República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020006947-7 A2

(22) Data do Depósito: 09/10/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 06/10/2020

(54) Título: PREPARAÇÃO DE PSILOCIBINA, FORMAS POLIMÓRFICAS DIFERENTES, INTERMEDIÁRIOS, FORMULAÇÕES E SEU USO

(51) Int. Cl.: C07D 209/16.

(30) Prioridade Unionista: 09/10/2017 GB 1716505.1; 09/10/2018 GB 1816438.4; 28/06/2018 GB 1810588.2.

(71) Depositante(es): COMPASS PATHWAYS LIMITED.

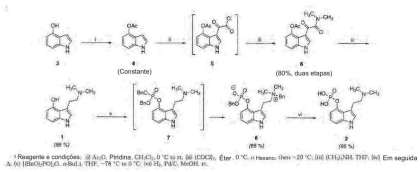
(72) Inventor(es): GILLIAN MOORE; HEMANT PATIL; DAVID NICHOLS; DEREK JOHN LONDESBROUGH; CHRISTOPHER BROWN; JULIAN SCOTT NORTHERN.

(86) Pedido PCT: PCT IB2018057811 de 09/10/2018

(87) Publicação PCT: WO WO/2019/073379 de 18/04/2019

(85) Data da Fase Nacional: 07/04/2020

(57) Resumo: Esta invenção refere-se à produção em larga escala de psilocibina para uso em medicina. Mais particularmente, refere-se a um método para obter psilocibina cristalina de alta pureza, particularmente na forma de Polimorfo A. Também refere-se a um método para a fabricação de psilocibina e intermediários na produção da mesma e formulações contendo psilocibina.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"PREPARAÇÃO DE PSILOCIBINA, FORMAS POLIMÓRFICAS DIFERENTES, INTERMEDIÁRIOS, FORMULAÇÕES E SEU USO".**

[001] Esta invenção refere-se à produção em larga escala de psilocibina para uso em medicina.

[002] Por grande escala entende-se a produção de lotes de psilocibina com um peso maior do que 10 g, mais preferivelmente maior do que 100 g, ainda mais preferivelmente maior do que 250 g e até e acima, de níveis de Kg.

[003] Também refere-se à produção de intermediários, incluindo, entre outros, a psilocina, diferentes formas polimórficas da psilocibina, incluindo variantes isoestruturais e sua formulação para uso em medicina, particularmente, mas não exclusivamente para o tratamento da depressão resistente ao tratamento, conforme definido em Diagnostic and Statistical Manual, 5ª Edição, isoladamente ou em combinação com suporte psicológico que pode ser fornecido digitalmente.

FUNDAMENTOS

[004] A psilocibina foi sintetizada pela primeira vez em 1958 por Sandoz, vide GB912714 e US3075992, e estava amplamente disponível como produto químico de pesquisa até meados da década de 1960.

[005] Um psicodélico à base de plantas tem sido utilizado como auxílio à psicoterapia no tratamento de transtornos do humor e transtornos de alcoolismo e, recentemente, três ensaios clínicos relataram seu uso para sintomas depressivos.

[006] Griffiths et al. 2016; J. Psychopharmacol 30 (12): 1181-1197;

[007] Ross et al. 2016; J. Psychopharmacol 30 (12): 1165-1180; e

[008] Carhart-Harris et al. 2016, Lancet Psychiatry 3 (7): 619-627.

[009] Os métodos de fabricação de psilocibina são limitados e incluem:

[010] J Nat Prod 2003, 66, páginas 885-887;

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

[012] Experientia 1958, 15, 397-399; e

[013] Synthesis 1999, 935-938.

[014] Com base nesta literatura, a Requerente acreditava que o processo divulgado em J Nat Prod 2003, 66, páginas 885-887 (doravante JNP) era o método mais adequado para o desenvolvimento em um processo comercial em escala.

[015] O processo aqui divulgado produziu quantidades na ordem de 10g e compreendeu 6 etapas numeradas (i) a (vi).

[016] Por analogia com o processo Requerente, as etapas ii e iii são discutidas a seguir como uma única etapa (Etapa 2) e o processo JNP é reproduzido como a Figura 1 neste documento.

[017] *Etapa 1 (i)* compreendeu reagir 4-hidróxi-indol ("3") com anidrido acético (AC_2O) em piridina e diclorometano anidro (CH_2Cl_2) a 0ºC. Foi adicionada água, a mistura foi evaporada e o concentrado resultante foi dissolvido em acetato de etila, lavado com água e cloreto de sódio saturado, e a Estágio orgânica seca sobre sulfato de sódio e evaporada para obter 4-acetilindol ("4"), que foi recolhido por filtração e lavado com água e acetato de etila.

[018] *Etapa 2 (ii e iii),* uma etapa de acilação em duas etapas (ii)-amidação (iii), compreendendo a formação de 3-Dimetilaminooxalil-4-acetilindol ("6") ao: (ii) reagir 4-acetilindol ("4") com cloreto de oxalila ($(COCl)_2$) em dietil éter anidro, agitar, adicionar n-hexano e manter a -20 ºC para produzir um acetato de 3-(2-cloro-2-oxoacetil)-1H-indol-4-ila intermediário ("5") que foi separado por filtração. O intermediário foi dissolvido em tetra-hidrofurano anidro (THF) e reagido com dimetilamina ($(CH_3)_2NH$) em tetra-hidrofurano e piridina. Éter anidro foi adicionado por causa da solidificação, e o produto da reação foi separado por filtração e lavado com n hexano, acetato de etila e água

para obter 3-Dimetilaminooxalil-4-acetilindol ("6").

[019] *Etapa 3 (iv)* compreendeu a formação de psilocina ("1") fazendo reagir o 3-dimetilaminooxalil-4-acetilindol ("6") com hidreto de alumínio e lítio ($LiAlH_4$) em THF anidro sob uma atmosfera de argônio. Após refluxo e arrefecimento, foi adicionado sulfato de sódio anidro, seguido de uma solução de sulfato de sódio e mais sulfato de sódio anidro. A mistura de reação foi diluída com acetato de etila, concentrada rapidamente sob vácuo, e os cristais de psilocina resultantes foram lavados brevemente com metanol.

[020] *Etapa 4 (v)* compreendeu a formação de fosfato de benzil [2-(4-óxi-indol-3-il)etil]dimetilammonio-4-O-benzila ("8") por reação de psilocina dissolvida em THF anidro, com n-butil lítio (n-BuLi) em n-hexano a -78 ºC e tetrabenzilpirofosfato $[(BnO)_2PO]_2O$, e a reação foi aquecida a 0ºC, e a produção de fosfato de dibenzil 3-[2-(dimetilamino)etil]-1H-indol-4-ila intermediário ("7") monitorada. Na verificação da sua presença, foi adicionado sílica gel de aminopropila, a mistura foi diluída com acetato de etila e filtrada através de uma almofada de Celite por sucção, o filtrado concentrado *in vacuo*, redissolvido em CH_2Cl_2 e o precipitado coletado por filtração.

[021] *Etapa 5 (vi)* compreendeu a formação de psilocibina ("2") por reação de ("8") em metanol (MeOH), com hidrogênio (H_2) usando um catalisador de carvão ativado por paládio (Pd/C). Água foi adicionada, devido à deposição do produto, e ("8"), seu derivado mono debenzilado foi monitorado juntamente com o aparecimento de psilocibina, a solução da reação foi filtrada através de uma almofada de Celite. O produto foi coletado por filtração e lavado com etanol para fornecer uma forma cristalina de agulha branca com um ponto de fusão de 190 ºC -198 ºC.

[022] Em contraste com a maioria dos processos, tal como JNP, que usam solventes não aquáticos como o metanol ou etanol, Experientia 1958, 15, 397-399 usou uma única recristalização a partir

da água para obter psilocibina a partir de uma extração de cogumelos. O ensinamento foi o de usar água fervente para dissolver o material de partida, obtido em pequena escala por cromatografia, e o material seco de alto vácuo resultante derreteu indistintamente entre 185 e 195 ºC, e mostrou uma perda de peso de 25,4%, sugerindo que ele claramente difere em pureza e forma ao obtido pela requerente.

[023] Durante o desenvolvimento de uma síntese para produzir Psilocibina, a requerente conduziu uma série de reações de hidrogenação em uma escala de 5 g que resultou na obtenção de diferentes formas cristalinas de Psilocibina. A reação de hidrogenação inicial produziu Hidrato A (JCCA2157E) que exibiu um difratograma de XRPD como mostrado na Fig. 7d e termogramas de DSC e TGA, tal como mostrado na Fig. 8d. O DSC exibe uma endotermia a ~97 ºC, que é coincidente com uma redução de peso no TGA indicativo de desidratação, e um evento endotérmico tendo uma temperatura de início de ~ 216 ºC, que se presume ser a fusão. Outra reação de hidrogenação produziu um solvato de etanol (JCCA2158D) que, quando analisado por XRPD (Fig. 7e), DSC (Fig. 8e), TGA (Fig. 8e) e por ^{1}H RMN, indicou 11% de etanol retido. O termograma de DSC mostra uma endotérmica com um início de ~ 154ºC que parecia ser uma fusão simultânea com a perda de peso de ~ 13% no TGA. Em outro experimento realizado durante o desenvolvimento, a requerente realizou uma cristalização da psilocibina; em vez de permanecer na solução em água quente, permitindo uma etapa de filtração de polimento, a precipitação ocorreu em alta temperatura (> 90ºC). Os sólidos formados não se dissolveram após aquecimento adicional ou adição de água extra. Após o arrefecimento e isolamento do sólido (CB646E), XRPD foi realizado. O difratograma de XRPD (Fig. 7f) sugeriu um Estágio misto de Polimorfo A' (JCCA2160-F-D4) e Polimorfo B (JCCA2160-F-TM2-C5). Essas descobertas destacam a importância

de desenvolver um processo que possa produzir consistentemente a forma cristalina desejada, para que as Requerentes iniciem experimentos para determinar quais eram essas formas para que pudessem produzir uma psilocibina quimicamente pura, em uma forma controlada adequada para uso em medicina.

[024] Para ensaios clínicos, qualquer Nova Substância Ativa (NAS) deve ser capaz de produzir em larga escala (normalmente 100g mais, mais tipicamente maior do que 250g, ainda mais preferivelmente maior do que 500g, em kg mais lotes), dependendo da quantidade de ativo a ser dosado a um objeto humano. Também deve ser quimicamente puro, bem definido e estável no armazenamento.

[025] Além disso, qualquer método de fabricação deve ser prontamente reproduzível e fornecer consistência lote a lote.

[026] É um primeiro objetivo desta invenção fornecer psilocibina, de forma polimórfica consistente, para administração a objetos humanos.

[027] É outro objetivo desta invenção fornecer psilocibina quimicamente pura, de forma polimórfica consistente, para administração a objetos humanos.

[028] É ainda um outro objetivo fornecer psilocibina quimicamente pura, em lotes de larga escala, uma vez que, para uso comercial, a psilocibina pura deve ser produzida em escala.

[029] É ainda outro objetivo da invenção fornecer um método de cristalização de psilocibina em uma forma polimórfica desejada.

[030] É ainda um outro objetivo da presente invenção fornecer um método escalonável para a fabricação de psilocibina, a partir de psilocina ou 4 hidroxi-indol.

[031] Ao desenvolver uma metodologia adequada, a Requerente enfrentou vários problemas e dificuldades que precisavam ser superados, e é um objetivo separado e independente superar os

problemas identificados em cada etapa e usar as invenções sozinhas ou em combinação.

[032] É ainda um objetivo adicional da invenção formular a psilocibina da invenção em uma forma adequada para administração a seres humanos e usá-la em medicina, particularmente no tratamento de transtornos do sistema nervoso central (SNC) e, mais particularmente, mas não exclusivamente, no tratamento da depressão, particularmente a depressão resistente a fármacos, isoladamente ou em combinação com um produto de saúde digital ou solução digital.

BREVE SUMÁRIO DA DIVULGAÇÃO

[033] De acordo com um primeiro aspecto da presente invenção, é fornecida psilocibina cristalina na forma Polimorfo A ou Polimorfo A', caracterizada por um ou mais de:

a. picos em um difratograma de XRPD a 11,5, 12,0 e 14,5 °2θ ± 0,1 °2θ;

b. picos em um difratograma de XRPD em 11,5, 12,0 e 14,5 °2θ ± 0,1 °2θ, adicionalmente caracterizado por pelo menos um pico adicional em 19,7, 20,4, 22,2, 24,3 ou 25,7 °2θ ± 0,1 °2θ;

c. um difratograma de XRPD como substancialmente ilustrado na Figura 7a ou 7b; ou

d. um evento endotérmico em um termograma de DSC com uma temperatura de início entre 205 e 220ºC substancialmente como ilustrado nas Figuras 8a ou 8b.

Polimorfo A

[034] De acordo com uma modalidade preferida da presente invenção, é fornecida psilocibina cristalina na forma Polimorfo A, caracterizada por um ou mais de:

a. picos em um difratograma de XRPD a 11,5, 12,0, 14,5 e 17,5, °2θ ± 0,1 °2θ;

b. picos em um difratograma de XRPD em 11,5, 12,0, 14,5 e

17,5, °2θ ± 0,1 °2θ, adicionalmente caracterizado por pelo menos um pico adicional em 19,7, 20,4, 22,2, 24,3 ou 25,7 °2θ ± 0,1 °2θ;

c. um difratograma de XRPD como substancialmente ilustrado na Figura 7a; ou

d. um evento endotérmico em um termograma de DSC com uma temperatura de início entre 205 e 220 ºC substancialmente como ilustrado na Figura 8a.

[035] O pico em 17,5 °2θ ± 0,1 °2θ tem uma intensidade relativa em comparação com o pico em 14,5 °2θ ± 0,1 °2θ de pelo menos 5%, preferivelmente pelo menos 6%, ainda mais preferivelmente pelo menos 7%, até 8%, e 9% a pelo menos 10%.

[036] Em uma modalidade, o Polimorfo A de psilocibina exibe um difratograma de XRPD caracterizado pelo difratograma resumido na Tabela 1. Em uma modalidade descrita aqui, o Polimorfo A de psilocibina cristalina compreende pelo menos 3 picos de (± 0,1 °2θ) da Tabela 1. Em uma modalidade certa modalidade, descrita aqui, o Polimorfo A de psilocibina cristalina compreende pelo menos 4 picos de (± 0,1 °2θ) da Tabela 1. Em uma certa modalidade, descrita aqui o Polimorfo A de psilocibina cristalina compreende pelo menos 5 picos de (± 0,1 °2θ) da Tabela 1. Em uma certa modalidade, aqui descrita, o Polimorfo A de psilocibina cristalina compreende pelo menos 6 picos de (± 0,1 °2θ) da Tabela 1. Em uma certa modalidade, descrita aqui, o Polimorfo A de psilocibina cristalina compreende pelo menos 8 picos de (± 0,1 °2θ) da Tabela 1. Em uma certa modalidade, aqui descrita, o Polimorfo A de psilocibina cristalina compreende pelo menos 10 picos de (± 0,1 °2θ) da Tabela 1. Em uma certa modalidade, aqui descrita, o Polimorfo A da psilocibina cristalina compreendendo pelo menos 15 picos de (± 0,1 °2θ) da Tabela 1. Um pico de cerca de 17,5 °2θ ± 0,1 °2θ distingue o Polimorfo A de psilocibina do Polimorfo A', no qual o pico está ausente ou substancialmente ausente (isto é, tem uma intensidade

relativa em comparação com o pico a 14,5 °2θ ± 0,1 °2θ menor do que 2%, mais preferivelmente menor do que 1%).

Tabela 1 - Posições de pico de XRPD para Polimorfo A

Posição [°2Th.]	Intensidade Relativa [%]
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

[037] Em uma modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina é caracterizado por picos de difratograma de XRPD em 11,5, 12,0, 14,5 e 17,5 °2θ ± 0,1 °2θ. Em outra modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina é adicionalmente caracterizado por pelo menos um pico adicional aparecendo em 19,7, 20,4, 22,2, 24,3 ou 25,7 °2θ ± 0,1 °2θ. Em outra modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina é adicionalmente caracterizado por pelo menos dois picos adicionais que aparecem em 19,7, 20,4, 22,2, 24,3 ou 25,7 °2θ ± 0,1 °2θ. Em outra modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina é adicionalmente caracterizado por pelo menos três picos adicionais que aparecem em

19,7, 20,4, 22,2, 24,3 ou 25,7 °2θ ± 0,1 °2θ. Em ainda uma outra modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina exibe um difratograma de XRPD substancialmente igual ao difratograma de XRPD mostrado na Fig. 7a.

[038] Em uma modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina é caracterizado por picos de difratograma de XRPD em 14,5 e 17,5 °2θ ± 0,1 °2θ com o pico em 17,5 °2θ tendo uma intensidade que é pelo menos 5% da intensidade do pico em 14,5 °2θ, ainda mais preferivelmente pelo menos 6%, a pelo menos 7%, pelo menos 8%, pelo menos 9% e pelo menos 10%.

[039] Em uma modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina é ausente ou substancialmente ausente de um difratograma de XRPD em picos em 10,1. Por substancialmente ausente, entende-se que qualquer pico de difratograma de XRPD em 10,1 é menor do que 2% da intensidade do pico em 14,5 °2θ, tal como menor de 1%, ou não é detectável no difratograma de XRPD,

[040] Em uma modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina é caracterizado por um evento endotérmico em um termograma de DSC com uma temperatura de início entre 205 e 220ºC, tal como entre 210 e 220ºC, tal como entre 210 e 218ºC, ou tal como entre 210 e 216ºC. Em outra modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina é adicionalmente caracterizado por um evento endotérmico no termograma de DSC com uma temperatura inicial entre 145 e 165 ºC, tal como entre 145 e 160ºC, ou entre 145 e 155ºC. Em outra modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina é caracterizado por um evento endotérmico tendo uma temperatura de início entre 205 e 220ºC, tal como entre 210 e 220 ºC, tal como entre 210 e 218ºC, ou entre 210 e 218ºC. 216ºC e um evento endotérmico tendo uma temperatura de início entre 145 e 165 ºC, tal como entre 145 e 160ºC, ou entre 145 e 155ºC, em um termograma de DSC. Em ainda outra

modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina exibe um termograma de DSC substancialmente o mesmo que o termograma de DSC na Fig. 8a.

[041] Em outra modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina é caracterizado por ter um teor de água de <0,5% em p/p, tal como <0,4% em p/p, tal como <0,3% em p/p, tal como <0,3% em p/p, tal como <0,2% em p/p, ou tal como <0,1% em p/p. O especialista conheceria métodos para determinar o teor de água de um composto, por exemplo, Titulação Karl Fischer. Em uma modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina é caracterizado por ter <0,5% em peso, tal como <0,4% em peso, tal como <0,3% em peso, tal como <0,3% em peso, tal como <0,2% em peso, tal como < 0,1% em p/p, no termograma de TGA entre a temperatura ambiente, tal como cerca de 25 ºC e 200 ºC. Em uma modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina perde menos de 2% em peso em um Teste de perda na secagem, tal como menos de 1% em peso, tal como menos de 0,5% em peso. O Teste de perda na secagem é realizado a 70 ºC.

[042] Em uma modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina é uma forma cristalina altamente pura do Polimorfo A, por exemplo, a psilocibina compreende pelo menos 90% em peso, tal como 95%, tal como 95%, tal como 99%, tal como 99,5% do Polimorfo A.

[043] Em uma modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina é um sólido branco a esbranquiçado.

[044] Em outra modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina é quimicamente puro, por exemplo, a psilocibina possui uma pureza química maior do que 97%, tal como maior do que 98%, ou maior do que 99% em por HPLC. Em uma modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina não tem nenhuma única impureza maior do que 1%, mais preferivelmente menor do que 0,5%, incluindo ácido fosfórico medido por ^{31}P RMN e psilocina medida por HPLC. Em uma

modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina tem uma pureza química maior do que 97% em área, ainda mais preferivelmente maior do que 98% em área e mais preferivelmente maior do que 99% em área por HPLC. Em uma modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina não possui nenhuma única impureza maior do que 1% em área, mais preferivelmente menor do que 0,5% em área, conforme medido por HPLC. Em uma modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina não contém psilocina a um nível maior do que 1% da área, mais preferivelmente menor do que 0,5% da área, conforme medido por HPLC. Em uma modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina não contém ácido fosfórico a um nível maior do que 1% em peso, mais preferivelmente menor do que 0,5% em peso, conforme medido por ^{31}P RMN. Em uma modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina tem um ensaio químico de pelo menos 95% em peso, tal como pelo menos 96% em peso, ou como pelo menos 98% em peso.

Polimorfo A'

[045] De acordo com outra modalidade da invenção, é fornecido Polimorfo A' de psilocibina cristalina caracterizado por um ou mais de:

a. picos em um difratograma de XRPD em 11,5, 12,0 e 14,5 °2θ ± 0,1 °2θ, mas ausente ou substancialmente ausente de um pico em 17,5 °2θ ± 0,1 °2θ;

b. picos em um difratograma de XRPD em 11,5, 12,0 e 14,5 °2θ ± 0,1 °2θ, mas ausente ou substancialmente ausente de um pico em 17,5 °2θ ± 0,1 °2θ, adicionalmente caracterizado por pelo menos um pico adicional em 19,7, 20,4, 22,2, 24,3 ou 25,7 °2θ ± 0,1 °2θ;

c. um difratograma de XRPD como substancialmente ilustrado na Figura 7b; ou

d. um evento endotérmico em um termograma de DSC com uma temperatura de início entre 205 e 220ºC substancialmente como ilustrado na Figura 8b.

[046] Por ausência substancial de um pico a 17,5 °2θ ± 0,1 °2θ significa, se presente, o pico tem uma intensidade relativa, comparado a um pico a 14,5 °2θ ± 0,1 °2θ, menor do que 5%, mais preferivelmente menor do que 4%, a menos de 3% a 2%, 1% ou menos.

[047] Em uma modalidade, o Polimorfo A de psilocibina exibe um difratograma de XRPD caracterizado pelo difratograma resumido na Tabela 2. Em uma modalidade descrita aqui, o Polimorfo A de psilocibina cristalina compreende pelo menos 3 picos (± 0,1 °2θ) da Tabela 2, mas ausente ou substancialmente ausente de um pico a 17,5 °2θ ± 0,1 °2θ. Em uma certa modalidade, aqui descrita o Polimorfo A' de psilocibina cristalina, compreendendo pelo menos 4 picos (± 0,1 °2θ) da Tabela 2, mas ausente ou substancialmente ausente de um pico a 17,5 °2θ ± 0,1 °2θ. Em uma certa modalidade, aqui descrita, o Polimorfo A de psilocibina cristalina compreende pelo menos 5 picos de (± 0,1 °2θ) da Tabela 2, mas ausente ou substancialmente ausente de um pico a 17,5 °2θ ± 0,1 °2θ. Em uma certa modalidade, aqui descrita, o Polimorfo A de psilocibina cristalina compreende pelo menos 6 picos de (± 0,1 °2θ) da Tabela 2, mas ausente ou substancialmente ausente de um pico a 17,5 °2θ ± 0,1 °2θ. Em uma certa modalidade, aqui descrita, o Polimorfo A de psilocibina cristalina compreende pelo menos 8 picos de (± 0,1 °2θ) da Tabela 2, mas ausente ou substancialmente ausente de um pico a 17,5 °2θ ± 0,1 °2θ. Em uma certa modalidade, aqui descrita, o Polimorfo A de psilocibina cristalina compreende pelo menos 10 picos de (± 0,1 °2θ) da Tabela 2, mas ausente ou substancialmente ausente de um pico a 17,5 °2θ ± 0,1 °2θ. Em uma certa modalidade, aqui descrita, o Polimorfo A de psilocibina cristalina compreende pelo menos 15 picos de (± 0,1 °2θ) da Tabela 2, mas ausente ou substancialmente ausente de um pico a 17,5 °2θ ± 0,1 °2θ. Em uma certa modalidade, aqui descrita, o Polimorfo A de psilocibina cristalina compreende pelo menos 20 picos (± 0,1 °2θ) da Tabela 2, mas ausente ou substancialmente

ausente de um pico a 17,5 °2θ ± 0,1 °2θ. Em uma certa modalidade, aqui descrita, o Polimorfo A de psilocibina cristalina compreende pelo menos 25 picos de (± 0,1 °2θ) da Tabela 2, mas ausente ou substancialmente ausente de um pico a 17,5 °2θ ± 0,1 °2θ.

Tabela 2 - Posições de pico de XRPD para Polimorfo A'

Posição [°2Th.]	Intensidade Relativa [%]
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

[048] Em uma modalidade, o Polimorfo A' de psilocibina cristalina é caracterizado por picos de difratograma de XRPD em 11,5, 12,0 e 14,5 °2θ ± 0,1 °2θ, mas substancialmente ausente de um pico em 17,5 °2θ ± 0,1 °2θ. Em outra modalidade, o Polimorfo A' de psilocibina cristalina é adicionalmente caracterizado por pelo menos um pico adicional aparecendo em 19,7, 20,4, 22,2, 24,3 ou 25,7 °2θ ± 0,1 °2θ. Em outra modalidade, o Polimorfo A' de psilocibina cristalina é adicionalmente caracterizado por pelo menos dois picos adicionais aparecendo em 19,7, 20,4, 22,2, 24,3 ou 25,7 °2θ ± 0,1 °2θ. Em outra modalidade, o Polimorfo A' de psilocibina cristalina é adicionalmente caracterizado e distinto do Polimorfo A pela presença de um pico que aparece em 10,1 °2θ ± 0,1 °2θ. Em ainda uma outra modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina exibe um difratograma de XRPD substancialmente igual ao difratograma de XRPD mostrado na Fig. 7b.

[049] Em uma modalidade, o Polimorfo A' de psilocibina cristalina é caracterizado por picos de difratograma de XRPD em 14,5 e 17,5 °2θ ± 0,1 °2θ, em que a intensidade do pico em 17,5 °2θ é menor do que 5% da intensidade do pico em 14,5 °2θ, tal como menos de 4%, tal como menos de 3%, tal como menos de 2%, tal como menos de 1% ou cerca de 1%.

[050] Em uma modalidade, o Polimorfo A' de psilocibina cristalina é caracterizado por picos de difratograma de XRPD em 10,1 e 14,5 °2θ ± 0,1 °2θ, em que a intensidade do pico em 10,1 °2θ é pelo menos 1% da intensidade do pico em 14,5 °2θ, tal como pelo menos 2%, tal como pelo menos 3% ou cerca de 4%.

[051] Em uma modalidade, o Polimorfo A' de psilocibina cristalina é caracterizado por um evento endotérmico em um termograma de DSC com uma temperatura de início entre 205 e 220ºC, tal como entre 210 e 220ºC, tal como entre 210 e 218ºC, ou tal como entre 210 e 216ºC. Em outra modalidade, o Polimorfo A' de psilocibina cristalina é

adicionalmente caracterizado por um evento endotérmico no termograma de DSC com uma temperatura inicial entre 145 e 165 ºC, tal como entre 145 e 160 ºC, ou entre 145 e 160 ºC, ou entre 145 e 155ºC. Em outra modalidade, o Polimorfo A' de psilocibina cristalina é caracterizado por um evento endotérmico tendo uma temperatura de início entre 205 e 220 ºC, tal como entre 210 e 220 ºC, tal como entre 210 e 218 ºC, ou entre 210 e 216 ºC, e um evento endotérmico tendo uma temperatura de início entre 145 e 165 ºC, tal como entre 145 e 160 ºC, ou entre 145 e 155 ºC, em um termograma de DSC. Em ainda outra modalidade, o Polimorfo A' de psilocibina cristalina exibe um termograma de DSC substancialmente o mesmo que o termograma de DSC na Fig. 8b.

[052] Em outra modalidade, o Polimorfo A' de psilocibina cristalina é caracterizado por ter um teor de água de <0,5% em p/p, tal como <0,4% em p/p, tal como <0,3% em p/p, tal como <0,2% em p/p ou <0,1% em p/p. O especialista saberia sobre métodos para determinar o teor de água de um composto, por exemplo, Titulação Karl Fischer. Em uma modalidade, o Polimorfo A' de psilocibina cristalina é caracterizado por ter <0,5% em p/p de perda, tal como <0,4% em p/p, tal como <0,3% em p/p, tal como <0,3% em p/p, tal como <0,2% em p/p, tal como <0,1% em p/p, no termograma de TGA entre a temperatura ambiente, tal como 25ºC e 200 ºC. Em uma modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina perde menos de 2% em peso em um Teste de perda na secagem, tal como menos de 1% em peso, tal como menos de 0,5% em peso. O Teste de perda por secagem é realizado a 70 ºC.

[053] Em uma modalidade, o Polimorfo A' de psilocibina cristalina é uma forma cristalina altamente pura do Polimorfo A', por exemplo, a psilocibina compreende pelo menos 90% em peso, tal como 95%, tal como 99%, tal como 99%, tal como 99,5% de Polimorfo A'.

[054] Em uma modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina

é um sólido branco a esbranquiçado.

[055] Em outra modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina é quimicamente puro, por exemplo, a psilocibina tem uma pureza química maior do que 97%, ainda mais preferivelmente maior do que 98% e mais preferivelmente maior do que 99% por HPLC. Em uma modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina não tem uma única impureza maior do que 1%, mais preferivelmente menor do que 0,5%, incluindo ácido fosfórico medido por ^{31}P RMN e psilocina medida por HPLC. Em uma modalidade, o Polimorfo A' de psilocibina cristalina tem uma pureza química maior do que 97% em área, ainda mais preferivelmente maior do que 98% em área e mais preferivelmente maior do que 99% em área por HPLC. Em uma modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina não tem nenhuma única impureza maior do que 1% em área, mais preferivelmente menor do que 0,5% em área, conforme medido por HPLC. Em uma modalidade, cristalino o Polimorfo A de psilocibina não contém psilocina em um nível maior do que 1% da área, mais preferivelmente menor do que 0,5% da área, conforme medido por HPLC. Em uma modalidade, o Polimorfo A' de psilocibina cristalina não contém ácido fosfórico em um nível maior do que 1% em peso, mais preferivelmente menor do que 0,5% em peso, conforme medido por ^{31}P RMN. Em uma modalidade, o Polimorfo A de psilocibina cristalina tem um ensaio químico de pelo menos 95% em peso, tal como pelo menos 96% em peso ou tal como pelo menos 98% em peso.

[056] Os difratogramas de XRPD e as posições de pico de XRPD são adquiridos usando radiação Cu Kα.

[057] Os termogramas de DSC e TGA são adquiridos usando uma taxa de aquecimento de 20 ºC/min.

[058] Em uma modalidade, é fornecida psilocibina cristalina de alta pureza, Polimorfo A ou Polimorfo A' (12A ou 12A'), exibindo um difratograma de XRPD como substancialmente ilustrado nas Fig. 7a ou

7b e um termógrafo de DSC como substancialmente ilustrado nas Fig. 8a ou 8b ou uma mistura dos mesmos.

[059] Preferivelmente, o Polimorfo A de psilocibina cristalina (12A) exibe um difratograma de XRPD como ilustrado na Fig. 7a e um termógrafo de DSC como ilustrado na Fig. 8a.

[060] Preferivelmente, o Polimorfo A' (12A') da psilocibina cristalina exibe um difratograma de XRPD como substancialmente ilustrado na Fig. 7b e um termógrafo de DSC como substancialmente ilustrado na Fig. 8b.

[061] Preferivelmente, o Polimorfo A de psilocibina cristalina de alta pureza (12A) é caracterizado por um difratograma de XRPD como substancialmente ilustrado na Fig. 7a e um termógrafo de DSC como substancialmente ilustrado na Fig. 8a.

[062] Preferivelmente, o Polimorfo A de psilocibina cristalina de alta pureza (12A') é caracterizado por um difratograma de XRPD como ilustrado na Fig. 7b e um termógrafo de DSC como ilustrado na Fig. 8b.

[063] O Polimorfo A (incluindo sua variante isoestrutural Polimorfo A') (Figs. 7a e 7b) difere do Polimorfo B (Fig. 7c), o Hidrato A (Fig. 7d) e o solvato de etanol (Fig. 7e: Solvato A) e a relação entre alguns das diferentes formas é ilustrada na Fig. 9.

[064] O Polimorfo A ou Polimorfo A' de psilocibina cristalina é um sólido branco a esbranquiçado e/ou tem uma pureza química maior do que 97%, ainda mais preferivelmente maior do que 98% e mais preferivelmente maior do que 99% por HPLC, e não tem nenhuma única impureza maior do que 1%, mais preferivelmente menor do que 0,5%, incluindo ácido fosfórico medido por ^{31}P RMN e psilocina medida por HPLC. Em uma modalidade, é fornecida psilocibina cristalina de alta pureza, Polimorfo A ou Polimorfo A'. Em uma modalidade, a psilocibina cristalina, Polimorfo A ou Polimorfo A', tem uma pureza química maior do que 97% em área, ainda mais preferivelmente maior do que 98% em

área e, mais preferivelmente, maior do que 99% em área por HPLC. Em uma modalidade, a psilocibina cristalina, Polimorfo A ou Polimorfo A', não tem uma única impureza maior do que 1% em área, mais preferivelmente menor do que 0,5% em área, conforme medido por HPLC. Em uma modalidade, a psilocibina cristalina, Polimorfo A ou Polimorfo A', não contém psilocina em um nível maior do que 1% em área, mais preferivelmente menor do que 0.5% em área conforme medido por HPLC. Em uma modalidade, a psilocibina cristalina, Polimorfo A ou Polimorfo A', não contém ácido fosfórico em um nível maior do que 1% em peso, mais preferivelmente menor do que 0,5% em peso, conforme medido por ^{31}P RMN. Em uma modalidade, a psilocibina cristalina, Polimorfo A ou Polimorfo A', tem um ensaio químico de pelo menos 95% em peso, tal como pelo menos 96% em peso, ou pelo menos 98% em peso.

[065] O aquecimento do Polimorfo A ou A' resulta em um evento endotérmico tendo uma temperatura inicial de cerca de 150 ºC correspondente à transição sólido-sólido do Polimorfo A ou Polimorfo A' para o Polimorfo B. Aquecimento contínuo do sólido resultante, isto é, Polimorfo B, resulta em um segundo evento endotérmico correspondente a um ponto de fusão com uma temperatura de início entre 205 e 220 ºC (vide Figuras 8a e 8b).

[066] De acordo com outro aspecto independente da presente invenção, é fornecida uma forma cristalina de psilocibina, Hidrato A, caracterizada por um ou mais de:

a. picos em um difratograma de XRPD a 8,9, 12,6 e 13,8 °2θ ± 0,1 °2θ;

b. picos em um difratograma de XRPD em 8,9, 12,6 e 13,8 °2θ ± 0,1 °2θ, adicionalmente caracterizado por pelo menos um pico adicional em 6,5, 12,2, 19,4, 20,4 ou 20,8 °2θ ± 0,1 °2θ;

c. um difratograma de XRPD como substancialmente

ilustrado na Figura 7d; ou

d. um evento endotérmico em um termograma de DSC com uma temperatura de início entre 205 e 220 ºC substancialmente como ilustrado na Figura 8d.

[067] Em uma modalidade, o Hidrato A de psilocibina exibe um difratograma de XRPD caracterizado pelo difratograma resumido na Tabela 3. Em uma modalidade, aqui descrito o Hidrato A de psilocibina cristalina compreende pelo menos 3 picos de (± 0,1 °2θ) da Tabela 3. Em uma determinada modalidade, descrita aqui o Hidrato A de psilocibina cristalina compreende pelo menos 4 picos de (± 0,1 °2θ) da Tabela 3. Em uma certa modalidade, descrito aqui o Hidrato A de psilocibina cristalina compreende pelo menos 5 picos de (± 0,1 °2θ) de Tabela 3. Em uma certa modalidade, aqui descrito o Hidrato A de psilocibina cristalina compreende pelo menos 8 picos de (± 0,1 °2θ) da Tabela 3. Em uma certa modalidade, aqui descrito o Hidrato A de psilocibina cristalina compreende pelo menos 10 picos de (± 0,1 °2θ) da Tabela 3.

Tabela 3 Posições de pico de XRPD para o Hidrato A

Posição [°2Th.]	Intensidade Relativa [%]
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

[068] Em uma modalidade, o Hidrato A de psilocibina cristalina é caracterizado por picos de difratograma de XRPD em 8,9, 12,6 e 13,8 °2θ ± 0,1 °2θ. Em outra modalidade, o Hidrato A de psilocibina cristalina é adicionalmente caracterizado por pelo menos um pico que aparece em 6,5, 12,2, 19,4, 20,4 ou 20,8 °2θ ± 0,1 °2θ. Em outra modalidade, o Hidrato A de psilocibina cristalina é adicionalmente caracterizado por pelo menos dois picos que aparecem em 6,5, 12,2, 19,4, 20,4 ou 20,8 °2θ ± 0,1 °2θ. Ainda em uma modalidade adicional, o Hidrato A de psilocibina cristalina exibe um difratograma de XRPD substancialmente igual ao difratograma de XRPD mostrado na Fig. 7d.

[069] Em uma modalidade, o Hidrato A de psilocibina cristalina é caracterizado por um evento endotérmico em um termograma de DSC com uma temperatura de início entre 205 e 220 ºC, tal como entre 210 e 220 ºC, tal como entre 210 e 218 ºC, ou tal como entre 210 e 216 ºC. Em outra modalidade, o Hidrato A de psilocibina cristalina é adicionalmente caracterizado por um evento endotérmico no

termograma de DSC com uma temperatura de início entre 85 e 105 ºC, ou tal como entre 90 e 100 ºC. Em outra modalidade, o Hidrato A de psilocibina cristalina é caracterizado por um evento endotérmico tendo uma temperatura de início entre 205 e 220 ºC, tal como entre 210 e 220ºC, tal como entre 210 e 218 ºC, ou entre 210 e 216 ºC e um evento endotérmico tendo uma temperatura de início entre 85 e 105 ºC, ou tal como entre 90 e 100ºC, em um termograma de DSC. Em ainda outra modalidade, o Hidrato A de psilocibina cristalina exibe um termograma de DSC substancialmente o mesmo que o termograma de DSC na Fig. 8d.

[070] Em outra modalidade, o Hidrato A de psilocibina cristalina é caracterizado por ter um teor de água entre 10 e 18%, tal como entre 12 e 16%, ou cerca de 13%. O especialista saberia sobre métodos para determinar o teor de água de um composto, por exemplo, Titulação Karl Fischer. Em uma modalidade, o Hidrato A de psilocibina cristalina é caracterizado por ter uma perda de peso no termograma de TGA entre 10 e 18%, tal como entre 12 e 16%, ou cerca de 13%, entre a temperatura ambiente, tal como cerca de 25 ºC e 120 ºC.

[071] Em uma modalidade, o Hidrato A de psilocibina cristalina é uma forma cristalina altamente pura de Hidrato A, por exemplo, a psilocibina compreende pelo menos 90% em peso, tal como 95%, tal como 99%, tal como 99%, tal como 99,5% de Hidrato A.

[072] De acordo com outro aspecto independente da presente invenção, é fornecida uma forma cristalina de psilocibina, Polimorfo B, caracterizada por um ou mais de:

a. picos em um difratograma de XRPD em 11,1, 11,8 e 14,3 °2θ ± 0,1 °2θ;

b. picos em um difratograma de XRPD em 11,1, 11,8 e 14,3 °2θ ± 0,1 °2θ, adicionalmente caracterizado por pelo menos um pico adicional em 14,9, 15,4, 19,3, 20,0 ou 20,6 °2θ ± 0,1 °2θ;

c. um difratograma de XRPD como substancialmente ilustrado na Figura 7c; ou

d. um evento endotérmico em um termograma de DSC com uma temperatura de início entre 205 e 220 ºC substancialmente como ilustrado na Figura 8c.

[073] Em uma modalidade, o Polimorfo B de psilocibina exibe um difratograma de XRPD caracterizado pelo difratograma resumido na Tabela 4. Em uma modalidade, aqui descrito o Polimorfo B de psilocibina cristalina compreende pelo menos 3 picos (± 0,1 °2θ) da Tabela 4. Em uma determinada modalidade, descrita aqui o Polimorfo B de psilocibina cristalina compreende pelo menos 4 picos de (± 0,1 °2θ) da Tabela 4. Em uma certa modalidade, descrita aqui o Polimorfo B de psilocibina cristalina compreende pelo menos 5 picos de (± 0,1 °2θ) de Tabela 4. Em uma certa modalidade, descrita aqui o Polimorfo B de psilocibina cristalina compreendendo pelo menos 8 picos de (± 0,1 °2θ) da Tabela 4. Em uma certa modalidade, descrita aqui o Polimorfo B de psilocibina cristalina compreende pelo menos 10 picos de (± 0,1 °2θ) da Tabela 4.

Tabela 4 Posições de pico de XRPD para Polimorfo B

Posição [°2Th.]	Intensidade Relativa [%]
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

[074] Em uma modalidade, o Polimorfo B de psilocibina cristalina é caracterizado por picos de difratograma de XRPD em 11,1, 11,8 e 14,3 °2θ ± 0,1 °2θ. Em outra modalidade, o Polimorfo B de psilocibina cristalina é adicionalmente caracterizado por pelo menos um pico que aparece em 14,9, 15,4, 19,3, 20,0 ou 20,6 °2θ ± 0,1 °2θ. Em outra modalidade, o Polimorfo B de psilocibina cristalina é adicionalmente caracterizado por pelo menos dois picos que aparecem em 14,9, 15,4, 19,3, 20,0 ou 20,6 °2θ ± 0,1 °2θ. Ainda em uma modalidade adicional, o Polimorfo B de psilocibina cristalina exibe um difratograma de XRPD substancialmente igual ao difratograma de XRPD mostrado na Fig. 7c.

[075] Em uma modalidade, o Polimorfo B de psilocibina cristalina é caracterizado por um evento endotérmico em um termograma de DSC com uma temperatura de início entre 205 e 220 ºC, tal como entre 210 e 220 ºC, tal como entre 210 e 218 ºC, ou tal como entre 210 e 216 ºC. Em ainda outra modalidade, o Polimorfo B de psilocibina cristalina exibe um termograma de DSC substancialmente igual ao termograma de DSC na Fig. 8c.

[076] Em outra modalidade, o Polimorfo B de psilocibina cristalina é caracterizado por ter um teor de água de <0,5% em p/p, tal como <0,4% em p/p, tal como <0,3% em p/p, tal como <0,3% em p/p, tal como <0,2% em p/p, ou tal como <0,1% em p/p. O especialista saberia sobre métodos para determinar o teor de água de um composto, por exemplo, Titulação Karl Fischer. Em uma modalidade, o Polimorfo B de psilocibina cristalina é caracterizado por ter <0,5% em peso, tal como <0,4% em peso, tal como <0,3% em peso, tal como <0,3% em peso, tal como <0,2% em peso, tal como <0,1% em p/p, no termograma de TGA entre a temperatura ambiente, tal como cerca de 25 ºC e 200 ºC. Em uma modalidade, o Polimorfo B de psilocibina cristalina perde menos de 2% em peso em uma perda no Teste de secagem, tal como menos de 1% em peso, tal como menos de 0,5% em peso. O Teste de perda por secagem é realizado a 70 ºC.

[077] Em uma modalidade, o Polimorfo B de psilocibina cristalina é uma forma cristalina altamente pura de Polimorfo B, por exemplo, a psilocibina compreende pelo menos 90% em peso, tal como 95%, tal como 95%, tal como 99%, tal como 99,5% de Polimorfo B.

[078] Em outra modalidade, o Polimorfo B de psilocibina cristalina é quimicamente puro, por exemplo, a psilocibina tem uma pureza química maior do que 97%, tal como maior do que 98%, ou maior do que 99% por HPLC. Em uma modalidade, o Polimorfo B de psilocibina cristalina não tem nenhuma única impureza maior do que 1%, mais preferivelmente menor do que 0,5%, incluindo ácido fosfórico medido por ^{31}P RMN, e psilocina medida por HPLC. Em uma modalidade, o Polimorfo B de psilocibina cristalina possui uma pureza química maior do que 97% em área, ainda mais preferivelmente maior do que 98% em área e mais preferivelmente maior do que 99% em área por HPLC. Em uma modalidade, o Polimorfo B de psilocibina cristalina não tem nenhuma única impureza maior do que 1% em área, mais

preferivelmente menor do que 0,5% em área, conforme medido por HPLC. Em uma modalidade, o Polimorfo B de psilocibina cristalina não contém psilocina a um nível maior do que 1% da área, mais preferivelmente menor do que 0,5% da área, conforme medido por HPLC. Em uma modalidade, o Polimorfo B de psilocibina cristalina não contém ácido fosfórico a um nível maior do que 1% em peso, mais preferivelmente menor do que 0,5% em peso, conforme medido por ^{31}P RMN. Em uma modalidade, o Polimorfo B de psilocibina cristalina tem um ensaio químico de pelo menos 95% em peso, tal como pelo menos 96% em peso, ou tal como pelo menos 98% em peso.

[079] A psilocibina da invenção na forma Polimorfo A ou A' tem as propriedades gerais ilustradas na Tabela 5 abaixo:

Tabela 5

Aparência:	Sólido braço a esbranquiçado
Evento endotérmico principal em DSC (temperatura de início) (correspondente a uma fusão):	210-215°C
Higroscopicidade:	Psilocibina forma Hidrato A em umidade elevada e quando adicionada à agua, mas a água de hidratação é perdida rapidamente na secagem. A forma anidra está portanto sendo desenvolvida.
Forma cristalina:	Polimorfia anidra A e /ou A'
pKa (calculado):	1,74, 6,71, 9,75
Solubilidade	*aprox.* 15 mg/ml em Água

[080] A psilocibina está em conformidade com os espectros, como apresentado na Tabela 6 abaixo e ilustrado nos espectros das Figs 10-13.

Tabela 6

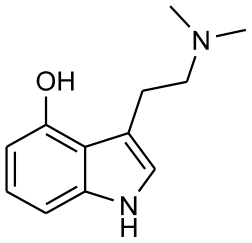
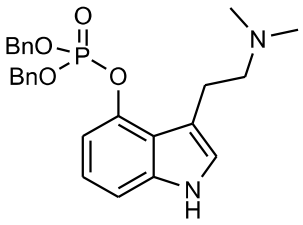
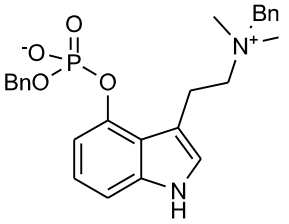
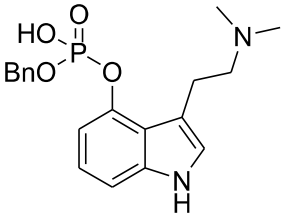
Técnica	Conclusões
Próton (^{1}H) e Carbono (^{13}C) RMN	Atribuição do próton (Fig. 10) e espectros de carbono (Fig. 11) estão em concordância com Psilocibina.

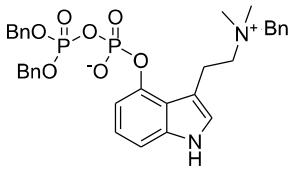
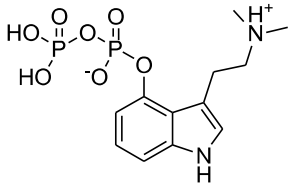
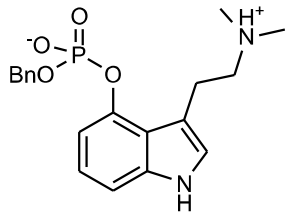
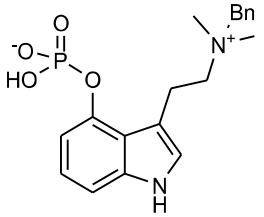
Espectroscopia FT-Infravermelha (FT-IR)	Atribuição do espectro FT-IR (Fig. 12) em concordância com Psilocibina.
Espectroscopia de massa (MS)	Atribuição do espectro de massa (Fig. 13) em concordância com Psilocibina.

[081] A alta pureza é alcançada pelo controle cuidadoso das condições de reação para garantir que as possíveis impurezas orgânicas sejam significativamente reduzidas.

[082] As impurezas conhecidas e potenciais na Psilocibina são mostradas na Tabela 7 abaixo:

Tabela 7

Impureza	Tempo de Retenção Relativa (RRT)	Estrutura	Origem
Psilocina	1,65		Material de partida (Estágio 3). Também gerado pela hidrólise de Psilocibina. Apenas impureza insignificante observada em lotes de psilocibina.
Estágio 4A			Produto inicial formado no na reação do Estágio 4. Converter para o Estágio 4 na agitação em THF. Converter para Psilocibina no Estágio 5.
Estágio 4	2,74		Intermediário
Estágio 4 N-Denzilado			Identificado por MS no Estágio 4. Converter para Psilocibina no Estágio 5.

Estágio 4 Impureza de anidrido			Identificado por MS no Estágio 4. Converter para Estágio 5 impureza de ácido pirofosfórico no Estágio 5.
Estágio 5 Impureza de ácido pirofosfó-rico			Identificado por MS Formado a partir do anidro do Estágio 4. Removido na recristalização do Estágio 6 por uma combinação de hidrólise para Psilocibina e solubilidade aumentada devido ao grupo fosfato extra.
Estágio 5 (intermedi-ários)	1,89 e 2,45	 	2 Intermediários são formados durante a hidrogenação. Esses subsequentemente convertidos para produto (estruturas baseadas em química). Monitorados e controlados na reação do Estágio 5.

[083] Da mesma forma, o processamento cuidadoso garante que os níveis de solvente sejam mantidos abaixo dos níveis, conforme indicado na Tabela 8.

Tabela 8

Solvente	Controlado para	Solvente de Estágio Químico é usado em
Metanol	3000ppm	Estágio 5
Etanol	5000ppm	Estágio 5
THF	720ppm	Estágio 4
Tolueno	890ppm	Gerado como um subproduto no Estágio 5

[084] Através da seleção cuidadosa da metodologia operacional, a substância do medicamento psilocibina da invenção atende aos critérios de aceitação estabelecidos na Tabela 9 abaixo:

Tabela 9

Atributo de qualidade	Critérios de aceitação	Método de Teste
1. Aparência	Apenas para informação	Visual
2. Identidade por ^{1}H RMN	Comparar poços com referência. Fig. 10	^{1}H RMN
3. Identidade por ^{13}C RMN	Comparar poços com referência. Fig. 11	^{13}C RMN
4. Identidade por MS	Comparar poços com referência. Fig. 12	MS
5. Identidade por FT-IR	Comparar poços com referência. Fig. 13	FT-IR
6. Perda na secagem	NMT 2% em p/p	Farmacopeia europeia 2.2.32
7. Resíduo em ignição	NMT 0,5% em p/p	Farmacopeia US <281 >
8. Pureza química	NLT 97 % em área	HPLC
9. Impurezas relacionadas a fármaco	Nenhuma única impureza NMT 1.0 % em área	HPLC
10. Ensaio (em uma base seca)	95-103 % em peso	HPLC
11. Teor de solvente residual	Metanol NMT 3000ppm Etanol NMT5000ppm THF NMT 720ppm Tolueno NMT 890ppm	HRGC
12. Teor de ácido fosfórico	NMT 1% em p/p	^{31}P RMN

13. Análise elementar por ICP-MS	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	Farmacopeia US <233>
14. Polimorfismo	Em conformidade com referência Fig. 7a	XRPD
15. Ponto de fusão	Resultado de relatório Fig. 8a	DSC

Abreviações usadas na tabela: NMT = não mais que, NLT = não menos que.

[085] A metodologia usada para verificar a pureza é fornecida na descrição detalhada.

[086] De fato, os critérios 6-13 são muito excedidos na prática, conforme observado na Tabela 10 abaixo:

Tabela 10

Atributo de qualidade	Critérios de aceitação	Tipicamente	Método de Teste
1. Perda na secagem		Tipicamente menor do que 1% em p/p	Farmacopeia europeia 2.2.32
2. Resíduo na ignição		Tipicamente menor do que 0,2% em p/p	US Farmacopeia <281>
3. Pureza química		Tipicamente NLT 99%	HPLC

4. Pureza relacionada a fármaco	Nenhuma única impureza NMT 1,0%	RRT 1,49: 0,06% RRT 1,69 (Psilocina): 0,39% RRT 1,70: 0,05% Outros LT 0,05%: 0,22%	HPLC
5. Ensaio (em uma base seca)	95 - 103	98,65%	HPLC
6. Teor de solvente residual	Metanol NMT 3000ppm Etanol NMT 5000ppm THF NMT 720ppm Tolueno NMT 890ppm	NMT 5 ppm NMT 10 ppm NMT 5 ppm NMT 5 ppm	HRGC
7. Teor de ácido fosfórico	NMT 1% em p/p	0,2% Ausência de ácido fosfórico (H_3PO_4) que vem para aprox. 0ppm	^{31}P RMN
8. Análise elementar por ICP-MS	Cd NMT 1,5ppm Pb NMT 1,5ppm As NMT 4,5ppm Hg NMT 9,0ppm Co NMT	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	Farmacopeia US <233 >

	15ppm V NMT 30ppm Ni NMT 60ppm Li NMT 165ppm Pd NMT 30ppm		

Abreviações usadas na tabela: NMT = não mais que, LT = menor do que.

[087] Assim, a psilocibina cristalina, na forma Polimorfo A ou Polimorfo A', possui espectros em conformidade com RMN de Próton (^{1}H) e Carbono (^{13}C), Espectroscopia de FT-infravermelho (FT-IR) e Espectroscopia de Massa (MS)- Fig. 10 -13.

[088] Também está em conformidade com qualquer um dos critérios especificados na Tabela 9 ou na Tabela 10.

[089] De acordo com um segundo aspecto da presente invenção, é fornecido um lote de psilocibina cristalina, na forma Polimorfo A ou Polimorfo A' de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção. Em uma modalidade, é fornecido um lote de psilocibina cristalina, Polimorfo A ou Polimorfo A', compreendendo pelo menos 10 g, mais preferivelmente pelo menos 100 g, e mais preferivelmente pelo menos 250 g. Em uma modalidade, é fornecido um lote de psilocibina cristalina, Polimorfo A ou Polimorfo A', compreendendo pelo menos 10 g, mais preferivelmente pelo menos 100 g, e mais preferivelmente pelo menos 250 g. Em uma modalidade, é fornecido um lote de psilocibina de alta pureza compreendendo pelo menos 10 g, mais preferivelmente pelo menos 100 g, e mais preferivelmente pelo menos 250 g. Em uma modalidade, é fornecido um lote de Polimorfo A de psilocibina de alta pureza compreendendo pelo menos 10 g, mais preferivelmente pelo menos 100 g, e mais preferivelmente pelo menos 250 g. Em uma modalidade, é fornecido um lote de Polimorfo A' de psilocibina de alta pureza compreendendo pelo menos 10 g, mais preferivelmente pelo

menos 100 g, e mais preferivelmente pelo menos 250 g.

[090] Alternativamente, e independentemente, a psilocibina cristalina pode assumir a forma de Hidrato A ou Polimorfo B.

[091] De acordo com um terceiro aspecto da presente invenção, é fornecida uma formulação farmacêutica compreendendo psilocibina cristalina e um ou mais excipientes.

[092] Em uma modalidade, é fornecida uma formulação farmacêutica compreendendo psilocibina de alta pureza e um ou mais excipientes. Em outra modalidade, é fornecida uma formulação farmacêutica compreendendo Polimorfo A de psilocibina cristalina e um ou mais excipientes. Em outra modalidade, é fornecida uma formulação farmacêutica compreendendo Polimorfo A' de psilocibina cristalina e um ou mais excipientes. Em outra modalidade, é fornecida uma formulação farmacêutica compreendendo psilocibina cristalina de alta pureza, Polimorfo A ou Polimorfo A', e um ou mais excipientes. Em outra modalidade, é fornecida uma formulação farmacêutica compreendendo Polimorfo A de psilocibina cristalina de alta pureza e um ou mais excipientes. Em outra modalidade, é fornecida uma formulação farmacêutica compreendendo Polimorfo A' de psilocibina cristalina de alta pureza e um ou mais excipientes.

[093] Alternativamente, e independentemente, a psilocibina cristalina na formulação pode assumir a forma de Hidrato A ou Polimorfo B.

[094] Os excipientes farmacêuticos preferidos para uma formulação oral incluem: diluentes, tais como celulose microcristalina, amido, manitol, hidrogenofosfato de cálcio anidro ou comisturas de dióxido de silício, carbonato de cálcio, celulose microcristalina e talco; desintegrantes, tal como amido glicolato de sódio ou croscarmelose sódica; aglutinantes, tais como povidona, co-povidona ou hidroxilpropil celulose; lubrificantes, tais como estearato de magnésio ou

estearilfumurato de sódio; agentes deslizantes, tais como dióxido de silício coloidal; e películas, tais como Opadry II branco ou Opadry II marrom à base de PVA.

[095] A psilocibina é um ativo difícil de formular por várias razões. Em primeiro lugar, apresenta características de fluxo fracas e, em segundo lugar, é usada em doses relativamente baixas, o que torna difícil garantir a uniformidade do teor em comprimidos.

[096] Uma boa mistura terá um Valor de Aceitação, um valor AV menor do que 15 e, mais preferivelmente, menor do que 10.

[097] Também terá uma exigência de % de Rótulo maior do que 90%, preferivelmente maior do que 94%.

[098] Entre eles, estes parâmetros indicam uma dose consistente da psilocibina entre os comprimidos.

[099] Para a maioria dos comprimidos farmacêuticos, excipientes padrão, particularmente cargaes podem ser usados. No entanto, no decurso da formulação de comprimidos de psilocibina, o requerente constatou que, para obter um produto satisfatório, era preferível um agente de carga não padrão.

[100] A este respeito, uma carga funcional foi selecionada. A carga funcional era um material de carga silicificado, preferivelmente uma celulose microcristalina silicificada. As formas preferidas compreendem graus de alta compactação com uma faixa de tamanho de partícula de cerca de 45 a 150 mícrons.

[101] De fato, uma mistura de dois cargaes funcionais com diferentes faixas de tamanho de partícula pode ser usada com as porcentagens em peso das duas favorecendo as partículas de tamanho maior.

[102] Em uma modalidade, a carga microcristalina silicificada pode compreender uma primeira carga, com uma faixa de tamanho de partícula de cerca de 45 a 80 mícrones em uma quantidade de até 30%,

mais preferivelmente até 20%, ainda mais preferivelmente até 15% ou menos e um segundo carga, com uma faixa de tamanho de partícula de cerca de 90 a 150 mícrons, em uma quantidade de até 70%, mais preferivelmente até 80, e ainda mais preferivelmente até 85% ou mais, em peso.

[103] A formulação pode ainda compreender ou consistir em um desintegrante, preferivelmente amido glicolato de sódio, um glidante, preferivelmente dióxido de silício coloidal e um lubrificante, preferivelmente estearil fumarato de sódio.

[104] Detalhes adicionais do desenvolvimento da formulação são fornecidos no Exemplo12.

[105] Deve-se notar que as formulações podem compreender psilocibina de qualquer forma, não apenas as formas polimórficas preferidas divulgadas.

[106] Studerus et al (2011) J Psychopharmacol 25 (11) 1434-1452 classificaram doses orais de psilocibina da seguinte forma: Doses muito baixas em 0,045 mg.kg; doses baixas entre 0,115-0.125 mg/kg, doses médias entre 0,115-0,260 mg/kg e doses altas em 0,315 mg/kg.

[107] A psilocibina estaria tipicamente presente em uma dose formulada em uma quantidade de 0,01 mg/kg a 1 mg/kg. Uma dose humana típica (para um adulto com peso entre 60 e 80 kg) seria equivalente a uma dose entre 0,60 mg e 80 mg. Em uma modalidade, entre 2 e 50 mg de psilocibina cristalina, mais preferivelmente Polimorfo A ou Polimorfo A', está presente em uma dose formulada, tal como entre 2 e 40 mg, tal como entre 2 e 10 mg, tal como 5 mg, tal como entre 5 e 30 mg, tal como entre 5 e 15 mg, tal como 10 mg, tal como entre 20 e 30 mg ou 25 mg. Em uma modalidade, entre 2 e 50 mg de psilocibina cristalina, particularmente Polimorfo A, está presente em uma dose formulada, tal como entre 2 e 40 mg, tal como entre 2 e 10 mg, tal como entre 2 e 10 mg, tal como 5 mg, tal como entre 5 e 30 mg, tal como entre

5 e 15 mg, tal como 10 mg, tal como entre 20 e 30 mg ou 25 mg. Em uma modalidade, entre 2 e 50 mg de psilocibina cristalina, particularmente Polimorfo A', está presente em uma dose formulada, tal como entre 2 e 40 mg, tal como entre 2 e 10 mg, tal como entre 2 e 10 mg, tal como 5 mg, tal como entre 5 e 30 mg, tal como entre 5 e 15 mg, tal como 10 mg, tal como entre 20 e 30 mg ou 25 mg.

[108] É provável que doses orais favorecidas de adultos estejam na faixa de 1 mg a 40 mg, preferivelmente 2 a 30 mg, mais preferivelmente 15 a 30 mg, por exemplo 5 mg, 10 mg ou 25 mg. A microdosagem, tipicamente em cerca de um décimo dessas doses, também é possível com formulações de microdose tipicamente situadas na faixa de 0,05 mg a 2,5 mg.

[109] Uma formulação farmacêutica preferida é uma forma de dosagem oral.

[110] A forma de dosagem oral pode ser um comprimido ou uma cápsula.

[111] Para um comprimido, é necessário poder dispersar com precisão o ativo. Isso é desafiador devido às baixas doses e à natureza higroscópica e pegajosa do ativo que limita sua fluidez.

[112] A psilocibina estará presente juntamente com um ou mais excipientes. Os excipientes preferidos incluem celulose microcristalina e amido, mais particularmente ainda uma celulose microcristalina silicificada.

[113] De acordo com um quarto aspecto da presente invenção, é fornecida a psilocibina cristalina na forma Polimorfo A ou Polimorfo A' de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção para uso em medicina. Em uma modalidade, é fornecido Polimorfo A de psilocibina cristalina para uso em medicina. Em uma modalidade, é fornecido o Polimorfo A de psilocibina cristalina para uso em medicina. Em uma modalidade, é fornecido um Polimorfo A de psilocibina cristalina de alta

pureza para uso em medicina. Em uma modalidade, é fornecido um Polimorfo A' de psilocibina cristalina de alta pureza para uso em medicina.

[114] Alternativamente, e independentemente, a psilocibina cristalina pode assumir a forma de Hidrato A ou Polimorfo B.

[115] De acordo com um quinto aspecto da presente invenção, é fornecida psilocibina cristalina na forma Polimorfo A ou Polimorfo A' do primeiro aspecto da presente invenção para uso no tratamento de transtornos do sistema nervoso central.

[116] Alternativamente, e independentemente, a psilocibina cristalina pode assumir a forma de Hidrato A ou Polimorfo B.

[117] Em uma modalidade, é fornecida psilocibina cristalina, Polimorfo A ou Polimorfo A', para uso no tratamento da depressão. Em uma modalidade, é fornecida psilocibina cristalina, Polimorfo A ou Polimorfo A', para uso no tratamento de depressão resistente a fármaco. Em uma modalidade, é fornecido o Polimorfo A de psilocibina cristalina para uso no tratamento de depressão resistente a fármaco. Em uma modalidade, é fornecido Polimorfo A' de psilocibina cristalina para uso no tratamento de depressão resistente a fármaco. Em uma modalidade, é fornecido um Polimorfo A de psilocibina cristalina de alta pureza para uso no tratamento de depressão resistente a fármaco. Em uma modalidade, é fornecido um Polimorfo A' de psilocibina cristalina de alta pureza para uso no tratamento de depressão resistente a fármaco.

[118] Outras condições que podem ser tratadas incluem: transtornos de ansiedade, incluindo ansiedade em doenças em Estágio avançado, por exemplo, câncer, bem como Transtorno de Ansiedade Generalizada, Depressão, incluindo Transtorno Depressivo Maior, Dores de Cabeça em Cluster, Transtorno Obsessivo-Compulsivo, Transtornos de Personalidade, incluindo Transtorno de Conduta, Transtornos de Fármacos, incluindo: dependência de álcool,

dependência de nicotina, dependência de opioides, dependência de cocaína e outros vícios, incluindo Transtorno de Jogo, Transtorno de Alimentação e Transtorno Dismórfico Corporal. Uma condição adicional é o tratamento da dor.

[119] De acordo com um sexto aspecto da presente invenção, é fornecido um método para o tratamento de transtornos do sistema nervoso central, compreendendo a administração a um indivíduo em necessidade de uma dose eficaz de psilocibina cristalina na forma Polimorfo A ou Polimorfo A' de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção.

[120] Em uma modalidade, é fornecido um método de tratamento da depressão, compreendendo a administração a um objeto em necessidade do mesmo de uma dose eficaz de psilocibina cristalina na forma de Polimorfo A ou Polimorfo A'. Em uma modalidade, é fornecido um método para tratar a depressão resistente a fármaco, compreendendo a administração a um objeto em necessidade do mesmo de uma dose eficaz de psilocibina cristalina na forma Polimorfo A ou Polimorfo A'. Em uma modalidade, é fornecido um método de tratamento da depressão resistente a fármaco, compreendendo a administração a um objeto em necessidade do mesmo de uma dose eficaz de Polimorfo A de psilocibina. Em uma modalidade, é fornecido um método de tratamento da depressão resistente a fármaco, compreendendo a administração a um objeto em necessidade do mesmo de uma dose eficaz de Polimorfo A' de psilocibina. Em uma modalidade, é fornecido um método de tratamento da depressão resistente a fármaco, compreendendo a administração a um objeto em necessidade do mesmo de uma dose eficaz de um Polimorfo A de psilocibina cristalina de alta pureza. Em uma modalidade, é fornecido um método de tratamento de depressão resistente a fármaco, compreendendo a administração a objeto em necessidade do mesmo

de uma dose eficaz de um Polimorfo A' de psilocibina cristalina de alta pureza.

[121] Alternativamente, e independentemente, a psilocibina cristalina pode assumir a forma de Hidrato A ou Polimorfo B.

[122] Para produzir a psilocibina da invenção, a psilocibina foi cristalizada a partir de água de uma maneira controlada.

[123] De acordo com um sétimo aspecto da presente invenção, é fornecido um método para a fabricação em larga escala de psilocibina, caracterizado pelo fato de que o método compreende submeter a psilocibina a uma etapa de cristalização da água, com secagem controlada, para produzir Polimorfo A de psilocibina cristalina de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção.

[124] Em uma modalidade, é fornecido um método para a fabricação em larga escala de psilocibina, caracterizado pelo fato de que o método compreende submeter a psilocibina a uma etapa de cristalização da água, com secagem controlada, ao Polimorfo A de psilocibina cristalina produzido com um difratograma de XRPD, tal como ilustrado na Fig. 7a e Termógrafo de DSC e TGA, tal como ilustrado na Fig. 8a. Em uma modalidade, é fornecido um método para a fabricação em larga escala de psilocibina, caracterizado pelo fato de que o método compreende submeter a psilocibina a uma etapa de cristalização da água, com secagem controlada, para produzir uma psilocibina cristalina de alta pureza - Polimorfo A com um difratograma de XRPD, tal como ilustrado em A Figura 7a e um termógrafo de DSC, tal como ilustrado na Figura 8a.

[125] Preferivelmente, o Polimorfo A é uma variante isoestrutural com um difratograma de XRPD como ilustrado na Fig. 7a e um termógrafo de DSC como ilustrado na Fig. 8a.

[126] Mais preferivelmente, a psilocibina é recristalizada em tipicamente cerca de 10 a 20 volumes de água, aquecida com agitação

a uma temperatura de pelo menos 70ºC, polida filtrada com um corte adequado (normalmente, abaixo de 5 µm), semeada a uma temperatura de cerca de 70ºC, e resfriada de maneira controlada a cerca de 5ºC por um período de mais de 2 horas.

[127] Mais preferivelmente, o método compreende um resfriamento controlado que reduz a temperatura em cerca de 5ºC a 15ºC por hora, mais preferivelmente em cerca de 10 ºC por hora.

[128] Preferivelmente, a etapa do filtro de polimento é realizada através de um filtro de tamanho apropriado, tal como um filtro de linha de 1,2 µm.

[129] Preferivelmente, a agitação é agitada a cerca de 400-500 rpm, tipicamente cerca de 450 rpm.

[130] Preferivelmente, a semente é o Hidrato A de psilocibina. Em uma modalidade, 0,1% em peso ou menos de semente é adicionado ao processo.

[131] Preferivelmente, a psilocibina cristalina é isolada por filtração a vácuo.

[132] Em uma modalidade, os cristais isolados são secos sob vácuo a uma temperatura de pelo menos 30ºC, tal como entre 30 e 50ºC, ou tal como entre 40 e 50ºC. Em uma modalidade, os cristais isolados são secos sob vácuo por pelo menos 10 horas, tal como entre 12 e 18 horas, ou cerca de 30 horas. Em uma modalidade, os cristais isolados são secos no vácuo a uma temperatura de pelo menos 30 ºC, tal como entre 30 e 50 ºC, ou entre 40 e 50 ºC, por pelo menos 10 horas, tal como entre 12 e 18 horas, ou cerca de 30 horas. Em uma modalidade, os cristais isolados são secos até que os cristais isolados percam menos de 2% em peso em um Teste de perda na secagem, tal como menos que 0,5% em peso.

[133] Preferivelmente, os cristais isolados são lavados, várias vezes, em água e secos sob vácuo a cerca de 50 ºC por pelo menos 12

horas.

[134] Os cristais obtidos são tipicamente relativamente grandes (faixa de 50 a 200 mícrons) e uniformes quando vistos sob o microscópio x 10, conforme ilustrado na Fig. 16a.

[135] Isso difere dos cristais obtidos sem resfriamento controlado, que são muito menores em tamanho (geralmente de 5 a 50 mícrons) quando vistos ao microscópio x 10, conforme ilustrado na Fig. 16b.

[136] De acordo com um oitavo aspecto da presente invenção, é fornecida psilocibina de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção obtida pelo método de cristalização da invenção.

[137] De acordo com um nono aspecto da presente invenção, é fornecida uma formulação farmacêutica compreendendo psilocibina de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção obtida pelo método de cristalização da invenção.

[138] A psilocibina fabricada antes da cristalização pode ser produzida utilizando qualquer método: sintético ou biológico, por exemplo, por fermentação ou obtida por extração de cogumelos.

[139] Os métodos de fabricação preferidos usam psilocina, ou 4 hidroxi-indol, tal como material de partida.

[140] De acordo com um décimo aspecto da presente invenção, é fornecido um método para a fabricação em larga escala de psilocibina a partir de psilocina, compreendendo as etapas de:

i) Estágio 4 - Reação de psilocina com tetrabenzilpirofosfato para formar fosfato de benzil 3-[2-(benzildimetilazaniumil)etil]-1H-indol-4-ila; e

ii) Estágio 5 - Reação de fosfato de benzil 3-[2-(benzildimetilazaniumil)etil]-1H-indol-4-ila com hidrogênio para formar psilocibina.

[141] De acordo com um décimo primeiro aspecto da presente invenção, é fornecido um método para a fabricação em larga escala de

psilocibina a partir de 4-hidróxi-indol compreendendo as etapas de:

i) Estágio 1 - Reação de 4-hidróxi-indol com anidrido acético para formar acetato de 1H-indol-4-ila;

ii) Estágio 2 - Reação do acetato de 1H-indol-4-ila com cloreto de oxalila e dimetilamina para formar 3[(dimetilcarbamoil)carbonil]-1H-indol-4il-acetato;

iii) Estágio 3 - Reação de 3[(dimetilcarbamoil)carbonil]-1H-indol-4il-acetato com hidreto de alumínio e lítio para formar psilocina;

iv) Estágio 4 - Reação de psilocina com tetrabenzilpirofosfato para formar fosfato de benzil 3-[2-(benzildimetilazaniumil)etil]-1H-indol-4-ila; e

v) Estágio 5 - Reação de fosfato de benzil 3-[2-(benzildimetilazaniumil)etil]-1H-indol-4-ila com hidrogênio para formar psilocibina.

[142] De acordo com um décimo segundo aspecto da presente invenção, é fornecido um método para a fabricação em larga escala de psilocibina, de acordo com o décimo ou décimo primeiro aspecto da presente invenção, adicionalmente compreendendo:

vi) Estágio 6 - uma etapa de cristalização da água, com secagem controlada, para produzir Polimorfo A de psilocibina cristalina de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção.

[143] Em uma modalidade, é fornecido um método para a fabricação em larga escala de psilocibina, de acordo com o décimo ou décimo primeiro aspecto da presente invenção, adicionalmente compreendendo:

vi) Estágio 6 - uma etapa de cristalização da água, com secagem controlada, para produzir psilocibina cristalina - Polimorfo A com um difratograma de XRPD como substancialmente ilustrado na Fig. 7a e um termógrafo de DSC como substancialmente ilustrado na Figura 8a.

[144] Em uma modalidade, é fornecido um método para a fabricação em larga escala de psilocibina, de acordo com o décimo ou décimo primeiro aspecto da presente invenção, adicionalmente compreendendo:

vi) Estágio 6 - uma etapa de cristalização da água, com secagem controlada, para produzir uma psilocibina cristalina de alta pureza - Polimorfo A com um difratograma de XRPD, tal como ilustrado na Fig. 7a, e um termógrafo de DSC, tal como ilustrado na Figura 8a.

[145] Preferivelmente, a psilocibina cristalina é o Polimorfo A.

[146] No desenvolvimento de metodologia para a produção em larga escala de psilocina ou psilocibina, a Requerente superou um ou mais problemas significativos em cada uma das etapas 1 a 5, e embora esses problemas sejam considerados no contexto da produção em larga escala de psilocina ou psilocibina a cada etapa, ou antes, o modo como cada problema foi superado é considerado invenções separadas e independentes, pois têm aplicação na fabricação de outros ativos, sejam intermediários à psilocina, psilocibina ou outros derivados, sais, ésteres ou similares que fornecem uma profármaco.

[147] Preferivelmente, a reação do Estágio 4 (i) compreende o uso de hexametildisilazida de sódio (NaHMDS).

[148] Isso tem os benefícios sobre o uso de butil lítio, pois: i) é mais fácil de manusear e ii) não introduz lítio na reação que causa problemas no processamento a jusante.

[149] Preferivelmente, a reação utiliza o solvente THF.

[150] Isso tem o benefício de que o produto resultante é obtido com uma pureza significativamente mais alta.

[151] Preferivelmente em (i) a reação é iniciada abaixo de -50 ºC.

[152] Isso tem o benefício de reduzir os níveis de impurezas (m/z 295.2 observado por LCMS) que subsequentemente afetarão a pureza a jusante.

[153] Ainda mais preferivelmente, a etapa do Estágio 4 (ii) utiliza THF como solvente.

[154] Isso tem o benefício de garantir que o espessamento seja evitado e facilita um processo simples de extração para obter o produto.

[155] Preferivelmente, a etapa do Estágio 4 (ii) compreende um processo de agitação para obter fosfato de benzil 3-[2-(benzildimetilazanililil)etil]-1H-indol-4-ila.

[156] Um processo de agitação tem a vantagem de que o processo é simplificado e os rendimentos são aprimorados.

[157] Para garantir que a reação do Estágio 4 (ii) seja concluída até a conclusão, os níveis do Intermediário 4A são monitorados e, após a conclusão, o fosfato de benzil 3-[2-(benzildimetilazaniumil)etil]-1H-indol-4-ila é filtrado e forno seco.

[158] Isso tem a vantagem de minimizar as impurezas e obter um produto mais puro

[159] Preferivelmente, a reação do Estágio 5 é monitorada quanto aos níveis de intermediários por HPLC, usando tempos de retenção relativos (RRT) e a conclusão é determinada pelos intermediários presentes em menos de 0,2%.

[160] A psilocibina bruta (produto do Estágio 5, (12)) possui impurezas no Estágio 5, cujos tempos de retenção relativo (TRS) no método HPLC são de cerca de 1,89 e 2,45, respectivamente, e psilocina (RRT 1,66). Essas impurezas são ilustradas na Tabela 7. Tipicamente, a psilocibina bruta (produto do Estágio 5 (12)) possui 0,24% em área da impureza RRT 1,89, 0,03% em área da impureza RRT 2,45 e 1,86% em área de psilocina. Além disso, a impureza do ácido pirofosfórico (RRT 0,31) está presente no estado bruto da psilocibina, por exemplo, a um nível de cerca de 2-6% em área por HPLC.

[161] Neste nível, os processos subsequentes de cristalização podem ser conduzidos para fornecer psilocibina substancialmente pura,

por exemplo, psilocibina com uma pureza de pelo menos 95% em área por HPLC, tal como pelo menos 98% em área ou em pelo menos 99% em área. Em uma modalidade, a impureza do ácido pirofosfórico (RRT 0,31) está presente na psilocibina substancialmente pura a um nível menor do que 0,3 % em área por HPLC, tal como menos que 0,2 % em área, ou como menos que 0,1% em área.

[162] Além disso, durante este Estágio, água é adicionada à reação para manter a psilocibina em solução.

[163] Preferivelmente o catalisador é recuperado por filtração.

[164] Preferivelmente no Estágio 1, a reação é conduzida em DCM e piridina.

[165] Isso tem a vantagem de evitar solventes inflamáveis.

[166] Preferivelmente, a mistura de reação é lavada com ácido cítrico, para dar um pH de cerca de 2-3, para remover o excesso de piridina, e o fase ácida é separada da fase de DCM.

[167] Isto tem a vantagem de o Intermediário 2A poder ser isolado, permitindo a purificação do excesso de cloreto de oxalila.

[168] Mais preferivelmente A fase de DCM é posteriormente lavada com bicarbonato de sódio a pH 8.

[169] Isso tem a vantagem de um processamento mais puro.

[170] Preferivelmente, o acetato de 1H-indol-4-ila é precipitado em heptano.

[171] Isso ajuda na precipitação e supera problemas de solubilidade parcial.

[172] Preferivelmente, sulfato de magnésio é usado como um agente de secagem.

[173] Preferivelmente, os solventes terc-butilmetil éter (TBME) e tetra-hidrofurano (THF) são utilizados.

[174] Preferivelmente, a reação com cloreto de oxalila é conduzida a cerca de 30ºC - 40 ºC.

[175] Isso tem a vantagem de garantir uma alta taxa de reação, proporcionando melhores níveis de conclusão.

[176] Preferivelmente, o Intermediário 2A é isolado por filtração.

[177] Isto tem a vantagem de que o intermediário é purificado longe do excesso de cloreto de oxalila.

[178] Preferivelmente no Estágio 2, a etapa i do Intermediário 2A também é lavada para remover o excesso de cloreto de oxalila.

[179] Preferivelmente, o Intermediário 2A é lavado com TBME.

[180] Preferivelmente, uma adição de heptano é feita para adicionalmente precipitar o Intermediário 2A.

[181] Preferivelmente na no Estágio 2, etapa ii, a dimetilamina é usada em excesso.

[182] Isso tem a vantagem de obter um perfil e um rendimento de impureza muito melhorados.

[183] Preferivelmente, o pH é mantido em pH igual ou maior do que 7.

[184] Preferivelmente a reação é realizada em TBME.

[185] Preferivelmente, esta etapa compreende ainda uma etapa de purificação que remove os sais de dimetilamina.

[186] Isso tem a vantagem de melhorar a pureza.

[187] Preferivelmente, esta etapa compreende uma pasta fluida e uma etapa de filtração.

[188] Isso tem a vantagem de melhorar o manuseio e a pureza.

[189] Mais preferivelmente, compreende pasta fluida com água e/ou IPA, filtragem e secagem de 3[(dimetilcarbamoil)carbonil]-1H-indol-4il-acetato isolado.

[190] Isto tem a vantagem de que a pureza e os rendimentos são melhorados e a hidrólise reduzida.

[191] Preferivelmente, no Estágio 3, a reação é conduzida no solvente THF.

[192] Isto tem a vantagem de formar uma suspensão/emulsão sem espessamento.

[193] Preferivelmente, o 3[(dimetilcarbamoil)carbonil]-1H-indol-4il-acetato é adicionado a uma solução de LiAlH4 em THF.

[194] Preferivelmente, a reação é arrefecida bruscamente com acetona, seguida de ácido cítrico, garantindo que a mistura permaneça fortemente básica (pH 11 ou superior).

[195] Isso tem a vantagem de obter altos rendimentos.

[196] Preferivelmente, a psilocina é filtrada e lavada em THF e misturada com PrOAc: TBME, filtrada, lavada em TBME e seca.

[197] Isto tem a vantagem de obter um produto de alta pureza, por exemplo, pelo menos 95% puro por HPLC, tal como pelo menos 98% puro por HPLC, ou como pelo menos 99% puro por HPLC.

[198] O método de produção preferido compreende cada um dos Estágios 1 a 6, mas será apreciado que cada um dos recursos de cada Estágio possa ser autônomo ou ser usado em combinação com qualquer outro recurso da mesma ou de uma etapa diferente da reação.

[199] Psilocibina de uma determinada forma, Polimorfo A ou Polimorfo A', e psilocibina de tal alta pureza não foram obtidas anteriormente, e para as Requerentes, conhecer sua produção de Polimorfo A e Polimorfo A' particularmente (como ilustrado nas Figuras 7a e 7b e 8a e 8b) é novidade. De fato, a produção de grandes quantidades de lotes de Polimorfo A é novidade. Uma consequência da metodologia de cristalização da invenção e, em parte, do processo de fabricação permite obter uma tal uma pureza química alta da psilocibina cristalina.

[200] Além disso, dada a natureza instável do composto, eles obtiveram uma forma cristalina que mostraram ser estáveis, sob condições aceleradas (descritas mais adiante) por pelo menos 12 meses.

[201] O Polimorfo A e A' (Fig. 7a e 7b) difere do Polimorfo B (fig. 7c), um Hidrato A (fig. 7d) e solvato de etanol (fig. 7e) e mistura (fig. 7f (superior)), tal como será aparente em seus difratogramas de XRPD e termógrafos de DSC - conforme descrito a seguir.

[202] A relação entre os diferentes polimorfos é mostrada na Figura 9.

[203] De fato, o tamanho e a forma dos cristais são determinados pela metodologia de cristalização, e estes, por sua vez, podem afetar a estabilidade e a capacidade de formular o produto.

[204] Em uma modalidade particularmente preferida, a psilocibina é fabricada através de um processo de 6 Estágios, conforme descrito abaixo:

[205] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um método para a fabricação de psilocibina cristalina de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção, caracterizado pelo fato de que o método compreende submeter a psilocibina a uma etapa de cristalização da água, com secagem controlada, para produzir Polimorfo A ou Polimorfo A' de psilocibina cristalina de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção. Em uma modalidade, é fornecido um método para a fabricação de psilocibina cristalina de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção, caracterizado pelo fato de que o método compreende uma etapa de cristalização em água, com secagem controlada, para produzir psilocibina cristalina - Polimorfo A ou Polimorfo A' com um difratograma de XRPD como substancialmente ilustrado na Fig. 7a ou Fig. 7b e um termógrafo de DSC como substancialmente ilustrado nas Fig. 8a ou 8b. Em uma modalidade, é fornecido um método para a fabricação de psilocibina de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção caracterizado pelo fato de que o método compreende uma etapa de cristalização da água, com secagem controlada, para produzir uma psilocibina cristalina de

alta pureza - Polimorfo A ou Polimorfo A' com um difratograma de XRPD, tal como ilustrado na Figura 7a ou Figura 7b, e um termógrafo de DSC como ilustrado na figura 8a ou na figura 8b.

[206] Preferivelmente, o Polimorfo A e o Polimorfo A' são variantes isoestruturais com difratogramas de XRPD, tal como substancialmente ilustrado na Fig. 7a e na Figura 7b e termógrafos de DSC, tal como substancialmente ilustrado na Figura 8a e na Figura 8b.

[207] Mais preferivelmente, a psilocibina é recristalizada em cerca de 10 a 20 volumes de água, aquecida com agitação a uma temperatura de pelo menos 70 ºC, filtrada com polimento com um corte adequado (normalmente, abaixo de 5 µm), semeada a uma temperatura de cerca de 70ºC, e resfriada de maneira controlada a cerca de 5 ºC por um período de mais de 2 horas.

[208] Mais preferivelmente, o método compreende um resfriamento controlado que reduz a temperatura em cerca de 5 ºC a 15ºC por hora, mais preferivelmente em cerca de 10 ºC por hora.

[209] Preferivelmente, a etapa do filtro de polimento é realizada através de um filtro de tamanho apropriado, tal como um filtro de linha de 1,2 µm ou 0,45 µm.

[210] Preferivelmente, a agitação é agitada a cerca de 400-500 rpm, tipicamente cerca de 450 rpm.

[211] Preferivelmente, a semente é o Hidrato A de psilocibina. Em uma modalidade, 0,1% em peso ou menos de semente é adicionado ao processo.

[212] Preferivelmente, a psilocibina cristalina é isolada por filtração a vácuo.

[213] Em uma modalidade, os cristais isolados são secos sob vácuo a uma temperatura de pelo menos 30ºC, tal como entre 30 e 50ºC, ou tal como entre 40 e 50ºC. Em uma modalidade, os cristais isolados são secos sob vácuo por pelo menos 10 horas, tal como entre

12 e 18 horas, ou cerca de 30 horas. Em uma modalidade, os cristais isolados são secos no vácuo a uma temperatura de pelo menos 30 ºC, tal como entre 30 e 50 ºC, ou entre 40 e 50 ºC, por pelo menos 10 horas, tal como entre 12 e 18 horas, ou cerca de 30 horas. Em uma modalidade, os cristais isolados são secos até que os cristais isolados percam menos de 2% em peso em um Teste de perda na secagem, tal como menos que 0,5% em peso.

[214] Preferivelmente, os cristais isolados são lavados, várias vezes, em água e secos sob vácuo a cerca de 50 ºC por pelo menos 12 horas.

[215] Os cristais obtidos são tipicamente relativamente grandes (faixa de 50 a 200 mícrons) e uniformes quando vistos sob o microscópio x 10, conforme ilustrado na Fig. 16a.

[216] Isso difere dos cristais obtidos sem resfriamento controlado, que são muito menores em tamanho (geralmente de 5 a 50 mícrons) quando vistos ao microscópio x 10, conforme ilustrado na Fig. 16b.

Estágio 1: Síntese de acetato de 1H-indol-4-ila (3)

[217] A reação do núcleo é a reação do 4-hidróxi-indol (1) com anidrido acético (2) para formar 1H-indol-4-il acetato (3); (Figura 2)

[218] Mais preferivelmente, o Estágio 1 é como segue:

[219] 4-hidróxi-indol (1), DCM (12) e piridina (13) são adicionados a um frasco e resfria-se a cerca de 0-5ºC. Anidrido acético (2) é adicionado gota a gota e a mistura é aquecida a cerca de 20-25 ºC e agitada até a conclusão por HPLC. Os reagentes são lavados com solução aquosa de ácido cítrico (14) e $NaHCO_3$ aquoso (15), secos sobre $mgSO_4$ (16), filtrados e evaporados até aproximadamente metade do volume. É adicionado heptano (17) e a destilação continua para remover a maioria do DCM. A mistura é arrefecida a cerca de 5-25 ºC, filtrada, lavada com heptano e seca em uma estufa de vácuo durante a noite para isolar acetato de 1H-indol-4-ila (3) como um sólido adequado

para uso no Estágio seguinte.

Estágio 2: Síntese de 3[(dimetilcarbamoil)carbonil]-1H-indol-4il-acetato (6)

[220] A reação do núcleo é a reação do acetato de 1H-indol-4-ila (3) com cloreto de oxalila (4) e dimetilamina (5) para formar 3[(dimetilcarbamoil)carbonil]-1H-indol-4il-acetato (6); (Fig. 3)

[221] Mais preferivelmente, o Estágio 2 é como segue:

[222] O acetato de 1H-indol-4-ila (3) é dissolvido em uma mistura de THF (19) e TBME (18) à temperatura ambiente. Adicionou-se gota a gota cloreto de oxalila (4) permitindo exotermizar a reação a cerca de 35-40ºC. A faixa de temperatura é mantida durante todo o restante da adição. A reação é então agitada a cerca de 40ºC até a conclusão por HPLC. A reação é resfriada à temperatura ambiente e heptano (17) é adicionado resultando na precipitação de outros sólidos. A pasta fluida é agitada, depois deixada repousar, seguida pela remoção da maioria do solvente (18/19) por decantação. O sólido foi lavado no frasco duas vezes com heptano (17). TBME (18) é adicionado para dar uma pasta fluida amarela e a mistura é arrefecida a cerca de -20ºC. Solução de dimetilamina (5) é adicionada mantendo a temperatura entre -20ºC e -10ºC. A reação foi então aquecida à temperatura ambiente e agitada até a conclusão, adicionando dimetilamina extra, se necessário. A reação foi filtrada, lavada com heptano (17) e seca em um forno a vácuo. O 3[(dimetilcarbamoil)carbonil]-1H-indol-4il-acetato (6) foi adicionalmente purificado por uma pasta fluida em água (20), depois IPA (21) e depois seco em um forno a vácuo para produzir (6) como um sólido adequado para uso no Estágio seguinte.

Estágio 3: Síntese de 3-(2-(dimetilamino)etil)-1H-indol-4-ol (Psilocina) (8)

[223] A reação nuclear é a reação de 3[(dimetilcarbamoil)carbonil]-1H-indol-4il-acetato (6) com hidreto de alumínio e lítio (7) para formar

psilocina (8); (Fig. 4)

[224] Mais preferivelmente, o Estágio 3 é como segue:

[225] O 3[(dimetilcarbamoil)carbonil]-1H-indol-4il-acetato (6) foi transformado em pasta fluida em THF (19) e resfriado a cerca de 0ºC. Uma solução de THF de $LiAlH_4$ (7) foi adicionada gota a gota mantendo a temperatura a cerca de 0-20 ºC. A reação foi então submetida a refluxo até a conclusão por HPLC. A reação foi arrefecida a 0ºC e o excesso de $LiAlH_4$ foi arrefecido bruscamente por adição de acetona (22) seguida por solução aquosa de ácido cítrico (14). O lote foi filtrado para remover os sais de lítio e alumínio. O filtrado foi seco sobre $MgSO_4$ (16), filtrado e concentrado e carregado em uma almofada de sílica (23). A almofada foi eluída com THF (19) e o produto contendo frações foi evaporado. O sólido resultante foi empastado na mistura iPrOAc: TBME (24/18), filtrado e lavado com TBME. O sólido foi seco no forno para produzir psilocina de alta pureza (8) como um sólido esbranquiçado.

Estágio 4: Síntese de fosfato de benzil 3-[2-(benzildimetilazaniumil)etil]-1H-indol-4-ila (10)

[226] A reação do núcleo é a reação da psilocina (8) com tetrabenzilpirofosfato (9) para formar fosfato de benzil 3-[2-(benzildimetilazaniumil)etil]-1H-indol-4-ila (10), (Fig. 5)

[227] Mais preferivelmente, o Estágio 4 é como segue:

[228] Carregar psilocina (8) em um frasco seguido por THF (19). A reação foi resfriada a -50 ºC a -70 ºC e NaHMDS (25) foi adicionado gota a gota a cerca de -45 ºC a -70 ºC. A temperatura foi ajustada para cerca de -45 ºC a -60 ºC e foi adicionado tetrabenzilpirofosfato em THF. O lote foi deixado aquecer até 0 ºC, após o que o sólido dos produtos foi removido por filtração e o filtrado concentrado *in vacuo*. A mistura concentrada foi então aquecida a cerca de 40 ºC e agitada até o intermediário se converter no produto do Estágio 4 (10)- controlado pelo monitoramento e pelo uso de HPLC. O lote foi resfriado a cerca de 0-

5ºC e o sólido resultante isolado por filtração e seco sob vácuo para fornecer fosfato de benzilo de benzil 3-[2-(benzildimetilazaniumil)etil]-1H-indol-4-ila (10) como um sólido.

Estágio 5: Síntese do hidrogenofosfato de 3-[2-(dimetilazaniumil)etil]-1H-indol-4-ila de grau intermediário (Psilocibina bruta) (12)

[229] A reação do núcleo compreende a reação de fosfato de 3-[2-(benzildimetilazaniumil)etil]-1H-indol-4-ila (10) com hidrogênio (11) para formar psilocibina (12) (Fig. 6).

[230] Mais preferivelmente, o Estágio 5 é como segue:

[231] Um frasco foi carregado com Pd/C (26), metanol (24) e fosfato de 3-[2-(benzildimetilazanioil)etil]-1H-indol-4-ila (10) e a mistura resultante aspergida com hidrogênio (11) até conclusão por HPLC. Água purificada (20) é adicionada durante esse processo para reter o produto em solução. A mistura foi aquecida a cerca de 35 ºC - 45 ºC e depois filtrada através de um leito de Celite (27) lavando com metanol (24) e água purificada (20). O filtrado foi evaporado *in vacuo*, azeotropando com etanol (28) para obter psilocibina de grau intermediário (12).

Estágio 6: Síntese de hidrogenofosfato de 3-[2-(dimetilazaniumil)etil]-1H-indol-4-ila (psilocibina)

[232] A etapa de determinação /purificação de Polimorfo do núcleo é uma etapa de cristalização em água, seguido por uma etapa controlada de resfriamento e secagem, para produzir psilocibina cristalina de alta pureza, Polimorfo A ou Polimorfo A'.

[233] Mais preferivelmente, o Estágio 6 é como segue:

[234] A psilocibina de grau intermediário (12) (Estágio 5) foi carregada em um frasco com água purificada (20) e a mistura foi aquecida até a psilocibina (12) se dissolver. A solução a granel resultante foi então filtrada por polimento para um recipiente pré-aquecido. A temperatura foi ajustada para, preferivelmente, cerca de

68ºC - 70 ºC, e uma semente de hidrato de psilocibina (isto é, Hidrato A) foi adicionada à reação. O lote foi então arrefecido de uma maneira controlada a cerca de 0-10ºC e agitado, e os sólidos foram recolhidos por filtração e lavados com água purificada. Os sólidos isolados foram então secos em vácuo para produzir Psilocibina cristalina de alta pureza, Polimorfo A ou A', tal como um sólido esbranquiçado.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[235] Modalidades da invenção são adicionalmente descritas a seguir com referência aos desenhos anexos, nos quais:

[236] a Fig. 1 é um esquema da reação ensinada em JNP;

[237] a Fig. 2 é um esquema da reação do Estágio 1 de um aspecto da presente invenção;

[238] a Fig. 3 é um esquema da reação do Estágio 2 de um aspecto da presente invenção;

[239] a Fig. 4 é um esquema da reação do Estágio 3 de um aspecto da presente invenção;

[240] a Fig. 5 é um esquema da reação do Estágio 4 de um aspecto da presente invenção;

[241] a Fig. 6 é um esquema da reação do Estágio 5 de um aspecto da presente invenção;

[242] a Fig. 7a é um difratograma de XRPD do Polimorfo A (GM764B);

[243] a Fig. 7b é um difratograma de XRPD do Polimorfo A' (JCCA2160F);

[244] a Fig. 7c é um difratograma de XRPD do Polimorfo B; (JCCA2160-F-TM2);

[245] a Fig. 7d é um difratograma de XRPD de um Hidrato A (JCCA2157E);

[246] a Fig. 7e é um difratograma de XRPD de um solvato de etanol (JCCA2158D);

[247] a Fig. 7f é um difratograma de XRPD do produto obtido durante o desenvolvimento do processo (CB646-E) (topo) - comparado aos difratogramas de Polimorfo A' (JCCA2160F) (meio) e Polimorfo B (JCCA2160-TM2) (abaixo);

[248] a Fig. 8a é um termógrafo de DSC e TGA do Polimorfo A (GM764B);

[249] a Fig. 8b é um termógrafo de DSC e TGA de Polimorfo A' (JCCA2160F);

[250] a Fig. 8c é um termógrafo de DSC do Polimorfo B (GM748A);

[251] a Fig. 8d é um termógrafo de DSC e TGA do Hidrato A (JCCA2157E);

[252] a Fig. 8e é um termógrafo de DSC e TGA de solvato de etanol (JCCA2158D);

[253] a Fig. 9 é um diagrama de fase de forma, mostrando a inter-relação da forma em sistemas à base de água;

[254] a Fig. 10 é um espectro de ^{1}H RMN de Psilocibina; (Leia em paralelo ao Exemplo de Atribuição 7);

[255] a Fig. 11 é um espectro de ^{13}C RMN de Psilocibina; (Leia em paralelo ao Exemplo de Atribuição 7);

[256] a Fig. 12 é um Espectro FT-IR de psilocibina;

[257] a Fig. 13 é um Espectro de Massa de psilocibina;

[258] a Fig. 14 é uma fórmula estrutural numerada de Psilocibina;

[259] a Fig. 15 é uma curva de solubilidade da temperatura para Psilocibina em água;

[260] a Fig. 16a é uma micrografia mostrando cristais obtidos por resfriamento controlado;

[261] a Fig. 16b é uma micrografia mostrando cristais obtidos por secagem não controlada por resfriamento;

[262] a Fig. 17 é um diagrama de fase de forma, mostrando a inter-relação das formas em diferentes sistemas de solventes;

[263] a Fig. 18 é um difratograma de XRPD - Padrão C para sólidos isolados a 25 e 50 ºC;

[264] a Fig. 19 é um difratograma de XRPD - Padrões D, E e F para sólidos isolados a 25 e 50 ºC;

[265] a Fig. 20 é uma comparação dos difratogramas de XRPD adquiridos para os sólidos isolados a partir do equilíbrio da Psilocibina amorfa nos solventes A a H;

[266] a Fig. 21 é uma comparação dos difratogramas de XRPD adquiridos para os sólidos isolados do equilíbrio da Psilocibina amorfa nos solventes I a P; e

[267] a Fig. 22 é uma comparação dos difratogramas de XRPD adquiridos para os sólidos isolados do equilíbrio da Psilocibina amorfa nos solventes R a Y.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[268] Em contraste com a técnica anterior, a presente invenção procurou produzir psilocibina em larga escala comercial, em quantidades ou lotes de pelo menos 100g, e mais preferivelmente pelo menos 250g, níveis 1 log ou 2 logs mais elevados do que os níveis descritos em JNP, que descreve um método de "grande" escala para produzir quantidades de grama em uma escala de 10g.

[269] Para demonstrar as muitas etapas significativas de desenvolvimento do JNP, a descrição abaixo apresenta detalhes de experimentos e investigações realizadas em cada um dos Estágios do processo, que ilustram as seleções feitas para superar os inúmeros problemas técnicos enfrentados na produção de psilocibina (7) para GMP em uma grande escala (incluindo os vários intermediários (2-6)) a partir de 4-hidróxi-indol (1).

[270] Referência a um valor numérico específico inclui pelo menos esse valor específico, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Quando um intervalo de valores é expresso, outra modalidade

é incluída a partir de um valor particular e/ou para outro valor particular. Além disso, a referência aos valores declarados nos intervalos inclui todo e qualquer valor dentro desse intervalo. Todos os intervalos são inclusivos e combináveis.

[271] Quando os valores são expressos como aproximações, pelo uso do antecedente "cerca de", será entendido que o valor específico forma outra modalidade.

[272] Conforme usado neste documento, as formas singulares "a", "o", "um" e "uma" incluem o plural.

[273] O termo "cerca de" quando usado em referência a intervalos numéricos, pontos de corte ou valores específicos é usado para indicar que os valores recitados podem variar em até 10% do valor listado. Como muitos dos valores numéricos usados neste documento são determinados experimentomente, deve ser entendido pelos especialistas na técnica que tais determinações podem, e muitas vezes variam, entre diferentes experimentos. Os valores aqui utilizados não devem ser considerados indevidamente limitantes em virtude dessa variação inerente. Assim, o termo "cerca de" é usado para abranger variações de ± 10% ou menos, variações de ± 5% ou menos, variações de ± 1% ou menos, variações de ± 0,5% ou menos ou variações de ± 0,1% ou menos do valor especificado.

[274] Como usado aqui, "tratar" e termos semelhantes se referem a reduzir a gravidade e/ou frequência dos sintomas, eliminar sintomas e/ou a causa subjacente dos referidos sintomas, reduzir a frequência ou probabilidade de sintomas e/ou a causa subjacente, atrasar, prevenir e/ou retardar a progressão de doenças e/ou transtornos e melhorar ou remediar os danos causados, direta ou indiretamente, pelas doenças e/ou transtornos.

[275] As seguintes abreviações foram usadas aqui:

DSC - Calorimetria de varredura diferencial

TA - Temperatura ambiente

TBME - Metil terc-butil éter

TGA - Análise Termogravimétrica

THF - Tetra-hidrofurano

Wrt - Com relação a

XRPD - Difração de raios X em pó

EXEMPLO 1

ESTÁGIO 6 PROCESSO DE CRISTALIZAÇÃO E POLIMORFOS RESULTANTES

Experimento para produzir a Forma A' :

[276] 1,0 g de psilocibina bruta foi carregado em um frasco de 25 mL. Água (12,8 mL/16 volumes com base na atividade do material de inserção) foi adicionada. A mistura foi agitada e aquecida a 80 ºC. Uma solução marrom escura com sólidos não dissolvidos visíveis foi obtida. A mistura foi filtrada por polimento através de um filtro aquecido de 0,45 µm em um frasco quente de 25 ml. Os sólidos não dissolvidos foram removidos para dar uma solução marrom escura. A solução foi reequilibrada a 75ºC e depois resfriada lentamente (10ºC/hora) até à temperatura ambiente. A solução castanha pálida resultante foi equilibrada à temperatura ambiente durante 16 horas. A suspensão foi arrefecida a 5ºC antes do isolamento do sólido por filtração a vácuo. A torta de filtro foi lavada com água (0,8 mL/1 volume) e seca sob vácuo a 50ºC durante 16 horas. Rendimento de 75%, pureza química 99%, ensaio de RMN > 98%.

[277] O procedimento acima foi repetido com 14 volumes (11,2 mL) de água. Rendimento de 69%, pureza química 99%, ensaio de RMN > 98%.

[278] Em ambos os casos, a dissolução da psilocibina bruta foi alcançada a ca. 75ºC. No arrefecimento gradual, foi observada precipitação a ca. 60ºC.

[279] Em ambos os casos, o Polimorfo A' da psilocibina foi produzido, confirmado por XRPD (difratograma consistente com a Fig. 7b) e DSC (termograma consistente com a fig. 8b).

Experimento para produzir a Forma A:

[280] 94g de psilocibina bruta obtida do processo do Estágio 5 (cerca de 93% puro por HPLC com cerca de 4% de impureza de pirofosfato) foram submetidos a uma recristalização aquosa, conforme estabelecido abaixo:

[281] O protocolo utilizou água suficiente (12 volumes), uma taxa de agitação rápida (450 rpm) e um perfil de resfriamento controlado (10ºC/h).

[282] A psilocibina (94,0 g) (CB650E) foi carregada em um frasco de 2 L. Água (902 ml, 12 volumes com base na atividade do material de inserção) foi adicionada. A mistura foi agitada e aquecida a cerca de 78ºC. Uma solução marrom escura com sólidos não dissolvidos visíveis foi obtida. A mistura foi filtrada por polimento através de um filtro em linha de 1,2 µm em um frasco quente de 5 L equipado com um agitador aéreo (450 rpm). Os sólidos não dissolvidos foram removidos para dar uma solução marrom escura clarificada. A solução foi reequilibrada a cerca de 75ºC por 15 minutos e depois resfriada lentamente (10 ºC/hora) até a temperatura ambiente. A solução foi semeada com Hidrato A de psilocibina (difratograma GM758A-XRPD consistente com a Fig. 7d) após maturação em água) a 68 ºC - 70 ºC. A suspensão castanha pálida resultante foi equilibrada à temperatura ambiente durante cerca de 16 horas. A suspensão foi arrefecida a 5 ºC durante uma hora antes do isolamento do sólido por filtração a vácuo. A torta de filtro foi lavada com água (282 mL, 3 volumes) e seca sob vácuo a cerca de 50 ºC por 30 horas.

[283] O processo foi concluído com sucesso, com um rendimento de 75% alcançado. A pureza química do sólido foi confirmada como

99,3%. A análise do sólido por XRPD após a secagem por 30 horas mostrou Polimorfo A (Fig. 7a). Uma perturbação característica foi observada a ca ~ 17 °2θ, tal como 17,5 °2θ, e foi pronunciada no material a granel.

Caracterização de estado sólido de Polimorfo A e Polimorfo A'

[284] Os termogramas de DSC e TGA (Fig. 8a) obtidos para o Polimorfo A foram comparáveis aos termogramas de DSC e TGA obtidos para o Polimorfo A' (Fig. 8b). Os termogramas de TGA (Fig. 8a) obtidos para o Polimorfo A e Polimorfo A' não mostram perda de peso antes da decomposição. Isso sugeriu que a diferença entre os XRPDs obtidos para o Polimorfo A (Fig. 7a; perturbação presente em ca. ~ 17 °2θ) e para o Polimorfo A', que foi obtida em pequena escala (Fig. 7b; perturbação não presente) não se deveu ao excesso hidratação.

[285] A microscopia do sólido (Fig. 16a) mostra cristais em forma de bastão com boa uniformidade com uma faixa de tamanho entre 50 e 200 mícron.

[286] O difratograma de XRPD obtido para o Polimorfo A' não demonstra uma perturbação em ca. ~ 17 °2θ na mesma extensão que o Polimorfo A. A perturbação no difratograma de XRPD a ca. ~ 17 °2θ é mais pronunciada para a psilocibina produzida em larga escala (comparada à obtida em pequena escala) e foi inesperada. A requerente demonstrou que o Hidrato A é a única forma polimórfica que existe através de uma gama de temperaturas sem pico de difração na região teta de 17 °2 (vide Fig. 7d). Isso sugere fortemente um colapso do Hidrato A após a desidratação para produzir o Polimorfo A ou A' que varia de acordo com a escala e que o Polimorfo A é a forma verdadeira do Polimorfo A' formado em pequena escala, sendo atípico.

[287] Para Testar a robustez dessa teoria e demonstrar um retorno ao Polimorfo A, uma pequena porção do volume foi seca novamente após outra imersão em água (para reproduzir o Hidrato A). Uma

pequena amostra (250 mg – Polimorfo A de psilocibina) foi equilibrada em água (10 vols) por uma hora. A suspensão foi filtrada e a análise do sólido úmido confirmou que o Hidrato A havia sido gerado (Fig. 7d), sem perturbação a 17 °2 teta. O material foi seco sob vácuo por 16 horas e o sólido reavaliado por XRPD. O material do Polimorfo A' foi confirmado por XRPD (Figura 7b) com a redução na perturbação de XRPD observada. A secagem adicional do sólido a granel original e o envelhecimento à temperatura ambiente não alteraram o difratograma de XRPD do sólido. As duas versões sólidas obtidas, os difratogramas de XRPD para Polimorfo A e Polimorfo A' são virtualmente idênticos, exceto o pico teta de ~ 17,5 °2. As propriedades térmicas também são idênticas. A distinção entre os difratogramas de XRPD para Polimorfo A versus Polimorfo A' é sutil e ambos os polimorfos se convertem cineticamente no estado hidratado muito rapidamente.

[288] Experimentos adicionais foram realizados para verificar se as diferenças nos difratogramas de XRPD para o Polimorfo A e Polimorfo A' foram devido ao processo de cristalização em larga escala, fornecendo sólidos com um tamanho de partícula maior que subsequentemente não secaram com a mesma eficácia e causaram a alteração, ou se a diferença de hábito e tamanho do sólido cristalino foi a causa. O Polimorfo A de psilocibina (forma polimórfica confirmada antes do experimento) foi moído através de um almofariz e pilão e avaliado por XRPD. Não foi observada alteração no polimorfo. Outra porção (51 mg) foi carregada com água (<1 mL) e avaliada como úmida para confirmar que o hidrato foi formado. Ambos os lotes foram secos *in vacuo* a 50ºC durante ca. 18 horas e reavaliados por XRPD. A amostra moída permaneceu como Polimorfo A. A amostra hidratada após a desidratação mostrou ser Polimorfo A' (isto é, sem reflexão a ~ 17,5 °2θ). Isso sugeriu que o tamanho/hábito por si só não era a única razão para os picos de reflexão originais.

[289] A avaliação por TGA revelou que o lote de inserção demonstrou uma pequena perda de massa (0,139% em peso) por ca. 70ºC. O tamanho reduzido das partículas e o sólido subsequentemente seco demonstraram uma maior perda de massa de 0,343% em peso em ca. 75ºC enquanto que o sólido hidratado e seco demonstrou a menor perda de massa de 0,069% em peso em ca. 80ºC. O tamanho reduzido de partícula e o sólido subsequentemente seco foram mantidos a 80ºC por 10 minutos (após o ponto de perda de massa por TGA), mas a avaliação por XRPD não revelou alterações na inserção, o que significa que baixos níveis de hidratação e inchaço parcial da retícula cristalina não foram a causa da variação

[290] É possível gerar Polimorfo A' através da hidratação do Polimorfo A e subsequente secagem do sólido isolado em pequena escala.

[291] Polimorfo A Polimorfo e A' de psilocibina, ca. 60 mg cada, foram carregados com água, 0,2 ml, para entregar o Hidrato A de ambos os lotes. Metade de cada Hidrato A foi seco sob vácuo a 25 ºC durante ca. 17 horas e o restante de cada Hidrato A foi seco à temperatura ambiente sob uma corrente de N_2 durante ca. 17 horas. Os sólidos foram isolados após secagem e avaliados por XRPD. A avaliação por XRPD dos sólidos isolados da inserção de Polimorfo A confirmou que o Hidrato A foi gerado com sucesso e que os sólidos secaram para dar Polimorfo A' de ambos os métodos de secagem. A avaliação por XRPD dos sólidos isolados da inserção do Polimorfo A' confirmou que o Hidrato A foi gerado com sucesso e que os sólidos secaram para permanecer como Polimorfo A' de ambos os métodos de secagem.

[292] Na pequena escala investigada, o Polimorfo A e o Polimorfo A' secarão para dar o Polimorfo A' via conversão para o Hidrato A.

[293] O Polimorfo A de psilocibina (100 mg) foi reduzido em tamanho de partícula por moagem de almofariz e pilão. O terreno foi

submetido a dois regimes de secagem diferentes para avaliar se a redução do tamanho das partículas afetou a desidratação da amostra. A primeira amostra foi mantida a 80ºC por 10 minutos e a segunda amostra mantida a 110ºC por 10 minutos. Ambos os sólidos foram avaliados por XRPD, que revelou que o Polimorfo A foi retido. Considerou-se se o lote moído nas tensões isotérmicas anteriores não era mantido a 110ºC por tempo suficiente para impactar a forma e, assim, uma porção do lote moído foi seca sob vácuo a 110 ºC por ca. 24 horas. A avaliação por XRPD revelou uma mudança sutil na forma com as reflexões de Polimorfo A a ca. 17 ainda presentes, mas com uma intensidade ligeiramente reduzida.

[294] Concluiu-se que o Polimorfo A não seria facilmente convertido em Polimorfo A' via redução do tamanho de partícula e/ou secagem a alta temperatura.

Metodologia

[295] As avaliações de estabilidade da psilocibina, que não contêm a impureza do pirofosfato, indicaram que a temperaturas superiores a 80 ºC, o nível da impureza intermediária do Estágio 3 (psilocina) gerada pela hidrólise da psilocibina é preocupante. Por exemplo, quando uma solução aquosa de psilocibina de 83 mg/mL é aquecida a 90ºC e analisada por HPLC em 1, 2 e 4 horas, o nível da impureza do Estágio 3 foi determinado como 0,28, 1,82 e 7,79% em área, respectivamente. Em comparação, quando 50 mg de psilocibina são dissolvidos em água (1,2 - 1,8 ml; volume suficiente para manter uma solução) e aquecidos a 70, 75 e 80ºC por 4 horas, o nível da impureza do Estágio 3 foi determinado, por HPLC, tal como 0,53, 0,74 e 2,30% em área, respectivamente. A recristalização aquece a psilocibina bruta entre 75ºC e 80ºC, a fim de obter a dissolução e filtrar o polimento. O resfriamento imediato da solução limita o nível de hidrólise da psilocibina, reduzindo o tempo de residência do material à temperatura excessiva.

[296] Novas recristalizações de psilocibina foram realizadas, introduzindo as seguintes variações:

[297] Variando os volumes de água utilizados;

[298] Variando agitação;

[299] Tendo um resfriamento controlado perfil;

[300] Tendo um perfil de resfriamento rápido (não controlado).

[301] O uso de volumes menores de água (menos de 12 volumes) não impediu o processo de recristalização e a dissolução da psilocibina foi alcançada a uma temperatura para permitir uma etapa de filtração do polimento. Mostrou-se que diferentes taxas de resfriamento resultam em diferentes distribuições de tamanho de cristal; um resfriamento lento controlado a cerca de 10 ºC por hora produziu um tamanho de cristal relativamente maior e mais uniforme (Fig. 16a), enquanto um perfil de resfriamento rápido produziu cristais menores (Fig. 16b). É preferido um perfil de resfriamento controlado e isso se reflete em uma pureza aprimorada para o resfriamento controlado.

[302] O uso do processo resultou em psilocibina de 99,3% de pureza química, com um rendimento de 75%. As características térmicas do sólido correspondiam às desejadas. As diferenças no difratograma de XRPD do sólido seco sugeriram que o perfil de secagem pode ser importante para determinar como o Hidrato A entra em colapso para dar a forma sólida preferida. O Polimorfo A demonstrou ser estável sob condições de Teste de estabilidade acelerada por 12 meses.

Experimento

[303] O Estágio 5 foi carregado em um frasco sob N_2 seguido de água (aproximadamente 12-15 vol. com base no Estágio 5 ativo). A mistura foi aquecida a cerca de 80ºC para alcançar a dissolução e o polimento filtrado através de um filtro em linha de 1,2 µm em um novo frasco limpo aquecido a 80ºC. A taxa de agitação foi ajustada para um

nível alto (450 rpm) e a solução equilibrada em 70-75 ºC. A solução foi resfriada à temperatura ambiente, a aprox. 10 ºC/hora, semeando com Hidrato A de Psilocibina (0,001 x carga do Estágio 5) a 68-70 ºC. A suspensão foi mantida à temperatura ambiente durante a noite e depois foi resfriada até aprox. 5ºC e mantida por 1 hora. A suspensão foi filtrada, lavada com água (2-3 volumes com base na carga ativa do Estágio 5). A Psilocibina pura foi seca sob vácuo a 50 ºC. A psilocibina de material cristalino (Polimorfo A ou Polimorfo A' depende da escala) foi obtida, por exemplo, usando 94 g de inserção de psilocibina rendeu o Polimorfo A e usando 1 g de inserção de psilocibina rendeu o Polimorfo A'. Normalmente, tamanhos de lote maiores que 5 g entregam Polimorfo A, enquanto tamanhos de lotes menores que 5 g entregam Polimorfo A'.

[304] As diferenças de JNP e os benefícios podem ser resumidos da seguinte forma:

i) Esta etapa de cristalização adicional dá origem a uma forma cristalina definida - Polimorfo A (ou A').

ii) Aquecimento a cerca de 80 ºC, por um curto período, tem a vantagem de maximizar a solubilidade (e evitar a hidrólise), o que garante bons rendimentos.

iii) A cerca de 70-80 ºC, a filtragem de polimento pode ser usada para remover impurezas insolúveis. Isso é melhor conseguido usando um filtro em linha - normalmente cerca de 1,2 µm. Isso garante uma boa pureza química.

iv) O uso de uma alta de agitação taxa (tipicamente cerca de 450 rpm) garante rápida dissolução, minimizando o tempo em que a solução é mantida a 80 ºC, evitando assim o aumento dos níveis da impureza intermediária do Estágio 3 formada pela hidrólise da psilocibina.

v) O fornecimento de resfriamento controlado, normalmente

resfriado a cerca de 10 ºC por hora fornece um tamanho de cristal mais uniforme e mantém a forma como o Hidrato A.

vi) Semear a solução a cerca de 70 ºC com o Hidrato A de psilocibina facilita a cristalização como o Hidrato A.

vii) Os cristais são lavados em água e secos a cerca de 50ºC para maximizar a pureza e fornecer Polimorfo A ou A', dependendo da escala.

EXEMPLOS 2 A 6

[305] Estágios 1 a 5 da produção de psilocibina

[306] Os exemplos a seguir ilustram desenvolvimentos significativos do processo descrito em JNP e ilustrado na Figura 1, tal como descrito aqui anteriormente.

EXEMPLO 2

ESTÁGIO 1 (Fig. 2)

[307] As condições do Estágio 1 EM JNP usaram 1,1 eq de Ac_2O e 1,2 eq de piridina no solvente DCM. Verificou-se que a reação estava completa (produto a 99%, SM a 0%) após agitação durante a noite. A mistura de reação foi lavada com água e concentrada *in vacuo*, originando um óleo castanho. Na literatura, o óleo foi absorvido em EtOAc e concentrado por evaporação, dando precipitação de sólidos em baixo volume.

Investigação

[308] No entanto, nas mãos das Requerentes, precipitação de sólidos de EtOAc não foi observada. A precipitação de sólidos foi incentivada pela trituração com heptano, porém isso não formaria um processo escalável. Os sólidos foram recolhidos dando um produto de Estágio 1 de alta pureza (rendimento de 75%, >95% puro por RMN).

[309] Enquanto a reação funcionou bem, o procedimento de isolamento exigiu maior desenvolvimento para que um sólido de fácil manipulação pudesse ser obtido. Esperava-se que o isolamento dos

sólidos por filtração também oferecesse um meio de purificação.

[310] A reação foi testada em EtOAc para verificar se a precipitação de sólidos poderia ser encorajada, permitindo o isolamento diretamente da mistura de reação. No entanto, o perfil da reação em EtOAc foi considerado menos favorável do que em DCM e, portanto, a reação foi abandonada.

[311] A requerente lavou a piridina a partir da mistura de reação DCM, pois acreditava-se que isso poderia estar impedindo a recristalização do produto. A reação foi repetida (conclusão de 0,4% SM, 98,7% de produção t por HPLC) e a mistura de reação lavada com ácido cítrico a 20% para atingir pH 2/3, removendo a piridina e depois $NaHCO_3$ saturado (aq) para evitar pH baixo nas etapas de evaporação. Os orgânicos foram secos e foi realizada uma troca de solvente para heptano, dando precipitação do Estágio 1. Os sólidos foram coletados por filtração, produzindo o Estágio 1 puro após secagem em vácuo (rendimento de 87%, pureza >95% por RMN).

[312] Ensaios de estabilidade foram realizados os quais confirmaram que a mistura de reação era estável durante a noite quando agitada com ácido cítrico a 20% e também $NaHCO_3$ saturado. Verificou-se que o produto era estável quando seco no forno a 40 ºC e 60 ºC.

<u>Aumento de escala</u>

[313] A reação do Estágio 1 foi ampliada com êxito, processando > 100g de 4-hidróxi-indol. A reação progrediu como esperado e foi processada para dar o produto do Estágio 1 (rendimento de 93%, pureza de RMN de ~ 98%).

<u>Síntese de matérias-primas GMP</u>

[314] Uma reação em larga escala do Estágio 1 foi realizada para fornecer material de partida GMP (processamento >500 g de 4-hidróxi-indol). A reação prosseguiu como esperado, dando consumo de SM por HPLC (produto de 99,2%, <0,1% de SM). A reação foi processada

usando o procedimento estabelecido para dar o produto do Estágio 1 após a secagem (rendimento de 94%, 99,1% por HPLC, ensaio de 99% de RMN).

[315] Também foi observado no desenvolvimento que o procedimento do Estágio 1 foi eficaz na remoção de pequenas impurezas presentes em alguns lotes de 4-hidróxi-indol. As impurezas de baixo nível presentes no 4-hidróxi-indol foram completamente removidas após a reação do Estágio 1, fornecendo material limpo com alto rendimento (89%) e pureza (99% por HPLC, 99% pelo Teste de RMN).

Experimento

[316] 4-hidróxi-indol (reagente limitante de 1 eq.) foi carregado em um frasco sob N_2 seguido por DCM (diclorometano; 6 vol com base no carga de 4-hidróxi-indol). A reação foi arrefecida a 0-5ºC e foi adicionada piridina (1,2 eq) gota a gota a 0-5ºC. Anidrido acético (1,1 eq) foi adicionado gota a gota a 0-5 ºC e a reação foi aquecida a 20-25ºC por 1 - 1,5 h e agitada a 20-25 ºC por mais 3 horas. A reação foi amostrada e analisada para finalização. A reação foi então lavada três vezes com solução aquosa de ácido cítrico a 20% (3 x 3 vol com base na carga de 4-hidróxi-indol) e uma vez com solução sat. $NaHCO_3$ (3 vol com base na carga de 4-hidróxi-indol). A solução de DCM foi seca sobre $mgSO_4$ e filtrada e a camada de DCM concentrada até metade do volume por destilação. Heptano foi adicionado (6 vol com base na carga de 4-hidróxi-indol) e o DCM adicional foi removido por destilação até ocorrer a precipitação total da Estágio 1. A reação foi resfriada a 15-25ºC e os sólidos recolhidos por filtração, lavados com heptano (1 vol com base na carga de 4-hidróxi-indol) secos sob vácuo durante a noite a 60ºC.

[317] As diferenças de JNP e os benefícios podem ser resumidos da seguinte forma:

i) A requerente lavou a piridina utilizando ácido cítrico a um pH de cerca de 2 - 3. Isso facilitou o isolamento e a cristalização. Na

prática, a fase de DCM é separada e o Estágio aquoso de ácido cítrico é descartado.

ii) Uma lavagem adicional em bicarbonato de sódio resultou em melhorias adicionais.

iii) Uma troca de solvente com heptano melhorou a precipitação de sólidos, maximizando o rendimento e resultando no Estágio 1 de alta pureza reproduzível.

EXEMPLO 3

ESTÁGIO 2 (Fig. 3)

Etapa i - Formação de cloreto ácido

[318] A formação do Intermediário 2A reativo pela reação do produto do Estágio 1 com cloreto de oxalila (1,5 eq) foi inicialmente testada em uma mistura de TBME e THF (6 vol/1 vol) para determinar se era uma alternativa viável ao Et_2O volátil e altamente inflamável conforme usado na literatura. A reação deu conclusão após ~ 18 horas com um perfil de solubilidade semelhante ao Et_2O (Estágio 1 em solução, precipitação do Estágio 2A).

[319] Como o intermediário de cloreto de ácido é propenso à hidrólise, levando a resultados analíticos variáveis, uma amostra e composição de amostras mais robustas foram desenvolvidas, nas quais a reação foi arrefecida bruscamente em THF/NMe_2 (para dar o Estágio 2) e depois analisada por HPLC.

[320] A proporção de TBME e THF foi otimizada para proporcionar a mais alta pureza e rendimento do intermediário, com uma proporção preferida de TBME:THF de 6:1 escolhida para aumento de escala. Outras razões de TBME:THF podem ser usadas.

[321] Uma reação de aumento de escala foi realizada usando a mistura de solvente preferida (1 vol THF, 6 vol TBME), mas com a adição de cloreto de oxalila realizada a 30-35 ºC. A solução resultante foi então aquecida a 40ºC por 2,5 horas, dando uma conclusão com ~

1% de produto do Estágio 1 restante. A realização da adição a quente para manter uma solução garante uma alta taxa de reação e proporcionou um nível aprimorado de conclusão com um tempo de reação muito mais curto (2,5 horas vs durante a noite). Observou-se ainda que o produto precipitava-se à temperatura após ~ 15 min e não observou-se nenhum efeito prejudicial no perfil da reação por HPLC.

[322] Como a estabilidade do Intermediário 2A não era conhecida, foi tentada a telescopia do material até o Estágio 2, em vez de isolar o intermediário e arricar degradação (hidrólise). O perfil da reação era complexo, com múltiplos componentes presentes em um nível baixo. Foi adicionado TBME e o precipitado foi recolhido. No entanto, isso também foi considerado uma mistura complexa por HPLC/RMN.

[323] Devido ao fraco perfil de reação, considerou-se necessário isolar o Intermediário 2A para permitir a purificação longe do excesso de cloreto de oxalila. A reação foi repetida e o precipitado amarelo foi coletado por filtração e lavado com TBME para remover o excesso de cloreto de oxalila (80% de rendimento). A análise por RMN confirmou que o produto era de pureza suficiente (~ 95% por RMN). No entanto, apesar do armazenamento sob nitrogênio, alguma decomposição foi observada durante os dias seguintes, dando hidrólise parcial, incluindo desprotecção do grupo acetato.

[324] Para tentar reduzir o potencial de hidrólise do cloreto de ácido intermediário durante o isolamento, novas investigações em um procedimento telescópico foram realizadas. Verificou-se que, ao permitir que a mistura de reação sedimentasse, os licores de TBME poderiam ser facilmente decantados e, em seguida, os sólidos residuais lavados com mais porções de TBME de maneira semelhante. Isso permitiu a purificação do Intermediário 2A longe do excesso de cloreto de oxalila, minimizando a exposição à umidade.

[325] Percebeu-se que algum rendimento da reação pode ter sido

perdido devido à solubilidade parcial do intermediário na mistura THF/TBME. Isto foi confirmado pela adição de heptano aos licores de decantação que deram precipitação a outros sólidos. Para limitar esta solubilidade, foi feita uma adição de heptano (8 vol) antes da decantação. Em vez de lavar os sólidos com TBME, também foi utilizado heptano para as lavagens (3 x 6 vol) que maximizavam o rendimento, mantendo a alta pureza do intermediário. Essa metodologia foi ampliada com sucesso e é o processo preferido.

Etapa ii - Reação com dimetilamina

[326] A literatura (Synthesis, 1999, 6, 935-938; D.E. Nichols) sugeriu que o gás $HNMe_2$ era eficaz para essa transformação. No entanto, para simplificar o processamento em larga escala, este foi substituído por $HNMe_2$.HCl sólido, com um excesso adicional de base ou uma solução de $HNMe_2$ em THF. JNP usa $HNMe_2$ na presença de excesso de base (piridina).

[327] O Intermediário 2A inicialmente isolado foi usado para otimizar a reação com dimetilamina através de uma série de reações de Teste (vide Tabela 11).

Tabela 11 - Ensaios de otimização da reação no Estágio 2

#	Dimetilamina Fonte	Base	Solvente	Finalização de HPLC	Sólidos isolados
1	2M $HNMe_2$/THF 1,2 eq	Piridina 1,3 eq	THF/TBME	80% produto,	64% rendimento, ~70% puro por RMN,
2	$HNMe_2$.HCl 1,5eq	K_2CO_3	THF/H_2O	70% produto	40% rendimento ~98% puro por RMN.
3	2M $HNMe_2$/THF 1,33 eq	Piridina 3,6 eq	Et_2O	81% produto	63% rendimento, ~90% puro por RMN.
4	2M $HNMe_2$/THF 2,9 eq	N/A	Et_2O	93% produto	72% rendimento, ~98% puro por RMN.

[328] As condições fornecidas pela literatura com piridina (# 1) foram testadas juntamente com uma reação semelhante em Et_2O (# 3), uma reação bifásica usando $Me_2NH.HCl$ e K_2CO_3 aquoso (# 2) e uma reação com excesso de 2M de Me_2NH em THF (# 4) O principal componente por HPLC foi o produto desejado em todos os casos, com as condições usando base aquosa e excesso de Me_2NH sendo geralmente muito mais limpas do que aquelas com piridina. Embora tenha sido observado um produto significativo de hidrólise em todos os casos, este foi considerado o resultado do Intermediário 2A não reagido que foi arrefecido bruscamente durante a composição da amostra para análise por HPLC. As reações foram processadas por adição de água e, em seguida, o solvente orgânico foi removido *in vacuo*, dando origem a precipitação de sólidos.

[329] A reação com excesso de amina mostrou um perfil de impureza muito melhorado que se traduziu em um maior rendimento (72% vs 63%) e pureza (98% vs 90%). Essa abordagem limitou o teor de água da reação e, portanto, minimizou a oportunidade de ocorrência de hidrólise. Também se esperava que a purificação fosse mais fácil devido à ausência de piridina nos sólidos isolados. Por esses motivos, as condições com excesso de $HNMe_2$ como base foram escolhidas para aumentar a escala.

[330] A reação em Et_2O deu um perfil limpo (# 4). No entanto, para facilitar o processamento em larga escala, mostrou-se vantajoso mudar para um solvente menos volátil, tal como o TBME. Isso facilitaria a telescopia do cloreto de ácido nessa reação. Por esses motivos, optou-se por realizar a reação em TBME usando excesso de Me_2NH a 2M em THF.

[331] Acreditava-se que a adição de água ajudaria a preparação solubilizando os sais de $HNMe_2.HCl$ que estavam presentes e resultaram em uma mistura muito espessa e filtrações lentas. Isso foi

testado. No entanto, quando a água foi adicionada às reações em TBME e THF, obteve-se uma má recuperação com a análise dos licores mostrando impurezas adicionais e desproteção de acetato extensas (produto fenol). Foi, portanto, necessário um desenvolvimento adicional da purificação.

Desenvolvimento de purificação

[332] Era desejável desenvolver uma estratégia de purificação que removesse o produto de hidrólise e outras impurezas observadas. Também era desejável incluir água na cristalização para reduzir o teor de sal do material isolado (assumido $HNMe_2$.HCl). Para este fim, uma série de 15 solventes e misturas de solventes foi rastreada (escala de 100 mg, solvente de 10 vol, ciclo de aquecimento a 60 ºC).

Tabela 12 - Ensaios de purificação do Estágio 2

Solvente	Observações	Recuperação	Pureza de HPLC (hidólise imp de intermediário 2A)
TBME	Pasta fluida	47 mg*	96,4% (2,8%)
DCM	Pasta fluida	60 mg	99,5% (0,5%)
Toluene	Pasta fluida	30 mg*	95,8% (3,4%)
EtOAc	Pasta fluida	66 mg*	97,8% (1,6%)
iPrOAc	Pasta fluida	40 mg*	97,3% (2,0%)
IPA	Pasta fluida	65 mg	99,4% (0,4%)
EtOH/H_2O, 1:1	Pasta fluida	62 mg	99,4% (0,5%)
MeCN/H_2O, 1:1	Solução parcial a TA Solução a 60°C	30 mg	99,0% (0,7%)
Acetona/H_2O, 1:1	Pasta fluida a TA Solução a 60°C	51 mg	99,4% (0,5%)
THF/H_2O, 1:1	Solução parcial a TA Solução a 60°C	No precipitate	n/a
Heptano	Pasta fluida	34 mg*	95,0% (3,6%)
MIBK	Pasta fluida	65 mg	97,9% (1,4%)
MEK	Pasta fluida	60 mg	99,6% (0,3%)
Ciclo-hexano	Pasta fluida	41 mg*	94,4% (4%)
Xilenos	Pasta fluida	56 mg*	96,1% (3%)

* Recuperação não representativa devido a suspensões espessas e sólidos que aderem ao frasco ao frasco de vidro.

[333] A partir dos solventes selecionados, acetona/água deu uma recristalização com pouca solubilidade observada à temperatura ambiente. Como se tratava de um sistema aquoso, tinha a vantagem de ajudar a purgar o $Me_2NH.HCl$ dos sólidos.

[334] A recristalização de acetona/água foi aumentada. Uma solução foi obtida à temperatura (5 vol de acetona, 1 vol de água) antes da adição de mais água (4 vol) e a mistura foi arrefecida até à TA dando cristalização (recuperação de 62%, > 99% de pureza por HPLC). Esse processo foi posteriormente ampliado com a adição de mais água para ajudar na recuperação (no total, 5 vol de acetona, 10 vol de água, 78% de recuperação).

[335] O processo foi ampliado ainda mais (30 g) e os sólidos brutos levados através do procedimento de recristalização. Embora a pureza do produto fosse alta, houve uma queda no rendimento (rendimento de 56%, 99% pelo Teste de RMN, 99,4% por HPLC).

[336] Para melhorar a recuperação, a quantidade de água adicionada foi aumentada de 10 para 15 vol. Isso manteve a pureza do produto acima de 99% e proporcionou uma recuperação mais alta em pequena escala (90% de recuperação, 56-70% observado anteriormente). No entanto, a ampliação deste procedimento alterado novamente gerou uma recuperação baixa (rendimento de 58%). Portanto, devido aos problemas encontrados ao aumentar a recristalização, buscou-se um meio alternativo de purificação com base na peneira de pasta fluida original que foi realizada (Tabela 12 acima).

[337] O desenvolvimento da estratégia de purificação ocorreu usando material isolado de larga escala, Estágio 2, reação. A reação progrediu como esperado para dar o produto bruto após a secagem no forno (70% por ensaio de RMN, 79% de rendimento ativo). Para remover

o componente significativo de sal (presumido como $HNMe_2$.HCl), uma porção foi misturada com água à temperatura ambiente. Após secagem, obteve-se 75% de recuperação (95% em por ensaio de RMN), mostrando ser um meio eficaz de reduzir o teor de sal. A pureza por HPLC permaneceu inalterada em ~ 93%. Buscou-se então um método para aumentar a pureza química dos sólidos.

[338] Na tela inicial, ambos EtOH:H_2O, IPA e acetona:H_2O pareciam fornecer produtos de alta pureza com uma boa recuperação e, portanto, esses sistemas de solventes foram escolhidos para uma investigação mais aprofundada. A pureza de inserção foi de 92,7%, com as principais impurezas nos níveis de 1,4%, 1,0% e 0,8%.

Tabela 13 - Desenvolvimento adicional da purificação (pasta fluida a 40ºC 1 hora, filtração à temperatura ambiente, lavagem a 1 vol)

Sistema de solvente	Recuperação	Pureza de HPLC (níveis de impureza principais)			
		Produto	Imp 1	Imp 2	Imp 3
Acetona/Água 6/16 vol	67%	98,8%	0,7%	0,2%	0,1%
1:1 EtOH:H_2O 10 vol	79%	98,0%	0,9%	0,5%	0,2%
IPA 10 vol	90%	97,5%	0,8%	0,8%	0,3%
IPA 5 vol	92%	97,2%	1,0%	0,7%	0,3%
4.5:2.5 IPA:H_2O * 7 vol	79%	98,7%	0,6%	0,4%	0,1%
6:1 IPA:H_2O 7 vol	82% **	98,0%	0,9%	0,6%	0,2%

[339] * A reação foi inicialmente executada em 1:1 IPA:H_2O a 5 vol. No entanto, tornou-se espessa demais para agitar e, portanto, foram adicionados mais 2 vol de IPA.

[340] ** A mistura era espessa e os sólidos presentes eram muito finos, dificultando a filtração com alguns sólidos batendo no filtro.

[341] Os resultados desses estudos sugeriram que eram possíveis boas recuperações desses sistemas, particularmente aqueles baseados em IPA. EtOH:H_2O apresentou um perfil de impureza marginalmente melhor que o IPA sozinho; no entanto, a recuperação não foi tão boa (79 vs 90%). O perfil de impureza com IPA foi bastante aprimorado pela presença de água (98,7% vs ~ 97,5%), no entanto, isso levou a uma recuperação mais baixa (79 vs 90%). Isto sugeriu um certo nível de solubilidade em água para o composto. Um Teste final em IPA e EtOH:Água foi realizada com volumes de água reduzidos para verificar se era possível encontrar um equilíbrio que proporcionasse alta pureza e uma recuperação de ~ 90%. Enquanto este sistema melhorou o rendimento, a filtração era lenta e, portanto, outras misturas de solventes também foram avaliadas.

Tabela 14 - Exame de outras misturas de solventes (escala de 500 mg, pasta fluida a 40 ºC 1 hora, filtração à temperatura ambiente, lavagem a 1 vol)

Sistema de solvente	Recuperação	Pureza HPLC (níveis de impureza)			
		Produto	Imp 1	Imp 2	Imp 3
IPA 10 vol	460 mg (92%)	97,6%	1,1%	0,7%	0,3%
1:3 EtOH:H2O 5 vol	451 mg (90%)	96,2%	1,4%	0,8%	0,5%
1:2 EtOH:H2O 5 vol	440 mg (88%)	97,5%	1,3%	0,7%	0,4%
1:1 EtOH:H2O 5 vol	375 mg (75%)	97,9%	1,0%	0,7%	0,3%
2:1 EtOH:H2O 5 vol	354 mg (71%)	97,6%	1,0%	0,6%	0,4%
3:1 EtOH:H2O 5 vol	369 mg (74%)	97,9%		0,9%	0,3%

[342] As pastas fluidas de EtOH/Água de 5 vol eram muito

espessas e não eram facilmente manipuladas. Como a pureza dos sólidos era comparável de todos os ensaios (é provável que haja pequenas variações devido à qualidade da filtração e lavagem), as condições de 100% de IPA foram ampliadas, pois ofereceram uma alta recuperação e a suspensão resultante foi facilmente manipulada.

[343] Uma expansão inicial da pasta fluida preferida deu (recuperação de 92%) com pureza por HPLC de 96,4% (níveis de impureza de 1,2%, 0,7%, 0,4%). A análise dos licores mostrou que eles eram enriquecidos em todas as principais impurezas - 72% (8,6%, 3,8%, 3,4%) por HPLC. Este foi considerado um método de purificação adequado que oferece uma alta recuperação e o material foi testado no Estágio seguinte para garantir que o rastreamento e a remoção das impurezas sejam alcançados a jusante (> 99% no Estágio 3, nenhuma única impureza > 0,5%).

[344] A pasta fluida mostrou-se escalável quando o material bruto do Estágio 2 bruto (ensaio de 70%) foi submetido a uma mistura de água para remover inorgânicos e, em seguida, no IPA para fornecer material de pureza aprimorada (97% em pelo ensaio de RMN, 76% de rendimento para o Estágio 2, 96,8% em por HPLC, impurezas a 1,1%, 0,8%, 0,4%).

Síntese de matérias-primas BPF

[345] Uma reação em larga escala foi realizada, no Estágio 2, para suprir a campanha GMP. A reação progrediu como esperado para fornecer o produto bruto que foi suspenso em água e filtrado para fornecer o Estágio 2 que era 93% puro por HPLC. Este foi posteriormente transformado em pasta fluida em 8 vol IPA e filtrado para dar o produto do Estágio 2 (93,7% por HPLC, ensaio de 92%, rendimento ativo de 66%). Como a pureza obtida foi menor do que a observada durante a campanha de desenvolvimento, foi realizado um Teste de uso que confirmou que o Estágio 3 de alta pureza obtido era

adequado para processamento posterior (matéria-prima GMP).

[346] Um segundo lote foi realizado sob condições idênticas para dar o produto bruto que após uma pasta fluida de água era 90% puro por HPLC. Este material foi subsequentemente misturado com água e purificado pela pasta fluida de IPA para dar 384 g do produto do Estágio 2 (93,0% por HPLC, ensaio de 91% de RMN, 60% de rendimento ativo).

[347] Um terceiro lote foi realizado para reabastecer a síntese de GMP. O produto bruto foi purificado com sucesso por uma pasta fluida de água e depois de IPA para fornecer o Estágio 2 (79% de rendimento) com uma pureza aumentada quando comparado aos lotes anteriores (97,3% por HPLC, 96% de análise por RMN).

Experimento

[348] O Estágio 1 (reagente limitante de 1 eq) foi carregado para um frasco sob N_2 seguido por THF (1 vol wrt carga de Estágio 1) e TBME (6 vol wrt carga de Estágio 1). Adicionou-se então cloreto de oxalila gota a gota ao recipiente (1,5 eq.), permitindo que a exotérmica inicialmente aumentasse a temperatura para 35-40ºC e aplicando em seguida resfriamento conforme necessário para manter 35-40ºC. Imediatamente após a adição, a reação foi aquecida a 40ºC e agitada por 2-6 horas. A reação foi amostrada e analisada para finalização, depois resfriada à TA e heptano adicionado (8 vol wrt carga de Estágio 1), dando origem a precipitação de outros sólidos. A reação foi agitada por 10 min e então os sólidos foram deixados repousar. A maioria do solvente foi decantada do sólido que foi então lavado duas vezes com heptano (2 x 6 vol wrt carga de Estágio 1), decantando de maneira semelhante após cada lavagem. Os sólidos foram então amostrados e analisados. O TBME foi carregado no frasco (4 vol wrt carga de Estágio 1) para dar uma pasta fluida amarela que foi resfriada a -20 ºC usando um banho de gelo seco/acetona. Uma solução de Me_2NH a 2M em THF (2 eq) foi adicionada gota a gota ao recipiente durante ~ 15 min, mantendo a

temperatura de -20 ºC a -10 ºC. A mistura de reação foi deixada aquecer lentamente até a TA e agitada durante a noite. Me_2NH adicional pode ser adicionado neste momento, se necessário. A reação foi amostrada e analisada para finalização. A reação foi filtrada, lavada com heptano (2 x 2 vol wrt carga de Estágio 1) e os sólidos isolados secos a 60 ºC sob vácuo. O Estágio 2 bruto foi empastado em água (8 vol wrt carga de Estágio 1) por 2-18 horas e depois filtrado, lavado com água (2 vol wrt carga de Estágio 1). Os sólidos foram secos a 60 ºC sob vácuo para obter o Estágio 2 bruto com <2% em p/p de água (determinado por titulação de Karl Fischer (KF)). O Estágio 2 em bruto foi suspenso em IPA (10 vol) por 2-18 horas e depois filtrado, lavado com IPA (1 vol wrt massa bruta de Estágio 2) e seco em estufa sob vácuo a 60 ºC.

[349] As diferenças de JNP e os benefícios podem ser resumidos da seguinte forma:

Etapa 1

i) Em primeiro lugar, o uso de um sistema solvente THF/TBME no lugar de dietil éter era menos volátil e inflamável.

ii) Em segundo lugar, a adição de cloreto de oxalila foi realizada a uma temperatura elevada, aquecida a 40 ºC, dando origem a uma solubilidade melhorada e impedindo a retenção do produto do Estágio 1 no precipitado. Também forneceu uma alta taxa de reação, melhores níveis de conclusão e tempos de reação mais curtos.

iii) Em terceiro lugar, o Intermediário 2A foi isolado para permitir a purificação do excesso de cloreto de oxalila.

iv) Em quarto lugar, foi adicionado heptano para ajudar a precipitar o Intermediário 2A.

Etapa 2

v) Ao garantir que a amina fosse usada em excesso, obtinha-se muito mais pureza e rendimentos, devido à presença mínima de água e, portanto, à hidrólise reduzida.

vi) Finalmente, o uso de pastas fluidas de água e IPA proporcionou boa pureza ao produto do Estágio 2.

EXEMPLO 4

Estágio 3

[350] Uma reação de ensaio de Estágio 3 inicial foi realizada usando material purificado do Estágio 2 (> 99% por HPLC) e as condições de reação fornecidas. O material de inserção do Estágio 2 foi considerado insolúvel em THF e, em vez de adicionar uma solução do Estágio 2 ao $LiAlH_4$, foi realizada a adição reversa. 4 eq de $LiAlH_4$ foram usados como uma solução 1M em THF com a adição feita a 20-25 ºC, durante ~ 2 horas. Neste ponto, 10% do produto foi observado com várias espécies intermediárias presentes. A reação foi aquecida ao refluxo por ~ 7 horas para dar 93% de conversão do produto (por HPLC). A reação foi processada para dar o produto bruto do Estágio 3 (~ 90% por HPLC, ~ 90% por RMN, ~ 87% de rendimento corrigido).

[351] Uma reação de ensaio foi realizada em que a carga de $LiAlH_4$ empregada foi reduzida com sucesso (3 eq vs 4 eq). Esperava-se que isso beneficiasse o procedimento, reduzindo a quantidade de sais de Li e Al gerados. Após aquecimento prolongado ao refluxo (10-18 horas), o intermediário da reação foi amplamente consumido (2-3% restante) com ~ 95% do produto por HPLC.

<u>Desenvolvimento de procedimento</u>

[352] Embora a primeira reação de ensaio tenha sido processada com sucesso com sal de Rochelles, os volumes empregados foram muito altos (~ 100 vol) e esse procedimento não formaria um processo viável para aumentar a escala. Uma variedade de procedimentos alternativos de análise foi examinada para tentar reduzir os volumes necessários e ajudar na remoção de sais de Li/Al.

[353] Um arrefecimento com volume reduzido foi testada com EtOAc e depois com sal de Rochelles. Sólidos cinzentos estavam

presentes como uma pasta fluida espessa que se assentou no fundo do frasco. Enquanto a filtração falhasse, os licores poderiam ser decantados e os sólidos novamente misturados com THF/EtOAc para extrair o produto. Um procedimento aquoso foi realizado e o produto foi isolado por concentração. Isto produziu um produto de boa pureza (90-95% por RMN) com um bom rendimento (94% não corrigido para pureza). No entanto, o processo não era facilmente passível de expansão.

[354] Uma reação foi arrefecida bruscamente por adição de EtOAc e depois saturada. Na_2SO_4 na presença de Na_2SO_4 anidro para atuar como um agente de ligação. A reação deu sólidos granulares que poderiam ser facilmente filtrados. Um procedimento aquoso foi realizado e o produto foi isolado por concentração. Um bom rendimento foi obtido (~ 94% não corrigido quanto à pureza), mas o produto continha níveis mais altos da impureza principal por RMN (10% vs 2-4% geralmente observado).

[355] Uma reação foi arrefecida bruscamente com 20% de AcOH a 0ºC, levando à formação de um gel que não pôde ser filtrado. A reação foi abandonada.

[356] Uma reação foi arrefecida bruscamente com EtOAc e depois com ácido cítrico a 20% para dar sólidos que poderiam ser separados por filtração. Os licores foram concentrados para obter o produto. Enquanto este procedimento apresentava um rendimento ligeiramente inferior (~ 77% não corrigido quanto à pureza), o produto era de pureza muito alta (> 95%).

[357] Uma reação adicional foi arrefecida bruscamente pela adição de EtOAc e depois água (3 mL por g de $LiAlH_4$ em THF). Formou-se um gel que não pôde ser facilmente filtrado e a reação foi abandonada.

[358] Finalmente, uma reação foi arrefecida bruscamente pelo método de Fieser. Foi feita uma adição de água (1 mL por g de $LiAlH_4$),

em seguida NaOH a 15% (1 mL por g de $LiAlH_4$) e finalmente água (3 mL por g de $LiAlH_4$). Isto deu sólidos que podiam ser filtrados a partir da mistura de reação. Os licores foram então repartidos e concentrados *in vacuo* (rendimento de 87%, 90-95% por RMN).

[359] Esses experimentos estão resumidos na tabela 15 abaixo:

Tabela 15 - Resumo das condições alternativas de processamento

#	Procedimento de procedimento	Rendimento	Pureza
3.1	Arrefecimento de EtOAc Sal de Rochelles (vol. reduzido)	2,8 g (94% não corrigido)	90-95% por RMN
3.2	Arrefecimento de EtOAc na presença de Na_2SO_4	2,8 g (94% não corrigido)	~80-85% por RMN, 10% imp.
3.3	20% de arrefecimento de AcOH	Emulsão (reação para desperdício)	
3.4	Arrefecimento de EtOAc 20% de ácido cítrico	i) 529 mg (71% não corrigido) ii) 2,3 g (77% não corrigido)	>95% pureza por RMN
3.5	Arrefecimento de água	Emulsão (reação para desperdício)	
3.6	Arrefecimento de água/NaOH	i) 615 mg (83% não corrigido) ii) 2,6 g (87% não corrigido)	90-95% por RMN

[360] Ambos os arrefecimentos com ácido cítrico e NaOH deram sólidos que podiam ser facilmente filtrados da mistura de reação e exigiam volumes mínimos de solvente. Enquanto as condições com NaOH eram de maior rendimento (~ 10%), o produto obtido com este procedimento era menos puro e provavelmente exigiria uma purificação adicional antes do uso no próximo Estágio. O menor rendimento com ácido cítrico foi provavelmente devido a alguma precipitação do sal de citrato do produto. Isso teve um efeito purificador com o produto limpo

obtido diretamente após a concentração. Essas condições foram escolhidas para aumentar a escala e esperava-se que uma otimização adicional da carga de ácido cítrico permitisse que o produto limpo fosse isolado com alto rendimento desse processo.

[361] A reação foi repetida com uma carga de ácido cítrico ligeiramente reduzida para tentar maximizar a recuperação. Esta reação produziu um produto com um rendimento de 57%, com um rendimento adicional de 20% obtido por reempastamento da torta de filtro em THF (ambas as amostras 97,7% por HPLC).

[362] A reação foi escalonada. No entanto, durante o arrefecimento de EtOAc, onde a reação foi previamente vista espessando-se, a reação formou uma goma no frasco para formar uma massa espessa que restringe a mistura. Enquanto a adição de ácido cítrico levou à pasta fluida/gel usual, que não representou um processo viável. Esta reação foi processada com a torta de filtro reempastada em THF para maximizar a recuperação, dando 76% de rendimento ativo, 95,0% por HPLC.

[363] A reação foi repetida a fim de desenvolver um melhor resfriamento e evitar a formação de goma observada com EtOAc. Uma porção foi arrefecida bruscamente pela adição de acetona, o que levou a uma suspensão/emulsão prontamente agitada sem sinal de espessamento. O tratamento com ácido cítrico foi então realizado para dar uma mistura filtrável. Este arrefecimento foi realizado com sucesso no restante da reação e processado para fornecer o produto bruto com bom rendimento (ensaio de 71%, rendimento corrigido de 82%, 98,0% por HPLC).

[364] Após o arrefecimento, verificou-se que a mistura de reação era geralmente pH 8/9. Como parte do processo de otimização da investigação, diferentes pHs foram investigados. Uma reação foi dividida para processamento com metade recebendo uma carga de

ácido cítrico ligeiramente reduzida (para obter pH 11/12 após o término) e a outra metade levada a pH 7 pela adição de mais ácido cítrico. A reação de pH 11 foi processada para dar material de ensaio de RMN a 85% (73% de rendimento) com a reação de pH 7 dando origem a ensaio de RMN de 60% (rendimento de 62%). Ficou claro a partir deste resultado que a obtenção do pH correto após o arrefecimento era fundamental para dar um rendimento >70%. Ao reduzir a carga de ácido cítrico apenas levemente (ainda aprox. 2 vol. De 20% de ácido cítrico) e aprox. 8% de aumento no rendimento foi obtido. Com essas informações em mãos, o pH das reações futuras foi monitorado durante a arrefecimento, a fim de garantir que a mistura permanecesse fortemente básica.

Desenvolvimento de purificação

[365] Uma triagem de purificação foi realizada utilizando porções de 100 mg de produto bruto Psilocina que foram suspensas em 10 vol de solvente com ciclo de aquecimento a 60 ºC. As pastas fluidas foram resfriadas à temperatura ambiente durante o fim de semana e, em seguida, os sólidos coletados por filtração. A estabilidade ao ácido e à base também foi testada com o objetivo de realizar uma análise de ácido/base. Os resultados da tela são apresentados na Tabela 16 abaixo:

Tabela 16 – Triagem de purificação de psilocina. (Pureza da inserção e 3 níveis principais de impureza: 90,2%, 3,8%, 0,9%, 0%).

Solvente	Observações	Recuperação (aprox.)	Pureza HPLC (e níveis de pureza principais)
MeOH	Solução a TA	n/a	n/a
EtOH	Solução a 60°C Precipitado a TA	35 mg	97,2%, 0,4%, 1,1%, 0,8%
IPA	Pasta fluida a 60°C	51 mg	97,6%, 0,5%, 0,5%, 1,1%
MeCN	Solução a 60°C Precipitado a TA	46 mg	96,8%, 0,6%, 0,4%, 1,6%

EtOAc	Pasta fluida a 60°C	58 mg	97,1%, 0,9%, 0,2%, 1,3%
^{i}PrOAc	Pasta fluida a 60°C	58 mg	98,2%, 0,8%, 0,2%, 0,4%
Tolueno	Pasta fluida a 60°C	70 mg	93,3%, 3,6%, 0,2%, 0,8%
Heptano	Pasta fluida a 60°C	77 mg	91,3%, 3,8%, 0,2%, 0,7%
Acetona	Solução a 60°C Precipitado a TA	30 mg	97,7%, 0,4%, 0,3%, 0,9%
MEK	Solução a 60°C Precipitado a TA	24 mg	97,3%, 0,5%, 0,5%, 1,2%
MIBK	Pasta fluida a 60°C	49 mg	97,4%, 0,6%, 0,2%, 1,3%
THF	Solução a TA	n/a	n/a
TBME	Pasta fluida a 60°C	67 mg	95,5%, 2,0%, 0,1%, 1,5%
DCM	Solução a TA	n/a	n/a
1M HCl	Solução a TA	n/a	83,7%, new imp 8%
1M KOH	Pasta fluida a TA (preta)	n/a	89,1%, 5,4%, 0,9%, 2,2%

[366] A primeira das três impurezas destacadas correspondeu ao intermediário de reação mais estável que é observado a ~ 70%, quando a adição de $LiAlH_4$ está completa (exigindo refluxo para converter em produto). A terceira impureza não estava presente na inserção e parecia ser gerada durante o procedimento de pasta fluida. Dos solventes que permaneceram como uma pasta fluida, o iPrOAc deu a mais alta pureza. Várias recristalizações foram encontradas com MeCN com potencial para remover impurezas durante a cristalização e com uma recuperação com potencial para melhorar durante o desenvolvimento. Alguma degradação foi observada no ácido e na base, com a amostra de KOH rapidamente ficando preta.

[367] A purificação do material bruto do Estágio 3 foi ampliada usando os dois solventes mais promissores (MeCN e iPrOAc). Os volumes de solvente foram reduzidos ao mínimo para melhorar a recuperação. Os resultados desses ensaios são apresentados na

Tabela 17 abaixo.

Tabela 17 - Desenvolvimento adicional da purificação de MeCN/iPrOAc

Solvente	Observações	Recuperação (%)	Pureza HPLC (e níveis de impureza principais)
MeCN (5 vol)	Recrist em 5 vol	512 mg (51%)	97,6%, 0,7%, 0,8%, 0%
^{i}PrOAc (3 vol)	Pasta fluida em 3 vol	706 mg (71%)	95,8%, 1,3%, 0,6%, 0%

[368] Uma recristalização foi obtida de MeCN em 5 vol e uma pasta fluida quente foi obtida em iPrOAc a 3 vol (ambos a 75ºC). A recuperação do MeCN foi novamente ruim, apesar dos volumes reduzidos, no entanto, o produto era de pureza muito alta (>> 95% por RMN). A recuperação do iPrOAc foi melhor com um grande aumento na pureza do produto quando analisada por RMN (~ 95%).

[369] Embora a pureza do material por HPLC e RMN da pasta fluida de iPrOAc tenha sido alta, foi observado um baixo valor de ensaio (85% pelo ensaio de RMN). A fim de melhorar o valor do ensaio do material, bem como remover a cor, (todos os materiais obtidos até o momento eram fortemente roxos, verdes ou marrons), a purificação por sílica foi investigada.

[370] A psilocina bruta (ensaio de 71%, 98,0% por HPLC) foi passada através de 4 eq de sílica eluindo com THF. Uma recuperação de 80% Obteve-se uma mistura de um sólido esbranquiçado com pureza por HPLC ligeiramente melhorada (98,4%) e valor do ensaio (~ 82%). Isso provou ser um meio eficaz de aumentar o valor do Teste do produto e, portanto, foi incluído como parte da análise da reação.

[371] Uma série de pastas fluidas iPrOAc/antissolvente (Tabela 18) foi então realizada usando a inserção tratada com sílica (100 mg por pasta) para tentar melhorar a recuperação, mantendo a pureza química (pureza de inserção 98,4%).

Tabela 18 - Resultados das adições de iPrOAc/antissolvente.

Sistema de solvente	Recuperação	Pureza HPLC
^{i}PrOAc 5 vol	78%	99,7%
1:1 ^{i}PrOAc:Heptano 5 vol	70%	99,6%
1:1 ^{i}PrOAc:TBME 5 vol	83%	99,7%
1:1 ^{i}PrOAc:Tolueno 5 vol	84%	99,4%
^{i}BuOAc 5 vol	80%	99,6%

[372] Como todos os valores de pureza eram comparáveis, dois sistemas de solventes foram escolhidos para aumentar a escala com base nas maiores recuperações obtidas. As duas pastas fluidas favoritas (TBME e Tolueno como antissolvente) foram aumentadas (1,0 g por pasta fluida) para avaliar melhor a recuperação.

Tabela 19 - Escala dos métodos de purificação favorecidos

Sistema de solvente	Recuperação	Pureza HPLC
1:1 ^{i}PrOAc:TBME 5 vol	79,9%	99,1%
1:1 ^{i}PrOAc:Tolueno 5 vol	79,4%	99,6%

[373] Ambas as opções forneceram material com pureza >99% de HPLC com recuperação de ~ 80% e, combinadas com uma almofada de sílica, parecem fornecer um meio eficaz de purificação para o produto Psilocina. Cor adicional foi removida nos licores durante a pasta fluida dando Psilocina como um sólido branco. Todas as impurezas foram efetivamente removidas para menos de 0,5%. A pasta fluida iPrOAc:TBME foi escolhida para aumento de escala, pois usava solventes ICH classe 3 não tóxicos.

Aumento de escala

[374] As condições desenvolvidas do Estágio 3 foram ampliadas e a reação progrediu para dar uma conclusão de 94,4% do produto com

2,9% do intermediário de reação presente por HPLC após a noite em refluxo (típico do processo). Depois de uma almofada de sílica, a Psilocina foi obtida com 83% de pureza por ensaio de RMN, 66% de rendimento ativo, 97,0% por HPLC. Este material foi ainda purificado por pasta fluida em iPrOAc/TBME para dar material 100% por ensaio de RMN com 62% de rendimento e 99,7% por HPLC.

[375] Devido ao rendimento bruto da reação ser menor do que o esperado (66% vs ~ 75%), a torta de filtro e a almofada de sílica foram novamente investigadas, a fim de tentar recuperar material adicional. No entanto, isso não teve êxito.

[376] O rendimento menor do que o esperado pode ter sido devido à decomposição do produto durante a preparação, embora Testes de estresse anteriores tivessem indicado que o material era estável nas condições utilizadas. Para investigar isso adicionalmente, a reação foi repetida. O produto bruto foi isolado antes da almofada de sílica e amostras adicionais de Teste de estresse foram tomadas para confirmar a degradação do produto durante o procedimento.

[377] A reação progrediu como esperado para dar conclusão (produto 93,7%, intermediário 2,9%) e foi concentrada produzindo material bruto (ensaio de RMN de 77%, rendimento ativo de 66%). A torta de filtro foi misturada novamente com THF/MeOH, mas Psilocina significativa não foi isolada. Para tentar deslocar qualquer produto que foi coordenado com os sais de alumínio, mais ácido cítrico foi adicionado para elevar o pH a 4 (de pH 8) e a torta foi novamente misturada com THF, mas novamente nenhuma Psilocina significativa foi isolada. O balanço de massa não foi obtido a partir da reação com o rendimento ativo de 66% correspondendo intimamente ao que foi obtido anteriormente. Este lote foi purificado por sílica e pasta fluida em iPrOAc/TBME para dar um rendimento de 62% de material de alta pureza (99,8% por HPLC).

[378] Apesar dos volumes de solvente empregados serem relativamente altos e de uma almofada de sílica ser necessária para a remoção de espécies de alumínio e lítio, o processo ainda era adequado à escala necessária.

[379] A reação do Estágio 3 foi escalonada para processar. A reação prosseguiu como esperado para completar após 18 horas (~ 91% do produto, ~ 3% de intermediário de reação restante). O procedimento com almofada de sílica e pasta fluida deu um rendimento de 57% de Psilocina de alta pureza (> 99% por HPLC, 99% de ensaio por RMN, 0,35% em peso de água Karl Fischer).

Experimento

[380] O Estágio 2 (1 eq de reagente limitador) foi carregado no frasco, seguido por THF (5 vol wrt carga de Estágio 2). A mistura foi arrefecida a 0 ºC e adicionou-se gota a gota uma solução de THF a 1M de $LiAlH_4$ (3 eq.) ao longo de 30-45 minutos, mantendo a temperatura entre 0-20 ºC. Após a adição, a reação foi agitada por 30 min a 10-20ºC e depois aquecida ao refluxo e agitada por ~16 horas. A reação foi amostrada e analisada para finalização, resfriada a 0ºC e arrefecida bruscamente por adição gota a gota de acetona (9,3 eq.) A 0-30ºC, seguida por uma solução de ácido cítrico aq. a 20% (1,9 vol wrt carga de Estágio 2) a 0-30ºC. O pH da adição foi monitorado para garantir que permaneça em pH > 11 e a adição foi interrompida mais cedo, se necessário. A suspensão resultante foi agitada durante 1 hora e filtrada, lavada com THF (2 vol wrt carga de Estágio 2) para remover os sais de Li e Al. A torta de filtro foi transformada em pasta fluida em THF (12,5 vol wrt carga de Estágio 2) por ~ 1 hora e filtrado, lavado com THF (5 vol wrt carga de Estágio 2) para recuperar o produto dos sais Li e Al. Os orgânicos combinados foram secos sobre $mgSO_4$ e filtrados. O filtrado foi evaporado *in vacuo* até aproximadamente 10 volumes restantes (wrt carga de Estágio 2) e esta solução foi aplicada a uma almofada de sílica

(3 eq wrt carga de Estágio 2). A almofada de sílica foi eluída com THF e as frações do produto foram combinadas e evaporadas até à secura *in vacuo*. O Estágio bruto 3 (Psilocina) foi suspenso em 1:1 iPrOAc:TBME (5 vol wrt massa volumétrica na etapa 18) por 2-18 horas, filtrado, lavado com TBME (2,5 vol wrt massa volumétrica na etapa 18) e seco *in vacuo* a 40 ºC para isolar Psilocina pura.

[381] As diferenças de JNP e os benefícios podem ser resumidos da seguinte forma:

[382] i) Em primeiro lugar, a Requerente, enquanto usando THF como solvente, arrefeceu o alcance usando acetona. Isso levou a uma suspensão/emulsão sem espessamento.

[383] ii) Em segundo lugar, a Requerente arrefeceu com ácido cítrico mantendo um pH básico, tipicamente cerca de 11. O controle de pH garantiu altos rendimentos.

[384] iii) Em terceiro lugar, após purificação por sílica, para remover sais residuais de Li/Al, eluindo com THF, uma pasta fluida iPrOAc:TBME fornece um produto altamente purificado que foi então seco.

EXEMPLO 5

ESTÁGIO 4

[385] Inicialmente, as condições da literatura foram usadas para processar uma amostra de 2,58 g, dando ~88% de conversão para o Intermediário 4A, quando analisadas por HPLC. O produto foi purificado pela adição de sílica de aminopropila e filtração através de Celite. O óleo verde resultante (5,5 g) foi transformado em pasta fluida em DCM, dando transferência de benzila e precipitação de Estágio zwitteriônico 4 (4,1 g, rendimento de 70%, ~ 95% por RMN).

Etapa i

[386] O desenvolvimento inicial neste Estágio foi focado em encontrar uma alternativa para nBuLi que fosse mais fácil de manusear

e, idealmente, não introduzisse mais lítio na síntese. Uma tela inicial de condições alternativas foi realizada, incluindo as seguintes bases: Li^{t}BuO, K^{t}BuO, NaH, NaHMDS e $NaNH_2$. Todas as reações deram produto com NaHMDS executando bem como nBuLi. Todas as reações se tornaram muito espessas com gelificação observada e a agitação aérea foi recomendada para agitação eficiente.

[387] A triagem inicial sugeriu que NaHMDS seria uma alternativa adequada ao nBuLi (conversão de 81% ao produto/Intermediário 4A). Essas condições foram dimensionadas para 1,5 g ao lado de uma reação de referência com nBuLi. A agitação aérea foi usada em ambos os casos.

Tabela 20 - Comparação de nBuLi e NaHMDS

Ponto no tempo	HPLC - ^{n}BuLi	HPLC - NaHMDS
1 h, -30°C	6,6% St 3, 78% Int 4A, 1% St 4	<1% St 3, 78% Int 4A, 4% St 4
2 h, 0°C	6,5% St 3, 77% Int 4A, 1% St 4	<1% St 3, 76% Int 4A, 4% St 4
Produto bruto	4,89 g <1% St 3, 2% Int 4A, 60% St 4	4,38 g <1% St 3, 5% Int4A, 68% St 4

Abreviações usadas na tabela: St 3 = Estágio 3, Int 4A = Intermediário 4A, St 4 = Estágio 4

[388] O perfil da reação obtido em ambos os casos foi muito semelhante ao da reação de NaHMDS, resultando no consumo do Estágio 3. Ambas as reações foram filtradas em Celite para remover um precipitado branco e concentradas. Por RMN, excesso de prótons de benzila estava presente em ambos os casos (especialmente no exemplo com nBuLi) e o rendimento isolado foi > 100%. As condições de NaHMDS provaram ser bem-sucedidas, fornecendo um perfil de reação favorável e foram escolhidas para maior escala. No entanto, foi necessário o desenvolvimento da preparação e purificação.

Etapa ii

[389] Os dados de HPLC indicaram que o material isolado dos ensaios acima usando NaHMDS e ^{n}BuLi foi reorganizado para dar o

Estágio 4 zwitteriônico após a concentração. A purificação deste material para longe dos subprodutos do ácido benzilfosfórico e outras impurezas foi tentada pela pasta fluida em vários solventes.

Tabela 21 - Purificação de triagem do produto bruto do Estágio 4

Solvente	Massa recuperada	Pureza HPLC
DCM	Sólido branco	84% St 4
EtOH	Goma	-
EtOAc	Goma	-
IPA	Sólido branco	88% St 4
Tolueno	Goma	-
TBME	Sólido branco	62% St 4
MIBK	Goma	-
MeCN	Goma	-
Acetona	Sólido branco	86% St 4

Abreviações usadas na tabela: St 4 = Etapa 4

* Filtragem fraca

[390] Sólidos brancos foram obtidos a partir de vários solventes, no entanto, os sólidos obtidos de DCM e TBME tornaram-se uma goma roxa pálida quando armazenados no fim de semana. Aqueles obtidos com IPA e acetona permaneceram como sólidos brancos de fluxo livre no armazenamento, sugerindo que a estabilidade desses sólidos provavelmente era maior e permitiria um manuseio mais fácil.

[391] As pastas fluidas em IPA e acetona foram aumentadas para 1 g. No entanto, observou-se goma imediatamente após a adição do solvente. A goma foi lentamente dispersa por agitação vigorosa e, eventualmente, mostrou sinais de cristalização, com uma pasta fluida branca se formando após uma agitação durante a noite. No entanto, esse processo não foi adequado para aumento de escala. Os sólidos foram isolados com bom rendimento com IPA, proporcionando a mais

alta pureza.

[392] THF também foi investigado, pois tinha vantagens porque também era o solvente da reação. No entanto, quando este foi testado, formação de goma foi novamente observada (rendimento ~ 80% isolado, ~ 92% em por HPLC). Para tentar evitar a formação de goma e dar uma cristalização mais controlada, o Estágio bruto 4 foi primeiro solubilizado em um baixo volume de DMSO (2 vol). THF foi então adicionado a este (10 vol) e a solução foi agitada no fim de semana. Isso deu lentamente a precipitação do produto que foi coletado por filtração e lavado com THF para produzir Estágio 4 (86% de rendimento) com 96% de pureza por HPLC (> 95% por RMN).

[393] Como a cristalização de THF foi bem-sucedida e foi observado anteriormente que a conversão completa no Estágio 4 zwitteriônico ocorreu durante a concentração dos licores de reação (THF/EtOAc) a 40ºC, esperava-se que as alterações do solvente pudessem ser evitadas e o produto cristalizado diretamente agitando a mistura de reação a 40ºC.

[394] Duas reações de NaHMDS de 4 g foram realizadas, com ambas as reações chegando a uma conclusão com ~ 80% de conversão no Intermediário 4A. Uma reação foi diluída com EtOAc e a outra com THF e ambas foram filtradas para remover os subprodutos de fosfato. A fim de reduzir ainda mais os níveis de impureza do fosfato, foi realizada uma lavagem com salmoura e os orgânicos secos e concentrados a 10 vol. Estas soluções foram agitadas durante a noite a 40ºC para dar conversão e precipitação do Estágio 4 (~ 1% Estágio 3, ~ 0,2% Intermediário 4A, ~ 82% Estágio 4). Os sólidos foram recolhidos por filtração dando 8,03 g (88% de rendimento) de EtOAc/THF e 5,65 g (62% de rendimento) de THF. Os sólidos marrom/cinza obtidos de EtOAc/THF eram de menor pureza (~ 90% por HPLC, ensaio de 78%) quando comparados com os sólidos brancos obtidos de THF (97% por

HPLC, ensaio de 88%). A análise da camada aquosa da reação THF mostrou que o produto estava presente e ocorreram perdas adicionais no filtrado final de THF.

[395] Devido à maior pureza obtida a partir de THF, este solvente foi investigado ainda mais para otimizar a recuperação. A lavagem com salmoura foi omitida devido a perdas de produto na camada aquosa e a mistura de reação foi ainda mais concentrada após a reação para minimizar as perdas durante a etapa final de filtração. Este novo procedimento foi testado em uma escala de 75 g com porções da mistura de reação concentradas a 8 vol e 6 vol. Após a filtração, não foi observada diferença no rendimento entre as duas porções com um rendimento total de 140,4 g (90% por ensaio de RMN, 74% de rendimento ativo, 90% por HPLC).

Rastreamento de impurezas

[396] Três impurezas principais foram observadas no produto isolado, com identidades para duas dessas espécies propostas com base nos dados de MS.

[397] A impureza desbenzilada (tipicamente ~ 2-5% por HPLC) mostrou dar psilocibina durante a hidrogenação seguinte e, portanto, poderia ser tolerada em um nível mais alto. A principal impureza observada no Estágio 4 isolado (tipicamente ~ 5-8% por HPLC) foi a impureza do anidrido. Isto foi rastreado através da hidrogenação subsequente e demonstrou ser facilmente removido por recristalização da água como a impureza de pirofosforato altamente solúvel que resulta da desbenzilação. A outra principal impureza observada (m/z 295,2 observada por LCMS) foi controlada para menos de 2%, limitando a temperatura da reação (abaixo de -50 °C) e não foi observada na psilocibina após hidrogenação.

[398] O perfil de impureza do lote de 140 g produzido acima mostrou 90,0% no Estágio 4, 6,4% de impureza com anidrido, 0,2% de

impureza desbenzilada por N e 1,2% da impureza m/z 295,2.

Síntese de GMP

[399] O primeiro lote de Estágio 3 em larga escala (544 g de inserção) foi concluído usando o procedimento estabelecido para fornecer 213,5 g (53% de rendimento, 99% por HPLC). Um segundo lote (628,2 g de inserção) também foi processado com sucesso para dar 295,2 g (66% de rendimento, 99% por HPLC).

[400] Alguma variabilidade no rendimento nesta Estágio foi observada em três lotes de grande escala (57%, 53% e 66%). Provavelmente, isso é consequência de pequenas diferenças no procedimento de processamento e resfriamento.

Experimento

[401] O Estágio 3 foi carregado em um frasco seguido de THF (15 vol wrt carga de Estágio 3) e resfriado a ≤ -50 ºC usando um banho de gelo seco/acetona. A solução de NaHMDS a 1M em THF (1,13 eq) foi carregada mantendo uma temperatura de ≤ -45 ºC, alvo <-50 ºC. A reação foi agitada por 30 minutos a -60 a -50 ºC. Tetrabenzilpirofosfato (2,26 eq) foi carregado para a reação em uma única porção seguida por THF adicional (20 vol) enquanto se mantinha a temperatura da reação <-30 ºC. A reação foi aquecida a 0 ºC, durante 1,5-2 horas e amostrada para finalização. A reação foi filtrada para remover os sais de fosfato lavando com THF (8 vol). O filtrado foi concentrado até restarem 6-8 vol e agitado durante a noite a 40 ºC para converter o produto Intermediário 4A no Estágio 4. A reação foi amostrada para finalização e depois filtrada e o sólido lavado com THF (2vol). O produto do Estágio 4 foi seco em um forno a vácuo a 40 ºC.

[402] As diferenças de JNP e os benefícios podem ser resumidos da seguinte forma:

Etapa i

i) Primeiramente, a hexametildisilazida de sódio foi

introduzida para suportar desprotonação. Isso provou ser uma alternativa eficaz ao Butil Lítio, que era mais fácil de manusear e não introduziu mais lítio na reação.

ii) Em segundo lugar, ao diluir a reação com THF, foi obtido um Intermediário 4A de pureza muito maior.

iii) Em terceiro lugar, ao controlar a temperatura da reação abaixo de -50ºC, mz 295,2 indesejável observado por LCMS foi controlado a níveis inferiores a 2%.

Etapa ii

iv) Em quarto lugar, ao monitorar os níveis de impurezas do Estágio 4A, particularmente o Estágio 4 desbenzilado por N (Tabela 7) e o Estágio 4 de anidrido (Tabela 7), um produto puro pode ser produzido de forma reprodutível.

v) A conversão do Estágio intermediário 4A para o Estágio 4 pode ser realizada no solvente da reação, evitando a necessidade de troca de solvente demorada.

vi) Finalmente, o sólido obtido é lavado com THF e seco no forno para obter o Estágio 4.

EXEMPLO 6

ESTÁGIO 5

[403] O envenenamento por catalisador foi observado durante o desenvolvimento deste Estágio e uma etapa de charcolation pode ser incluída no processo quando necessário para evitar a hidrogenação incompleta. No entanto, a charcolation não é rotineiramente necessária.

[404] Após aspersão com hidrogênio por 3 horas, as reações típicas mostraram altos níveis de conclusão (> 90% do produto, 3-5% de SM restante). Foi adicionada uma pequena quantidade de água para ajudar a solubilidade e após aspersão com hidrogênio por mais 1 hora, foi alcançado o consumo do Estágio 4.

[405] Uma reação bem sucedida foi processada por filtração,

seguida de evaporação para remover o metanol, deixando o produto como uma suspensão espessa em água. Etanol foi adicionado e o sólido foi filtrado para dar psilocibina com um rendimento de 69%. ^{1}H RMN confirmou a identidade do produto, mas indicou que havia uma pequena impureza relacionada. A análise por LCMS indicou uma pureza de 95,2% com a maior impureza (4,1%) sendo identificada como a impureza do ácido pirofosfórico. (Tabela 7) decorrente da impureza do anidrido no Estágio 4. Foi mais tarde demonstrado que essa impureza foi efetivamente purgada durante a recristalização do produto final (Estágio 6).

[406] Uma outra reação foi então realizada usando o material do Estágio 4 do tratamento finalizado com THF, que era 88,0% puro por HPLC e continha 7,3% de Estágio 4-desbenzilado com N (convertido em produto), sem nenhuma impureza do anidrido. Novamente, a conclusão foi observada e a reação funcionou como anteriormente para dar psilocibina com 46% de rendimento. Pensa-se que o baixo rendimento resulta da precipitação do produto durante a etapa de filtração do catalisador. ^{1}H RMN confirmou a identidade do produto e HPLC indicou uma pureza de 98,9%.

[407] Um desenvolvimento adicional das condições de reação foi realizado para otimizar o volume de água empregado e minimizar as perdas do produto durante a etapa de filtração. Após a reação, uma solução foi obtida por adição de 10 volumes de água com aquecimento a 40ºC. Isso permitiu a remoção do catalisador por filtração, sem incorrer em perdas de produto no filtro.

[408] Algum estágio 3 foi gerado por hidrólise durante a reação e processamento com níveis de aprox. 1 - 2,5% que parece ser típico do processo. Foi demonstrada uma redução no nível do Estágio 3 durante a recristalização do produto final.

Aumento de escala

[409] O lote do Estágio 4 em larga escala (não GMP) foi processado como um único lote (148 g de inserção ativa). O consumo do Estágio 4 foi alcançado com 88% do produto e 0,9% do Estágio 3 resultante da hidrólise. A impureza do anidrido (6,4%) foi completamente convertida em impureza de ácido pirofosfórico correspondente (5,2%).

[410] A hidrogenação em larga escala foi filtrada e concentrada para produzir 109 g de produto bruto após retirada do etanol para reduzir o teor de água (~ 71% pelo Teste de RMN, 86% de rendimento).

Experimento

[411] 10% de Pd/C (~ 50% de umidade de água, tipo 87L, 0,1 x carga de Estágio 4) foram carregados em um frasco sob N_2, seguido por metanol (20 vol wrt Estágio 4) e Estágio 4. O N_2 foi substituído por H_2 e a reação foi agitada sob H_2 (pressão atmosférica) por 1-2 horas. A reação foi amostrada para finalização e, em seguida, foi adicionada água (10 vol wrt Estágio 4), mantendo uma temperatura de <25ºC. A mistura foi agitada por mais 1-2 horas sob H_2 (pressão atmosférica). A reação foi amostrada e verificada quanto à conclusão.

[412] Se a reação estava incompleta, o H_2 era recarregado e a reação continuava por mais 1-12 horas até que a conclusão fosse observada. A reação foi então colocada sob N_2 e aquecida a 40 ºC e mantida por 15-45 minutos. A reação foi filtrada através de celite para remover o catalisador, lavando com metanol (13,3 vol wrt carga de Estágio 4) e água (6,7 vol wrt carga de Estágio 4). O filtrado foi concentrado *in vacuo*, azeotropando com etanol para remover a água até se obter um sólido. As diferenças de JNP e os benefícios podem ser resumidos da seguinte forma:

[413] Primeiramente, a reação é monitorada quanto aos níveis de intermediários por HPLC, usando tempos de retenção relativos (RRT) e a conclusão controlada com os intermediários presentes em menos de

0,2%. A impureza do ácido pirofosfórico no Estágio 5 também é cuidadosamente monitorada para confirmar que pode ser controlada na recristalização final.

[414] O processo final do Estágio 6 é como descrito no Exemplo 1.

EXEMPLO 7

METODOLOGIA E PROTOCOLOS DE ENSAIO

[415] Para testar a pureza etc., foram utilizados os seguintes métodos/protocolos.

7.1 RMN

[416] Os espectros ^{1}H e ^{13}C RMN de Psilocibina em D_2O foram obtidos usando o espectrômetro de 400 MHz. Os desvios químicos são relatados em ppm em relação ao D_2O no ^{1}H RMN (□ = 4,75ppm) e em relação ao MeOH (□ = 49,5ppm), que foi adicionado como referência, no espectro ^{13}C RMN. Os valores da literatura para a psilocibina são relatados no JNP. A análise da psilocibina por RMN forneceu dados consistentes com a estrutura e consistentes com os relatados na literatura com apenas pequenas variações nas mudanças químicas dos prótons próximas aos grupos ionizáveis, o que é esperado, pois a natureza zwitteriônica do composto torna o material muito sensível a pequenas mudanças no pH.

[417] Os dados de ^{1}H RMN e ^{13}C RMN estão descritos abaixo e os espectros são mostrados nas Figuras 10 e 11.

[418] Dados de ^{1}H RMN (400 MHz, D_2O): 2,79 (s, 3H), 3,18 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 3,31 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 6,97 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,08 (s, 1H), 7,10 (t, J = 8,0Hz, 1H), 7,19 (d, 8,2Hz, 1H).

[419] Dados de ^{13}C RMN (400 MHz, D_2O (+ traço de MeOH): 22,3 (1 x CH2), 43,4 (2 x CH_3), 59,6 (1 x CH2), 108,4 (1 x CH), 108,6 (1 x C), 109,5 (1 x CH), 119,1 (d, $^{3}J_{P-H}$ = 6,7 Hz, 1 x C), 123,3 (1 x CH2), 124,8 (1 x CH), 139,3 (1 x C), 146,3 (d, $^{2}J_{P-H}$ = 6,7 Hz, 1 x C)

7.2 FT-IR

[420] Os dados foram coletados em um espectrômetro Perkin Elmer Spectrum Two™ com acessório UATR Two. A análise da psilocibina (Lote: AR755) por espectroscopia FT-IR deu um espectro (Fig. 12) que é consistente com a estrutura proposta. O pico amplo em 3244cm^{-1} é típico de um sal de amina. O restante dos picos está na região da impressão digital e, portanto, não pode ser atribuído individualmente.

7.3 ESPECTROMETRIA DE MASSA

[421] O espectro de massa de Psilocibina (AR755) foi obtido em um espectrômetro de massa Bruker Esquire 3000 plus Ion Trap e foi concordante com a estrutura. O espectro de massa (Fig. 13) mostrou um pico principal em m/z = 284,8 e 568,1 que correspondia a $(M + H)^+$ e $(2M + H)^+$ de Psilocibina. Isso implicou que o íon molecular tem m/z 284 correspondente à fórmula molecular da psilocibina ($C_{12}H_{17}N_2O_4P$) (Fig. 14).

7.4 RESÍDUOS NA IGNIÇÃO

[422] O resíduo no método de ignição segue o método da farmacopeia com um ajuste. Resultados inconsistentes foram obtidos quando o cadinho foi aquecido a 500 ºC e acredita-se que isso se deva à baixa volatilidade dos resíduos de fosfato que são gerados. A temperatura foi, portanto, aumentada para 800 ºC para Psilocibina e foram obtidos resultados consistentes e precisos.

7.5 HPLC - ENSAIO E DETERMINAÇÃO DE PUREZA

[423] O método HPLC usado para o Teste, pureza química e quantificação das impurezas da Psilocibina é um método gradiente de HPLC-UV e as condições estão descritas na Tabela 22. Padrões externos são usados para quantificação. Aproximadamente 1 mg/mL de Psilocibina foi dissolvido em Água Purificada:MeOH (95:5). Sonicar para dissolver completamente.

[424] A pureza por HPLC é calculada com base na % em área e

está correlacionada com um padrão de tempo de retenção conhecido.

[425] O ensaio por HPLC é calculado em uma base anidra, com base na % em peso versus um padrão de pureza e composição conhecidos.

Tabela 22: Condições típicas de HPLC para Identificação, Pureza e Ensaio

Parâmetro	Condições
Sistema	Cromatografia Líquida Agilent 1100 series ou equivalente
Coluna	XBridge C18, 4.6 x 150mm; 3.5 µm (Ex; waters PN:186003034)
Taxa de Fluxo	1,0ml.min^{-1}
Volume de Injeção	5µl
Detecção	UV @ 267nm
Temperatura da Coluna	30ºC
Fase Móvel	A – Água Purificada : Metanol : TFA (95:5:0.1) B – Metanol : Água Purificada : TFA (95:5:0.1)
Gradiente	Tempo (min) %A %B 0 100 0 2 100 0 15 0 100 20 0 100 22 100 0

7.6 TEOR DE SOLVENTE RESIDUAL POR HRGC

[426] O método DE HRGC para quantificar solventes residuais é um método de headspace (espaço livre) e está descrito na Tabela 23 abaixo:

Tabela 23: Método de GC de Solvente Residual Típico

Parâmetro	Condições
Sistema	Agilent 6890/7890 HRGC ou similar
Coluna	DB-624 60m x 0,32mm, 1,80 µm de

	espessura do filme (ou equivalente)
Programa de Forno	40°C (mantido por 15min) em seguida aumentado (20°C.min^{-1}) para 200°C (manter 5min)
Headspace Parâmetros	
Temp. do forno	125ºC
Temp de Loop	140ºC
Temp de Linha de Transfer.	150ºC
Razão de Divisão	10:1
Temperatura do Injetor e	200ºC
Temperatura do Detector	250°C, FID
Pressão do Cabeçote	15 psi, pressão constante
Gás veículo	Nitrogênio
Fluxo de Coluna	2,0 ml.min^{-1} @ 40°C
Padrão Interno	1,2-Difluorobenzeno

[427] Os níveis dos seguintes solventes e reagentes são determinados: Metanol, Etanol, THF e Tolueno.

7.7 PONTO DE FUSÃO POR DSC

[428] Os dados do DSC foram coletados em um DSC PerkinElmer Pyris 6000 (ou similar). O instrumento foi verificado quanto à calibração de energia e temperatura usando índio certificado. A amostra foi pesada (tipicamente 0,5 a 3,0 mg) em uma panela de amostras de alumínio com orifício de pino. A panela foi frisada com uma tampa de alumínio. A panela foi aquecida a 20 ºC/min de 30 a 300 ºC com uma purga de nitrogênio seco a 20 mL/min. Durante o procedimento do ponto de fusão, cada lote de Polimorfo A ou A' de psilocibina exibiu dois eventos endotérmicos no último; o primeiro dos quais foi atribuído à transição sólido-sólido do Polimorfo A ou A' para o Polimorfo B, e o segundo foi atribuído à fusão do Polimorfo B.

7.8 POLIMORFISMO POR XRPD

[429] A forma de estado sólido da psilocibina é determinada por

XRPD. Os difratogramas de XRPD foram coletados em um difratômetro (como um PANalytical X'Pert PRO ou equivalente) usando radiação Cu Kα (45kV, 40mA), goniômetro θ-θ, espelho de foco, fenda de divergência (1/2"), fendas de soller em ambas feixe incidente e divergente (4 mm) em condições ambientais. O intervalo de coleta de dados foi de 3-35 °2θ com uma velocidade de varredura contínua de 0,2°s^{-1}. O difratograma resultante é comparado ao de um difratograma de referência do Polimorfo A ou A' para garantir que seja concordante (Fig. 7a ou 7b, respectivamente).

7.9 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

[430] Os dados de TGA foram coletados em um PerkinElmer Pyris 1 TGA (ou similar). O instrumento foi calibrado usando um peso certificado e Alumel e Perkalloy certificados para temperatura. Uma quantidade predefinida de amostra (tipicamente cerca de 5 mg) foi carregada em um cadinho de alumínio e foi aquecida a 20ºC/min da temperatura ambiente a 400ºC. Uma purga de nitrogênio a 20 mL/min foi mantida sobre a amostra.

7.10 PERDA DE SECAGEM

[431] Determinar em duplicado a perda por secagem da amostra usando uma porção de 1g, pesada com precisão, seca a 70ºC, sob vácuo a peso constante.

Cálculo:

$$\%\ \text{Perda na Secagem} = \frac{(W_{INICIAL} - W_{FINAL})}{W_{AMOSTRA}} \times 100$$

Onde:

$W_{INICIAL}$ = Peso inicial do prato e amosrta antes de secagem (g)

W_{FINAL} = Peso final do prato e amosrta seca (g)

$W_{AMOSTRA}$ = Peso da amostra (g)

EXEMPLO 8

Estudos de Degradação Forçada

[432] A substância do fármaco psilocibina foi estressada sob várias condições em solução e no estado sólido para fornecer amostras para avaliar a seletividade do método analítico.

[433] O estudo de degradação forçada foi realizado em psilocibina; com base nos requisitos de ICH Q1A (R2). Testes sob condições estressantes forneceram informações sobre possíveis vias de degradação e a estabilidade intrínseca da Psilocibina. O método analítico otimizado empregado demonstrou especificidade à Psilocibina; mostrou-se adequado e alterações na identidade, pureza e potência do produto podem ser detectadas usando esse método. O método utilizado também demonstrou estar livre de interferências de prováveis impurezas e produtos de degradação, de acordo com ICH Q2 (R1) (Validação de Procedimentos Analíticos) com referência à especificidade. Portanto, o método HPLC é considerado adequado para determinar a pureza da psilocibina e impurezas relacionadas.

[434] A amostra de controle da Psilocibina foi estável em solução durante o período do estudo (o período do estudo foi de 7 dias para amostras sem fotoestabilidade). A psilocibina degradou-se lentamente quando aquecida em solução que produz psilocina como a principal impureza. A psilocibina também foi estável em condições ácidas à temperatura ambiente. No entanto, a 60ºC, foi observada uma degradação lenta e constante, produzindo psilocina como principal impureza. A psilocibina era levemente instável à temperatura ambiente na presença de base com lenta degradação para uma série de impurezas durante o período do estudo. Apenas níveis muito baixos de impurezas foram formados sob condições de peróxido com a pureza geral caindo em ~ 0,5%. No estado sólido, observou-se uma lenta degradação química (3 dias a 150ºC) produzindo predominantemente psilocina (Estágio 3) como uma impureza. A psilocibina era estável sob

condições de fotoestabilidade tanto como sólido quanto quando em solução.

Estudos de Estabilidade

[435] Os estudos de estabilidade foram realizados com dois lotes de psilocibina, tal como mostrado na Tabela 24.

Tabela 24

Número do estudo / Início do estudo	Substância do fármaco No. do lote	Embalagem	Local de fabricação	Uso do lote	Condição de armazenamento	Pontos no tempo pretendidos / Status do estudo
ONYXSTAB0138	GM764B	Sacos de Politeno de grau alimentar duplo. Recipientes de Politeno externos	Onyx Scientific	Ref. Std.	2-8°C 25°C/60 %UR 40°C/75 % UR	1,3,6 Meses ongoing 1,3,6 Meses ongoing 1,3,6 meses em curso
ONYXSTAB0139	170231	Sacos de Politeno de grau alimentar duplo. Recipientes de Politeno externos	Onyx Scientific	Clinical	2-8°C 25°C/60 %UR 40°C/75 % UR	1,3,6,9,12,18,24,36 meses em curso 1,3,6,9,12,18,24,36 meses em curso 1,3,6 meses em curso

[436] As amostras foram ensacadas duas vezes em sacos de polietileno de grau alimentar e seladas em um recipiente externo de polietileno e colocadas em armazenamento a 2-8ºC, 25ºC/60% UR e 45ºC/75% UR, um saco dessecante é incluído entre os sacos internos de polietileno para evitar a absorção de umidade. Foram realizados Testes de aparência, teor de água, pureza e ensaio.

[437] Os protocolos para os dois estudos são mostrados na Tabela 25 e na Tabela 26. Os dados de estabilidade de um mês e três meses para o lote GM764B estão detalhados na Tabela 27 e na Tabela 28 abaixo. Os dados de estabilidade de um, três, seis, nove e doze meses

para o lote GMP 170231 são fornecidos na Tabela 29, Tabela 30, Tabela 31, Tabela 31, Tabela 32 e Tabela 33, respectivamente, abaixo.

Tabela 25

Planilha de Protocolo de Triagem de Estabilidade Onix

Produto:	Psilocibina	Número de triagem Onix:	ONYXSTAB0138
Número de lote:	GM764B	Triagem devido à data de início :	10 MAR 2017
Método de ensaio:	N/A	Data de fabricação:	06 FEV 2017
Informação adicional:	1200mg de material requerido em cada recipiente.		
Componentes de embalagem:	Politeno duplo embalado alinhado contido dentro de 300ml de Recipiente HDPE (grau alimentar). Inserir um saco dessecante entre os dois sacos de politeno.		
Parâmetros de Teste Rotina Testes	Aparência Ensaio (Base anidra) por ^{1}H-RMN Teor de Água por perda na secagem Pureza química / Impurezas por HPLC		

Meses	1	3	6		Sobressalentes	Total
2°C-8°C	X	X	X		2	5
25°C/60%UR	X	X	X		2	5
40°C/75%UR	X	X	X		0	3
Data de vencimento	10 ABRI 17	10 JUN 17	10 SET 17			13

Tabela 26

Planilha de Protocolo de Triagem de Estabilidade Onix

Produto:	Psilocibina	Número de triagem Onix:	ONYXSTAB0139
Número de lote:	170231	Triagem devido à data de início :	31 MAR 2017
Método de ensaio:	SS/PSILOCIBINA/	Data de fabricação:	27 FEV 2017
Informação adicional:	2200mg de material requerido em cada recipiente.		
Componentes de embalagem:	Politeno duplo embalado alinhado contido dentro de 300ml Recipiente HDPE (grau alimentar). Inserir um saco dessecante entre os dois sacos de politeno.		
Parâmetros de Teste Testes de Rotina	Aparência Ensaio (em uma base seca) por HPLC Teor de Água por perda na secagem Pureza química / Impurezas por HPLC		

Ponto no Tempo	1 mês	3 Meses	6 Meses	9 Meses	12 Meses	18 Meses	24 Meses	36 Meses	Sobres-salentes	Total
2-8°C	X	X	X	X	X	X	X	X	2	10
25°C/60%UR	X	X	X	X	X	X	X	X	2	10
40°C/75%UR	X	X	X						1	4
Data de vencimento	31ABR17	30JUN17	30SET17	31DEZ17	31MAR18	30SET18	31MAR19	31MAR20		24

Tabela 27: Dados de Estabilidade de Um Mês para Lote GM764B

Teste	Limite de Especificação	T=0	T=1 mês	T=1 mês	T=1 mês
Condição	N/A	N/A	2°C-8°C	25°C/60%UR	40°C/75%UR
Aparência	Apenas para informação.	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível
Ensaio por ^{1}H-RMN	Apenas para informação.	97% p/p	99% p/p	98% em p/p	96% p/p
Teor de Água por perda na secagem	Apenas para informação.	0,86%p/p	0,35% p/p	0,20% p/p	0,14% p/p
Pureza química por HPLC	Apenas para informação.	99,24%	99,24%	99,22%	99,23%
Impurezas por HPLC: (Citar todo GT 0,05%)	Apenas para informação. RRT 0,86 RRT 1,46 RRT 1,59 (Psilocina) Impurezas Totais	 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%

Tabela 28: Dados de Estabilidade de três Meses para Lote GM764B

Teste	Limite de Especificação	T=0	T=3 meses	T=3 meses	T=3 meses
Condição	N/A	N/A	2°C-8°C	25°C-60%UR	40°C-75%UR
Aparência	Apenas para informação.	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível
Ensaio por ^{1}H-RMN	Apenas para informação.	97 % p/p	97% p/p	99% p/p	97% p/p
Teor de Água por perda na secagem	Apenas para informação.	0,86% p/p	0,26% p/p	0,08% p/p	0,14% p/p
Pureza química por HPLC	Apenas para informação.	99,24%	99,31%	99,27%	99,26%
Impurezas por HPLC: (Citar todo GT 0,05%)	Apenas para informação. RRT 0,86 RRT 1,46 RRT 1,59 (Psilocina) Impurezas Totais	 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%

Tabela 29: Dados de Estabilidade de Um Mês para Lote 170231

Teste	Limite de Especificação	T=0	T=1 mês	T=1 mês	T=1 mês
Condição	N/A	N/A	2°C-8°C	25°C/60%UR	40°C/75%UR
Aparência	Apenas para informação.	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível
Pureza química por HPLC	Apenas para informação.	99,28%	99,20%	99,16%	99,17%
Impurezas por HPLC: (Citar todo GT 0,05%) RRT 1,49 RRT 1,62 (Psilocina) RRT 1,70 Impureza em RRT 1,89 Impureza em RRT 2,45 Impurezas LT 0,05% Impurezas Totais	Apenas para informação.	 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%
Ensaio por HPLC (em uma base seca)	Apenas para informação	98,65%$^{p/p}$	98,76%$^{p/p}$	97,98%$^{p/p}$	98,52%$^{p/p}$
Teor de Água por perda na secagem	Apenas para informação.	0,32%$^{p/p}$	0,27% $^{p/p}$	0,17% $^{p/p}$	0,19%$^{p/p}$

Tabela 30: Dados de Estabilidade de três meses para Lote 170231

Teste	Limite de Especificação	T=0	T=3 Meses	T=3 meses	T=3 meses
Condição	N/A	N/A	2°C-8°C	25°C/60%UR	40°C/75%UR
Aparência	Apenas para informação.	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível
Pureza química por HPLC	Apenas para informação.	99,28%	99,30%	99,31%	99,17%
Impurezas por HPLC: (Citar todo GT 0,05%) RRT0,69 RRT 1,49 RRT 1,62 (Psilocina) RRT 1,70 Impureza em RRT 1,89 Impureza em RRT 2,45 Impurezas LT 0,05% Impurezas Totais	Apenas para informação.	 LT0,05% 0,06% 0,39% 0,05% LT 0,05% LT 0,05% 0,22% 0,72%	 0,05% 0,05% 0,37% LT 0,05% LT 0,05% LT 0,05% 0,22% 0,70%	 LT0,05% 0,05% 0,36% LT 0,05% LT 0,05% LT 0,05% 0,27% 0,69%	 LT0,05% 0,06% 0,39% LT 0,05% LT 0,05% LT 0,05% 0,34% 0,79%

Ensaio por HPLC (em uma base seca)	Apenas para informação	98,65%$^{p/p}$	98,45%p/p	99,46%$^{p/p}$	98,64%$^{p/p}$
Teor de Água por perda na secagem	Apenas para informação	0,32%$^{p/p}$	0,17% em p/p	0,01% $^{p/p}$	0,19%$^{p/p}$

Tabela 31: Dados de Estabilidade de Seis Meses para Lote 170231

Teste	Limite de Especificação	T=0	T=6 Meses	T=6 Meses	T=6 Meses
Condição	N/A	N/A	2°C-8°C	25°C-60%UR	40°C-75%UR
Aparência	Apenas para informação.	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível
Pureza química por HPLC	Apenas para informação.	99,28%	99,20%	99,19%	99,12%
Impurezas por HPLC: (Citar todo GT 0,05%)	Apenas para informação.				
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 (Psilocina)		0,39%	LT 0,05%	LT 0,05%	LT 0,05%
RRT 1,70		0,05%	0,35%	0,34%	0,38%
Impureza em RRT 1,89		LT 0,05%	LT 0,05%	LT 0,05%	LT 0,05%
Impureza em RRT 2,45		LT 0,05%	LT 0,05%	LT 0,05%	LT 0,05%
Impurezas LT 0,05%		0,22%	LT 0,05%	LT 0,05%	LT 0,05%
			0,32%	0,34%	0,36%
Impurezas Totais		0,72%	0,80%	0,81%	0,88%
Ensaio por HPLC (em uma base seca)	Apenas para informação.	98,65%$^{p/p}$	97,97%$^{p/p}$	98,04%$^{p/p}$	100,10%$^{p/p}$
Teor de Água por perda na secagem	Apenas para informação.	0,32%$^{p/p}$	0,06% $^{p/p}$	0,32% $^{p/p}$	2,26% $^{p/p}$

Tabela 32: Dados de Estabilidade para Nove Meses para Lote 170231

Teste	Limite de Especificação	T=0	T=9 Meses	T=9 Meses
Condição	N/A	N/A	2°C-8°C	25°C-60%UR
Aparência	Apenas para informação.	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível
Pureza química por HPLC	Apenas para informação.	99,28%	99,16%	99,16%
Impurezas por HPLC: (Citar todo GT 0.05%) RRT0,69 RRT 1,49 RRT 1,62 (Psilocina) RRT 1,70 Impureza em RRT 1,89 Impureza em RRT 2,45 Impurezas LT 0,05% Impurezas Totais	Apenas para informação.	 LT0,05% 0,06% 0,39% 0,05% LT 0,05% LT 0,05% 0,22% 0,72%	 LT 0,05% LT 0,05% 0,07% 0,06% 0,37% LT 0,05% LT 0,05% LT 0,05% 0,34% 0,84%	 LT 0,05% LT 0,05% 0,05% 0,06% 0,37% LT 0,05% LT 0,05% LT 0,05% 0,35% 0,84%

Ensaio por HPLC (em uma base seca)	Apenas para informação.	98,65%$^{p/p}$	97,53%$^{p/p}$	98.12%$^{p/p}$
Teor de Água por perda na secagem	Apenas para informação.	0,32%$^{p/p}$	0,21% $^{p/p}$	0,10% $^{p/p}$

Tabela 33: Dados de Estabilidade de doze Meses para Lote 170231

Teste	Limite de Especificação	T=0	T=12 Meses	T=12 Meses
Condição	N/A	N/A	2°C-8°C	25°C/60%UR
Aparência	Apenas para informação.	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível	Um sólido esbranquiçado. Livre de contaminação visível
Pureza química por HPLC	Apenas para informação.	99,28%	99,25%	99,25%
Impurezas por HPLC: (Citar todo GT 0.05%) RRT0,69 RRT 1,49 RRT 1,62 (Psilocina) RRT 1,70 Impureza em RRT 1,89 Impureza em RRT 2,45 Impurezas LT 0,05% Impurezas Totais	Apenas para informação.	 LT0,05% 0,06% 0,39% 0,05% LT 0,05% LT 0,05% 0,22% 0,72%	 LT 0,05% LT 0,05% 0,37% LT 0,05% LT 0,05% LT 0,05% 0,38% 0,75%	 LT 0,05% LT 0,05% 0,37% LT 0,05% ND LT 0,05% 0,38% 0,75%
Ensaio por HPLC (em uma base seca)	Apenas para informação.	98,65%$^{p/p}$	99,63%$^{p/p}$	98,97%$^{p/p}$
Teor de Água por perda na secagem	Apenas para informação.	0,32%$^{p/p}$	0,49% $^{p/p}$	0,61% $^{p/p}$

[438] Nos primeiros 12 meses do estudo de estabilidade de ICH, a psilocibina demonstrou ser quimicamente estável sob condições de baixa temperatura (2-8ºC), ambiente (25ºC/60% UR) e acelerada (40ºC/75% UR). Não houve alteração na aparência e a análise por HPLC também se manteve consistente. O teor de água variou em todas as amostras, devido ao impacto inicial e, em seguida, ao envelhecimento dos sacos dessecantes usados no estudo.

Exemplo 9 - Experimento para formar o Hidrato A

[439] A psilocibina (200 mg) foi carregada em um tubo de cristalização seguido por água desionizada (4 ml). A mistura foi equilibrada a 25ºC durante 2 horas antes do sólido ser isolado por filtração a vácuo. O material foi dividido em duas partes iguais. Uma porção não foi submetida à secagem adicional para dar o Hidrato A, lote GK2, por XRPD e DSC (difratograma e termograma consistentes com as Fig. 7d e Fig. 8d, respectivamente).

Exemplo 10 - Experimento para formar o Polimorfo B

[440] O Polimorfo A de psilocibina (250 mg) foi carregado em um frasco de fundo redondo, aquecido a 173ºC utilizando um banho de óleo e mantido à temperatura durante 5 minutos. O sólido foi arrefecido à temperatura ambiente e isolado para dar o lote GK3 com uma recuperação de 93%. A análise por XRPD e DSC revelou que o lote GK3 era o Polimorfo B (difratograma e termograma consistente com as Fig. 7c e Fig. 8c, respectivamente).

Exemplo 11 - Investigações de estado sólido

[441] Uma série de investigações de polimorfismo foi concluída. Um resumo das formas sólidas encontradas é mostrado na Figura 17. A maioria das formas encontradas foi derivada da perturbação do solvente; em alguns casos, solventes estequiométricos foram isolados e, em outros casos, solvatos não estequiométricos.

<u>Pastas Fluidas de Polimorfo A</u>

[442] Os equilíbrios mediados por solvente do Padrão A da Psilocibina foram conduzidos como uma via primária para a modificação da forma sólida e para avaliar visualmente a solubilidade do material em uma faixa de 24 solventes entre 25 e 50 ºC.

[443] O Padrão A de psilocibina (40 mg) foi dosado em tubos à temperatura ambiente e os solventes listados na Tabela 34 foram adicionados em alíquotas de 0,4 ml (10 vol.) A um volume total de 1,2 ml (30 vol.) e observações foram observadas. As misturas foram agitadas constantemente. A ciclagem de calor foi conduzida da seguinte forma: 50 ºC por 18 horas, resfriar por 2 horas a 20ºC, amadurecer por 4 horas, aquecer a 50 ºC por 4 horas, resfriar a 20ºC durante 2 horas, maturar por 18 horas. Um ciclo repetido de 50ºC - 20 ºC foi realizado durante 24 horas e o seguinte foi aplicado:

Isolamento após aquecimento a 50ºC, onde os sólidos eram suficientes = série A

Isolamento após resfriamento a 20 ºC, onde os sólidos eram suficientes = série B

[444] Todos os sólidos isolados foram secos sob vácuo a 50ºC por 24 horas e analisados por XRPD. As observações são fornecidas na Tabela 34.

[445] O API era amplamente insolúvel nos solventes e misturas de solventes testados em 30 volumes a 50ºC, resultando em suspensões pesadas. A água solubilizou a Psilocibina a 50ºC.

Tabela 34 - Observações tabuladas para maturações de pasta fluida de ciclo térmico e uso da mistura do Padrão A como inserção

Inserção	Solvente	Obs. 20°C, 0,4 ml	Obs. 20°C, 0,8 ml	Obs. 20°C, 1,2 ml	Obs. 50°C	XRPD A série	XRPD B série
1	Ciclo-hexano	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	A	A
2	Clorobenzeno	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	A	A

3	2-Clorobutano	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	A	A
4	Benzotrifluoreto	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	A	A
5	Anisol	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	A	A
6	Nitrometano	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	C	C
7	CPME	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	A	A
8	Heptano	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	A	A
9	TBME	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	C	A
10	MIBK	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	A	A
11	MEK	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	A	A
12	iPrOAc	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	C	C
13	EtOAc	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	A	A
14	Tolueno	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	A	A
15	THF	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	A	A
16	$CHCl_3$	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	A	A
17	MeOH	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	D	D
18	EtOH	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	E	E
19	IPA	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	F	F
20	MeCN	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	C	A
21	Água	Susp.	Susp.	Susp.	Solução	n/a	A
22	4:1 EtOH/água	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	A	A
23	4:1 THF/ água	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	A	Hidra-to A
24	4:1 IPA/ água	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	A	C

Resultados:

[446] Nas figuras (Fig. 18 e Fig. 19), "25C" indica isolamento do sólido a 25ºC e "50C" indica isolamento do sólido a 50ºC. Por exemplo, GM832-20_50_A9 representa a inserção 20 de GM832 (MeCN) isolada a 50 ºC.

Pastas Fluidas a 50ºC

[447] Inserções 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 22, 23, 24: Difratograma de XRPD amplamente consistente com o Polimorfo A, mas com um pico adicional de intensidade variável em 18 °2θ.

[448] Inserções 6, 9, 12, 20: Difratograma de XRPD adquirido para os sólidos isolados era amplamente consistente (vide Fig. 18) com picos adicionais a 10 °2θ e 13,2 °2θ observados em algumas amostras. Este difratograma de XRPD foi designado Padrão C. Não há correlação quimiotípica entre os solventes (CH_3NO_2, TBME, iPrOAc e CH_3CN).

[449] Inserção 17: Difratograma de XRPD adquirido tinha vários picos de difração (Fig. 19). Difratograma de XRPD foi designado Padrão D.

[450] Inserção 18: Difratograma de XRPD adquirido tinha vários picos de difração (Fig. 19). Difratograma de XRPD foi designado Padrão E.

[451] Inserção 19: Difratograma de XRPD adquirido tinha vários picos de difração (Fig. 19). Difratograma de XRPD foi designado Padrão F.

Pastas Fluidas a 25 ºC:

[452] Inserções 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 20, 21, 22: Difratogramas de XRPD são todos semelhantes aos adquiridos para o Polimorfo A.

[453] Inserções 6, 12, 24: Difratogramas de XRPD adquiridos para os sólidos isolados eram amplamente consistentes (vide Fig. 18) com o Padrão C.

[454] Inserção 23: Análise XRPD mostrou que o Hidrato A se formou.

[455] Inserção 17: Difratograma de XRPD adquirido tinha vários picos de difração (Fig. 19). Difratograma de XRPD foi designado Padrão D.

[456] Inserção 18: Difratograma de XRPD adquirido tinha vários picos de difração (Fig. 19). Difratograma de XRPD foi designado Padrão E.

[457] Inserção 19: Difratograma de XRPD adquirido tinha vários

picos de difração (Fig. 19). Difratograma de XRPD foi designado Padrão F.

Análise dos Resultados:

[458] Os difratogramas de XRPD para os sólidos isolados a 25 ºC são amplamente os mesmos que os difratogramas de XRPD adquiridos para os sólidos isolados a 50 ºC.

[459] Os padrões D, E e F foram derivados de álcoois (MeOH, EtOH e IPA). Os estados solvatados foram postulados considerando que um Solvato de Etanol foi previamente isolado durante o desenvolvimento. Os difratogramas de XRPD para o Solvato de Etanol não são idênticos, no entanto, dado que a variação exata do nível de solvente pode fornecer estados de ordem variados dentro da rede, a comparação entre esses difratogramas de XRPD fornece uma forte hipótese de que essas variações de Estágio mais significativas são invocadas pelo arrastamento de solventes.

[460] Os padrões de XRPD D, E e F (Fig. 19) são todos diferentes do difratograma de XRPD para Hidrato (Fig. 7d).

[461] A comparação direta dos difratogramas de XRPD adquiridos para os sólidos derivados de MeOH, EtOH e IPA (Padrões D, E e F - Fig. 19) isolados nas duas temperaturas mostra difratogramas em conformidade; os dois difratogramas de MeOH são semelhantes, enquanto o EtOH e o IPA são diretamente comparáveis.

[462] A análise de DSC foi realizada nos sólidos isolados e, quando havia amostra suficiente disponível, TGA. Os sólidos que forneceram os Padrões D, E e F apresentam todos os endotérmicos em ca. 170-180ºC, mas apresentou perfis térmicos distintos. A análise de TGA para o sólido isolado por pasta fluida de MeOH mostrou uma perda de massa prolongada de ca. 25 - 190ºC (3,1%). Um solvato estiométrico de metanol requer 10,3% em peso de solvente. A análise de TGA do sólido isolado em suspensão de EtOH mostrou duas etapas distintas de

perda de massa. O primeiro ocorreu antes de 100 ºC (0,3% em peso) é considerado devido à água e a segunda maior perda (11,5% em peso) devido ao solvente. Um solvato estequiométrico de etanol requer 13,9% em peso de solvente. A análise de TGA do sólido isolado da pasta fluida de IPA apresentou duas etapas distintas de perda de massa. A primeira perda de massa antes de 100ºC (0,4% em peso) é considerada ser devida à água, enquanto a segunda maior perda de massa (13,9% em peso) é considerada ser devida a solvente residual. Um solvato estequiométrico de IPA requer 17,5% em peso de solvente.

Pastas Fluidas de Psilocibina Amorfa

[463] Para gerar material amorfo, uma pequena amostra de Psilocibina (0,5 g) foi dissolvida em água (0,5 L, 1000 vol.), filtrada e liofilizada. A psilocibina foi recuperada como um material fibroso esbranquiçado (lote MC1368A; 412 mg, 82%, XRPD amorfo).

[464] Para avaliar a solubilidade visual do API amorfo e para induzir a modificação da forma, uma série de maturações de pasta fluida foi realizada da seguinte maneira:

[465] A psilocibina (15 mg) foi carregada nos tubos. O solvente foi então adicionado à temperatura ambiente (20ºC, 0,3 mL, 20 vol.) e as suspensões agitadas. Observações foram feitas. Após 1 hora de agitação, as amostras foram aquecidas a 45ºC durante 18 horas e foram feitas observações. As amostras foram aquecidas a 50 ºC por 8 horas e foram feitas observações. As amostras foram agitadas por 72 horas a 25ºC e submetidas a um ciclo de aquecimento final, antes do isolamento. As observações são mostradas na Tabela 35.

Tabela 35 - Observações de Psilocibina amorfa durante a maturação da pasta fluida do ciclo térmico e o destino da forma

Inserção	Solvente	Obs. a 20˚C	Obs. a 45˚C	Obs. a 50˚C	Dados XRPD
A	Ciclo-hexano	Susp.	Susp.	Susp.	Semicristalino
B	Clorobenzeno	Susp.	Susp.	Susp.	Semicristalino

C	Clorobutano	Susp.	Susp.	Susp.	Padrão B
D	Benzotrifluoreto	Susp.	Susp.	Susp.	Semicristalino
E	Anisol	Susp.	Susp.	Susp.	Semicristalino
F	Nitrometano	Susp.	Susp.	Susp.	Padrão B
G	CPME	Susp.	Susp.	Susp.	Semicristalino
H	Heptano	Susp.	Susp.	Susp.	Semicristalino
I	TBME	Susp	Susp.	Susp.	Semicristalino
J	MIBK	Susp.	Susp.	Susp.	Semicristalino
K	MEK	Susp.	Susp.	Susp.	Semicristalino
L	iPrOAc	Susp.	Susp.	Susp.	Semicristalino
M	EtOAc	Susp.	Susp.	Susp.	Semicristalino
N	Tolueno	Susp.	Susp.	Susp.	Similar a Solvato A
O	THF	Susp.	Susp.	Susp.	Semicristalino
P	Clorofórmio	Susp.	Susp.	Susp.	Similar a Padrão E
R	MeOH	Susp.	Susp.	Susp.	Semicristalino
S	EtOH	Susp.	Susp.	Susp.	Padrão D
T	IPA	Susp.	Susp.	Susp.	Padrão B
U	Acetonitrila	Susp.	Susp.	Susp.	Amorfo
V	Água	Susp.	Susp.	Susp.	Similar a Padrão A
W	4:1 EtOH/água	Susp.	Susp.	Susp.	Similar a Padrão D
X	4:1 THF/ água	Susp.	Susp.	Susp.	Similar a Padrão A
Y	4:1 IPA/ água	Susp.	Susp.	Susp.	Similar a Padrão A

Resultados

[466] A maioria dos solventes retornou um sólido que era considerado semicristalino (predominantemente amorfo com uma reflexão notável a cerca de 18 °2θ).

[467] Amorfo verdadeiro foi retornado do equilíbrio em MeCN.

[468] O Polimorfo B foi retornado a partir de clorobutano, nitrometano e IPA (Fig. 20 e 22).

[469] O padrão D, que foi isolado a partir de MeOH nos experimentos de pastas fluidas de Polimorfo A discutidos acima, retornou do equilíbrio de EtOH enquanto o MeOH neste estudo retornou

um sólido semicristalino.

[470] Sólidos semelhantes ao Padrão A foram recuperados da água, THF:Água e IPA:Água (4:1).

[471] Um sólido semelhante ao Padrão D foi recuperado de EtOH:Água (4:1), suportando a descoberta do isolamento do Padrão D a partir de EtOH sozinho.

[472] Um sólido semelhante ao padrão E foi recuperado do clorofórmio.

[473] De nenhum dos solventes investigados foi isolado o Polimorfo A ou A' verdadeiro após equilíbrio prolongado e maturação térmica da Psilocibina amorfa.

Exemplo 12 - Desenvolvimento da formulação.

[474] Uma série inicial de experimentos foi conduzida usando formulações como apresentado na Tabela 36 abaixo. O objetivo era identificar preenchedores únicos ou combinados adequados para a formulação em larga escala.

Tabela 36

Nome do material	Lote No. (% em p/p)		
	APL-117-6085-01	APL-117-6085-02	APL-117-6085-03
Psilocibina	1,0	1,0	1,0
Celulose microcristalina Ph 102	91,5	49,5	81,5
Amido pré-gelatinizado (amido 1500)	-	45,0	-
Compact Cel MAB	-	-	10
Hidroxipropilcelulose (Klucel EXF)	3,0	3,0	3,0
Amido glicolato de sódio	3,0	3,0	3,0
Dióxido de silício coloidal	0,5	0,5	0,5
Estearato de Magnésio (Derivado de Vegetais)	1,0	1,0	1,0
Estearil Fumarato de Sódio	-	-	-
TOTAL	100,0	100,0	100,0

[475] O resultado, em termos das principais propriedades físico-químicas - Fluxo de material, Uniformidade de mistura e Uniformidade de teor, é apresentado na Tabela 37 abaixo:

Tabela 37:

Lote No	Intensidade (mg)	Fluxo de Material (Índice Carrs)	Uniformidade de Mistura	Uniformidade de teor
APL-117-6085-01	1,0	19,1	SUPERIOR=127,9 Meio =106,4 Fundo =104,5 Média = 112,9 %RSD= 10,9	% menções no rótulo = 92,4 AV = 7,9
APL-117-6085-02	1,0	19,1	SUPERIOR =115,9 Meio =106,6 Fundo =106,1 Média = 109,6 %RSD=4,9	% Menções no rótulo = 95,2 AV = 5,9
APL-117-6085-03	1,0	22,4	SUPERIOR =105,0 Meio =101,4 Fundo =98,7 Média =101,7 %RSD=3,8	% Menções no rótulo = 96,3 AV = 4,6

[476] Enquanto o lote (APL-117-6085-03) apresentou boa uniformidade de mistura em diferentes amostras analisadas (SUPERIOR, MEIO e FUNDO) e muito boa uniformidade de teor, suas propriedades de fluxo (com base no índice de Carr) foram mais altas e previu-se que a formulação não acomodaria cargas de fármaco mais altas.

[477] Por esse motivo, várias formulações alternativas foram testadas. O objetivo era considerar outras combinações de carga com o objetivo de melhorar o fluxo de pó, além de obter boa uniformidade da mistura e uniformidade de teor.

[478] Também foram testadas formulações contendo menos Compactcel MAB e maior quantidade de glidante em comparação com o Lote 3 (APL-117-6085-03)

[479] Estas formulações adicionais são apresentadas na Tabela 38 abaixo.

Tabela 38:

Nome do Material	Lote No (% em p/p)		
	APL-117-6085-05	APL-117-6085-06	APL-117-6085-07
Psilocibina	1,0	1,0	5,0
Celulose Microcristalina Ph 102	-	89,0	85,0
Amido pré-gelatinizado (Amido 1500)	45,0	-	-
Compact Cel MAB	-	5,0	5,0
Celulose Microcristalina CEOLUS UF 702	49,5	-	-
Glicolato de Amido de Sódio	3,0	3,0	3,0
Dióxido de Silício Coloidal	0,5	1,0	1,0
Estearil Fumarato de Sódio	1,0	1,0	1,0
TOTAL	100,0	100,0	100,0

[480] Os resultados para esses lotes são mostrados na Tabela 39 abaixo:

Tabela 39:

Lote No	Intensidade (mg)	Fluxo de Material (Índice de Carrs)	Uniformidade de Mistura	Uniformidade de Teor
APL-117-6085-05	1,0	20,9	SUP,=130,0 Meio=105,4 Fundo=107,2 Média= 114,2 %RSD = 12,6%	% menção de rótulo = 88,3 AV =16,5
APL-117-6085-06	1,0	20,0	SUP,=107,0 Meio =96,2 Fundo =95,5 Média = 99,6 % RSD = 6,5	% menção de rótulo =96,2 AV = 10,5
APL-117-6085-07	5,0	24,3	SUP,=91,5 Meio =94,2	% menção de rótulo = 96,0

			Fundo =94,8 Média = 93,5 % RSD = 7,0	AV = 11,9

[481] APL-117-6085-05 não conseguiu obter uma boa uniformidade da mistura e também falhou nos critérios de uniformidade do teor.

[482] APL-117-6085-06 e APL-117-6085-07 ambos exibiram um fluxo de pó melhorado, mas a uniformidade da mistura para ambas as formulações foi mais baixa que APL-117-6085-03.

[483] Em consequência, a Requerente analisou excipientes modificados e mais particularmente preenchedores silicificados com diferentes tamanhos de partículas. Essas formulações são apresentadas na Tabela 40 abaixo:

Tabela 40:

Nome do Material	Lote No (% em p/p)	
	APL-117-6085-11	APL-117-6085-12
Psilocibina	5,0	1,0
Prosolv 50	10,5	15,5
Prosolv 90	80,0	79,0
Glicolato de Amido de Sódio	3,0	3,0
Dióxido de Silício Coloidal	0,5	0,5
Estearil Fumarato de Sódio	1,0	1,0
TOTAL	100,0	100,0

[484] Prosolv é uma celulose microcristalina silicificada e as duas variantes foram selecionadas para determinar se o tamanho das partículas afetou o resultado. Comparado à celulose microcristalina padrão (a faixa de tamanho típica, dependendo da peneiração, é de 80 a 350 mícrons), o Prosolv possui uma distribuição mais fina do tamanho de partícula, o que fornece uma área de superfície aumentada. A área de superfície aumentada como foi sugerida pode fornecer fluxo superior

e compactação aumentada juntamente com uniformidade e estabilidade de teor aprimoradas na formulação. A proporção de Prosolv 50 e Prosolv 90 era produzir uma distribuição de tamanho de partícula através de partículas mais finas e mais grossas.

[485] Os resultados estão apresentados na Tabela 41 abaixo

Tabela 41:

Lote No	Intensidade (mg)	Fluxo de Material (Índice de Carrs)	Uniformidade de Mistura	Uniformidade de Teor
APL-117-6085-11	5,0	24,3	SUP,=103,4 Meio=100,4 Fundo=100,2 Média =101,5 % RSD = 2,0	% menção de rótulo = 94,1 AV =6,0
APL-117-6085-12	1,0	21,1	SUP,=101,9 Meio =98,4 Fundo =99,9 Média = 100,1 % RSD = 3,8%	% menção de rótulo =100,5 AV =5,8

[486] Pode-se observar que os principais parâmetros de uniformidade de teor (maior do que 90% e de fato maior do que 94%) e AV (menor do que 10 e menor do que 7) são excelentes, assim como a consistência na uniformidade da mistura (maior do que 95% permitindo erro).

REIVINDICAÇÕES

1. Psilocibina cristalina na forma Polimorfo A ou Polimorfo A', caracterizada pelo fato de que tem um ou mais dos seguintes:

a. picos em um difratograma de XRPD em 11,5, 12,0 e 14,5 °2θ ± 0,1 °2θ;

b. picos em um difratograma de XRPD em 11,5, 12,0 e 14,5 °2θ ± 0,1 °2θ, adicionalmente distinguido por pelo menos um pico adicional em 19,7, 20,4, 22,2, 24,3 ou 25,7 °2θ ± 0,1 °2θ;

c. um difratograma de XRPD como substancialmente ilustrado na Figura 7a ou 7b; ou

d. um evento endotérmico em um termograma de DSC com uma temperatura de início entre 205 e 220 ºC substancialmente como ilustrado nas Figuras 8a ou 8b.

2. Psilocibina cristalina na forma Polimorfo A ou Polimorfo A', de acordo com a reivindicação 1, adicionalmente caracterizada pelo fato de que tem um evento endotérmico em um termograma de DSC com uma temperatura de início entre 210 e 215 ºC.

3. Psilocibina cristalina na forma Polimorfo A, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que tem um ou mais dos seguintes:

a. picos em um difratograma de XRPD em 11,5, 12,0, 14,5 e 17,5, °2θ ± 0,1 °2θ;

b. picos em um difratograma de XRPD em 11,5, 12,0, 14,5 e 17,5, 2θ ± 0,1 °2θ, adicionalmente distinguido por pelo menos um pico adicional em 19,7, 20,4, 22,2, 24,3 ou 25,7 °2θ ± 0,1 °2θ;

c. um difratograma de XRPD como substancialmente ilustrado na Figura 7a; ou

d. um evento endotérmico em um termograma de DSC com uma temperatura de início entre 205 e 220 ºC substancialmente como ilustrado na Figura 8a.

4. Psilocibina cristalina na forma Polimorfo A, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o pico a 17,5 °2θ ± 0,1 °2θ tem uma intensidade relativa em comparação com o pico a 14,5 °2θ ± 0,1 °2θ de pelo menos 5%.

5. Psilocibina cristalina na forma Polimorfo A', de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que tem um ou mais dos seguintes:

a. picos em um difratograma de XRPD em 11,5, 12,0 e 14,5 °2θ ± 0,1 °2θ, mas ausente ou substancialmente ausente de um pico em 17,5 °2θ ± 0,1 °2θ;

b. picos em um difratograma de XRPD em 11,5, 12,0 e 14,5 °2θ ± 0,1 °2θ, mas ausente ou substancialmente ausente de um pico em 17,5 °2θ ± 0,1 °2θ, adicionalmente distinguido por pelo menos um pico adicional em 19,7, 20,4, 22,2, 24,3 ou 25,7 °2θ ± 0,1 °2θ;

c. um difratograma de XRPD como substancialmente ilustrado na Figura 7b; ou

d. um evento endotérmico em um termograma de DSC com uma temperatura de início entre 205 e 220 ºC substancialmente como ilustrado na Figura 8b.

6. Psilocibina cristalina na forma Polimorfo A', de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que qualquer pico a 17,5 °2θ ± 0,1 °2θ tem uma intensidade relativa em comparação com o pico em 14,5 °2θ ± 0,1 °2θ menor do que 5%.

7. Psilocibina cristalina na forma Polimorfo A ou Polimorfo A', de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, adicionalmente caracterizada pelo fato de que possui:

ii) um teor de água de <0,5% em p/p; ou

iii) perda <0,5% em p/p no termograma de TGA entre a temperatura ambiente, tal como 25 ºC e 200 ºC.

8. Psilocibina cristalina na forma Polimorfo A ou Polimorfo A',

de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que tem uma pureza química maior do que 97% por HPLC, e nenhuma única impureza maior do que 1% incluindo ácido fosfórico, como medido por ^{31}P RMN, e psilocina conforme medido por HPLC.

9. Psilocibina cristalina na forma Polimorfo A ou Polimorfo A', de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a psilocibina cristalina é um sólido branco a esbranquiçado.

10. Psilocibina cristalina na forma Polimorfo A ou Polimorfo A', de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que compreende espectros que estão em conformidade com qualquer uma ou mais das Figuras 10 a 13.

11. Psilocibina cristalina na forma Polimorfo A ou Polimorfo A', de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que compreende os critérios de aceitação de um ou mais atributos de qualidade da Tabela 9, pontos 6 a 13.

12. Lote de psilocibina cristalina Polimorfo A, como definida nas reivindicações 1 a 4 ou 7 a 11, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos 100 g.

13. Formulação farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende psilocibina cristalina na forma Polimorfo A ou Polimorfo A', como definida em qualquer uma das reivindicações anteriores.

14. Formulação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que é uma forma de dosagem oral.

15. Formulação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 13 ou 14, caracterizada pelo fato de que a psilocibina cristalina na forma Polimorfo A ou Polimorfo A' está presente em uma quantidade que fornece uma dose de 0,01 mg/kg a 1 mg/kg.

16. Formulação farmacêutica, de acordo com qualquer uma

das reivindicações 13 a 15, caracterizada pelo fato de que compreende um ou mais excipientes.

17. Formulação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que um ou mais excipientes compreendem celulose microcristalina ou amido.

18. Formulação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que os um ou mais excipientes compreendem celulose microcristalina silicificada.

19. Psilocibina cristalina na forma Polimorfo A ou Polimorfo A', de acordo com as reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo fato de que é para uso em medicina.

20. Psilocibina cristalina na forma Polimorfo A ou Polimorfo A', de acordo com as reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de um transtorno nervoso central.

21. Psilocibina cristalina na forma Polimorfo A ou Polimorfo A', de acordo com as reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de depressão resistente a fármaco.

22. Método para fabricação em larga escala de psilocibina (12) na forma Polimorfo A, caracterizado pelo fato de que o método compreende submeter a psilocibina (12) a uma etapa de cristalização em água, com secagem controlada, para produzir uma psilocibina cristalina Polimorfo A, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou 7 a 11.

23. Psilocibina cristalina na forma Polimorfo A (12A), caracterizada pelo fato de que é para uso em medicina.

24. Psilocibina cristalina na forma Polimorfo A (12A), caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de depressão resistente a fármaco.

25. Método de tratamento de depressão resistente a fármaco, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a um

indivíduo em necessidade do mesmo uma dose eficaz de psilocibina cristalina na forma Polimorfo A (12A).

26. Método para fabricação em larga escala de psilocibina (12) na forma Polimorfo A (12A), caracterizado pelo fato de que compreende submeter a psilocibina (12) a uma etapa de cristalização em água, com secagem controlada, para produzir cristais distinguidos por um ou mais dos seguintes:

a. picos em um difratograma de XRPD em 11,5, 12,0, 14,5 e 17,5, °2θ ± 0,1 °2θ;

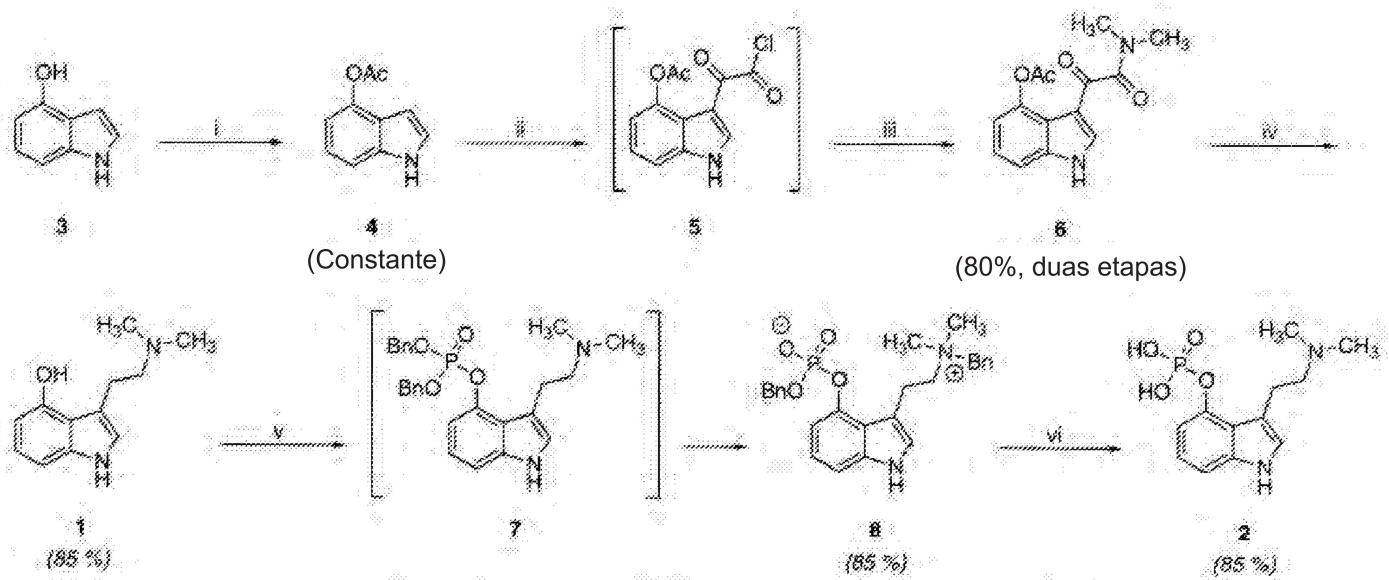
b. picos em um difratograma de XRPD em 11,5, 12,0, 14,5 e 17,5, 2θ ± 0,1 °2θ, adicionalmente distinguido por pelo menos um pico adicional em 19,7, 20,4, 22,2, 24,3 ou 25,7 °2θ ± 0,1 °2θ;

c. um difratograma de XRPD como substancialmente ilustrado na Figura 7a; ou

d. um evento endotérmico em um termograma de DSC com uma temperatura de início entre 205 e 220 ºC substancialmente como ilustrado na Figura 8a.

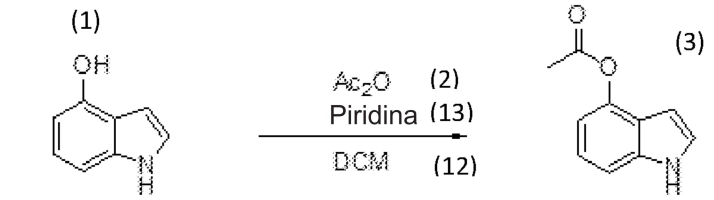
27. Método, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que a psilocibina é recristalizada em cerca de 10 a 20 volumes de água, aquecida com agitação a uma temperatura de pelo menos 70 ºC, filtrada por polimento, semeada em uma temperatura de cerca de 70 ºC, e resfriada a cerca de 50 ºC durante um período maior do que 2 horas.

FIG 1



a Reagente e condições: (i) Ac_2O, Piridina, CH_2Cl_2, 0 °C to rt; (ii) $(COCl)_2$, Éter, 0 °C, *n*-Hexano, then −20 °C; (iii) $(CH_3)_2NH$, THF; (iv) Em seguida Δ; (v) $[(BnO)_2PO]_2O$, *n*-BuLi, THF, −78 °C to 0 °C; (vi) H_2, Pd/C, MeOH, rt.

FIG 2



Lavar com ácido cítrico (14) e $NaHCO_3$ (15)

Secar com $MgSO_4$ (16)

Particionar com heptano (17)

FIG 3

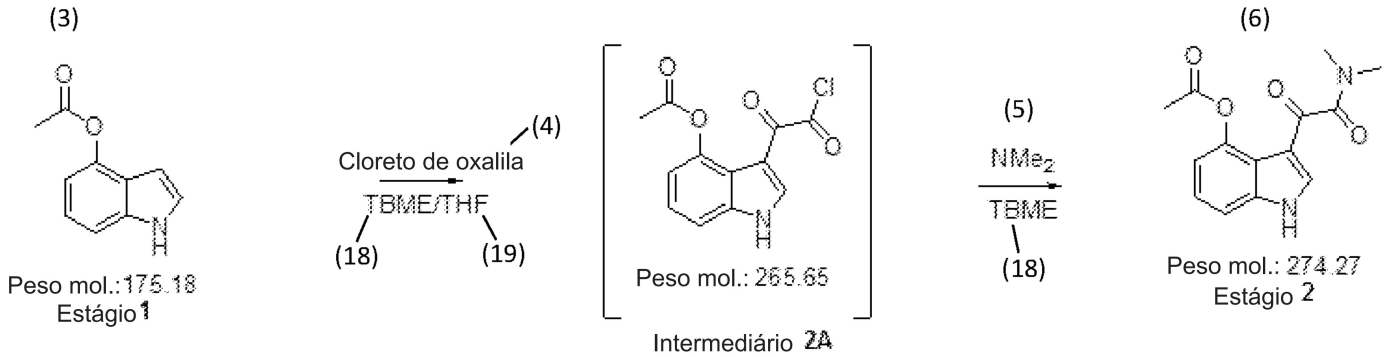
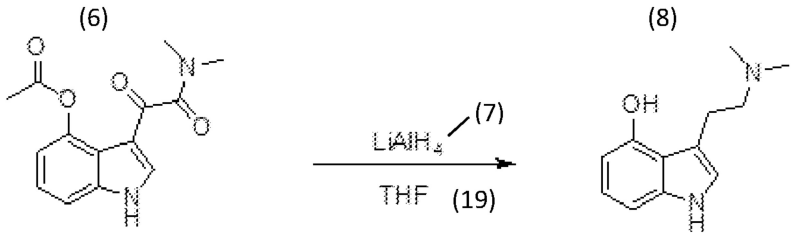

(3)
Peso mol.: 175.18
Estágio 1
(4)
Cloreto de oxalila
TBME/THF
(18)
(19)
Peso mol.: 265.65
Intermediário 2A
(5)
NMe2
TBME
(18)
(6)
Peso mol.: 274.27
Estágio 2
Adicionar heptano (17)
Lavar com heptano (17)
Pasta fluida em água (20) e IPA (21)

FIG 4



Peso mol.: 274.27
Estágio 2

Peso mol.: 204.27
Estágio 3

PS ilocina

Arrefecer com acetona (22) e ácido cítrico (14)

Secar sobre $MgSO_4$ (16)

Pasta fluida em iProAC (24): TBME (18)

FIG 5

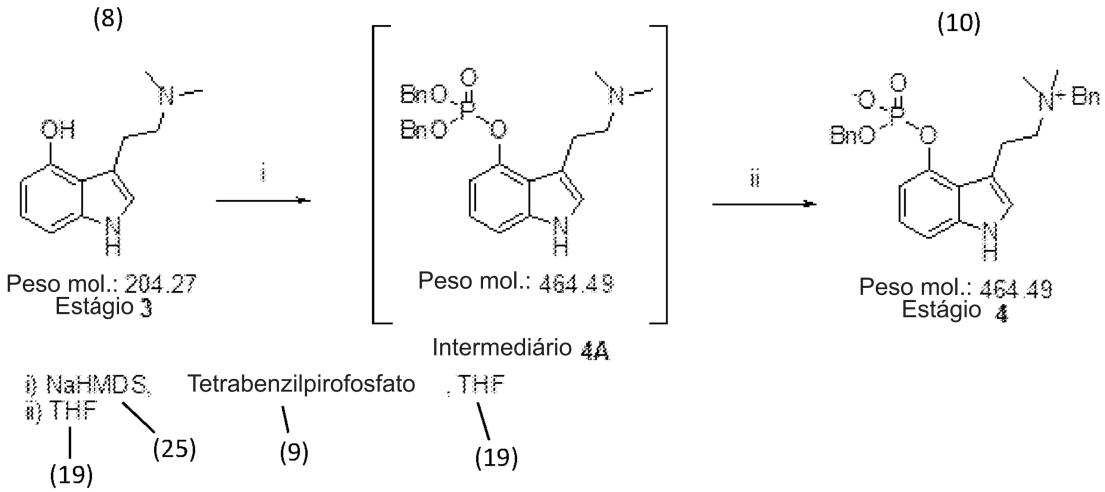
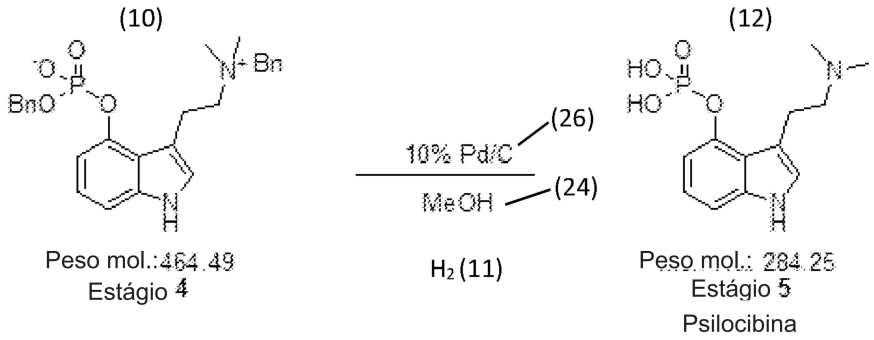

(8)
OH
N
H
Peso mol.: 204.27
Estágio 3
i
BnO
BnO
P
O
O
N
H
Peso mol.: 464.49
Intermediário 4A
ii
(10)
O
O
BnO
P
O
N+ Bn
H
Peso mol.: 464.49
Estágio 4
i) NaHMDS, Tetrabenzilpirofosfato , THF
ii) THF
(19)
(25)
(9)
(19)

FIG 6



Adicionar H_2O (20)

Filtrar sobre leito de celite (27)

FIG 7A

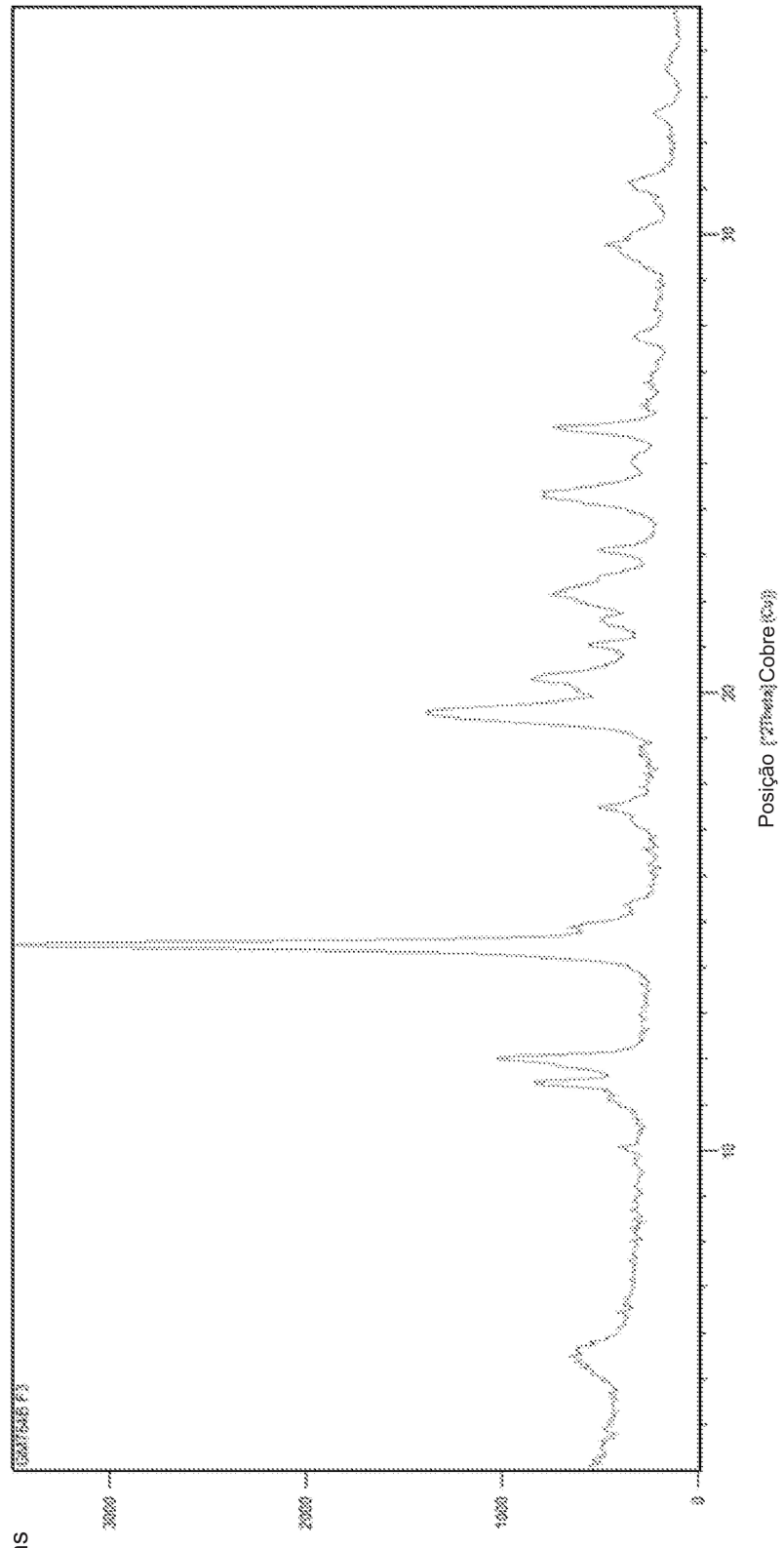


FIG 7B

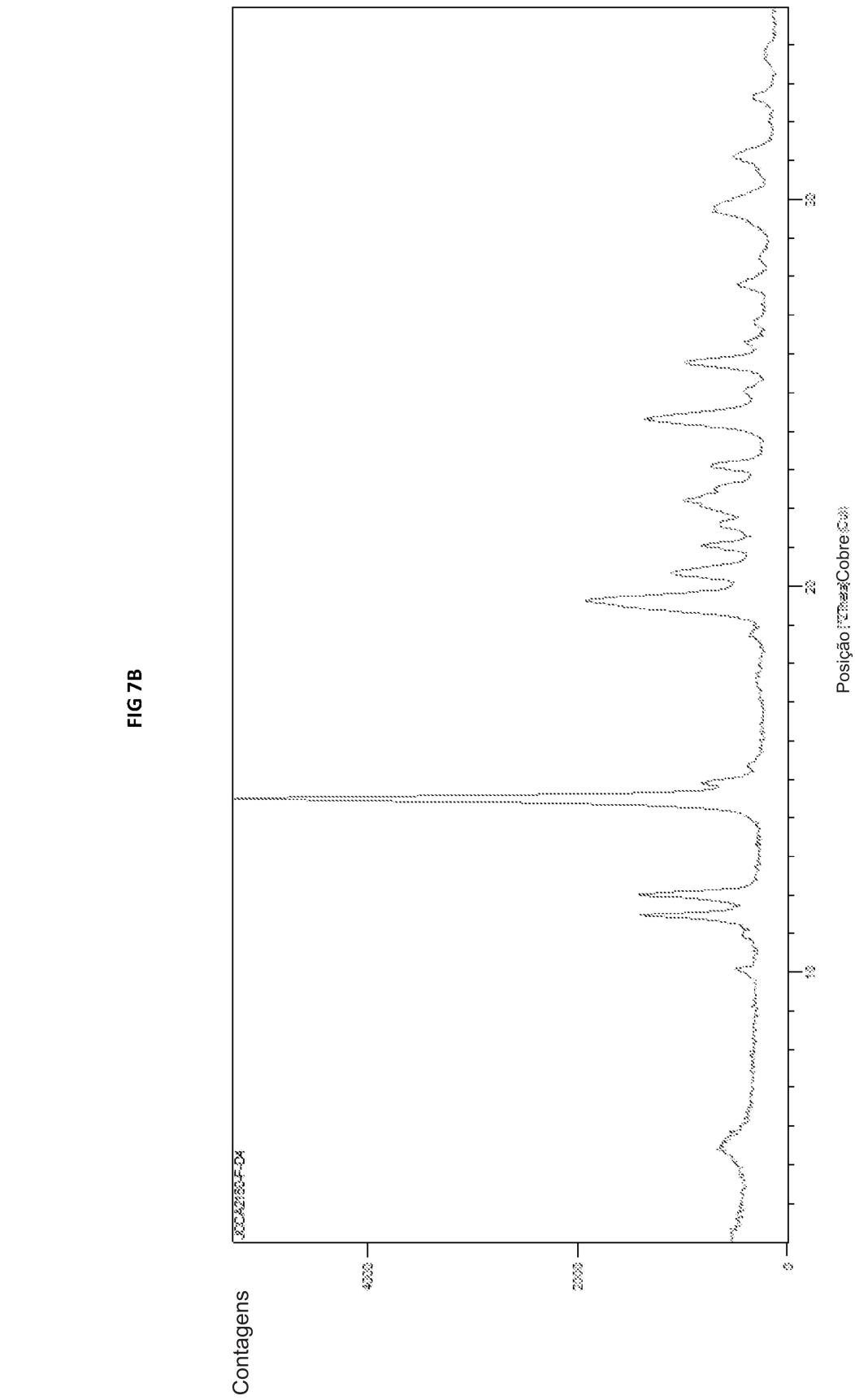


FIG 7C

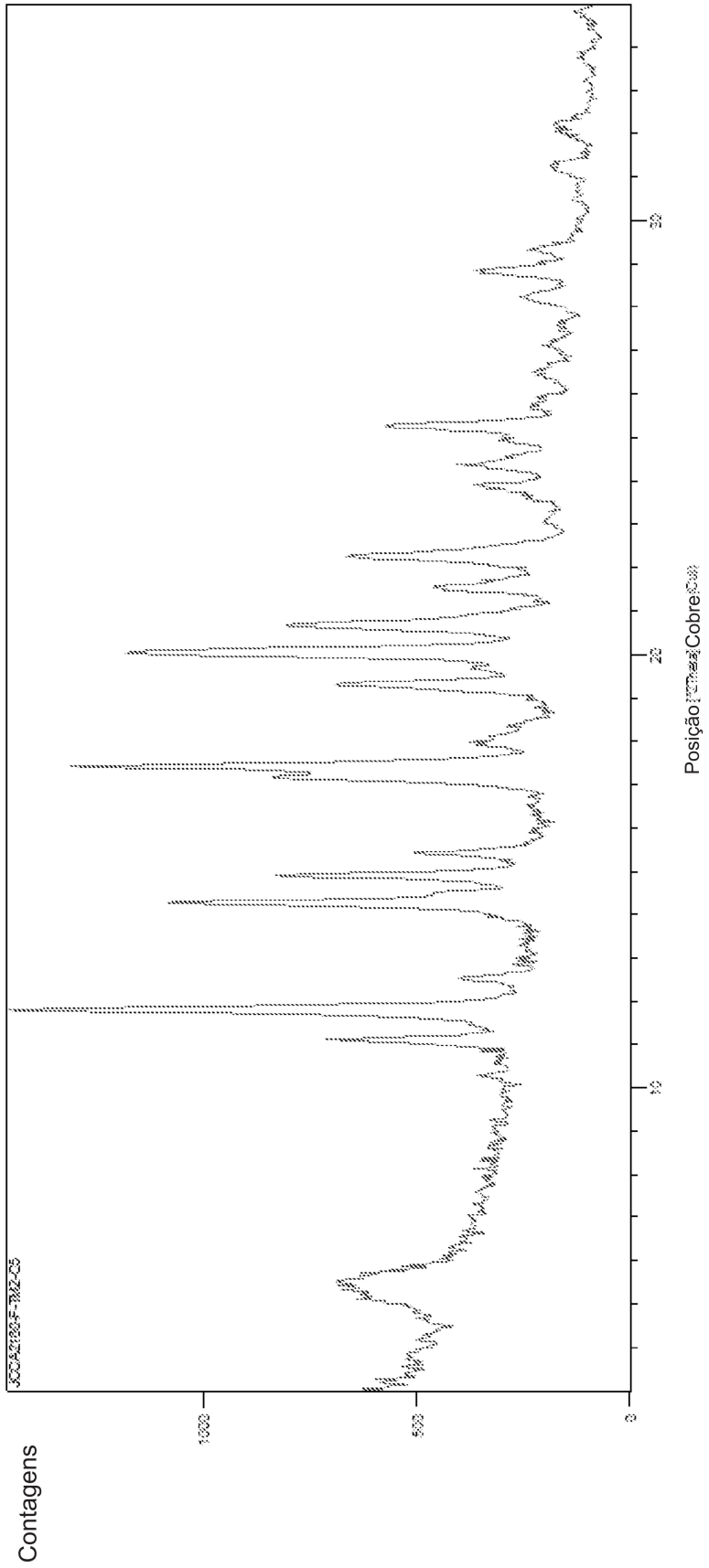


FIG 7D

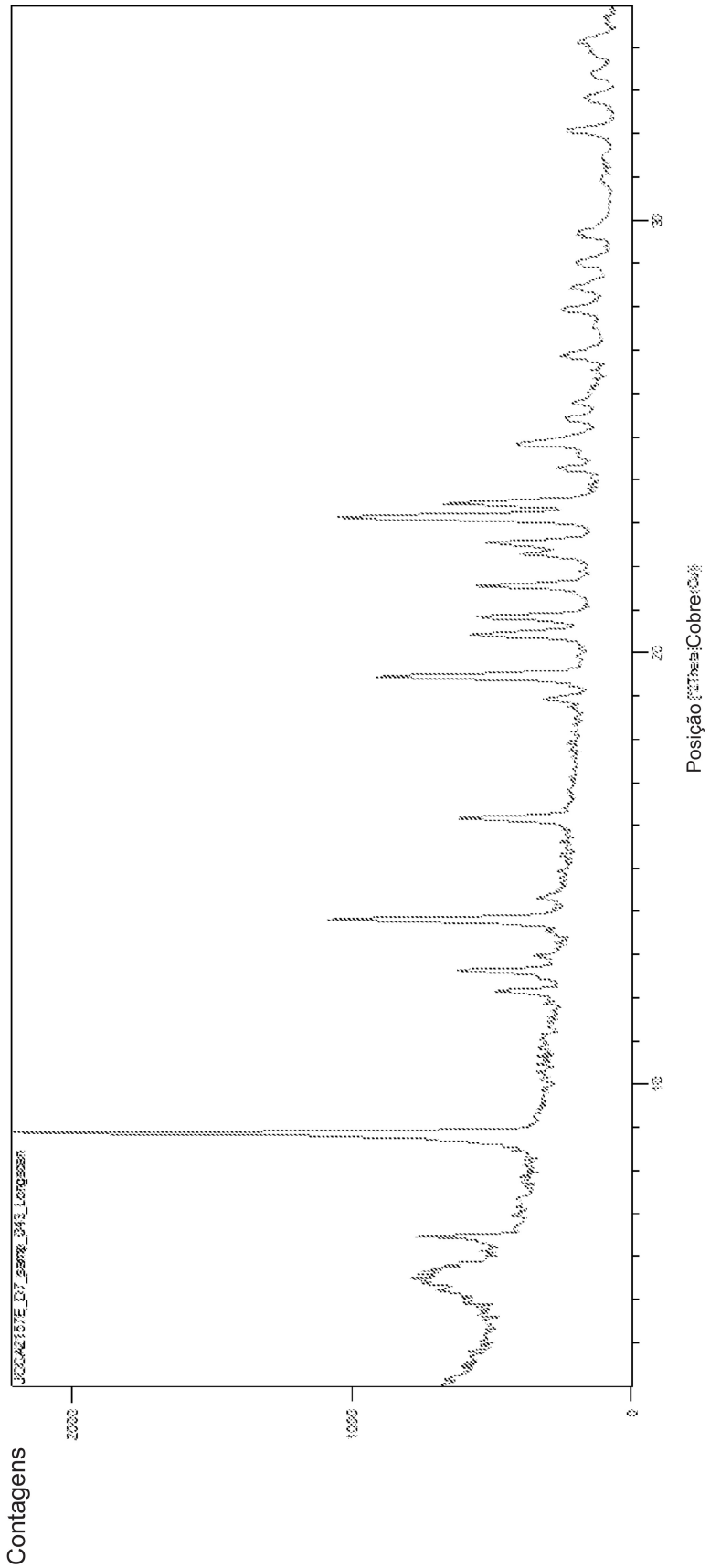


FIG 7E

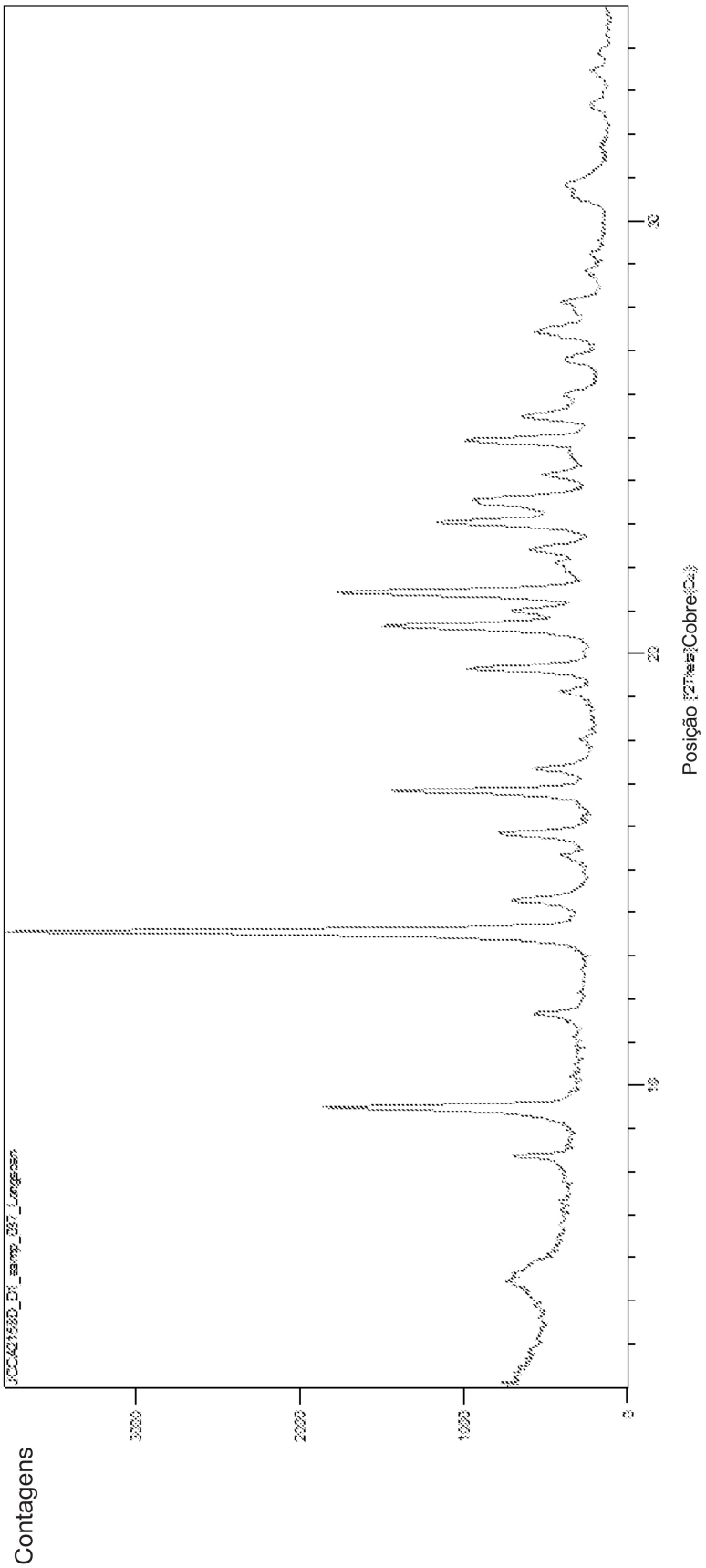
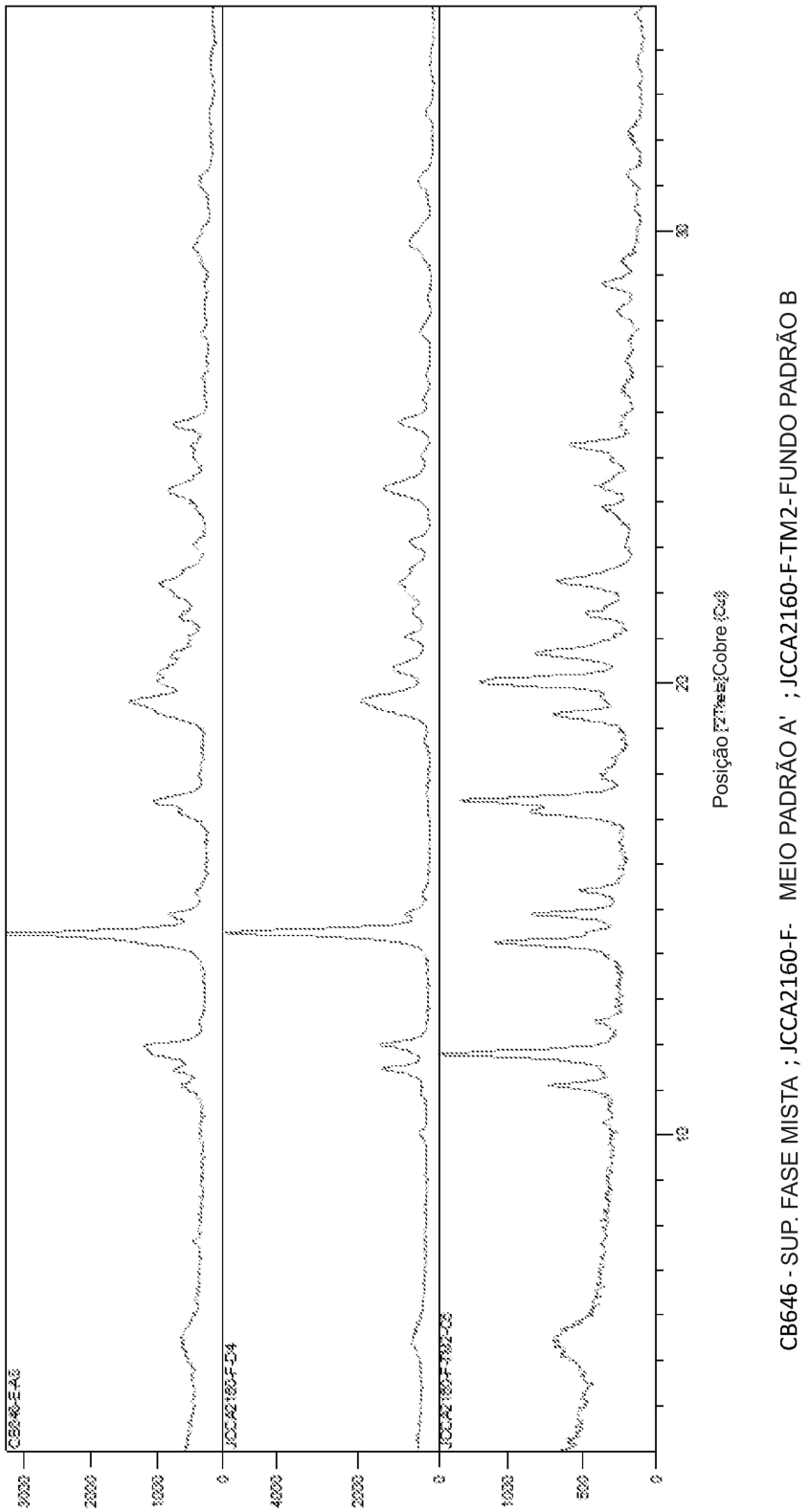


FIG 7F



CB646 - SUP. FASE MISTA ; JCCA2160-F- MEIO PADRÃO A' ; JCCA2160-F-TM2-FUNDO PADRÃO B

FIG 8A

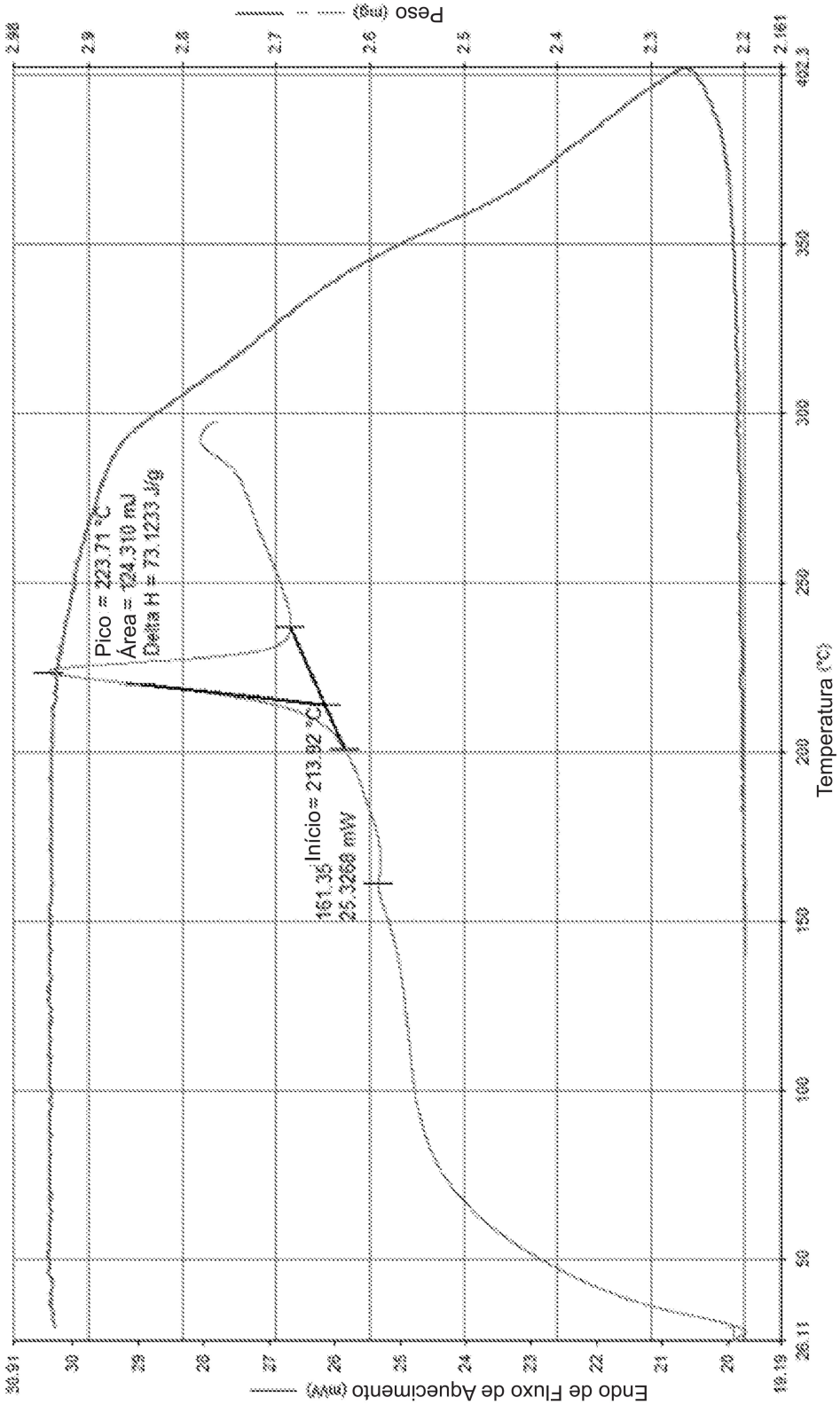

Endo de Fluxo de Aquecimento (mW)
Peso (mg)
Temperatura (°C)
Pico = 223.71 °C
Área = 24.310 mJ
Delta H = 73.1233 J/g
Início = 213.92 °C
161.35
25.3268 mW

FIG 8B

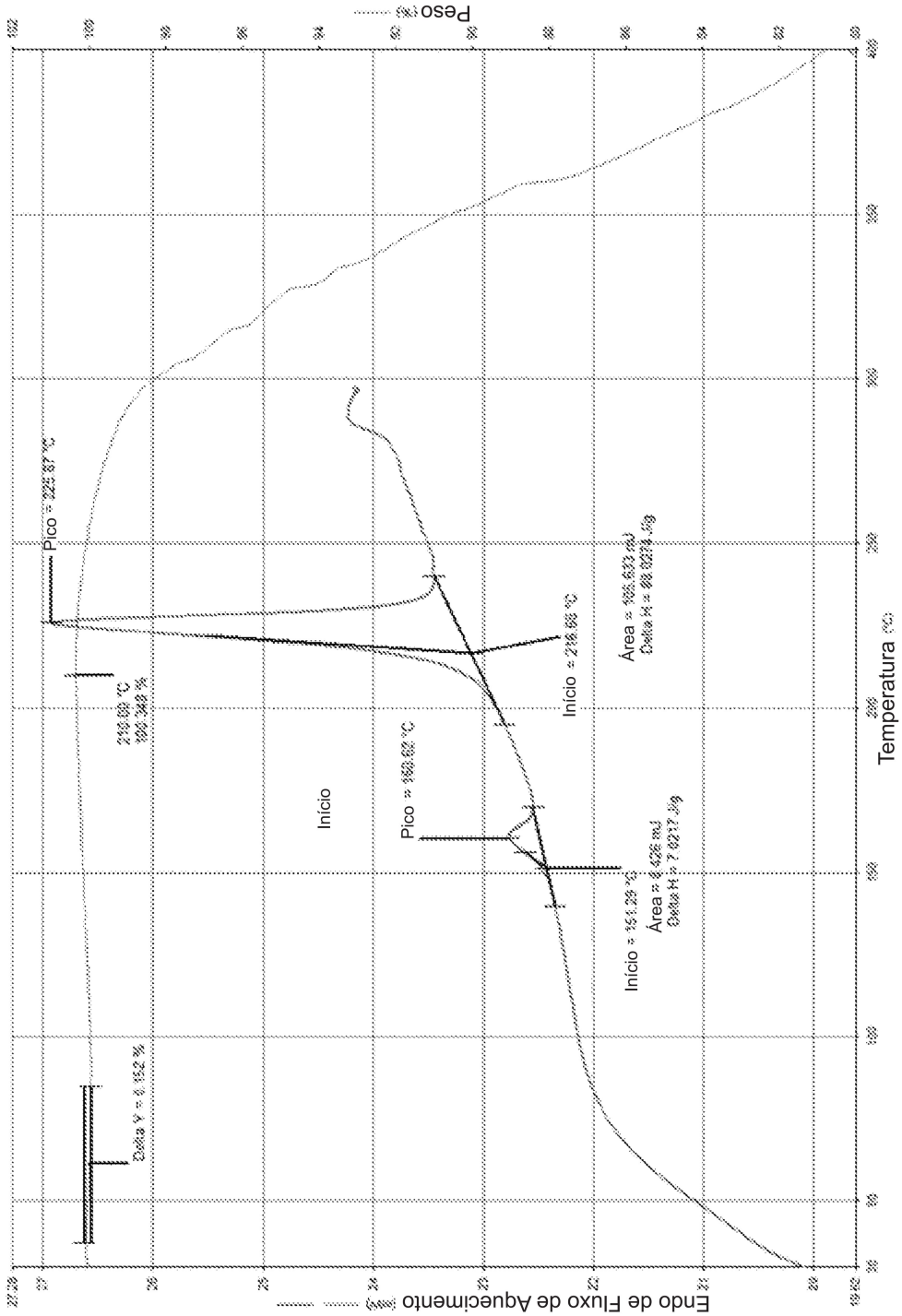

Peso (%)
Endo de Fluxo de Aquecimento (mW)
Temperatura (°C)
Pico = 225.87 °C
Início
Pico = 188.62 °C
Início = 216.68 °C
Área = 166.623 mJ
Início = 151.29 °C
Área = 4.426 mJ

FIG 8C

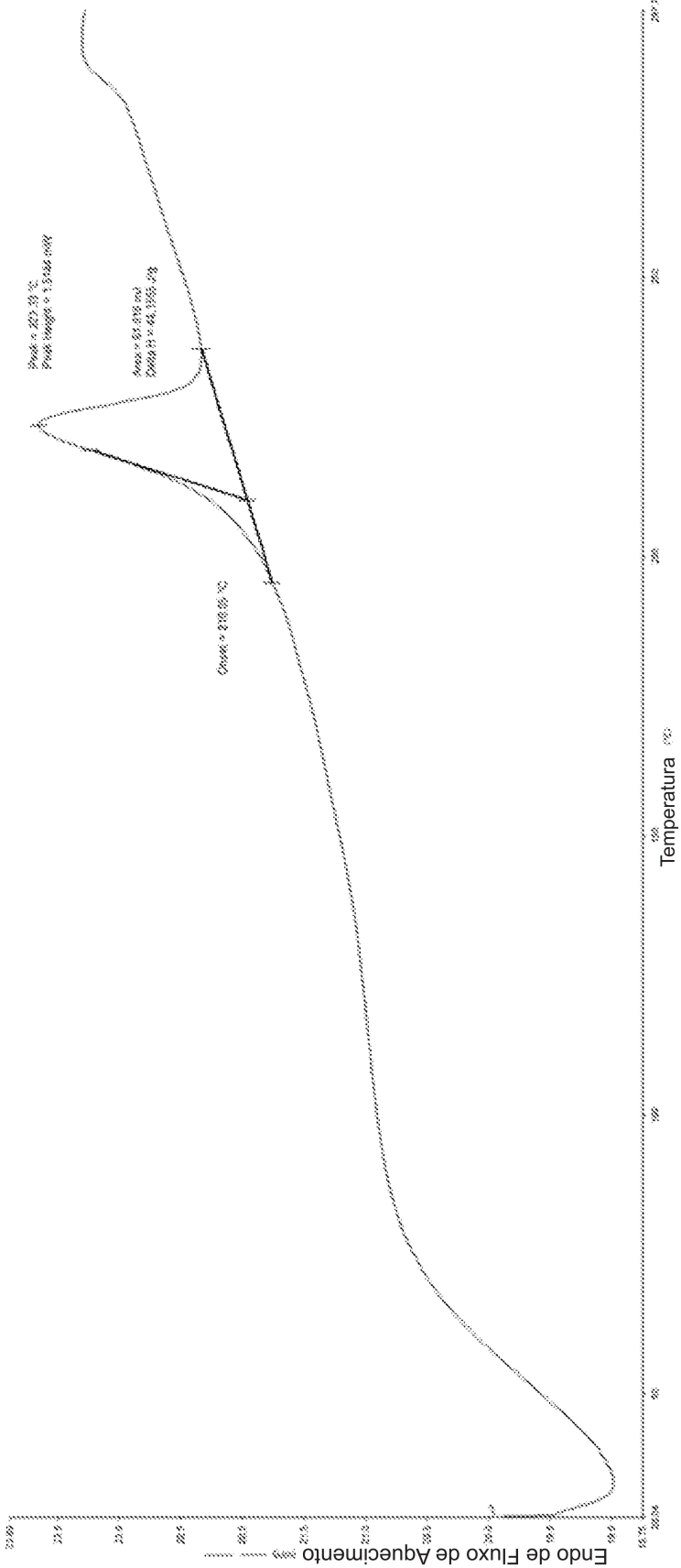


FIG 8D

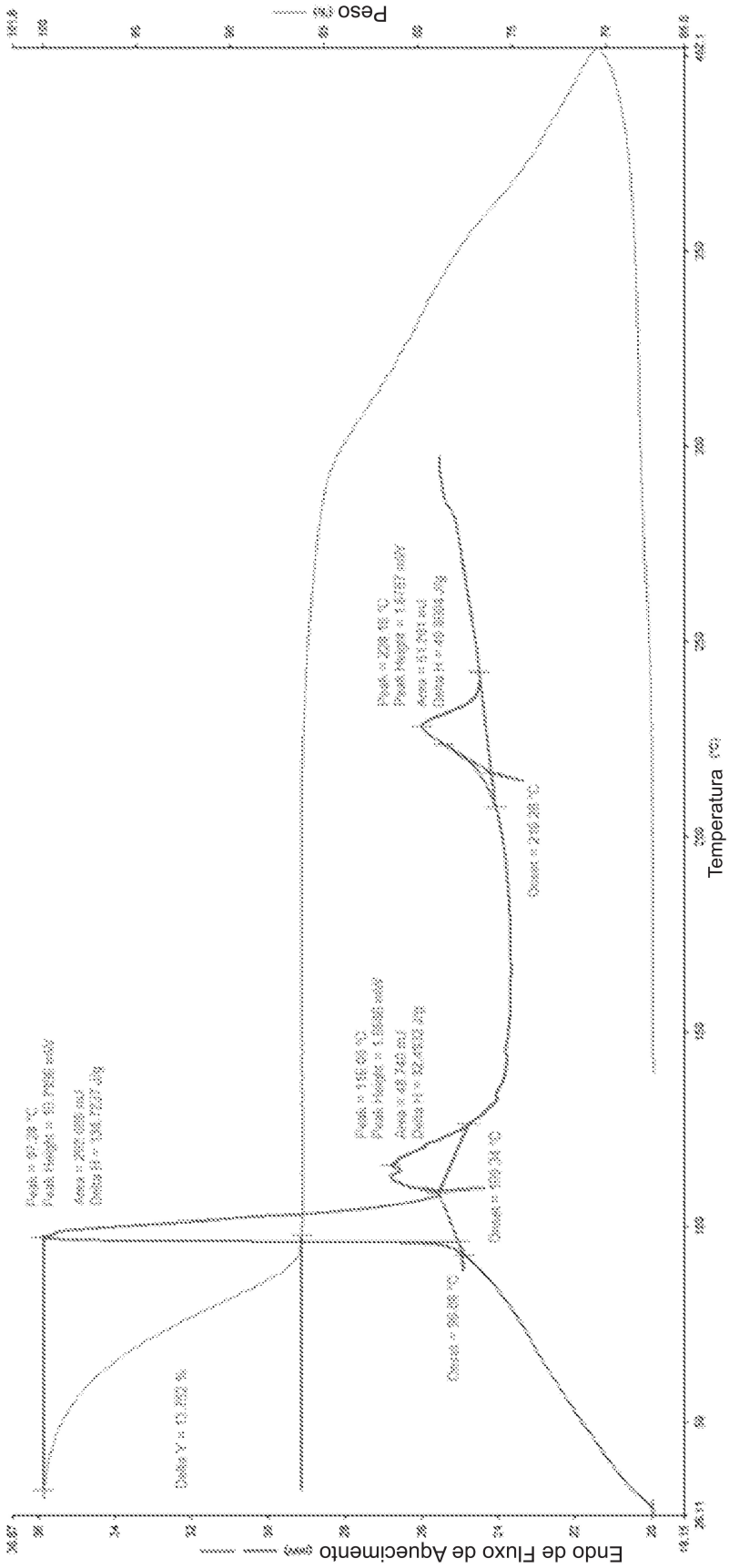


FIG 8E

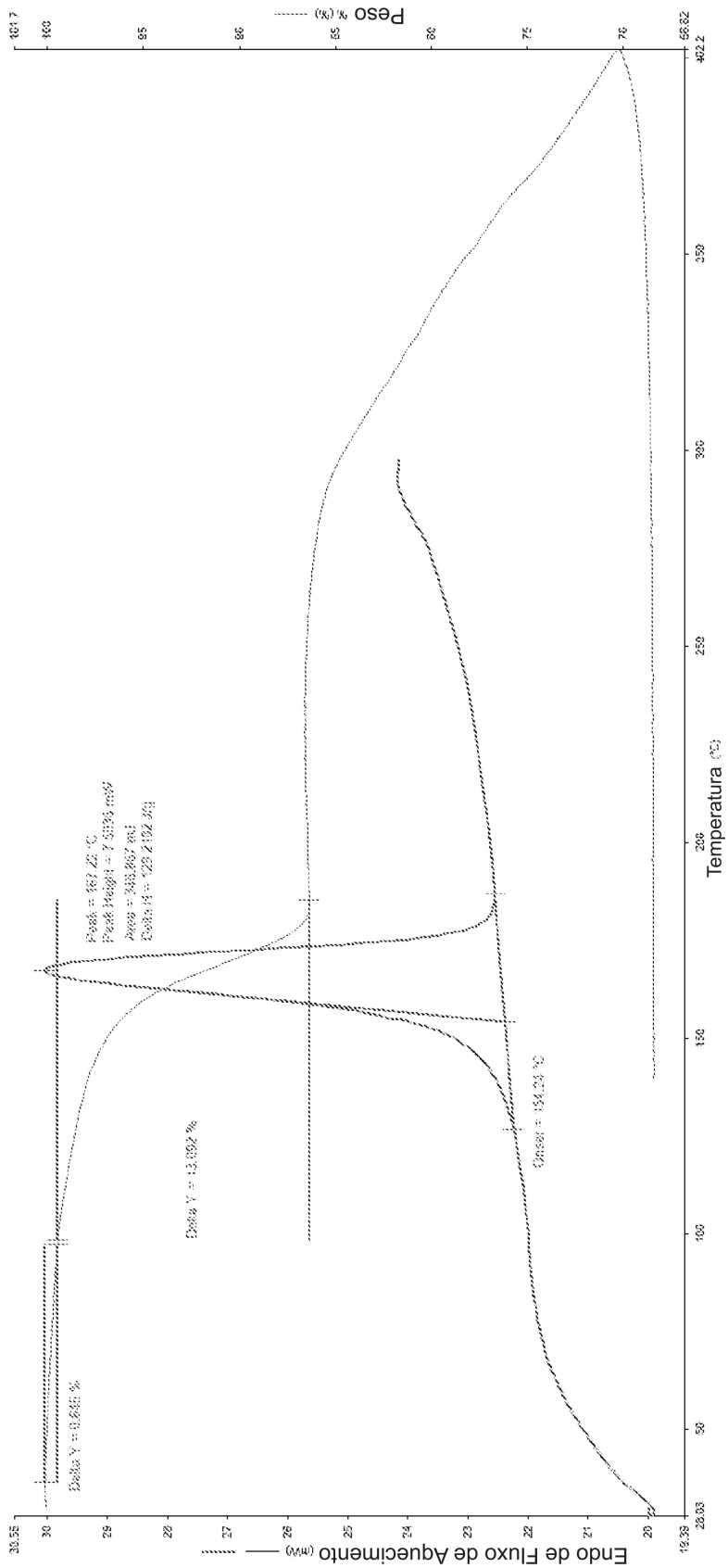

Endo de Fluxo de Aquecimento (mW)
Peso %
Temperatura (°C)
Delta Y = -0.645 %
Peak = 167.42 °C
Peak Height = -7.5396 mW
Area = 348.867 mJ
Delta H = -129.2192 J/g
Delta Y = -13.1892 %
Onset = 154.24 °C
30.55
30
29
28
27
26
25
24
23
22
21
20
19.39
28.03
50
100
150
200
250
300
350
402.2
101.7
100
95
90
85
80
75
70
66.82

FIG 9

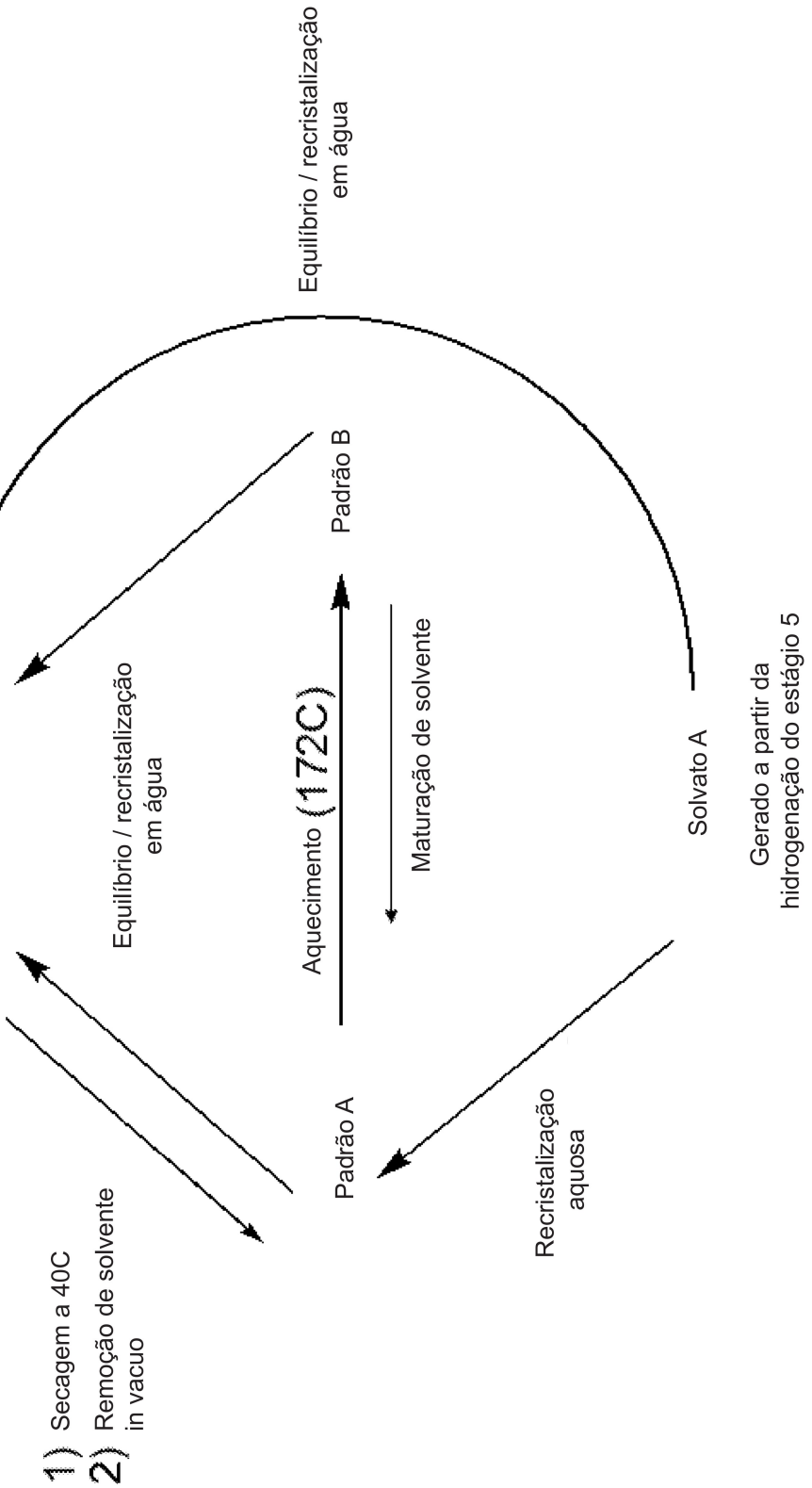

Hidrato A
Equilíbrio / recristalização em água
Padrão B
Aquecimento (172C)
Maturação de solvente
Solvato A
Gerado a partir da hidrogenação do estágio 5
Equilíbrio / recristalização em água
Padrão A
Recristalização aquosa
1) Secagem a 40C
2) Remoção de solvente in vacuo

FIG 10

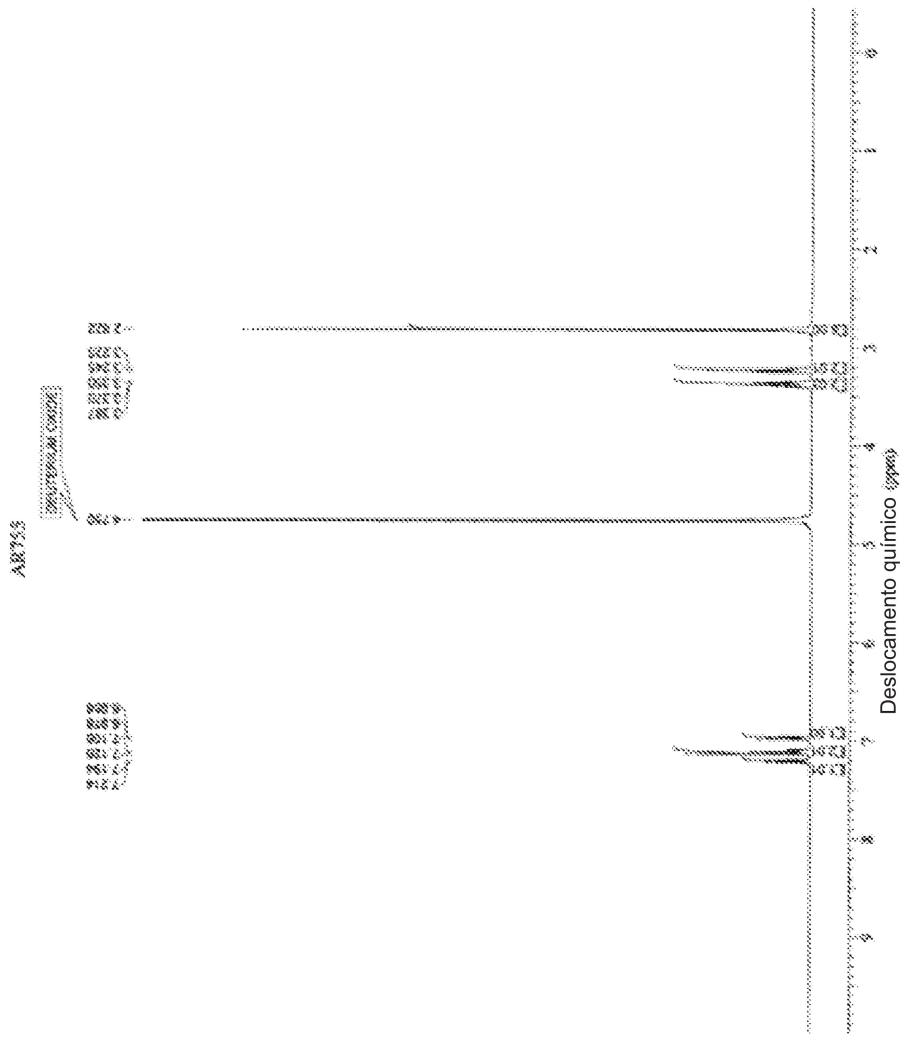


FIG 11

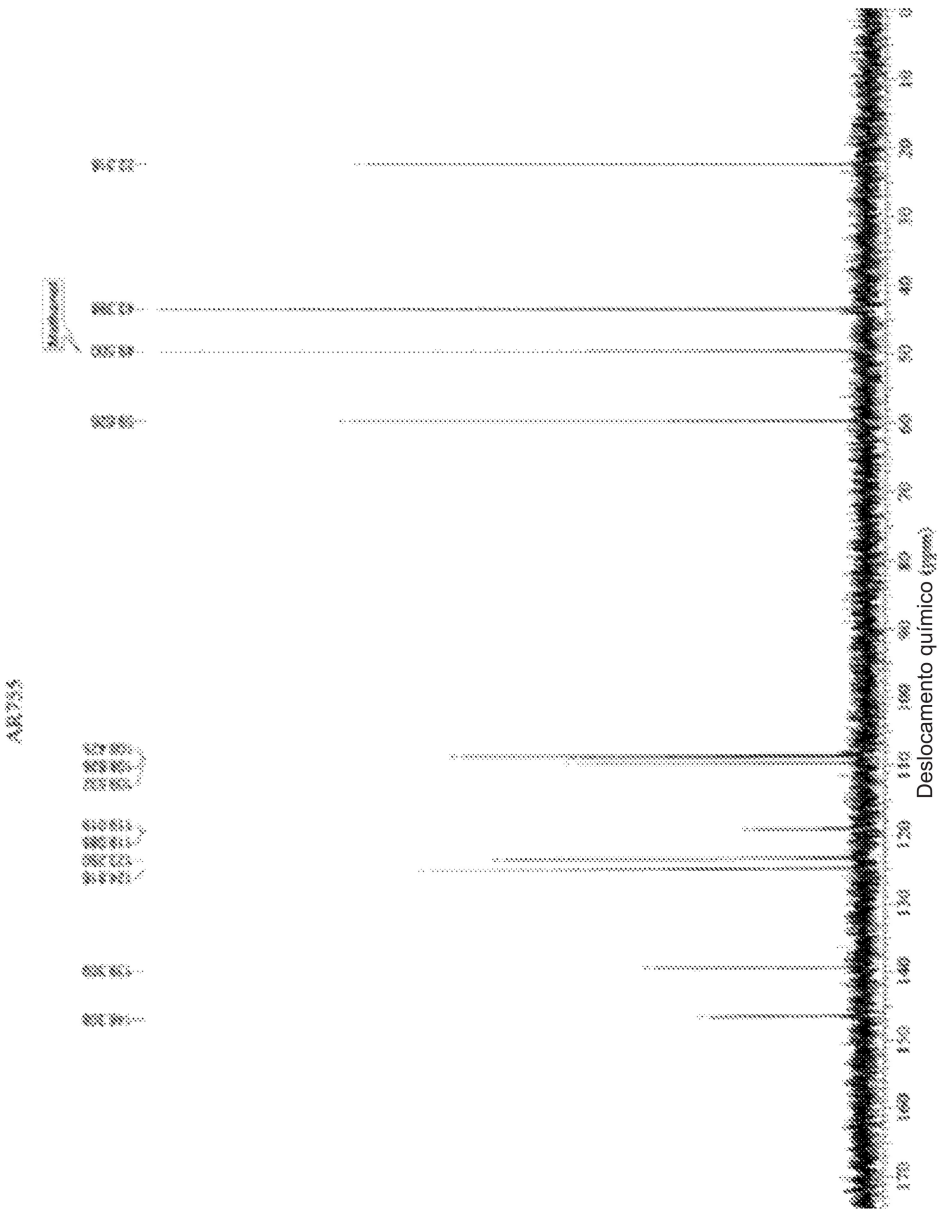


FIG 12

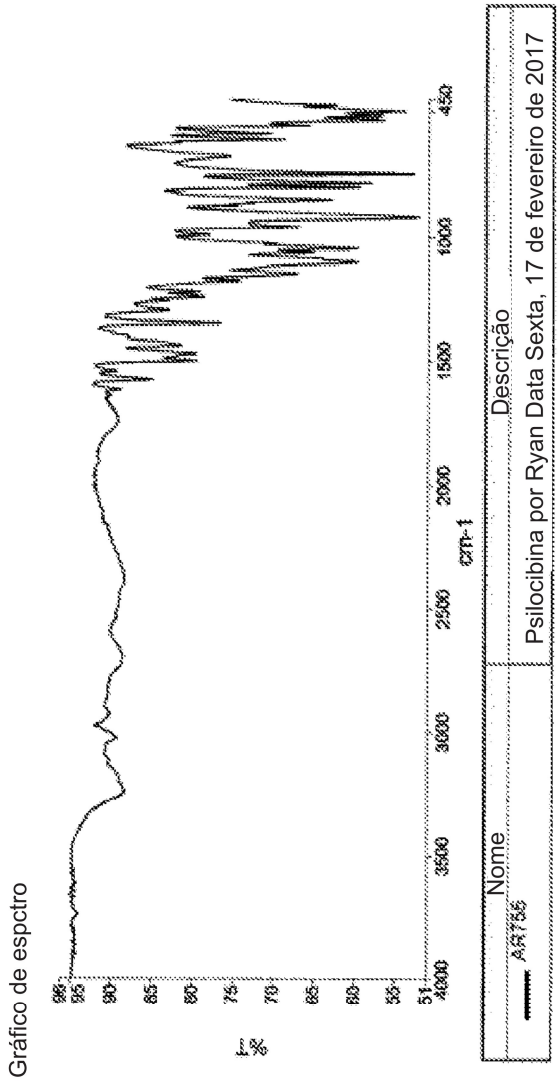


Gráfico de espctro
%T
cm-1
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
Nome
Descrição
AR755
Psilocibina por Ryan Data Sexta, 17 de fevereiro de 2017

FIG 13

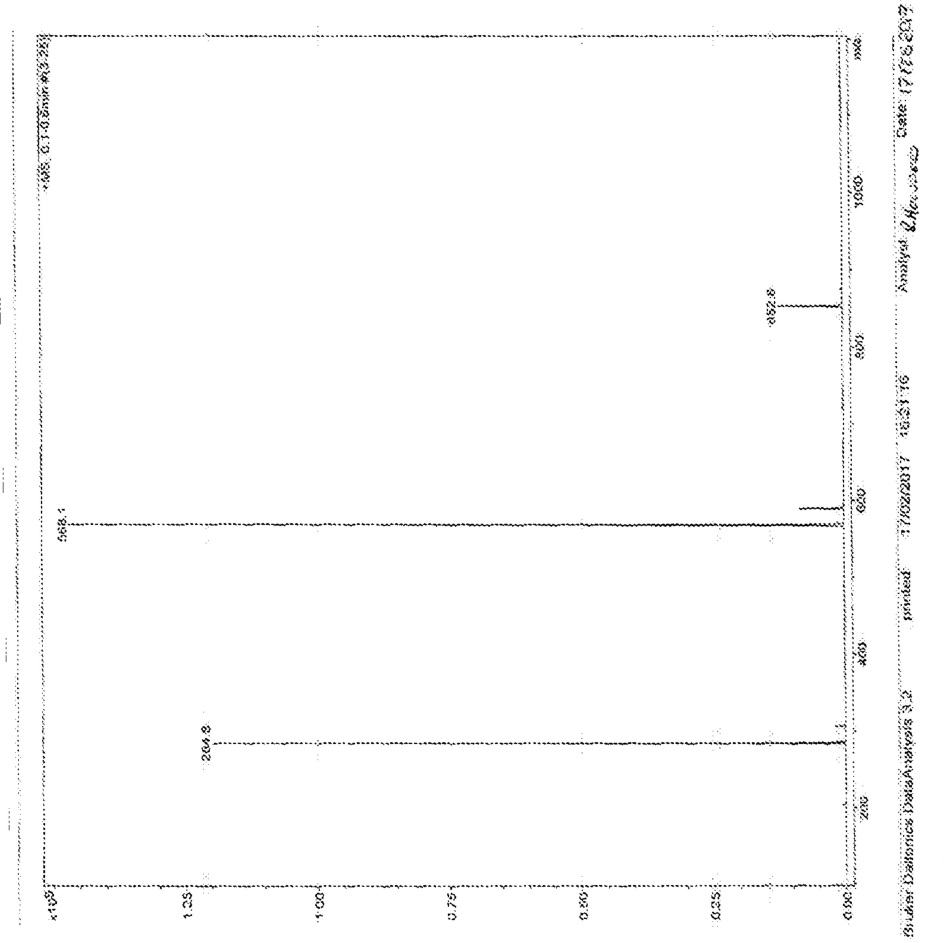
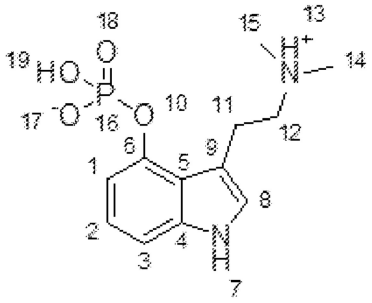


FIG 14



Psilocibina

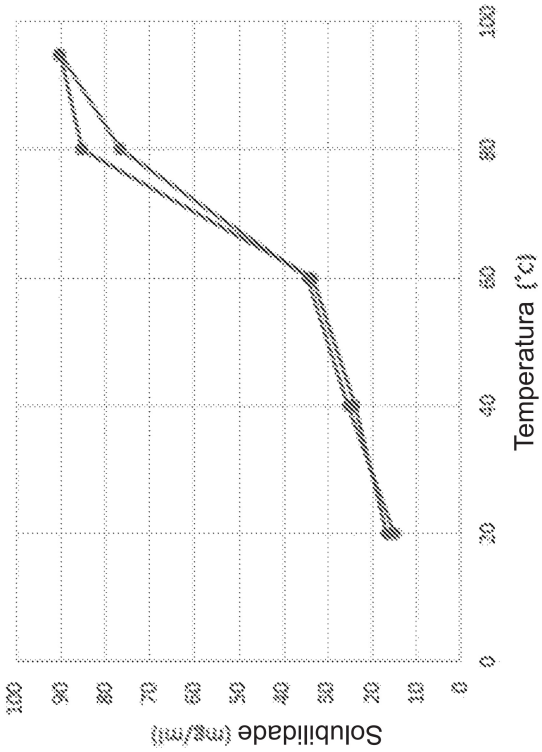
$C_{12}H_{17}N_2O_4P$

Massa exata: 284.09

Peso mol.: 284.25

FIG 15

Solubilidade de psilocibina em água



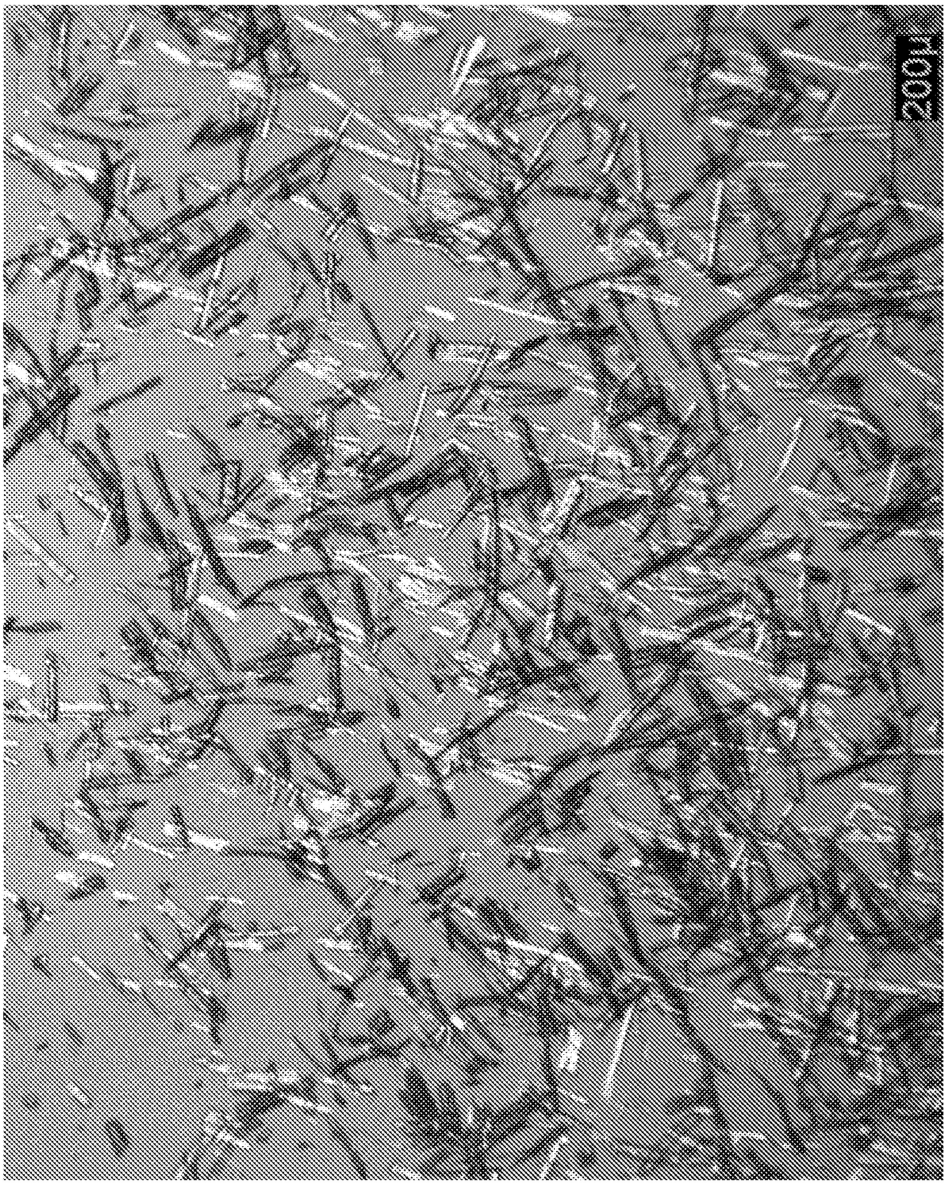


FIG 16A

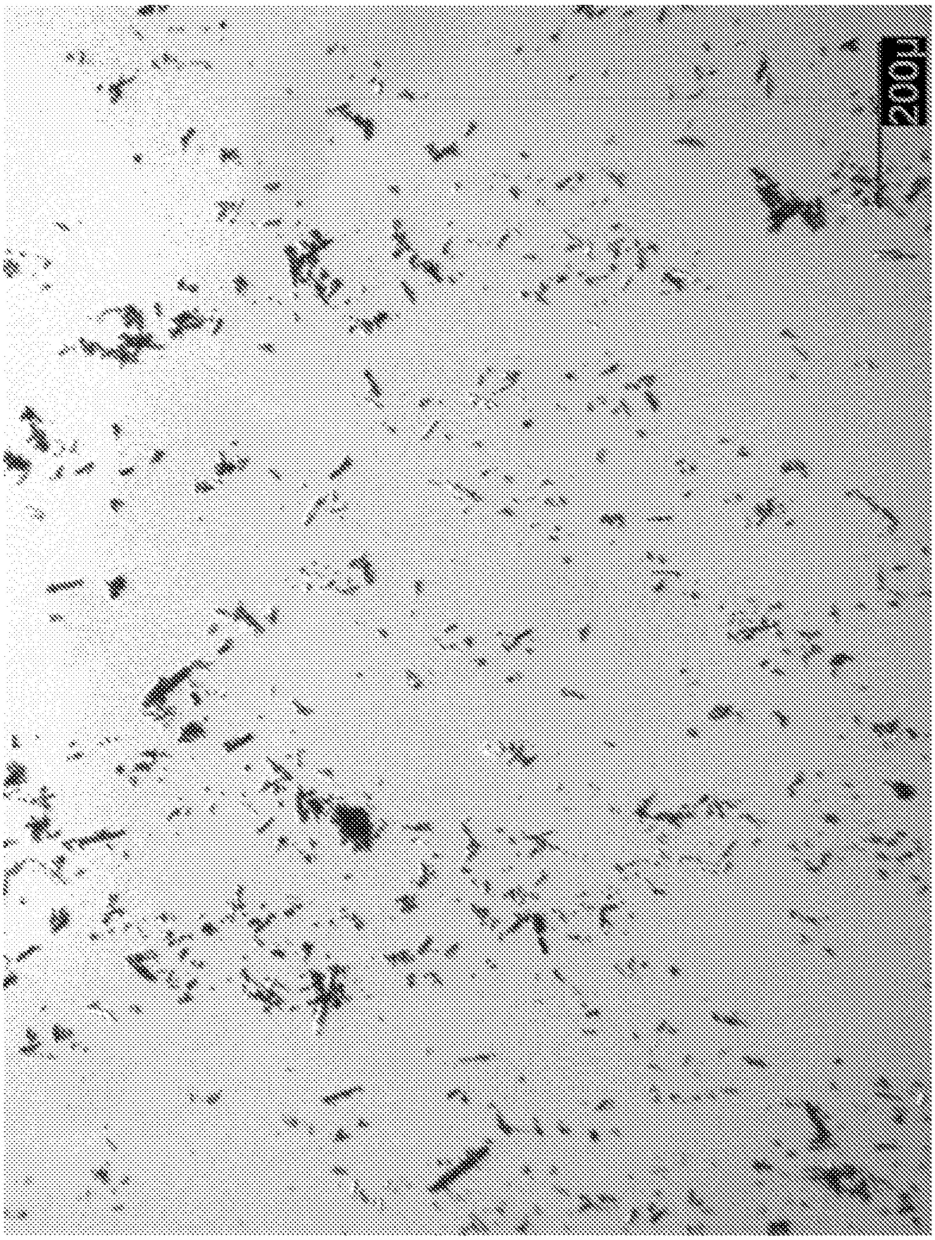


FIG 16B

FIG 17

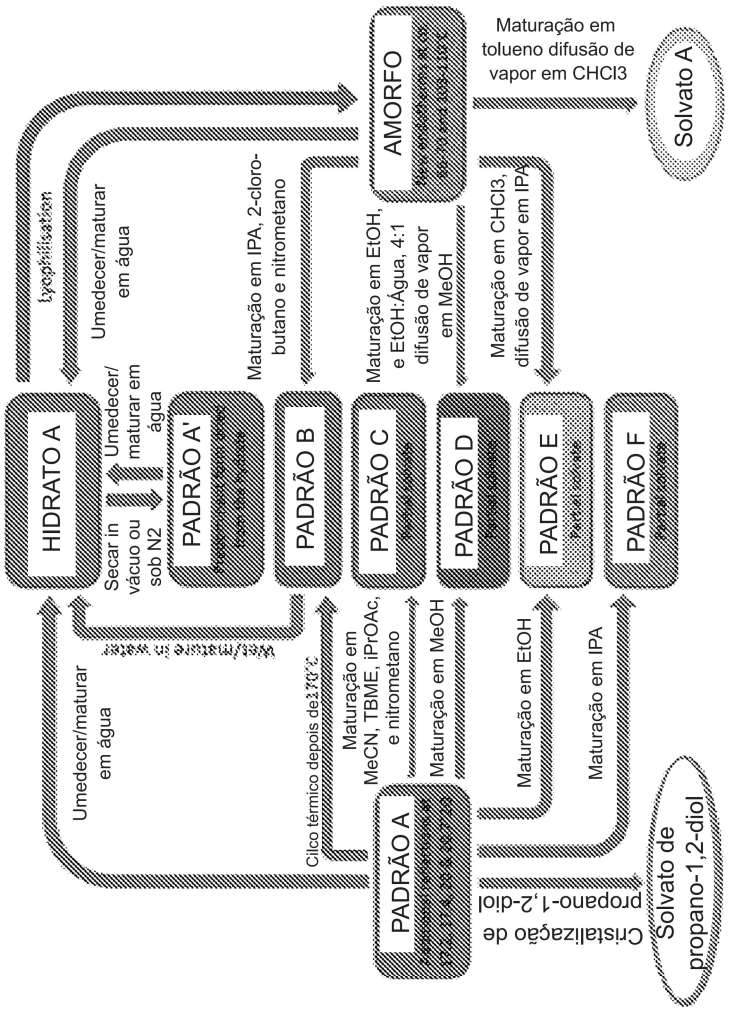

HIDRATO A
Umedecer/maturar em água
Secar in vácuo ou sob N2
Umedecer/ maturar em água
PADRÃO A'
PADRÃO B
PADRÃO C
PADRÃO D
PADRÃO E
PADRÃO F
AMORFO
Maturação em IPA, 2-cloro-butano e nitrometano
Maturação em EtOH, e EtOH:Água, 4:1 difusão de vapor em MeOH
Maturação em CHCl3, difusão de vapor em IPA
Maturação em tolueno difusão de vapor em CHCl3
Solvato A
Cilco térmico depois de
Maturação em MeCN, TBME, iPrOAc, e nitrometano
Maturação em MeOH
Maturação em EtOH
Maturação em IPA
PADRÃO A
Cristalização de propano-1,2-diol
Solvato de propano-1,2-diol

FIG 18

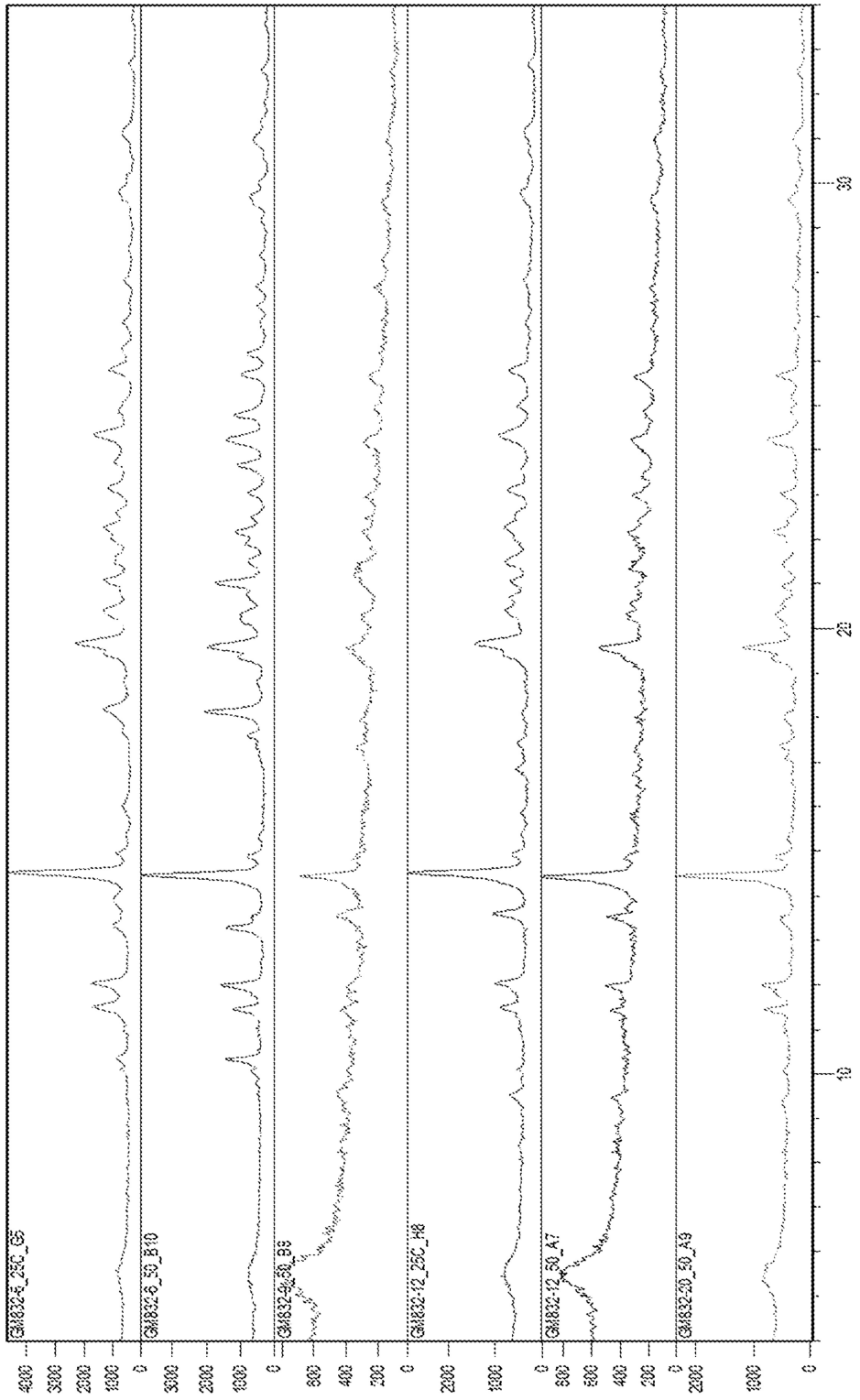

GM832-6_25C_G5
GM832-6_50_B10
GM832-9_50_B6
GM832-12_25C_H8
GM832-12_50_A7
GM832-20_50_A9
10
20
30
Posição [°2Theta] (cobre (Cu))

FIG 19

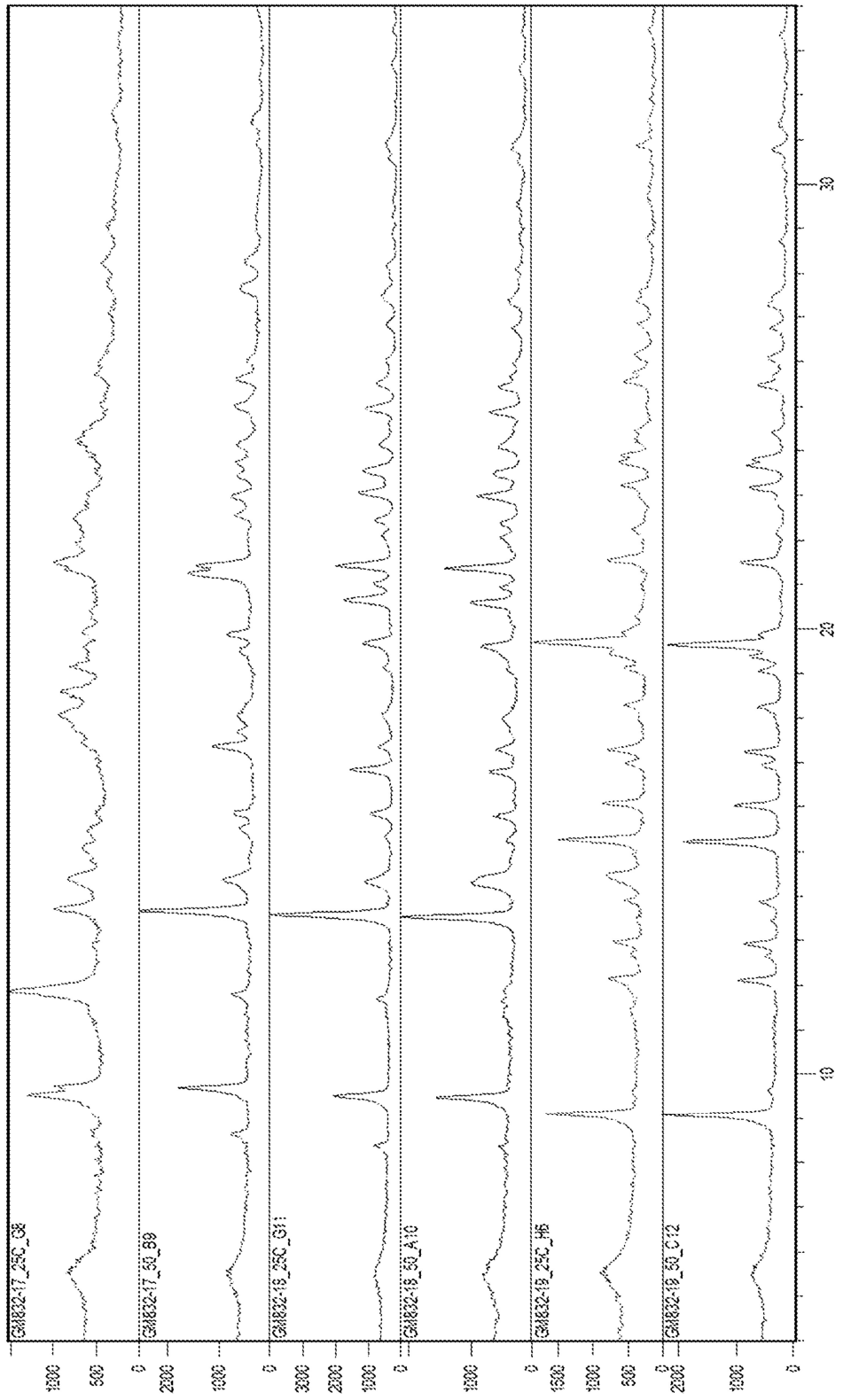

GM832-17_25C_G8
GM832-17_50_B9
GM832-18_25C_G11
GM832-18_50_A10
GM832-19_25C_H5
GM832-19_50_C12
Posição [°2Theta] (cobre (Cu))

FIG 20

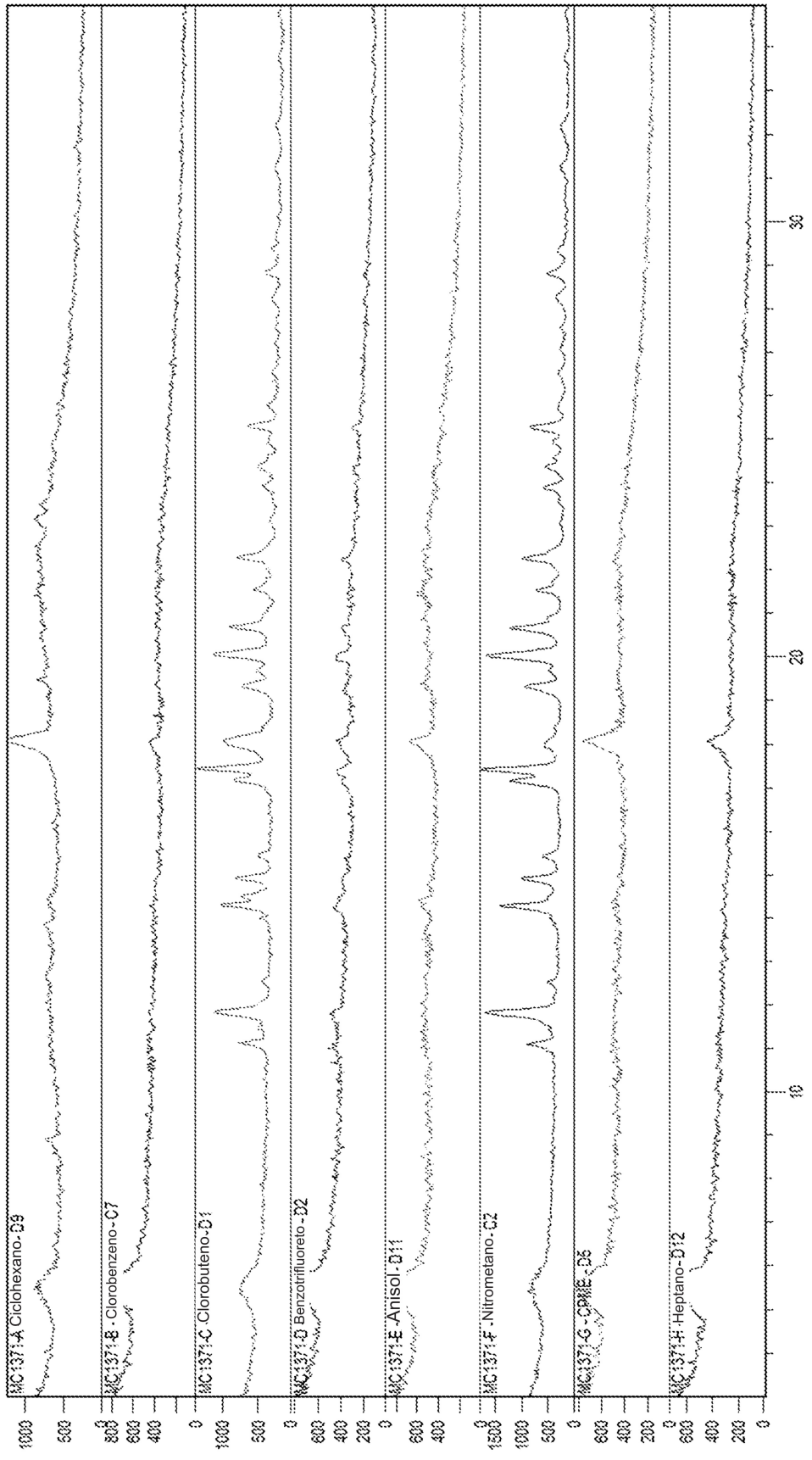

MC1371-A Ciclohexano-D9
MC1371-B - Clorobenzeno-D7
MC1371-C Clorobuteno-D1
MC1371-D Benzotrifluoreto-D2
MC1371-E Anisol-D11
MC1371-F Nitrometano-D2
MC1371-G - CPME-D5
MC1371-H Heptano-D12
10
20
30
Posição [°2Theta] cobre (Cu)

FIG 21

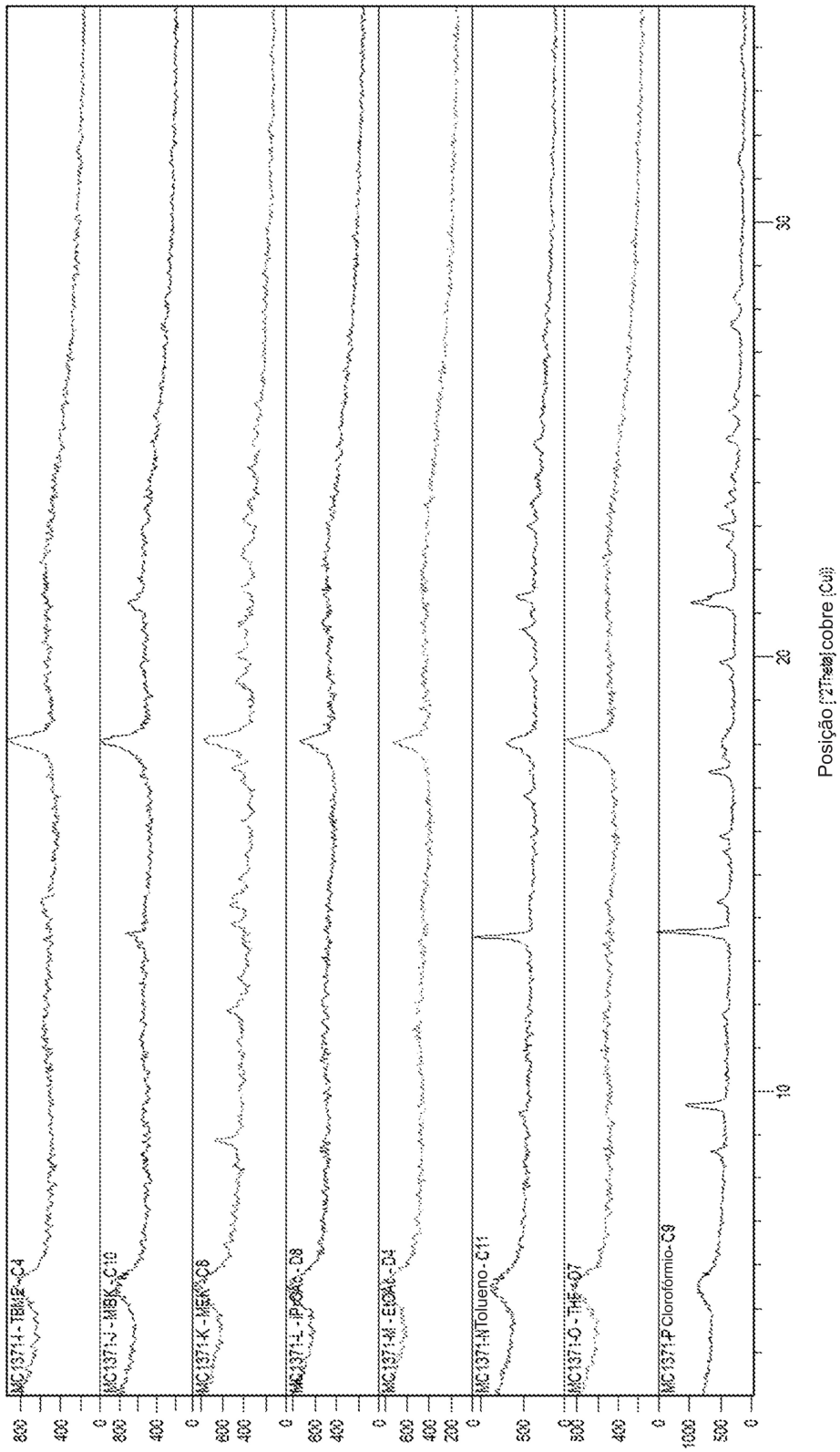
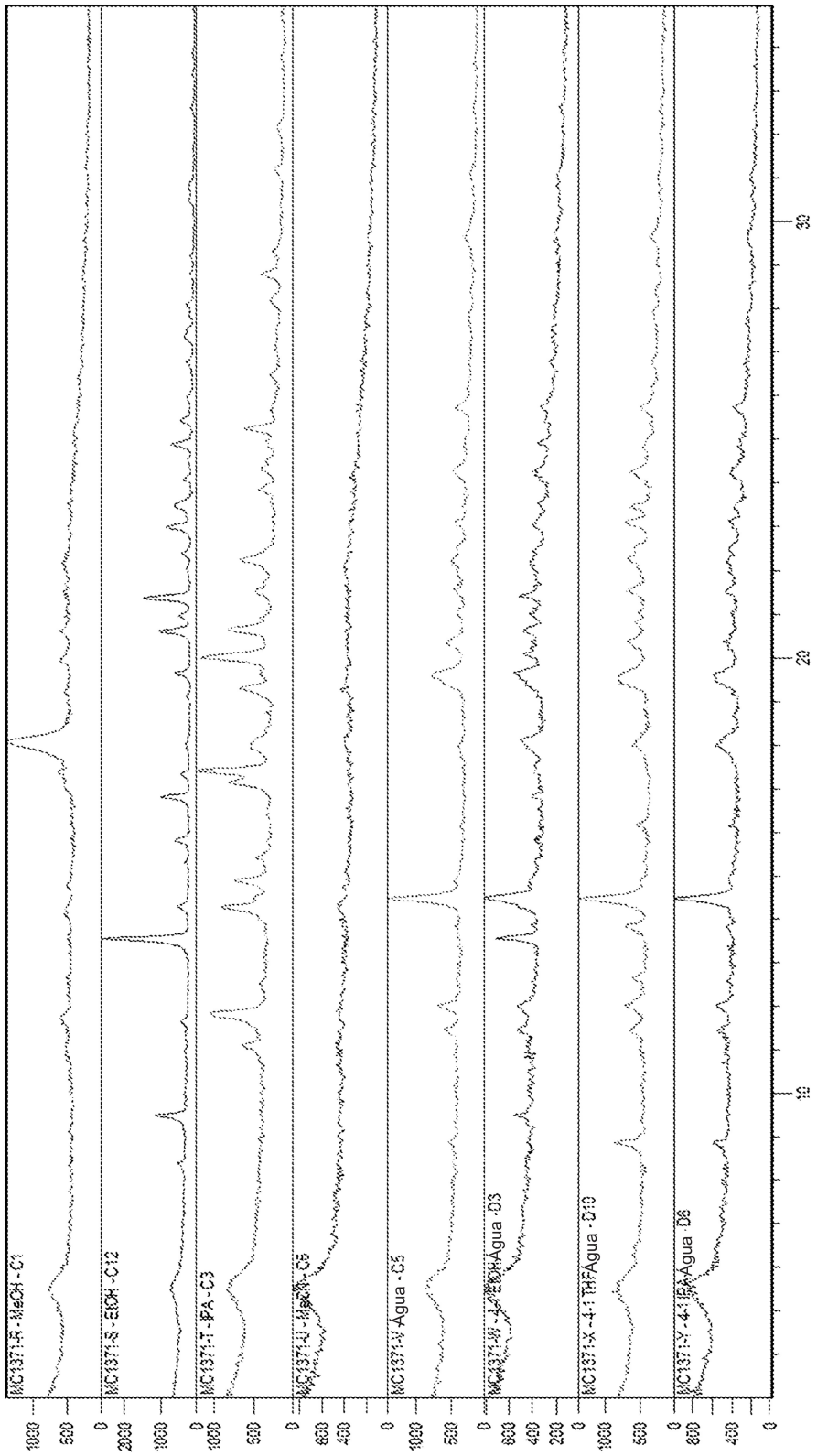

MC1371-I - TBME - C4
MC1371-J - MIBK - C10
MC1371-K - MEK - C8
MC1371-L - IPOAc - C8
MC1371-M - EtOAc - D4
MC1371-N Tolueno - C11
MC1371-O - THF - D7
MC1371-P Clorofórmio - C9
10
20
30
Posição [°2Theta] (cobre (Cu))

FIG 22


MC1371-R - MeOH - C1
MC1371-S - EtOH - C12
MC1371-T - IPA - C3
MC1371-U - MeOH - C5
MC1371-V Água - C5
MC1371-W - 4:1 EtOH:Água - D3
MC1371-X - 4:1 THF:Água - D10
MC1371-Y - 4:1 IPA:Água - D6
10
20
30
Posição [°2Theta] cobre (Cu)

RESUMO

Patente de Invenção: **"PREPARAÇÃO DE PSILOCIBINA, FORMAS POLIMÓRFICAS DIFERENTES, INTERMEDIÁRIOS, FORMULAÇÕES E SEU USO".**

Esta invenção refere-se à produção em larga escala de psilocibina para uso em medicina. Mais particularmente, refere-se a um método para obter psilocibina cristalina de alta pureza, particularmente na forma de Polimorfo A. Também refere-se a um método para a fabricação de psilocibina e intermediários na produção da mesma e formulações contendo psilocibina.