

**PREPARACIÓN DE PSILOCIBINA, DIFERENTES FORMAS POLIMÓRFICAS,
INTERMEDIARIOS, FORMULACIONES, Y SU USO**

Esta invención se refiere a la producción a gran escala de psilocibina para uso en medicina.

5 Por "gran escala" se entiende la producción de lotes de psilocibina con un peso superior a 10 g; más preferentemente, superior a 100 g; con mayor preferencia, incluso superior a 250 g, y niveles de hasta Kg y superiores.

 También se refiere a la producción de intermediarios, que
10 incluyen, a modo no taxativo, psilocina, diferentes formas polimórficas de psilocibina, incluidas las variantes isoestructurales, y su formulación para uso en medicina, en particular, aunque no exclusivamente, para el tratamiento de la depresión resistente a tratamientos, como se define en
15 Manual *Diagnostic and Statistical Manual*, 5ta. edición, ya sea en forma individual o combinada con el soporte psicológico que puede brindarse digitalmente.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La psilocibina fue sintetizada por primera vez en 1958 por
20 Sandoz (véase los Documentos GB912714 y US3075992), y estuvo ampliamente disponible como químico de investigación hasta mediados de los años sesenta.

Un psicodélico de origen vegetal, que ha sido utilizado como auxiliar de la psicoterapia para el tratamiento de los

trastornos anímicos y trastornos alcohólicos, y cuyo uso para síntomas depresivos ha sido informado recientemente en 3 ensayos clínicos.

- Griffiths et al 2016; *J Psychopharmacol* 30 (12):1181-1197;
 5 Ross et al 2016; *J Psychopharmacol* 30 (12):1165-1180; y
 Carhart-Harris et al 2016, *Lancet Psychiatry* 3(7): 619-627.

Los métodos de fabricación de psilocibina son limitados, e incluyen:

- 10 *J Nat Prod* 2003, 66, páginas 885-887;
Helv Chim Acta 1959, 42, 2073-2103;
Experientia 1958, 15, 397-399; y
Synthesis 1999, 935-938.

- Basándose en esta literatura, el Solicitante creía que el
 15 proceso divulgado en *J Nat Prod* 2003, 66, páginas 885-887 (en lo sucesivo "JNP") era el método más adecuado para desarrollarse en un proceso a escala comercial.

- El proceso allí divulgado produjo cantidades en el orden de 10 g y estaba conformado por 6 pasos enumerados de (i) a
 20 (vi).

Por analogía con el proceso del Solicitante, los pasos ii y iii se analizan a continuación como un solo paso (**Paso 2**) y el proceso de JNP se reproduce como la Figura 1 en la presente.

Paso 1 (i) comprendía hacer reaccionar 4-hidroxiindol

("3") con anhídrido acético (Ac_2O) en piridina y diclorometano anhidro (CH_2Cl_2) a 0 °C. Se agregó agua, la mezcla se evaporó, y el concentrado resultante se disolvió en acetato de etilo, se lavó con agua y cloruro de sodio saturado, y la fase orgánica
 5 se secó en presencia de sulfato de sodio y se evaporó para obtener 4-acetilindol ("4"), que fue recogido por filtración y lavado con agua y acetato de etilo.

Paso 2 (ii y iii), un paso de acilación (ii) - amidación (iii) en dos etapas, que comprendía formar 3-
 10 Dimetilaminooxalil-4-acetilindol ("6") al: (ii) hacer reaccionar 4-acetilindol ("4") con cloruro de oxalilo ($(\text{COCl})_2$) en dietil éter anhidro, agitar, agregar n-hexano y mantener a -20 °C para producir un intermediario acetato de 3-(2-cloro-2-oxoacetil)-1H-indol-4-ilo ("5") que se separó por filtración. El
 15 intermediario se disolvió en tetrahidrofurano anhidro (THF) y se sometió a reacción con dimetilamina ($(\text{CH}_3)_2\text{NH}$) en tetrahidrofurano y piridina. Se agregó éter anhidro debido a la solidificación, y el producto de reacción se separó por filtración y se lavó con n hexano, acetato de etilo y agua para
 20 obtener 3-dimetilaminooxalil-4-acetilindol ("6").

Paso 3 (iv) comprendía la formación de psilocina ("1") al hacer reaccionar el 3-dimetilaminooxalil-4-acetilindol ("6") con hidruro de litio y aluminio (LiAlH_4) en THF anhidro bajo atmósfera de argón. Después de someter a reflujo y

enfriamiento, se agregó sulfato de sodio anhidro, seguido de una solución de sulfato de sodio, y más sulfato de sodio anhidro. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo, se concentró rápidamente *in vacuo*, y los cristales de psilocina
5 resultantes se lavaron brevemente con metanol.

Paso 4 (v) comprendía la formación de bencil [2-(4-oxiindol-3-il) etil] dimetilammonio-4-O-bencil fosfato ("8") al hacer reaccionar psilocina, disuelta en THF anhidro, con n-butil litio (n-BuLi) en n-hexano a -78 °C y
10 tetrabencilpirofosfato [(BnO)₂PO]₂O, y la reacción se dejó calentar a 0 °C, y se monitoreó la producción del intermediario dibencil 3-[2-(dimetilamino)etil]-1H-indol-4-il fosfato ("7"). Al verificar su presencia, se agregó gel de sílice aminopropílico, la mezcla se diluyó con acetato de etilo y se filtró a través
15 de una almohadilla de Celite por succión, el filtrado se concentró *in vacuo*, se re-disolvió en CH₂Cl₂ y el precipitado se recogió por filtración.

Paso 5 (vi) comprendía la formación de psilocibina ("2") mediante la reacción de ("8"), en metanol (MeOH), con hidrógeno
20 (H₂) usando un catalizador de carbono activado con paladio (Pd/C). Se agregó agua, debido a la deposición del producto, y ("8"), su derivado mono-desbencilado se controló junto con la aparición de psilocibina; la solución de reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite. El producto se recogió

por filtración y se lavó con etanol para proveer una forma cristalina de aguja blanca con un punto de fusión de 190 °C - 198 °C.

A diferencia de la mayoría de los procesos, tal como el

5 JNP, que usan solventes no acuosos, como metanol o etanol, en Experientia 1958, 15, 397-399 se utilizó una recristalización única del agua para obtener psilocibina de una extracción de hongos. La enseñanza consistía en usar agua hirviendo para disolver el material de partida, obtenido a pequeña escala por

10 cromatografía, y se declaró que el material secado con alto vacío resultante se fundió indistintamente entre 185 y 195 °C, y mostró una pérdida de peso del 25.4%, sugiriendo que claramente difiere en pureza y forma al obtenida por el Solicitante.

15 Durante el desarrollo de una síntesis para producir psilocibina, el Solicitante condujo un número de reacciones de hidrogenación a una escala de 5 g, como resultado de las cuales se obtuvieron diferentes formas cristalinas de psilocibina. La reacción de hidrogenación inicial produjo el Hidrato A

20 (JCCA2157E) que exhibió un difractograma XRPD como se muestra en la Figura 7d, y termogramas de DSC y TGA como se muestra en la Figura 8d. El DSC exhibe una reacción endotérmica a ~97 °C que coincide con una reducción del peso en el TGA indicativo de deshidratación, y un evento endotérmico con una temperatura

de inicio de ~216 °C que se presume que es la fusión. Otra reacción de hidrogenación produjo un solvato de etanol (JCCA2158D) que, cuando se analizó por XRPD (Figura 7e), DSC (Figura 8e), TGA (Figura 8e) y por ¹H RMN, indicó 11% de etanol atrapado. El termograma de DSC muestra una reacción endotérmica que tiene un inicio de ~154 °C que parece ser una fusión concurrente con la pérdida de peso de ~13% en el TGA. En otro experimento realizado durante el desarrollo, el Solicitante realizó una cristalización de psilocibina; en lugar de permanecer en solución en agua caliente permitiendo un paso de filtración de pulido, la precipitación tuvo lugar a alta temperatura (>90 °C). Los sólidos formados no se re-disolvieron ante un mayor calentamiento o adición de agua extra. Tras enfriar y aislar el sólido (CB646E), se realizó XRPD. El difractograma de XRPD (Figura 7f) sugirió una fase mixta de Polimorfo A' (JCCA2160-F-D4) y Polimorfo B (JCCA2160-F-TM2-C5). Estos hallazgos resaltan la importancia de desarrollar un proceso que pueda producir consistentemente la forma cristalina deseada para que el Solicitante realice experimentos para determinar cuáles eran estas formas para poder producir una psilocibina químicamente pura, en una forma controlada adecuada para uso en medicina.

Para ensayos clínicos, cualquier Sustancia Activa Nueva (NAS, *New Active Substance*) debería ser apta para la producción

a gran escala (típicamente, lotes superiores a 100 g, más típicamente superiores a 250 g, más preferentemente, incluso superiores a 500 g, hasta lotes superiores a Kg), dependiendo de la cantidad de activo a administrar a un sujeto humano.

- 5** También debería ser químicamente pura, bien definida y estable bajo almacenamiento.

Además, cualquier método de fabricación debe ser fácilmente reproducible, y proporcionar consistencia lote a lote.

- 10** Es un primer objetivo de esta invención proveer psilocibina, de forma polimórfica consistente, para su administración a sujetos humanos.

- Es otro objetivo de esta invención proveer psilocibina químicamente pura, de forma polimórfica consistente, para su
15 administración a sujetos humanos.

Es un objetivo adicional proveer psilocibina químicamente pura, en cantidades de lotes a gran escala ya que, para uso comercial, la psilocibina pura debe producirse a escala.

- Es otro objetivo adicional de la invención proveer un
20 método para cristalizar psilocibina en una forma polimórfica deseada.

Es otro objetivo adicional de la presente invención proveer un método escalable para fabricar psilocibina, a partir de psilocina o 4 hidroxindol.

Al desarrollar una metodología adecuada, el Solicitante experimentó numerosos problemas y dificultades que tuvieron que superarse, y es un objetivo aparte, e independiente, superar los problemas identificados en cada paso, y usar las invenciones ya sea en forma individual o en combinación.

Es incluso otro objetivo adicional de la invención formular la psilocibina de la invención en una forma adecuada para su administración a sujetos humanos y usarla en medicina, particularmente en el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central (SNC), y más particularmente, pero no exclusivamente, en el tratamiento de la depresión, en particular, la depresión resistente a los fármacos, ya sea en forma individual o en combinación con un producto de salud digital o solución digital.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se provee psilocibina cristalina en forma de Polimorfo A o Polimorfo A', caracterizada por uno o más de:

picos en un difractograma de XRPD a 11.5, 12.0 y 14.5 $^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$;

picos en un difractograma de XRPD a 11.5, 12.0 y 14.5 $^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$, caracterizado además por al menos un pico adicional a 19.7, 20.4, 22.2, 24.3 o 25.7 $^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$;

un difractograma de XRPD como se ilustra sustancialmente

en la Figura 7a o 7b; o

un evento endotérmico en un termograma de DSC que tiene una temperatura de inicio de entre 205 y 220 °C sustancialmente como se ilustra en la Figura 8a o 8b.

5 Polimorfo A

De acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención, se provee psilocibina cristalina en forma de Polimorfo A, caracterizada por uno o más de:

10 picos en un difractograma de XRPD a 11.5, 12.0, 14.5, y 17.5, $^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$;

picos en un difractograma de XRPD a 11.5, 12.0, 14.5 y 17.5, $^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$, caracterizado además por al menos un pico adicional a 19.7, 20.4, 22.2, 24.3 o 25.7 $^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$;

15 un difractograma de XRPD como se ilustra sustancialmente en la Figura 7a; o

un evento endotérmico en un termograma de DSC que tiene una temperatura de inicio de entre 205 y 220 °C sustancialmente como se ilustra en la Figura 8a.

20 El pico a 17.5 $^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$ tiene una intensidad relativa comparada con el pico a 14.5 $^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$ de al menos 5%; preferentemente, al menos 6%; más preferentemente, incluso al menos 7%, hasta 8%, y 9% a al menos 10%.

En una forma de realización, el Polimorfo A de psilocibina exhibe un difractograma de XRPD caracterizado por el

difractograma resumido en la Tabla 1. En una forma de realización, descrita en la presente, el Polimorfo A de psilocibina cristalina comprende al menos 3 picos de ($\pm 0.1^\circ 2\theta$) de la Tabla 1. En cierta forma de realización, descrita en la presente, el Polimorfo A de psilocibina cristalina comprende al menos 4 picos de ($\pm 0.1^\circ 2\theta$) de la Tabla 1. En cierta forma de realización, descrita en la presente, el Polimorfo A de psilocibina cristalina comprende al menos 5 picos de ($\pm 0.1^\circ 2\theta$) de la Tabla 1. En cierta forma de realización, descrita en la presente, el Polimorfo A de psilocibina cristalina comprende al menos 6 picos de ($\pm 0.1^\circ 2\theta$) de la Tabla 1. En cierta forma de realización, descrita en la presente, el Polimorfo A de psilocibina cristalina comprende al menos 8 picos de ($\pm 0.1^\circ 2\theta$) de la Tabla 1. En cierta forma de realización, descrita en la presente, el Polimorfo A de psilocibina cristalina comprende al menos 10 picos de ($\pm 0.1^\circ 2\theta$) de la Tabla 1. En cierta forma de realización, descrita en la presente, el Polimorfo A de psilocibina cristalina comprende al menos 15 picos de ($\pm 0.1^\circ 2\theta$) de la Tabla 1. Un pico a aproximadamente $17.5, ^\circ 2\theta \pm 0.1^\circ 2\theta$ distingue el Polimorfo A del Polimorfo A' de la psilocibina, en el cual el pico está ausente o sustancialmente ausente (es decir, tiene una intensidad relativa comparada con el pico a $14.5 ^\circ 2\theta \pm 0.1^\circ 2\theta$ de menos de 2%; más preferentemente, menos de 1%).

Tabla 1 - Posiciones de los picos de XRPD para el Polimorfo A

	Posición [°2Th.]	Intensidad relativa [%]
5	5.6	8.42
	11.5	13.05
	12.0	26.45
	14.5	100
	17.5	10.71
10	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

15 En una forma de realización, el Polimorfo A de psilocibina cristalina se caracteriza por picos de difractograma de XRPD a 11.5, 12.0, 14.5, y 17.5°2θ±0.1°2θ. En otra forma de realización, el Polimorfo A de psilocibina cristalina se caracteriza además por al menos un pico adicional que aparece

20 a 19.7, 20.4, 22.2, 24.3 o 25.7°2θ±0.1°2θ. En otra forma de realización, el Polimorfo A de psilocibina cristalina se caracteriza además por al menos dos picos adicionales que aparecen a 19.7, 20.4, 22.2, 24.3 o 25.7 °2θ±0.1°2θ. En otra forma de realización, el Polimorfo A de psilocibina cristalina

se caracteriza además por al menos tres picos adicionales que aparecen a 19.7, 20.4, 22.2, 24.3 o 25.7 °2θ±0.1°2θ. En otra forma de realización más, el Polimorfo A de psilocibina cristalina exhibe un difractograma de XRPD sustancialmente
5 igual al difractograma de XRPD que se muestra en la Figura 7a.

En una forma de realización, el Polimorfo A de psilocibina cristalina se caracteriza por picos de difractograma de XRPD a 14.5 y 17.5°2θ±0.1°2θ en donde el pico a 17.5°2θ tiene una intensidad que es al menos 5% de la intensidad del pico a
10 14.5°2θ; más preferentemente aún, al menos 6%, hasta al menos 7%, al menos 8%, al menos 9%, a al menos 10%.

En una forma de realización, el Polimorfo A de psilocibina cristalina se encuentra en ausencia de o sustancialmente en ausencia de picos de difractograma de XRPD a 10.1. Por
15 "sustancialmente en ausencia de" se entiende que cualquier pico de difractograma de XRPD a 10.1 es menos de 2% de la intensidad del pico a 14.5°2θ, tal como menos de 1%, o no es detectable en el difractograma de XRPD.

En una forma de realización, el Polimorfo A de psilocibina
20 cristalina se caracteriza por un evento endotérmico en un termograma de DSC que tiene una temperatura de inicio de entre 205 y 220 °C, tal como entre 210 y 220 °C, tal como entre 210 y 218 °C, o tal como entre 210 y 216 °C. En otra forma de realización, el Polimorfo A de psilocibina cristalina se

caracteriza además por un evento endotérmico en el termograma de DSC que tiene una temperatura de inicio de entre 145 y 165 °C, tal como entre 145 y 160 °C, o tal como entre 145 y 155 °C. En otra forma de realización, el Polimorfo A de psilocibina

5 cristalina se caracteriza por un evento endotérmico que tiene una temperatura de inicio de entre 205 y 220 °C, tal como entre 210 y 220 °C, tal como entre 210 y 218°C, o tal como entre 210 y 216 °C, y un evento endotérmico que tiene una temperatura de inicio de entre 145 y 165 °C, tal como entre 145 y 160 °C, o

10 tal como entre 145 y 155°C, en un termograma de DSC. En incluso otra forma de realización, el Polimorfo A de psilocibina cristalina exhibe un termograma de DSC sustancialmente igual al termograma de DSC en la Figura 8a.

En otra forma de realización, el Polimorfo A de

15 psilocibina cristalina se caracteriza por tener un contenido de agua de <0.5% p/p, tal como <0.4% p/p, tal como <0.3% p/p, tal como <0.2% p/p, o tal como <0.1% p/p. El experto en la materia suele conocer los métodos para determinar el contenido de agua de un compuesto; por ejemplo, valoración de Karl

20 Fischer. En una forma de realización, el Polimorfo A de psilocibina cristalina se caracteriza por tener <0.5% p/p de pérdida, tal como <0.4% p/p, tal como <0.3% p/p, tal como <0.2% p/p, tal como <0.1% p/p, en el termograma de TGA entre temperatura ambiente, tal como aproximadamente 25 °C, y 200 °C.

En una forma de realización, el Polimorfo A de psilocibina cristalina pierde menos del 2% en peso en una prueba de pérdida por secado, tal como menos del 1% en peso, tal como menos del 0.5% en peso. La prueba de pérdida por secado se realiza a 70 °C.

En una forma de realización, el polimorfo A de psilocibina cristalina es una forma cristalina altamente pura del Polimorfo A, por ejemplo, la psilocibina comprende al menos 90% en peso, tal como 95%, tal como 99%, tal como 99.5% de Polimorfo A.

En una forma de realización, el Polimorfo A de psilocibina cristalina es un sólido de color blanco a blanquecino.

En otra forma de realización, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina es químicamente puro; por ejemplo, la psilocibina tiene una pureza química superior al 97%; tal como superior al 98%; o tal como superior al 99% por HPLC. En una forma de realización, el Polimorfo A de psilocibina cristalina no tiene impureza única superior al 1%, más preferentemente inferior al 0.5%, incluyendo ácido fosfórico según se mide por ³¹P RMN, y psilocina según se mide por HPLC. En una forma de realización, el Polimorfo A de psilocibina cristalina tiene una pureza química superior al 97% de área; más preferentemente, incluso superior al 98% de área; y, con mayor preferencia, superior al 99% de área por HPLC. En una forma de realización, el polimorfo A de psilocibina cristalina no

tiene impureza única superior al 1% de área; más preferentemente, inferior al 0.5% de área según se mide por HPLC. En una forma de realización, el polimorfo A de psilocibina cristalina no contiene psilocina a un nivel superior al 1% de área; más preferentemente, inferior al 0.5% de área según se mide por HPLC. En una forma de realización, el polimorfo A de psilocibina cristalina no contiene ácido fosfórico a un nivel superior al 1% en peso; más preferentemente, inferior al 0.5% en peso según se mide por ^{31}P RMN. En una forma de realización, el polimorfo A de psilocibina cristalina tiene un ensayo químico de al menos 95% en peso, tal como de al menos 96% en peso, o tal como de al menos 98% en peso.

Polimorfo A'

De acuerdo con otra forma de realización de la invención, se provee el Polimorfo A' de psilocibina cristalina, caracterizado por uno o más de:

picos en un difractograma de XRPD a 11.5, 12.0 y 14.5 $^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$, pero en ausencia de o sustancialmente en ausencia de un pico a 17.5 $^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$;

picos en un difractograma de XRPD a 11.5, 12.0 y 14.5 $^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$, pero en ausencia de o sustancialmente en ausencia de un pico a 17.5 $^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$, caracterizado además por al menos un pico adicional a 19.7, 20.4, 22.2, 24.3 o 25.7 $^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$;

un difractograma de XRPD como se ilustra sustancialmente en la Figura 7b; o

un evento endotérmico en un termograma de DSC que tiene una temperatura de inicio de entre 205 y 220 °C sustancialmente como se ilustra en la Figura 8b.

Por "sustancialmente en ausencia de un pico a $17.5^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$ " se entiende, de estar presente, que el pico tiene una intensidad relativa, comparada con un pico a $14.5^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$, de menos de 5%, más preferentemente menos de 4%, hasta menos de 3%, a 2%, 1% o menos.

En una forma de realización, el Polimorfo A' de psilocibina exhibe un difractograma de XRPD caracterizado por el difractograma resumido en la Tabla 2. En una forma de realización, descrita en la presente, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina comprende al menos 3 picos de ($\pm 0.1^{\circ}2\theta$) de la Tabla 2, pero en ausencia de o sustancialmente en ausencia de un pico a $17.5^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$. En cierta forma de realización, descrita en la presente, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina comprende al menos 4 picos de ($\pm 0.1^{\circ}2\theta$) de la Tabla 2, pero en ausencia de o sustancialmente en ausencia de un pico a $17.5^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$. En cierta forma de realización, descrita en la presente, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina comprende al menos 5 picos de ($\pm 0.1^{\circ}2\theta$) de la Tabla 2, pero en ausencia de o sustancialmente en ausencia de un pico a $17.5^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$.

$^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$. En cierta forma de realización, descrita en la presente, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina comprende al menos 6 picos de $(\pm 0.1^{\circ}2\theta)$ de la Tabla 2, pero en ausencia de o sustancialmente en ausencia de un pico a $17.5^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$.

- 5** En cierta forma de realización, descrita en la presente, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina comprende al menos 8 picos de $(\pm 0.1^{\circ}2\theta)$ de la Tabla 2, pero en ausencia de o sustancialmente en ausencia de un pico a $17.5^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$. En cierta forma de realización, descrita en la presente, el
- 10** Polimorfo A' de psilocibina cristalina comprende al menos 10 picos de $(\pm 0.1^{\circ}2\theta)$ de la Tabla 2, pero en ausencia de o sustancialmente en ausencia de un pico a $17.5^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$. En cierta forma de realización, descrita en la presente, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina comprende al menos 15
- 15** picos de $(\pm 0.1^{\circ}2\theta)$ de la Tabla 2, pero en ausencia de o sustancialmente en ausencia de un pico a $17.5^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$. En cierta forma de realización, descrita en la presente, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina comprende al menos 20 picos de $(\pm 0.1^{\circ}2\theta)$ de la Tabla 2, pero en ausencia de o
- 20** sustancialmente en ausencia de un pico a $17.5^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$. En cierta forma de realización, descrita en la presente, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina comprende al menos 25 picos de $(\pm 0.1^{\circ}2\theta)$ de la Tabla 2, pero en ausencia de o sustancialmente en ausencia de un pico a $17.5^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$.

Tabla 2 - Posiciones de los picos de XRPD para el Polimorfo

A'

5

Posición [°2Th.]	Intensidad 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

10

15

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

20

En una forma de realización, el Polimorfo A de psilocibina cristalina se caracteriza por picos de difractograma de XRPD a 11.5, 12.0, y $14.5^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$ pero sustancialmente en ausencia de un pico a $17.5^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$. En otra forma de realización,

el Polimorfo A' de psilocibina cristalina se caracteriza además por al menos un pico adicional que aparece a 19.7, 20.4, 22.2, 24.3, o 25.7 $^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$. En otra forma de realización, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina se caracteriza además

5 por al menos dos picos adicionales que aparecen a 19.7, 20.4, 22.2, 24.3, o 25.7 $^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$. En otra forma de realización, el polimorfo A de psilocibina cristalina se caracteriza adicionalmente y se distingue del polimorfo A por la presencia de un pico que aparece a 10.1 $^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$. En otra forma de

10 realización más, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina exhibe un difractograma de XRPD sustancialmente igual al difractograma de XRPD que se muestra en la Figura 7b.

En una forma de realización, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina se caracteriza por picos de

15 difractograma de XPRD a 14.5 y 17.5 $^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$ en donde la intensidad del pico a 17.5 $^{\circ}2\theta$ es inferior al 5% de la intensidad del pico a 14.5 $^{\circ}2\theta$, tal como inferior al 4%, tal como inferior al 3%, tal como inferior al 2%, tal como inferior al 1%, o tal como aproximadamente 1%.

20 En una forma de realización, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina se caracteriza por picos de difractograma de XPRD a 10.1 y 14.5 $^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$ en donde la intensidad del pico a 10.1 $^{\circ}2\theta$ es al menos 1% de la intensidad del pico a 14.5 $^{\circ}2\theta$, tal como al menos 2%, tal como al menos

3%, o tal como aproximadamente 4%.

En una forma de realización, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina se caracteriza por un evento endotérmico en un termograma de DSC que tiene una temperatura de inicio de entre 205 y 220 °C, tal como entre 210 y 220 °C, tal como entre 210 y 218 °C, o tal como entre 210 y 216 °C. En otra forma de realización, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina se caracteriza además por un evento endotérmico en el termograma de DSC que tiene una temperatura de inicio de entre 145 y 165 °C, tal como entre 145 y 160 °C, o tal como entre 145 y 155 °C. En otra forma de realización, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina se caracteriza por un evento endotérmico que tiene una temperatura de inicio de entre 205 y 220 °C, tal como entre 210 y 220 °C, tal como entre 210 y 218°C, o tal como entre 210 y 216 °C, y un evento endotérmico que tiene una temperatura de inicio de entre 145 y 165 °C, tal como entre 145 y 160 °C, o tal como entre 145 y 155°C, en un termograma de DSC. En incluso otra forma de realización, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina exhibe un termograma de DSC sustancialmente igual al termograma de DSC en la Figura 8b.

En otra forma de realización, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina se caracteriza por tener un contenido de agua de <0.5% p/p, tal como <0.4% p/p, tal como <0.3% p/p, tal como <0.2% p/p, o tal como <0.1% p/p. El experto en la

materia suele conocer los métodos para determinar el contenido de agua de un compuesto; por ejemplo, valoración de Karl Fischer. En una forma de realización, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina se caracteriza por tener <0.5% p/p de pérdida, tal como <0.4% p/p, tal como <0.3% p/p, tal como <0.2% p/p, tal como <0.1% p/p, en el termograma de TGA entre temperatura ambiente, tal como 25 °C, y 200 °C. En una forma de realización, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina pierde menos del 2% en peso en una prueba de pérdida por secado, tal como menos del 1% en peso, tal como menos del 0.5% en peso. La prueba de pérdida por secado se realiza a 70 °C.

En una forma de realización, el polimorfo A de psilocibina cristalina es una forma cristalina altamente pura del Polimorfo A', por ejemplo, la psilocibina comprende al menos 90% en peso, tal como 95%, tal como 99%, tal como 99.5% de Polimorfo A'.

En una forma de realización, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina es un sólido de color blanco a blanquecino.

En otra forma de realización, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina es químicamente puro; por ejemplo, la psilocibina tiene una pureza química superior al 97%; más preferentemente, incluso superior al 98%; y, con mayor preferencia, superior al 99% por HPLC. En una forma de

realización, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina no tiene impureza única superior al 1%, más preferentemente inferior al 0.5%, incluyendo ácido fosfórico según se mide por ^{31}P RMN, y psilocina según se mide por HPLC. En una forma de realización,

5 el Polimorfo A' de psilocibina cristalina tiene una pureza química superior al 97% de área; más preferentemente, incluso superior al 98% de área; y, con mayor preferencia, superior al 99% de área por HPLC. En una forma de realización, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina no tiene impureza única superior

10 al 1% de área; más preferentemente, inferior al 0.5% de área según se mide por HPLC. En una forma de realización, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina no contiene psilocina a un nivel superior al 1% de área; más preferentemente, inferior al 0.5% de área según se mide por HPLC. En una forma de

15 realización, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina no contiene ácido fosfórico a un nivel superior al 1% en peso; más preferentemente, inferior al 0.5% en peso según se mide por ^{31}P RMN. En una forma de realización, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina tiene un ensayo químico de al menos 95%

20 en peso, tal como de al menos 96% en peso, o tal como de al menos 98% en peso.

Los difractogramas de XRPD y las posiciones de los picos de XRPD se adquieren utilizando radiación Cu K α .

Los termogramas de DSC y TGA se adquieren utilizando una

tasa de calentamiento de 20 °C/min.

En una forma de realización, se provee psilocibina cristalina de alta pureza, en forma de Polimorfo A o Polimorfo A' (12A o 12A'), que exhibe un difractograma XRPD como se ilustra sustancialmente en las Figuras 7a o 7b y un termográfico de DSC como se ilustra sustancialmente en las Figuras 8a u 8b, o una mezcla de los mismos.

Preferentemente, el Polimorfo A de psilocibina cristalina (12A) exhibe un difractograma de XRPD como se ilustra en la Figura 7a, y un termográfico de DSC como se ilustra en la Figura 8a.

Preferentemente, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina (12A') exhibe un difractograma de XRPD como se ilustra sustancialmente en la Figura 7b, y un termográfico de DSC como se ilustra sustancialmente en la Figura 8b.

Preferentemente, el Polimorfo A de psilocibina cristalina (12A) de alta pureza se caracteriza por un difractograma de XRPD como se ilustra sustancialmente en la Figura 7a, y un termográfico de DSC como se ilustra sustancialmente en la Figura 8a.

Preferentemente, el Polimorfo A' de psilocibina cristalina (12A') de alta pureza se caracteriza por un difractograma de XRPD como se ilustra en la Figura 7b, y un termográfico de DSC como se ilustra en la Figura 8b.

El Polimorfo A (incluida su variante isoestructural, el Polimorfo A') (Figuras 7a y 7b) difiere del Polimorfo B (Figura 7c), el Hidrato A (Figura 7d) y el solvato de etanol (Figura 7e: Solvato A), y la relación entre algunas de las diferentes
5 formas se ilustra en la Figura 9.

El Polimorfo A o Polimorfo A' de psilocibina cristalina es un sólido de color blanco a blanquecino, y/o tiene una pureza química superior al 97%, más preferentemente incluso superior al 98%, y con mayor preferencia superior al 99% por
10 HPLC, y no tiene impureza única superior al 1%, más preferentemente inferior al 0.5%, incluyendo el ácido fosfórico según se mide por ^{31}P RMN, y la psilocina según se mide por HPLC. En una forma de realización, se provee psilocibina cristalina de alta pureza, en forma de Polimorfo A o Polimorfo
15 A'. En una forma de realización, la psilocibina cristalina, en forma de Polimorfo A o Polimorfo A', tiene una pureza química superior al 97% de área; más preferentemente, incluso superior al 98% de área; y, con mayor preferencia, superior al 99% de área por HPLC. En una forma de realización, la psilocibina
20 cristalina, en forma de Polimorfo A o Polimorfo A', no tiene impureza única superior al 1% de área; más preferentemente, inferior al 0.5% de área según se mide por HPLC. En una forma de realización, la psilocibina cristalina, en forma de Polimorfo A o Polimorfo A', no contiene psilocina a un nivel

superior al 1% de área; más preferentemente, inferior al 0.5% de área según se mide por HPLC. En una forma de realización, la psilocibina cristalina, en forma de Polimorfo A o Polimorfo A', no contiene ácido fosfórico a un nivel superior al 1% en peso; más preferentemente, inferior al 0.5% en peso según se mide por ^{31}P RMN. En una forma de realización, la psilocibina cristalina, en forma de Polimorfo A o Polimorfo A', tiene un ensayo químico de al menos 95% en peso, tal como de al menos 96% en peso, o tal como de al menos 98% en peso.

El calentamiento del Polimorfo A o A' genera un evento endotérmico que tiene una temperatura de inicio de alrededor de 150 °C correspondiente a la transición sólido-sólido del Polimorfo A o Polimorfo A' al Polimorfo B. El calentamiento continuo del sólido resultante, es decir, el Polimorfo B, genera un segundo evento endotérmico correspondiente a un punto de fusión que tiene una temperatura de inicio de entre 205 y 220 °C (ver las Figuras 8a y 8b).

De acuerdo con otro aspecto independiente de la presente invención, se provee una forma cristalina de psilocibina cristalina, el Hidrato A, caracterizado por uno o más de:

picos en un difractograma de XRPD a 8.9, 12.6 y $13.8^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$;

picos en un difractograma de XRPD a 8.9, 12.6 y $13.8^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$, caracterizado además por al menos un pico

adicional a 6.5, 12.2, 19.4, 20.4 o $20.8^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$;

un difractograma de XRPD como se ilustra sustancialmente en la Figura 7d; o

un evento endotérmico en un termograma de DSC que tiene
5 una temperatura de inicio de entre 205 y 220 °C sustancialmente como se ilustra en la Figura 8d.

En una forma de realización, el Hidrato A de psilocibina exhibe un difractograma de XRPD caracterizado por el difractograma resumido en la Tabla 3. En una forma de
10 realización, descrita en la presente, el Hidrato A de psilocibina cristalina comprende al menos 3 picos de ($\pm 0.1^{\circ}2\theta$) de la Tabla 3. En cierta forma de realización, descrita en la presente, el Hidrato A de psilocibina cristalina comprende al menos 4 picos de ($\pm 0.1^{\circ}2\theta$) de la Tabla 3. En cierta forma de
15 realización, descrita en la presente, el Hidrato A de psilocibina cristalina comprende al menos 5 picos de ($\pm 0.1^{\circ}2\theta$) de la Tabla 3. En cierta forma de realización, descrita en la presente, el Hidrato A de psilocibina cristalina comprende al menos 8 picos de ($\pm 0.1^{\circ}2\theta$) de la Tabla 3. En cierta forma de
20 realización, descrita en la presente, el Hidrato A de psilocibina cristalina comprende al menos 10 picos de ($\pm 0.1^{\circ}2\theta$) de la Tabla 3.

Tabla 3 Posiciones de los picos de XRPD para el Hidrato A

	Posición [°2 θ .]	Intensidad relativa [%]
5	5.6	14.4
	6.5	18.84
	8.9	100
10	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
15	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
20	29.7	4.83
	32.1	8.27
	32.8	4.81
	33.4	3.74
	34.2	5.96

En una forma de realización, el Hidrato A de psilocibina cristalina se caracteriza por picos de difractograma de XRPD a 8.9, 12.6 y 13.8°2 θ ±0.1°2 θ . En otra forma de realización, el Hidrato A de psilocibina cristalina se caracteriza además por

al menos un pico que aparece a 6.5, 12.2, 19.4, 20.4 o $20.8^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$. En otra forma de realización, el Hidrato A de psilocibina cristalina se caracteriza además por al menos dos picos que aparecen a 6.5, 12.2, 19.4, 20.4 o $20.8^{\circ}2\theta \pm 0.1^{\circ}2\theta$.

- 5** En otra forma de realización más, el Hidrato A de psilocibina cristalina exhibe un difractograma de XRPD sustancialmente igual al difractograma de XRPD que se muestra en la Figura 7d.

- En una forma de realización, el Hidrato A de psilocibina cristalina se caracteriza por un evento endotérmico en un
- 10** termograma de DSC que tiene una temperatura de inicio de entre 205 y 220 °C, tal como entre 210 y 220 °C, tal como entre 210 y 218 °C, o tal como entre 210 y 216 °C. En otra forma de realización, el Hidrato A de psilocibina cristalina se caracteriza además por un evento endotérmico en el termograma
- 15** de DSC que tiene una temperatura de inicio de entre 85 y 105°C, o tal como entre 90 y 100°C. En otra forma de realización, el Hidrato A de psilocibina cristalina se caracteriza por un evento endotérmico que tiene una temperatura de inicio de entre 205 y 220 °C, tal como entre 210 y 220 °C, tal como entre 210
- 20** y 218°C, o tal como entre 210 y 216 °C, y un evento endotérmico que tiene una temperatura de inicio de entre 85 y 105 °C, o tal como entre 90 y 100 °C, en un termograma de DSC. En incluso otra forma de realización, el Hidrato A de psilocibina cristalina exhibe un termograma de DSC sustancialmente igual

al termograma de DSC en la Figura 8d.

En otra forma de realización, el Hidrato A de psilocibina cristalina se caracteriza por tener un contenido de agua de entre 10 y 18%, tal como entre 12 y 16%, o tal como
 5 aproximadamente 13%. El experto en la materia suele conocer los métodos para determinar el contenido de agua de un compuesto; por ejemplo, valoración de Karl Fischer. En una forma de realización, el Hidrato A de psilocibina cristalina se caracteriza por tener una pérdida de peso en el termograma
 10 de TGA de entre 10 y 18%, tal como entre 12 y 16%, o tal como aproximadamente 13%, entre temperatura ambiente, tal como aproximadamente 25 °C, y 120 °C.

En una forma de realización, el Hidrato A de psilocibina cristalina es una forma cristalina altamente pura del Hidrato
 15 A, por ejemplo, la psilocibina comprende al menos 90% en peso, tal como 95%, tal como 99%, tal como 99.5% de Hidrato A.

De acuerdo con otro aspecto independiente de la presente invención, se provee una forma cristalina de psilocibina cristalina, el Polimorfo B, caracterizado por uno o más de:
 20 picos en un difractograma de XRPD a 11.1, 11.8 y 14.3°2θ±0.1°2θ;

picos en un difractograma de XRPD a 11.1, 11.8 y 14.3°2θ±0.1°2θ, caracterizado además por al menos un pico adicional a 14.9, 15.4, 19.3, 20.0 o 20.6°2θ±0.1°2θ;

un difractograma de XRPD como se ilustra sustancialmente en la Figura 7c; o

un evento endotérmico en un termograma de DSC que tiene una temperatura de inicio de entre 205 y 220 °C sustancialmente
5 como se ilustra en la Figura 8c.

En una forma de realización, el Polimorfo B de psilocibina exhibe un difractograma de XRPD caracterizado por el difractograma resumido en la Tabla 4. En una forma de realización, descrita en la presente, el Polimorfo B de
10 psilocibina cristalina comprende al menos 3 picos de ($\pm 0.1^\circ 2\theta$) de la Tabla 4. En cierta forma de realización, descrita en la presente, el Polimorfo B de psilocibina cristalina comprende al menos 4 picos de ($\pm 0.1^\circ 2\theta$) de la Tabla 4. En cierta forma de realización, descrita en la presente, el Polimorfo B de
15 psilocibina cristalina comprende al menos 5 picos de ($\pm 0.1^\circ 2\theta$) de la Tabla 4. En cierta forma de realización, descrita en la presente, el Polimorfo B de psilocibina cristalina comprende al menos 8 picos de ($\pm 0.1^\circ 2\theta$) de la Tabla 4. En cierta forma de realización, descrita en la presente, el Polimorfo B de
20 psilocibina cristalina comprende al menos 10 picos de ($\pm 0.1^\circ 2\theta$) de la Tabla 4.

Tabla 4 Posiciones de los picos de XRPD para el Polimorfo

B

5	Posición [°2Th.]	Intensidad relativa [%]
	5.5	21.33
10	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
15	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
20	32.2	6.90
	33.8	2.37

En una forma de realización, el Polimorfo B de psilocibina cristalina se caracteriza por picos de difractograma de XRPD a 11.1, 11.8 y 14.3°2θ±0.1°2θ. En otra forma de realización, el Polimorfo B de psilocibina cristalina se caracteriza además por al menos un pico que aparece a 14.9, 15.4, 19.3, 20.0 o

20.6°2 θ ±0.1°2 θ . En otra forma de realización, el Polimorfo B de psilocibina cristalina se caracteriza además por al menos dos picos que aparecen a 14.9, 15.4, 19.3, 20.0 o 20.6°2 θ ±0.1°2 θ . En otra forma de realización más, el Polimorfo

5 B de psilocibina cristalina exhibe un difractograma de XRPD sustancialmente igual al difractograma de XRPD que se muestra en la Figura 7c.

En una forma de realización, el Polimorfo B de psilocibina cristalina se caracteriza por un evento endotérmico en un
10 termograma de DSC que tiene una temperatura de inicio de entre 205 y 220 °C, tal como entre 210 y 220 °C, tal como entre 210 y 218 °C, o tal como entre 210 y 216 °C. En otra forma de realización más, el Polimorfo B de psilocibina cristalina exhibe un termograma de DSC sustancialmente igual al termograma
15 de DSC en la Figura 8c.

En otra forma de realización, el Polimorfo B de psilocibina cristalina se caracteriza por tener un contenido de agua de <0.5% p/p, tal como <0.4% p/p, tal como <0.3% p/p, tal como <0.2% p/p, o tal como <0.1% p/p. El experto en la
20 materia suele conocer los métodos para determinar el contenido de agua de un compuesto; por ejemplo, valoración de Karl Fischer. En una forma de realización, el Polimorfo B de psilocibina cristalina se caracteriza por tener <0.5% p/p de pérdida, tal como <0.4% p/p, tal como <0.3% p/p, tal como <0.2%

p/p, tal como <0.1% p/p, en el termograma de TGA entre temperatura ambiente, tal como aproximadamente 25 °C, y 200 °C. En una forma de realización, el Polimorfo B de psilocibina cristalina pierde menos del 2% en peso en una prueba de pérdida
5 por secado, tal como menos del 1% en peso, tal como menos del 0.5% en peso. La prueba de pérdida por secado se realiza a 70 °C.

En una forma de realización, el polimorfo B de psilocibina cristalina es una forma cristalina altamente pura del Polimorfo
10 B, por ejemplo, la psilocibina comprende al menos 90% en peso, tal como 95%, tal como 99%, tal como 99.5% de Polimorfo B.

En otra forma de realización, el Polimorfo B de psilocibina cristalina es químicamente puro; por ejemplo, la psilocibina tiene una pureza química superior al 97%; tal como
15 superior al 98%; o tal como superior al 99% por HPLC. En una forma de realización, el Polimorfo B de psilocibina cristalina no tiene impureza única superior al 1%, más preferentemente inferior al 0.5%, incluyendo ácido fosfórico según se mide por ³¹P RMN, y psilocina según se mide por HPLC. En una forma de
20 realización, el Polimorfo B de psilocibina cristalina tiene una pureza química superior al 97% de área; más preferentemente, incluso superior al 98% de área; y, con mayor preferencia, superior al 99% de área por HPLC. En una forma de realización, el Polimorfo B de psilocibina cristalina no

- tiene impureza única superior al 1% de área; más preferentemente, inferior al 0.5% de área según se mide por HPLC. En una forma de realización, el Polimorfo B de psilocibina cristalina no contiene psilocina a un nivel superior al 1% de área; más preferentemente, inferior al 0.5% de área según se mide por HPLC. En una forma de realización, el Polimorfo B de psilocibina cristalina no contiene ácido fosfórico a un nivel superior al 1% en peso; más preferentemente, inferior al 0.5% en peso según se mide por ³¹P RMN. En una forma de realización, el Polimorfo B de psilocibina cristalina tiene un ensayo químico de al menos 95% en peso, tal como de al menos 96% en peso, o tal como de al menos 98% en peso.

- La psilocibina de la invención en forma de Polimorfo A o A' tiene las propiedades generales ilustradas en la Tabla 5 que sigue:

Tabla 5

20	Apariencia:	Sólido de color blanco a blanquecino
	Evento endotérmico mayor en DSC (temperatura de inicio) (correspondiente a una fusión):	210-215°C
	Higroscopicidad:	La psilocibina forma el Hidrato A a alta humedad y cuando se agrega al agua, pero el agua de hidratación se pierde rápidamente al secarse. De este modo, la forma anhidra se está desarrollando.
	Forma cristalina:	Polimorfo A y/o A' anhidro
	pKa (calculado):	1.74, 6.71, 9.75
	Solubilidad	<i>aprox.</i> 15 mg/ml en agua

5 La psilocibina se ajusta a los espectros como se establecen en la Tabla 6 que siguen y se ilustran en los espectros de las Figuras 10-13.

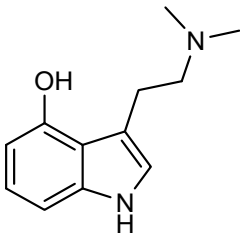
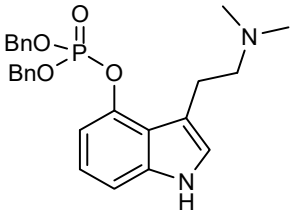
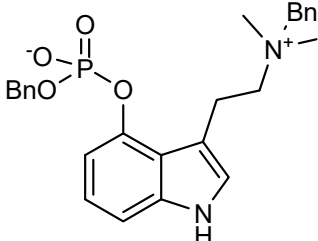
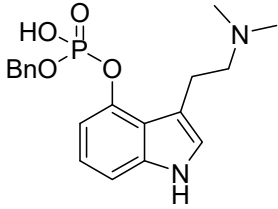
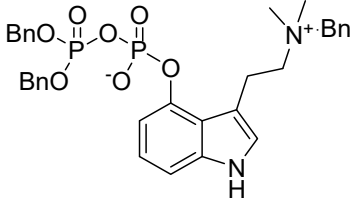
Tabla 6

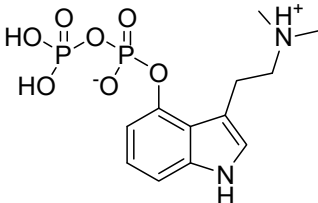
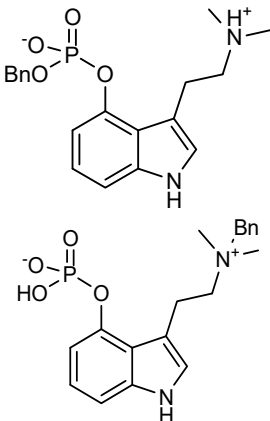
	Técnica	Conclusiones
10	RMN Protón (^1H) y Carbono (^{13}C)	La asignación de los espectros de protón (Figura 10) y carbono (Figura 11) son concordantes con la Psilocibina.
	Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FT-IR)	La asignación del espectro de FT-IR (Figura 12) es concordante con la Psilocibina.
15	Espectroscopía de masas (MS, <i>Mass Spectroscopy</i>)	La asignación del espectro de masa (Figura 13) es concordante con la Psilocibina.

La alta pureza se logra mediante un control cuidadoso de las condiciones de reacción para garantizar que las potenciales impurezas orgánicas se reduzcan significativamente.

20 Las impurezas conocidas y potenciales en la Psilocibina se muestran en la Tabla 7 que sigue:

Tabla 7

	Impureza	Tiempo de retención relativo (RRT, <i>Relative Retention Time</i>)	Estructura	Origen
5	Psilocina	1.65		Material de partida (etapa 3). También generado por la hidrólisis de la psilocibina. Solo se observó impureza significativa en los lotes de psilocibina.
10	Etapa 4A			Producto inicial formado en la reacción de etapa 4. Se convierte a la etapa 4 al agitar en THF. Se convierte en Psilocibina en la etapa 5.
15	Etapa 4	2.74		Intermediario
20	N-Dencilado etapa 4			Identificado por MS en Etapa 4. Se convierte en Psilocibina en la etapa 5.
	Etapa 4 Impureza anhídrido			Identificado por MS en Etapa 4. Se convierte en Etapa 5 Impureza de ácido pirofosfórico en etapa 5.

5	Etapa 5 Impureza de ácido pirofosfórico			Identificado por MS Formado a partir del anhídrido de la etapa 4. Se eliminó en la etapa 6, re-cristalización, mediante una combinación de hidrólisis a psilocibina y aumento de la solubilidad debido al grupo fosfato adicional.
10	Etapa 5 (intermediarios)	1.89 y 2.45		Se forman 2 intermediarios durante la hidrogenación. Posteriormente, se convierten en producto (estructuras basadas en la química). Monitoreado y controlado en la reacción de etapa 5.
15				

Del mismo modo, el procesamiento cuidadoso garantiza que los niveles de solvente se mantengan por debajo de los niveles que se indican en la Tabla 8.

Tabla 8

20	Solvente	Controlado a	El solvente de la etapa química se usa en
	Metanol	3000 ppm	Etapa 5
	Etanol	5000 ppm	Etapa 5
	THF	720 ppm	Etapa 4
	Tolueno	890 ppm	Generado como sub-producto en la etapa 5

Mediante una cuidadosa selección de la metodología de operación, el principio activo psilocibina de la invención cumple los criterios de aceptación establecidos en la Tabla 9 a continuación:

5 Tabla 9

	Atributo de calidad	Criterios de aceptación	Método de prueba
	Apariencia	Solamente a título informativo.	Visual
	Identidad por ^1H RMN	Se compara bien con la referencia. Figura 10	^1H RMN
10	Identidad por ^{13}C RMN	Se compara bien con la referencia. Figura 11	^{13}C RMN
	Identidad por MS	Se compara bien con la referencia. Figura 12	MS
	Identidad por FT-IR	Se compara bien con la referencia. Figura 13	FT-IR
15	Pérdida por secado	NMT 2% p/p	Farmacopea Europea 2.2.32
	Residuo de ignición	NMT 0.5% p/p	Farmacopea US <281>
	Pureza química	NLT 97% de área	HPLC
	Impurezas relacionadas con el fármaco	Ninguna impureza única NMT 1.0% de área	HPLC
	Ensayo (en base seca)	95-103% en peso	HPLC
20	Contenido de solvente residual	Metanol NMT 3000 ppm Etanol NMT 5000 ppm THF NMT 720 ppm Tolueno NMT 890 ppm	HRGC
	Contenido de ácido fosfórico	NMT 1% p/p	^{31}P RMN

5

Análisis elemental 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	Farmacopea US <233>
Polimorfismo	Se ajusta a la referencia Figura 7a	XRPD
Punto de fusión	Resultado del informe Figura 8a	DSC

10 Abreviaturas usadas en la tabla: NMT = *not more than* (no más de), NLT = *not less than* (no menos de).

La metodología utilizada para verificar la pureza se provee en la descripción detallada.

De hecho, los criterios 6-13 son ampliamente excedidos en la práctica, como se indica en la Tabla 10 que sigue:

15

Tabla 10

20

Atributo de calidad	Criterios de aceptación	Típicamente	Método de prueba
1. Pérdida por secado		Típicamente menos del 1% p/p	Farmacopea Europea 2.2.32
2. Residuo de ignición		Típicamente menos del 0.2% p/p	Farmacopea US <281>
3. Pureza química		Típicamente NLT 99%	HPLC
4. Impureza relacionada con el fármaco	Ninguna impureza única NMT 1.0%	RRT 1.49: 0.06% RRT 1.69 (Psilocina): 0.39% RRT 1.70: 0.05% Otros LT 0.05%: 0.22%	HPLC

5	5. Ensayo (en base seca)	95 - 103	98.65%	HPLC
	6. Contenido de solvente residual	Metanol NMT 3000 ppm Etanol NMT 5000 ppm THF NMT 720 ppm Tolueno NMT 890 ppm	NMT 5 ppm NMT 10 ppm NMT 5 ppm NMT 5 ppm	HRGC
	7. Contenido de ácido fosfórico	NMT 1% p/p	0.2% Ausencia de ácido fosfórico (H ₃ PO ₄) que aparece a aprox. 0 ppm	³¹ P RMN
10	8. Análisis elemental 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	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 5 ppm	Farmacopea US <233>
15				

Abreviaturas usadas en la tabla: NMT = *not more than* (no más de), LT = *less than* (menos de).

Por lo tanto, la psilocibina cristalina, en forma de Polimorfo A o Polimorfo A', tiene espectros que se ajustan a la RMN de Protón (¹H) y Carbono (¹³C) RMN, Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), y

Espectrometría de masas (MS) - Figuras 10-13.

También cumple con cualquiera de los criterios especificados en la Tabla 9 o la Tabla 10.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente
5 invención, se provee un lote de psilocibina cristalina en forma de Polimorfo A o Polimorfo A', de acuerdo con el primera aspecto de la presente invención. En una forma de realización, se provee un lote de psilocibina cristalina, en forma de Polimorfo A o Polimorfo A', que comprende al menos 10 g; más
10 preferentemente, al menos 100 g; y, con mayor preferencia, al menos 250 g. En una forma de realización, se provee un lote de psilocibina cristalina, en forma de Polimorfo A o Polimorfo A', que comprende al menos 10 g; más preferentemente, al menos 100 g; y, con mayor preferencia, al menos 250 g. En una forma
15 de realización, se provee un lote de psilocibina de alta pureza que comprende al menos 10 g; más preferentemente, al menos 100 g; y, con mayor preferencia, al menos 250 g. En una forma de realización, se provee un lote de Polimorfo A de psilocibina de alta pureza que comprende al menos 10 g; más
20 preferentemente, al menos 100 g; y, con mayor preferencia, al menos 250 g. En una forma de realización, se provee un lote de Polimorfo A' de psilocibina de alta pureza que comprende al menos 10 g; más preferentemente, al menos 100 g; y, con mayor preferencia, al menos 250 g.

En forma alternativa, e independientemente, la psilocibina cristalina puede tomar la forma de Hidrato A o Polimorfo B.

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención,
5 se provee una formulación farmacéutica que comprende psilocibina cristalina y uno o más excipientes.

En una forma de realización, se provee una formulación farmacéutica que comprende psilocibina de alta pureza y uno o más excipientes. En otra forma de realización, se provee una
10 formulación farmacéutica que comprende el Polimorfo A de psilocibina cristalina y uno o más excipientes. En otra forma de realización, se provee una formulación farmacéutica que comprende el Polimorfo A' de psilocibina cristalina y uno o más excipientes. En otra forma de realización, se provee una
15 formulación farmacéutica que comprende el Polimorfo A o Polimorfo A' de psilocibina cristalina de alta pureza y uno o más excipientes. En otra forma de realización, se provee una formulación farmacéutica que comprende el Polimorfo A de psilocibina cristalina de alta pureza y uno o más excipientes.
20 En otra forma de realización, se provee una formulación farmacéutica que comprende el Polimorfo A' de psilocibina cristalina de alta pureza y uno o más excipientes.

En forma alternativa, e independientemente, la psilocibina cristalina en la formulación puede tomar la forma

de Hidrato A o Polimorfo B.

Los excipientes farmacéuticos preferidos para una formulación oral incluyen: diluyentes, tales como celulosa microcristalina, almidón, manitol, fosfato de hidrógeno de calcio anhidro o co-mezclas de dióxido de silicio, carbonato de calcio, celulosa microcristalina y talco; desintegrantes, tales como almidón glicolato de sodio o croscarmelosa sódica; aglutinantes, tales como povidona, copovidona o hidroxipropilcelulosa; lubricantes, tales como estearato de magnesio o estearil fumarato de sodio; deslizantes, tales como dióxido de silicio coloidal; y capas de película, tales como Opadry II blanco u Opadry II marrón a base de PVA.

La psilocibina es un activo difícil de formular por numerosas razones. En primer lugar, tiene características de flujo deficientes y, en segundo lugar, se usa en dosis relativamente bajas, por lo que la combinación hace que sea difícil garantizar la uniformidad del contenido en la formación de comprimidos.

Una buena combinación tendrá un valor de aceptación (AV, *Acceptance Value*) de menos de 15 y más preferentemente menos de 10.

También tendrá un% según el prospecto superior al 90%, más preferentemente superior al 94%.

Entre ellos, estos parámetros indican una dosificación

consistente de la psilocibina entre comprimidos.

Para la mayoría de los comprimidos farmacéuticos, es posible usar excipientes estándares, particularmente rellenos. Sin embargo, en el transcurso de formular los comprimidos de psilocibina, el Solicitante descubrió que para lograr un

5 producto satisfactorio, se prefería un relleno no estándar.

Al respecto, se seleccionó un relleno funcional. El relleno funcional era un relleno silicificado; preferentemente, una celulosa microcristalina silicificada.

10 Las formas preferidas comprenden grados de alta compactabilidad con un rango de tamaño de partícula de aproximadamente 45 a 150 micrómetros.

De hecho, se puede usar una mezcla de dos rellenos funcionales que tienen diferentes rangos de tamaño de

15 partícula, en donde los porcentajes en peso de los dos rellenos favorecen las partículas de mayor tamaño.

En una forma de realización, la microcristalina silicificada como relleno puede comprender un primer relleno, que tiene un rango de tamaño de partícula de aproximadamente

20 45 a 80 micrómetros en una cantidad de hasta 30%, más preferentemente hasta 20%, más preferentemente aún hasta 15% o menos, y un segundo relleno, que tiene un rango de tamaño de partícula de aproximadamente 90 a 150 micrómetros, en una cantidad de hasta 70%, más preferentemente hasta 80, y más

preferentemente aún hasta 85% o más, en peso.

La formulación además puede comprender o consistir en un desintegrante, preferentemente almidón glicolato de sodio, un deslizante, preferentemente dióxido de silicio coloidal, y un
5 lubricante, preferentemente estearil fumarato de sodio.

Detalles adicionales del desarrollo de la formulación se brindan en el Ejemplo 12.

Cabe destacar que las formulaciones pueden comprender psilocibina en cualquier forma, no solamente las formas
10 polimórficas preferidas divulgadas.

Studerus et al (2011) *J Psychopharmacol* 25 (11) 1434-1452 clasificaron las dosis orales de psilocibina de la siguiente manera: Dosis muy bajas a 0.045 mg/kg; dosis bajas entre 0.115-0.125 mg/kg, dosis intermedias entre 0.115-0.260 mg/kg y dosis
15 altas a 0.315 mg/kg.

La psilocibina típicamente estaría presente en una dosis formulada en una cantidad de 0.01 mg/kg a 1 mg/kg. Una dosis típica para humanos (para un adulto que pesa 60-80 kg) equivaldría a una dosis de entre 0.60 mg y 80 mg. En una forma
20 de realización, entre 2 y 50 mg de psilocibina cristalina, más preferentemente, Polimorfo A o Polimorfo A', está presente en una dosis formulada, tal como entre 2 y 40 mg, tal como entre 2 y 10 mg, tal como 5 mg, tal como entre 5 y 30 mg, tal como entre 5 y 15 mg, tal como 10 mg, tal como entre 20 y 30 mg, o

tal como 25 mg. En una forma de realización, entre 2 y 50 mg de psilocibina cristalina, particularmente el Polimorfo A, está presente en una dosis formulada, tal como entre 2 y 40 mg, tal como entre 2 y 10 mg, tal como 5 mg, tal como entre 5 y 30 mg, 5 tal como entre 5 y 15 mg, tal como 10 mg, tal como entre 20 y 30 mg, o tal como 25 mg. En una forma de realización, entre 2 y 50 mg de psilocibina cristalina, particularmente el Polimorfo A' está presente en una dosis formulada, tal como entre 2 y 40 mg, tal como entre 2 y 10 mg, tal como 5 mg, tal como entre 5 10 y 30 mg, tal como entre 5 y 15 mg, tal como 10 mg, tal como entre 20 y 30 mg, o tal como 25 mg.

Es probable que las dosis orales para adultos favorables estén en el rango de 1 mg a 40 mg, preferentemente de 2 a 30 mg, más preferentemente de 15 a 30 mg, por ejemplo 5 mg, 10 mg 15 o 25 mg. La micro-dosificación, típicamente a aproximadamente una décima parte de estas dosis, también es posible con formulaciones en micro-dosis que generalmente se encuentran dentro del rango de 0.05 mg a 2.5 mg.

Una formulación farmacéutica preferida es una forma 20 farmacéutica oral.

La forma farmacéutica oral puede ser un comprimido o una cápsula.

Para un comprimido, es necesario poder dispersar el activo en forma precisa. Esto es un desafío debido a las bajas dosis

y la naturaleza higroscópica y pegajosa del activo que limita su fluidez.

La psilocibina estará presente junto con uno o más excipientes. Los excipientes preferidos incluyen celulosa microcristalina y almidón; con mayor particularidad, una
5 celulosa microcristalina silicificada.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, se provee la psilocibina cristalina en forma de Polimorfo A o Polimorfo A', de acuerdo con el primer aspecto de la presente
10 invención, para uso en medicina. En una forma de realización, se provee el Polimorfo A de psilocibina cristalina para uso en medicina. En una forma de realización, se provee el Polimorfo A' de psilocibina cristalina para uso en medicina. En una forma de realización, se provee un Polimorfo A de psilocibina
15 cristalina de alta pureza para uso en medicina. En una forma de realización, se provee un Polimorfo A' de psilocibina cristalina de alta pureza para uso en medicina.

En forma alternativa, e independientemente, la psilocibina cristalina puede tomar la forma de Hidrato A o
20 Polimorfo B.

De acuerdo con un quinto aspecto de la presente invención, se provee psilocibina cristalina en forma de Polimorfo A o Polimorfo A' del primer aspecto de la presente invención para uso en el tratamiento de trastornos del sistema nervioso

central.

En forma alternativa, e independientemente, la psilocibina cristalina puede tomar la forma de Hidrato A o Polimorfo B.

- 5** En una forma de realización, se provee psilocibina cristalina, en forma de Polimorfo A o Polimorfo A', para uso en el tratamiento de la depresión. En una forma de realización, se provee psilocibina cristalina, en forma de Polimorfo A o Polimorfo A', para uso en el tratamiento de la depresión
- 10** resistente a los fármacos. En una forma de realización, se provee el Polimorfo A de psilocibina cristalina para uso en el tratamiento de la depresión resistente a los fármacos. En una forma de realización, se provee el Polimorfo A' de psilocibina cristalina para uso en el tratamiento de la depresión
- 15** resistente a los fármacos. En una forma de realización, se provee el Polimorfo A de psilocibina cristalina de alta pureza para uso en el tratamiento de la depresión resistente a los fármacos. En una forma de realización, se provee el Polimorfo A' de psilocibina cristalina de alta pureza para uso en el
- 20** tratamiento de la depresión resistente a los fármacos.

Otras afecciones que pueden tratarse incluyen: trastornos de ansiedad, incluida la ansiedad en la enfermedad en etapa avanzada, por ejemplo, cáncer, así como trastorno de ansiedad generalizada, depresión que incluye trastorno depresivo mayor,

cefalea en racimos, trastorno obsesivo compulsivo, trastornos de personalidad que incluyen trastorno de la conducta, trastornos por abuso de sustancias que incluyen: dependencia del alcohol, dependencia de la nicotina, dependencia de opioides, dependencia de la cocaína y otras adicciones, incluyendo ludopatía, trastorno alimenticio y trastorno dismórfico corporal. Otra afección más a tratar es el dolor.

De acuerdo con un sexto aspecto de la presente invención, se provee un método para tratar trastornos del sistema nervioso central, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una dosis efectiva de psilocibina cristalina en forma de Polimorfo A o Polimorfo A', de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

En una forma de realización, se provee un método para tratar la depresión, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una dosis efectiva de psilocibina cristalina en forma de Polimorfo A o Polimorfo A'. En una forma de realización, se provee un método para tratar la depresión resistente a los fármacos, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una dosis efectiva de psilocibina cristalina en forma de Polimorfo A o Polimorfo A'. En una forma de realización, se provee un método para tratar la depresión resistente a los fármacos, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una dosis efectiva de psilocibina

cristalina en forma de Polimorfo A. En una forma de realización, se provee un método para tratar la depresión resistente a los fármacos, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una dosis efectiva de psilocibina

5 cristalina en forma de Polimorfo A'. En una forma de realización, se provee un método para tratar la depresión resistente a los fármacos, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una dosis efectiva de psilocibina cristalina de alta pureza en forma de Polimorfo A. En una

10 forma de realización, se provee un método para tratar la depresión resistente a los fármacos, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una dosis efectiva de psilocibina cristalina de alta pureza en forma de Polimorfo A'.

En forma alternativa, e independientemente, la

15 psilocibina cristalina puede tomar la forma de Hidrato A o Polimorfo B.

Para producir la psilocibina de la invención, la psilocibina se cristalizó a partir de agua de manera controlada.

20 De acuerdo con un séptimo aspecto de la presente invención, se provee un método para la fabricación a gran escala de psilocibina, caracterizado porque el método comprende someter la psilocibina a un paso de cristalización de agua, con secado controlado, para producir el polimorfo A de

psilocibina cristalina según el primer aspecto de la presente invención.

En una forma de realización, se provee un método para la fabricación a gran escala de psilocibina, caracterizado porque
5 el método comprende someter la psilocibina a un paso de cristalización de agua, con secado controlado, para producir el polimorfo A de psilocibina cristalina con un difractograma de XRPD como se ilustra en la Figura 7a y un termográfico de DSC y TGA como se ilustra en la Figura 8a. En una forma de
10 realización, se provee un método para la fabricación a gran escala de psilocibina, caracterizado porque el método comprende someter la psilocibina a un paso de cristalización de agua, con secado controlado, para producir el polimorfo A de psilocibina cristalina de alta pureza con un difractograma de
15 XRPD como se ilustra en la Figura 7a y un termográfico de DSC como se ilustra en la Figura 8a.

Preferentemente, el Polimorfo A es una variante isoestructural con un difractograma de XRPD como se ilustra en la Figura 7a, y un termográfico de DSC como se ilustra en la
20 Figura 8a.

Más preferentemente, la psilocibina se recrystaliza típicamente en aproximadamente 10-20 volúmenes de agua, se calienta con agitación a una temperatura de al menos 70 °C, se filtra con pulido, se siembra a una temperatura de

aproximadamente 70 °C con un corte adecuado (típicamente, por debajo de 5 µm), y se enfría de manera controlada a aproximadamente 5 °C en un período de más de 2 horas.

Más preferentemente, el método comprende enfriamiento controlado, que baja la temperatura en aproximadamente 5 °C - 15 °C por hora; más preferentemente, aproximadamente 10 °C por hora.

Preferentemente, el paso de filtro con pulido se realiza a través de un filtro de tamaño apropiado tal como un filtro en línea de 1.2 µm.

Preferentemente, la agitación se realiza sacudiendo a aproximadamente 400-500 rpm, típicamente aproximadamente 450 rpm.

Preferentemente, la semilla es el Hidrato A de psilocibina. En una forma de realización, se agrega 0.1% en peso o menos de semilla al proceso.

Preferentemente, la psilocibina cristalina se aísla por filtración al vacío.

En una forma de realización, los cristales aislados se secan *in vacuo* a una temperatura de al menos 30 °C, tal como entre 30 y 50 °C, o tal como entre 40 y 50 °C. En una forma de realización, los cristales aislados se secan *in vacuo* durante al menos 10 horas, tal como entre 12 y 18 horas, o tal como aproximadamente 30 horas. En una forma de realización, los

cristales aislados se secan *in vacuo* a una temperatura de al menos 30 °C, tal como entre 30 y 50 °C, o tal como entre 40 y 50 °C durante al menos 10 horas, tal como entre 12 y 18 horas, o tal como aproximadamente 30 horas. En una forma de
5 realización, los cristales aislados se secan hasta que los cristales aislados pierden menos del 2% en peso en una prueba de pérdida por secado, tal como menos del 0.5% en peso.

Preferentemente, los cristales aislados se lavan, varias veces, en agua, y se secan *in vacuo* a aproximadamente 50 °C
10 durante al menos 12 horas.

Los cristales obtenidos son típicamente relativamente grandes (en un rango de 50 a 200 micrómetros) y uniformes cuando se observan bajo el microscopio x 10, como se ilustra en la Figura 16a.

15 Esto difiere de los cristales obtenidos sin enfriamiento controlado que son mucho más pequeños en tamaño (típicamente de 5 a 50 micrómetros) cuando se observan bajo el microscopio x 10, como se ilustra en la Figura 16b.

De acuerdo con un octavo aspecto de la presente invención,
20 se provee psilocibina de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención obtenida a través del método de cristalización de la invención.

De acuerdo con un noveno aspecto de la presente invención, se provee una formulación farmacéutica que comprende

psilocibina de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, obtenida a través del método de cristalización de la invención.

La psilocibina fabricada antes de la cristalización puede producirse utilizando cualquier método: sintético o biológico, por ejemplo, por fermentación u obtenerse por extracción de hongos.

Los métodos de fabricación preferidos usan psilocina, o 4 hidroxindol, como material de partida.

De acuerdo con un décimo aspecto de la presente invención, se provee un método para la fabricación a gran escala de psilocibina a partir de psilocina, que comprende los pasos de:

Etapa 4 - Hacer reaccionar psilocina con tetrabencilpirofosfato para formar bencil 3-[2-(bencildimetilazanioil)etil]-1H-indol-4-il fosfato; y

Etapa 5 - Hacer reaccionar el bencil 3-[2-(bencildimetilazanioil)etil]-1H-indol-4-il fosfato con hidrógeno para formar psilocibina.

De acuerdo con un undécimo aspecto de la presente invención, se provee un método para la fabricación a gran escala de psilocibina a partir de 4-hidroxindol, que comprende los pasos de:

Etapa 1 - Hacer reaccionar 4-hidroxindol con anhídrido acético para formar 1H-indol-4-il acetato;

Etapa 2 - Hacer reaccionar el 1H-indol-4-il acetato con cloruro de oxalilo y dimetilamina para formar 3[(dimetilcarbamoil)carbonil]-1H-indol-4il-acetato;

5 Etapa 3 - Hacer reaccionar 3[(dimetilcarbamoil)carbonil]-1H-indol-4il-acetato con hidruro de aluminio y litio para formar psilocina;

Etapa 4 - Hacer reaccionar psilocina con tetrabencilpirofosfato para formar bencil 3-[2-(bencildimetilazanioil)etil]-1H-indol-4-il fosfato; y

10 Etapa 5 - Hacer reaccionar el bencil 3-[2-(bencildimetilazanioil)etil]-1H-indol-4-il fosfato con hidrógeno para formar psilocibina.

De acuerdo con un duodécimo aspecto de la presente invención, se provee un método para la fabricación a gran
15 escala de psilocibina de acuerdo con el décimo u undécimo aspecto de la presente invención que además comprende:

Etapa 6 - un paso de cristalización de agua, con secado controlado, para producir el Polimorfo A de psilocibina cristalina de acuerdo con el primer aspecto de la presente
20 invención.

En una forma de realización, se provee un método para la fabricación a gran escala de psilocibina de acuerdo con el décimo u undécimo aspecto de la presente invención que además comprende:

Etapa 6 - un paso de cristalización de agua, con secado controlado, para producir psilocibina cristalina - Polimorfo A con un difractograma de XRPD como se ilustra sustancialmente en la Figura 7a y un termográfico de DSC como se ilustra sustancialmente en la Figura 8a.

En una forma de realización, se provee un método para la fabricación a gran escala de psilocibina de acuerdo con el décimo u undécimo aspecto de la presente invención que además comprende:

Etapa 6 - un paso de cristalización de agua, con secado controlado, para producir psilocibina cristalina de alta pureza - Polimorfo A con un difractograma de XRPD como se ilustra en la Figura 7a y un termográfico de DSC como se ilustra en la Figura 8a.

Preferentemente, la psilocibina cristalina es el Polimorfo A.

Al desarrollar una metodología para la producción a gran escala de psilocina o psilocibina, el Solicitante resolvió uno o más problemas significativos en cada una de las Etapas 1 a 5, y aunque estos problemas se consideran en el contexto de la producción a gran escala de psilocina o psilocibina, cada uno de los pasos, o más bien la forma en que se resolvió cada problema, se consideran invenciones separadas e independientes, ya que tienen aplicación en la fabricación de

otros activos, ya sean intermediarios de psilocina, psilocibina u otros derivados, sales, ésteres o similares, que proveen un profármaco.

Preferentemente, la reacción de la Etapa 4 (i) comprende
5 el uso de hexametildisilazida de sodio (NaHMDS).

Esto tiene sus beneficios por sobre el uso de butil litio en que: i) es más fácil de manejar, y ii) no introduce litio en la reacción, lo que causa problemas en el procesamiento posterior.

10 Preferentemente, la reacción usa el solvente THF.

Esto tiene el beneficio de que se obtiene el producto resultante en una pureza significativamente mayor.

Preferentemente en (i) la reacción se inicia por debajo de -50 °C.

15 Esto tiene el beneficio de reducir los niveles de impurezas (m/z 295.2 observados por LCMS) que posteriormente afectarán la pureza en el procesamiento final.

Más preferentemente aún, el paso (ii) de la Etapa 4 usa THF como solvente.

20 Esto tiene el beneficio de garantizar que se evite el espesamiento y facilita un proceso de agitación simple para obtener el producto.

Preferentemente, el paso (ii) de la Etapa 4 comprende un proceso de agitación para obtener bencil 3-[2-

(bencildimetilazanioil) etil]-1H-indol-4-il fosfato.

Un proceso de agitación tiene la ventaja de que el proceso se simplifica, y los rendimientos se mejoran.

Para garantizar que la reacción de la Etapa 4 (ii) proceda hasta completarse, se controlan los niveles del Intermediario 4A y, una vez completa, el bencil 3-[2-(bencildimetilazanioil) etil]-1H-indol-4-il fosfato seco se filtra y se seca en horno.

Esto tiene la ventaja de que las impurezas se minimizan y se obtiene un producto más puro.

Preferentemente, la reacción de la Etapa 5 se controla en cuanto a los niveles de intermediarios por HPLC, usando tiempos de retención relativos (RRT, *Relative Retention Times*) y la compleción es determinada por los intermediarios que están presentes en menos del 0.2%.

El producto crudo de psilocibina (producto de la Etapa 5, (12)) tiene impurezas principales de la etapa 5 cuyos tiempos de retención relativos (RRT) en el método de HPLC son de aproximadamente 1.89 y 2.45 respectivamente, y psilocina (RRT 1.66). Estas impurezas se ilustran en la Tabla 7. Típicamente, el producto crudo de psilocibina (producto de Etapa 5 (12)) tiene 0.24% de área de la impureza de RRT 1.89, 0.03% de área de la impureza de RRT 2.45, y 1.86% de área de psilocina. Además, la impureza de ácido pirofosfórico (RRT 0.31) está presente en el producto crudo de psilocibina, por ejemplo, a

un nivel de aproximadamente 2-6% de área por HPLC.

A este nivel, se pueden llevar a cabo procesos de cristalización posteriores para proveer psilocibina sustancialmente pura, por ejemplo, psilocibina que tiene una

5 pureza de al menos 95% de área por HPLC, tal como al menos 98% de área, o tal como al menos 99% de área. En una forma de realización, la impureza de ácido pirofosfórico (RRT 0.31) está presente en la psilocibina sustancialmente pura a un nivel de menos de 0.3% de área por HPLC, tal como menos de 0.2% de área,

10 o tal como menos de 0.1% de área.

Además, durante esta etapa, se agrega agua a la reacción para mantener la psilocibina en solución.

Preferentemente, el catalizador se recupera por filtración.

15 Preferentemente, en la Etapa 1, la reacción se lleva a cabo en DCM y piridina.

Esto tiene la ventaja de que se evitan los solventes inflamables.

Preferentemente, la mezcla de reacción se lava con ácido

20 cítrico, para arrojar un pH de aproximadamente 2-3, para eliminar el exceso de piridina, y la fase ácida se separa de la fase de DCM.

Esto tiene la ventaja de que el Intermediario 2A puede aislarse, permitiendo la purificación lejos del exceso de

cloruro de oxalilo.

Más preferentemente, la fase de DCM se lava adicionalmente con bicarbonato de sodio a aproximadamente pH 8.

Esto tiene la ventaja de un procesamiento más puro.

- 5** Preferentemente, el 1H-indol-4-il acetato se precipita en heptano.

Esto ayuda a la precipitación y supera los problemas de solubilidad parcial.

- 10** Preferentemente, se usa sulfato de magnesio como agente de secado.

Preferentemente, se usan los solventes ter-butil metil éter (TBME) y tetrahidrofurano (THF).

Preferentemente, la reacción con cloruro de oxalilo se realiza a aproximadamente 30 °C - 40 °C.

- 15** Esto tiene la ventaja de garantizar una alta tasa de reacción que ofrece niveles mejorados de compleción.

Preferentemente, el Intermedio 2A se aísla por filtración.

Esto tiene la ventaja de que el intermediario se purifica lejos del exceso de cloruro de oxalilo.

- 20** Preferentemente, en la Etapa 2, paso i, el Intermediario 2A también se lava para eliminar el exceso de cloruro de oxalilo.

Preferentemente, el Intermediario 2A se lava con TBME.

Preferentemente, a través de una adición de heptano, se

precipita más el Intermediario 2A.

Preferentemente, en la Etapa 2, paso ii, se usa dimetil amina en exceso.

5 Esto tiene la ventaja de que se obtiene un perfil de impurezas y rendimiento mucho mejor.

Preferentemente, el pH se mantiene a un pH de aproximadamente o por encima de 7.

Preferentemente, la reacción se lleva a cabo en TBME.

10 Preferentemente, esta etapa además comprende un paso de purificación que elimina las sales de dimetil amina.

Esto tiene la ventaja de mejorar la pureza.

Preferentemente, esta etapa comprende una suspensión y un paso de filtración.

15 Esto tiene la ventaja de que se mejora la manipulación y la pureza.

Más preferentemente, comprende suspender con agua y/o IPA, filtrar y secar el 3[(dimetilcarbamoil)carbonil]-1H-indol-4il-acetato aislado.

20 Esto tiene la ventaja de que se mejoran la pureza y los rendimientos, y la hidrólisis se reduce.

Preferentemente, en la Etapa 3, la reacción se lleva a cabo en el solvente THF.

Esto tiene la ventaja de que se forma una suspensión/emulsión sin espesarse.

Preferentemente, el 3[(dimetilcarbamoil)carbonil]-1H-indol-4il-acetato se agrega a una solución de LiAlH_4 en THF.

Preferentemente, la reacción se detiene con acetona, seguido de ácido cítrico, asegurando que la mezcla permanezca
5 fuertemente básica (pH 11 o superior).

Esto tiene la ventaja de que se obtienen altos rendimientos.

Preferentemente, la psilocina se filtra y se lava en THF y se suspende en PrOAc:TBME , se filtra, se lava en TBME, y se
10 seca.

Esto tiene la ventaja de que se obtiene un producto de alta pureza, por ejemplo, al menos 95% puro por HPLC, tal como al menos 98% puro por HPLC, o tal como al menos 99% puro por HPLC.

15 El método de producción preferido comprende cada una de las Etapas 1 a 6, pero se apreciará que cada una de las características de cada etapa puede ser independiente o puede usarse en combinación con cualquier otra característica de la misma etapa o de una etapa diferente de la reacción.

20 La psilocibina de una forma determinada, Polimorfo A o Polimorfo A', y la psilocibina de tan alta pureza no han sido obtenidas previamente y, según entienden los Solicitantes, su producción de Polimorfo A y Polimorfo A' particularmente (como se ilustra en las Figuras 7a y 7b y 8a y 8b) es novedosa. De

hecho, la producción de grandes cantidades de lotes de Polimorfo A es nueva. Una consecuencia de la metodología de cristalización de la invención y, en parte, el proceso de fabricación, permiten que se obtenga una pureza química tan

5 alta de la psilocibina cristalina.

Además, dada la naturaleza inestable del compuesto, han obtenido una forma cristalina que ha demostrado ser estable, bajo condiciones aceleradas (descritas más adelante) durante al menos 12 meses.

10 El polimorfo A y A' (Figura 7a y 7b) difiere del Polimorfo B (Figura 7c), un Hidrato A (Figura 7d) y un solvato de etanol (Figura 7e) y una mezcla (Figura 7f (superior)) como será evidente a partir de sus difractogramas de XRPD y termográficos de DSC, tal como se describe a continuación.

15 La relación entre los diferentes polimorfos se muestra en la Figura 9.

De hecho, el tamaño y la forma de los cristales son determinados por la metodología de cristalización, y estos a su vez pueden afectar la estabilidad y la capacidad de formular

20 el producto.

En una forma de realización particularmente preferida, la psilocibina se fabrica a través de un proceso de 6 etapas como se esgrime a continuación:

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se

proporciona un método para la fabricación de psilocibina cristalina de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, caracterizado porque el método comprende someter la psilocibina a un paso de cristalización de agua, con secado controlado, para producir el Polimorfo A o Polimorfo A' de psilocibina cristalina según el primer aspecto de la presente invención. En una forma de realización, se provee un método para la fabricación de psilocibina cristalina de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, caracterizado porque el método comprende un paso de cristalización de agua, con secado controlado, para producir psilocibina cristalina, Polimorfo A o Polimorfo A', con un difractograma de XRPD como se ilustra sustancialmente en la Figura 7a o la Figura 7b y un termográfico de DSC como se ilustra sustancialmente en la Figura 8a o 8b.

En una forma de realización, se provee un método para la fabricación de psilocibina de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, caracterizado porque el método comprende un paso de cristalización de agua, con secado controlado, para producir psilocibina cristalina de alta pureza, Polimorfo A o Polimorfo A', con un difractograma de XRPD como se ilustra en la Figura 7a o la Figura 7b y un termográfico de DSC como se ilustra en la Figura 8a o 8b.

Preferentemente, el Polimorfo A y el Polimorfo A' son variantes isoestructurales con difractogramas de XRPD como se

ilustran sustancialmente en la Figura 7a y la Figura 7b y los termográficos de DSC como se ilustran sustancialmente en las Figuras 8a y 8b.

Más preferentemente, la psilocibina se recrystaliza en
5 aproximadamente 10-20 volúmenes de agua, se calienta con agitación a una temperatura de al menos 70 °C, se filtra con pulido, se siembra a una temperatura de aproximadamente 70 °C con un corte adecuado (típicamente, por debajo de 5 µm), y se enfría de manera controlada a aproximadamente 5 °C en un
10 período de más de 2 horas.

Más preferentemente, el método comprende enfriamiento controlado, que baja la temperatura en aproximadamente 5 °C - 15 °C por hora; más preferentemente, aproximadamente 10 °C por hora.

15 Preferentemente, el paso de filtro con pulido se realiza a través de un filtro de tamaño apropiado tal como un filtro en línea de 1.2 µm o 0.45 µm.

Preferentemente, la agitación se realiza sacudiendo a aproximadamente 400-500 rpm, típicamente aproximadamente 450
20 rpm.

Preferentemente, la semilla es el Hidrato A de psilocibina. En una forma de realización, se agrega 0.1% en peso o menos de semilla al proceso.

Preferentemente, la psilocibina cristalina se aísla por

filtración al vacío.

- En una forma de realización, los cristales aislados se secan *in vacuo* a una temperatura de al menos 30 °C, tal como entre 30 y 50 °C, o tal como entre 40 y 50 °C. En una forma de
- 5 realización, los cristales aislados se secan *in vacuo* durante al menos 10 horas, tal como entre 12 y 18 horas, o tal como aproximadamente 30 horas. En una forma de realización, los cristales aislados se secan *in vacuo* a una temperatura de al menos 30 °C, tal como entre 30 y 50 °C, o tal como entre 40 y
- 10 50 °C durante al menos 10 horas, tal como entre 12 y 18 horas, o tal como aproximadamente 30 horas. En una forma de realización, los cristales aislados se secan hasta que los cristales aislados pierden menos del 2% en peso en una prueba de pérdida por secado, tal como menos del 0.5% en peso.
- 15 Preferentemente, los cristales aislados se lavan, varias veces, en agua, y se secan *in vacuo* a aproximadamente 50 °C durante al menos 12 horas.

- Los cristales obtenidos son típicamente relativamente grandes (en un rango de 50 a 200 micrómetros) y uniformes
- 20 cuando se observan bajo el microscopio x 10, como se ilustra en la Figura 16a.

Esto difiere de los cristales obtenidos sin enfriamiento controlado que son mucho más pequeños en tamaño (típicamente de 5 a 50 micrómetros) cuando se observan bajo el microscopio

x 10, como se ilustra en la Figura 16b.

Etapas 1: Síntesis de 1H-indol-4-il acetato (3)

La reacción central es la reacción de 4-hidroxiindol (1) con anhídrido acético (2) para formar 1H-indol-4-il acetato (3);

5 (Figura 2)

Más preferentemente, la Etapa 1 es como sigue:

Se agregan a gotas 4-hidroxiindol (1), DCM (12) y piridina (13) a un recipiente, y se enfrían a aproximadamente 0-5 °C. Se agrega a gotas anhídrido acético (2), y la mezcla se calienta

10 a aproximadamente 20-25 °C y se agita hasta que se completa por HPLC. Los reactivos se lavan con solución acuosa de ácido cítrico (14) y NaHCO₃ acuoso (15), se secan en presencia de MgSO₄ (16), se filtran y se evaporan hasta aproximadamente la mitad del volumen. Se agrega heptano (17), y la destilación

15 prosigue para eliminar la mayoría del DCM. La mezcla se enfría a aproximadamente 5-25 °C, se filtra, se lava con heptano y se seca en un horno de vacío toda la noche para aislar el 1H-indol-4-il acetato (3) como un sólido adecuado para uso en la siguiente etapa.

20 Etapas 2: Síntesis de 3[(dimetilcarbamoil)carbonil]-1H-indol-4il-acetato (6)

La reacción central es la reacción de 1H-indol-4-il acetato (3) con cloruro de oxalilo (4) y dimetilamina (5) para formar 3[(dimetilcarbamoil)carbonil]-1H-indol-4il-acetato(6);

(Figura 3)

Más preferentemente, la Etapa 2 es como sigue:

El 1H-indol-4-il acetato (3) se disuelve en una mezcla de THF (19) y TBME (18) a temperatura ambiente. Se agregó cloruro de oxalilo (4) a gotas, permitiendo que la reacción alcanzara su punto exotérmico a aproximadamente 35-40 °C. El rango de temperatura se mantiene durante todo lo que resta de la adición. La reacción luego se agita a aproximadamente 40 °C hasta que se completa por HPLC. La reacción se enfría a temperatura ambiente y se agrega heptano (17) dando como resultado la precipitación de sólidos adicionales. La suspensión se agita, luego se deja sedimentar, seguido de la eliminación de la mayoría del solvente (18/19) por decantación. El sólido se lavó en el recipiente dos veces con heptano (17). Se agrega TBME (18) para obtener una suspensión amarilla, y la mezcla se enfría a aproximadamente -20 °C. Se agrega solución de dimetilamina (5) manteniendo la temperatura en un rango de -20 °C a -10 °C. La reacción se calentó luego a temperatura ambiente y se agitó hasta que se completó, agregando dimetilamina adicional de ser necesario. La reacción se filtró, se lavó con heptano (17) y se secó en un horno de vacío. El 3[(dimetilcarbamoil)carbonil]-1H-indol-4il-acetato (6) se purificó adicionalmente mediante una suspensión en agua (20), luego IPA (21) y luego se secó en un horno de vacío para

producir (6) como un sólido adecuado para su uso en la siguiente etapa.

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

5 La reacción central es la reacción de 3[(dimetilcarbamoil)carbonil]-1H-indol-4il-acetato (6) con hidruro de litio y aluminio (7) para formar psilocina (8); (Figura 4)

Más preferentemente, la Etapa 3 es como sigue:

10 El 3[(dimetilcarbamoil)carbonil]-1H-indol-4il-acetato (6) se suspendió en THF (19) y se enfrió a aproximadamente 0 °C. Una solución de THF de LiAlH_4 (7) se agregó a gotas, manteniendo la temperatura a aproximadamente 0-20 °C. La reacción luego se sometió a reflujo hasta completarse por HPLC.

15 La reacción se enfrió a 0 °C y el exceso de LiAlH_4 se inactivó mediante la adición de acetona (22) seguido de una solución acuosa de ácido cítrico (14). El lote se filtró para eliminar las sales de litio y aluminio. El producto filtrado se secó en presencia de MgSO_4 (16), se filtró y se concentró y se cargó

20 en una almohadilla de sílice (23). La almohadilla se eluyó con THF (19) y el producto que contenía fracciones se evaporó. El sólido resultante se suspendió en una mezcla de $i\text{PrOAc}:\text{TBME}$ (24/18), se filtró, y se lavó con TBME. El sólido se secó en el horno para producir psilocina (8) de alta pureza como sólido

blanquecino.

Etapla 4: Síntesis de bencil 3-[2-(bencildimetilazanioil)etil]-1H-indol-4-il fosfato (10)

La reacción central es la reacción de psilocina (8) con
 5 tetrabencilpirofosfato (9) para formar bencil 3-[2-(bencildimetilazanioil)etil]-1H-indol-4-il fosfato (10),
 (Figura 5)

Más preferentemente, la Etapa 4 es como sigue:

Cargar la psilocina (8) en un recipiente seguido de THF
 10 (19). La reacción se enfrió a una temperatura de -50 °C a -70 °C, y se agregó NaHMDS (25) a gotas a aproximadamente una temperatura de -45 °C a -70 °C. La temperatura se ajustó a una temperatura de aproximadamente -45 °C a -60 °C y se agregó tetrabencilpirofosfato en THF. El lote se dejó calentar a 0
 15 °C, después de lo cual los sub-productos sólidos se eliminaron por filtración y el producto filtrado se concentró *in vacuo*. La mezcla concentrada se calentó luego a aproximadamente 40 °C y se agitó hasta convertir el producto intermediario en el producto de la Etapa 4 (10), controlado por monitoreo y el uso
 20 de HPLC. El lote se enfrió a aproximadamente 0-5 °C, y el sólido resultante se aisló por filtración y se secó *in vacuo* para proveer 3-[2-(bencildimetilazanioil)etil]-1H-indol-4-il fosfato (10) como un sólido.

Etapla 5: Síntesis de 3-[2-(dimetilazanioil) etil]-1H-indol-4-

il hidrógeno fosfato de grado intermedio (Producto crudo de psilocibina) (12)

La reacción principal comprende hacer reaccionar el bencil 3-[2-(bencildimetilazanioil)etil]-1H-indol-4-il fosfato (10) con
5 hidrógeno (11) para formar psilocibina (12), (Figura 6).

Más preferentemente, la Etapa 5 es como sigue:

En un recipiente se cargó Pd/C (26), metanol (24) y 3-[2-(bencildimetilazanioil)etil]-1H-indol-4-il fosfato (10) y la
mezcla resultante se burbujeó con hidrógeno (11) hasta
10 completarse por HPLC. Se agrega agua purificada (20) durante
este proceso para retener el producto en solución. La mezcla
se calentó a aproximadamente 35 °C - 45 °C y luego se filtró a
través de un lecho de Celite (27) lavando con metanol (24) y
agua purificada (20). El producto filtrado se evaporó *in vacuo*,
15 haciendo un azeótropo con etanol (28) para obtener psilocibina
de grado intermedio (12).

Etapa 6: Síntesis de 3-[2-(dimetilazanioil) etil]-1H-indol-4-il hidrógeno fosfato (Psilocibina)

El paso central de purificación/determinación del polimorfo es
20 un paso de cristalización de agua, seguido de un paso de
enfriamiento y secado controlado, para producir psilocibina
cristalina de alta pureza, Polimorfo A o Polimorfo A'.

Más preferentemente, la Etapa 6 es como sigue:

La psilocibina de grado intermedio (12) (etapa 5) se cargó

en un recipiente con agua purificada (20) y la mezcla se calentó hasta que la psilocibina (12) se disolvió. La solución a granel resultante luego se filtró con pulido en un recipiente precalentado. La temperatura se ajustó, preferentemente, a

5 aproximadamente 68 °C - 70 °C, y se agregó una semilla de hidrato de psilocibina (es decir, Hidrato A) a la reacción. Luego, el lote se enfrió de manera controlada a aproximadamente 0-10 °C y se agitó, y los sólidos se recogieron por filtración y se lavaron con agua purificada. Los sólidos aislados se

10 secaron luego *in vacuo* para producir psilocibina cristalina de alta pureza, Polimorfo A o A', como un sólido blanquecino.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las formas de realización de la invención se describen adicionalmente a continuación con referencia a los dibujos

15 adjuntos, en los cuales:

La Figura 1 es un esquema de la reacción enseñada en JNP.

La Figura 2 es un esquema de la reacción de la Etapa 1 de un aspecto de la presente invención.

La Figura 3 es un esquema de la reacción de la Etapa 2 de

20 un aspecto de la presente invención.

La Figura 4 es un esquema de la reacción de la Etapa 3 de un aspecto de la presente invención.

La Figura 5 es un esquema de la reacción de la Etapa 4 de un aspecto de la presente invención.

La Figura 6 es un esquema de la reacción de la Etapa 5 de un aspecto de la presente invención.

La Figura 7a es un difractograma de XRPD del Polimorfo A (GM764B).

5 La Figura 7b es un difractograma de XRPD del Polimorfo A' (JCCA2160F).

La Figura 7c es un difractograma de XRPD del Polimorfo B (JCCA2160-F-TM2).

10 La Figura 7d es un difractograma de XRPD de un Hidrato A (JCCA2157E).

La Figura 7e es un difractograma de XRPD de un solvato de etanol (JCCA2158D).

La Figura 7f es un difractograma de XRPD del producto obtenido durante el desarrollo del proceso (CB646-E) (arriba),
15 en comparación con los difractogramas del Polimorfo A' (JCCA2160F) (medio) y Polimorfo B (JCCA2160-TM2) (abajo).

La Figura 8a es un termográfico de DSC y TGA del Polimorfo A (GM764B).

20 La Figura 8b es un termográfico de DSC y TGA del Polimorfo A' (JCCA2160F).

La Figura 8c es un termográfico de DSC del Polimorfo B (GM748A).

La Figura 8d es un termográfico de DSC y TGA del Hidrato A (JCCA2157E).

La Figura 8e es un termográfico de DSC y TGA del solvato de etanol (JCCA2158D).

La Figura 9 es un diagrama de fase de forma que muestra la interrelación de formas en sistemas basados en agua.

5 La Figura 10 es un espectro de ^1H RMN de psilocibina; (Leer junto con la asignación del Ejemplo 7).

La Figura 11 es un espectro de ^{13}C RMN de psilocibina; (Leer junto con la asignación del Ejemplo 7).

La Figura 12 es un espectro de FT-IR de psilocibina.

10 La Figura 13 es un espectro de masas de psilocibina.

La Figura 14 es una fórmula estructural enumerada de psilocibina.

La Figura 15 es una curva de solubilidad de temperatura para psilocibina en agua.

15 La Figura 16a es una micrografía que muestra cristales obtenidos por enfriamiento controlado.

La Figura 16b es una micrografía que muestra cristales obtenidos por secado por enfriamiento no controlado.

20 La Figura 17 es un diagrama de fase de forma que muestra la interrelación de formas en diferentes sistemas de solventes.

La Figura 18 es un difractograma de XRPD - Patrón C para sólidos aislados a una temperatura de 25 y 50 °C.

La Figura 19 muestra difractogramas de XRPD - Patrones D, E y F para sólidos aislados a una temperatura de 25 y 50 °C.

La Figura 20 es una comparación de los difractogramas de XRPD adquiridos para los sólidos aislados a partir del equilibrado de la psilocibina amorfa en los solventes A a H.

5 La Figura 21 es una comparación de los difractogramas de XRPD adquiridos para los sólidos aislados a partir del equilibrado de la psilocibina amorfa en los solventes I a P.

La Figura 22 es una comparación de los difractogramas de XRPD adquiridos para los sólidos aislados a partir del equilibrado de la psilocibina amorfa en los solventes R a Y.

10 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

A diferencia del arte previo, la presente invención buscaba producir psilocibina a gran escala comercial, en cantidades o lotes de al menos 100 g, y más preferentemente al menos 250 g, niveles 1 log o 2 logs superiores a los niveles descritos en
15 JNP, que describe un método de "gran" escala para producir cantidades en gramos a una escala de 10 g.

Para demostrar los muchos pasos de desarrollo significativos de JNP, la descripción que sigue establece detalles de experimentos e investigaciones llevadas a cabo en
20 cada una de las etapas del proceso, que ilustran las selecciones realizadas para superar los numerosos problemas técnicos enfrentados, en la producción de psilocibina (7) a GMP en gran escala (incluidos los diversos intermediarios (2-6)) comenzando por 4-hidroxiindol (1).

La referencia a un valor numérico particular incluye al menos ese valor particular, a menos que el contexto claramente indique lo contrario. Cuando se expresa un rango de valores, otra forma de realización incluye desde un valor particular
5 y/o hasta el otro valor particular. Además, la referencia a los valores establecidos en los rangos incluye todos y cada uno de los valores dentro de ese rango. Todos los rangos son inclusivos y combinables.

Cuando los valores se expresan como aproximaciones,
10 mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor particular crea otra forma de realización.

Tal como se usa en la presente, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen sus referentes en plural.

El término "aproximadamente", cuando se usa con referencia
15 a rangos numéricos, límites o valores específicos, se emplea para indicar que los valores mencionados pueden variar hasta en un 10% del valor enunciado. Como muchos de los valores numéricos utilizados en la presente se determinan experimentalmente, los expertos en la materia deberían entender
20 que tales determinaciones pueden variar, y muchas veces variarán, entre diferentes experimentos. Los valores utilizados en la presente no deben considerarse indebidamente limitativos en virtud de esta variación inherente. Por lo tanto, el término "aproximadamente" se utiliza para abarcar

variaciones de $\pm 10\%$ o menos, variaciones de $\pm 5\%$ o menos, variaciones de $\pm 1\%$ o menos, variaciones de $\pm 0.5\%$ o menos, o variaciones de $\pm 0.1\%$ o menos del valor especificado.

Como se usa en este documento, "tratar" y términos
 5 similares se refieren a reducir la gravedad y/o frecuencia de los síntomas, eliminar los síntomas y/o la causa subyacente de dichos síntomas, reducir la frecuencia o probabilidad de síntomas y/o su causa subyacente, retrasar, prevenir y/o
 10 ralentizar la progresión de enfermedades y/o trastornos, y mejorar o remediar el daño causado, directa o indirectamente, por las enfermedades y/o trastornos.

Las siguientes abreviaturas se han utilizado en la presente:

DSC (*Differential Scanning Calorimetry*): Calorimetría
 15 diferencial de barrido

RT (*Room Temperature*): Temperatura ambiente

TBME (*Methyl Tert-Butyl Ether*): metil ter-butil éter

TGA (*Thermogravimetric Analysis*): Análisis
 termogravimétrico

20 THF (*tetrahydrofuran*): tetrahidrofurano

wrt (*with respect to*): con respecto a

XRPD (*X-Ray Powder Diffraction*): difracción de rayos X en
 muestras de polvo

Ejemplo 1

Etapas 6- Proceso de Cristalización y Polimorfos Resultantes

Experimentación para Producir la Forma A':

Se cargaron 1.0 g de psilocibina cruda en un matraz de 25 mL. Se agregó agua (12.8 mL/16 volúmenes en función de la actividad del material de entrada). La mezcla se agitó y se calentó a 80 °C. Se obtuvo una solución de color marrón oscuro con sólidos visibles no disueltos. La mezcla se filtró con pulido a través de un filtro calentado de 0.45 µm en un matraz caliente de 25 mL. Los sólidos no disueltos se extrajeron para obtener una solución de color marrón oscuro. La solución se volvió a equilibrar a 75 °C y luego se enfrió lentamente (10 °C/hora) a temperatura ambiente. La solución de color marrón pálido resultante se equilibró a temperatura ambiente durante 16 horas. La suspensión se enfrió a 5 °C antes del aislamiento del sólido por filtración al vacío. La torta del filtro se lavó con agua (0.8 mL/1 volumen) y se secó *in vacuo* a 50 °C durante 16 horas. Rendimiento del 75%, pureza química del 99%, ensayo de RMN >98%.

El procedimiento anterior se repitió con 14 volúmenes (11.2 mL) de agua. Rendimiento del 69%, pureza química del 99%, ensayo de RMN >98%.

En ambos casos, la disolución de la psilocibina cruda se logró a aprox. 75 °C. En enfriamiento gradual, se observó precipitación a aprox. 60 °C.

En ambos casos, se produjo el Polimorfo A' de psilocibina, confirmado por XRPD (difractograma consistente con la Figura 7b) y DSC (termograma consistente con la Figura 8b).

Experimentación para Producir la Forma A:

- 5 Se sometieron 94 g de la psilocibina cruda obtenida del proceso de la Etapa 5 (aproximadamente 93% de pureza por HPLC con aproximadamente 4% de impureza de pirofosfato) a una re-cristalización acuosa como se establece a continuación:

- 10 El protocolo usó suficiente agua (12 volúmenes), una tasa de agitación rápida (450 rpm) y un perfil de enfriamiento controlado (10 °C/hr).

- La psilocibina (94.0 g) (CB650E) se cargó en un matraz de 2 L. Se agregó agua (902 ml, 12 volúmenes basados en la actividad del material de entrada). La mezcla se agitó y se
- 15 calentó a aproximadamente 78 °C. Se obtuvo una solución de color marrón oscuro con sólidos visibles no disueltos. La mezcla se filtró con pulido a través de un filtro en línea de 1.2 µm en un matraz caliente de 5 L equipado con un agitador superior (450 rpm). Los sólidos no disueltos se extrajeron para
- 20 obtener una solución de color marrón oscuro clarificada. La solución se volvió a equilibrar a aproximadamente 75 °C durante 15 minutos y luego se enfrió lentamente (10 °C/hora) a temperatura ambiente. La solución se sembró con Hidrato A de psilocibina (difractograma GM758A-XRPD consistente con la

Figura 7d) después de la maduración en agua) a 68 °C - 70 °C. La suspensión resultante de color marrón pálido se equilibró a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 horas. La suspensión se enfrió a 5 °C durante una hora antes del
5 aislamiento del sólido por filtración al vacío. La torta del filtro se lavó con agua (282 mL, 3 volúmenes) y se secó *in vacuo* a aproximadamente 50 °C durante 30 horas.

El proceso se completó de manera exitosa con un rendimiento del 75% logrado. La pureza química del sólido se
10 confirmó como 99.3%. El análisis del sólido por XRPD después del secado durante 30 horas mostró el Polimorfo A (Figura 7a). Se observó una perturbación característica en $\sim 17^\circ 2\theta$, tal como $17.5^\circ 2\theta$, y fue pronunciada en el material a granel.

Caracterización de Estado Sólido de Polimorfo y Polimorfo A'

15 Los termogramas de DSC y TGA (Figura 8a) obtenidos para el Polimorfo A fueron comparables a los termogramas de DSC y TGA obtenidos para el Polimorfo A' (Figura 8b). Los termogramas de TGA (Figura 8a) obtenidos para el Polimorfo A y el Polimorfo A' no muestran pérdida de peso antes de la descomposición. Esto
20 sugirió que la diferencia entre los XRPD obtenidos para el Polimorfo A (Figura 7a; perturbación presente a aproximadamente $\sim 17^\circ 2\theta$) y para el Polimorfo A' que se obtuvo a pequeña escala (Figura 7b; perturbación no presente) no se debió a un exceso de hidratación.

La microscopía del sólido (Figura 16a) muestra cristales en forma de varilla con buena uniformidad con un rango de tamaño de entre 50 y 200 micrómetros.

El difractograma de XRPD obtenido para el Polimorfo A' no demuestra una perturbación a aprox. $\sim 17^\circ 2\theta$ en la misma medida que el Polimorfo A. La perturbación en el difractograma de XRPD a aprox. $\sim 17^\circ 2\theta$ es más pronunciado para la psilocibina producida a gran escala (en comparación con la obtenida a pequeña escala) y fue inesperada. El Solicitante ha demostrado que el Hidrato A es la única forma polimórfica que existe en un rango de temperaturas sin pico de difracción en la región $17^\circ 2\theta$ (ver Figura 7d). Esto enfáticamente sugiere un colapso del Hidrato A tras la deshidratación para producir el Polimorfo A o A' que varía con la escala y que el Polimorfo A es la verdadera forma con el Polimorfo A' formado a pequeña escala siendo atípico.

Para evaluar la solidez de esta teoría y demostrar un retorno al Polimorfo A, se volvió a secar una pequeña porción del material a granel después de otro remojo en agua (para reproducir el Hidrato A). Una pequeña muestra (250 mg - psilocibina Polimorfo A) se equilibró en agua (10 volúmenes) durante una hora. La suspensión se filtró, y el análisis del sólido húmedo confirmó que se había generado el Hidrato A (Figura 7d), sin perturbación a $17^\circ 2\theta$. El material se

secó *in vacuo* durante 16 horas, y el sólido se volvió a evaluar mediante XRPD. El material del Polimorfo A' fue confirmado por XRPD (Figura 7b) notando una reducción en la perturbación de XRPD. El secado adicional del sólido a granel original y el

5 envejecimiento a temperatura ambiente no cambiaron el difractograma de XRPD del sólido. Las dos versiones sólidas obtenidas, los difractogramas de XRPD para el Polimorfo A y el Polimorfo A' son prácticamente idénticos, aparte del pico $\sim 17.5^\circ$ 2 theta. Las propiedades térmicas también son idénticas.

10 La distinción entre los difractogramas de XRPD para el Polimorfo A versus el Polimorfo A' es sutil y ambos polimorfos se convierten cinéticamente al estado hidratado con gran rapidez.

Se realizaron experimentos adicionales para determinar si

15 las diferencias en los difractogramas de XRPD para el Polimorfo A y el Polimorfo A' se debían al proceso de cristalización a mayor escala que formaba sólidos de un tamaño de partícula más grande que posteriormente no se secaron tan efectivamente y causaron el cambio, o si la diferencia entre el hábito y el

20 tamaño del sólido cristalino fue la causa. El Polimorfo A de psilocibina (forma polimórfica confirmada antes del experimento) se molió mediante un mortero y una mano de mortero, y se evaluó mediante XRPD. No se observó ningún cambio en el polimorfo. Otra porción (51 mg) se cargó con agua

(<1 mL) y se evaluó en húmedo para confirmar la formación del hidrato. Ambos lotes se secaron *in vacuo* a 50 °C durante aprox. 18 horas y se volvieron a evaluar por medio de XRPD. La muestra molida permaneció como Polimorfo A. La muestra
5 hidratada después de la deshidratación demostró ser el Polimorfo A' (es decir, sin reflexión a $\sim 17.5^\circ 2\theta$). Esto sugirió que el tamaño/hábito por sí solo no era la única razón de los picos de reflexión originales.

La evaluación de TGA reveló que el lote de entrada
10 demostró una pequeña pérdida de masa (0.139% en peso) en aprox. 70 °C. El reducido en tamaño de partícula y posteriormente secado demostró una mayor pérdida de masa de 0.343% en peso en aprox. 75 °C mientras que el sólido hidratado y secado demostró la pérdida de masa más baja de 0.069% en peso en aprox. 80 °C.
15 El reducido en tamaño de partícula y posteriormente secado se mantuvo a 80 °C durante 10 minutos (más allá del punto de pérdida de masa por TGA), pero la evaluación por XRPD no reveló ningún cambio desde la entrada, lo que significa que los bajos niveles de hidratación e hinchamiento parcial de la red
20 cristalina no fueron la causa de la variación.

Es posible generar el Polimorfo A' mediante la hidratación del Polimorfo A y el posterior secado del sólido aislado a pequeña escala.

El Polimorfo A y el Polimorfo A' de psilocibina, aprox.

60 mg cada uno, se cargaron con agua, 0.2 mL, para proveer el Hidrato A de ambos lotes. La mitad de cada Hidrato A se secó *in vacuo* a 25 °C durante aprox. 17¼ horas, y el resto de cada Hidrato A se secó a temperatura ambiente bajo una corriente de N₂ durante aprox. 17¼ horas. Los sólidos se aislaron después del secado y se evaluaron mediante XRPD. La evaluación por XRPD de los sólidos aislados del Polimorfo A como entrada confirmó que el Hidrato A se generó con éxito y que los sólidos se secaron para formar el Polimorfo A' a partir de ambos métodos de secado. La evaluación por XRPD de los sólidos aislados del Polimorfo A' como entrada confirmó que el Hidrato A se generó con éxito y que los sólidos se secaron para permanecer como Polimorfo A' a partir de ambos métodos de secado.

En la pequeña escala investigada, el Polimorfo A y el Polimorfo A' se secarán para formar el Polimorfo A' mediante la conversión a Hidrato A.

El Polimorfo A de psilocibina (100 mg) se redujo el tamaño de partícula mediante molienda con mortero y mano de mortero. El lote molido se sometió a dos regímenes de secado diferentes para evaluar si la reducción del tamaño de partícula afectaba la deshidratación de la muestra. La primera muestra se mantuvo a 80 °C durante 10 minutos, y la segunda muestra se mantuvo a 110 °C durante 10 minutos. Ambos sólidos fueron evaluados por XRPD, que reveló la retención del Polimorfo A. Se consideró

si el lote molido en las tensiones isotérmicas anteriores no se mantuvo a 110 °C durante el tiempo suficiente para impactar la forma y, por lo tanto, una porción del lote molido se secó *in vacuo* a 110 °C durante aprox. 24 horas. La evaluación
5 realizada por XRPD reveló un cambio sutil en la forma, donde las reflexiones del Polimorfo A en aprox. 17 todavía estaban presentes pero a una intensidad levemente reducida.

Se concluyó que el Polimorfo A no tendría a convertirse fácilmente en el Polimorfo A' mediante la reducción del tamaño
10 de partícula y/o el secado a alta temperatura.

Metodología

Las evaluaciones de estabilidad de la psilocibina, que no contiene la impureza de pirofosfato, indicaron que a temperaturas superiores a 80 °C, el nivel de la impureza de
15 grado intermedio de la Etapa 3 (psilocina) generada por la hidrólisis de la psilocibina es preocupante. Por ejemplo, cuando se calienta una solución acuosa de psilocibina de 83 mg/mL a 90 °C y se analiza por HPLC a las 1, 2 y 4 horas, el nivel de impureza de la Etapa 3 se determinó como 0.28, 1.82 y
20 7.79% de área respectivamente. A modo comparativo, cuando se disuelven 50 mg de psilocibina en agua (1.2 - 1.8 ml; volumen suficiente para mantener una solución) y se calientan a 70, 75 y 80 °C durante 4 horas, se determinó que el nivel de impureza de la Etapa 3, por HPLC, era 0.53, 0.74 y 2.30% de área

respectivamente. La re-cristalización calienta la psilocibina cruda entre 75 °C y 80 °C para lograr la disolución y la filtración de pulido. El enfriamiento inmediato de la solución limita el nivel de hidrólisis de psilocibina al reducir el

5 tiempo de residencia del material a una temperatura excesiva.

Se realizó una mayor recrystalización de ensayo de psilocibina introduciendo las siguientes variaciones:

Variando los volúmenes de agua usados;

Variando la agitación;

10 Teniendo un perfil de enfriamiento controlado;

Teniendo un perfil de enfriamiento rápido (no controlado).

El uso de volúmenes más pequeños de agua (tan poco como 12 volúmenes) no obstaculizó el proceso de re-cristalización, y la disolución de la psilocibina se logró a una temperatura

15 para permitir un paso de filtración de pulido. Se demostró que diferentes tasas de enfriamiento generaban diferentes distribuciones de tamaño de cristal; un enfriamiento lento y controlado a aproximadamente 10 °C por hora produjo un tamaño de cristal promedio relativamente más grande y más parejo

20 (Figura 16a), mientras que un perfil de enfriamiento rápido proporcionó cristales más pequeños (Figura 16b). Se prefiere un perfil de enfriamiento controlado y esto se reflejó en una pureza mejorada para el enfriamiento controlado.

El uso del proceso dio como resultado psilocibina con una

pureza química del 99.3%, con un rendimiento del 75%. Las características térmicas del sólido se correspondieron con las deseadas. Las diferencias en el difractograma de XRPD del sólido seco han sugerido que el perfil de secado puede ser importante para determinar cómo se colapsa el Hidrato A para generar la forma sólida preferida. Se ha demostrado que el Polimorfo A es estable bajo condiciones de prueba de estabilidad acelerada durante 12 meses.

Experimentación

La Etapa 5 se cargó al recipiente bajo N₂ seguido de agua (aprox. 12-15 vol. basado en la Etapa 5 activa). La mezcla se calentó a aproximadamente 80 °C para lograr la disolución y se filtró con pulido a través de un filtro en línea de 1.2 µm en un nuevo matraz limpio calentado a 80 °C. La tasa de agitación se ajustó a un nivel alto (450 rpm) y la solución se equilibró a 70-75 °C. La solución se enfrió a temperatura ambiente, a aprox. 10 °C/hora, sembrando con Hidrato A de psilocibina (0.001 x carga de Etapa 5) a 68-70 °C. La suspensión se mantuvo a temperatura ambiente toda la noche y luego se enfrió a aprox. 5 °C y se mantuvo durante 1 hora. La suspensión se filtró, lavándose con agua (2-3 volúmenes basados en la carga activa de la Etapa 5). La psilocibina pura se secó *in vacuo* a 50 °C. Se obtuvo psilocibina como material cristalino (Polimorfo A o Polimorfo A' dependiente de la escala), por ejemplo, el uso de

94 g de entrada de psilocibina produjo el Polimorfo A y el uso de 1 g de entrada de psilocibina produjo el Polimorfo A'. Típicamente, los tamaños de lote de más de 5 g proporcionan el Polimorfo A, mientras que los tamaños de lote de menos de 5 g proporcionan el Polimorfo A'.

Las diferencias con JNP y los beneficios se pueden resumir de la siguiente manera:

Este paso de cristalización adicional da lugar a una forma cristalina definida: Polimorfo A (o A').

El calentamiento a aproximadamente 80 °C, durante un breve período de tiempo, tiene la ventaja de que se maximiza la solubilidad (y se evita la hidrólisis), lo que garantiza buenos rendimientos.

A aproximadamente 70-80 °C, se puede usar filtración de pulido para extraer las impurezas insolubles. Esto se logra mejor utilizando un filtro en línea, típicamente de aproximadamente 1.2 µm. Esto asegura una buena pureza química.

El uso de una tasa de agitación alta (típicamente aproximadamente 450 rpm) asegura una disolución rápida, lo que permite minimizar el tiempo en el que la solución se mantiene a 80 °C, evitando así el aumento de los niveles de la impureza de grado intermedio de Etapa 3 formada por la hidrólisis de la psilocibina.

La provisión de enfriamiento controlado, típicamente

enfriamiento a aproximadamente 10 °C por hora, proporciona un tamaño de cristal más uniforme y mantiene la forma como Hidrato A cristalino.

La siembra de la solución a aproximadamente 70 °C con
5 Hidrato A de psilocibina facilita la cristalización como el Hidrato A.

Los cristales se lavan en agua y se secan a aproximadamente 50 °C para maximizar la pureza y proporcionar el Polimorfo A o A' dependiendo de la escala.

10 **Ejemplos 2 a 6**

Etapas 1 a 5 - Producción de Psilocibina

Los siguientes Ejemplos ilustran desarrollos significativos del proceso descrito en JNP e ilustrado en la Figura 1, como se describió aquí anteriormente.

15 **Ejemplo 2**

Etapas 1 (Figura 2)

Las condiciones de la Etapa 1 en JNP usaron 1.1 eq. Ac₂O y 1.2 eq. piridina en el solvente DCM. Se encontró que la reacción estaba completa (99% de producto, 0% de SM) después de agitar
20 toda la noche. La mezcla de reacción se lavó con agua y se concentró *in vacuo* formando un aceite de color marrón. En la literatura, el aceite se absorbió en EtOAc y se concentró por evaporación, posibilitando la precipitación de sólidos a bajo volumen.

Investigación

Sin embargo, en las manos de los Solicitantes no se observó precipitación de sólidos de EtOAc. La precipitación de sólidos fue alentada por la trituración con heptano; sin embargo, esto
5 no tendió a formar un proceso escalable. Los sólidos se recogieron, formando un producto de Etapa 1 de alta pureza (75% de rendimiento, >95% puro por RMN).

Si bien la reacción funcionó bien, el procedimiento de aislamiento requirió un mayor desarrollo para que pudiera
10 obtenerse un sólido de fácil manejo. Se esperaba que el aislamiento de los sólidos por filtración también ofreciera un medio de purificación.

La reacción se evaluó primero en EtOAc para ver si podía alentarse la precipitación de sólidos, permitiendo el
15 aislamiento directamente de la mezcla de reacción. Sin embargo, se encontró que el perfil de reacción en EtOAc era menos favorable que en DCM y, por lo tanto, se abandonó la reacción.

El Solicitante lavó la piridina de la mezcla de reacción de DCM, ya que se creía que esto podría estar evitando la re-
20 cristalización del producto. La reacción se repitió (compleción del 0.4% SM, 98.7% de producto por HPLC) y la mezcla de reacción se lavó con ácido cítrico al 20% para alcanzar un pH de 2/3, eliminando la piridina y luego NaHCO₃ saturado (acuoso) para evitar un pH bajo en los pasos de evaporación. Los orgánicos

se secaron y se realizó un cambio de solvente a heptano, brindando la precipitación de la Etapa 1. Los sólidos se recogieron por filtración produciendo la Etapa 1 pura después de secar *in vacuo* (87% de rendimiento, >95% de pureza por RMN).

- 5 Se llevaron a cabo ensayos de estabilidad que confirmaron que la mezcla de reacción era estable durante la noche cuando se agitó con ácido cítrico al 20% y también NaHCO₃ saturado. Se encontró que el producto era estable cuando se secó en horno a 40 °C y 60 °C.

10 **Aumento en Escala**

La reacción de la Etapa 1 aumentó con éxito procesando >100 g de 4-hidroxiindol. La reacción progresó según lo esperado, y se trató para obtener el producto de la Etapa 1 (93% de rendimiento, ~98% de pureza por RMN).

15 **Síntesis de materia prima GMP**

Se llevó a cabo una reacción de Etapa 1 a gran escala para suministrar material de partida GMP (procesando >500 g de 4-hidroxiindol). La reacción procedió según lo esperando, arrojando un consumo de SM por HPLC (99.2% de producto, <0.1%

- 20 de SM). La reacción se trató usando el procedimiento establecido para obtener el producto de la Etapa 1 después del secado (94% de rendimiento, 99.1% por HPLC, 99% por ensayo de RMN).

También se observó en el desarrollo que el procedimiento

de la Etapa 1 fue eficaz para eliminar las impurezas menores presentes en algunos lotes de 4-hidroxiindol. Las impurezas en bajo nivel presentes en 4-hidroxiindol se eliminaron por completo después de la reacción de la Etapa 1 proporcionando un material limpio en alto rendimiento (89%) y pureza (99% por HPLC, 99% por ensayo de RMN).

Experimentación

Se cargó 4-hidroxiindol (1 eq. reactivo limitante) en un recipiente bajo N₂ seguido de DCM (diclorometano; 6 vol. sobre la base de la carga de 4-hidroxiindol). La reacción se enfrió a 0-5 °C y se agregó piridina (1.2 eq.) a gotas a 0-5 °C. Se agregó anhídrido acético (1.1 eq.) a gotas a 0-5 °C, y la reacción se calentó a 20-25 °C durante 1 - 1.5 horas y se agitó a 20-25 °C durante 3 horas más. Se tomaron muestras de la reacción y se analizaron para determinar su compleción. La reacción se lavó luego tres veces con una solución acuosa de ácido cítrico al 20% (3 x 3 vol. sobre la base de la carga de 4-hidroxiindol) y una vez con NaHCO₃ sat. (3 vol. sobre la base de la carga de 4-hidroxiindol). La solución de DCM se secó en presencia de MgSO₄ y se filtró, y la capa de DCM se concentró hasta la mitad del volumen por destilación. Se agregó heptano (6 vol. sobre la base de la carga de 4-hidroxiindol) y se eliminó DCM adicionalmente por destilación hasta que se produjera la precipitación completa de la Etapa 1. La reacción

se enfrió a 15-25 °C y los sólidos se recogieron por filtración, lavando con heptano (1 vol. sobre la base de la carga de 4-hidroxiindol) secado bajo vacío toda la noche a 60 °C.

Las diferencias con JNP y los beneficios se pueden resumir de la siguiente manera:

El Solicitante lavó la piridina usando ácido cítrico a un pH de aproximadamente 2 - 3. Esto facilitó la mejora del aislamiento y la cristalización. En la práctica, la fase DCM se separa y la fase acuosa de ácido cítrico se descarta.

Un lavado adicional en bicarbonato de sodio posibilitó una mayor mejora.

Un cambio de solvente a heptano mejoró la precipitación de sólidos maximizando el rendimiento y dando como resultado una Etapa 1 de alta pureza reproducible.

15 Ejemplo 3

Etapas 2 (Figura 3)

Paso I - Formación de Cloruro de Ácido

La formación del Intermediario 2A reactivo por reacción del producto de la Etapa 1 con cloruro de oxalilo (1.5 eq.) se ensayó inicialmente en una mezcla de TBME y THF (6 vol./1 vol.) para determinar si era una alternativa viable al Et₂O volátil y altamente inflamable como se usa en la literatura. La reacción se completó después de ~18 horas con un perfil de solubilidad similar al Et₂O (Etapa 1 en solución, precipitación

de la Etapa 2A).

Como el intermediario de cloruro de ácido es proclive a la hidrólisis, lo que lleva a resultados analíticos variables, se desarrolló un tratamiento y análisis de la muestra más
5 robustos en los que la reacción se inactivó en THF/NMe₂ (para proporcionar la Etapa 2) y luego se analizó por HPLC.

La relación de TBME y THF se optimizó para proporcionar la mayor pureza y rendimiento del intermediario con una relación preferida de TBME:THF de 6:1 elegida para el aumento
10 en escala. Es posible usar otras relaciones de TBME:THF.

Se llevó a cabo una reacción de aumento en escala utilizando la mezcla de solventes preferida (1 vol. THF, 6 vol. TBME) pero en donde la adición de cloruro de oxalilo se llevó a cabo a 30-35 °C. La solución resultante se calentó luego a
15 40 °C durante 2.5 horas, completándose con ~1% de producto de Etapa 1 restante. Llevar a cabo la adición en caliente para mantener una solución asegura una tasa de reacción alta y ofreció un nivel de compleción mejorado con un tiempo de reacción mucho más corto (2.5 horas vs toda la noche). Se
20 observó que el producto seguía precipitándose a temperatura después de ~15 min, y no se observó ningún efecto perjudicial sobre el perfil de reacción mediante HPLC.

Como no se conocía la estabilidad del Intermediario 2A, se intentó telescopizar el material hasta la Etapa 2 en lugar

de aislar el intermediario y arriesgar la degradación (hidrólisis). El perfil de reacción fue complejo con múltiples componentes presentes a un nivel bajo. Se agregó TBME y se recogió el precipitado. Sin embargo, también se encontró que
5 esta era una mezcla compleja por medio de HPLC/RMN.

Debido al perfil de reacción deficiente, se consideró necesario aislar el Intermediario 2A para permitir la purificación lejos del exceso de cloruro de oxalilo. La reacción se repitió y el precipitado de color amarillo se
10 recogió por filtración y se lavó con TBME para eliminar el exceso de cloruro de oxalilo (80% de rendimiento). El análisis por RMN confirmó que el producto tenía una pureza suficiente (~95% por RMN). Sin embargo, a pesar del almacenamiento bajo nitrógeno, se observó cierta descomposición en el transcurso
15 de los días siguientes, lo que proporcionó hidrólisis parcial, incluida la desprotección del grupo acetato.

Con el objeto de intentar reducir el potencial de hidrólisis del intermediario cloruro de ácido durante el aislamiento, se llevaron a cabo investigaciones adicionales en
20 un procedimiento telescopizado. Se descubrió que, al permitir que la mezcla de reacción se sedimentara, los licores de TBME podían decantarse fácilmente y luego los sólidos residuales lavarse con porciones adicionales de TBME de similar manera. Esto permitió la purificación del Intermediario 2A lejos del

exceso de cloruro de oxalilo mientras se minimizaba la exposición a la humedad.

Se consideró que se podía perder algo del rendimiento de la reacción debido a la solubilidad parcial del intermediario en la mezcla de THF/TBME. Esto se confirmó al agregar heptano a los licores de decantación, lo que generó la precipitación de sólidos adicionales. Para limitar esta solubilidad, se realizó una adición de heptano (8 vol.) antes de la decantación. En lugar de lavar los sólidos con TBME, también se usó heptano para los lavados (3 x 6 vol.), lo cual maximizó el rendimiento mientras se mantenía la alta pureza del intermediario. Esta metodología aumentó en escala con éxito, y conforma el proceso preferido.

Paso ii - Reacción con dimetilamina

La literatura (*Synthesis*, 1999, 6, 935-938; D.E. Nichols) sugirió que el gas HNMe₂ era efectivo para esta transformación. Sin embargo, para simplificar el procesamiento a gran escala, se sustituyó por HNMe₂.HCl sólido, con un exceso adicional de base, o una solución de HNMe₂ en THF. JNP usa HNMe₂ en presencia de exceso de base (piridina).

Inicialmente, se usó el Intermediario 2A aislado para optimizar la reacción con dimetilamina a través de una serie de reacciones de ensayo (ver Tabla 11).

Tabla 11 - ensayos de optimización de reacción de Etapa 2

#	Fuente Dimetilamina	Base	Solvente	Compleción por HPLC	Sólidos aislados
1	2M HNMe ₂ /THF	Piridina	THF/TBME	80% de	64% de

5

Las condiciones con piridina (#1) provistas por la
10 literatura fueron ensayadas junto con una reacción similar en
Et₂O (#3), una reacción bifásica usando Me₂NH.HCl y K₂CO₃ acuoso
(#2) y una reacción con exceso de Me₂NH 2M en THF (#4). El
componente principal por HPLC fue el producto deseado en todos
los casos en donde las condiciones que usaban una base acuosa
15 y un exceso de Me₂NH eran generalmente mucho más limpias que
aquellas con piridina. Si bien se observó un producto de
hidrólisis significativo en todos los casos, se pensó que esto
era el resultado del Intermediario 2A sin reaccionar que se
inactivó durante la preparación de la muestra para el análisis
20 por HPLC. Las reacciones se produjeron mediante la adición de
agua y luego el solvente orgánico se eliminó *in vacuo*
permitiendo la precipitación de sólidos.

La reacción con exceso de amina mostró un perfil de
impurezas mucho mejor, que se tradujo en un mayor rendimiento

(72% vs. 63%) y pureza (98% vs. 90%). Este enfoque limitó el contenido de agua de la reacción y, por lo tanto, minimizó la oportunidad de que se produjera la hidrólisis. También se esperó que la purificación fuera más fácil debido a la ausencia
5 de piridina en los sólidos aislados. Por estas razones, las condiciones con exceso de HNMe_2 como base fueron elegidas para el aumento en escala.

La reacción en Et_2O arrojó un perfil limpio (#4). Sin embargo, para facilitar el procesamiento a gran escala, resultó
10 ventajoso cambiar a un solvente menos volátil, tal como TBME. Esto facilitaría telescopizar el cloruro de ácido en esta reacción. Por estas razones, se eligió llevar a cabo la reacción en TBME usando un exceso de Me_2NH 2M en THF.

Se creía que la adición de agua ayudaría al tratamiento
15 al solubilizar las sales de $\text{HNMe}_2\cdot\text{HCl}$ que estaban presentes y dieron como resultado una mezcla muy espesa y filtraciones lentas. Esto fue ensayado. Sin embargo, cuando se agregó agua a las reacciones en TBME y THF, se obtuvo una recuperación deficiente en donde el análisis de los licores mostró impurezas
20 adicionales y amplia desprotección de acetato (producto fenólico). Por lo tanto, se requirió mayor desarrollo de la purificación.

Desarrollo de la Purificación

Fue deseable desarrollar una estrategia de purificación que

eliminara el producto de hidrólisis y otras impurezas observadas. También fue deseable incluir agua en la cristalización para reducir el contenido de sal del material aislado ($\text{HNMe}_2\cdot\text{HCl}$ asumido). Con este fin, se monitorizó una

5 serie de 15 solventes y mezclas de solventes (escala de 100 mg, solvente de 10 vol., ciclado térmico a 60 °C).

Tabla 12 - ensayos de purificación de Etapa 2

10	Solvente	Observaciones	Recuperación	Pureza por HPLC (hidrólisis de imp. del Intermediario 2A)
15	TBME	Suspensión	47 mg*	96.4% (2.8%)
	DCM	Suspensión	60 mg	99.5% (0.5%)
	Tolueno	Suspensión	30 mg*	95.8% (3.4%)
	EtOAc	Suspensión	66 mg*	97.8% (1.6%)
	iPrOAc	Suspensión	40 mg*	97.3% (2.0%)
	IPA	Suspensión	65 mg	99.4% (0.4%)
	EtOH/H ₂ O, 1:1	Suspensión	62 mg	99.4% (0.5%)
	MeCN/H ₂ O, 1:1	Solución parcial a RT Solución a 60 °C	30 mg	99.0% (0.7%)
	Acetona/H ₂ O, 1:1	Suspensión a RT Solución a 60 °C	51 mg	99.4% (0.5%)
	THF/H ₂ O, 1:1	Solución parcial a RT Solución a 60 °C	Sin precipitado	n/d
	Heptano	Suspensión	34 mg*	95.0% (3.6%)
	MIBK	Suspensión	65 mg	97.9% (1.4%)
	MEK	Suspensión	60 mg	99.6% (0.3%)
	Ciclohexano	Suspensión	41 mg*	94.4% (4%)
	Xilenos	Suspensión	56 mg*	96.1% (3%)

* Recuperación no representativa debido a suspensiones espesas y sólidos adheridos al vial de vidrio.

De los solventes seleccionados, la acetona/agua ofreció una re-cristalización con poca solubilidad observada a
5 temperatura ambiente. Como se trataba de un sistema acuoso, tuvo la ventaja de ayudar a purgar el $\text{Me}_2\text{NH}\cdot\text{HCl}$ de los sólidos.

La re-cristalización de acetona/agua se aumentó en escala. Se obtuvo una solución a temperatura (5 vol. de acetona, 1 vol. de agua) antes de la adición de más agua (4 vol.), y la mezcla
10 se enfrió a temperatura ambiente, posibilitando la cristalización (62% de recuperación, >99% de pureza por HPLC). Posteriormente, este proceso se aumentó en escala aún más con la adición de más agua para ayudar a la recuperación (en total 5 vol. acetona, 10 vol. agua, 78% de recuperación).

15 El proceso se aumentó en escala aún más (30 g) y los sólidos crudos se tomaron mediante el procedimiento de re-cristalización. Si bien la pureza del producto fue alta, hubo una caída en el rendimiento (56% de rendimiento, 99% por ensayo de RMN, 99.4% por HPLC).

20 Para mejorar la recuperación, la cantidad de agua agregada se incrementó aún más de 10 vol. a 15 vol. Esto mantuvo la pureza del producto en más del 99% y proporcionó una mayor recuperación a pequeña escala (90% de recuperación, 56-70% previamente observado). Sin embargo, el aumento en escala de

este procedimiento modificado nuevamente arrojó una baja recuperación (58% de rendimiento). Por lo tanto, debido a los problemas encontrados cuando se aumentaba en escala la re-cristalización, se buscó un medio alternativo de purificación
5 basado en la selección de la suspensión original que se llevó a cabo (Tabla 12 anterior).

El re-desarrollo de la estrategia de purificación tuvo lugar usando el material aislado a partir de una reacción, Etapa 2, a gran escala. La reacción progresó según lo previsto
10 para formar el producto crudo después del secado en horno (70% por ensayo de RMN, 79% de rendimiento de activo). Para eliminar el componente de sal significativo (presumido como $\text{HNMe}_2 \cdot \text{HCl}$), se suspendió una porción en agua a temperatura ambiente. Después del secado, esto proporcionó una recuperación del 75%
15 (95% por ensayo de RMN), lo que demuestra que es un medio efectivo para reducir el contenido de sal. La pureza por HPLC permaneció inalterada en ~93%. Luego se buscó un método para incrementar la pureza química de los sólidos.

Desde la selección inicial, tanto $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$, IPA como
20 acetona: H_2O pareció brindar un producto de alta pureza con una buena recuperación, por lo que estos sistemas solventes fueron elegidos para mayor investigación. La pureza de entrada fue de 92.7% con las impurezas principales en niveles de 1.4%, 1.0% y 0.8%.

5 Tabla 13 - Desarrollo de purificación adicional
(suspensión a 40 °C 1 hora, filtración a temperatura ambiente,
lavado de 1 vol.)

	Sistema solvente	Recuperación	Pureza por HPLC (niveles de impurezas principales)			
			Producto	Imp. 1	Imp. 2	Imp. 3
10	Acetona/Agua 6/16 vol.	67%	98.8%	0.7%	0.2%	0.1%
	1:1 EtOH:H ₂ O 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%
15	4.5:2.5 IPA:H ₂ O * 7 vol.	79%	98.7%	0.6%	0.4%	0.1%
	6:1 IPA:H ₂ O 7 vol.	82% **	98.0%	0.9%	0.6%	0.2%

* La reacción se ejecutó inicialmente en 1:1 IPA:H₂O a 5 vol. Sin embargo, se volvió demasiado espesa de agitar, por lo que se agregaron otros 2 vol. de IPA.

20 ** La mezcla era espesa y los sólidos presentes eran muy finos, lo que dificultaba la filtración con algunos sólidos que golpeaban el filtro.

Los resultados de estos ensayos sugirieron que era posible una buena recuperación a partir de estos sistemas,

particularmente aquellos basados en IPA. EtOH:H₂O arrojó un perfil de impurezas ligeramente mejor que IPA solo; sin embargo, la recuperación no fue tan buena (79 vs. 90%). El perfil de impurezas con IPA resultó optimizado en gran medida por la presencia de agua (98.7% vs ~97.5%); sin embargo, esto condujo a una menor recuperación (79 vs. 90%). Esto sugirió cierto nivel de solubilidad en agua para el compuesto. Una prueba final en IPA y EtOH:agua se llevó a cabo con volúmenes de agua reducidos para ver si se podía encontrar un equilibrio que proporcionara una alta pureza y una recuperación de ~90%. Si bien este sistema mejoró el rendimiento, la filtración fue lenta y, por lo tanto, también se evaluaron otras mezclas de solventes.

Tabla 14 - Examen de otras mezclas de solventes (escala de 500 mg, suspensión a 40 °C 1 hora, filtración a temperatura ambiente, lavado de 1 vol.)

20

Sistema solvente	Recuperación	Pureza por HPLC (niveles de impurezas)			
		Producto	Imp. 1	Imp. 2	Imp. 3
IPA 10 vol.	460 mg (92%)	97.6%	1.1%	0.7%	0.3%
1:3 EtOH:H ₂ O 5 vol.	451 mg (90%)	96.2%	1.4%	0.8%	0.5%
1:2 EtOH:H ₂ O 5 vol.	440 mg (88%)	97.5%	1.3%	0.7%	0.4%
1:1 EtOH:H ₂ O 5 vol.	375 mg (75%)	97.9%	1.0%	0.7%	0.3%
2:1 EtOH:H ₂ O 5 vol.	354 mg (71%)	97.6%	1.0%	0.6%	0.4%
3:1 EtOH:H ₂ O 5 vol.	369 mg (74%)	97.9%	0.9%	0.5%	0.3%

Las suspensiones de 5 vol. EtOH/Agua eran muy espesas y no se manejaban fácilmente. Dado que la pureza de los sólidos fue comparable en todos los ensayos (es probable que haya ligeras variaciones debido a la calidad de la filtración y el lavado), las condiciones de 100% de IPA se aumentaron en escala ya que ofrecían una alta recuperación y la suspensión resultante era fácil de manejar.

Un aumento en escala inicial de la suspensión preferida ofreció (recuperación del 92%) con pureza por HPLC del 96.4% (niveles de impureza del 1.2%, 0.7%, 0.4%). El análisis de los licores mostró que estaban enriquecidos en todas las impurezas principales: 72% (8.6%, 3.8%, 3.4%) por HPLC. Esto se consideró un método de purificación adecuado que ofrecía una alta recuperación y el material usado se evaluó en la siguiente etapa para garantizar que se lograran el seguimiento y la eliminación de las impurezas en la parte final del proceso (>99% en la Etapa 3, sin impureza única >0.5%).

La suspensión demostró ser escalable cuando el material crudo restante de la Etapa 2 (ensayo del 70%) se suspendió en agua para eliminar los inorgánicos, y luego se suspendió en IPA para proporcionar material de pureza mejorada (97% por ensayo de RMN, rendimiento del 76% para la Etapa 2, 96.8% por HPLC, impurezas al 1.1%, 0.8%, 0.4%).

Síntesis de materia prima GMP

Se llevó a cabo una reacción a gran escala de Etapa 2 para suministrar la campaña de GMP. La reacción progresó según lo previsto para proporcionar un producto crudo que se suspendió en agua y se filtró para proporcionar la Etapa 2 que era 93% pura por HPLC. Esto se suspendió adicionalmente en 8 vol. IPA y se filtró para obtener el producto de la Etapa 2 (93.7% por HPLC, 92% por ensayo, 66% de rendimiento de activo). Dado que la pureza obtenida fue inferior a la observada durante la campaña de desarrollo, se realizó una prueba de uso que confirmó que la Etapa 3 de alta pureza obtenida era adecuada para el procesamiento posterior (materia prima GMP).

Se realizó un segundo lote bajo idénticas condiciones para formar un producto crudo que después de una suspensión en agua era 90% puro por HPLC. Posteriormente, este material se suspendió en agua y se purificó mediante suspensión de IPA para obtener 384 g de producto de la Etapa 2 (93.0% por HPLC, 91% por ensayo de RMN, 60% de rendimiento de activo).

Se realizó un tercer lote para reabastecer la síntesis de GMP. El producto crudo se purificó con éxito mediante una suspensión en agua y luego IPA para ofrecer la Etapa 2 (79% de rendimiento) con una pureza incrementada en comparación con lotes anteriores (97.3% por HPLC, ensayo de RMN al 96%).

Experimentación

La Etapa 1 (1 eq. reactivo limitante) se cargó en un recipiente

bajo N₂ seguido de THF (1 vol. wrt la carga de la Etapa 1) y TBME (6 vol. wrt la carga de la Etapa 1). Luego se agregó cloruro de oxalilo a gotas al recipiente (1.5 eq.) permitiendo que el evento exotérmico elevara inicialmente la temperatura a

5 35-40 °C y luego aplicando enfriamiento según fuera necesario para mantener 35-40 °C. Inmediatamente después de la adición, la reacción se calentó a 40 °C y se agitó durante 2-6 horas. Se extrajeron muestras de la reacción y se analizaron para determinar su compleción; luego se enfriaron a temperatura

10 ambiente y se agregó heptano (8 vol. wrt la carga de la Etapa 1) posibilitando la precipitación de sólidos adicionales. La reacción se agitó durante 10 minutos y luego los sólidos se dejaron sedimentar. La mayoría del solvente se decantó del sólido que luego se lavó dos veces con heptano (2 x 6 vol. wrt

15 la carga de la Etapa 1), decantando de manera similar después de cada lavado. Luego se tomaron muestras de los sólidos y se analizaron. Se cargó TBME en el recipiente (4 vol. wrt la carga de la Etapa 1) para formar una suspensión amarilla que se enfrió a -20 °C usando un baño de hielo seco/acetona. Se agregó

20 una solución 2 M de Me₂NH en THF (2 eq.) a gotas al recipiente durante ~15 min manteniendo la temperatura de -20 °C a -10 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente y se agitó toda la noche. Se puede agregar Me₂NH adicional en este punto si es necesario. Se tomaron muestras

de la reacción y se analizaron para determinar su compleción. La reacción se filtró, lavando con heptano (2 x 2 vol. wrt la carga de la Etapa 1) y los sólidos aislados se secaron a 60 °C bajo vacío. La Etapa 2 cruda se suspendió en agua (8 vol. wrt la carga de la Etapa 1) durante 2-18 horas y luego se filtró, lavando con agua (2 vol. wrt la carga de la Etapa 1). Los sólidos se secaron a 60 °C bajo vacío para obtener la Etapa 2 cruda con <2% p/p de agua (determinado por medio de valoración de Karl Fischer (KF)). La Etapa 2 cruda se suspendió en IPA (10 vol.) durante 2-18 horas y luego se filtró, se lavó con IPA (1 vol. wrt la masa de la Etapa 2 cruda) y se secó en horno bajo vacío a 60 °C.

Las diferencias con JNP y los beneficios se pueden resumir de la siguiente manera:

15 Paso 1

En primer lugar, el uso de un sistema solvente THF/TBME en lugar de éter dietílico fue menos volátil e inflamable.

En segundo lugar, la adición de cloruro de oxalilo se realizó a una temperatura elevada, se calentó a 40 °C, lo que generó una solubilidad mejorada y evitó el atrapamiento del producto de la Etapa 1 en el precipitado. También proporcionó una alta tasa de reacción, niveles mejorados de compleción, y tiempos de reacción más cortos.

En tercer lugar, el Intermediario 2A se aisló para

permitir la purificación lejos del exceso de cloruro de oxalilo.

En cuarto lugar, se agregó heptano para ayudar a precipitar el Intermediario 2A.

5 Paso 2

Al asegurarse de que la amina se usó en exceso, se obtuvo una pureza y un rendimiento mucho mejores, debido a la presencia de agua mínima y, por lo tanto, una hidrólisis reducida.

Finalmente, el uso de agua y suspensiones de IPA ofreció
10 buena pureza del producto de Etapa 2.

Ejemplo 4

Etapas 3

Se llevó a cabo una reacción de ensayo de la Etapa 3 inicial usando material de la Etapa 2 purificado (>99% por HPLC) y las
15 condiciones de reacción suministradas. Se encontró que el material de entrada de la Etapa 2 era insoluble en gran medida en THF, por lo que en lugar de agregar una solución de la Etapa 2 a LiAlH_4 , se realizó la adición inversa. Se usaron 4 eq. de LiAlH_4 como una solución 1M en THF con la adición realizada a
20 20-25 °C, durante ~2 horas. En este punto, se observó un 10% de producto con varias especies intermediarias presentes. La reacción se calentó a reflujo durante ~7 horas para generar una conversión del producto del 93% (por HPLC). La reacción se trató para formar el producto crudo de la Etapa 3 (~90% por

HPLC, ~90% por RMN, ~87% de rendimiento corregido).

Se llevó a cabo una reacción de ensayo en la que la carga de LiAlH_4 empleada se redujo de manera exitosa (3 eq. vs. 4 eq.). Se esperó que esto beneficiara el tratamiento final al
5 reducir la cantidad de sales de Li y Al generadas. Después de un calentamiento prolongado a reflujo (10-18 horas), el intermediario de reacción se consumió en gran medida (2-3% restante) con ~95% de producto por HPLC.

Desarrollo del Tratamiento Final

10 Aunque la primera reacción de ensayo se trató con éxito usando la sal de Rochelles, los volúmenes empleados fueron muy altos (~100 vol.) y este procedimiento no formaría un proceso viable para el aumento de escala. Se examinaron una variedad de procedimientos de tratamiento alternativos para intentar
15 reducir los volúmenes requeridos y ayudar a la eliminación de sales de Li/Al.

Se ensayó una inactivación de volumen reducido con EtOAc y luego sal de Rochelles. Los sólidos grises estaban presentes como una pasta espesa que se depositó en el fondo del matraz.
20 Si bien la filtración falló, los licores se pudieron decantar y los sólidos se volvieron a suspender en THF/EtOAc para extraer el producto. Luego se realizó un tratamiento final acuoso y el producto se aisló por concentración. Esto produjo un producto de buena pureza (90-95% por RMN) en buen

rendimiento (94% sin corrección para la pureza). Sin embargo, el proceso no fue fácilmente proclive de aumentar en escala.

Una reacción se inactivó mediante la adición de EtOAc y luego Na_2SO_4 sat. en presencia de Na_2SO_4 anhidro para actuar
5 como agente aglutinante. La reacción formó sólidos granulares que podían filtrarse con facilidad. Luego se realizó un tratamiento final acuoso y el producto se aisló por concentración. Se obtuvo un buen rendimiento (~94% sin corregir para la pureza) pero el producto contenía niveles más altos de
10 la impureza principal por RMN (10% vs. 2-4% usualmente observado).

Una reacción se inactivó con AcOH al 20% a 0 °C que condujo a la formación de un gel que no podía filtrarse. La reacción se abandonó.

15 Una reacción se inactivó con EtOAc y luego ácido cítrico al 20% para formar sólidos que se pudieron separar por filtración. Los licores se concentraron para obtener el producto. Si bien este procedimiento tuvo un rendimiento ligeramente inferior (~77% sin corregir para la pureza), el
20 producto fue de muy alta pureza (>95%).

Se inactivó una reacción adicional mediante la adición de EtOAc y luego agua (3 mL por g de LiAlH_4 en THF). Se formó un gel que no pudo filtrarse fácilmente, y se abandonó la reacción.

Finalmente, una reacción se inactivó por medio del método Fieser. Se realizó una adición de agua (1 mL por g de LiAlH_4), luego NaOH al 15% (1 mL por g de LiAlH_4) y finalmente agua (3 mL por g de LiAlH_4). Esto ofreció sólidos que pudieron filtrarse de la mezcla de reacción. Los licores luego se repartieron y se concentraron *in vacuo* (rendimiento del 87%, 90-95% por RMN).

Estos experimentos se resumen en la Tabla 15 a continuación:

Tabla 15 - Resumen de condiciones alternativas de tratamiento final

#	Procedimiento de tratamiento final	Rendimiento	Pureza
3.1	Inactivación con EtOAc Sal de Rochelles (vol. reducido)	2.8 g (94% no corregido)	90-95% por RMN
3.2	Inactivación con EtOAc en presencia de Na_2SO_4	2.8 g (94% no corregido)	~80-85% por RMN, 10% de imp.
3.3	Inactivación con EtOAc al 20%	Emulsión (reacción a residuo)	
3.4	Inactivación con EtOAc 20% de ácido cítrico	i) 529 mg (71% no corregido) ii) 2.3 g (77% no corregido)	>95% de pureza por RMN
3.5	Inactivación con agua	Emulsión (reacción a residuo)	
3.6	Inactivación con agua/NaOH	i) 615 mg (83% no corregido) ii) 2.6 g (87% no corregido)	90-95% por RMN

Ambas inactivaciones con ácido cítrico y NaOH formaron sólidos que pudieron filtrarse fácilmente de la mezcla de reacción y requirieron volúmenes mínimos de solvente. Si bien las condiciones con NaOH fueron de mayor rendimiento (~10%), el producto obtenido de este procedimiento fue menos puro y

probablemente requeriría una purificación mayor antes de usarse en la siguiente etapa. El menor rendimiento con ácido cítrico probablemente se debió a cierta precipitación del producto de sal de citrato. Esto tuvo un efecto purificador con un producto
5 limpio obtenido directamente después de la concentración. Estas condiciones fueron elegidas para el aumento en escala y se esperó que una mayor optimización de la carga de ácido cítrico permitiera aislar el producto limpio en alto rendimiento a partir de este proceso.

10 La reacción se repitió con una carga de ácido cítrico ligeramente reducida para intentar maximizar la recuperación. Esta reacción produjo un producto con un rendimiento del 57% con un mayor rendimiento del 20% obtenido por la re-suspensión de la torta de filtro en THF (ambas muestras de 97.7% por
15 HPLC).

La reacción se aumentó en escala. Sin embargo, durante la inactivación con EtOAc, donde previamente se observó que la reacción se espesaba, la reacción se engomó en el matraz para formar una masa espesa que restringió el mezclado. Si bien la
20 adición de ácido cítrico condujo luego a la suspensión/gel usual, esto no representó un proceso viable. Esta reacción se trató finalmente con la torta del filtro re-suspendida en THF para maximizar la recuperación dando 76% de rendimiento de activo, 95.0% por HPLC.

La reacción se repitió a fin de desarrollar una mejor inactivación y evitar la formación de goma observada con EtOAc. Una porción se inactivó mediante la adición de acetona, lo que condujo a una suspensión/emulsión fácilmente agitada sin signos de espesamiento. El tratamiento con ácido cítrico se llevó a cabo para formar una mezcla filtrable. Esta inactivación se llevó a cabo con éxito en el resto de la reacción y se trató para proporcionar un producto crudo en buen rendimiento (71% por ensayo, 82% de rendimiento corregido, 98.0% por HPLC).

Después de la inactivación, se encontró que la mezcla de reacción generalmente tenía un pH de 8/9. Como parte del proceso de optimización del tratamiento final, se investigaron diferentes pH. Se dividió una reacción para el tratamiento final donde una mitad recibió una carga de ácido cítrico ligeramente reducida (para obtener un pH de 11/12 después de la inactivación) y la otra mitad fue llevada a pH 7 mediante la adición de más ácido cítrico. La reacción a pH 11 se trató para formar material de 85% por ensayo de RMN (73% de rendimiento) donde la reacción a pH 7 arrojó 60% por ensayo de RMN (62% de rendimiento). A partir de este resultado quedó claro que obtener el pH correcto después de la inactivación era primordial para obtener un rendimiento >70%. Al reducir la carga de ácido cítrico solo ligeramente (incluso aproximadamente 2 vol. de ácido cítrico al 20%) se obtuvo un

incremento en el rendimiento de aprox. 8%. Con esta información en la mano, se monitoreó el pH de las futuras reacciones durante la inactivación para asegurar que la mezcla permaneciera fuertemente básica.

5 Desarrollo de la purificación

Se realizó una selección con purificación usando porciones de 100 mg de producto de psilocina cruda que se suspendieron en 10 vol. de solvente con ciclos de calor a 60 °C. Las suspensiones se enfriaron a temperatura ambiente durante el fin de semana y luego cualquier sólido formado se recogió por filtración. La estabilidad al ácido y base también se evaluó a fin de llevar a cabo un tratamiento final con ácido/base. Los resultados de la selección se presentan en la Tabla 16 que sigue:

15 Tabla 16 - Selección con purificación de psilocina.
(Pureza de entrada y 3 niveles de impurezas principales: 90.2%, 3.8%, 0.9%, 0%).

20	Solvente	Observaciones	Recuperación (aprox.)	Pureza por HPLC (y niveles de impurezas principales)
	MeOH	Solución a RT	n/d	n/d
	EtOH	Solución a 60 °C Precipitado a RT	35 mg	97.2%, 0.4%, 1.1%, 0.8%

5	IPA	Suspensión a 60 °C	51 mg	97.6%, 0.5%, 0.5%, 1.1%
	MeCN	Solución a 60 °C Precipitado a RT	46 mg	96.8%, 0.6%, 0.4%, 1.6%
	EtOAc	Suspensión a 60 °C	58 mg	97.1%, 0.9%, 0.2%, 1.3%
	ⁱ PrOAc	Suspensión a 60 °C	58 mg	98.2%, 0.8%, 0.2%, 0.4%
	Tolueno	Suspensión a 60 °C	70 mg	93.3%, 3.6%, 0.2%, 0.8%
10	Heptano	Suspensión a 60 °C	77 mg	91.3%, 3.8%, 0.2%, 0.7%
	Acetona	Solución a 60 °C Precipitado a RT	30 mg	97.7%, 0.4%, 0.3%, 0.9%
	MEK	Solución a 60 °C Precipitado a RT	24 mg	97.3%, 0.5%, 0.5%, 1.2%
	MIBK	Suspensión a 60 °C	49 mg	97.4%, 0.6%, 0.2%, 1.3%
	THF	Solución a RT	n/d	n/d
15	TBME	Suspensión a 60 °C	67 mg	95.5%, 2.0%, 0.1%, 1.5%
	DCM	Solución a RT	n/d	n/d
	1M HCl	Solución a RT	n/d	83.7%, nueva imp. 8%
	1M KOH	Suspensión a RT (negra)	n/d	89.1%, 5.4%, 0.9%, 2.2%

La primera de las tres impurezas destacadas se correspondió con el intermediario de reacción más estable que se observa a ~70%, cuando se completa la adición de LiAlH₄ (que requiere reflujo para convertir al producto). La tercera

impureza no estaba presente en la entrada y parecía generarse durante el procedimiento de la suspensión. De los solventes que quedaron como una suspensión, el ⁱPrOAc brindó la pureza más alta. Se encontraron varias re-cristalizaciones, donde el MeCN tenía el potencial de eliminar impurezas durante la

cristalización y tenía una recuperación que tuvo el potencial de mejorar durante el desarrollo. Se observó cierta degradación tanto en ácido como en base con la muestra de KOH que se tornó rápidamente negra.

5 La purificación del material crudo de la Etapa 3 se aumentó en escala utilizando los dos solventes más prometedores (MeCN e ⁱPrOAc). Los volúmenes de solvente se redujeron a un mínimo para mejorar la recuperación. Los resultados de estos ensayos se presentan en la Tabla 17 que sigue.

10 Tabla 17 - Desarrollo adicional de la purificación de MeCN/ⁱPrOAc

Solvente	Observaciones	Recuperación (%)	Pureza por HPLC (y niveles de impurezas principales)
MeCN (5 vol.)	Recrist en 5 vol.	512 mg (51%)	97.6%, 0.7%, 0.8%, 0%
ⁱ PrOAc (3 vol.)	Suspensión en 3 vol.	706 mg (71%)	95.8%, 1.3%, 0.6%, 0%

15 Se obtuvo una re-cristalización de MeCN en 5 vol. y se logró una suspensión caliente en ⁱPrOAc a 3 vol. (ambos a 75 °C). La recuperación a partir de MeCN fue nuevamente deficiente a pesar de los volúmenes reducidos, sin embargo, el producto fue de muy alta pureza (>>95% por RMN). La recuperación a partir de ⁱPrOAc fue mejor con un gran incremento en la pureza del producto cuando se analizó por RMN (~95%).

20 Aunque la pureza por HPLC y RMN del material de la

suspensión de ⁱPrOAc fue alta, se observó un valor de ensayo bajo (85% por ensayo de RMN). Con el fin de mejorar el valor de ensayo del material, así como eliminar el color, (todos los materiales obtenidos hasta ese momento eran de un intenso púrpura, verde o marrón) se investigó la purificación por almohadilla de sílice.

La psilocina cruda (71% por ensayo, 98.0% por HPLC) se pasó a través de 4 eq. de sílice eluyendo con THF. Se obtuvo una recuperación del 80% de un sólido blanquecino con pureza por HPLC (98.4%) y valor de ensayo (~82% por ensayo) ligeramente mejorados. Esto demostró ser un medio efectivo para aumentar el valor de ensayo del producto y, por lo tanto, se incluyó como parte del tratamiento final de reacción.

Luego se realizó una serie de suspensiones de ⁱPrOAc/anti-solvente (Tabla 18) utilizando la entrada tratada con sílice (100 mg por suspensión) para tratar de mejorar la recuperación, manteniendo la pureza química (pureza de entrada del 98.4%).

Tabla 18 - Resultados de las adiciones de ⁱPrOAc/anti-solvente.

Sistema solvente	Recuperación	Pureza por 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%

Como todos los valores de pureza eran comparables, se eligieron dos sistemas solventes para el aumento en escala sobre la base de las recuperaciones más altas obtenidas. Las dos suspensiones preferidas (TBME y tolueno como anti-solvente) se aumentaron en escala (1.0 g por suspensión) para evaluar mejor la recuperación.

Tabla 19 - Aumento en escala de los métodos de purificación preferidos

Sistema solvente	Recuperación	Pureza por HPLC
1:1 ⁱ PrOAc:TBME 5 vol.	79.9%	99.1%
1:1 ⁱ PrOAc:Tolueno 5 vol.	79.4%	99.6%

Ambas opciones proporcionaron material de >99% de pureza por HPLC a ~80% de recuperación y, combinadas con una almohadilla de sílice, parecen proporcionar un medio efectivo de purificación para el producto de psilocina. Se eliminó el color adicional en los licores durante la suspensión, formando psilocina como sólido blanco. Todas las impurezas se eliminaron efectivamente por debajo del 0.5%. Se eligió la suspensión en ⁱPrOAc:TBME para el aumento en escala ya que utilizaba solventes ICH no tóxicos de clase 3.

Aumento en Escala

Las condiciones de la etapa 3 desarrolladas se aumentaron en escala, y la reacción progresó para generar una compleción del 94.4% del producto con 2.9% del intermediario de reacción presente por HPLC después de toda la noche a reflujo (típico del proceso). Después de obtener una almohadilla de sílice, se obtuvo psilocina con una pureza del 83% mediante un ensayo de RMN, 66% de rendimiento de activo, 97.0% por HPLC. Este material se purificó adicionalmente por suspensión en iPrOAc/TBME para obtener el material al 100% por ensayo de RMN en 62% de rendimiento y 99.7% por HPLC.

Debido a que el rendimiento en crudo de la reacción fue inferior al esperado (66% vs. ~75%), la torta del filtro y la almohadilla de sílice se volvieron a investigar para intentar recuperar material adicional. Sin embargo, esto no tuvo éxito.

El rendimiento menor al esperado puede deberse a la descomposición del producto durante el tratamiento final, aunque las pruebas de estrés anteriores habían indicado que el material era estable bajo las condiciones utilizadas. Para investigar esto más a fondo, se repitió la reacción. El producto crudo se aisló antes de la almohadilla de sílice y se tomaron muestras de la prueba de estrés adicionales para confirmar que no se estaba produciendo degradación durante el tratamiento final.

La reacción progresó según lo previsto para generar compleción (93.7% de producto, 2.9% de intermediario) y se concentró produciendo material crudo (77% por ensayo de RMN, 66% de rendimiento de activo). La torta del filtro se volvió a suspender en THF/MeOH pero no se aisló psilocina significativa. Para tratar de desplazar cualquier producto que fuera coordinado a las sales de aluminio, se agregó más ácido cítrico para llevar el pH a 4 (desde pH 8) y la torta se volvió a suspender en THF, pero nuevamente no se aisló psilocina significativa. El balance de masa no se obtuvo de la reacción, donde un rendimiento de activo del 66% coincidió muy de cerca con el obtenido previamente. Este lote se purificó mediante una almohadilla de sílice y una suspensión en ⁱPrOAc/TBME para proporcionar un rendimiento del 62% de material de alta pureza (99.8% por HPLC).

A pesar de que los volúmenes de solvente empleados son relativamente altos y se requiere una almohadilla de sílice para la eliminación de las especies de aluminio y litio, el proceso siguió siendo adecuado para la escala requerida.

La reacción de la Etapa 3 se aumentó aún más en escala para procesamiento. La reacción procedió según lo previsto para ofrecer una compleción después de 18 horas (~91% de producto, ~3% de intermediario de reacción restante). El tratamiento final con almohadilla de sílice y suspensión dio un rendimiento

del 57% de psilocina de alta pureza (>99% por HPLC, 99% por ensayo de RMN, 0.35% p/p de agua Karl Fischer).

Experimentación

La Etapa 2 (1 eq. reactivo limitante) se cargó al recipiente
5 seguido de THF (5 vol. wrt la carga de la Etapa 2). La mezcla se enfrió a 0 °C y se agregó a gotas una solución de THF 1M de LiAlH_4 (3 eq.) durante 30-45 minutos manteniendo la temperatura a 0-20 °C. Después de la adición, la reacción se agitó durante 30 minutos a 10-20 ° C y luego se calentó a reflujo y se agitó
10 durante ~16 h. Se tomaron muestras de la reacción y analizaron en cuanto a su compleción, se enfriaron 0 ° C y se inactivaron mediante la adición a gotas de acetona (9.3 eq.) a 0-30 °C seguido de una solución acuosa de ácido cítrico al 20% (1.9 vol. wrt la carga de la Etapa 2) a 0-30 °C. El pH de la adición
15 se controló para garantizar que permaneciera a un $\text{pH} > 11$ y la adición se inactivó antes de lo necesario. La suspensión resultante se agitó durante 1 hora y se filtró, lavando con THF (2 vol. wrt la carga de la etapa 2) para eliminar las sales de Li y Al. La torta del filtro se suspendió en THF (12.5 vol.
20 wrt la carga de la Etapa 2) durante ~1 hora y se filtró, lavando con THF (5 vol. wrt la carga de la Etapa 2) para recuperar el producto de las sales de Li y Al. Los orgánicos combinados se secaron en presencia de MgSO_4 y se filtraron. El producto filtrado se evaporó *in vacuo* hasta que quedaron aproximadamente

10 volúmenes (wrt a la carga de la Etapa 2) y esta solución se aplicó a una almohadilla de sílice (3 eq. wrt la carga de la Etapa 2). La almohadilla de sílice se eluyó con THF y las fracciones del producto se combinaron y se evaporaron a sequedad *in vacuo*. La Etapa 3 en crudo (Psilocina) se suspendió en 1:1 iPrOAc:TBME (5 vol. wrt la masa en el paso 18) durante 2-18 horas, se filtró, lavando con TBME (2.5 vol. wrt la masa en el paso 18) y se secó *in vacuo* a 40 °C para aislar Psilocina pura.

10 Las diferencias con JNP y los beneficios se pueden resumir de la siguiente manera:

En primer lugar, el Solicitante, mientras usaba THF como solvente, inactivó la reacción usando acetona. Esto conduce a una suspensión/emulsión sin espesamiento.

15 En segundo lugar, el Solicitante se inactivó con ácido cítrico manteniendo un pH básico, típicamente aproximadamente 11. El control del pH aseguró que se obtuvieran altos rendimientos.

En tercer lugar, después de la purificación por almohadilla de sílice, para eliminar las sales residuales de Li/Al, eluyendo con THF, una suspensión de iPrOAc:TBME proporciona un producto altamente purificado que luego se seca.

Ejemplo 5

Etapa 4

Inicialmente, las condiciones de la literatura se usaron para procesar una muestra de 2.58 g que proporcionó ~88% de conversión al Intermediario 4A cuando se analizó por HPLC. El producto se purificó mediante la adición de aminopropil sílice y filtración a través de Celite. El aceite verde resultante (5.5 g) se suspendió en DCM lo que posibilitó la transferencia de bencilo y la precipitación de la etapa 4 zwitteriónica (4.1 g, 70% de rendimiento, ~95% por RMN).

Paso i

El desarrollo inicial en esta etapa se focalizó en encontrar una alternativa a $n\text{BuLi}$ que fuera más fácil de manejar e idealmente no introdujera más litio en la síntesis. Se realizó una selección inicial de las condiciones alternativas que incluía las siguientes bases: Li^tBuO , K^tBuO , NaH , NaHMDS , y NaNH_2 . Todas las reacciones formaron producto en donde NaHMDS funcionó tan bien como $n\text{BuLi}$. Todas las reacciones se tornaron muy espesas, observándose gelificación, y se recomendó agitación superior como una agitación eficiente.

La selección inicial sugirió que NaHMDS sería una alternativa adecuada a $n\text{BuLi}$ (81% de conversión a producto/Intermediario 4A). Estas condiciones se aumentaron en escala hasta 1.5 g junto con una reacción de referencia con $n\text{BuLi}$. Se usó agitación superior en ambos casos.

Tabla 20 - Comparación de $n\text{BuLi}$ y NaHMDS

	Punto de tiempo	HPLC - $n\text{BuLi}$	HPLC - NaHMDS
5	1 hr, - 30°C	6.6% St 3, 78% Int 4A, 1% St 4	<1% St 3, 78% Int 4A, 4% St 4
	2 hr, 0°C	6.5% St 3, 77% Int 4A, 1% St 4	<1% St 3, 76% Int 4A, 4% St 4
	Producto crudo	4.89 g <1% St 3, 2% Int 4A, 60% St 4	4.38 g <1% St 3, 5% Int 4A, 68% St 4

Abreviaturas usadas en la tabla: St 3 = Etapa (*Stage*) 3,

10 Int 4A = Intermediario 4A, St 4 = Etapa 4

El perfil de reacción obtenido en ambos casos fue muy similar con la reacción de NaHMDS que ofreció el consumo de la Etapa 3. Ambas reacciones se filtraron sobre Celite para eliminar un precipitado blanco y se concentraron. Por RMN, el

15 exceso de protones de bencilo estaba presente en ambos casos (especialmente en el ejemplo con $n\text{BuLi}$) y el rendimiento aislado fue >100%. Las condiciones de NaHMDS resultaron exitosas, ofreciendo un perfil de reacción favorable y fueron elegidas para un mayor aumento en escala. Sin embargo, se

20 requirió el desarrollo de tratamiento final y purificación.

Paso ii

Los datos de HPLC indicaron que el material aislado de los ensayos anteriores usando NaHMDS y ⁿBuLi se había reorganizado para obtener la Etapa 4 zwitteriónica tras la concentración. La purificación de este material lejos de los sub-productos del ácido bencilfosfórico y otras impurezas se intentó mediante suspensión en un número de solventes.

Tabla 21 - Purificación de ensayo del producto crudo de la Etapa 4

10

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

15

Abreviaturas usadas en la tabla: St 4 = Etapa (**Stage**) 4

*filtración deficiente

Se obtuvieron sólidos blancos de varios solventes; sin embargo, los sólidos obtenidos de DCM y TBME se convirtieron en una goma de color púrpura pálido cuando se almacenaron durante el fin de semana. Aquellos obtenidos a partir de IPA y acetona se mantuvieron como sólidos blancos de libre flujo durante el almacenamiento, lo que sugiere que la estabilidad

20

de estos sólidos probablemente fuera mayor y que permitirían un manejo más fácil.

Las suspensiones en IPA y acetona se aumentaron en escala hasta 1 g. Sin embargo, se observó engomado inmediatamente después de la adición del solvente. La goma se dispersó lentamente mediante agitación vigorosa y eventualmente mostró signos de cristalización, formándose una suspensión blanca después de agitar toda la noche. Sin embargo, este proceso no fue adecuado para el aumento en escala. Los sólidos se aislaron en buen rendimiento, donde IPA ofreció la pureza más alta.

También se investigó el THF puesto que tuvo la ventaja de ser también el solvente de reacción. Sin embargo, cuando esto se ensayó, se observó nuevamente la formación inicial de goma (aislado ~80% de rendimiento, ~92% por HPLC). Para intentar evitar la formación de goma y ofrecer una cristalización más controlada, la Etapa 4 en crudo se solubilizó primero en un volumen bajo de DMSO (2 vol.). Luego se agregó THF a esto (10 vol.) y la solución se agitó durante el fin de semana. Esto lentamente generó la precipitación del producto, que se recogió por filtración y se lavó con THF para producir la Etapa 4 (86% de rendimiento) con 96% de pureza por HPLC (>95% por RMN).

Como la cristalización de THF fue exitosa y se observó previamente que se produjo la conversión completa a la Etapa 4 zwitteriónica durante la concentración de los licores de

reacción (THF/EtOAc) a 40 °C, se esperaba que los cambios de solvente pudieran evitarse y el producto se cristalizara directamente agitando la mezcla de reacción a 40 °C.

Se llevaron a cabo dos reacciones de 4 g de NaHMDS; ambas
5 reacciones llegaron a completarse con ~80% de conversión al Intermediario 4A. Una reacción se diluyó con EtOAc y la otra con THF, y ambas se filtraron para eliminar los sub-productos de fosfato. Con el fin de reducir aún más los niveles de impurezas de fosfato, se realizó un lavado con salmuera y los
10 orgánicos se secaron y se concentraron a 10 vol. Estas soluciones se agitaron toda la noche a 40 °C para ofrecer conversión a, y precipitación de, la Etapa 4 (~1% Etapa 3, ~0.2% Intermediario 4A, ~82% Etapa 4). Los sólidos se recogieron por filtración, formando 8.03 g (88% de rendimiento)
15 de EtOAc/THF y 5.65 g (62% de rendimiento) de THF. Los sólidos de color marrón/gris obtenidos de EtOAc/THF tuvieron menor pureza (~90% por HPLC, 78% por ensayo) en comparación con los sólidos de color blanco obtenidos de THF (97% por HPLC, 88% por ensayo). El análisis de la capa acuosa de la reacción de
20 THF mostró que el producto estaba presente y se incurrió en pérdidas adicionales en el filtrado de THF final.

Debido a la mayor pureza obtenida a partir del THF, este solvente se investigó más a fondo para optimizar la recuperación. El lavado con salmuera se omitió debido a las

pérdidas de producto en la capa acuosa, y la mezcla de reacción se concentró adicionalmente después de la reacción para minimizar las pérdidas durante el paso final de filtración. Este nuevo procedimiento se ensayó en una escala de 75 g con 5 porciones de la mezcla de reacción concentradas a 8 vol. y 6 vol. Tras la filtración, no se observó diferencia en el rendimiento entre las dos porciones con un rendimiento global de 140.4 g (90% por ensayo de RMN, 74% de rendimiento de activo, 90% por HPLC).

10 **Seguimiento de impurezas**

Se observaron tres impurezas principales en el producto aislado, con identidades para dos de estas especies propuestas sobre la base de datos de MS.

Se demostró que la impureza desbencilada (típicamente ~2-15 5% por HPLC) proporciona psilocibina durante la hidrogenación siguiente y, por lo tanto, podría tolerarse a un nivel superior. La principal impureza observada en la Etapa 4 aislada (típicamente ~5-8% por HPLC) fue la impureza de anhídrido. De esto se hizo un seguimiento a través de la hidrogenación 20 posterior y demostró que se elimina fácilmente por re-cristalización de agua como la impureza de pirofosfato altamente soluble que se obtiene de la desbencilación. Se encontró que la otra impureza principal observada (m/z 295.2 observada por LCMS) estaba controlada a menos del 2% limitando

la temperatura de reacción (por debajo de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$) y no se observó en Psilocibina después de la hidrogenación.

El perfil de impurezas del lote de 140 g producido anteriormente mostró 90.0% de Etapa 4, 6.4% de impureza de anhídrido, 0.2% de impureza N-desbencilada y 1.2% de la impureza m/z 295.2.

Síntesis de GMP

El primer lote de Etapa 3 a gran escala (544 g de entrada) se completó utilizando el procedimiento establecido para obtener 213.5 g (53% de rendimiento, 99% por HPLC). Un segundo lote (628.2 g de entrada) también se procesó con éxito para obtener 295.2 g (66% de rendimiento, 99% por HPLC).

Se observó cierta variabilidad en el rendimiento en esta etapa en 3 lotes a gran escala (57%, 53% y 66%). Esto es probablemente una consecuencia de pequeñas diferencias en el procedimiento de tratamiento final e inactivación.

Experimentación

La Etapa 3 se cargó en un recipiente seguido de THF (15 vol. wrt la carga de la Etapa 3) y se enfrió a $\leq -50\text{ }^{\circ}\text{C}$ usando un baño de hielo seco/acetona. Se cargó una solución de NaHMDS 1 M en THF (1.13 eq.) manteniendo una temperatura de $\leq -45\text{ }^{\circ}\text{C}$, objetivo $<-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. La reacción se agitó durante 30 minutos a una temperatura de -60 a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se cargó tetrabencilpirofosfato (2.26 eq.) a la reacción en una única

porción seguido de THF adicional (20 vol.) mientras se mantenía la temperatura de reacción $< -30\text{ }^{\circ}\text{C}$. La reacción se calentó a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 1.5 - 2 horas, y se tomaron muestras para determinar la compleción. La reacción se filtró para eliminar las sales de fosfato lavando con THF (8 vol.). El producto filtrado se concentró hasta que quedaron 6-8 vol. y se agitó toda la noche a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ para convertir el Intermediario 4A al producto de la Etapa 4. Se tomaron muestras de la reacción para determinar la compleción, y luego se filtró y el sólido se lavó con THF (2 vol.). El producto de la Etapa 4 se secó en un horno de vacío a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las diferencias con JNP y los beneficios se pueden resumir de la siguiente manera:

Paso i

En primer lugar, se introdujo hexametildisilazida de sodio para consolidar la desprotonación. Esto demostró ser una alternativa efectiva al butil litio, que era más fácil de manejar, y no introdujo más litio en la reacción.

En segundo lugar, diluyendo la reacción con THF, se obtuvo un Intermediario 4A de mucho mayor pureza.

En tercer lugar, controlando la temperatura de reacción por debajo de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, la indeseable mz 295.2 observada por LCMS se controló a niveles inferiores al 2%.

Paso ii

En cuarto lugar, al monitorear los niveles de impurezas de la Etapa 4A, particularmente la Etapa 4 N-desbencilada (Tabla 7) y la Etapa 4 de anhídrido (Tabla 7), es posible producir un producto puro en forma reproducible.

- 5 La conversión de la Etapa 4A intermedia a la Etapa 4 se puede llevar a cabo en el solvente de reacción, evitando la necesidad de intercambios de solventes que consumen mucho tiempo.

- 10 Finalmente, el sólido obtenido se lava con THF y se seca en horno para obtener la Etapa 4.

Ejemplo 6

Etapa 5

- Se observó envenenamiento del catalizador durante el desarrollo de esta etapa y se puede incluir un paso de carbonización en el proceso cuando sea necesario para evitar la hidrogenación incompleta. Sin embargo, la carbonización no se requiere de manera rutinaria.
- 15

- Después de rociar con hidrógeno durante 3 horas, las reacciones típicas mostraron altos niveles de compleción (>90% de producto, 3-5% de SM restante). Se agregó una pequeña cantidad de agua para ayudar a la solubilidad y después de rociar con hidrógeno durante 1 hora más, se logró el consumo de Etapa 4.
- 20

Se trató una reacción exitosa por filtración, seguido de

evaporación para eliminar el metanol, dejando el producto como una suspensión espesa en agua. Se agregó etanol y el sólido se filtró para formar Psilocibina en un rendimiento del 69%. La ^1H RMN confirmó la identidad del producto pero indicó la presencia de una impureza relacionada menor. El análisis de LCMS indicó una pureza del 95.2% donde la impureza principal (4.1%) se identificó como la impureza de ácido pirofosfórico. (Tabla 7) derivada de la impureza de anhídrido en la Etapa 4. Más tarde se demostró que esta impureza se purgó efectivamente durante la re-cristalización del producto final (Etapa 6).

Luego se llevó a cabo una reacción adicional usando material de la Etapa 4 del tratamiento de THF finalizado que era 88.0% puro por HPLC y contenía 7.3% de Etapa 4 N-desbencilada (convertida a producto), sin ninguna impureza de anhídrido. Nuevamente se observó la compleción y la reacción se trató como anteriormente para obtener Psilocibina con un rendimiento del 46%. Se consideró que el bajo rendimiento fue el resultado de la precipitación del producto durante el paso de filtración del catalizador. La ^1H RMN confirmó la identidad del producto y la HPLC indicó una pureza del 98.9%.

El desarrollo adicional de las condiciones de reacción se llevó a cabo para optimizar el volumen de agua empleado y minimizar las pérdidas de producto durante el paso de filtración. Después de la reacción, se obtuvo una solución

mediante la adición de 10 volúmenes de agua con calentamiento a 40 °C. Esto permitió la eliminación del catalizador por filtración sin incurrir en pérdidas de producto en el filtración.

5 Parte de la Etapa 3 se generó por hidrólisis durante la reacción y el tratamiento final con niveles de aprox. 1 - 2.5% parece ser típico del proceso. Se demostró una reducción en el nivel de la Etapa 3 durante la re-cristalización del producto final.

10 **Aumento en Escala**

El lote de la Etapa 4 a gran escala (no GMP) se procesó como un lote único (148 g de entrada activa). El consumo de la Etapa 4 se logró con 88% de producto y 0.9% de Etapa 3 como resultado de la hidrólisis. La impureza de anhídrido (6.4%) se convirtió
15 completamente en la correspondiente impureza de ácido pirofosfórico (5.2%).

La hidrogenación a gran escala se filtró y se concentró para producir 109 g de producto crudo después de retirar el etanol para reducir el contenido de agua (~71% por ensayo de
20 RMN, rendimiento del 86%).

Experimentación

Se cargó 10% de Pd/C (~50% humedecido en agua, tipo 87L, 0.1 x carga de Etapa 4) a un recipiente bajo N₂ seguido de metanol (20 vol. wrt la Etapa 4) y Etapa 4. El N₂ se reemplazó con H₂

y la reacción se agitó bajo H_2 (presión atmosférica) durante 1-2 horas. Se tomaron muestras de la reacción para determinar su compleción, y luego se agregó agua (10 vol. wrt la Etapa 4) manteniendo una temperatura de $<25\text{ }^{\circ}\text{C}$. La mezcla se agitó

5 durante otras 1-2 horas bajo H_2 (presión atmosférica). Se tomaron muestras de la reacción y se controlaron para determinar su compleción.

Si la reacción estaba incompleta, el H_2 se recargó y la reacción continuó durante otras 1-12 horas hasta de observar

10 su compleción. La reacción se colocó luego bajo N_2 y se calentó a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo durante 15-45 minutos. La reacción se filtró a través de Celite para eliminar el catalizador, lavando con metanol (13.3 vol. wrt la carga de la Etapa 4) y agua (6.7 vol. wrt la carga de la Etapa 4). El producto filtrado se

15 concentró *in vacuo*, formando un azeótropo con etanol para eliminar el agua hasta que se obtuvo un sólido. Las diferencias con JNP y los beneficios se pueden resumir de la siguiente manera:

En primer lugar, la reacción se controla en cuanto a los

20 niveles de intermediarios por HPLC, usando tiempos de retención relativos (RRT, *Relative Retention Times*) y la compleción se controla, con intermediarios que están presentes a menos del 0.2%. La impureza de ácido pirofosfórico de la Etapa 5 también se controla cuidadosamente para confirmar que se puede

controlar en la re-cristalización final.

El proceso final de la Etapa 6 es como se describe en el Ejemplo 1.

Ejemplo 7

5 Metodología y Protocolos de Evaluación

Para evaluar la pureza, etc., se empleó la siguiente metodología/protocolos.

RMN

Los espectros de ^1H y ^{13}C RMN de Psilocibina en D_2O se obtuvieron usando un espectrómetro de 400 MHz. Los cambios químicos se informan en ppm en relación con D_2O en ^1H RMN (4.75 ppm) y en relación con MeOH (49.5 ppm), que se agregó como referencia, en el espectro de ^{13}C RMN. Los valores de la literatura para Psilocibina se informan en JNP. El análisis de Psilocibina por RMN arrojó datos que eran consistentes con la estructura y consistentes con los informados en la literatura con solo pequeñas variaciones en los cambios químicos para los protones cerca de los grupos ionizables que se espera ya que la naturaleza zwitteriónica del compuesto hace que el material sea muy sensible a los pequeños cambios en el pH.

Los datos de ^1H RMN y ^{13}C RMN se resumen a continuación y los espectros se muestran en las Figuras 10 y 11.

Datos de ^1H RMN (400MHz, D_2O): 2.79 (s, 3H), 3.18 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 2H), 3.31 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 2H), 6.97 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H),

7.08 (s, 1H), 7.10 (t, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.19 (d, 8.2Hz , 1H).

Datos de ^{13}C RMN (400MHz, D_2O (+ MeOH traza): 22.3 (1 x CH_2), 43.4 (2 x CH_3), 59.6 (1 x xCH_2), 108.4 (1 x CH), 108.6 (1 x C), 109.5 (1 x CH), 119.1 (d, $^3J_{\text{P-H}}=6.7\text{Hz}$, 1 x C), 123.3 (1 x
 5 CH_2), 124.8 (1 x CH), 139.3 (1 x C), 146.3 (d, $^2J_{\text{P-H}}=6.7\text{Hz}$, 1 x C).

7.2 FT-IR

Los datos se recopilaron en un espectrómetro Perkin Elmer Spectrum Two™ con el accesorio UATR Two. Análisis de
 10 psilocibina (Lote: AR755) por espectroscopía FT-IR arrojó un espectro (Figura 12) que es consistente con la estructura propuesta. El pico amplio a 3244 cm^{-1} es típico de una sal de amina. El resto de los picos están en la región de huellas digitales y, por lo tanto, no se pueden asignar
 15 individualmente.

7.3. Espectrometría de Masas

El espectro de masas de psilocibina (AR755) se obtuvo en un espectrómetro de masas de trampa de iones Bruker Esquire 3000 plus y fue concordante con la estructura. El espectro de masas
 20 (Figura 13) mostró un pico principal a $m/z = 284.8$ y 568.1 que correspondía a $(\text{M}+\text{H})^+$ y $(2\text{M}+\text{H})^+$ de psilocibina. Esto significó que el ion molecular tiene m/z 284 correspondiente a la fórmula molecular de la psilocibina ($\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$) (Figura 14).

Residuo de Ignición

El método basado en el residuo de ignición sigue el método de la farmacopea con un ajuste. Se obtuvieron resultados inconsistentes cuando el crisol se calentó a 500 °C, y se cree que esto se debe a la baja volatilidad de los residuos de fosfato que son generados. Por lo tanto, la temperatura se incrementó a 800 °C para la psilocibina y se obtuvieron resultados consistentes y precisos.

7.5 HPLC - Ensayo y Determinación de la Pureza

El método de HPLC utilizado para el ensayo, pureza química y cuantificación de las impurezas de psilocibina es un método de HPLC-UV en gradiente, y las condiciones se destacan en la Tabla 22. Se utilizan estándares externos para la cuantificación. Aproximadamente 1 mg/mL de psilocibina se disolvió en agua purificada:MeOH (95:5). Someter a sonicación para disolver completamente.

La pureza por HPLC se calcula sobre la base del % de área y se correlaciona contra un estándar de tiempo de retención conocido.

El ensayo por HPLC se calcula sobre una base anhidra, basada en el % en peso frente a un estándar de pureza y composición conocidas.

Tabla 22: Condiciones típicas de HPLC para identificación, pureza y ensayo

	Parámetro	Condiciones		
5	Sistema	Cromatógrafo líquido serie Agilent 1100 o equivalente		
	Columna	XBridge C18, 4.6 x 150mm; 3.5 µm (Ex; Waters PN:186003034)		
	Tasa de flujo	1.0ml.min ⁻¹		
	Volumen de inyección	5µl		
	Detección	UV a 267nm		
	Temperatura de la columna	30°C		
10	Fase móvil	A - Agua purificada : Metanol : TFA (95:5:0.1) B - Metanol : Agua purificada : TFA (95:5:0.1)		
	Gradiente	Tiempo (mins)	%A	%B
		0	100	0
		2	100	0
		15	0	100
		20	0	100
15		22	100	0

7.6 Contenido de solvente residual por HRGC

El método de HRGC para cuantificar solventes residuales es un método de espacio de cabeza y se describe en la Tabla 23 que sigue:

Tabla 23: Método típico de GC con solvente residual

	Parámetro	Condiciones
5	Sistema	Agilent 6890/7890 HRGC o similar
	Columna	DB-624 60m x 0.32 mm, espesor de película de 1.80 µm (o equivalente)
	Programa de horno	40 °C (mantener durante 15min) luego subir (20°C.min ⁻¹) a 200 °C (mantener 5 min)
10	Parámetros de espacio de cabeza	125°C
	Temp. de horno	140°C
	Temp. de ciclo	150°C
	Temp. de línea de transferencia	
	Relación de división	10:1
	Temperatura del inyector	200°C
	Temperatura del detector	250 °C, FID
	Presión de cabeza	15 psi, presión constante
	Gas portador	Nitrógeno
15	Flujo de columna	2.0 ml.min ⁻¹ a 40 °C
	Estándar interno	1.2-Difluorobenceno

Se determinan los niveles de los siguientes solventes y reactivos: Metanol, Etanol, THF y Tolueno.

7.7 Punto de Fusión por DSC

Los datos de DSC se recopilaron en un instrumento de DSC
 20 PerkinElmer Pyris 6000 (o similar). El instrumento se verificó en cuanto a la calibración de energía y temperatura utilizando indio certificado. La muestra se pesó (típicamente de 0.5 a 3.0 mg) en una cápsula de muestra de aluminio con orificios. La cápsula se sella con una tapa para cápsula de aluminio. La

cápsula se calentó a 20 °C/min de 30 a 300 °C con una purga de nitrógeno seco a 20 mL/min. Durante el procedimiento de punto de fusión, cada lote de Polimorfo A o A' de psilocibina exhibió dos eventos endotérmicos, el primero de los cuales se atribuyó a la transición sólido-sólido del Polimorfo A o A' al Polimorfo B, y el segundo de los cuales se atribuyó a la fusión del Polimorfo B.

7.8 Polimorfismo por XRPD

La forma en estado sólido de psilocibina es determinada por XRPD. Los difractogramas de XRPD se recolectaron en un difractómetro (tal como un PANalytical X'Pert PRO o equivalente) usando radiación Cu K α (45 kV, 40 mA), goniómetro θ - θ , espejo de enfoque, rendija de divergencia (1/2"), rendijas Soller en ambos haces incidente y divergente (4 mm) bajo condiciones ambientales. El rango de recopilación de datos fue de 3-35°2 θ con una velocidad de exploración continua de 0.2°s⁻¹. El difractograma resultante se compara con el de un difractograma de referencia del Polimorfo A o A' para garantizar que sea concordante (Figura 7a o 7b respectivamente).

7.9 Análisis Termo-Gravimétrico (TGA)

Los datos de TGA se recopilieron en un instrumento de TGA PerkinElmer Pyris 1 (o similar). El instrumento fue calibrado usando un peso certificado y Alumel y Perkalloy certificados

para temperatura. Se cargó una cantidad predefinida de muestra (típicamente aproximadamente 5 mg) en un crisol de aluminio, y se calentó a 20 °C/min desde la temperatura ambiente hasta 400 °C. Se mantuvo una purga de nitrógeno a 20 mL/min sobre la muestra.

7.10 Pérdida Por Secado

Determinar por duplicado la pérdida por secado de la muestra usando una porción de 1 g, pesada con precisión, secada a 70 °C, bajo vacío a peso constante.

10 Cálculo:

$$\% \text{ Pérdida por secado} = \frac{(P_{\text{INICIAL}} - P_{\text{FINAL}})}{P_{\text{MUESTRA}}} \times 100$$

donde:

P_{INICIAL} = Peso inicial de plato y muestra antes del secado (g)

15 P_{FINAL} = Peso final de plato y muestra secada (g)

P_{MUESTRA} = Peso de la muestra (g)

EJEMPLO 8

Estudios de degradación forzada

20 El principio activo psilocibina se sometió a estrés bajo diversas condiciones en solución y en estado sólido para proporcionar muestras para evaluar la selectividad de método analítico.

Se realizó el estudio de degradación forzada sobre la psilocibina; basado en los requisitos de ICH Q1A (R2). La

evaluación bajo condiciones de estrés ha brindado información sobre las potenciales vías de degradación y la estabilidad intrínseca de la psilocibina. El método analítico optimizado empleado demostró especificidad a la psilocibina; se demostró

5 que era adecuado y se pueden detectar cambios en la identidad, la pureza y la potencia del producto utilizando este método. También se ha demostrado que el método utilizado está libre de interferencias de probables impurezas y productos de degradación de acuerdo con ICH Q2 (R1) (Validación de

10 procedimientos analíticos) con referencia a la especificidad. Por lo tanto, el método de HPLC se considera adecuado para determinar la pureza de la psilocibina y las impurezas relacionadas.

La muestra de control de psilocibina fue estable en

15 solución durante el período de estudio (el período de estudio fue de 7 días para las muestras sin fotoestabilidad). La psilocibina se degradó lentamente cuando se calentó en solución produciendo psilocina como la impureza principal. La psilocibina también fue estable bajo condiciones ácidas a

20 temperatura ambiente. Sin embargo, a 60 °C se observó una degradación lenta y constante que producía psilocina como la impureza principal. La psilocibina fue ligeramente inestable a temperatura ambiente en presencia de una base con degradación lenta a un rango de impurezas durante el período de estudio.

Solamente se formaron niveles muy bajos de impurezas bajo las condiciones de peróxido con una caída de la pureza global de ~0.5%. En estado sólido, se observó una lenta degradación química (3 días a 150 °C) predominantemente produciendo

5 psilocina (etapa 3) como impureza. La psilocibina fue estable bajo condiciones de fotoestabilidad tanto como sólida cuanto como estaba en solución.

Estudios de estabilidad

Se realizaron estudios de estabilidad con dos lotes de

10 psilocibina como se muestra en la Tabla 24.

Tabla 24

15

20

Número de estudio/ inicio de estudio	Principio activo, Lote No.	Empaque	Sitio de fabricación	Uso de lote	Condición de almacenamiento	Puntos de tiempo previstos/ estado del estudio
ONYXSTAB 0138	GM764B	Bolsas dobles de polietileno grado alimenticio Recipiente de polietileno exterior	Onyx Scientific	Est. de ref.	2-8°C 25°C/60% HR 40°C/75% HR	1,3,6 meses en curso 1,3,6 meses en curso 1,3,6 meses en curso
ONYXSTAB 0139	170231	Bolsas dobles de polietileno grado alimenticio Recipiente de polietileno exterior	Onyx Scientific	Clínico	2-8°C 25°C/60% HR 40°C/75% HR	1,3,6,9,12,18,24,36 meses en curso 1,3,6,9,12,18,24,36 meses en curso 1,3,6 meses en curso

Las muestras se colocaron en bolsas dobles de polietileno de grado alimenticio y se sellaron en un recipiente de polietileno exterior y se almacenaron a 2-8 °C, 25 °C/60% de HR y 45 °C/75% HR, se incluye una bolsa desecante entre bolsas de polietileno interiores para evitar la absorción de humedad. Se realizaron pruebas de apariencia, contenido de agua, pureza y ensayo.

Los protocolos para los dos estudios se muestran en la Tabla 25 y la Tabla 26.

Los datos de estabilidad de un mes y tres meses para el lote GM764B se detallan en la Tabla 27 y la Tabla 28 a continuación. Los datos de estabilidad de uno, tres, seis, nueve y doce meses para el lote GMP 170231 se brindan en la Tabla 29, Tabla 30, Tabla 31, Tabla 32 y Tabla 33, respectivamente, a continuación.

Tabla 25

Hoja de protocolo de ensayo de estabilidad Onyx

5	Producto:	Psilocibina	Número de ensayo Onyx:	ONYXSTAB0138		
	Número de lote:	GM764B	Fecha límite de inicio de ensayo:	10 MAR 2017		
10	Método de prueba:	N/D	Fecha de fabricación:	06 FEB 2017		
	Información adicional:	1200 mg de material requerido en cada recipiente.				
15	Componentes de empaque:	Doble bolsa de polietileno forrada contenida dentro de un recipiente de HDPE de 300 ml (grado alimenticio). Inserte una bolsa desecante entre las dos bolsas de polietileno.				
	<u>Parámetros de prueba</u>					
20	<u>Pruebas</u>	Apariencia				
	<u>de</u>	Ensayo (base anhidra) por ¹ H-RMN				
	<u>rutina</u>	Contenido de agua ante pérdida por secado				
		Pureza química/Impurezas por HPLC				
	Meses	1	3	6	Repuestos	Total
	2°C-8°C	X	X	X	2	5
	25°C/60%HR	X	X	X	2	5
	40°C/75%HR	X	X	X	0	3
	Fecha final	10ABR17	10JUN17	10SEP17		13

Tabla 26

Hoja de protocolo de ensayo de estabilidad Onyx

5	Producto: Psilocibina					Número de ensayo ONYXSTAB0139					
	Onyx:										
	Número de lote: 170231					Fecha límite de inicio de ensayo: 31 MAR 2017					
10	Método de prueba: SS/PSILOCIBINA/					Fecha de fabricación: 27FEB2017					
	Información adicional: 2200mg de material requerido en cada recipiente.										
	Componentes de empaque: Doble bolsa de polietileno forrada contenida dentro de un recipiente de HDPE de 300 ml (grado alimenticio). Inserte una bolsa desecante entre las dos bolsas de polietileno.										
15	<u>Parámetros de prueba</u>										
	<u>Pruebas de rutina</u>										
	Apariencia Ensayo (en base seca) por HPLC Contenido de agua ante pérdida por secado Pureza química/Impurezas por HPLC										
20											
	Punto de tiempo	1 mes	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	36 meses	Repuestos	Total
	2-8°C	X	X	X	X	X	X	X	X	2	10
	25°C/60%HR	X	X	X	X	X	X	X	X	2	10
	40°C/75%HR	X	X	X						1	4
	Fecha final	31ABR17	30JUN17	30SEP17	31DEC17	31MAR18	30SEP18	31MAR19	31MAR20		24

Tabla 27: Datos de estabilidad de un mes para el lote GM764B

	Prueba	Límite de especificación	T=0	T=1 mes	T=1 mes	T=1 mes
5	Condición	N/D	N/D	2°C-8°C	25°C/60%HR	40°C/75%HR
	Apariencia	Solamente a título informativo.	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible
10	Ensayo por ¹ H-RMN	Solamente a título informativo.	97% p/p	99% p/p	98% p/p	96% p/p
15	Contenido de agua ante pérdida por secado	Solamente a título informativo.	0.86% p/p	0.35% p/p	0.20% p/p	0.14% p/p
	Pureza química por HPLC	Solamente a título informativo.	99.24%	99.24%	99.22%	99.23%
20	Impurezas por HPLC: (Citar todos GT 0.05%)	Solamente a título informativo. RRT 0.86 RRT 1.46 RRT 1.59 (Psilocina) Impurezas en total	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%

Tabla 28: Datos de estabilidad de tres meses para el lote GM764B

	Prueba	Límite de especificación	T=0	T=3 mes	T=3 mes	T=3 mes
5	Condición	N/D	N/D	2°C-8°C	25°C-60%HR	40°C-75%HR
10	Apariencia	Solamente a título informativo.	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible
	Ensayo por ¹ H-RMN	Solamente a título informativo.	97 % P/p	97% P/p	99% P/p	97% P/p
15	Contenido de agua ante pérdida por secado	Solamente a título informativo.	0.86% P/p	0.26% P/p	0.08% P/p	0.14% P/p
	Pureza química por HPLC	Solamente a título informativo.	99.24%	99.31%	99.27%	99.26%
20	Impurezas por HPLC: (Citar todos GT 0.05%)	Solamente a título informativo. RRT 0.86 RRT 1.46 RRT 1.59 (Psilocina)	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%
		Impurezas en total				

Tabla 29: Datos de estabilidad de un mes para Lote 170231

	Prueba	Límite de especificación	T=0	T=1 mes	T=1 mes	T=1 mes
5	Condición	N/D	N/D	2°C-8°C	25°C/60%HR	40°C/75%HR
	Apariencia	Solamente a título informativo.	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible
10	Pureza química por HPLC	Solamente a título informativo.	99.28%	99.20%	99.16%	99.17%
15	Impurezas por HPLC: (Citar todos GT 0.05%) RRT 1.49 RRT 1.62 (Psilocina) RRT 1.70 Impureza a RRT 1.89 Impureza a RRT 2.45 Impurezas LT 0.05% Impurezas en total	Solamente a título informativo.	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%
20	Ensayo por HPLC (en base seca)	Solamente a título informativo	98.65% P/p	98.76% P/p	97.98% P/p	98.52% P/p
	Contenido de agua ante pérdida por secado	Solamente a título informativo.	0.32% P/p	0.27% P/p	0.17% P/p	0.19% P/p

Tabla 30: Datos de estabilidad de tres meses para Lote 170231

	Prueba	Límite de especificación	T=0	T=3 meses	T=3 meses	T=3 meses
5	Condición	N/D	N/D	2°C-8°C	25°C/60%HR	40°C/75%HR
	Apariencia	Solamente a título informativo.	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible
10	Pureza química por HPLC	Solamente a título informativo.	99.28%	99.30%	99.31%	99.17%
15	Impurezas por HPLC: (Citar todos GT 0.05%) RRT0.69 RRT 1.49 RRT 1.62 (Psilocina) RRT 1.70	Solamente a título informativo.	LT0.05% 0.06% 0.39% 0.05% LT 0.05% LT 0.05% 0.22%	0.05% 0.05% 0.37% LT 0.05% LT 0.05% LT 0.05% 0.22%	LT0.05% 0.05% 0.36% LT 0.05% LT 0.05% LT 0.05% 0.27%	LT0.05% 0.06% 0.39% LT 0.05% LT 0.05% LT 0.05% 0.34%
20	Impureza a RRT 1.89 Impureza a RRT 2.45 Impurezas LT 0.05% Impurezas en total					
	Ensayo por HPLC (en base seca)	Solamente a título informativo	98.65% P/p	98.45% p/p	99.46% P/p	98.64% P/p
	Contenido de agua ante pérdida por secado	Solamente a título informativo.	0.32% P/p	0.17% p/p	0.01% P/p	0.19% P/p

Tabla 31: Datos de estabilidad de seis meses para Lote 170231

	Prueba	Límite de especificación	T=0	T=6 meses	T=6 meses	T=6 meses
5	Condición	N/D	N/D	2°C-8°C	25°C-60%HR	40°C-75%HR
	Apariencia	Solamente a título informativo.	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible
10	Pureza química por HPLC	Solamente a título informativo.	99.28%	99.20%	99.19%	99.12%
15	Impurezas por HPLC: (Citar todos GT 0.05%) RRT0.69 RRT 1.49 RRT 1.62 (Psilocina) RRT 1.70	Solamente a título informativo.	LT 0.05% 0.06% 0.39% 0.05% LT 0.05% LT 0.05% 0.22%	0.06% 0.07% LT 0.05% 0.35% LT 0.05% LT 0.05% LT 0.05% 0.32%	0.06% 0.07% LT 0.05% 0.34% LT 0.05% LT 0.05% LT 0.05% 0.34%	0.06% 0.08% LT 0.05% 0.38% LT 0.05% LT 0.05% LT 0.05% 0.36%
20	Impureza a RRT 1.89					
	Impureza a RRT 2.45					
	Impurezas LT 0.05%					
	Impurezas en total		0.72%	0.80%	0.81%	0.88%
	Ensayo por HPLC (en base seca)	Solamente a título informativo	98.65% P/p	97.97% P/p	98.04% P/p	100.10% P/p
	Contenido de agua ante pérdida por secado	Solamente a título informativo.	0.32% P/p	0.06% P/p	0.32% P/p	2.26% P/p

Tabla 32: Datos de estabilidad de nueve meses para Lote 170231

	Prueba	Límite de especificación	T=0	T=9 meses	T=9 meses
5	Condición	N/D	N/D	2°C-8°C	25°C-60%HR
	Apariencia	Solamente a título informativo.	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible
10	Pureza química por HPLC	Solamente a título informativo.	99.28%	99.16%	99.16%
15	Impurezas por HPLC: (Citar todos GT 0.05%)	Solamente a título informativo.	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%
20	RRT0.69				
	RRT 1.49				
	RRT 1.62				
	(Psilocina)				
	RRT 1.70				
	Impureza a RRT 1.89				
	Impureza a RRT 2.45				
	Impurezas LT 0.05%				
	Impurezas en total				
	Ensayo por HPLC (en base seca)	Solamente a título informativo	98.65% p/p	97.53% p/p	98.12% p/p
	Contenido de agua ante pérdida por secado	Solamente a título informativo.	0.32% p/p	0.21% p/p	0.10% p/p

Tabla 33: Datos de estabilidad de doce meses para Lote 170231

5	Prueba	Límite de especificación	T=0	T=12 meses	T=12 meses
	Condición	N/D	N/D	2°C-8°C	25°C/60%HR
10	Apariencia	Solamente a título informativo.	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible	Un sólido blanquecino Libre de contaminación visible
	Pureza química por HPLC	Solamente a título informativo.	99.28%	99.25%	99.25%
15	Impurezas por HPLC: (Citar todos GT 0.05%)	Solamente a título informativo.	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%
20	RRT0.69 RRT 1.49 RRT 1.62 (Psilocina) RRT 1.70 Impureza a RRT 1.89 Impureza a RRT 2.45 Impurezas LT 0.05% Impurezas en total				
	Ensayo por HPLC (en base seca)	Solamente a título informativo	98.65% p/p	99.63% p/p	98.97% p/p
	Contenido de agua ante pérdida por secado	Solamente a título informativo.	0.32% p/p	0.49% p/p	0.61% p/p

Durante los primeros 12 meses del estudio de estabilidad ICH, la psilocibina ha demostrado ser químicamente estable en condiciones de temperatura baja (2-8 °C), ambiente (25 °C/60% HR) y acelerada (40 °C/75% HR). No ha habido cambios en la
5 apariencia, y el análisis por HPLC también se ha mantenido constante. El contenido de agua ha variado en todas las muestras, debido al impacto inicial y luego al envejecimiento de las bolsas desecantes usadas en el estudio.

Ejemplo 9 - Experimentación para Formar el Hidrato A

10 La psilocibina (200 mg) se cargó en un tubo de cristalización seguido de agua desionizada (4 ml). La mezcla se equilibró a 25 °C durante 2 horas antes de aislar el sólido por filtración al vacío. El material se dividió en dos partes iguales. Una porción no se sometió a un secado adicional para formar el
15 Hidrato A, lote GK2, por XRPD y DSC (difractograma y termograma consistentes con la Figura 7d y la Figura 8d, respectivamente).

Ejemplo 10- Experimentación para Formar el Polimorfo B

El Polimorfo A de psilocibina (250 mg) se cargó en un matraz de fondo redondo, se calentó a 173 °C usando un baño de aceite,
20 y se mantuvo a temperatura durante 5 minutos. El sólido se enfrió a temperatura ambiente y se aisló para proporcionar el lote GK3 con una recuperación del 93%. El análisis por XRPD y DSC reveló que el lote GK3 era Polimorfo B (difractograma y termograma consistentes con la Figura 7c y la Figura 8c,

respectivamente).

Ejemplo 11 - Investigaciones de Estado Sólido

Se completó un número de investigaciones del polimorfismo. Un resumen de las formas sólidas encontradas se muestra en la

5 Figura 17. La mayoría de las formas encontradas se derivaron de la perturbación del solvente; en algunos casos, se aislaron solvatos estequiométricos y en otros casos solvatos no estequiométricos.

Suspensiones de Polimorfo A

10 El Patrón A de psilocibina se equilibró con solventes como una ruta primaria hacia la modificación de la forma sólida y para evaluar visualmente la solubilidad del material en un rango de 24 solventes entre 25 y 50 °C.

El Patrón A de psilocibina (40 mg) se dosificó en tubos a

15 temperatura ambiente, y los solventes tal como se enuncian en la Tabla 34 se agregaron en alícuotas de 0.4 ml (10 vol.) a un volumen total de 1.2 ml (30 vol.) y se advirtieron las observaciones. Las mezclas se agitaban constantemente. El ciclado de calor se realizó de la siguiente manera: 50 °C

20 durante 18 horas, enfriar durante 2 horas a 20 °C, madurar durante 4 horas, calentar a 50 °C durante 4 horas, enfriar a 20 °C durante 2 horas, madurar durante 18 horas. Se realizó un ciclo repetido de 50 °C a 20 °C durante 24 horas y se aplicó lo siguiente:

Aislamiento posterior al calentamiento a 50 °C donde los sólidos fueron suficientes = serie A

Aislamiento posterior al enfriamiento a 20°C donde los sólidos fueron suficientes = serie B

5 Todos los sólidos aislados se secaron *in vacuo* a 50 °C durante 24 horas y se analizaron por XRPD. Las observaciones se proporcionan en la Tabla 34.

El API fue en gran medida insoluble en los solventes y mezclas de solventes se evaluaron en 30 volúmenes a 50 °C, lo
10 que generó suspensiones pesadas. El agua efectivamente solubilizó la psilocibina a 50 °C.

Tabla 34 - Observaciones tabuladas para ciclado de calor de las maduraciones de las suspensiones y uso de la mezcla del Patrón A como entrada

15

20

Entrada	Solvente	Obs. 20°C, 0.4 ml	Obs. 20°C, 0.8 ml	Obs. 20°C, 1.2 ml	Obs. 50°C	XRPD serie A	XRPD serie B
1	Ciclohexano	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	A	A
2	Clorobenceno	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	A	A
3	2-Clorobutano	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	A	A
4	Benzotrifluoruro	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

5

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	Agua	Susp.	Susp.	Susp.	Solución	n/d	A
22	4:1 EtOH/agua	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	A	A
23	4:1 THF/agua	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	A	Hidrato A
24	4:1 IPA/agua	Susp.	Susp.	Susp.	Susp.	A	C

Resultados:

En las Figuras (Figura 18 y Figura 19), "25C" denota el aislamiento del sólido a 25 °C y "50C" denota el aislamiento del sólido a 50 °C. Por ejemplo, GM832-20_50_A9 representa la entrada 20 de GM832 (MeCN) aislada a 50 °C.

10

Suspensiones a 50 °C

15

Entradas 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 22, 23, 24: Difractograma de XRPD ampliamente consistente con el Polimorfo A, pero con un pico adicional de intensidad variable a 18°2θ.

20

Entradas 6, 9, 12, 20: El difractograma de XRPD adquirido para los sólidos aislados fue ampliamente consistente (ver Figura 18) con picos adicionales a 10°2θ y 13.2°2θ observados para algunas muestras. Este difractograma de XRPD se denominó "Patrón C". No hay correlación de quimiotipos entre los solventes (CH₃NO₂, TBME, iPrOAc y CH₃CN).

Entrada 17: El difractograma de XRPD adquirido tenía múltiples picos de difracción (Figura 19). El difractograma

de XRPD se designó "Patrón D".

Entrada 18: El difractograma de XRPD adquirido tenía múltiples picos de difracción (Figura 19). El difractograma de XRPD se designó "Patrón E".

5 Entrada 19: El difractograma de XRPD adquirido tenía múltiples picos de difracción (Figura 19). El difractograma de XRPD se designó "Patrón F".

Suspensiones a 25 °C:

Entradas 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 20,
10 21, 22: Los difractogramas de XRPD son todos similares a los adquiridos para el Polimorfo A.

Entradas 6, 12, 24: Los difractogramas de XRPD adquiridos para los sólidos aislados fueron ampliamente consistentes (ver Figura 18) con el Patrón C.

15 Entrada 23: El análisis por XRPD mostró que se había formado el Hidrato A.

Entrada 17: El difractograma de XRPD adquirido tenía múltiples picos de difracción (Figura 19). El difractograma de XRPD se designó "Patrón D".

20 Entrada 18: El difractograma de XRPD adquirido tenía múltiples picos de difracción (Figura 19). El difractograma de XRPD se designó "Patrón E".

Entrada 19: El difractograma de XRPD adquirido tenía múltiples picos de difracción (Figura 19). El difractograma

de XRPD se designó "Patrón F".

Análisis de Resultados:

Los difractogramas de XRPD para los sólidos aislados a 25 °C son, en términos generales, los mismos que para los
5 difractogramas de XRPD adquiridos para los sólidos aislados a 50 °C.

Los Patrones D, E y F se obtuvieron a partir de alcoholes (MeOH, EtOH e IPA). Los estados solvatados se postularon considerando que un solvato de etanol fue previamente aislado
10 durante el desarrollo. Los difractogramas de XRPD para el solvato de etanol no son idénticos, sin embargo, dado que la variación exacta del nivel de solvente puede generar diversos estados de orden dentro de la red, la comparación entre estos difractogramas de XRPD ofrece una sólida hipótesis de que estas
15 variaciones de fase más significativas son invocadas por el arrastre de solvente.

Los patrones de XRPD D, E y F (Figura 19) son todos disimiles al difractograma de XRPD para el Hidrato (Figura 7d).

La comparación directa de los difractogramas de XRPD
20 adquiridos para los sólidos derivados de MeOH, EtOH e IPA (Patrones D, E y F - Figura 19) aislados a las dos temperaturas muestra difractogramas ajustados; los dos difractogramas de MeOH son similares, mientras que el EtOH y el IPA son directamente comparables.

El análisis por DSC se realizó sobre los sólidos aislados, y donde había suficiente muestra disponible, TGA. Los sólidos que proporcionaron los Patrones D, E y F presentan eventos endotérmicos en aprox. 170-180 °C, pero por lo demás ofrecieron

5 distintos perfiles térmicos. El análisis por TGA para el sólido aislado de suspensión de MeOH mostró una pérdida de masa prolongada de aprox. 25-190 °C (3.1%). Un solvato de metanol estequiométrico requeriría un 10.3% en peso de solvente. El análisis por TGA del sólido aislado de suspensión de EtOH

10 mostró dos pasos distintos de pérdida de masa. Se consideró que el primero ocurrido antes de 100 °C (0.3% en peso) se debía al agua, y la segunda pérdida mayor (11.5% en peso) se debía al solvente. Un solvato de etanol estequiométrico requiere un 13.9% en peso de solvente. El análisis por TGA del sólido

15 aislado de suspensión de IPA presentó dos pasos distintos de pérdida de masa. Se considera que la primera pérdida de masa antes de 100 °C (0.4% en peso) se debe al agua, mientras que la segunda pérdida mayor de masa (13.9% en peso) se debe al solvente residual. Un solvato de IPA estequiométrico requiere

20 un 17.5% en peso de solvente.

Suspensiones de Psilocibina Amorfa

A fin de generar material amorfo, se disolvió una pequeña muestra de psilocibina (0.5 g) en agua (0.5 L, 1000 vol.), se filtró con pulido, y se liofilizó. La psilocibina se recuperó

como un material fibroso blanquecino (lote MC1368A; 412 mg, 82%, amorfo por XRPD).

Para evaluar visualmente la solubilidad del API amorfo e inducir la modificación de la forma, se realizó una serie de
5 maduraciones de las suspensiones de la siguiente manera:

La psilocibina (15 mg) se cargó en tubos. Luego se agregó el solvente a temperatura ambiente (20 °C, 0.3 ml, 20 vol.) y las suspensiones se agitaron. Se hicieron observaciones. Después de 1 hora de agitación, las muestras se calentaron a
10 45 °C durante 18 horas y se realizaron observaciones. Las muestras se calentaron a 50 °C durante 8 horas y se realizaron observaciones. Las muestras se agitaron durante 72 horas a 25 °C y se sometieron a un ciclo de calor final, antes del aislamiento. Las observaciones se muestran en la Tabla 35.

15 Tabla 35 - Observaciones de Psilocibina amorfa durante el ciclado de calor de la maduración de la suspensión y destino de la forma

20

Entrada	Solvente	Obs. a 20 °C	Obs. a 45 °C	Obs. a 50 °C	Datos de XRPD
A	Ciclohexano	Susp.	Susp.	Susp.	Semi-cristalino
B	Clorobenceno	Susp.	Susp.	Susp.	Semi-cristalino
C	Clorobutano	Susp.	Susp.	Susp.	Patrón B

5	D	Benzotrifluoruro	Susp.	Susp.	Susp.	Semi-cristalino
	E	Anisol	Susp.	Susp.	Susp.	Semi-cristalino
	F	Nitrometano	Susp.	Susp.	Susp.	Patrón B
	G	CPME	Susp.	Susp.	Susp.	Semi-cristalino
	H	Heptano	Susp.	Susp.	Susp.	Semi-cristalino
10	I	TBME	Susp.	Susp.	Susp.	Semi-cristalino
	J	MIBK	Susp.	Susp.	Susp.	Semi-cristalino
	K	MEK	Susp.	Susp.	Susp.	Semi-cristalino
	L	iPrOAc	Susp.	Susp.	Susp.	Semi-cristalino
	M	EtOAc	Susp.	Susp.	Susp.	Semi-cristalino
15	N	Tolueno	Susp.	Susp.	Susp.	Similar a Solvato A
	O	THF	Susp.	Susp.	Susp.	Semi-cristalino
	P	Cloroformo	Susp.	Susp.	Susp.	Similar al Patrón E
	R	MeOH	Susp.	Susp.	Susp.	Semi-cristalino
	S	EtOH	Susp.	Susp.	Susp.	Patrón D
20	T	IPA	Susp.	Susp.	Susp.	Patrón B
	U	Acetonitrilo	Susp.	Susp.	Susp.	Amorfo
	V	Agua	Susp.	Susp.	Susp.	Similar al Patrón A
	W	4:1 EtOH/agua	Susp.	Susp.	Susp.	Similar al Patrón D
	X	4:1 THF/agua	Susp.	Susp.	Susp.	Similar al Patrón A
	Y	4:1 IPA/agua	Susp.	Susp.	Susp.	Similar al

Resultados

La mayoría de los solventes volvió a sólido, que se consideró semi-cristalino (predominantemente amorfo con una notable reflexión a aproximadamente $18^{\circ}2\theta$).

Se volvió a realmente amorfo a partir del equilibramiento en MeCN.

El Polimorfo B se recuperó a partir del clorobutano, nitrometano e IPA (Figuras 20 y 22).

5 El Patrón D, que se aisló a partir del MeOH en los experimentos de suspensión de Polimorfo A descritos anteriormente, se recuperó a partir del equilibramiento de EtOH, mientras que MeOH en este estudio devolvió un sólido semi-cristalino.

10 Los sólidos similares al Patrón A se recuperaron del agua, THF:agua e IPA:agua (4:1).

Se recuperó un sólido similar al Patrón D a partir de EtOH:agua (4:1), sustentando el hallazgo del aislamiento del Patrón D a partir de EtOH solo.

15 Se recuperó un sólido similar al Patrón E a partir de cloroformo.

De ninguno de los solventes investigados se aisló el verdadero Polimorfo A o A' después del equilibramiento prolongado y maduración térmica de la psilocibina amorfa.

20 **Ejemplo 12 - Desarrollo de Formulación.**

Se llevó a cabo una serie inicial de experimentos usando formulaciones tal como se expone en la Tabla 36 que sigue. El objetivo era identificar rellenos individuales adecuados o rellenos en combinación para la formulación a gran escala.

Tabla 36

	Nombre del material	Lote No (% p/p)		
		APL-117-6085-01	APL-117-6085-02	APL-117-6085-03
5				
	Psilocibina	1.0	1.0	1.0
	Celulosa microcristalina Ph 102	91.5	49.5	81.5
	Almidón pregelatinizado (Almidón 1500)	-	45.0	-
	Compact Cel MAB	-	-	10
10	Hidroxipropil Celulosa (Klucel EXF)	3.0	3.0	3.0
	Almidón glicolato de sodio	3.0	3.0	3.0
	Dióxido de sílice coloidal	0.5	0.5	0.5
	Estearato de magnesio (derivado de vegetal)	1.0	1.0	1.0
15	Estearil fumarato de sodio	-	-	-
	TOTAL	100.0	100.0	100.0

El resultado, en términos de propiedades fisicoquímicas clave: flujo del material, uniformidad de la mezcla, y uniformidad del contenido, se establecen en la Tabla 37 a continuación:

Tabla 37:

5	Lote No	Potencia (mg)	Flujo del material (índice de Carrs)	Uniformidad de la mezcla	Uniformidad del contenido
	APL-117-6085-01	1.0	19.1	Superior=127.9 Medio=106.4 Inferior=104.5 Media = 112.9 %RSD= 10.9	% declarado en prospecto= 92.4 AV = 7.9
10	APL-117-6085-02	1.0	19.1	Superior=115.9 Medio=106.6 Inferior=106.1 Media = 109.6 %RSD=4.9	% declarado en prospecto= 95.2 AV = 5.9
15	APL-117-6085-03	1.0	22.4	Superior=105.0 Medio=101.4 Inferior=98.7 Media =101.7 %RSD=3.8	% declarado en prospecto= 96.3 AV = 4.6

Mientras que el lote (APL-117-6085-03) mostró una buena uniformidad de la mezcla en diferentes muestras analizadas (SUPERIOR, MEDIO e INFERIOR) y muy buena uniformidad del contenido, su propiedad de flujo (basada en el índice de Carr) fue hacia el extremo superior y se predijo que la formulación no se adaptaría a cargas superiores de fármaco.

Por esta razón, se ensayó un número de formulaciones alternativas. El objetivo era considerar otras combinaciones de rellenos con el propósito de mejorar el flujo del polvo así

como también lograr una buena uniformidad de la mezcla y del contenido.

También se ensayaron formulaciones que contenían menos Compactcel MAB y una mayor cantidad de deslizante en
5 comparación con el Lote 3 (APL-117-6085-03).

Estas formulaciones adicionales se exponen en la Tabla 38 que siguen.

Tabla 38:

10	Nombre del material	Lote No (% p/p)		
		APL-117-6085-05	APL-117-6085-06	APL-117-6085-07
	Psilocibina	1.0	1.0	5.0
	Celulosa microcristalina Ph 102	-	89.0	85.0
15	Almidón pregelatinizado (Almidón 1500)	45.0	-	-
	Compact Cel MAB	-	5.0	5.0
	Celulosa microcristalina CEOLUS UF 702	49.5	-	-
	Almidón glicolato de sodio	3.0	3.0	3.0
	Dióxido de sílice coloidal	0.5	1.0	1.0
20	Estearil fumarato de sodio	1.0	1.0	1.0
	TOTAL	100.0	100.0	100.0

Los resultados para estos lotes se muestran en la Tabla
39 que sigue:

Tabla 39:

	Lote No	Potencia (mg)	Flujo del material (índice de Carrs)	Uniformidad de la mezcla	Uniformidad del contenido
5	APL-117-6085-05	1.0	20.9	Superior=130.0 Medio=105.4 Inferior=107.2 Media = 114.2 %RSD = 12.6%	% declarado en prospecto=88.3 AV =16.5
	APL-117-6085-06	1.0	20.0	Superior=107.0 Medio=96.2 Inferior=95.5 Media = 99.6 % RSD = 6.5	% declarado en prospecto=96.2 AV = 10.5
10	APL-117-6085-07	5.0	24.3	Superior=91.5 Medio=94.2 Inferior=94.8 Media = 93.5 % RSD = 7.0	% declarado en prospecto=96.0 AV = 11.9

APL-117-6085-05 no logró alcanzar una buena uniformidad de la mezcla, y también falló en los criterios de uniformidad del contenido.

Tanto APL-117-6085-06 como APL-117-6085-07 exhibieron un flujo del polvo mejorado, pero la uniformidad de la mezcla para ambas formulaciones fue más deficiente que APL-117-6085-03.

Como consecuencia, el Solicitante examinó los excipientes modificados y, más particularmente, rellenos silicificados con diferentes tamaños de partículas. Estas formulaciones se exponen en la Tabla 40 que sigue:

Tabla 40:

Nombre del material	Lote No (% 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
Almidón glicolato de sodio	3.0	3.0
Dióxido de sílice coloidal	0.5	0.5
Estearil fumarato de sodio	1.0	1.0
TOTAL	100.0	100.0

- 5
- 10 Prosolv es una celulosa microcristalina silicificada, y las dos variantes se seleccionaron para determinar si el tamaño de partícula afectó el resultado. En comparación con la celulosa microcristalina estándar (el rango de tamaño típico, dependiendo del tamizado, es de 80-350 micrómetros), el Prosolv
- 15 tiene una distribución de tamaño de partícula más fina, y eso proporciona un área de superficie incrementada. El área de superficie incrementada que se creyó podría proporcionar un flujo superior y una mayor compactación junto con una mejor uniformidad de contenido y estabilidad en la formulación. La
- 20 relación de Prosolv 50 y Prosolv 90 era para producir una distribución del tamaño de partícula entre las partículas más finas y las partículas más gruesas.

Los resultados se establecen en la Tabla 41 que sigue

Tabla 41:

Lote No	Potencia (mg)	Flujo del material (índice de Carrs)	Uniformidad de la mezcla	Uniformidad del contenido
APL-117-6085-11	5.0	24.3	Superior=103.4 Medio=100.4 Inferior=100.2 Media =101.5 % RSD = 2.0	% declarado en prospecto= 94.1 AV =6.0
APL-117-6085-12	1.0	21.1	Superior=101.9 Medio=98.4 Inferior=99.9 Media = 100.1 % RSD = 3.8%	% declarado en prospecto=100.5 AV =5.8

10

Se puede ver que los parámetros clave de la uniformidad del contenido (superior al 90% y, de hecho, superior al 94%) y AV (menos de 10 y, de hecho, menos de 7) son excelentes, como lo es la consistencia en la uniformidad de la mezcla (superior al 95% permitiendo error).

15