



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014123468, 14.11.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.11.2012

Дата регистрации:
14.11.2017

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
15.11.2011 US 61/559,830

(43) Дата публикации заявки: 27.12.2015 Бюл. № 36

(45) Опубликовано: 14.11.2017 Бюл. № 32

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 16.06.2014

(86) Заявка РСТ:
US 2012/064985 (14.11.2012)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2013/074608 (23.05.2013)

Адрес для переписки:
191002, Санкт-Петербург, а/я 5, ООО "Ляпунов
и партнеры"

(72) Автор(ы):

ВУ Ке (US),
СМИТ Скотт В. (US)

(73) Патентообладатель(и):

АЛЛЕРГАН, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: GB 2211848 A, 12.07.1989. RU
2098122 C1, 10.12.1997.

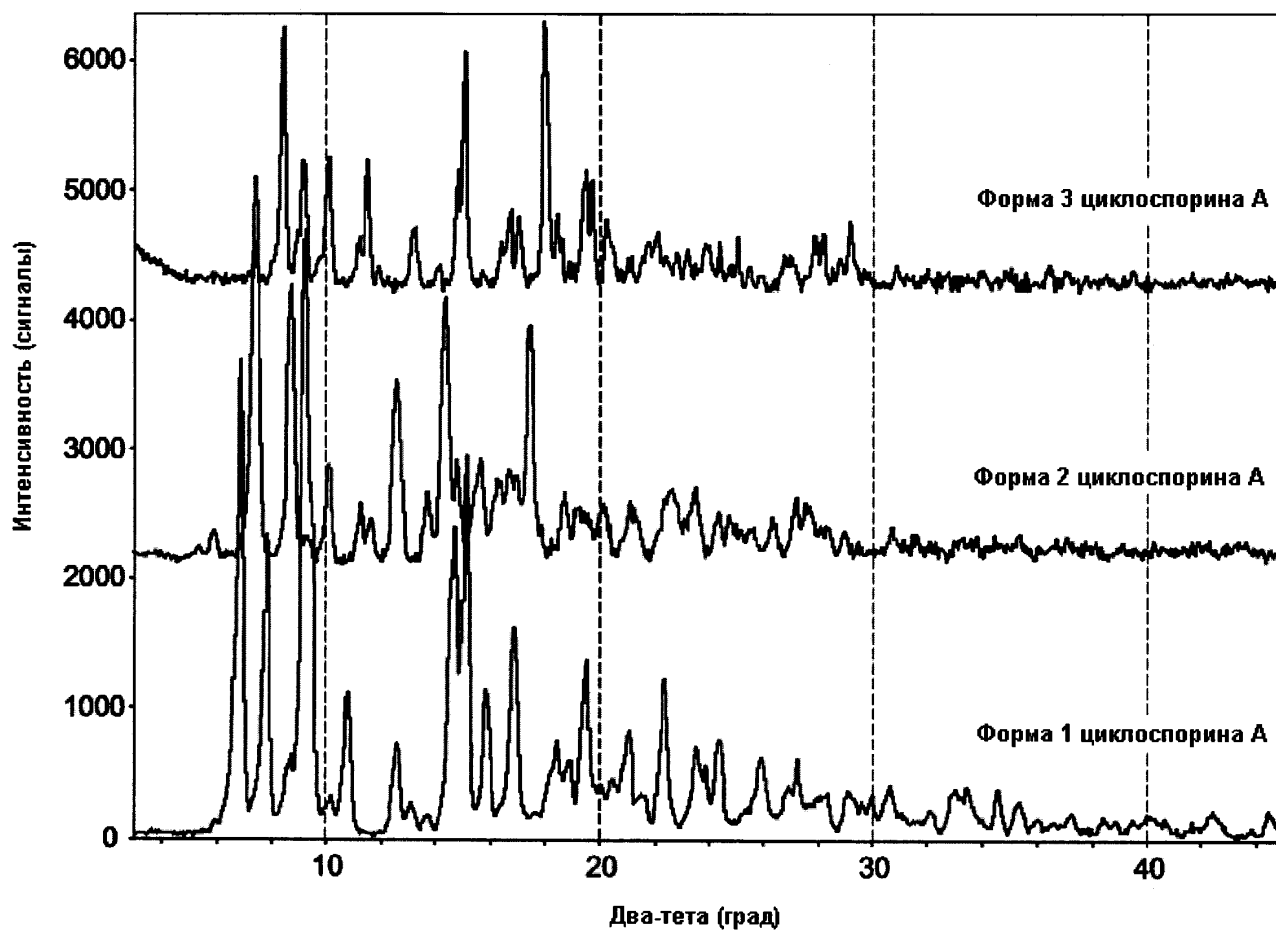
(54) ФОРМА 2 ЦИКЛОСПОРИНА А И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу получения
Формы 2 циклоспорина А, которая является
кинетически стабильной формой циклоспорина
А в водных суспензиях. Способ получения формы
2 циклоспорина А, характеризующейся
основными кристаллическими пиками 2θ
рентгеновской порошковой дифрактограммы
при 7,5, 8,8, 10,2, 11,3, 12,7, 13,8, 14,5, 15,6 и 17,5,
включает стадии: а) приготовление суспензии
циклоспорина А в растворителе, содержащем
воду и ингредиент, выбранный из группы,
состоящей из ацетонитрила, 1,4-диоксана и

этанола; б) первый цикл нагревания-охлаждения,
включающий нагревание суспензии до
температуры от 5 до 50°C, затем охлаждение
суспензии до температуры от 1 до 35°C; с) второй
цикл нагревания-охлаждения, включающий
нагревание суспензии до температуры от 5 до
50°C, затем охлаждение суспензии до
температуры от 1 до 35°C и d) третий цикл
нагревания-охлаждения, включающий нагревание
суспензии до температуры от 5 до 50°C, затем
охлаждение суспензии до температуры от 1 до
35°C. 13 з.п. ф-лы, 9 ил., 3 табл., 1 пр.

Диаграммы РД кристаллических форм циклоспорина А



ФИГ. 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 7/64 (2006.01)*A61K 38/13* (2006.01)*A61P 27/02* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2014123468, 14.11.2012**(24) Effective date for property rights:
14.11.2012Registration date:
14.11.2017

Priority:

(30) Convention priority:
15.11.2011 US 61/559,830(43) Application published: **27.12.2015** Bull. № 36(45) Date of publication: **14.11.2017** Bull. № 32(85) Commencement of national phase: **16.06.2014**(86) PCT application:
US 2012/064985 (14.11.2012)(87) PCT publication:
WO 2013/074608 (23.05.2013)Mail address:
**191002, Sankt-Peterburg, a/ya 5, OOO "Lyapunov i
partnery"**

(72) Inventor(s):

**VU Ke (US),
SMIT Skott V. (US)**

(73) Proprietor(s):

ALLERGAN, INK. (US)(54) **FORM OF 2 CYCLOSPORIN A AND METHOD OF ITS PRODUCTION**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

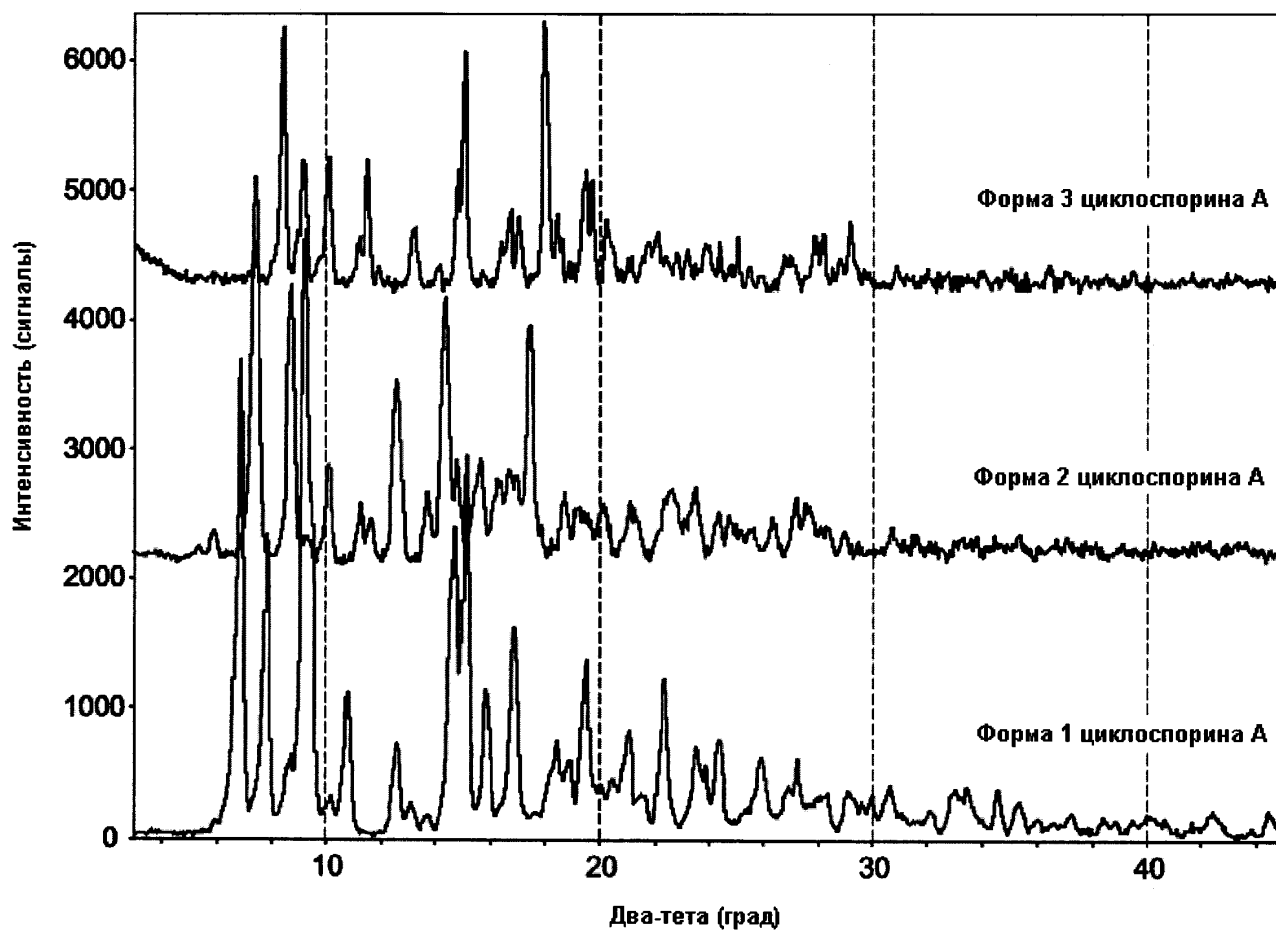
SUBSTANCE: method of producing Form 2 of cyclosporin A, which is a kinetically stable form of cyclosporin A in aqueous suspensions. The method of producing Form 2 of cyclosporin A, characterized by basic crystal peaks of 2θ X-ray powder diffractogram at 7.5, 8.8, 10.2, 11.3, 12.7, 13.8, 14.5, 15.6 and 17.5 includes the steps of: a) preparing a suspension of cyclosporin A in a solvent containing water and an ingredient selected from the group consisting of acetonitrile, 1,4-dioxane and ethanol; b) the first

heating-cooling cycle comprising heating the slurry to a temperature of 5 to 50°C, then cooling the slurry to a temperature of 1 to 35°C; c) the second heating-cooling cycle comprising heating the slurry to a temperature of 5 to 50°C, then cooling the slurry to a temperature of 1 to 35°C and d) the third heating-cooling cycle comprising heating the slurry to a temperature of 5 to 50°C, then cooling the slurry to a temperature of 1 to 35°C.

EFFECT: method improvement.

14 cl, 9 dwg, 3 tbl, 1 ex

Диаграммы РПД кристаллических форм циклоспорина А



ФИГ. 1

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

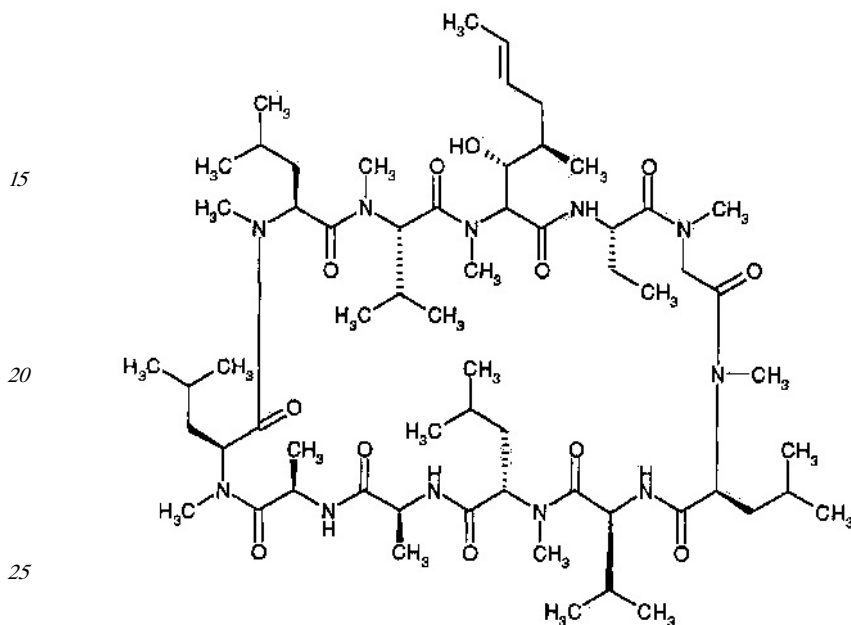
Настоящая патентная заявка заявляет о приоритете по предварительной заявке на патент США №61/559830, поданной 15 ноября 2011 года, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

В настоящем документе описан способ получения новой кристаллической формы циклоспорина А.

Циклоспорин А

Циклоспорин А (CsA) представляет собой циклический пептид, имеющий следующую химическую структуру:



Его химическое название цикло[[*(E)*-(2*S*,3*R*,4*R*)-3-гидрокси-4-метил-2-(метиламино)-6-октеноил]-*L*-2-аминобутирил-*N*-метилглицил-*N*-метил-*L*-лейцил-*L*-валил-*N*-метил-*L*-лейцил-*L*-аланил-*D*-аланил-*N*-метил-*L*-лейцил-*N*-метил-*L*-лейцил-*N*-метил-*L*-валил]. Он известен также под названиями циклоспорин и циклоспорин А. Он представляет собой активный ингредиент в Restasis® (Allergan, Inc., Ирвин, штат Калифорния), в виде эмульсии, содержащей 0,05% (вес./об.) циклоспорина. Restasis® одобрен в Соединенных Штатах Америки для увеличения слезообразования у пациентов, у которых выработка слез считается сниженной из-за глазного воспаления, связанного с сухим кератоконъюнктивитом.

Известно также, что циклоспорин А существует в аморфной форме, форме жидкого кристалла, тетрагональной кристаллической форме (Форме 1) и в орторомбической форме (Форме 3). Авторы настоящего изобретения в настоящем документе описывают способ получения новой кристаллической формы, Формы 2 циклоспорина А.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1 иллюстрирует характеристические диаграммы рентгеновской порошковой дифракции (РПД) CsA в новой кристаллической форме (обозначенной в настоящем документе как Форма 2), в тетрагональной форме (обозначенной в настоящем документе как Форма 1) и в орторомбической форме (обозначенной в настоящем документе как Форма 3).

Фигура 2 иллюстрирует дифрактограмму РПД кристаллической Формы 2 CsA.

Фигура 3 иллюстрирует профиль сорбции/десорбции воды для CsA Формы 2.

Фигура 4 иллюстрирует анализ МДСК Формы 2 CsA, выделенной из 0,04%

композиции с 1% PS80.

Фигура 5 иллюстрирует цикл нагревания и охлаждения, используемый для получения Формы 2 CsA, созданный в качестве способа настоящего изобретения.

Фигура 6 иллюстрирует диаграмму рентгеновской дифракции (РПД) Формы 2 CsA, полученной по способу настоящего изобретения, с использованием в качестве исходного материала аморфного циклоспорина А.

Фигура 7 иллюстрирует РПД Формы 2 CsA, полученной по способу настоящего изобретения, с использованием в качестве исходного материала тетрагонального циклоспорина А.

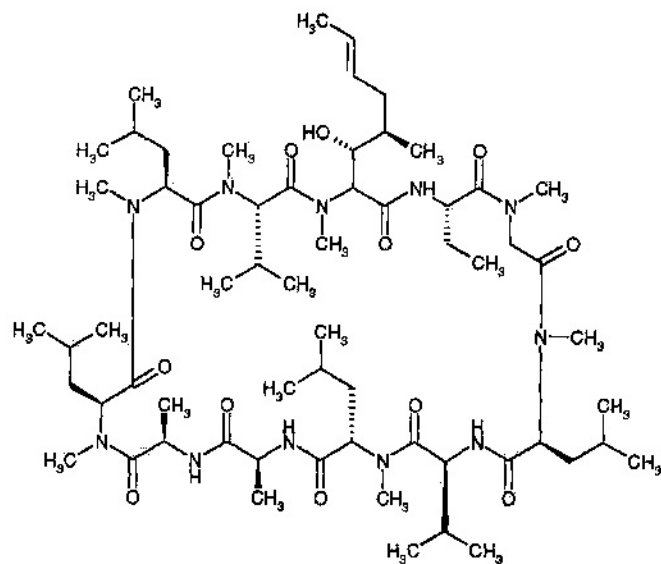
Фигура 7 иллюстрирует РПД Формы 2 CsA, полученной по способу настоящего изобретения, с использованием в качестве исходного материала орторомбического циклоспорина А.

Фигура 9 иллюстрирует моделированную диаграмму РПД форм циклоспорина А.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Диаграмма РПД Формы 2 CsA существенно отличается от тетрагональной формы и орторомбической формы (Фиг. 1). Основные кристаллические пики для формы 2 CsA возникают при (2 θ), при сканировании рентгеновским дифрактометром с источником рентгеновского излучения в виде Cu K α излучения, $\lambda=1,54 \text{ \AA}$, при 30 кВ /15 мА: 7,5, 8,8, 10,2, 11,3, 12,7, 13,8, 14,5, 15,6 и 17,5 (межатомное расстояние в кристаллической решетке около 11,8, 10,0, 8,7, 7,8, 7,0, 6,4, 6,1, 5,6 и 5,1 \AA , соответственно, Фиг. 2). Эти основные пики определены как уникальные пики для Формы 2, по сравнению с орторомбической или тетрагональной формами; а также как пики, имеющие интенсивность, превышающую фон более чем в 5 раз.

В одном из вариантов реализации новая кристаллическая форма (Форма 2) CsA представляет собой нестехиометрический гидрат Циклоспорина А. В другом варианте реализации кристаллическая Форма 2 представлена формулой:



$X \text{ H}_2\text{O}$,

где X представляет собой количество молекул воды и варьируется от 0 до 3. В одном из вариантов реализации X в представленной выше формуле равен 2.

Форма 2 является кинетически стабильной формой CsA в водных суспензиях. Суспензии, содержащие Форму 2, демонстрируют отсутствие превращения в другие известные полиморфные или псевдополиморфные формы при хранении. Было обнаружено, что Форма 1 и аморфная форма превращаются в Форму 2 в присутствии

воды.

Была определена структура монокристалла гидратной формы CsA Формы 2, а параметры кристаллической структуры представлены в Таблице 2. Эти результаты показывают, что Форма 2 является уникальной, по сравнению с другими известными кристаллическими формами циклоспорина А.

**Таблица 1: Кристаллические данные кристалла и параметры сбора данных
расшифровка структуры Формы 2 CsA.**

формула	$C_{62}H_{115}N_{11}O_{14}$
формульный вес	1238,67
пространственная группа	$P 2_1 2_1 2_1$ (№19)
a (Å)	12,6390(5)
b (Å)	19,7582(8)
c (Å)	29,568(2)
объем (Å ³)	7383,8(7)
Z	4
$d_{\text{расч.}}$ (г см ⁻³)	1,114
размеры кристалла (мм)	0,27 x 0,18 x 0,12
температура (К)	150
излучение (длина волны в Å)	Cu K α (1,54184)
монохроматор	конфокальный оптический прибор
коэффициент линейного поглощения (мм ⁻¹)	0,640
используемая поправка абсорбции	эмпирическая ^a
коэффициенты пропускания (min, max)	0,80, 0,93
дифрактометр	Rigaku RAPID-II
диапазон h, k, l	от -13 до 13, от -21 до 21, от -32 до 21
диапазон 2θ (град)	5,38-115,00
блочность (град)	1,31
используемая программа	SHELXTL
F_{max}	2704.0
весомость	$1/[\sigma^2(F_o^2)+(0,0845P)^2+0,0000P]$, где $P=(F_o^2+2F_c^2)/3$
собранные данные	37360
уникальные данные	9964
R_{int}	0,077
данные, используемые при уточнении	9964
отсечка, используемая в расчете R-фактора	$F_o^2 > 2,0\sigma(F_o^2)$
данные с $I > 2,0\sigma(I)$	6597
количество переменных	834
наибольший сдвиг/esd в последнем цикле	0,00
$R(F_o)$	0,061
$R_w(F_o^2)$	0,145
критерий соответствия	1,037
определение абсолютной структуры	параметр Флека ^b (0,0(3))

Асимметричное звено этой Формы 2 CsA содержит одну молекулу циклоспорина А и две молекулы воды. Возможно, что другие небольшие молекулы, которые могут связываться с водой посредством водородных связей, могут играть роль материала,

заполняющего пустоты, что дает ряд потенциальных структур, начиная от орторомбического дигидрата до искаженного моноклинного дигидрата. Диаграмма РПД, рассчитанная по структуре монокристалла, представлена на Фигуре 9 и она соответствует экспериментальной диаграмме, представленной на Фигуре 2. Эти

согласующиеся диаграммы подтверждают, что Форма 2 является уникальной и чистой кристаллической формой циклоспорино А.

Не ограничиваясь какой-либо теорией, термогравиметрический анализ вместе с титрованием по Карлу Фишеру и анализом сорбции-десорбции воды (VSA) позволяет предположить, что Форма 2 CsA представляет собой нестехиометрический гидрат CsA.

Анализ сорбции паров Формы 2 Циклоспорино показывает, что содержание воды в новой кристаллической форме обратимо изменяется в зависимости от относительной влажности, как показано на Фиг. 3. Аналогично тетрагональной форме, новая форма CsA подвергается фазовому переходу в жидкий кристалл или аморфную форму при 124,4°C, затем плавится, как показывает анализ модулированной дифференциальной сканирующей калориметрии (МДСК) (Фигура 4).

Дополнительные подробности в отношении Формы 2 CsA представлены в заявке на патент США №13/480710, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Способы получения Формы 2 циклоспорино А

Осаждением из полисорбата 80

Форма 2 циклоспорино А может быть получена суспендированием аморфного циклоспорино А в воде, содержащей полисорбат 80 (полиоксиэтилен-сорбитмоноолеат), с последующим нагреванием раствора до температуры в диапазоне от около 55°C до около 75°C и выдерживанием при этой температуре в течение по меньшей мере от около 18 до около 48 часов, после чего удаляют осадок, Форму 2 циклоспорино А.

Этот способ можно использовать с циклоспорином А в концентрации от около 0,001% до около 10%. При использовании в настоящем документе, термин «около», при использовании вместе с определенным значением, указывает значение, которое в разумных пределах близко к указанному значению.

Поэтому в этом способе можно использовать циклоспорин А в концентрации около 0,001% (вес./об.), около 0,005% (вес./об.), около 0,01% (вес./об.), около 0,02% (вес./об.), около 0,03% (вес./об.), около 0,04% (вес./об.), около 0,05% (вес./об.), около 0,06% (вес./об.), около 0,07% (вес./об.), около 0,08% (вес./об.), около 0,09% (вес./об.), около 0,1% (вес./об.), около 0,2% (вес./об.), около 0,3% (вес./об.), около 0,4% (вес./об.), около 0,5% (вес./об.), около 0,6% (вес./об.), около 0,7% (вес./об.), около 0,8% (вес./об.), около 0,9% (вес./об.), около 1% (вес./об.), около 2% (вес./об.), около 3% (вес./об.), около 4% (вес./об.), около 5% (вес./об.), около 6% (вес./об.), около 7% (вес./об.), около 8% (вес./об.), около 9% (вес./об.) или около 10% (вес./об.) циклоспорино А.

В этом способе можно использовать полисорбат 80 в концентрации от около 0,1% до 10%, такое значение как около 0,1% (вес./об.), около 0,2% (вес./об.), около 0,3% (вес./об.), около 0,4% (вес./об.), около 0,5% (вес./об.), около 0,6% (вес./об.), около 0,7% (вес./об.), около 0,8% (вес./об.), около 0,9% (вес./об.), около 1% (вес./об.), около 2% (вес./об.), около 3% (вес./об.), около 4% (вес./об.), около 5% (вес./об.), около 6% (вес./об.), около 7% (вес./об.), около 8% (вес./об.), около 9% (вес./об.) или около 10% (вес./об.) полисорбата 80.

После суспендирования циклоспорино А в полисорбате 80 можно нагревать раствор до температуры от около 55°C до около 75°C, такое значение как около 55°C, около 56°C, около 57°C, около 58°C, около 59°C, около 60°C, около 61°C, около 62°C, около

63°C, около 64°C, около 65°C, около 66°C, около 66°C, около 67°C, около 68°C, около 69°C, около 70°C, около 71°C, около 72°C, около 73°C, около 74°C или около 75°C.

Нагретый раствор можно выдерживать при одной из представленных выше температур в течение времени от около 18 до около 48 часов, такое значение как около 18 часов, около 19 часов, около 20 часов, около 21 часа, около 22 часов, около 23 часов, около 24 часов, около 25 часов, около 26 часов, около 27 часов, около 28 часов, около 29 часов, около 30 часов, около 31 часа, около 32 часов, около 33 часов, около 34 часов, около 35 часов, около 36 часов, около 37 часов, около 38 часов, около 39 часов, около 40 часов, около 41 часа, около 42 часов, около 43 часов, около 44 часов, около 45 часов, около 46 часов, около 47 часов или около 48 часов.

После приготовления и нагревания раствора и его выдерживания при заданной температуре полученное твердое вещество, выпавшее в осадок, может быть выделено любым стандартным способом, таким как вакуумное фильтрование. После выделения осадок затем можно промыть и высушить. Например, осадок можно промыть водой, а затем высушить под вакуумом при повышенной температуре (например, около 40°C), затем при комнатной температуре. Также могут быть использованы другие приемы промывания и высушивания.

Используя Форму 2 циклоспорина А в качестве затравочного кристалла, можно также получить Форму 2 циклоспорина А, используя Форму 2 циклоспорина А в качестве затравочного кристалла. В этом способе можно суспендировать аморфный циклоспорин А в водном растворе полисорбата 80 и нагревать раствор так, как описано выше. Затем можно поместить в раствор затравочный кристалл Формы 2 циклоспорина А, затем выдерживать раствор при температурах и продолжительностях, описанных выше, постоянно перемешивая раствор при выполнении этого действия. В завершение процесса, затем можно выделить осадок так, как описано выше.

В этом способе можно использовать от около 0,01 до около 1 г затравочных кристаллов / л воды. Например, можно использовать около 0,01 г/л, около 0,02 г/л, около 0,03 г/л, около 0,04 г/л, около 0,05 г/л, около 0,06 г/л, около 0,07 г/л, около 0,08 г/л, около 0,09 г/л, около 0,1 г/л, около 0,2 г/л, около 0,3 г/л, около 0,4 г/л, около 0,5 г/л, около 0,6 г/л, около 0,7 г/л, около 0,8 г/л, около 0,9 г/л или около 1 г затравочных кристаллов на литр воды.

Можно нагревать суспензию аморфного циклоспорина А, затравочных кристаллов Формы 2 циклоспорина А до температуры от около 45°C до около 65°C перед их добавлением к раствору или можно оставить затравочные кристаллы при комнатной температуре перед их добавлением. Например, можно нагревать затравочные кристаллы Формы 2 циклоспорина А до около 45°C, около 46°C, около 47°C, около 48°C, около 49°C, около 50°C, около 51°C, около 52°C, около 53°C, около 54°C, около 55°C, около 56°C, около 57°C, около 58°C, около 59°C, около 60°C, около 61°C, около 62°C, около 63°C, около 64°C или около 65°C перед их добавлением к раствору.

Например, можно суспендировать около 30 г циклоспорина А в растворе 900 мл воды, содержащей 1% (вес./об.) полисорбата 80. Можно нагревать раствор до 65°C, а затем вносить в него затравку 0,2 г Формы 2 циклоспорина А при температуре 52°C. Раствор перемешивают в течение около 22 часов при температуре от около 61°C до 65°C. Полученный осадок можно выделить так, как описано выше.

Нагреванием и охлаждением в определенных системах растворителей

В очень общих чертах, Форму 2 циклоспорина А можно получить 1) суспендированием циклоспорина А в воде или в растворе воды и ацетонитрила, 1,4-диоксана или этанола; 2) нагреванием суспензии с определенной скоростью; 3)

охлаждением суспензии с определенной скоростью; 4) повторением цикла нагревания и охлаждения; 5) выделением полученного осадка. Выбор растворителя очень важен: авторы настоящего изобретения не обнаружили никаких структурных особенностей или других свойств, которые бы предсказывали возможность образования или невозможность образования Формы 2 CsA из определенного растворителя.

В этом варианте реализации можно использовать циклоспорин А в форме жидкого кристалла, в тетрагональной или орторомбической форме, или можно использовать аморфную форму. Выбор исходного материала дает Форму 2 CsA с лишь незначительно разнящимися характеристиками (смотри Фигуры X и Y), но важным пунктом является то, что можно использовать различные исходный материалы и при этом получать Форму 2 CsA.

На первой стадии этого способа готовят раствор суспендированием заданного исходного материала (то есть жидкого кристалла, тетрагональной, орторомбической формы или аморфного циклоспорина А) в воде, или суспендированием исходного материала в ацетонитриле, в 1,4-диоксане или в этаноле, которые растворены в воде.

На этой стадии можно использовать от около 0,01 до около 1 г исходного материала/л воды. Например, можно использовать около 0,01 г/л, около 0,02 г/л, около 0,03 г/л, около 0,04 г/л, около 0,05 г/л, около 0,06 г/л, около 0,07 г/л, около 0,08 г/л, около 0,09 г/л, около 0,1 г/л, около 0,2 г/л, около 0,3 г/л, около 0,4 г/л, около 0,5 г/л, около 0,6 г/л, около 0,7 г/л, около 0,8 г/л, около 0,9 г/л или около 1 г исходного материала на литр во воды. Заданный растворитель (ацетонитрил, 1,4-диоксан или этанол) добавляют в таком количестве, которое приводит к образованию раствора с мольной долей воды от около 0,75 до 1. Например, растворитель добавляют в таком количестве, которое приводит к образованию раствора с мольной долей около 0,75, около 0,76, около 0,77, около 0,78, около 0,79, около 0,80, около 0,81, около 0,82, около 0,83, около 0,84, около 0,85, около 0,86, около 0,87, около 0,88, около 0,89, около 0,90, около 0,91, около 0,92, около 0,93, около 0,94, около 0,95, около 0,96, около 0,97, около 0,98, около 0,99 и около 1.

На второй стадии этого способа нагревают раствор до температуры от около 5°C до около 50°C со скоростью от около 0,01°C в минуту до около 1°C в минуту. В одном из вариантов реализации можно нагревать раствор до температуры от около 5°C до около 10°C, от около 10°C до около 15°C, от около 15°C до около 20°C, от около 20°C до около 25°C, от около 25°C до около 30°C, от около 30°C до около 35°C, от около 35°C до около 40°C, от около 40°C до около 45°C или от около 45°C до около 50°C. В другом варианте реализации можно нагревать раствор до температуры от около 5°C до около 15°C, от около 15°C до около 25°C, от около 25°C до около 35°C, от около 35°C до около 45°C или от около 40°C до около 50°C. Например, можно нагревать раствор до температуры около 1°C, около 2°C, около 3°C, около 4°C, около 5°C, около 6°C, около 7°C, около 8°C, около 9°C, около 10°C, около 11°C, около 12°C, около 13°C, около 14°C, около 15°C, около 16°C, около 17°C, около 18°C, около 19°C, около 20°C, около 21°C, около 22°C, около 23°C, около 24°C, около 25°C, около 26°C, около 27°C, около 28°C, около 29°C, около 30°C, около 31°C, около 32°C, около 33°C, около 34°C, около 35°C, около 36°C, около 37°C, около 38°C, около 39°C, около 40°C, около 41°C, около 42°C, около 43°C, около 44°C, около 45°C, около 46°C, около 47°C, около 48°C, около 49 или около 50°C.

В одном из вариантов реализации раствор нагревают со скоростью от около 0,01°C / мин. до около 0,05°C/мин, от около 0,05°C/мин до 0,1°C/мин, от около 0,1°C/мин до около 0,2°C/мин, от около 0,2°C/мин до около 0,3°C/мин, от около 0,3°C/мин до около

0,4°C/мин, от около 0,4°C/мин до около 0,5°C/мин, от около 0,5°C/мин до около 0,6°C/мин, от около 0,6°C/мин до около 0,7°C/мин, от около 0,7°C/мин до около 0,8°C/мин, от около 0,8°C/мин до около 0,9°C/мин или от около 0,9°C/мин до около 1°C/мин

Например, можно нагревать раствор со скоростью около 0,01°C/мин, около 0,02°C/мин, около 0,03°C/мин, около 0,04°C/мин, около 0,05°C/мин, около 0,06°C/мин, около 0,07°C/мин, около 0,08°C/мин, около 0,09°C/мин, около 0,1°C/мин, около 0,2°C/мин, около 0,3°C/мин, около 0,4°C/мин, около 0,5°C/мин, около 0,6°C/мин, около 0,7°C/мин, около 0,8°C/мин, около 0,9°C/мин или около 1°C/мин.

На третьей стадии этого способа раствор охлаждают до температуры от около 1°C до около 22°C. В одном из вариантов реализации раствор можно охлаждать до температуры от около 1°C до около 5°C, от около 5°C до около 10°C, от около 10°C до около 15°C, от около 15°C до около 20°C или от около 17°C до около 22°C. В другом варианте реализации раствор можно охлаждать до температуры от около 1°C до около 10°C, от около 5°C до около 15°C, от около 10°C до около 20°C или от около 15°C до около 22°C. Например, можно охлаждать раствор до температуры около 1°C, около 2°C, около 3°C, около 4°C, около 5°C, около 6°C, около 7°C, около 8°C, около 9°C, около 10°C, около 11°C, около 12°C, около 13°C, около 14°C, около 15°C, около 16°C, около 17°C, около 18°C, около 19°C, около 20°C, около 21°C или около 22°C.

Раствор можно охлаждать с той же или с другой скоростью, с которой его нагревали. В одном из вариантов реализации раствор охлаждают со скоростью от около 0,01°C/мин до около 0,05°C/мин, от около 0,05°C/мин до 0,1°C в минуту, от около 0,1°C/мин до около 0,2°C/мин, от около 0,2°C/мин до около 0,3°C/мин, от около 0,3°C/мин до около 0,4°C/мин, от около 0,4°C/мин до около 0,5°C/мин, от около 0,5°C/мин до около 0,6°C/мин, от около 0,6°C/мин до около 0,7°C/мин, от около 0,7°C/мин до около 0,8°C/мин, от около 0,8°C/мин до около 0,9°C/мин или от около 0,9°C/мин до около 1°C/мин. Например, можно охлаждать раствор со скоростью около 0,01°C/мин, около 0,02°C/мин, около 0,03°C/мин, около 0,04°C/мин, около 0,05°C/мин, около 0,06°C/мин, около 0,07°C/мин, около 0,08°C/мин, около 0,09°C/мин, около 0,1°C/мин, около 0,2°C/мин, около 0,3°C/мин, около 0,4°C/мин, около 0,5°C/мин, около 0,6°C/мин, около 0,7°C/мин, около 0,8°C/мин, около 0,9°C/мин или около 1°C/мин.

Затем можно приступить к выделению образовавшегося осадка, используя описанные выше способы, или можно повторить стадии нагревания и охлаждения, используя те же или другие температуры и такие же или другие скорости нагревания и охлаждения. В одном из вариантов реализации повторяют стадии нагревания и охлаждения один раз, то есть сначала нагревают, затем охлаждают раствор, затем снова нагревают и охлаждают раствор. В другом варианте реализации стадии нагревания и охлаждения повторяют два раза, то есть сначала нагревают, затем охлаждают раствор, затем нагревают и охлаждают второй раз, затем нагревают и охлаждают раствор третий раз. В другом варианте реализации стадии нагревания и охлаждения повторяют три раза, то есть сначала нагревают, затем охлаждают раствор, затем нагревают и охлаждают раствор второй раз, затем нагревают и охлаждают раствор третий раз, а затем нагревают и охлаждают раствор четвертый раз. Во время каждой стадии нагревания раствор можно нагревать до той же или другой температуры, и с той же или с другой скоростью; аналогично, во время каждой стадии охлаждения можно нагревать раствор до той же или другой температуры, и с той же или с другой скоростью.

В одном из вариантов реализации раствор начинают охлаждать сразу после нагревания раствора до заданной температуры. В другом варианте реализации раствор выдерживают при повышенной температуре в течение от около 0 до около 25 часов

перед началом его охлаждения. Например, можно выдерживать раствор при повышенной температуре в течение от около 0 до около 5 часов, от около 5 до около 10 часов, от около 10 до около 15 часов, от около 15 до около 20 часов или от около 20 до около 25 часов; в другом варианте реализации можно выдерживать раствор при повышенной температуре в течение от около 0 до около 10 часов, от около 5 до около 15 часов, от около 10 до около 20 часов или от около 15 до около 25 часов. Например, можно выдерживать раствор при повышенной температуре в течение около 0,5 часа, около 1 часа, около 2 часов, около 3 часов, около 4 часов, около 5 часов, около 6 часов, около 7 часов, около 8 часов, около 9 часов, около 10 часов, около 11 часов, около 12 часов, около 13 часов, около 14 часов, около 15 часов, около 16 часов, около 17 часов, около 18 часов, около 19 часов, около 20 часов, около 21 часа, около 22 часов, около 23 часов, около 24 часов или около 25 часов.

При повторении цикла нагревания-охлаждения, можно нагревать раствор сразу после его охлаждения до заданной температуры, или можно выдерживать раствор при пониженной температуре в течение от около 0 до около 24 часов перед началом его повторного нагревания. Например, можно выдерживать раствор в течение от около 0 до около 5 часов, от около 5 до около 10 часов, от около 10 до около 15 часов, от около 15 до около 20 часов или от около 20 до около 25 часов; в другом варианте реализации можно выдерживать раствор при пониженной температуре в течение от около 0 до около 10 часов, от около 5 до около 15 часов, от около 10 до около 20 часов или от около 15 до около 25 часов. Например, можно выдерживать раствор при пониженной температуре в течение около 0,5 часа, около 1 часа, около 2 часов, около 3 часов, около 4 часов, около 5 часов, около 6 часов, около 7 часов, около 8 часов, около 9 часов, около 10 часов, около 11 часов, около 12 часов, около 13 часов, около 14 часов, около 15 часов, около 16 часов, около 17 часов, около 18 часов, около 19 часов, около 20 часов, около 21 часа, около 22 часов, около 23 часов, около 24 часов или около 25 часов.

В завершение цикла нагревания и охлаждения можно выдерживать раствор при конечной температуре охлаждения в течение от около 0 до около 24 часов до начала выделения осадка, как описано выше.

ПРИМЕРЫ

Настоящее изобретение дополнительно иллюстрировано следующими примерами.
Пример 1

Циклоспорин А (CsA), аморфной, тетрагональной (F1) или орторомбической формы, суспендировали в воде, ацетонитриле, диоксане или этаноле, как описано ниже в Таблице 1.

Таблица 1: Суспензия циклоспорина, используемая для получения формы 2
циклоспорина

ФОРМА CSA	РАСТВОРИТЕЛЬ		МОЛЬНАЯ ДОЛЯ ВОДЫ
	1	2	
аморфный	Вода	ацетонитрил	0,87
F1	Вода	ацетонитрил	0,87
F3	Вода	ацетонитрил	0,87
F1	вода	нет	1,00
F1	вода	диоксан	0,90
F1	Вода	Этанол	0,89

Каждый из представленных выше растворов нагревали до 50°C со скоростью 0,1°C в минуту и выдерживали при этой температуре в течение 600 минут; затем раствор охлаждали до 20°C с такой же скоростью и выдерживали при этой температуре в течение 300 минут; этот цикл нагревания и охлаждения повторили еще два раза, как показано на Фигуре 5 и обобщено в Таблице 2.

Таблица 2: Профиль термоциклирования

Стадия	Температура (°C)	Скорость нагрева (°C/мин.)	Продолжительность (мин.)	Общее время
Выдерживание	20	---	30,00	00:30:00
Изменение	50	0,1000	300,00	05:30:00
Выдерживание	50	---	600,00	15:30:00
Изменение	20	- 0,1000	300,00	20:30:00
Выдерживание	20	---	600,00	1,06:30:00
Изменение	50	0,1000	300,00	1,11:30:00
Выдерживание	50	---	600,00	1,21:30:00
Изменение	20	- 0,1000	300,00	2,02:30:00
Выдерживание	20	---	600,00	2,12:30:00
Изменение	50	0,1000	300,00	2,17:30:00
Выдерживание	50	---	600,00	3,03:30:00
Изменение	20	- 0,1000	300,00	3,06:30:00
Выдерживание	20	---	300,00	3,13:30:00

Диаграмма рентгеновской порошковой дифракции (РПД) формы 2 циклоспорина А, полученной таким образом, с использованием аморфного циклоспорина А в качестве исходного материала, представлена на Фигуре 6; РПД формы 2 циклоспорина А, полученной с использованием тетрагонального циклоспорина А в качестве исходного материала, представлена на Фигуре 7; РПД формы 2 циклоспорина А, полученной с использованием орторомбического циклоспорина А в качестве исходного материала, представлена на Фигуре 8. Диаграммы РПД форм CsA записали с помощью рентгеновского дифрактометра Rigaku MiniFlex (излучение Cu K α , $\lambda=1,54 \text{ \AA}$, при 30 кВ и 15 мА). Прибор калибровали по кремниевому стандарту с эталонным пиком при 28,44° (2-тета). Эксперименты рентгеновской дифракции выполняли от 3° до 45° (2-тета) при скорости сканирования 0,5° или 1° (2-тета) в минуту и с шириной шага 0,05° (2-тета).

Экспериментальные условия, которые не дают Форму 2 циклоспорина А, представлены ниже в Таблице 3.

Таблица 3 - Экспериментальные условия, которые не дают Форму 2 циклоспорина А

№	Форма CsA	Вес CsA (мг)	Растворитель		Объем (мкл)		Конечная форма	Мольная доля воды
1	Аморфная	53,77	вода	ацетон	100	42	F 1+ F 2	0,91
2	Аморфная	61,70	вода	этиленгликоль	100	42	аморфная	0,88
4	Аморфная	41,17	вода	н.д.	100	н.д.	аморфная	1,00
5	F1	65,74	вода	ацетон	100	42	F 1+ F 2	0,91
6	F1	74,51	вода	этиленгликоль	100	42	F 1	0,88
8	F1	68,59	вода	н.д.	100	н.д.	аморфная	1,00
9	F3	49,70	вода	ацетон	100	42	F 3	0,91
10	F3	69,45	вода	этиленгликоль	100	42	F 3	0,88
12	F3	70,87	вода	н.д.	100	н.д.	F 3	1,00
15	F1	43,07	вода	метанол	100	42	аморфная + F 2	0,84

Способы лечения

Форма 2 CsA, полученная по способам настоящего изобретения, может быть использована для лечения любых заболеваний глаз, которые, как известно, восприимчивы к локальному лечению циклоспорином А (таким как Restasis®).

Например, композиции настоящего изобретения могут быть использованы для лечения пациентов, страдающих от сухости глаз, для лечения блефарита и заболевания мейбомиевой железы, для восстановления роговичной чувствительности, ухудшенной вследствие рефрактивной хирургии на глазах, для лечения аллергического конъюнктивита и атопического и весеннего кератоконъюнктивита, а также для лечения птеригия, конъюнктивального и роговичного воспаления, кератоконъюнктивита, заболевания «трансплантат против хозяина», глаукомы после трансплантации, роговичных трансплантатов, грибкового кератита, поверхностного точечного кератита Тайджесона, увеита и верхнего лимбального кератоконъюнктивита Теодора, помимо прочих состояний.

Международная рабочая группа по проблемам сухости глаз (DEWS) определяет сухость глаз как «многофакторное заболевание выделения слез и поверхности глаз, которое приводит к симптомам дискомфорта, нарушения зрения и нестабильности слезной пленки с потенциальным повреждением поверхности глаз, сопровождаемое увеличенной осмолярностью слезной пленки и воспалением поверхности глаз». Оно включает такие состояния как сухой кератоконъюнктивит, которые обусловлены недостатком выработки слез или избыточным испарением слез.

Блефарит представляет собой хроническое расстройство, обуславливающее воспаление переднего и заднего края века, затрагивая кожу и родственные структуры (волосы и сальные железы), слизисто-кожную кайму и мейбомиевые железы. На поздних стадиях он может поражать также конъюнктиву, слезную пленку и роговичную поверхность и может быть связан с сухостью глаз. Блефарит обычно классифицируют на передний или задний блефарит, при этом передний блефарит поражает область роста ресниц на веках, а задний, в основном, поражает отверстия мейбомиевых желез.

Заболевание мейбомиевой железы наиболее часто встречается в виде одной из трех форм: первичный мейбомит, вторичный мейбомит и мейбомиевая себорея. Мейбомиевая себорея характеризуется избыточной секрецией мейбомиевых желез в отсутствие воспаления (заболевание гиперсекреции мейбомиевой железы). Первичный мейбомит, напротив, определяют по застойной и уплотненной секреции мейбомиевых желез

(обструктивное заболевание гиперсекреции мейбомиевой железы). Вторичный мейбомит представляет собой локализованную воспалительную реакцию, при которой мейбомиевые железы являются вторично воспаленными разнохарактерным образом в результате блефарита переднего края века.

Ухудшение роговичной чувствительности зачастую возникает после рефрактивной хирургии, такой как фоторефракционная кератэктомия, лазерный субэпителиальный кератомилез (LASEK); EPI-LASEK, индивидуальная трансэпителиальная бесконтактная абляция или другие процедуры, в которых отсекают роговичные нервы. Ухудшение роговичной чувствительности также может возникать после вирусной инфекции, такой как вирусы ВПГ-1, ВПГ-2 и ВЗВ. Пациенты с ухудшенной роговичной чувствительностью часто жалуются на сухость глаз, даже при нормальной выработке слез и испарении, что позволяет предположить, что «сухость» у таких пациентов фактически представляет собой форму роговичной нейропатии, которая возникает при хирургическом отсечении роговичных нервов или в результате воспаления после вирусной инфекции.

Аллергический конъюнктивит представляет собой воспаление конъюнктивы, обусловленной гиперчувствительностью к одному или более аллергенам. Он может быть острым, периодическим или хроническим. Он возникает сезонно, то есть только в определенное время года, или имеет место постоянно, то есть является хроническим в течение всего года. Симптомы сезонного и периодического аллергического конъюнктивита включают, помимо воспаления конъюнктивы, лакримацию, слезоотделение, расширение сосудов конъюнктивы, зуд, папиллярную гиперплазию, хемоз, отек глазного яблока и выделение из глаз. Выделение может образовывать корку на глазах после ночного сна.

Атопический кератоконъюнктивит представляет собой хроническую, тяжелую форму аллергического конъюнктивита, которая зачастую приводит к ухудшению зрения. Симптомы включают зуд, жжение, боль, покраснение, ощущение инородного тела, светочувствительность и расплывчатое зрение. Зачастую встречаются выделения, особенно при просыпании после ночного сна; выделение может быть вязким, липким с слизиобразным. Нижняя конъюнктива зачастую поражается более заметно, чем верхняя конъюнктива. Конъюнктива может быть от бледной, отечной и не имеющей характерных признаков до демонстрирующей характеристики запущенного заболевания, включая папиллярную гипертрофию, субэпителиальный фиброз, укорачивание свода, трихиаз, заворот век и мадароз. У некоторых пациентов это заболевание прогрессирует до точечных эпителиальных эрозий, роговичной неоваскуляризации и других характерных черт кератопатии, которые могут ухудшать зрение. Как правило, в конъюнктиве происходит пролиферация бокаловидных клеток, образование эпителиальных псевдотубулярных структур и увеличение количества дегранулированных эозинофилов и мастоцитов в эпителии. В собственном веществе ткани существенно повышено содержание CD25+T лимфоцитов, макрофагов и дендритных клеток (HLA-DR.sup.+, HLA-CD1+).

Как и атопический кератоконъюнктивит, весенний кератоконъюнктивит представляет собой тяжелую форму аллергического конъюнктивита, но он обычно более заметно поражает верхнюю конъюнктиву, чем нижнюю. Он встречается в двух формах. В пальберальной форме присутствуют прямоугольные, твердые, уплощенные, близко расположенные бугорки; при луковичной (лимбальной) форме околороговичная конъюнктива становится гипертрофированной и сероватой. Обе формы зачастую сопровождаются слизиобразными выделениями. Может возникать потеря роговичного

эпителия, сопровождающаяся болью и светобоязнью, а также центральные роговичные бляшки и точки Трантаса.

(57) Формула изобретения

- 5 1. Способ получения формы 2 циклоспорина А, характеризующейся основными кристаллическими пиками 2 θ рентгеновской порошковой дифрактограммы при 7,5, 8,8, 10,2, 11,3, 12,7, 13,8, 14,5, 15,6 и 17,5, включающий стадии:
 - а) приготовление суспензии циклоспорина А в растворителе, содержащем воду и ингредиент, выбранный из группы, состоящей из ацетонитрила, 1,4-диоксана и этанола;
 - 10 б) первый цикл нагревания-охлаждения, включающий нагревание суспензии до температуры от 5 до 50°C, затем охлаждение суспензии до температуры от 1 до 35°C;
 - с) второй цикл нагревания-охлаждения, включающий нагревание суспензии до температуры от 5 до 50°C, затем охлаждение суспензии до температуры от 1 до 35°C, и
 - 15 д) третий цикл нагревания-охлаждения, включающий нагревание суспензии до температуры от 5 до 50°C, затем охлаждение суспензии до температуры от 1°C до 35°C.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный растворитель содержит воду и ацетонитрил.
3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что мольная доля воды в растворителе
- 20 составляет от 0,8 до 1,0.
4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что мольная доля воды в растворителе составляет 0,87.
5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный растворитель содержит воду и 1,4-диоксан.
- 25 6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что мольная доля воды в растворителе составляет от 0,8 до 1,0.
7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что мольная доля воды в растворителе составляет 0,90.
8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный растворитель содержит воду и
- 30 этанол.
9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что мольная доля воды в растворителе составляет от 0,8 до 1,0.
10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что мольная доля воды в растворителе составляет 0,89.
- 35 11. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что первый, второй или третий цикл нагревания-охлаждения включает нагревание суспензии до температуры от 5 до 50°C со скоростью от 0,05 до 2°C в минуту, затем охлаждение суспензии до температуры от 1 до 35°C со скоростью от 0,01 до 1°C в минуту.
12. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что по меньшей мере два из
- 40 циклов нагревания-охлаждения включают нагревание суспензии до температуры от 5 до 50°C со скоростью от 0,05 до 2°C в минуту, затем охлаждение суспензии до температуры от 1 до 35°C со скоростью от 0,01 до 1°C в минуту.
13. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что первый, второй и третий цикл нагревания-охлаждения включает нагревание суспензии до температуры от 5 до
- 45 70°C со скоростью от 0,05 до 2°C в минуту, затем охлаждение суспензии до температуры от 1 до 35°C со скоростью от 0,05 до 2°C в минуту.
14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что первый, второй и третий цикл нагревания-охлаждения включает нагревание суспензии до температуры от 5 до 50°C со скоростью

0,1°C в минуту, затем охлаждение суспензии до температуры 5°C со скоростью 1°C в минуту.

5

10

15

20

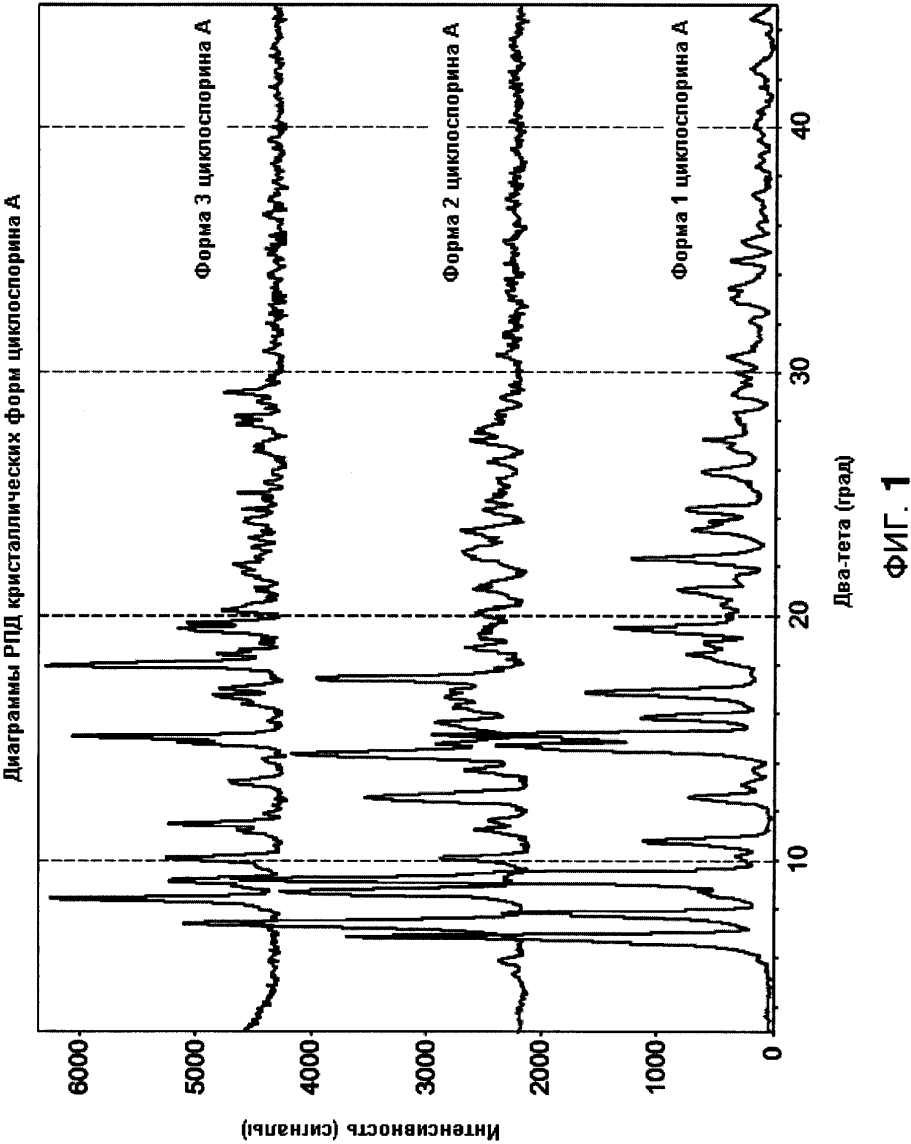
25

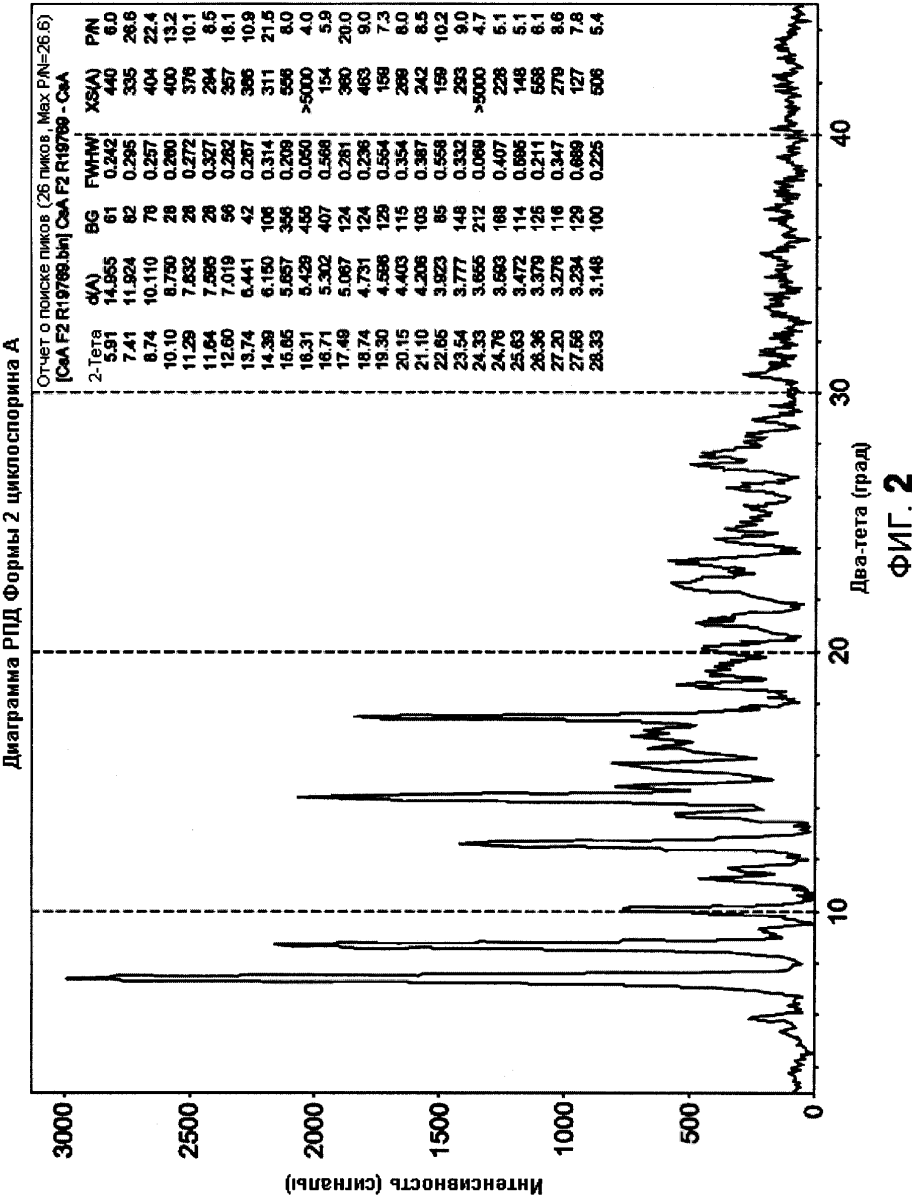
30

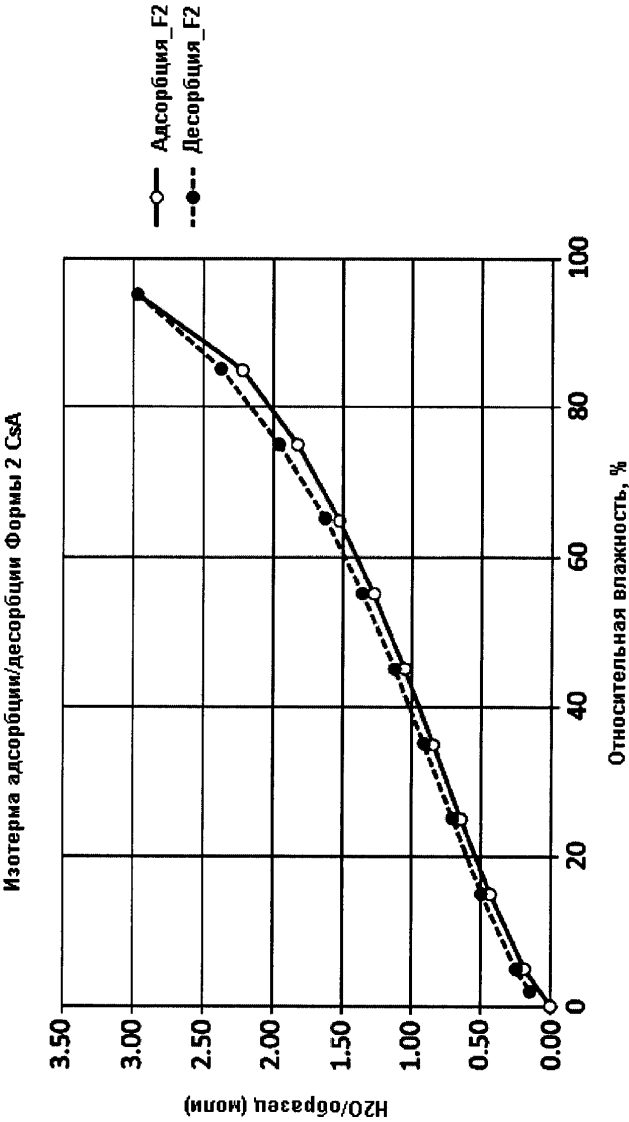
35

40

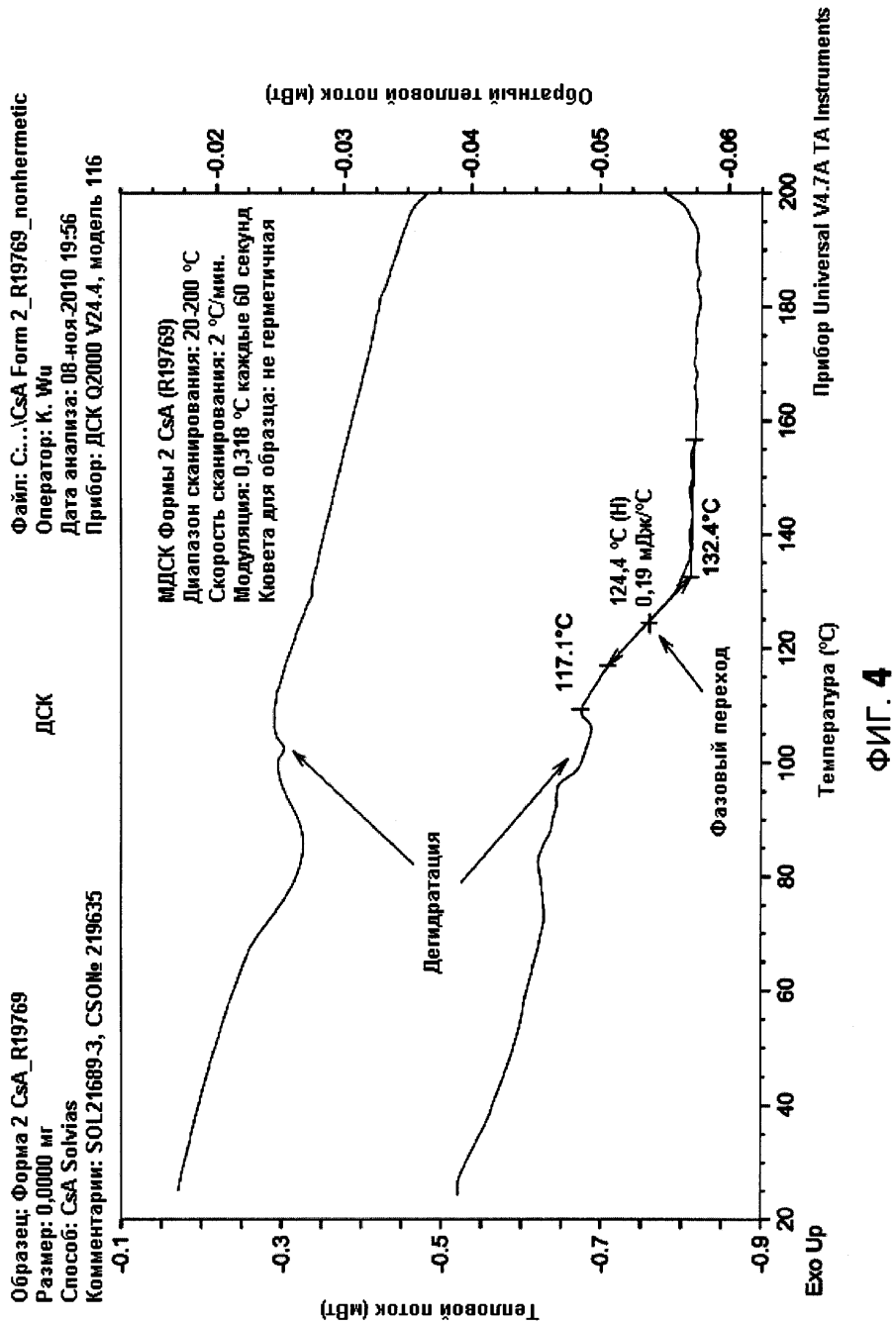
45

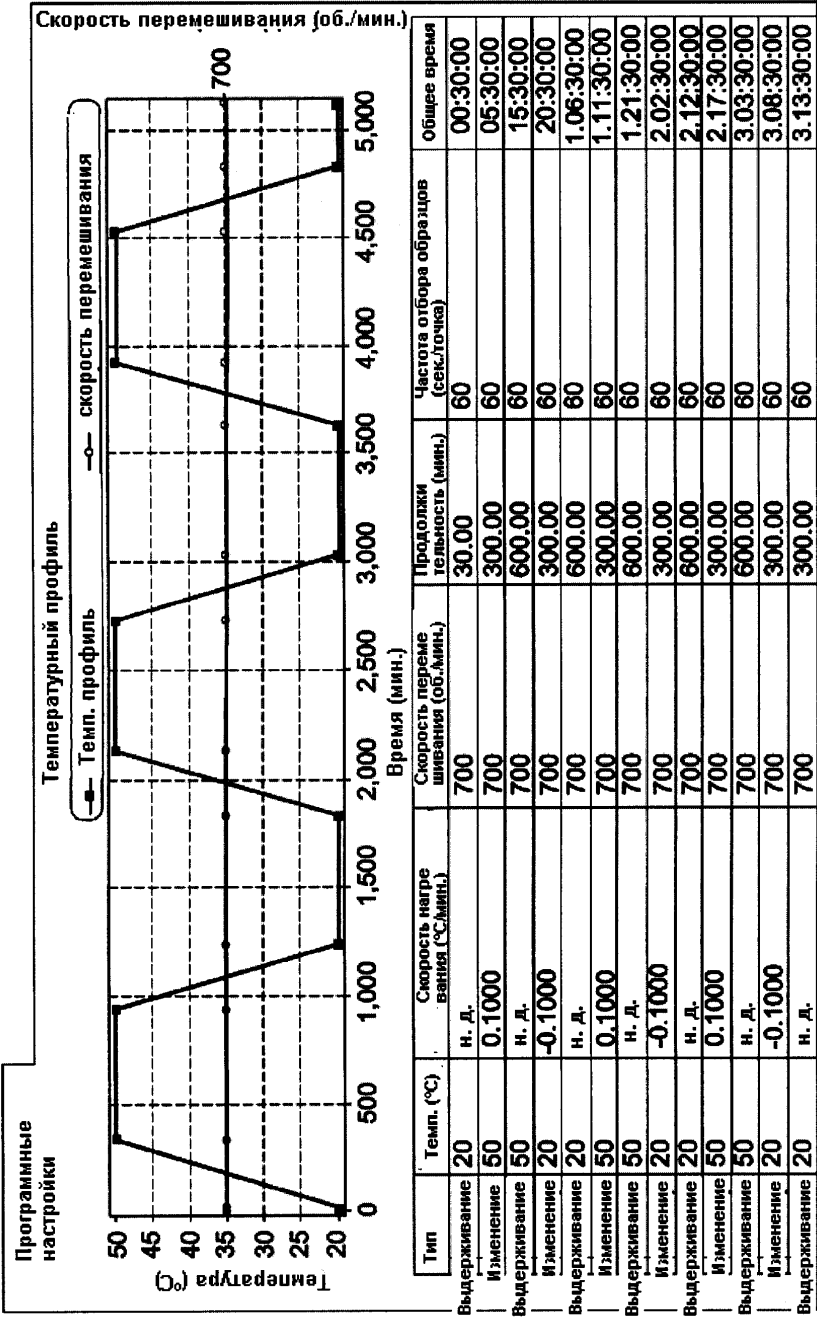






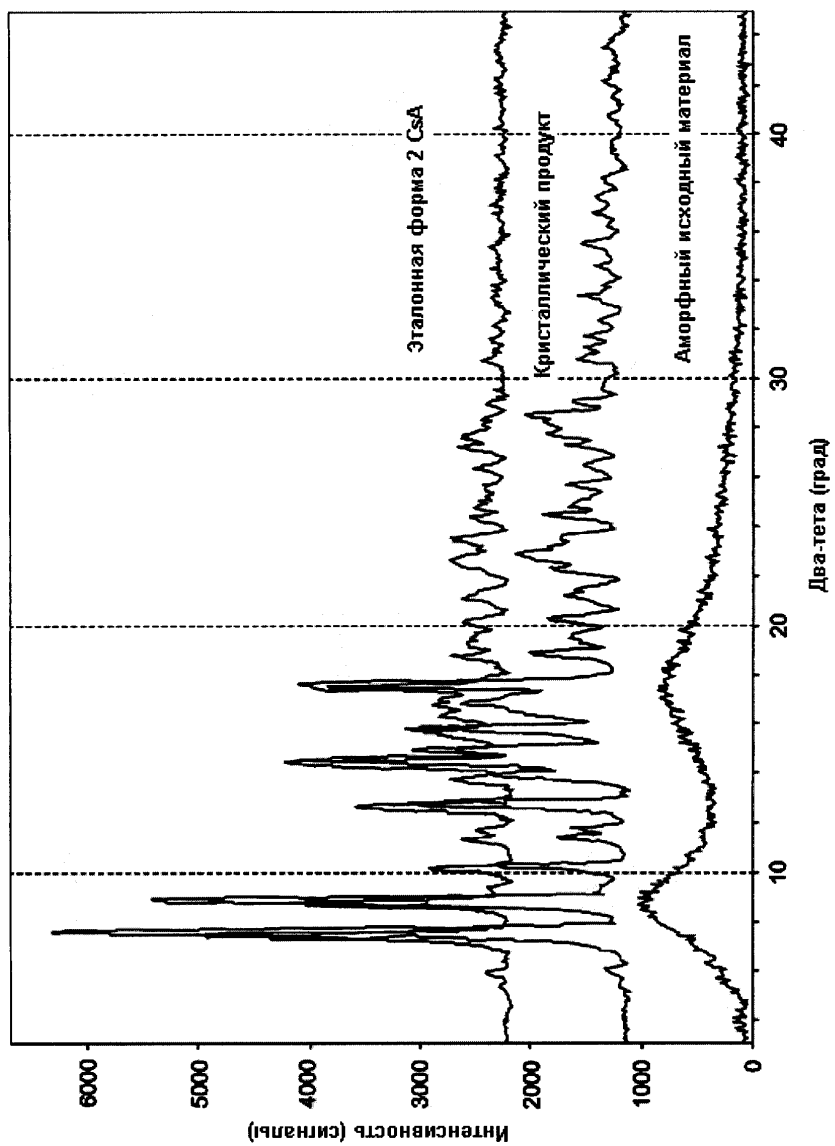
ФИГ. 3





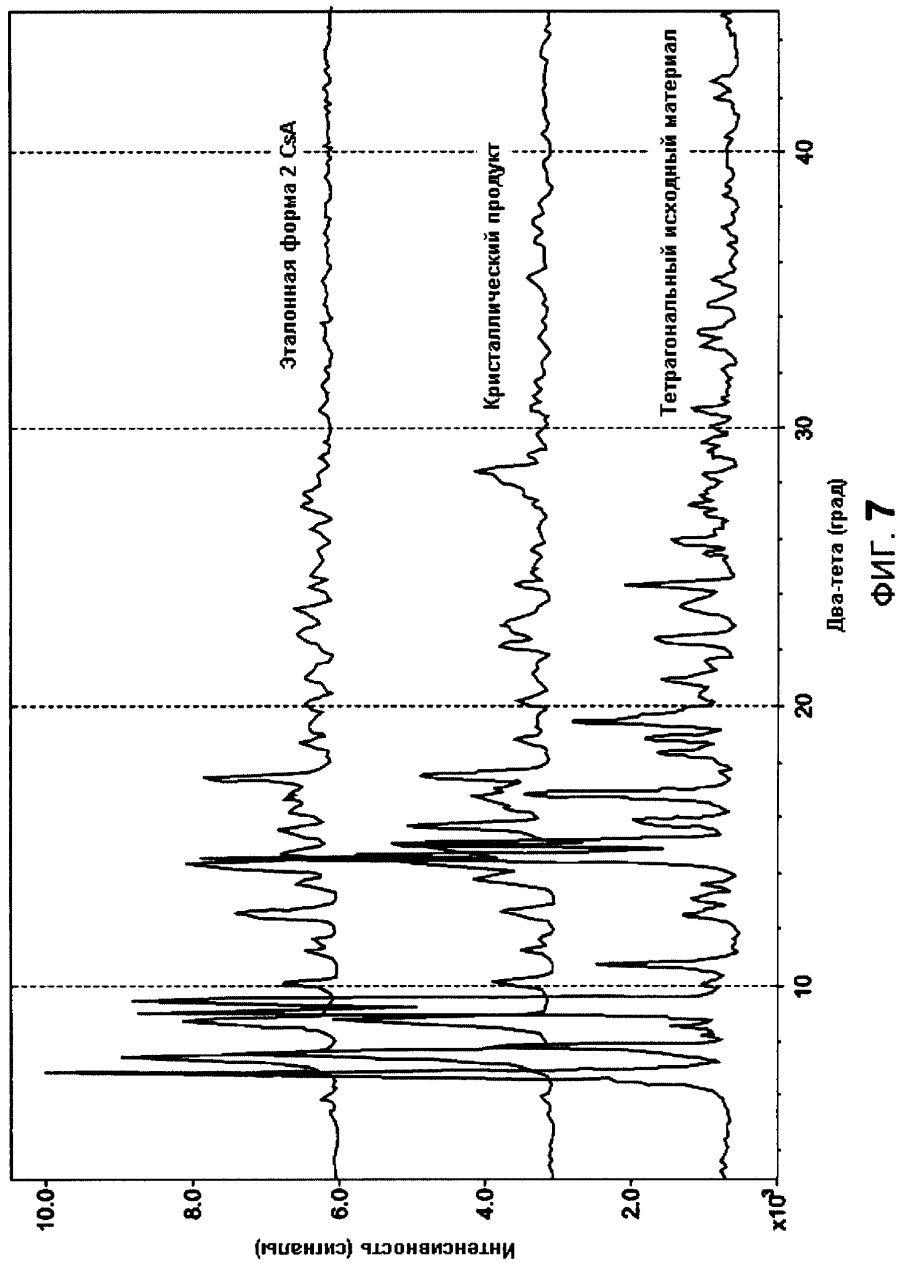
ФИГ. 5

6/9

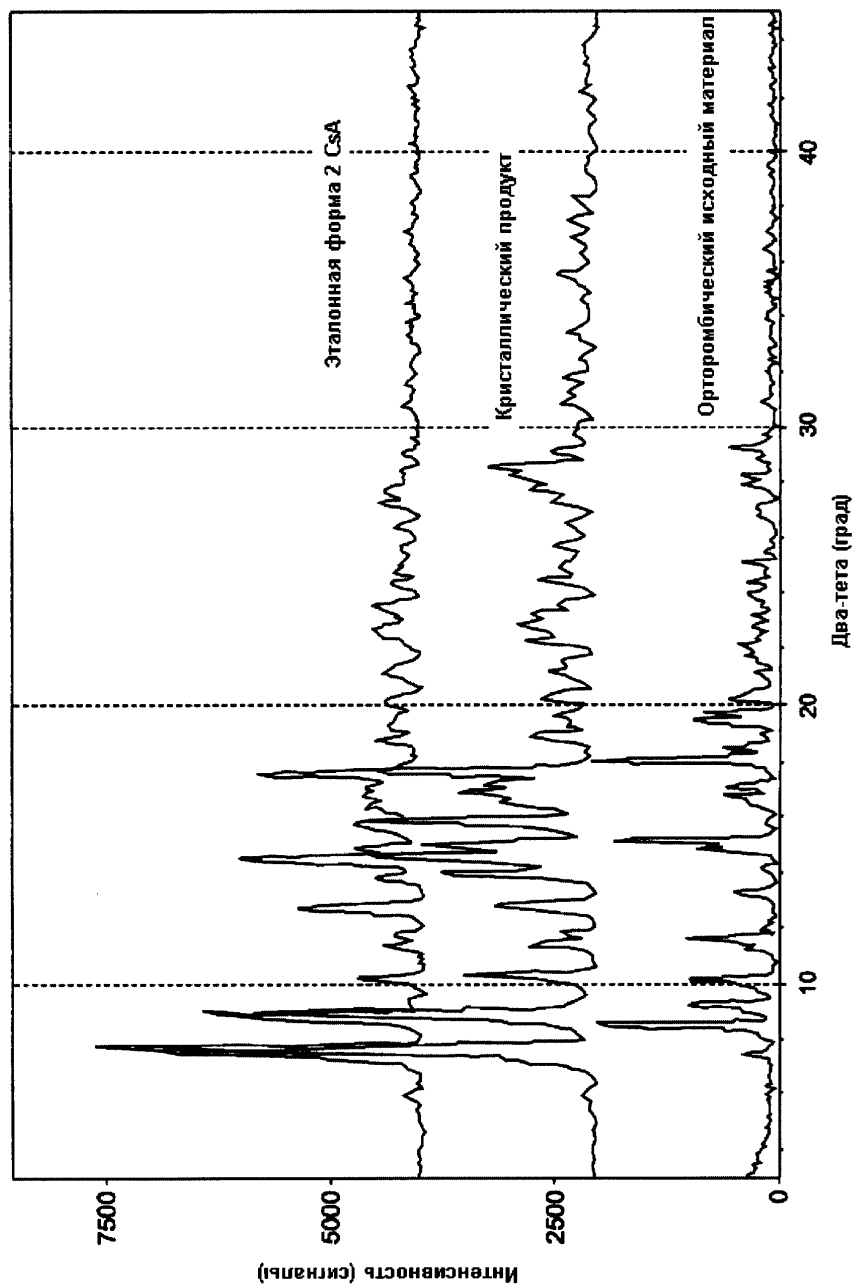


ФИГ. 6

7/9



8/9



ФИГ. 8

