66% 대 ~75%) 추가 물질을 시도하고 회수하기 위해 필터 케이크 및 실리카 패드를 재조사하였다. 그러나 이것은 성공적이지 않았다.

[0454] 비록 이전 스트레스 테스트에서 사용된 조건 하에서 물질이 안정한 것으로 나타났지만, 예상되는 것보다 낮은 수율은 워크업 동안 생성물의 분해로 인한 것일 수 있다. 이것을 추가로 조사하기 위해 반응을 반복하였다. 미정제 생성물을 실리카 패드 전에 분리하고, 워크업 동안 생성물의 분해가 일어나지 않았음을 확인하기 위해 추가의 스트레스 시험 샘플을 취하였다.

[0455] 반응이 예상대로 진행되어 완성물(93.7% 생성물, 2.9% 중간체)을 제공하였으며 농축되어 미정제 물질을 수득하였다(77% NMR 분석, 66% 활성 수율). 필터 케이크를 THF/MeOH에서 재-슬러리화 시켰지만, 유의한 실로신은 분리되지 않았다. 알루미늄 염에 배위된 임의의 생성물을 대체하려고 시도하기 위해, 추가의 시트르산을 첨가하여(pH8로부터) pH를 4로 취하고 케이크를 THF에서 재-슬러리화하였지만, 다시 유의한 실로신은 분리되지 않았다. 이전에 얻은 것과 매우 일치하는 66% 활성 수율을 갖는 반응으로부터 질량 균형은 얻어지지 않았다. 이 배치를 ^{i}PrOAc/TBME 중의 실리카 패드 및 슬러리로 정제하여 62% 수율의 고순도 물질(HPLC에 의해 99.8%)을 수득하였다.

[0456] 사용된 용매 부피가 비교적 높고 알루미늄 및 리튬 종의 제거를 위해 실리카 패드가 필요함에도 불구하고, 공정은 여전히 요구되는 규모에 매우 적합하다.

[0457] 단계 3 반응은 공정에 추가로 스케일업되었다. 예상한 바와 같이 반응이 진행되어 18시간 후 완성물을 제공하였다(~91% 생성물, ~3% 반응 중간체 남음). 실리카 패드 및 슬러리에 의한 워크업은 57% 수율의 고순도 실로신(HPLC에 의한 >99%, 99% NMR 분석, 0.35% w/w 물 칼 피셔)을 제공하였다.

[0458] 실험

[0459] 단계 2(1eq 제한 시약)를 용기에 충전한 후 THF(5부피 wrt 단계 2 충전)를 충전하였다. 혼합물을 0℃로 냉각시키고 온도를 0-20℃로 유지하면서 30-45분에 걸쳐 $LiAlH_4$(3eq)의 1M THF 용액을 적가하였다. 첨가 후, 반응물을 10-20℃에서 30분 동안 교반한 다음 가열 환류시키고 ~16시간 동안 교반하였다. 완료를 위해 반응물을 샘플링하여 분석하고, 0℃로 냉각시키고, 0-30℃에서 아세톤(9.3eq)을 적가한 다음 0-30℃에서 20% 수성 시트르산 용액(1.9부피 wrt 단계 2 충전)에 의해 급랭시켰다. 첨가 pH를 모니터링하여 그것이 pH>11로 유지되는지 확인하고 필요한 경우 첨가를 조기에 중지시켰다. 생성된 현탁액을 1시간 동안 교반하고 여과하고 THF(2부피 wrt 단계 2 충전)로 세척하여 Li 및 Al 염을 제거하였다. 필터 케이크를 ~1시간 동안 THF(12.5부피 wrt 단계 2 충전)에서 슬러리화하고 여과하고, THF(5부피 wrt 단계 2 충전)로 세척하여 Li 및 Al 염으로부터 생성물을 회수하였다. 합한 유기물을 $MgSO_4$상에서 건조시키고 여과하였다. 여과액을 대략 10부피가 남을 때까지 진공에서 증발시키고(wrt 2 단계 충전) 이 용액을 실리카 패드에 적용하였다(3eq wrt 단계 2 충전). 실리카 패드를 THF로 용리시키고 생성물 분획을 합하고 진공에서 증발 건조시켰다. 미정제 단계 3(실로신)을 1:1 iPrOAc:TBME(단계 18에서의 질량 wrt 5부피)에서 2-18시간 동안 슬러리화하고, 여과하고, TBME(단계 18에서의 질량 wrt 2.5부피)로 세척하고 40℃에서 진공에서 건조시켜 순수한 실로신을 분리하였다.

[0460] JNP와의 차이점 및 이점은 다음과 같이 요약될 수 있다:

[0461] i) 첫째로, 출원인은 THF를 용매로 사용하면서, 아세톤을 사용하여 반응물을 급랭시켰다. 이로 인해 증점 없이 현탁액/에멀젼이 생성된다.

[0462] ii) 둘째로, 출원인은 일반적으로 약 11인 염기성 pH를 유지하는 시트르산으로 급랭하였다. pH 제어는 높은 수율이 얻어지는 것을 보장하였다.

[0463] iii) 셋째로, 잔류 Li/Al 염을 제거하기 위해, 실리카 패드로 정제한 후, THF로 용리시키면, iPrOAc:TBME 슬러리는 고도로 정제된 생성물을 제공하며 이는 이후 건조된다.

[0464] 실시예 5

[0465] 단계 4

[0466] 초기에 문헌 조건을 사용하여 HPLC로 분석할 때 중간체 4A로 ~88% 전환을 제공하는 2.58g 샘플을 처리하였다. 아미노프로필 실리카를 첨가하고 셀라이트를 통해 여과하여 생성물을 정제하였다. 생성된 녹색 오일(5.5g)을

DCM에서 슬러리화하여 벤질 전이 및 양쪽 이온성 단계 4의 침전을 제공하였다(4.1g, 70% 수율, NMR에 의해 ~95%).

[0467] 단계 i

[0468] 이 단계에서의 초기 개발은 처리하기 쉬우며 이상적으로 합성에 추가 리튬을 도입하지 않은 ^{n}BuLi에 대한 대안을 찾는 데 중점을 두었다. 다음 염기를 포함하는 대안적인 조건의 초기 스크린을 수행하였다: Li^{t}BuO, K^{t}BuO, NaH, NaHMDS 및 $NaNH_2$. 모든 반응은 ^{n}BuLi뿐만 아니라 NaHMDS 성능을 갖는 생성물을 제공하였다. 겔화가 관찰됨에 따라 모든 반응물이 매우 두껍게 되었고 효율적인 교반을 위해 오버헤드 교반이 권장되었다.

[0469] 초기 스크린은 NaHMDS가 ^{n}BuLi(생성물/중간체 4A로의 81% 전환)에 대한 적합한 대안이 될 것을 제안하였다. 이들 조건은 ^{n}BuLi와의 참조 반응과 함께 1.5g까지 스케일업되었다. 두 경우 모두 오버헤드 교반이 사용되었다.

표 20

[0470] ^{n}BuLi 및 NaHMDS의 비교

시점	HPLC - ^{n}BuLi	HPLC - NaHMDS
1 hr, -30° C	6.6% St 3, 78% Int 4A, 1% St 4	<1% St 3, 78% Int 4A, 4% St 4
2 hr, 0° C	6.5% St 3, 77% Int 4A, 1% St 4	<1% St 3, 76% Int 4A, 4% St 4
미정제 생성물	4.89 g <1% St 3, 2% Int 4A, 60% St 4	4.38 g <1% St 3, 5% Int4A, 68% St 4

[0471] 표에 사용된 약자: St 3 = 단계 3, Int 4A = 중간체 4A, St 4 = 단계 4두 경우 모두에서 얻어진 반응 프로파일은 단계 3의 소비를 제공하는 NaHMDS 반응과 매우 유사하였다. 두 반응 모두를 셀라이트상에서 여과하여 백색 침전물을 제거하고 농축시켰다. NMR에 의해 과량의 벤질 양성자가 두 경우 모두에(특히 ^{n}BuLi을 갖는 예에서) 존재하였고 분리된 수율은 >100%였다. NaHMDS 조건은 유리한 반응 프로파일을 제공하는 것으로 성공적으로 입증되었으며 추가 스케일업을 위해 선택되었다. 그러나 워크업 및 정제 개발이 필요하였다.

[0472] 단계 ii

[0473] HPLC 데이터는 NaHMDS 및 ^{n}BuLi를 사용하여 상기 시험으로부터 분리된 물질이 재배열되어 농축시 양쪽 이온성 단계 4를 제공하였다는 것을 나타내었다. 벤질포스폰산 부산물 및 다른 불순물로부터 이 물질의 정제는 다수의 용매 중의 슬러리에 의해 시도되었다.

표 21

[0474] 미정제 단계 4 생성물의 시험 정제

용매	회수된 질량	HPLC 순도
DCM	백색 고체	84% St 4
EtOH	검	-
EtOAc	검	-
IPA	백색 고체	88% St 4
톨루엔	검	-
TBME	백색 고체	62% St 4
MIBK	검	-
MeCN	검	-
아세톤	백색 고체	86% St 4

[0475] 표에 사용된 약자: St 4 = 단계 4

[0476] *여과 불량

[0477] 몇 가지 용매로부터 백색 고체를 수득하였지만, DCM 및 TBME로부터 수득한 고체는 주말 동안 저장될 때 옅은 자주색 검으로 변하였다. IPA 및 아세톤으로부터 얻은 것들은 저장시 자유 유동성 백색 고체로 유지되었으며, 이는 이들 고체의 안정성이 더 높을 것이고 취급이 더 쉬울 것이라는 것을 시사한다.

[0478] IPA 및 아세톤의 슬러리는 1g까지 스케일업되었다. 그러나, 용매를 첨가하자마자 검화(gumming)가 발견되었다. 검을 격렬한 교반에 의해 천천히 분산시키고, 밤새 교반한 후 백색 슬러리가 형성되면서 결국 결정화의 징후를 나타냈다. 그러나 이 공정은 스케일업에 적합하지 않았다. 고순도를 제공하는 IPA로 고체를 고 수율로 분리하였다.

[0479] THF는 이것이 또한 반응 용매이기도 한 이점이 있었기 때문에 조사되었다. 그러나, 이것을 시험했을 때, 초기 검 형성이 다시 관찰되었다(~80% 수율, HPLC에 의해 ~92% 분리됨). 검 형성을 피하고 보다 제어된 결정화를 제공하기 위해, 미정제 단계 4를 먼저 적은 부피의 DMSO(2부피)에 용해시켰다. THF를 여기에 첨가하고(10부피), 용액을 주말에 걸쳐 교반하였다. 이로써 생성물을 천천히 침전시켜 여과에 의해 수집하고 THF로 세척하여 96% HPLC 순도(NMR에 의해 >95%)로 단계 4(86% 수율)를 수득하였다.

[0480] THF 결정화가 성공적이었고 이전에 40℃에서 반응 액체(THF/EtOAc)의 농축 동안 양쪽 이온성 단계 4로의 완전한 전환이 발생했음을 알았으므로, 반응 혼합물을 40℃에서 교반함으로써 용매의 변화를 피하고 생성물을 직접 결정화시킬 수 있을 것으로 기대되었다.

[0481] 2개의 4g NaHMDS 반응이 중간체 4A로 ~80% 전환되어 완료되는 두 반응 모두에서 수행되었다. 하나의 반응물을 EtOAc로 희석하고 다른 반응물을 THF로 희석하고 둘 다 여과하여 포스페이트 부산물을 제거하였다. 포스페이트 불순물 수준을 추가로 감소시키기 위해 염수 세척을 수행하고 유기물을 건조시키고 10부피로 농축시켰다. 이들 용액을 40℃에서 밤새 교반하여 단계 4(~1% 단계 3, ~0.2% 중간체 4A, ~82% 단계 4)로 전환 및 침전시켰다. 여과하여 고체를 수집하여 EtOAc/THF로부터 8.03g(88% 수율) 및 THF로부터 5.65g(62% 수율)을 제공하였다. EtOAc/THF로부터 수득된 갈색/회색 고체는 THF로부터 수득된 백색 고체(HPLC에 의해 97%, 88% 분석)와 비교할 때 더 낮은 순도(HPLC에 의해 ~90%, 78% 분석)였다. THF 반응으로부터 수성 층을 분석한 결과 생성물이 존재하고 최종 THF 여과액에 추가 손실이 발생하는 것으로 나타났다.

[0482] THF로부터 얻어진 더 높은 순도로 인해, 이 용매는 회수를 최적화하기 위해 추가로 조사되었다. 수성 층으로의 생성물 손실로 인해 염수 세척을 생략하고, 최종 여과 단계 동안 손실을 최소화하기 위해 반응 혼합물을 반응 후에 추가로 농축시켰다. 이 새로운 절차는 반응 혼합물의 일부를 8부피 및 6부피로 농축시키면서 75g 규모로 시험되었다. 여과시, 140.4g의 전체 수율(NMR 분석에 의해 90%, 74% 활성 수율, HPLC에 의해 90%)로 두 부분 사이에서 수율 차이가 관찰되지 않았다.

[0483] 불순물 추적

[0484] 분리된 생성물에서 3가지 주요 불순물이 관찰되었으며, 이들 두 종에 대한 동일성은 MS 데이터에 기초하여 제안되었다.

[0485] 탈벤질화된 불순물(HPLC에 의해 일반적으로 ~2-5%)은 다음 수소화 동안 실로시빈을 제공하는 것으로 나타났으며, 따라서 보다 높은 수준에서 견딜 수 있었다. 분리된 단계 4에서 주요 관찰된 불순물(HPLC에 의해 일반적으로 ~5-8%)은 무수물 불순물이었다. 이는 후속 수소화를 통해 추적되었으며, 탈벤질화로 인한 고 가용성 피로포스포레이트 불순물로서 물로부터 재결정화에 의해 쉽게 제거되는 것으로 나타났다. 다른 주요 관찰된 불순물(LCMS에 의해 관찰된 m/z 295.2)은 반응 온도(-50℃ 미만)를 제한함으로써 2% 미만으로 제어되는 것으로 밝혀졌으며, 수소화 후 실로시빈에서는 관찰되지 않았다.

[0486] 상기 제조된 140g 배치의 불순물 프로파일은 90.0% 단계 4, 6.4% 무수물 불순물, 0.2% N-탈벤질화 불순물 및 1.2%의 m/z 295.2 불순물을 나타냈다.

[0487] GMP 합성

[0488] 확립된 절차를 사용하여 제 1 대규모 단계 3 배치(544g 투입)를 완료하여 213.5g(53% 수율, HPLC에 의해 99%)을 제공하였다. 제 2 배치(628.2g 투입)도 성공적으로 처리되어 295.2g(66% 수율, HPLC에 의해 99%)을 제공하였다.

[0489] 이 단계에서 수율의 일부 변동은 3개의 대규모 배치(57%, 53% 및 66%)에 걸쳐 주목되었다. 이는 워크업 및 급랭 절차에서의 약간의 차이의 결과일 수 있다.

[0490] 실험

[0491] 단계 3을 용기에 충전한 후 THF(15부피 wrt 단계 3 충전)를 충전하고 드라이아이스/아세톤 조를 사용하여 ≤-50℃로 냉각시켰다. THF 중 1M NaHMDS 용액(1.13eq)을 ≤-45℃, 목표 <-50℃로 유지하면서 충전하였다. 반응물을 -60 내지 -50℃에서 30분 동안 교반하였다. 테트라벤질피로포스페이트(2.26 eq)를 단일 부분으로 반응에 충전한 후, 반응 온도를 <-30℃로 유지하면서 추가 THF(20부피)를 첨가하였다. 반응물을 1.5-2시간에 걸쳐 0℃로 가온하고 완료를 위해 샘플링하였다. 반응물을 여과하여 포스페이트 염을 제거하고 THF(8부피)로 세척하였다. 여과물을 6-8부피가 남을 때까지 농축하고 40℃에서 밤새 교반하여 중간체 4A를 단계 4 생성물로 전환시켰다. 반응을 완료하기 위해 샘플링한 후 여과하고 고체를 THF(2부피)로 세척하였다. 단계 4 생성물을 40℃의 진공 오븐에서 건조시켰다.

[0492] JNP와의 차이점 및 이점은 다음과 같이 요약될 수 있다:

[0493] 단계 i

[0494] i) 첫째로, 헥사메틸디실라지드 나트륨을 도입하여 탈양성자화를 지원하였다. 이는 취급하기 쉬우며 반응에 추가 리튬을 도입하지 않은 부틸 리튬의 효과적인 대안으로 입증되었다.

[0495] ii) 둘째로, THF로 반응을 희석하여 훨씬 더 높은 순도의 중간체 4A를 얻었다.

[0496] iii) 셋째로, -50℃ 미만에서 반응 온도를 제어함으로써, LCMS에 의해 관찰되는 바람직하지 않은 mz 295.2를 2% 미만의 수준으로 제어하였다.

[0497] 단계 ii

[0498] iv) 넷째로, 단계 4A 불순물, 특히 N-디벤질화된 단계 4(표 7) 및 무수물 단계 4(표 7)의 수준을 모니터링함으로써 순수한 생성물을 재현 가능하게 제조할 수 있다.

[0499] v) 중간 단계 4A에서 단계 4로의 전환은 반응 용매에서 수행될 수 있으며, 시간 소모적인 용매 교환이 필요하지 않다.

[0500] vi) 마지막으로, 얻어진 고체를 THF로 세척하고 오븐 건조시켜 단계 4를 수득한다.

[0501] 실시예 6

[0502] 단계 5

[0503] 이 단계의 개발 동안 촉매 중독이 주목되었고, 불완전한 수소화를 방지하기 위해 필요할 때 차콜화(charcolation) 단계가 공정에 포함될 수 있다. 그러나 차콜화가 관례적으로 필요하지는 않다.

[0504] 3시간 동안 수소로 살포한 후 일반적인 반응은 높은 수준의 완료(>90% 생성물, 3-5% SM 잔류)를 나타냈다. 용해도를 돕기 위해 소량의 물을 첨가하고 추가 1시간 동안 수소로 살포한 후, 단계 4의 소비가 달성되었다.

[0505] 성공적인 반응을 여과에 의해 워크업하고, 이어서 메탄올을 제거하기 위해 증발시켜 생성물을 물에 진한 현탁액으로 남겼다. 에탄올을 첨가하고 고체를 여과하여 실로시빈을 69% 수율로 수득하였다. ^{1}H NMR은 생성물의 정체를 확인했지만 약간의 관련 불순물이 존재함을 나타냈다. LCMS 분석은 95.2%의 순도를 나타내었고, 주요 불순물(4.1%)이 피로인산 불순물로 확인되었다. (표 7) 단계 4에서 무수물 불순물로부터 유도된다. 이후에 이 불순물이 최종 생성물 재결정화 동안 효과적으로 퍼지됨을 보여주었다(단계 6).

[0506] 이어서, 최종 THF 워크업로부터 단계 4 물질을 사용하여 추가의 반응을 수행하였으며, 이는 HPLC에 의해 순도 88.0%이고 무수물 불순물이 없는 7.3% N-디벤질화 단계 4(생성물로 전환됨)를 함유하였다. 다시 완료가 기록되었고, 반응은 이전과 같이 워크업되어 46% 수율로 실로시빈을 제공하였다. 낮은 수율은 촉매 여과 단계 동안 생성물의 침전으로 인한 것으로 여겨졌다. ^{1}H NMR은 생성물의 동일성을 확인하였고 HPLC는 98.9%의 순도를 나타냈다.

[0507] 여과 단계 동안 사용된 물 부피를 최적화하고 생성물 손실을 최소화하기 위해 반응 조건의 추가 개발이 수행되었다. 반응 후, 40℃로 가열하면서 10부피의 물을 첨가하여 용액을 수득하였다. 이는 필터에서 생성물 손실을 발생시키지 않으면서 여과에 의해 촉매를 제거할 수 있게 하였다.

[0508] 일부 단계 3은 반응 동안 가수분해 및 공정의 일반적인 것으로 보이는 대략 1-2.5% 수준의 워크업에 의해 생성되었다. 최종 생성물 재결정화 동안 단계 3 수준의 감소가 입증되었다.

[0509] 스케일업

[0510] 대규모 단계 4 배치(비-GMP)를 단일 배치(148g 활성 투입)로서 처리하였다. 단계 4의 소비는 가수분해로 인한 88% 생성물 및 0.9% 단계 3으로 달성되었다. 무수물 불순물(6.4%)을 상응하는 피로인산 불순물(5.2%)로 완전히 전환시켰다.

[0511] 대규모 수소화를 여과하고 농축하여 물 함량(NMR 분석에 의해 ~71%, 86% 수율)을 감소시키기 위해 에탄올로부터 스트리핑한 후 미정제 생성물 109g을 수득하였다.

[0512] 실험

[0513] 10% Pd/C(~50% 물 습윤, 유형 87L, 0.1x단계 4 충전)를 N_2 하에 이어서 메탄올(20부피 wrt 단계 4) 및 단계 4 하에 용기에 충전시켰다. N_2는 H_2로 대체되었으며 반응물을 H_2(대기압) 하에 1-2시간 동안 교반하였다.

[0514] 완료에 대해 반응물을 샘플링한 후 온도를 <25℃로 유지하면서 물을 첨가하였다(10부피 wrt 단계 4). 혼합물을 H_2(대기압) 하에 추가로 1-2시간 동안 교반하였다. 반응을 샘플링하고 완료를 확인하였다.

[0515] 반응이 완료되지 않은 경우, H_2를 재충전하고 완료가 관찰될 때까지 추가로 1-12시간 동안 반응을 계속하였다. 이어서, 반응물을 N_2 하에 두고 40℃로 가온하고 15-45분 동안 유지시켰다. 반응물을 셀라이트를 통해 여과하여 촉매를 제거하고, 메탄올(13.3부피 wrt 단계 4 충전) 및 물(6.7부피 wrt 단계 4 충전)로 세척하였다. 여과 액체를 진공 농축하고, 에탄올과 공비 혼합하여 고체가 얻어질 때까지 물을 제거하였다. JNP와의 차이점과 이점은 다음과 같이 요약할 수 있다:

[0516] 주로, 반응은 상대 체류 시간(RRT)을 사용하여 HPLC에 의해 중간체 수준에 대해 모니터링되고, 중간체가 0.2% 미만으로 존재하는 것을 이용하여 완료가 제어된다. 단계 5 피로인산 불순물 또한 최종 재결정화에서 제어될 수 있음을 확인하기 위해 주의 깊게 모니터링된다.

[0517] 최종 단계 6 공정은 실시예 1에 기재된 바와 같다.

[0518] 실시예 7

[0519] 테스트 방법론 및 프로토콜

[0520] 순도 등을 테스트하기 위해 다음 방법론/프로토콜이 사용되었다.

[0521] 7.1 NMR

[0522] 400MHz 분광계를 사용하여 D_2O 중 실로시빈의 ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼을 수득하였다. 화학적 이동은 ^{1}H NMR에서 D_2O(□=4.75ppm) 및 MeOH(□=49.5ppm)에 대해 ppm으로 보고되었으며, 이는 기준으로서 ^{13}C NMR 스펙트럼에 추가되었다. 실로시빈에 대한 문헌 값은 JNP에 보고되어 있다. NMR에 의한 실로시빈의 분석은 구조와 일치하고 화합물의 양쪽 이온성 특성이 물질을 pH의 작은 변화에 매우 민감하게 만들기 때문에 예상되는 이온화 가능한 그룹 근처의 양성자에 대한 화학적 이동의 작은 변화만을 가지며 문헌에서 보고된 것과 일치하는 데이터를 나타내었다.

[0523] ^{1}H NMR 및 ^{13}C NMR 데이터는 아래에서 설명되고 스펙트럼은 도 10 및 도 11에 나타나있다.

[0524] ^{1}H NMR 데이터(400MHz, D_2O): 2.79(s, 3H), 3.18(t, J=7.4Hz, 2H), 3.31(t, J=7.4Hz, 2H), 6.97(d, J=8.0Hz, 1H), 7.08(s, 1H), 7.10(t, J=8.0Hz, 1H), 7.19(d, 8.2Hz, 1H).

[0525] ^{13}C NMR 데이터(400MHz, D_2O(+미량의 MeOH): 22.3(1 x CH_2), 43.4(2 x CH_3), 59.6(1 x xCH_2), 108.4(1 x CH), 108.6(1 x C), 109.5(1 x CH), 119.1(d, $^{3}J_{P-H}$=6.7Hz, 1 x C), 123.3(1 x CH2), 124.8(1 x CH), 139.3(1 x C), 146.3(d, $^{2}J_{P-H}$=6.7Hz, 1 x C)

[0526] 7.2 FT-IR

[0527] UATR Two 액세서리가 있는 퍼킨 엘머 스펙트럼 Two™ 분광계에서 데이터를 수집하였다. FT-IR 분광법에 의한 실

로시빈(배치: AR755)의 분석은 제안된 구조와 일치하는 스펙트럼(도 12)을 제공하였다. 3244cm^{-1}에서의 넓은 피크는 아민 염의 전형이다. 나머지 피크는 지문 영역에 있으므로 개별적으로 할당할 수 없다.

[0528] 7.3. 질량 분석

[0529] 실로시빈(AR755)의 질량 스펙트럼은 브루커 에스콰이어 3000 plus 이온 트랩 질량 분석기에서 얻어졌으며 구조와 일치하였다. 질량 스펙트럼(도 13)은 실로시빈의 $(M+H)^+$ 및 $(2M+H)^+$에 해당하는 m/z=284.8 및 568.1에서 주요 피크를 나타냈다. 이는 분자 이온이 실로시빈($C_{12}H_{17}N_2O_4P$)의 분자식에 해당하는 m/z 284를 가짐을 암시한다(도 14).

[0530] 7.4 점화 잔류물(RESIDUE ON IGNITION)

[0531] 점화 잔류물 방법은 하나의 조정을 가지며 약전 방법을 따른다. 도가니를 500℃로 가열할 때 불일치한 결과가 얻어졌으며 이는 생성된 인산염 잔류물의 휘발성이 낮기 때문인 것으로 여겨진다. 따라서, 실로시빈에 대해 온도가 800℃로 증가되어 일관되고 정확한 결과를 얻었다.

[0532] 7.5 HPLC-분석 및 순도 측정

[0533] 실로시빈의 불순물을 분석, 화학적 순도 및 정량화에 사용된 HPLC 방법은 구배 HPLC-UV 방법이고, 조건은 표 22에 요약되어 있다. 외부 표준은 정량화에 사용된다. 대략 1mg/mL의 실로시빈을 정제수:MeOH(95:5)에 용해시켰다. 초음파 처리하여 완전히 용해시킨다.

[0534] HPLC에 의한 순도는 면적%를 기준으로 계산되고 공지된 체류 시간 표준과 상관 관계가 있다.

[0535] HPLC에 의한 분석은 알려진 순도 및 조성의 표준에 대한 중량%를 기준으로 무수물 기준으로 계산된다.

표 22

[0536] 식별, 순도 및 분석을 위한 일반적인 HPLC 조건

파라미터	조건		
시스템	애질런트 1100 시리즈 액체 크로마토그래피 또는 동급		
컬럼	XBridge C18, 4.6 x 150mm; 3.5 µm (Ex; waters PN:186003034)		
유속	1.0ml.min^{-1}		
주입 부피	5µl		
검출	UV @ 267nm		
컬럼 온도	30℃		
유동상	A - 정제수 : 메탄올 : TFA (95:5:0.1) B - 메탄올 : 정제수 : TFA (95:5:0.1)		
구배	시간(분)	%A	%B
	0	100	0
	2	100	0
	15	0	100
	20	0	100
	22	100	0

[0537] 7.6 HRGC에 의한 잔류 용매 성분

[0538] 잔류 용매를 정량화하기 위한 HRGC 방법은 헤드스페이스 방법이며, 하기 표 23에 기재되어 있다:

표 23

[0539] 일반적인 잔류 용매 GC 방법

파라미터	조건
시스템	애질런트 6890/7890 HRGC 또는 유사
컬럼	DB-624 60m x 0.32mm, 1.80 µm 필름 두께(또는 동등물)
오븐 프로그램	40℃ (15min 유지) 이후 ramp (20℃.min^{-1}) to 200℃ (5min 유지)

헤드스페이스 파라미터 오븐 온도 루프 온도 전송 라인 온도	 125℃ 140℃ 150℃
분할 비	10:1
인젝터 온도	200℃
검출기 온도	250℃, FID
헤드 압력	15 psi, 일정한 압력
캐리어 가스	질소
컬럼 유속	2.0 ml.min^{-1} @ 40℃
내부 표준	1,2-디플루오로벤젠

[0540] 다음 용매 및 시약의 수준이 결정된다: 메탄올, 에탄올, THF 및 톨루엔.7.7 DSC에 의한 융점

[0541] DSC 데이터는 퍼킨엘머 Pyris 6000 DSC(또는 유사)에서 수집되었다. 기기는 인증된 인듐을 사용하여 에너지 및 온도 보정을 위해 검증되었다. 샘플을 핀-홀링된 알루미늄 샘플 팬 내로 칭량하였다(일반적으로 0.5 내지 3.0mg). 팬은 알루미늄 팬 커버로 압착되었다. 팬을 20ml/분에서 건조 질소 퍼지와 함께 30℃에서 300℃까지 20℃/분으로 가열하였다. 융점 절차 동안, 실로시빈 다형체 A 또는 A'의 각각의 배치는 후자의 2개의 흡열 이벤트를 나타냈다; 첫 번째는 다형체 A 또는 A'의 다형체 B로의 고체-고체 전이에 기인한 것이고, 두 번째는 다형체 B의 용융에 기인한 것이다.

[0542] 7.8 XRPD에 의한 다형성

[0543] 실로시빈의 고체 형태는 XRPD에 의해 결정된다. XRPD 회절도는 주변 조건에서 입사 및 발산 빔(4mm) 모두에서 Cu Kα 방사선(45kV, 40mA), θ-θ 고니오미터, 포커싱 미러, 발산 슬릿(1/2"), 솔러 슬릿을 사용하여 회절계(예를 들어 PANalytical X'Pert PRO 또는 동등물)에서 수집되었다. 데이터 수집 범위는 3-35° 2θ이며 연속 스캔 속도는 0.2° s^{-1}였다. 생성된 회절도는 일치하는지 확인하기 위해 다형체 A 또는 A'의 기준 회절도의 것과 비교된다(각각 도 7a 또는 7b).

[0544] 7.9 열 중량 분석(TGA)

[0545] TGA 데이터는 퍼킨엘머 Pyris 1 TGA(또는 유사)에서 수집되었다. 기기는 온도에 대해 인증된 무게와 인증된 알루멜(Alumel) 및 퍼칼로이(Perkalloy)를 사용하여 보정되었다. 소정의 양의 샘플(일반적으로 약 5mg)을 알루미늄 도가니에 넣고 주위 온도로부터 400℃로 20℃/분으로 가열하였다. 20mL/분의 질소 퍼지가 샘플에 걸쳐 유지되었다.

[0546] 7.10 건조 손실

[0547] 정확하게 중량이 측정되고 일정한 중량으로 진공하에서 70℃에서 건조된 1g 부분을 사용하여 샘플의 건조 손실을 이중으로 결정한다.

[0548] 계산:

$$\%\ 건조\ 손실 = \frac{(W_{최초} - W_{최종})}{W_{샘플}} \times 100$$

[0549]

[0550] 여기서:

[0551] $W_{최초}$ = 건조 전 접시 및 샘플의 초기 중량(g)

[0552] $W_{최종}$ = 접시 및 건조된 샘플의 최종 중량(g)

[0553] $W_{샘플}$ = 샘플 중량(g)

[0554] 실시예 8

[0555] 강제 분해 연구(Forced Degradation Studies)

[0556] 실로시빈 약물 물질은 용액 및 고체 상태의 다양한 조건 하에서 스트레스를 가해 분석 방법 선택성을 평가하기 위한 샘플을 제공하였다.

[0557] 실로시빈에 대해 강제 분해 연구를 수행하였다; ICH Q1A(R2)의 요구 사항을 기반으로 한다. 스트레스 조건 하에서의 시험은 실로시빈의 잠재적인 분해 경로 및 고유 안정성에 대한 정보를 제공하였다. 사용된 최적화된 분석 방법은 실로시빈에 대한 특이성을 입증하였다; 이는 적합한 것으로 나타났으며, 이 방법을 사용하여 생성물의 동일성, 순도 및 효능에 대한 변화를 검출할 수 있다. 사용된 방법은 또한 특이성을 참조하여 ICH Q2(R1)(분석 절차의 검증)에 따라 가능한 불순물 및 분해 산물로부터의 간섭이 없는 것으로 나타났다. 따라서, HPLC 방법은 실로시빈의 순도 및 관련 불순물을 결정하는데 적합한 것으로 간주된다.

[0558] 실로시빈의 대조 샘플은 연구 기간 동안 용액에서 안정적이었다(연구 기간은 비-광안정성 샘플의 경우 7일이었다). 실로시빈은 주요 불순물로서 실로신을 제조하는 용액에서 가열될 때 천천히 분해된다. 실로시빈은 또한 산 조건 하에서 실온에서 안정하였다. 그러나 60℃에서 주요 불순물로서 실로신을 제조하는 느리고 꾸준한 분해가 관찰되었다. 실로시빈은 연구 기간 동안 일정 범위의 불순물로 느리게 분해되는 염기의 존재하에 실온에서 약간 불안정하였다. 퍼옥시드 조건 하에서 매우 낮은 수준의 불순물만이 형성되어 전체 순도가 ~0.5% 떨어졌다. 고체 상태에서, 불순물로서 실로신(단계 3)을 주로 제조하는 느린 화학적 분해(150℃에서 3일)가 주목되었다. 실로시빈은 광안정성 조건 하에서 고체로서 그리고 용액 중에 있을 때 안정하였다.

[0559] 안정성 연구

[0560] 안정성 연구는 표 24에 도시된 바와 같이 두 배치의 실로시빈으로 수행되었다.

표 24

[0561]

연구 번호/연구 개시	약물 물질 Lot No.	패키징	제조 장소	Lot 사용	보관 조건	의도된 시점/연구 현황
ONYXSTAB0138	GM764B	이중 식품 등급 폴리에틸렌 백. 외부 폴리에틸렌 용기	Onyx Scientific	Ref. Std.	2-8℃ 25℃/60%RH 40℃/75% RH	1,3,6개월 지속 1,3,6개월 지속 1,3,6개월 지속
ONYXSTAB0139	170231	이중 식품 등급 폴리에틸렌 백. 외부 폴리에틸렌 용기	Onyx Scientific	Clinical	2-8℃ 25℃/60%RH 40℃/75% RH	1,3,6,9,12,18,24,36개월 지속 1,3,6,9,12,18,24,36개월 지속 1,3,6개월 지속

[0562] 샘플을 식품 등급 폴리에틸렌 백에 이중 포장하고 외부 폴리에틸렌 용기에 밀봉하고 2-8℃, 25℃/60% RH 및 45℃/75% RH에서 보관하고, 흡습을 방지하기 위해 내부 폴리에틸렌 백 사이에 건조제 백이 포함된다. 외관, 수분 함량, 순도 및 분석에 대한 시험을 수행하였다.

[0563] 두 연구에 대한 프로토콜이 표 25 및 표 26에 제시되어 있다.

[0564] 배치 GM764B에 대한 1개월 및 3개월 안정성 데이터는 하기 표 27 및 표 28에 상세하게 나타나 있다. GMP 배치 170231에 대한 1, 3, 6, 9 및 12개월 안정성 데이터는 각각 하기 표 29, 표 30, 표 31, 표 32 및 표 33에 제공된다.

표 25

[0565]

오닉스 안정성 시험 프로토콜 시트			
생성물:	실로시빈	오닉스 시험 번호:	ONYXSTAB0138
배치 숫자:	GM764B	시험 마감 개시일:	10 MAR 2017
시험 방법:	N/A	제조 일자:	06 FEB 2017
추가 정보:	각 용기에 1200mg의 재료가 필요하다.		

패키징 구성요소: 300ml HDPE 용기(식품 등급)에 포함된 이중 폴리에틸렌 봉지 백. 두 개의 폴리에틸렌 백 사이에 건조제 백을 넣는다.						
테스트 파라미터 루틴 외관 테스트 ^{1}H-NMR에 의한 분석(무수물 기준) 건조 손실에 의한 물 함량 화학적 순도 / HPLC에 의한 불순물						
개월	1	3	6		여분	합계
2℃-8℃	X	X	X		2	5
25℃/60%RH	X	X	X		2	5
40℃/75%RH	X	X	X		0	3
마감일	10APR17	10JUN17	10SEP17			13

표 26

[0566]

오닉스 안정성 시험 프로토콜 시트										
생성물: 실로시빈 오닉스 시험 번호: ONYXSTAB0139										
배치 숫자: 170231 시험 마감 개시일: 31 MAR 2017										
시험 방법: SS/실로시빈/ 제조 일자: 27FEB2017										
추가 정보: 각 용기에 2200mg의 재료가 필요하다.										
패키징 구성요소: 300ml HDPE 용기(식품 등급)에 포함된 이중 폴리에틸렌 봉지 백. 두 개의 폴리에틸렌 백 사이에 건조제 백을 넣는다.										
테스트 파라미터 루틴 외관 테스트 HPLC에 의한 분석(건조 기준) 건조 손실에 의한 물 함량 화학적 순도 / HPLC에 의한 불순물										
시점	1개월	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월	36개월	여분	합계
2-8℃	X	X	X	X	X	X	X	X	2	10
25℃/60%RH	X	X	X	X	X	X	X	X	2	10
40℃/75%RH	X	X	X						1	4
마감일	31APR17	30JUN17	30SEP17	31DEC17	31MAR18	30SEP18	31MAR19	31MAR20		24

표 27

[0567] 배치 GM764B에 대한 1개월 안정성 데이터

테스트	사양 제한	T=0	T=1개월	T=1개월	T=1개월
조건	N/A	N/A	2℃-8℃	25℃/60%RH	40℃/75%RH
외관	참조용.	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음
^{1}H-NMR에 의한 분석	참조용.	97% $^{w}/_{w}$	99% $^{w}/_{w}$	98% $^{w}/_{w}$	96% $^{w}/_{w}$
건조 손실에 의한 물 함량	참조용.	0.86% $^{w}/_{w}$	0.35% $^{w}/_{w}$	0.20% $^{w}/_{w}$	0.14% $^{w}/_{w}$
HPLC에 의한 화학적 순도	참조용.	99.24%	99.24%	99.22%	99.23%

HPLC에 의한 불순물: (Quote all GT 0.05%)	참조용. RRT 0.86 RRT 1.46 RRT 1.59 (실로신) 합계 불순물	 0.05% 0.05% 0.37% 0.76%	 0.05% 0.09% 0.35% 0.76%	 0.05% 0.10% 0.34% 0.78%	 0.05% 0.10% 0.34% 0.77%

표 28

[0568] 배치 GM764B에 대한 3개월 안정성 데이터

테스트	사양 제한	T=0	T=3개월	T=3개월	T=3개월
조건	N/A	N/A	2℃-8℃	25℃-60%RH	40℃-75%RH
외관	참조용.	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음
^{1}H-NMR에 의한 분석	참조용.	97 % $^w/_w$	97% $^w/_w$	99% $^w/_w$	97% $^w/_w$
건조 손실에 의한 물 함량	참조용.	0.86% $^w/_w$	0.26% $^w/_w$	0.08% $^w/_w$	0.14% $^w/_w$
HPLC에 의한 화학적 순도	참조용.	99.24%	99.31%	99.27%	99.26%
HPLC에 의한 불순물: (Quote all GT 0.05%)	참조용. RRT 0.86 RRT 1.46 RRT 1.59 (실로신) 합계 불순물	 0.05% 0.05% 0.37% 0.76%	 LT0.05% 0.10% 0.37% 0.69%	 LT0.05% 0.09% 0.36% 0.73%	 LT0.05% 0.10% 0.37% 0.74%

표 29

[0569] 배치 170231에 대한 1개월 안정성 데이터

테스트	사양 제한	T=0	T=1개월	T=1개월	T=1개월
조건	N/A	N/A	2℃-8℃	25℃/60%RH	40℃/75%RH
외관	참조용.	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음
HPLC에 의한 화학적 순도	참조용.	99.28%	99.20%	99.16%	99.17%
HPLC에 의한 불순물: (Quote all GT 0.05%) RRT 1.49 RRT 1.62 (실로신) RRT 1.70 RRT 1.89에서의 불순물 RRT 2.45에서의 불순물 불순물 LT 0.05% 합계 불순물	참조용.	 0.06% 0.39% 0.05% LT 0.05% LT 0.05% 0.22% 0.72%	 0.05% 0.36% LT 0.05% LT 0.05% LT 0.05% 0.39% 0.80%	 0.05% 0.37% LT 0.05% LT 0.05% LT 0.05% 0.42% 0.84%	 0.06% 0.36% LT 0.05% LT 0.05% LT 0.05% 0.41% 0.83%
HPLC에 의한 분석 (건조 기준)	참조용	98.65% $^w/_w$	98.76% $^w/_w$	97.98% $^w/_w$	98.52% $^w/_w$
건조 손실에 의한 물 함량	참조용.	0.32% $^w/_w$	0.27% $^w/_w$	0.17% $^w/_w$	0.19% $^w/_w$

표 30

[0570] 배치 170231에 대한 3개월 안정성 데이터

테스트	사양 제한	T=0	T=3 개월	T=3개월	T=3개월
조건	N/A	N/A	2℃-8℃	25℃/60%RH	40℃/75%RH
외관	참조용.	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음
HPLC에 의한 화학적 순도	참조용.	99.28%	99.30%	99.31%	99.17%
HPLC에 의한 불순물: (Quote all GT 0.05%)	참조용.				
RRT0.69		LT0.05%	0.05%	LT0.05%	LT0.05%
RRT 1.49		0.06%	0.05%	0.05%	0.06%
RRT 1.62 (실로신)		0.39%	0.37%	0.36%	0.39%
RRT 1.70		0.05%	LT 0.05%	LT 0.05%	LT 0.05%
RRT 1.89에서의 불순물		LT 0.05%	LT 0.05%	LT 0.05%	LT 0.05%
RRT 2.45에서의 불순물		LT 0.05%	LT 0.05%	LT 0.05%	LT 0.05%
불순물 LT 0.05%		0.22%	0.22%	0.27%	0.34%
합계 불순물		0.72%	0.70%	0.69%	0.79%
HPLC에 의한 분석 (건조 기준)	참조용	98.65%$^{w}/_{w}$	98.45%w/w	99.46%$^{w}/_{w}$	98.64%$^{w}/_{w}$
건조 손실에 의한 물 함량	참조용.	0.32%$^{w}/_{w}$	0.17% w/w	0.01%$^{w}/_{w}$	0.19%$^{w}/_{w}$

표 31

[0571] 배치 170231에 대한 6개월 안정성 데이터

테스트	사양 제한	T=0	T=6 개월	T=6 개월	T=6 개월
조건	N/A	N/A	2℃-8℃	25℃-60%RH	40℃-75%RH
외관	참조용.	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음
HPLC에 의한 화학적 순도	참조용.	99.28%	99.20%	99.19%	99.12%
HPLC에 의한 불순물: (Quote all GT 0.05%)	참조용.				
RRT0.69		LT 0.05%	0.06%	0.06%	0.06%
RRT 1.49		0.06%	0.07%	0.07%	0.08%
RRT 1.62 (실로신)		0.39%	LT 0.05%	LT 0.05%	LT 0.05%
RRT 1.70		0.05%	0.35%	0.34%	0.38%
RRT 1.89에서의 불순물		LT 0.05%	LT 0.05%	LT 0.05%	LT 0.05%
RRT 2.45에서의 불순물		LT 0.05%	LT 0.05%	LT 0.05%	LT 0.05%
불순물 LT 0.05%		0.22%	LT 0.05%	LT 0.05%	LT 0.05%
합계 불순물		0.72%	0.32% 0.80%	0.34% 0.81%	0.36% 0.88%
HPLC에 의한 분석 (건조 기준)	참조용	98.65%$^{w}/_{w}$	97.97%$^{w}/_{w}$	98.04%$^{w}/_{w}$	100.10%$^{w}/_{w}$
건조 손실에 의한 물 함량	참조용.	0.32%$^{w}/_{w}$	0.06%$^{w}/_{w}$	0.32%$^{w}/_{w}$	2.26%$^{w}/_{w}$

표 32

[0572] 배치 170231에 대한 9개월 안정성 데이터

테스트	사양 제한	T=0	T=9 개월	T=9 개월
조건	N/A	N/A	2℃-8℃	25℃-60%RH
외관	참조용.	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음
HPLC에 의한 화학적 순도	참조용.	99.28%	99.16%	99.16%
HPLC에 의한 불순물: (Quote all GT 0.05%)	참조용.			
RRT0.69		LT0.05%	LT 0.05%	LT 0.05%
RRT 1.49		0.06%	LT 0.05%	LT 0.05%
RRT 1.62 (실로신)		0.39%	0.07%	0.05%
RRT 1.70		0.05%	0.06%	0.06%
RRT 1.89에서의 불순물		LT 0.05%	0.37%	0.37%
RRT 2.45에서의 불순물		LT 0.05%	LT 0.05%	LT 0.05%
불순물 LT 0.05%		0.22%	LT 0.05%	LT 0.05%
			LT 0.05%	LT 0.05%
합계 불순물		0.72%	0.34%	0.35%
			0.84%	0.84%
HPLC에 의한 분석 (건조 기준)	참조용	98.65% $^{w}/_{w}$	97.53% $^{w}/_{w}$	98.12% $^{w}/_{w}$
건조 손실에 의한 물 함량	참조용.	0.32% $^{w}/_{w}$	0.21% $^{w}/_{w}$	0.10% $^{w}/_{w}$

표 33

[0573] 배치 170231에 대한 12개월 안정성 데이터

테스트	사양 제한	T=0	T=12 개월	T=12 개월
조건	N/A	N/A	2℃-8℃	25℃/60%RH
외관	참조용.	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음	회백색 고체. 눈에 띄는 오염 없음
HPLC에 의한 화학적 순도	참조용.	99.28%	99.25%	99.25%
HPLC에 의한 불순물: (Quote all GT 0.05%)	참조용.			
RRT0.69		LT0.05%	LT 0.05%	LT 0.05%
RRT 1.49		0.06%	LT 0.05%	LT 0.05%
RRT 1.62 (실로신)		0.39%	0.37%	0.37%
RRT 1.70		0.05%	LT 0.05%	LT 0.05%
RRT 1.89에서의 불순물		LT 0.05%	LT 0.05%	ND
RRT 2.45에서의 불순물		LT 0.05%	LT 0.05%	LT 0.05%
불순물 LT 0.05%		0.22%	0.38%	0.38%
합계 불순물		0.72%	0.75%	0.75%
HPLC에 의한 분석 (건조 기준)	참조용	98.65% $^{w}/_{w}$	99.63% $^{w}/_{w}$	98.97% $^{w}/_{w}$
건조 손실에 의한 물 함량	참조용.	0.32% $^{w}/_{w}$	0.49% $^{w}/_{w}$	0.61% $^{w}/_{w}$

[0574] ICH 안정성 연구의 첫 12개월에 걸쳐 실로시빈은 저온(2-8℃), 주위(25℃/60% RH) 및 가속(40℃/75% RH) 조건에서 화학적으로 안정한 것으로 입증되었다. 외관에는 변화가 없었으며 HPLC 분석도 일관성을 유지하였다. 연구에 사용된 건조제 백의 초기 충격 및 이후 에이징으로 인해 모든 샘플에서 수분 함량이 변하였다.

[0575] 실시예 9 - 수화물 A를 형성하기 위한 실험

[0576] 실로시빈(200mg)을 결정화 튜브에 충전한 후 탈이온수(4ml)를 첨가하였다. 고체를 진공 여과에 의해 분리하기 전에 혼합물을 25℃에서 2시간 동안 평형화시켰다. 물질을 2개의 동일한 부분으로 나누었다. XRPD 및 DSC에 의해 수화물 A, 로트 GK2를 제공하기 위해 한 부분은 추가로 건조시키지 않았다(각각 도 7d 및 도 8d와 일치하는 회절도 및 써모그램).

[0577] 실시예 10 - 다형체 B를 형성하기 위한 실험

[0578] 실로시빈 다형체 A(250mg)를 둥근 바닥 플라스크에 채우고 오일 조를 사용하여 173℃로 가열하고 온도를 5분 동안 유지하였다. 고체를 주위 온도로 냉각시키고 분리하여 93%의 회수율로 로트 GK3를 제공하였다. XRPD 및 DSC에 의한 분석은 로트 GK3이 다형체 B인 것으로 밝혀졌다(각각 도 7c 및 도 8c와 일치하는 회절도 및 써모그램).

[0579] 실시예 11 - 고체 상태 조사

[0580] 다수의 다형성 조사가 완료되었다. 발견된 고체 형태의 요약이 도 17에 도시되어 있다. 발견된 대부분의 형태는 용매 섭동으로부터 유래되었다; 일부 경우에는 화학량론적 용매화물이 분리되고 다른 경우에는 비-화학량론적 용매화물이 분리되었다.

[0581] 다형체 A의 슬러리

[0582] 실로시빈 패턴 A의 용매 매개 평형화를 고체 형태의 변형에 대한 1차 경로로서 수행하고 25 내지 50℃의 24개 용매 범위에서 물질의 용해도를 시각적으로 평가하였다.

[0583] 실로시빈 패턴 A(40mg)를 실온에서 튜브에 투여하고, 표 34에 열거된 바와 같은 용매를 0.4ml(10부피)의 분취량으로 1.2ml(30부피)의 총 부피로 첨가하고 관찰하였다. 혼합물을 일정하게 교반하였다. 열 사이클링은 다음과 같이 수행되었다: 18시간 동안 50℃, 2시간 동안 20℃로 냉각, 4시간 동안 숙성, 4시간 동안 50℃로 가열, 2시간 동안 20℃로 냉각, 18시간 동안 숙성. 24시간 동안 50℃-20℃의 반복주기를 수행하고 다음을 적용하였다:

[0584] 고체가 충분한 경우 50℃까지 가열 후 분리 = A 시리즈

[0585] 고체가 충분한 경우 20℃까지 냉각 후 분리 = B 시리즈

[0586] 모든 분리된 고체를 진공에서 50℃에서 24시간 동안 건조시키고 XRPD에 의해 분석하였다. 관찰 결과는 표 34에 제공되어 있다.

[0587] API는 50℃에서 30부피로 시험된 용매 및 용매 혼합물에 크게 불용성이며, 그 결과 무거운 현탁액이 생성되었다. 물은 50℃에서 실로시빈을 용해시켰다.

표 34

[0588] 열 사이클링 슬러리 숙성 및 투입으로서 패턴 A 혼합을 사용한 표로된 관찰

엔트리	용매	Obs. 20℃, 0.4 ml	Obs. 20℃, 0.8 ml	Obs. 20℃, 1.2 ml	Obs. 50℃	XRPD A 시리즈	XRPD B 시리즈
1	사이클로헥산	현탁액	현탁액	현탁액	현탁액	A	A
2	클로로벤젠	현탁액	현탁액	현탁액	현탁액	A	A
3	2-클로로부탄	현탁액	현탁액	현탁액	현탁액	A	A
4	벤조트리플루오라이드	현탁액	현탁액	현탁액	현탁액	A	A
5	아니솔	현탁액	현탁액	현탁액	현탁액	A	A
6	나이트로메탄	현탁액	현탁액	현탁액	현탁액	C	C
7	CPME	현탁액	현탁액	현탁액	현탁액	A	A
8	헵탄	현탁액	현탁액	현탁액	현탁액	A	A
9	TBME	현탁액	현탁액	현탁액	현탁액	C	A
10	MIBK	현탁액	현탁액	현탁액	현탁액	A	A
11	MEK	현탁액	현탁액	현탁액	현탁액	A	A
12	iPrOAc	현탁액	현탁액	현탁액	현탁액	C	C

13	EtOAc	현탁액	현탁액	현탁액	현탁액	A	A
14	톨루엔	현탁액	현탁액	현탁액	현탁액	A	A
15	THF	현탁액	현탁액	현탁액	현탁액	A	A
16	$CHCl_3$	현탁액	현탁액	현탁액	현탁액	A	A
17	MeOH	현탁액	현탁액	현탁액	현탁액	D	D
18	EtOH	현탁액	현탁액	현탁액	현탁액	E	E
19	IPA	현탁액	현탁액	현탁액	현탁액	F	F
20	MeCN	현탁액	현탁액	현탁액	현탁액	C	A
21	물	현탁액	현탁액	현탁액	용액	n/a	A
22	4:1 EtOH/물	현탁액	현탁액	현탁액	현탁액	A	A
23	4:1 THF/물	현탁액	현탁액	현탁액	현탁액	A	수화물 A
24	4:1 IPA/물	현탁액	현탁액	현탁액	현탁액	A	C

[0589] 결과:

[0590] 도면(도 18 및 도 19)에서, "25C"는 25℃에서 고체의 분리를 나타내고 "50C"는 50℃에서 고체의 분리를 나타낸다. 예를 들어, GM832-20_50_A9는 50℃에서 분리 된 GM832 엔트리 20(MeCN)을 나타낸다.

[0591] 50℃ 슬러리

[0592] 엔트리 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 22, 23, 24: XRPD 회절도는 다형체 A와 광범위하게 일치하지만, 18° 2Θ에서 다양한 강도의 추가 피크를 가진다.

[0593] 엔트리 6, 9, 12, 20: 분리된 고체에 대해 획득한 XRPD 회절도는 일부 샘플에 대해 관찰된 10° 2Θ 및 13.2° 2Θ에서의 추가 피크를 가지며 광범위하게 일치하였다(도 18 참조). 이 XRPD 회절도는 패턴 C로 지정되었다. 용매(CH_3NO_2, TBME, iPrOAc 및 CH_3CN) 사이에는 화학형 상관 관계가 없다.

[0594] 엔트리 17: 획득된 XRPD 회절도는 다수의 회절 피크를 가졌다(도 19). XRPD 회절도는 패턴 D로 지정되었다.

[0595] 엔트리 18: 획득된 XRPD 회절도는 다수의 회절 피크를 가졌다(도 19). XRPD 회절도는 패턴 E로 지정되었다.

[0596] 엔트리 19: 획득된 XRPD 회절도는 다수의 회절 피크를 가졌다(도 19). XRPD 회절도는 패턴 F로 지정되었다.

[0597] 25℃ 슬러리:

[0598] 엔트리 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 20, 21, 22: XRPD 회절도는 모두 다형체 A에 대해 획득된 것과 유사하다.

[0599] 엔트리 6, 12, 24: 분리된 고체에 대해 획득된 XRPD 회절도는 패턴 C와 광범위하게 일치하였다(도 18 참조).

[0600] 엔트리 23: XRPD 분석은 수화물 A가 형성되었음을 보여주었다.

[0601] 엔트리 17: 획득된 XRPD 회절도는 다수의 회절 피크를 가졌다(도 19). XRPD 회절도는 패턴 D로 지정되었다.

[0602] 엔트리 18: 획득된 XRPD 회절도는 다수의 회절 피크를 가졌다(도 19). XRPD 회절도는 패턴 E로 지정되었다.

[0603] 엔트리 19: 획득된 XRPD 회절도는 다수의 회절 피크를 가졌다(도 19). XRPD 회절도는 패턴 F로 지정되었다.

[0604] 결과 분석:

[0605] 25℃에서 분리된 고체에 대한 XRPD 회절도는 50℃에서 분리된 고체에 대해 얻어진 XRPD 회절도에 대해 광범위하게 동일하다.

[0606] 패턴 D, E 및 F는 알코올(MeOH, EtOH 및 IPA)로부터 유도되었다. 용매화된 상태는 에탄올 용매화물이 개발 동안 미리 분리되었다는 것을 고려하여 추정되었다. 에탄올 용매화물에 대한 XRPD 회절도는 동일하지 않지만, 정확한 용매 수준 변화가 격자 내에서 다양한 상태의 질서를 전달할 수 있다는 점을 고려할 때, 이러한 XRPD 회절도 사이의 비교는 이러한 보다 현저한 상 변화가 용매 혼입에 의해 유발된다는 강력한 가설을 제공한다.

[0607] XRPD 패턴 D, E 및 F(도 19)는 모두 수화물에 대한 XRPD 회절도(도 7d)와 유사하지 않다.

[0608] 두 온도에서 분리된 MeOH, EtOH 및 IPA 유래 고체(패턴 D, E 및 F - 도 19)에 대해 획득된 XRPD 회절도의 직접 비교는 적합한 회절도를 보여주고; 2개의 MeOH 회절도는 유사하지만, EtOH 및 IPA는 직접 비교 가능하다.

[0609] 분리된 고체 및 충분한 샘플이 이용 가능한 경우 TGA에 대해 DSC 분석을 수행하였다. 패턴 D, E 및 F를 전달한 고체는 모두 약 170-180℃에서의 흡열을 특징으로 하지만 별개의 열 프로파일을 나타낸다. MeOH 슬러리 분리된 고체에 대한 TGA 분석은 25-190℃(3.1%)에서 하나의 대량 질량 손실을 보여주었다. 화학량론적 메탄올 용매화물은 10.3중량%의 용매를 필요로 한다. EtOH 슬러리 분리된 고체의 TGA 분석은 2개의 별개의 질량 손실 단계를 보여주었다. 100℃(0.3중량%) 전에 발생한 첫 번째 것은 물 때문인 것으로 간주되고, 두 번째 큰 손실(11.5중량%)은 용매로 인한 것으로 간주된다. 화학량론적 에탄올 용매화물은 13.9중량% 용매를 필요로 한다. IPA 슬러리 분리된 고체의 TGA 분석은 2개의 별개의 질량 손실 단계를 특징으로 한다. 100℃(0.4중량%) 전의 질량 손실은 물 때문인 것으로 간주되는 반면, 두 번째 큰 질량 손실(13.9중량%)은 잔류 용매 때문인 것으로 간주된다. 화학량론적 IPA 용매화물은 17.5중량% 용매를 필요로 한다.

[0610] 비정질 실로시빈의 슬러리

[0611] 비정질 물질을 생성하기 위해, 작은 샘플의 실로시빈(0.5g)을 물(0.5L, 1000부피)에 용해시키고, 폴리싱 여과하고 동결 건조시켰다. 실로시빈은 회백색 섬유 물질(lot MC1368A; 412mg, 82%, XRPD 비정질)로서 회수되었다.

[0612] 비정질 API의 시각적 용해도를 평가하고 형태 변형을 유도하기 위해, 일련의 슬러리 숙성을 다음과 같이 수행하였다:

[0613] 실로시빈(15mg)을 튜브에 충전시켰다. 이어서, 용매를 주위 온도(20℃, 0.3ml, 20부피)에서 첨가하고 현탁액을 교반하였다. 관찰하였다. 1시간 동안 교반한 후, 샘플을 18시간 동안 45℃로 가열하고 관찰하였다. 샘플을 8시간 동안 50℃로 가열하고 관찰하였다. 샘플을 25℃에서 72시간 동안 교반하고 분리 전에 최종 열 사이클을 가하였다. 관찰 결과는 표 35에 나와 있다.

표 35

[0614] 열 사이클링 슬러리 숙성 및 형태 페이트 동안 비정질 실로시빈의 관찰

엔트리	용매	Obs. at 20℃	Obs. at 45℃	Obs. at 50℃	XRPD
A	사이클로헥산	현탁액	현탁액	현탁액	반-결정질
B	클로로벤젠	현탁액	현탁액	현탁액	반-결정질
C	클로로부탄	현탁액	현탁액	현탁액	패턴 B
D	벤조트리플루오라이드	현탁액	현탁액	현탁액	반-결정질
E	아니솔	현탁액	현탁액	현탁액	반-결정질
F	나이트로메탄	현탁액	현탁액	현탁액	패턴 B
G	CPME	현탁액	현탁액	현탁액	반-결정질
H	헵탄	현탁액	현탁액	현탁액	반-결정질
I	TBME	Susp	현탁액	현탁액	반-결정질
J	MIBK	현탁액	현탁액	현탁액	반-결정질
K	MEK	현탁액	현탁액	현탁액	반-결정질
L	iPrOAc	현탁액	현탁액	현탁액	반-결정질
M	EtOAc	현탁액	현탁액	현탁액	반-결정질
N	톨루엔	현탁액	현탁액	현탁액	용매화물 A와 유사
O	THF	현탁액	현탁액	현탁액	반-결정질
P	클로로포름	현탁액	현탁액	현탁액	패턴 E와 유사
R	MeOH	현탁액	현탁액	현탁액	반-결정질
S	EtOH	현탁액	현탁액	현탁액	패턴 D
T	IPA	현탁액	현탁액	현탁액	패턴 B
U	아세토나이트릴	현탁액	현탁액	현탁액	비정질
V	물	현탁액	현탁액	현탁액	패턴 A와 유사
W	4:1 EtOH/물	현탁액	현탁액	현탁액	패턴 D와 유사
X	4:1 THF/물	현탁액	현탁액	현탁액	패턴 A와 유사
Y	4:1 IPA/물	현탁액	현탁액	현탁액	패턴 A와 유사

[0615] 결과

[0616] 대부분의 용매는 반-결정질인 것으로 간주되는 고체를 돌려주었다(주로 18° 2Θ에서 현저한 반사율을 가진 비정질).

[0617] 완전 비정질은 MeCN에서의 평형으로부터 회수하였다.

[0618] 다형체 B를 클로로부탄, 나이트로메탄 및 IPA로부터 회수하였다(도 20 및 22).

[0619] 상기 논의된 다형체 A 슬러리 실험에서 MeOH로부터 분리된 패턴 D는 EtOH 평형으로부터 회수된 반면, 본 연구에서 MeOH는 반-결정질 고체를 돌려주었다.

[0620] 패턴 A와 유사한 고체를 물, THF:물 및 IPA:물(4:1)로부터 회수하였다.

[0621] 패턴 D와 유사한 고체가 EtOH:물(4:1)로부터 회수되어, EtOH 단독으로부터의 패턴 D의 분리의 발견을 뒷받침해 준다.

[0622] 패턴 E와 유사한 고체가 클로로포름으로부터 회수되었다.

[0623] 조사된 용매 중 어느 것도 비정질 실로시빈의 연장된 평형화 및 열 숙성 후에 분리된 진짜 다형체 A 또는 A'가 아니었다.

[0624] 실시예 12 - 제제 개발.

[0625] 하기 표 36에 제시된 바와 같은 제제를 사용하여 초기 일련의 실험을 수행하였다. 목적은 대규모 제제에 적합한 단일 충전제 또는 조합 충전제를 식별하는 것이었다.

표 36

[0626]

물질 이름	배치 No (% w/w)		
	APL-117-6085-01	APL-117-6085-02	APL-117-6085-03
실로시빈	1.0	1.0	1.0
미세결정질 셀룰로스 Ph 102	91.5	49.5	81.5
전호화 전분(Starch 1500)	-	45.0	-
Compact Cel MAB	-	-	10
하이드록시프로필 셀룰로스 (Klucel EXF)	3.0	3.0	3.0
나트륨 전분 글리콜레이트	3.0	3.0	3.0
콜로이드성 실리콘 이산화물	0.5	0.5	0.5
마그네슘 스테아레이트(식물성 유래)	1.0	1.0	1.0
나트륨 스테아릴 푸마레이트	-	-	-
합계	100.0	100.0	100.0

[0627] 주요 물리 화학적 특성 - 물질 흐름, 혼합 균일성 및 함량 균일성 측면에서의 결과는 하기 표 37에 제시되어 있다:

표 37

[0628]

배치 No	강도 (mg)	물질 흐름 (Carrs Index)	혼합 균일성	함량 균일성
APL-117-6085-01	1.0	19.1	TOP=127.9 Middle=106.4 Bottom=104.5 Mean=112.9 %RSD= 10.9	% Label claim= 92.4 AV=7.9
APL-117-6085-02	1.0	19.1	TOP=115.9 Middle=106.6 Bottom=106.1 Mean=109.6 %RSD=4.9	% Label claim= 95.2 AV=5.9

APL-117-6085-03	1.0	22.4	TOP=105.0 Middle=101.4 Bottom=98.7 Mean =101.7 %RSD=3.8	% Label claim= 96.3 AV=4.6

[0629] 배치(APL-117-6085-03)는 분석된 상이한 샘플(TOP, MIDDLE 및 BOTTOM)에 걸쳐 우수한 혼합 균일성을 나타내었고, 매우 우수한 함량 균일성, 이의 흐름 특성(Carr's index에 기초)은 하이엔드를 향하고 있었으며 제제는 더 높은 약물 부하를 수용하지 않을 것으로 예측되었다.

[0630] 이러한 이유로, 다수의 대안적인 제제가 시험되었다. 목적은 분말 흐름을 개선하고 우수한 혼합 균일성 및 함량 균일성을 달성하기 위한 목적으로 다른 충전제 조합을 고려하는 것이었다.

[0631] 배치 3(APL-117-6085-03)과 비교하여 더 적은 Compactcel MAB 및 더 많은 양의 활택제를 함유하는 제제가 또한 시험되었다.

[0632] 이들 추가 제제는 하기 표 38에 제시되어 있다.

표 38

[0633]

물질 이름	배치 No (% w/w)		
	APL-117-6085-05	APL-117-6085-06	APL-117-6085-07
실로시빈	1.0	1.0	5.0
미세결정질 셀룰로스 Ph 102	-	89.0	85.0
전호화 전분(Starch 1500)	45.0	-	-
Compact Cel MAB	-	5.0	5.0
미세결정질 셀룰로스 CEOLUS UF 702	49.5	-	-
나트륨 전분 글리콜레이트	3.0	3.0	3.0
콜로이드성 실리콘 이산화물	0.5	1.0	1.0
나트륨 스테아릴 푸마레이트	1.0	1.0	1.0
합계	100.0	100.0	100.0

[0634] 이들 배치에 대한 결과는 하기 표 39에 제시되어 있다:

표 39

[0635]

배치 No	강도 (mg)	물질 흐름 (Carrs Index)	혼합 균일성	함량 균일성
APL-117-6085-05	1.0	20.9	TOP=130.0 Middle=105.4 Bottom=107.2 Mean=114.2 %RSD=12.6%	% Label claim= 88.3 AV =16.5
APL-117-6085-06	1.0	20.0	TOP=107.0 Middle=96.2 Bottom=95.5 Mean=99.6 % RSD=6.5	% Label claim=96.2 AV=10.5
APL-117-6085-07	5.0	24.3	TOP=91.5 Middle=94.2 Bottom=94.8 Mean=93.5 % RSD=7.0	% Label claim= 96.0 AV=11.9

[0636] APL-117-6085-05는 우수한 혼합 균일성을 달성하지 못했고, 또한 함량 균일 성 기준에 실패하였다.

[0637] APL-117-6085-06 및 APL-117-6085-07은 모두 개선된 분말 흐름을 나타내지만, 두 제제에 대한 혼합 균일성은 APL-117-6085-03보다 낮았다.

[0638] 결과적으로, 출원인은 개질된 부형제 및 보다 특히 상이한 입자 크기를 갖는 규화된 충전제를 검토하였다. 이들 제제는 하기 표 40에 제시되어 있다:

표 40

[0639]

물질 이름	배치 No (% w/w)	
	APL-117-6085-11	APL-117-6085-12
실로시빈	5.0	1.0
Prosolv 50	10.5	15.5
Prosolv 90	80.0	79.0
나트륨 전분 글리콜레이트	3.0	3.0
콜로이드성 실리콘 이산화물	0.5	0.5
나트륨 스테아릴 푸마레이트	1.0	1.0
합계	100.0	100.0

[0640] Prosolv는 규화된 미세결정질 셀룰로스이고, 입자 크기가 결과에 영향을 미치는지 여부를 결정하기 위해 2개의 변이체가 선택되었다. 표준 미세결정질 셀룰로스(체질에 따라 전형적인 크기 범위는 80-350 마이크론임)와 비교하여 Prosolv는 더 미세한 입자 크기 분포를 가지며 표면적을 증가시킨다. 가설을 세운 증가된 표면적은 제제에서의 개선된 함량 균일성 및 안정성과 함께 우수한 흐름 및 증가된 압축성을 제공할 수 있다. Prosolv 50과 Prosolv 90의 비율은 미세한 입자와 거친 입자 모두에 걸쳐 입자 크기 분포를 제공하는 것이었다.

[0641] 결과는 하기 표 41에 제시되어 있다.

표 41

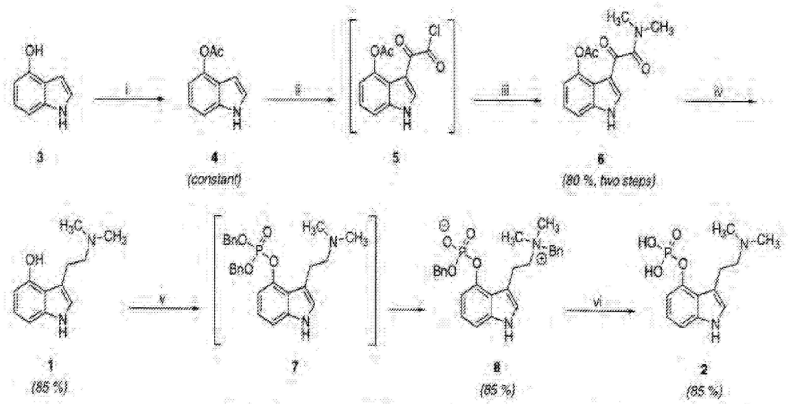
[0642]

배치 No	강도 (mg)	물질 흐름 (Carrs Index)	혼합 균일성	함량 균일성
APL-117-6085-11	5.0	24.3	TOP=103.4 Middle=100.4 Bottom=100.2 Mean=101.5 % RSD=2.0	% Label claim= 94.1 AV =6.0
APL-117-6085-12	1.0	21.1	TOP=101.9 Middle=98.4 Bottom=99.9 Mean=100.1 % RSD=3.8%	% Label claim=100.5 AV =5.8

[0643] 함량 균일성(90% 초과, 및 사실상 94% 초과) 및 AV(10미만, 및 사실상 7미만)의 주요 파라미터가 우수하다는 것을 알 수 있으며 혼합 균일성에서의 일관성도 마찬가지이다(오류를 감안하여 95% 초과).

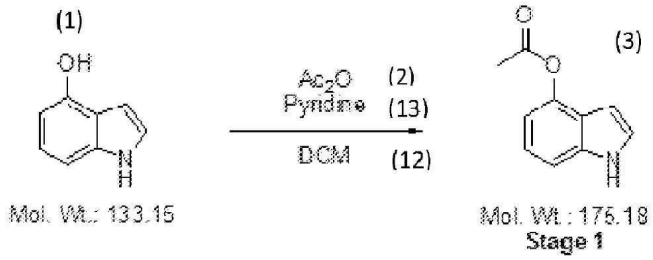
도면

도면1



* Reagent and conditions: (i) Ac_2O, pyridine, CH_2Cl_2, 0 °C to rt; (ii) $(COCl)_2$, ether, 0 °C, *n*-hexane, then −20 °C; (iii) $(CH_3)_2NH$, THF; (iv) $LiAlH_4$, THF, Δ; (v) $[(BnO)_2PO]_2O$, *n*-BuLi, THF, −78 °C to 0 °C; (vi) H_2, Pd/C, MeOH, rt.

도면2

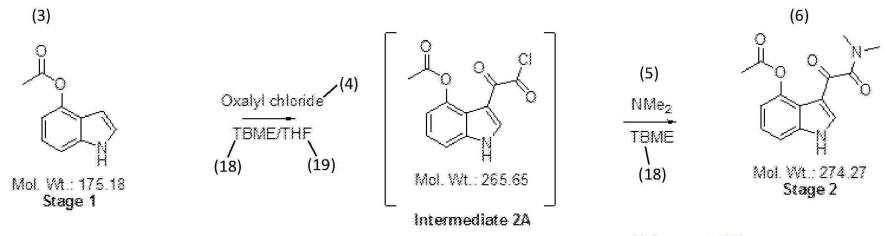


시트르산(14) 및 $NaHCO_3$(15)로 세척

$MgSO_4$(16)로 건조

헵탄(17)으로 파티션

도면3

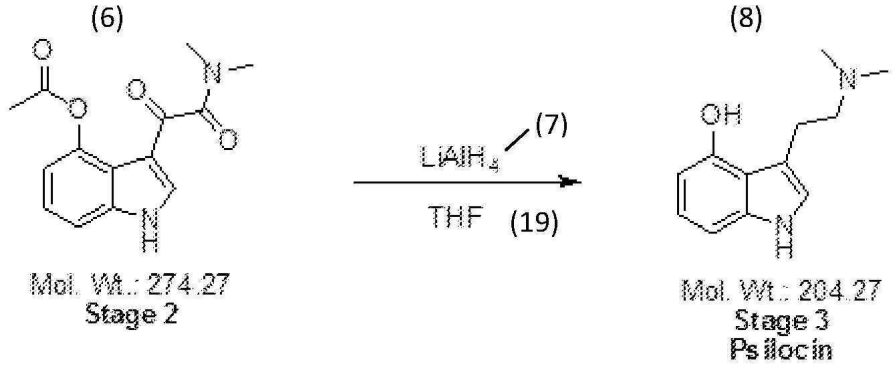


헵탄 추가(17)

헵탄(17)으로 세척

물(20) 및 IPA(21)에서 슬러리

도면4

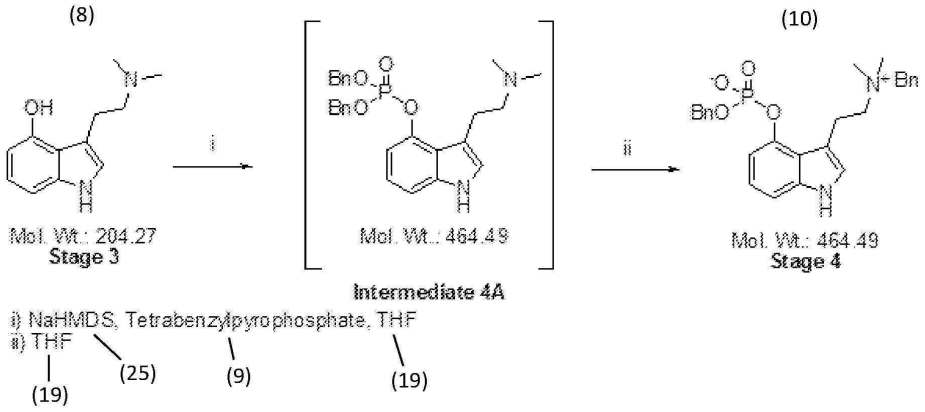


아세톤(22) 및 시트르산(14)으로 급랭

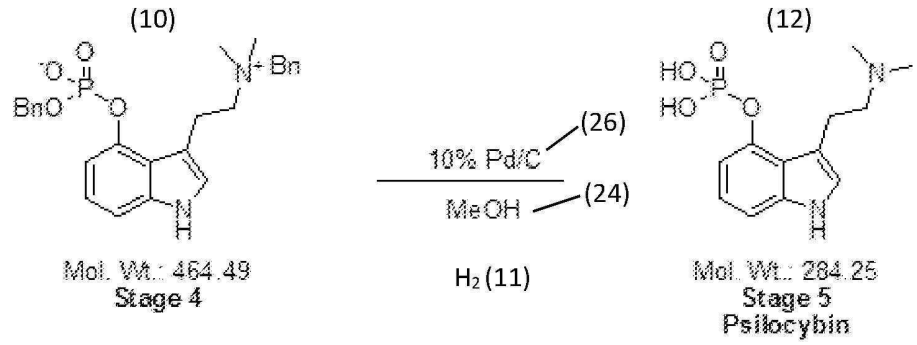
$MgSO_4$(16) 상에서 건조

iProAC(24):TBME(18)에서 슬러리

도면5



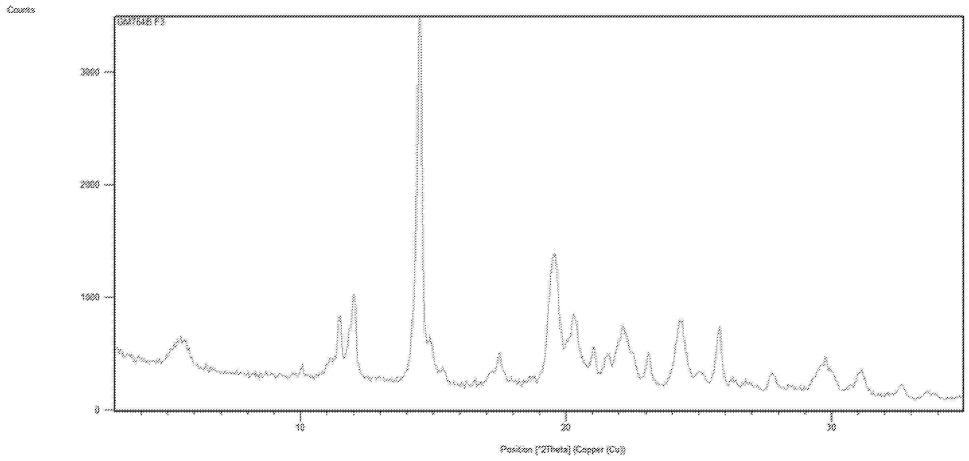
도면6



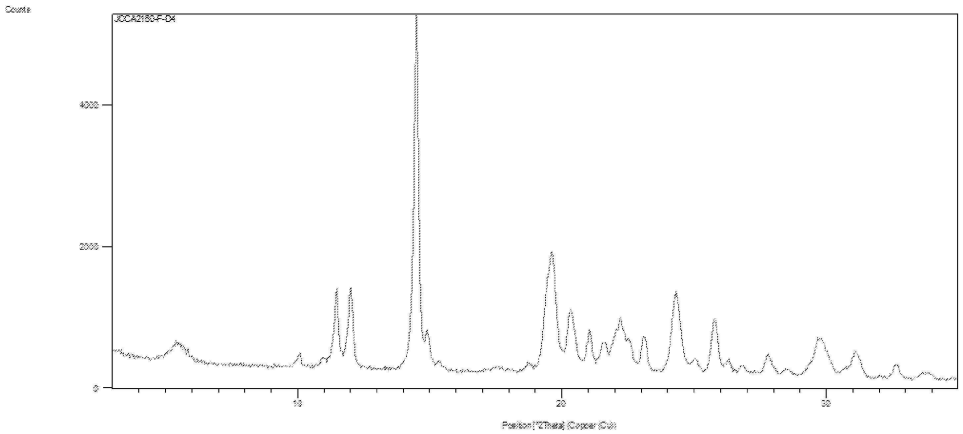
H_2O(20) 첨가

셀라이트(27) 층 상에서 여과

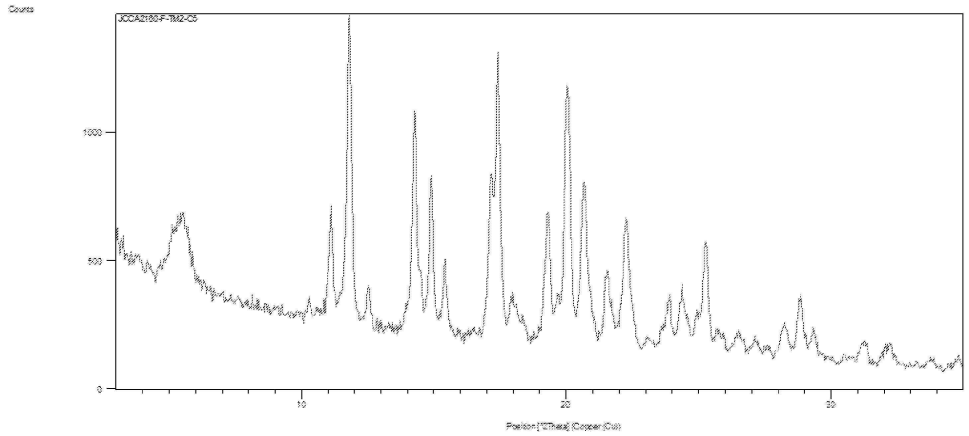
도면7a



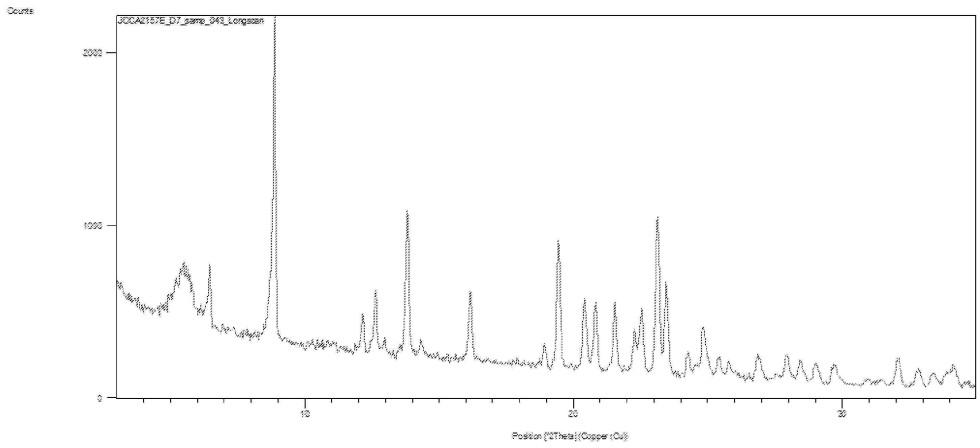
도면7b



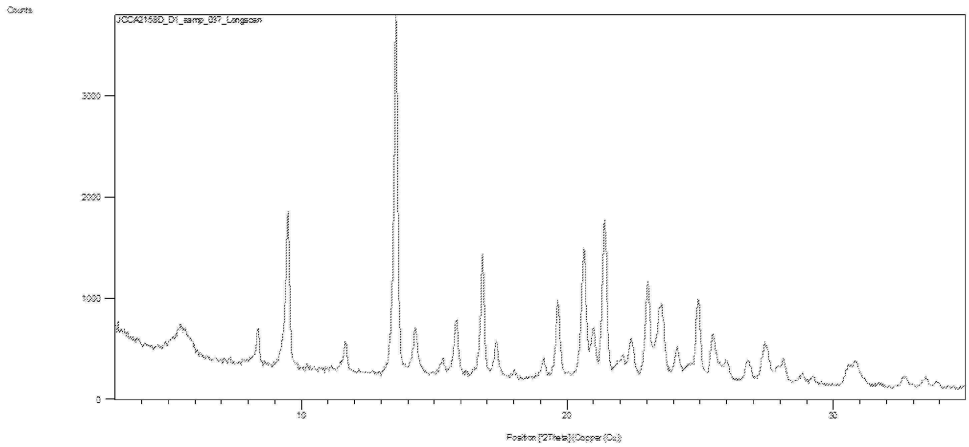
도면7c



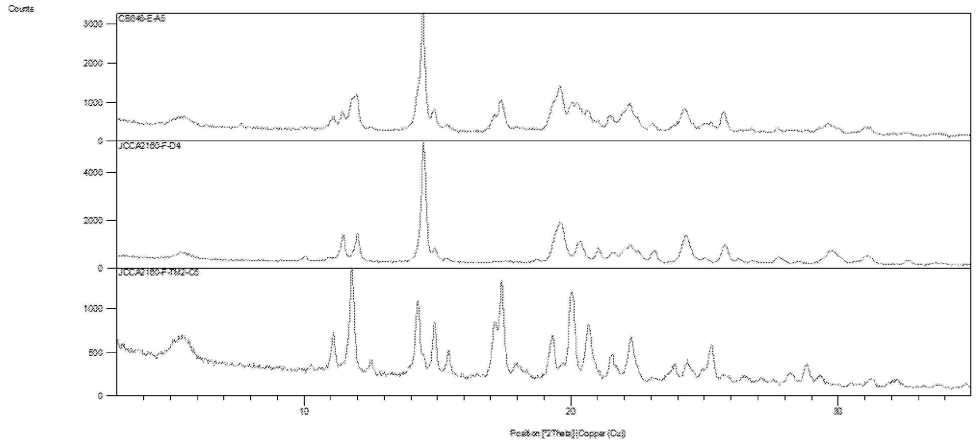
도면7d



도면7e

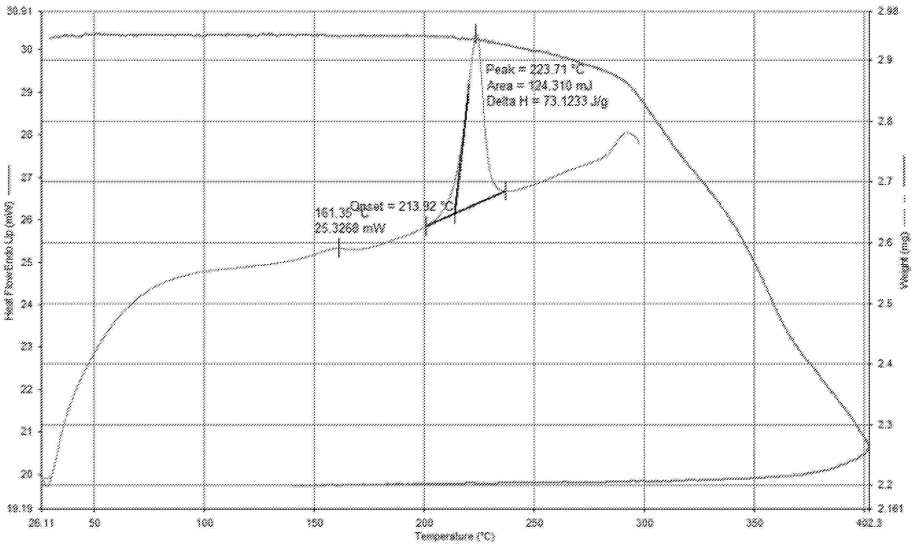


도면7f

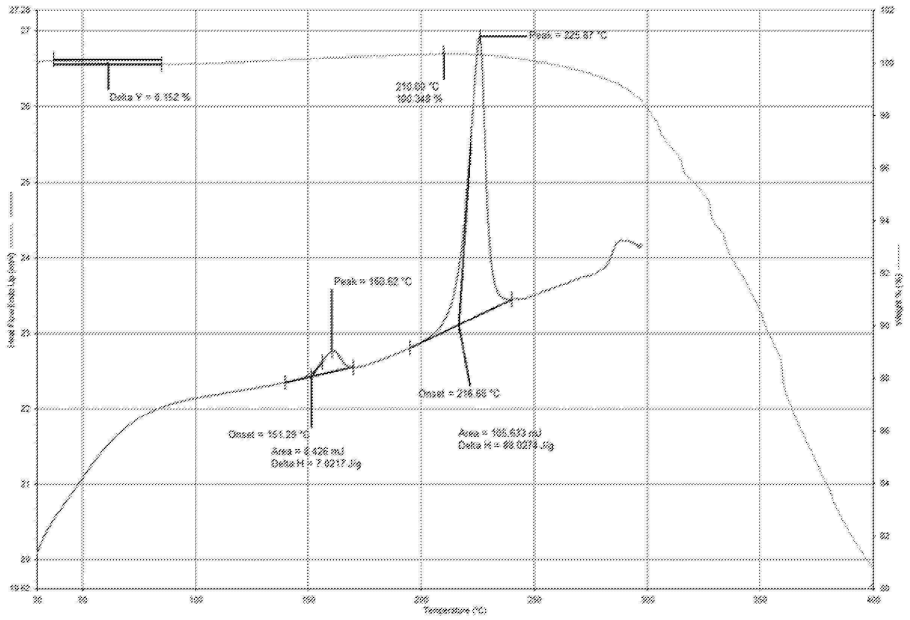


CB646 -TOP- MIXED PHASE; JCCA2160-F- MIDDLE PATTERN A'; JCCA2160-F-TM2- BOTTOM PATTERN B

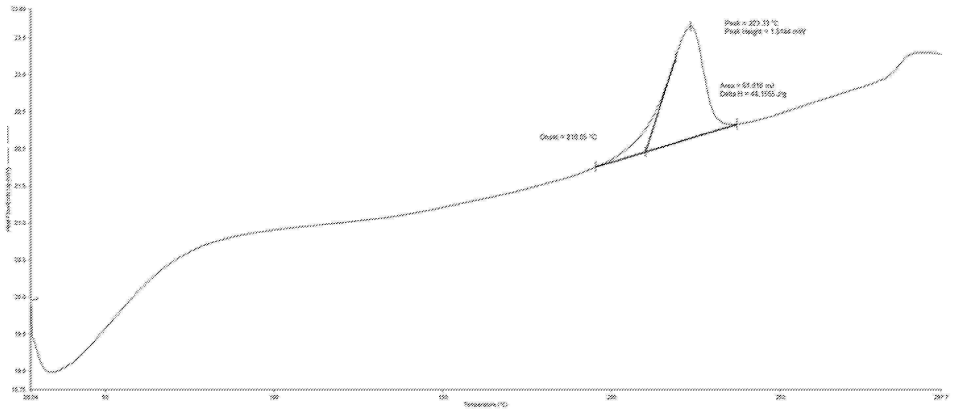
도면8a


Peak = 223.71 °C
Area = 124.310 mJ
Delta H = 73.1233 J/g
Onset = 213.92 °C
161.35 °C
25.3268 mW
Temperature (°C)

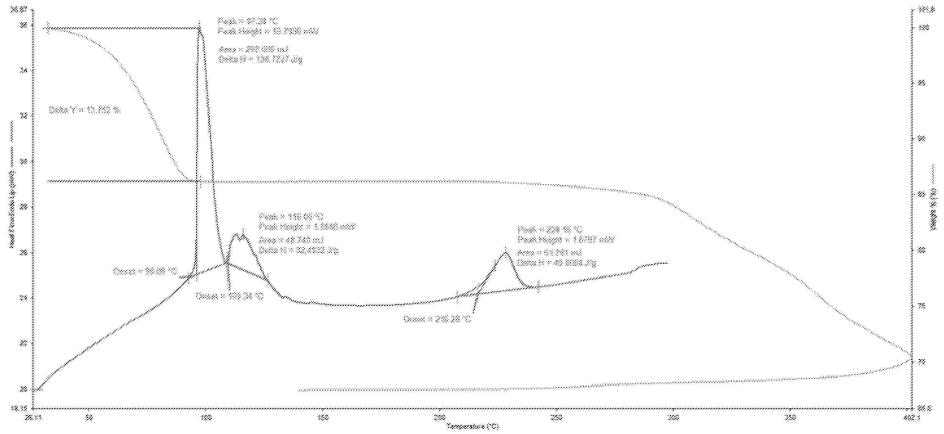
도면8b


Peak = 225.87 °C
Delta Y = 6.152 %
215.69 °C
100.348 %
Peak = 160.62 °C
Onset = 216.66 °C
Onset = 151.29 °C
Area = 8.426 mJ
Delta H = 7.0217 J/g
Area = 185.633 mJ
Delta H = 88.0278 J/g
Temperature (°C)

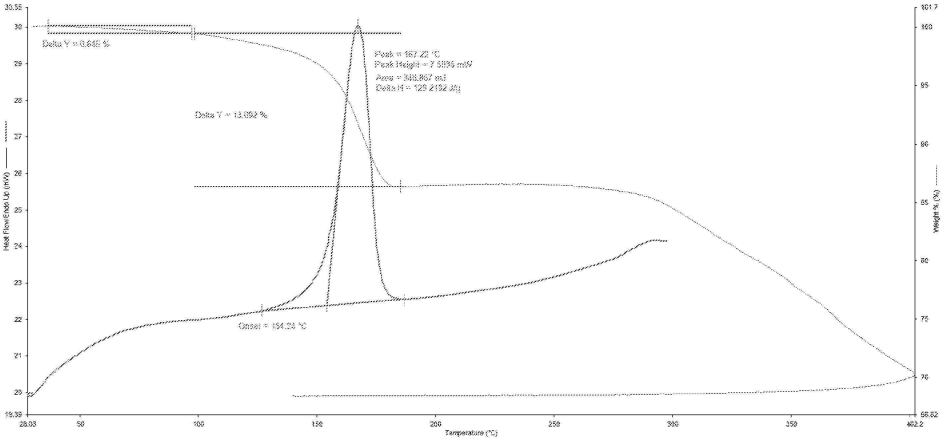
도면8c



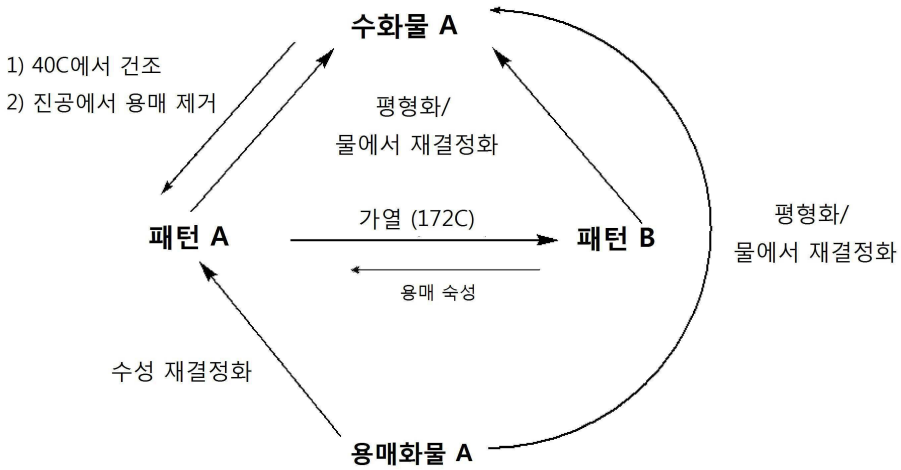
도면8d



도면8e

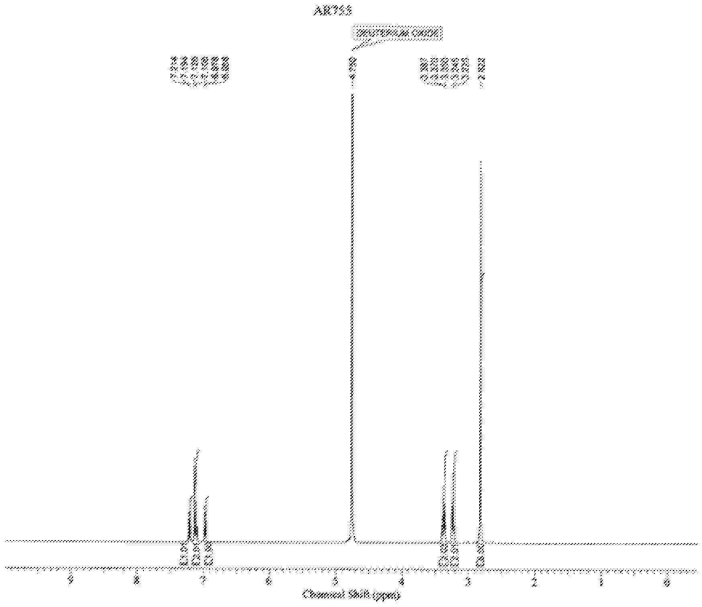


도면9

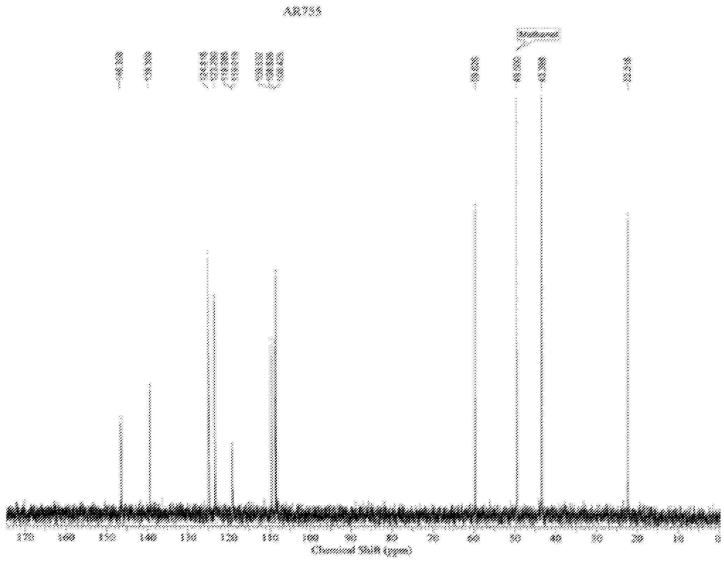


단계 5 수소화로부터 생성됨

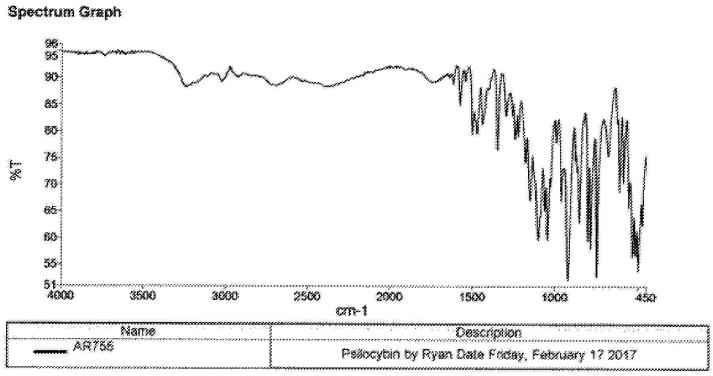
도면10



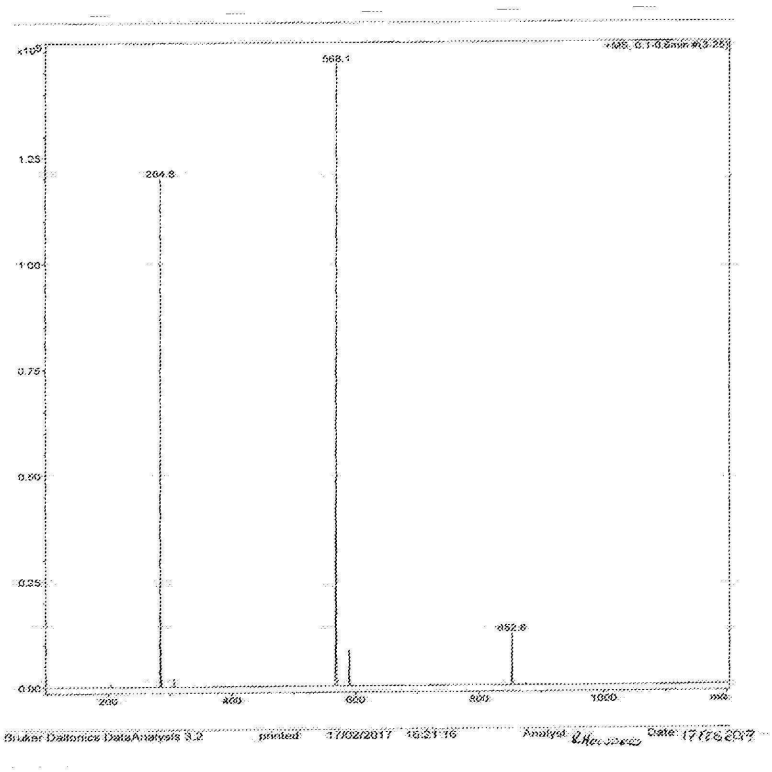
도면11



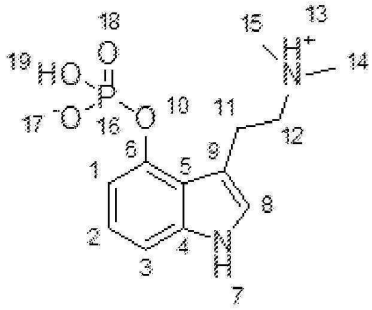
도면12


Spectrum Graph
%T
cm-1
Name
AR755
Description
Psilocybin by Ryan Date Friday, February 17 2017

도면13



도면14



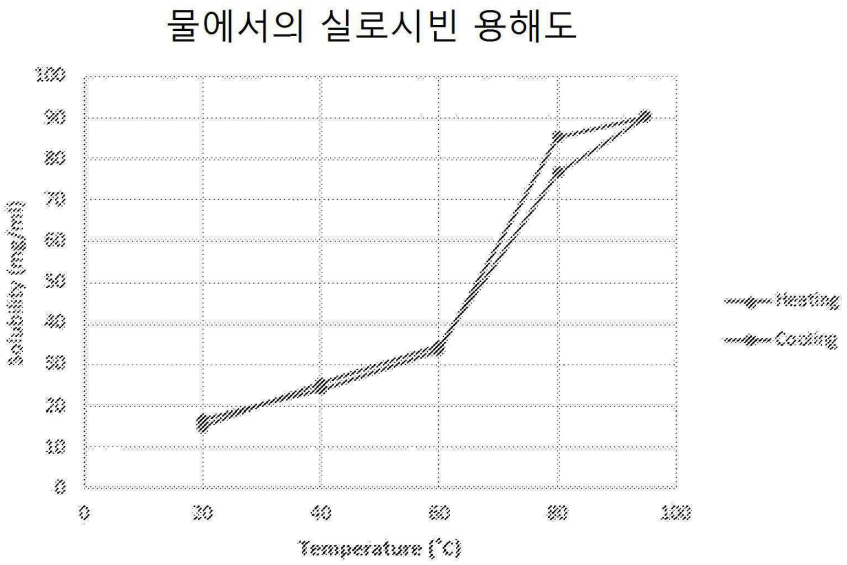
실로시빈

$C_{12}H_{17}N_2O_4P$

Exact Mass: 284.09

Mol. Wt.: 284.25

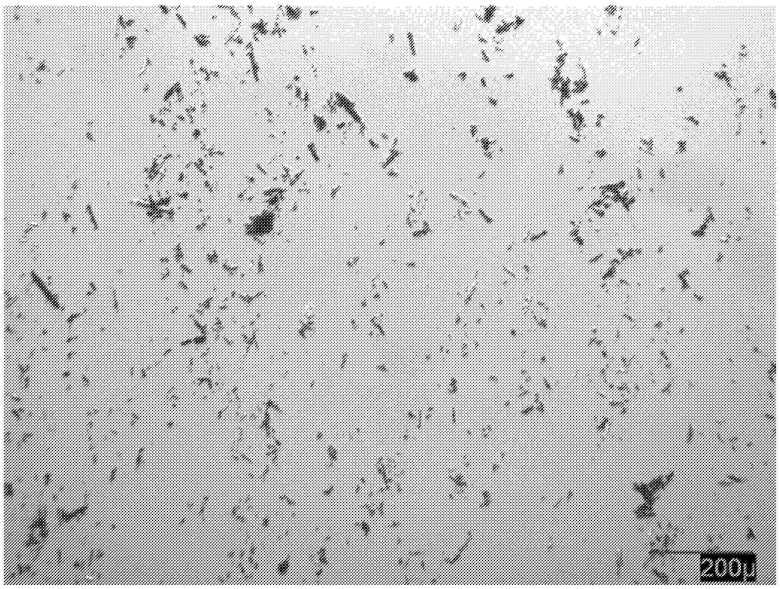
도면15


물에서의 실로시빈 용해도
Solubility (mg/kg)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
30
40
60
80
100
Temperature (°C)
Heating
Cooling

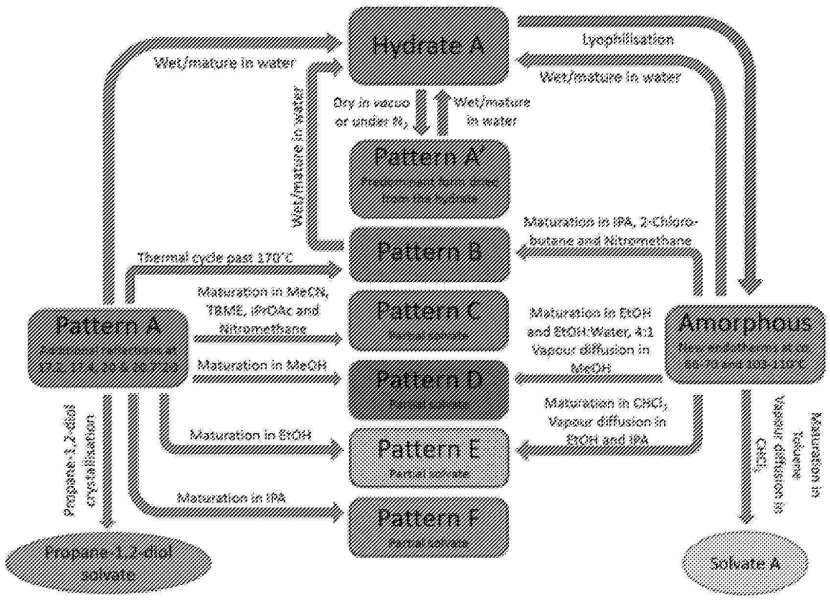
도면16a


200μ

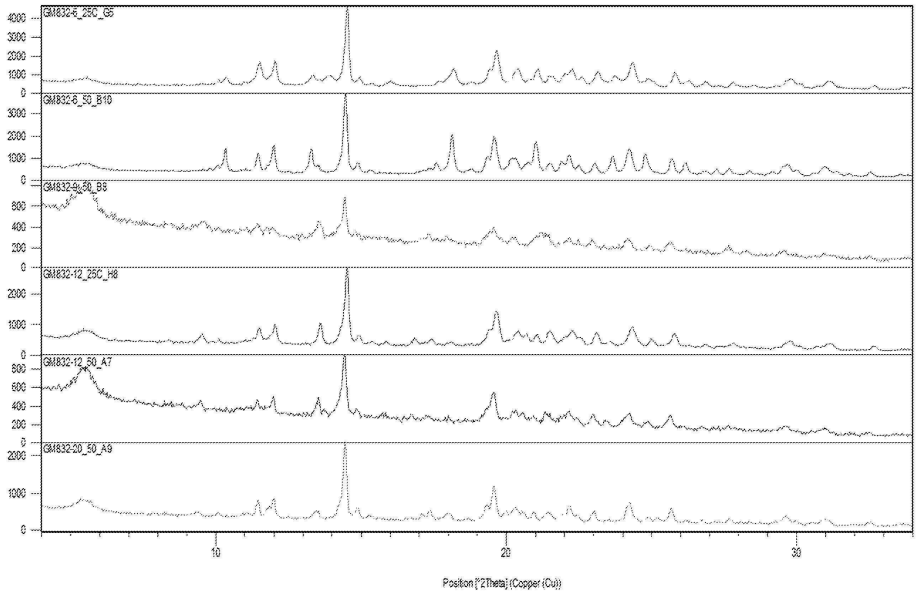
도면16b


200µ

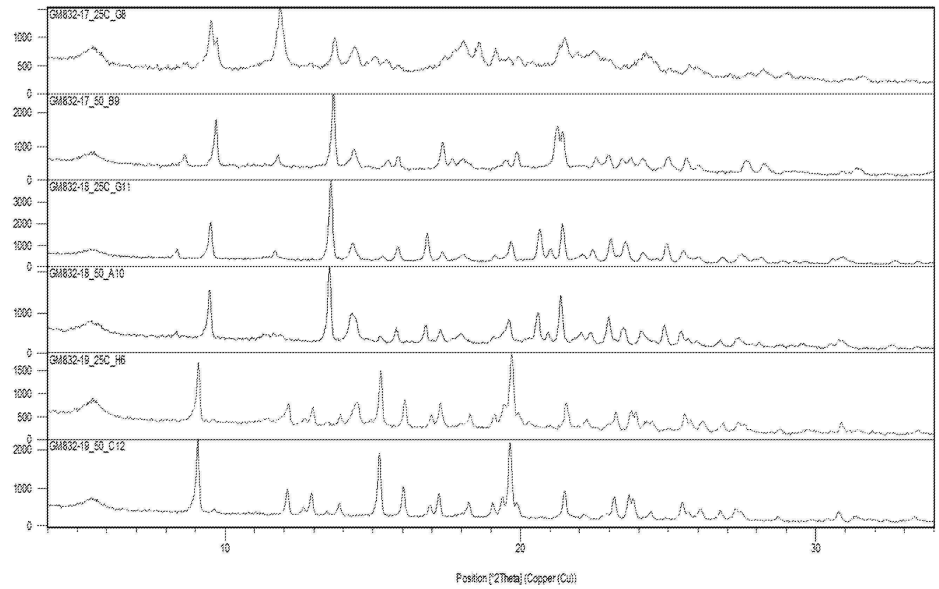
도면17


Hydrate A
Lyophilisation
Wet/mature in water
Wet/mature in water
Dry in vacuo or under N2
Wet/mature in water
Wet/mature in water
Pattern A'
Pattern B
Maturation in IPA, 2-Chloro-butane and Nitromethane
Thermal cycle past 170°C
Maturation in MeCN, TBME, iPrOAc and Nitromethane
Pattern A
Pattern C
Maturation in EtOH and EtOH:Water, 4:1 Vapour diffusion in MeOH
Amorphous
Maturation in MeOH
Pattern D
Maturation in CHCl3 Vapour diffusion in EtOH and IPA
Maturation in EtOH
Pattern E
Propane-1,2-diol crystallisation
Maturation in IPA
Pattern F
Maturation in toluene Vapour diffusion in CHCl3
Propane-1,2-diol solvate
Solvate A

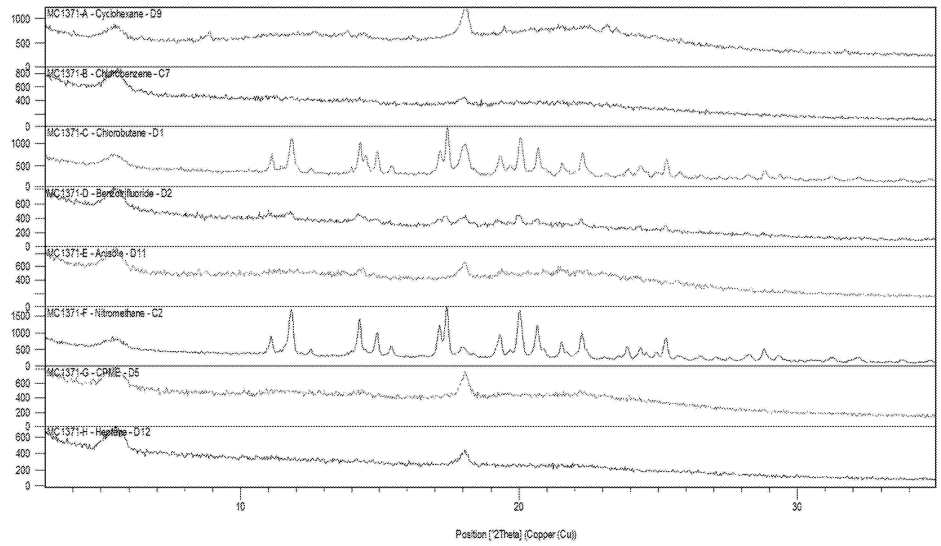
도면18


GM832-6_25C_G5
GM832-6_50_B10
GM832-9_50_B8
GM832-12_25C_H8
GM832-12_50_A7
GM832-20_50_A9
10
20
30
Position [°2Theta] (Copper (Cu))

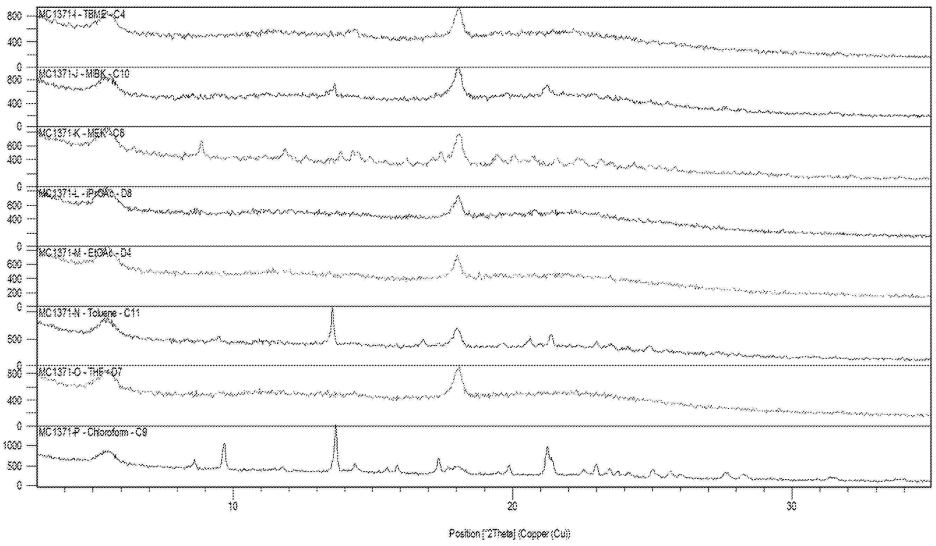
도면19


GM832-17_25C_G8
GM832-17_50_B9
GM832-18_25C_G11
GM832-18_50_A10
GM832-19_25C_H6
GM832-19_50_C12
10
20
30
Position [°2Theta] (Copper (Cu))

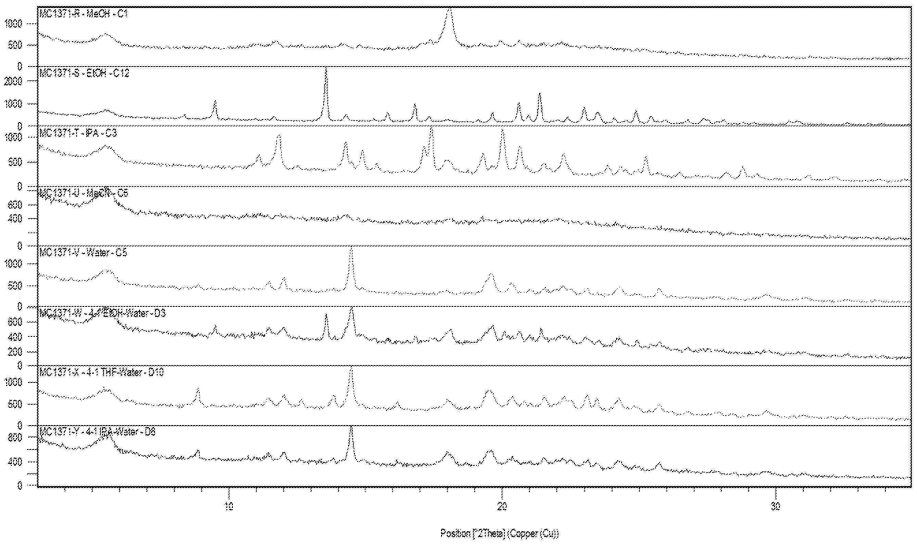
도면20


MC1371-A - Cyclohexane - D9
MC1371-B - Chlorobenzene - C7
MC1371-C - Chlorobutane - D1
MC1371-D - Benzotrifluoride - D2
MC1371-E - Anisole - D11
MC1371-F - Nitromethane - C2
MC1371-G - CPME - D5
MC1371-H - Heptane - D12
10
20
30
Position [°2Theta] (Copper (Cu))

도면21


MC1371-I - TBME - C4
MC1371-J - MIBK - C10
MC1371-K - MEK - C6
MC1371-L - iPrOAc - D8
MC1371-M - EtOAc - D4
MC1371-N - Toluene - C11
MC1371-O - THF - D7
MC1371-P - Chloroform - C9
10
20
30
Position [°2Theta] (Copper (Cu))

도면22


MC1371-R - MeOH - C1
MC1371-S - EtOH - C12
MC1371-T - IPA - C3
MC1371-U - MeCN - C5
MC1371-V - Water - C5
MC1371-W - 4-1 EtOH-Water - D3
MC1371-X - 4-1 THF-Water - D10
MC1371-Y - 4-1 IPA-Water - D8
10
20
30
Position [°2Theta] (Copper (Cu))