



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 120257

(13) C2

(51) МПК

C07K 5/02 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2016 05006	(72) Винахідник(и):	Б'янкі Давіде (ІТ), Валетті Марко (ІТ), Бацца Паола (ІТ)
(22) Дата подання заявки:	06.11.2014	(73) Власник(и):	ГНОСІС С.П.А., Piazza del Carmine, 4, I-20121 Milano, Italy (ІТ)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	11.11.2019	(74) Представник:	Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	MI2013A001856	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 2 760 956 A, 28.08.1956 US 2009/136993 A1, 28.05.2009 CAIRA M. R., "CRYSTALLINE POLYMORPHISM OF ORGANIC COMPOUNDS", TOPICS IN CURRENT CHEMISTRY, SPRINGER, BERLIN, DE (19980101), vol. 198, doi:10.1007/3-540- 69178-2_5, ISSN 0340-1022, pages 163-208, XP001156954 [Y] 1-16 * the whole document *
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	08.11.2013		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	ІТ		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.11.2016, Бюл.№ 21		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	11.11.2019, Бюл.№ 21		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	РСТ/EP2014/073957, 06.11.2014		

(54) КРИСТАЛІЧНІ ФОРМИ S-АЦЕТИЛГЛУТАТІОНУ, ЇХ ОТРИМАННЯ ТА ЗАСТОСУВАННЯ В ФАРМАЦЕВТИЧНИХ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ХАРЧОВИХ КОМПОЗИЦІЯХ**(57) Реферат:**

Розкрито дві нові кристалічні форми S-ацетилглютаміону (SAG), які називають "формою А" та "формою В", які отримують кристалізацією SAG з сумішшю вода-ацетон, вода-етанол або вода-метанол, переважно ацетону, в контрольованих умовах. Форми А та В переважно можуть застосовувати як інгредієнти фармацевтичних або функціональних харчових композицій.

UA 120257 C2

Галузь винаходу

Винахід стосується нових кристалічних форм S-ацетилглутатіона (SAG), що застосовують для отримання фармацевтичних або функціональних харчових композицій.

Передумови створення винаходу

5 Глутатіон (GSH) є сполукою, яка, в своїй відновленій формі, є відмінним антиоксидантом та, таким чином, захищена від пошкоджень, викликаних вільними радикалами у складних організмів. S-ацетилглутатіон (SAG) (дивись фіг. 1) є його синтетичною похідною, захищаючи GSH від окиснення, та водночас легко його вивільняє гідролізом.

10 GSH або γ -L-глутаміл-L-цистеїнілглїцин є трипептидом, що складається з глютамінової кислоти, цистеїну та глїцину, який характеризується атиповим пептидним зв'язком, а саме зв'язком, який зв'язує нітроген цистеїну з карбоксилом в γ глютамінової кислоти. Це є основною тіольною сполукою з найнижчою молекулярною масою, яка присутня як в тваринних, так і рослинних клітин (приблизно 95 % від загальної кількості). Її функція полягає в підтримці у відновленому стані -SH груп багатьох ферментів та протеїнів, чиє окиснення (з утворенням S-S

15 внутрішньо- та міжмолекулярних дисульфідних містків) призводить, в більшості випадків, до інактивації або втрати біологічної функції ферменту або протеїну.

Вважається, GSH є одним з найбільш важливих внутрішньоклітинних антиоксидантів, який природним чином виробляється організмом людини. Однак, хронічний оксидативний стрес знижує клітинні рівні GSH, та часто буває доцільним поповнювати його рівні з допомогою харчових добавок.

20 Прийнято вважати, що всмоктування GSH, отриманого з раціону харчування або застосуванням харчових добавок, легко застосовується впливаннями, але в дійсності він всмоктується не "як є", а гідролізованим до його трьох складових амінокислот з допомогою гамма-глутамілтранспептидази, присутньої в кишечнику. Після того, як його всмокчено та введено в потік крові, зазначені амінокислоти розподіляються в різних тканинах, де вони здійснюють пул амінокислот, з якого клітини тіла синтезують ендогенний GSH. Тому необхідним є застосовувати високу пероральну дозу для того, щоб гарантувати значне всмоктування. Коли Witschi et al. оцінили зростання рівнів глутатіону, цистеїну та глутамату в крові після перорального введення GSH сімом здоровим добровольцям, не спостерігалось значного збільшення в дозуваннях аж до 3 г на дозу (Witschi A et al., J. Clin. Pharmacol. 43 (6), 667 -1992).

30 Сублінгвальне введення, яке забезпечує кращу біологічну доступність, може бути застосовано як альтернативу пероральному введенню GSH.

І, нарешті, у фармацевтичній галузі, в деяких випадках застосовують профілактику на основі GSH з допомогою парентерального, внутрішньом'язового або повільного внутрішньовенного введення, наприклад, як профілактика невропатії, що є результатом хіміотерапії цисплатином або аналогами.

Застосування SAG як попередника є гарною альтернативою для поповнення знижених рівнів GSH в організмі. Суттєво ацетилювання атому сульфору запобігає розкладанню GSH та полегшує його всмоктування через стінку кишечника, таким чином, дозволяючи молекулі проходити в значній мірі в клітини.

Таким чином SAG, що сприймається тканинами, гідролізує за участю цитоплазматичної тіоестерази, та гідролізом ацетильної групи продукує знижений GSH, який є доступним для всіх біологічних функцій, де це необхідно.

45 Додавання SAG до культур фібробластів, які мають походження від осіб, які страждають від генетичного дефіциту глутатіонсинтетази, як доведено, є здатними ефективно поповнювати внутрішньоклітинний рівень GSH (Okun JG et al., J. Inherit. Metab. Dis. 27(6), 783-2004). SAG є також більш стабільним в плазмі та, як доведено, є більш ефективним ніж GSH в поповненні клітинних рівнів GSH, концентрація яких зменшується при вірусних інфекціях (Vogel JU et al., Med. Microbiol. Immunol. 194, 55-2005) (Fraternal A et al., Antiviral Res. 77, 120-2008). І, нарешті, SAG демонструє цікаву не-GSH-залежну активність, яка індукує апоптоз в деяких людських пухлинних клітинних лініях in vitro. (Locigno R et al., Int. J. Oncol. 20, 69 -2002).

Ідентифікація та характеристика поліморфних форм та експериментальних умов їх отримання є дуже важливими параметрами для сполуки, призначеної для функціонального харчового та/або фармацевтичного застосування.

55 Синтез SAG вже було заявлено в патенті Японії (дивись Chemical Abstract 97-7222755s) та в WO92/00320. Однак, автори розкривають тільки загальний спосіб його отримання, без дослідження існування поліморфних форм будь-яким чином.

60 Як зазначено вище, ряд труднощів є залученими в поглинання GSH, які частково вирішуються застосуванням похідної SAG. Однак, всмоктування зазначеної сполуки може знаходитись під негативним впливом існування їх поліморфних форм, які мають різні фізико-

хімічні характеристики, які впливають на його інтенсивність розчинення, розчинність та, внаслідок цього, біологічну доступність, не кажучи вже про різну поведінку порошків під час приготування різних препаратів.

5 Ні експериментальну умову, ні попередню індикацію щодо кристалізації та сушки, що вказує на існування поліморфних форм SAG, ніколи не було розкрито в будь-якому патенті або заявці.

Опис креслень

ФІГУРА 1: структури глутатіону (GSH) та S-ацетилглутатіону (SAG)

ФІГУРА 2: ¹H-ЯМР спектр SAG форми А

10 ФІГУРА 2А: розтяжка ¹H-ЯМР спектру SAG форми А 1,8-5 млн⁻¹.

ФІГУРА 3: ¹H-ЯМР спектр SAG форми В

ФІГУРА 3А: розтяжка ¹H-ЯМР спектру SAG форми В в діапазоні 1,8-5 млн⁻¹.

ФІГУРА 4: XRD дифрактограма SAG форми А

ФІГУРА 5: XRD дифрактограма SAG форми В

15 ФІГУРА 6: ІЧ спектр з Фур'є перетворенням SAG форми А

ФІГУРА 7: ІЧ спектр з Фур'є перетворенням SAG форми В

ФІГУРА 8: термогравіметричний аналіз (ТГА) SAG форми А

ФІГУРА 9: термогравіметричний аналіз (ТГА) SAG форми В

ФІГУРА 10: ДСК термограма SAG форми А

20 ФІГУРА 11: ДСК термограма SAG форми В

ФІГУРА 12: ДСК термограма охолодження SAG форми В

Опис винаходу

25 Винахідники неочікувано з'ясували, що SAG існує не тільки в аморфній формі, але також щонайменше в двох поліморфних формах, які характеризуються різними фізико-хімічними властивостями, які є корисними як інгредієнти фармацевтичних або функціональних харчових композицій.

Експериментально доказано існування згаданих двох поліморфних форм, описаних в представленому винаході, як "форма А" та "форма В", з допомогою аналізів, описаних нижче, які проводять як в розчині, так і в твердій речовині.

30 Зразки двох кристалічних форм, які піддають ¹H-ЯМР аналізу (Фігури 2, 2А, 3 та 3А), давали спектр з високим розділенням відповідно до хімічної формули цієї сполуки, що вказує на те, що не існує спектральної різниці між ними в розчині.

Навпаки, аналізи, які виконували безпосередньо з твердою речовиною, демонструють наявність поліморфних форм.

35 XRD: аналізи, що проводили, застосовуючи рентгенівський дифрактометр, показали істотні відмінності в кристалографічних властивостях двох зразків (Фігури 4 та 5). Кількість та інтенсивність не менше, ніж 20 дифракційних піків, чітко вказують на те, що вони мають два різних типи ґратки, та, внаслідок цього, що існує дві різні кристалічні форми однієї й тієї ж хімічної сполуки.

40 В Таблицях 1 та 2 показано найбільш дозволені дифракційні піки, пов'язані з поліморфними формами А та В, відповідно. Значення, показані жирним шрифтом, відповідають пікам, що характеризують дві форми.

Таблиця 1

2 тета [°]	d-значення	I/I ₀
5,2	17,1113	63
10,3	8,6143	55
15,4	5,7636	76
18,6	4,7765	100
19,7	4,4981	81
20,4	4,3496	71
21,1	4,2148	87
25,1	3,5420	70
25,7	3,4607	76
27,0	3,3043	57
27,6	3,2337	76
27,9	3,1928	98
32,7	2,7346	77
35,3	2,5376	66
36,3	2,4753	84

Таблиця 2

2 тета [°]	d-значення	I/I ₀
4,2	21,2221	20
12,7	6,9861	22
13,0	6,8251	21
14,9	5,9405	16
17,3	5,1214	29
17,7	5,0122	33
21,0	4,2227	100
21,3	4,1717	98
21,9	4,0513	45
22,5	3,9413	43
24,7	3,5956	40
25,1	3,5476	59
30,2	2,9568	58
32,6	2,7477	44

- ІЧ: і в даному випадку, спектри, які записували, застосовуючи ІЧ з Фур'є перетворенням, на твердих речовинах (Фігури 6 та 7), демонстрували різні спектральні смуги, чітко вказуючи наявність двох різних кристалічних форм. Форма А показує (в тому числі) характеристичну NH смугу валентних коливань при 3344 см⁻¹ та характеристичні карбонільні смуги валентних коливань при 1726, 1687 та 1663 см⁻¹. Форма В показує (в тому числі) характеристичні NH смуги валентних коливань при 3370 та 3355 см⁻¹ та характеристичні карбонільні смуги валентних коливань при 1701, 1677 та 1648 см⁻¹.

- Хоча 1H-ЯМР спектри виключали присутність розчинників, зразки також піддавали термічним аналізам, а саме ТГА та ДСК.

- ТГА: термогравіметричні аналізи, які проводили на двох зразках, категорично виключають присутність "розчинників" та показують значну втрату маси, через розкладання, при температурі значно вищій, ніж 150 °C (Фігури 8 та 9).

- ДСК: Термограми підтверджують розкладання при приблизно 200 °C для обох поліморфних форм, та незважаючи на ендотермічний пік, при 208,2 °C для форми А та 191,4 °C для форми В, представляє досить чіткий початок, який може оманливо показати плавлення, який стосується розкладання з втратою маси (Фігури 10 та 11).

- Однак, дві термограми розрізняються з точки зору присутності, в поліморфній формі В, слабкого ендотермічного явища при приблизно 135 °C. Зазначене явище, яке є переважно зворотним, можна побачити на термограмі охолодження сполуки, як аналогічного екзотермічного явища при дещо більш низькій температурі (Фігура 12).

Грунтуючись на цих даних, таким чином, можна зробити висновок про те, що SAG існує

щонайменше в двох різних поліморфних формах, А та В, які характеризуються різними фізико-хімічними властивостями.

Винахід стосується, таким чином, кристалічної форми SAG, яку називають "формою А", яка характеризується рентгенівським порошковим дифракційним спектром, отриманим із застосуванням α_1 ($\lambda = 1,54060\text{\AA}$) та α_2 ($\lambda = 1,54439\text{\AA}$) випромінювання міді, як показано на фігурі 4, та яка має характеристичні піки, виражені в градусах 2-тета $^\circ$, при 5,2, 10,3, 15,4, 18,6, 19,7, 35,3, $36,3 \pm 0,2$.

В XRD дифрактограмі, додаткова група характеристичних дифракційних піків, виражених в градусах 2-тета $^\circ$, є представлена тими, що знаходяться при 20,4, 21,1, 25,1, 25,7, 27,0, 27,6, 27,9, $32,7 \pm 0,2$.

Кристалічна форма А характеризується ІЧ спектром, отриманим в матриці бромиду калію, як показано на фігурі 6, що має характеристичні смуги поглинання при 3344, 1726, 1687 та 1663 см^{-1} (в тому числі).

Кристалічна форма А також характеризується ДСК діаграмою, отриманою з інтенсивністю нагрівання $10,00\text{ }^\circ\text{C/хв.}$, що має ендотермічний пік $190\text{--}210\text{ }^\circ\text{C}$, пов'язаний з розкладанням сполуки, з наступними іншими невпорядкованими ендотермічними явищами, як показано на фігурі 10.

Винахід стосується кристалічної форми SAG, яку називають "форма В", яка характеризується рентгенівським порошковим дифракційним спектром, отриманим із застосуванням α_1 ($\lambda = 1,54060\text{\AA}$) та α_2 ($\lambda = 1,54439\text{\AA}$) випромінювання міді, як показано на фігурі 5, та яка має характеристичні піки, виражені в градусах 2-тета $^\circ$, при 4,2, 12,7, 13,0, 17,3, 17,7, $30,2 \pm 0,2$. В XRD дифрактограмі, додаткова група характеристичних дифракційних піків, виражених в градусах 2-тета $^\circ$, представлена тими, що знаходяться при 14,9, 21,0, 21,3, 21,9, 22,5, 24,7, 25,1, $32,6 \pm 0,2$.

Кристалічна форма В характеризується ІЧ спектром, отриманим в матриці бромиду калію, як показано на фігурі 7, що має характеристичні смуги поглинання при 3370, 3355, 1701, 1677 та 1648 см^{-1} (в тому числі).

Кристалічна форма В також характеризується ДСК діаграмою, отриманою з інтенсивністю нагрівання $10,00\text{ }^\circ\text{C/хв.}$, що має ендотермічний пік розкладання $180\text{--}200\text{ }^\circ\text{C}$, пов'язаний з розкладанням сполуки, з наступними іншими невпорядкованими ендотермічними явищами, та характеристичний ендотермічний пік при приблизно $135\text{ }^\circ\text{C}$, як показано на фігурі 11.

Винахід стосується способу отримання кристалічних форм А та В SAG з високими виходами та хімічною чистотою.

Кристалічні форми А та В може бути отримано кристалізацією SAG з суміші розчинників, таких як вода-ацетон, вода-етанол та вода-метанол, переважно вода-ацетон.

Найбільш неочікуване виявлення, яке, зокрема, не може бути легко виведеним навіть кваліфікованим фахівцем, є те, що всі суміші зазначених розчинників є здатними забезпечити як поліморфну форму А, так і поліморфну форму В, та, що відмітним фактором є умови, при яких ініціюється кристалізація.

Суттєво додавання розчинника осадження (не розчинник) перед кристалізацією ініціюється водою, що призводить до поліморфної форми В, тоді як, якщо кристалізація ініціюється тільки водою, та не розчинник додається тільки, щоб підвищити виходи (повне осадження), отримують поліморфну форму А. Така поведінка підтверджується осадженням обох поліморфних форм А та В, якщо допускається ініціювання кристалізації з води, та розчинник (не розчинник) додають перед осадженням продукту, який повністю осаджують.

Кристалічну форму А SAG може бути отримано за способом, який полягає в:

а) розчиненні SAG у воді при температурі $75\text{--}80\text{ }^\circ\text{C}$;

б) негайному охолодженні розчину, отриманому в операції а), до температури нижче $55\text{ }^\circ\text{C}$, переважно до температури $45\text{--}55\text{ }^\circ\text{C}$, з наступним додатковим охолодженням до виникнення кристалізації;

с) охолодженні до $20\text{--}25\text{ }^\circ\text{C}$ маси, отриманої в операції б), при проведенні мінімального перемішування ($60\text{--}120\text{ об./хв.}$), з наступним безперервним перемішуванням маси при $20\text{--}25\text{ }^\circ\text{C}$ протягом 2-12 годин;

д) повільному додаванні до суспензії, отриманої в операції с), розчинника, вибраного з групи, що складається з ацетону, етанолу та метанолу, переважно ацетону, з наступним охолодженням отриманої в результаті суспензії до температури $3\text{--}7\text{ }^\circ\text{C}$;

е) виділенні твердого осаду в операції д), отримуючи кристалічну форму А SAG.

Кристалічну форму В SAG може бути отримано за способом, який полягає в:

а) розчиненні SAG у воді при температурі $75\text{--}80\text{ }^\circ\text{C}$;

б) негайному охолодженні розчину, отриманому в операції а), до температури $55\text{ }^\circ\text{C}$, з

наступним додаванням розчинника, вибраного з групи, що складається з ацетону, етанолу та метанолу, переважно ацетону;

с) спонтанному охолодженні до 20-25 °С маси, отриманої в операції b), при проведенні мінімального перемішування (60-120 об./хв.), з наступним безперервним перемішуванням маси при 20-25 °С протягом 2-12 годин;

д) охолодженні суспензії, отриманої в операції с) до температури 3-7 °С;

е) виділенні твердого осаду в операції d), отримуючи кристалічну форму В SAG.

Навпаки, аморфну форму можуть отримувати висушуванням при розпиленні водного розчину продукту.

Дві поліморфні форми А та В та аморфна форма представляють різні фізико-хімічні властивості, зокрема, що стосуються якості продукту, його стабільності, його інтенсивності розчинення у воді та щільності і сипучості порошків.

Якість, значення аналізу та стабільність різних форм - Кристалічні форми А та В відрізняються за присутності різних кількостей окисненого GSH (GSSG), оскільки кристалізація поліморфної форми А призводить до підвищення GSSG (приблизно 1 %, більше). Даний GSSG має походження не тільки з окиснення залишкового GSH, присутнього в реакційному середовищі, але також виникає через гідроліз SAG під час кристалізації, хоча і в мінімальних кількостях. Відсоток GSSG є набагато вищим в аморфній формі через умови висушування, які збільшують гідроліз та відповідне окиснення. Це не впливає на якість продукту, оскільки GSSG, аналогічно SAG, є здатним поповнювати GSH після всмоктування.

Коли зразки поліморфних форм А та В піддають нагріванню та механічним діям, не було виявлено можливості перетворення однієї поліморфної форми в іншу форму в застосованих умовах.

Стабільності різних твердих форм досліджували як описано в Європейській фармакопеї (EP), проведенням дослідження прискореної стабільності при 50 °С протягом 6 місяців. Результати представлено в таблиці 3 як внутрішня стандартизація (% площі інгредієнтів) та як значення аналізу SAG.

Таблиця 3

Місяці	Тип твердої речовини	Невідомі домішки (загальні)	Невідомі домішки (єдина)	GSH	GSSG	SAG	SAG - значення аналізу
0	Аморфна	1,4 %	0,4 %	1,0 %	2,5 %	95,1 %	96,5 %
1,5	Аморфна	1,9 %	0,9 %	1,6 %	2,5 %	94,6 %	94,9 %
3	Аморфна	2,3 %	1,2 %	2,4 %	2,8 %	91,3 %	92,4 %
4,5	Аморфна	2,7 %	1,3 %	2,8 %	2,9 %	90,4 %	91,5 %
6	Аморфна	3,5 %	1,5 %	2,5 %	3,9 %	88,6 %	89,9 %
Місяці	Тип твердої речовини	Невідомі домішки (загальні)	Невідомі домішки (єдина)	GSH	GSSG	SAG	SAG - значення аналізу
0	Форма А	1,0 %	0,4 %	0,1 %	2,2 %	96,3 %	98,6 %
1,5	Форма А	1,7 %	0,5 %	0,1 %	2,2 %	95,5 %	98,3 %
3	Форма А	1,9 %	0,5 %	0,2 %	2,3 %	95,1 %	97,8 %
4,5	Форма А	2,0 %	0,7 %	0,2 %	2,4 %	94,7 %	97,6 %
6	Форма А	2,0 %	0,9 %	0,3 %	2,4 %	94,4 %	97,4 %
Місяці	Тип твердої речовини	Невідомі домішки (загальні)	Невідомі домішки (єдина)	GSH	GSSG	SAG	SAG - значення аналізу
0	Форма В	0,8 %	0,2 %	0,2 %	1,1 %	97,7 %	99,3 %
1,5	Форма В	0,9 %	0,5 %	0,3 %	1,2 %	97,1 %	99,1 %
3	Форма В	1,1 %	0,7 %	0,7 %	0,8 %	96,7 %	98,7 %
4,5	Форма В	1,3 %	0,7 %	0,9 %	1,1 %	96,0 %	98,3 %
6	Форма В	2,0 %	0,8 %	1,0 %	0,9 %	95,7 %	98,1 %

Як зрозуміло з даних, наведених в таблиці 3, аморфна форма є набагато менш стабільною, ніж кристалічні форми, та остання, поліморфна форма В, характеризується більш високою чистотою та значенням аналізу.

Інтенсивність розчинення - З двох кристалічних форм, форма В має найбільш високу інтенсивність розчинення, та є, таким чином, більш прийнятною для пероральних препаратів,

чия інтенсивність розчинення впливає на інтенсивність всмоктування. Тільки аморфна форма розчиняється більш інтенсивно, але якість та стабільність продукту є неприйнятною для його застосування.

Щільність порошку - Стосовно даного аспекту, відповідно дослідженням двох кристалічних форм наведено, що поліморфна форма В має більш високу щільність (0,4 г/мл), ніж форма А (0,2-0,25 г/мл). Цей параметр впливає на сипучість та здатність до пресування порошку, і тому на його застосування для приготування твердих препаратів, зокрема, таблеток. Порошки поліморфної форми А, таким чином, демонструють кращу сипучість.

Кристалічні форми А та В SAG може бути сформульовано в фармацевтичні або функціональні харчові композиції, прийнятні для перорального або парентерального введення, застосовуючи традиційні методики та ексципієнти.

Винахід стосується, таким чином, фармацевтичних або функціональних харчових композицій, які містять кристалічні форми А та В SAG.

Винахід стосується застосування кристалічних форм А та В SAG для отримання лікарських засобів або харчових добавок.

Винахід стосується застосування кристалічних форм А та В SAG для отримання флаконів, які містять порошкоподібний SAG для ін'єкційного парентерального введення.

Винахід додатково ілюстровано наступними прикладами.

ПРИКЛАДИ

ХRD спектри отримали із застосуванням дифрактометра RIGAKU-MINIFLEX. Випромінюванням, яке застосовували, є випромінювання міді α_1 та α_2 (відповідно $\lambda = 1,54060\text{\AA}$ та $\lambda = 1,54439\text{\AA}$).

ІЧ спектр з Фур'є перетворенням отримували з застосуванням приладу Perkin-Elmer FTIR Spectrum-one. Зразки аналізували як таблетки з KBr без вакууму, з розбавленням 1:100.

ТГА діаграми отримували із застосуванням приладу Universal V2.6D TA. Діапазон температур, який досліджували, складав $0\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow 300\text{ }^{\circ}\text{C}$, з інтенсивністю сканування $10\text{ }^{\circ}\text{C/хв}$.

ДСК термограми отримували із застосуванням приладу Perkin Elmer DSC6. Діапазон температур, який досліджували, складав $30\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow 350\text{ }^{\circ}\text{C}$, з інтенсивністю сканування $10\text{ }^{\circ}\text{C/хв}$. У випадку фігури 12, ДСК термограму отримували нагріванням $30\text{--}145\text{ }^{\circ}\text{C}$ з інтенсивністю $10\text{ }^{\circ}\text{C/хв}$, де зразок потім витримували протягом 5 хв. при $145\text{ }^{\circ}\text{C}$ та на завершення охолоджували $145\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ з інтенсивністю $10\text{ }^{\circ}\text{C/хв}$.

^1H -ЯМР спектри отримували із застосуванням приладу Varian Gemini 200, з робочою частотою 200 МГц, із застосуванням D_2O як розчинника.

Приклад 1

Отримання SAG в кристалічній формі А

5 г сирого SAG завантажують при перемішуванні та нагрівають до $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ в 40 мл демінералізованої води. Реакційну масу нагрівають до $75\text{--}80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Після розчинення, розчин одразу охолоджують до температури нижче $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, переважно, $45\text{--}55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Охолодження продовжують до початку кристалізації. Перемішування мінімізують, та розчин охолоджують до $20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$, при такій температурі його залишають при перемішуванні на 2-12 годин, доки осадження не завершиться. Далі, знову з мінімальним перемішуванням, додають 40 мл ацетону через приблизно 30-50 хв. Додавання здійснюють повільно, щоб попередити утворення навіть незначної кількості кристалів поліморфної форми В. Отриману в результаті суспензію потім переносять до $5 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ та витримують при ній при повільному перемішуванні (60-120 об./хв.) протягом приблизно 1 години. В кінці цього часу реакційну масу фільтрують, отримуючи білу тверду речовину, яку промивають безводним ацетоном ($2 \times 10\text{ мл}$). таким чином, отримують 8,4 г вологої твердої речовини, яку залишають сушитися при $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 мбар залишкового вакууму протягом 14-18 годин. 4,3 г (86 %) білої кристалічної твердої речовини, що відповідає кристалічній формі А, отримують після висушування.

Аналітичний профіль продукту, отриманий таким чином, є наступним:

Значення аналізу: 98,6 % (як є)

Домішки: Загальні: 1,0 %; Єдині відомі домішки: GSH (0,1 %), GSSG (2,2 %);

Вода 1,4 %

Залишкового ацетон: $< 500\text{ млн}^{-1}$.

Залишкова оцтова кислота: 0,4 %

Удавана щільність: 0,15-0,25 г/мл

Отриманий таким чином продукт демонструє ^1H -ЯМР спектри, показані на фігурі 2 та фігурі 2А, ХRD дифрактограму, показану на фігурі 4, та ІЧ спектр з Фур'є перетворенням, показано на фігурі 6, та ТГА діаграму, показану на фігурі 8, та ДСК термограму, показану на фігурі 10. Найкраще розрішені дифракційні піки та їх відносні інтенсивності показано в таблиці 1.

Приклад 2

Отримання SAG в кристалічній формі В

35 мл демінералізованої води нагрівають до 75 °С. Коли досягається зазначена температура, 5 г сирого SAG додають одним додаванням з допомогою воронки, та реакційну масу повертають до температури 75 °С, без перевищення максимальної температури 80 °С. Коли продукт розчинився, що перевіряють відбиранням зразку при перемішуванні, розчин одразу охолоджують до 55 °С, та додають 40 мл ацетону при цій самій температурі через приблизно 10 хв. Температуру залишають самовільно знижуватися до 20-25 °С при мінімальному перемішуванні (60-120 об./хв.). Суміш залишають при перемішуванні при цій самій температурі протягом 2-12 годин. Далі охолоджують до 5 °С та залишають при перемішуванні при цій самій температурі протягом приблизно 1 години.

Реакційну масу фільтрують, та промивають безводним ацетоном (2 × 10 мл). Після висушування протягом 14-18 годин при 50 °С та 5 мбар залишкового вакууму, отримують 3,8 г білої кристалічної твердої речовини, що відповідає кристалічній формі В (вихід 76 %).

Аналітичний профіль продукту, отриманий таким чином, є наступним:

Значення аналізу: 99,3 % (як є)

Домішки: Загальні: 0,8 %; Єдині відомі домішки: GSH (0,2 %), GSSG (1,1 %)

Вода 1.2 %

Залишковий ацетон: < 0,1 %

Удавана щільність: 0,25-0,40 г/мл

Отриманий таким чином продукт демонструє ¹H-ЯМР спектри, показані на фігурі 3 та фігурі 3А, XRD дифрактограму, показану на фігурі 5, ІЧ спектр з Фур'є перетворенням показаний на фігурі 7, ТГА діаграму, показану на фігурі 9, та ДСК термограми, показані на фігурах 11 та 12. Найкраще розрішені дифракційні піки, та їх відносні інтенсивності, показано в таблиці 2.

Приклад 3

Отримання SAG в кристалічних формах А та В

35 мл демінералізованої води нагрівають до 75 °С, та потім додають 5 г сирого SAG одним додаванням з допомогою воронки. Реакційну масу нагрівають до 75 °С, без перевищення температурного обмеження 80 °С. Коли продукт розчинився, що перевіряється відбиранням зразку при перемішуванні, розчин охолоджують до температури 35-45 °С. 40 мл ацетону додають до розчину при зазначеній температурі через приблизно 10 хв., при мінімальному перемішуванні (60-120 об./хв.). Температуру залишають самовільно знижуватися до 20-25 °С. Наприкінці додавання, розчин стає каламутним. Розчин витримують при перемішуванні при цій самій температурі протягом 2-12 годин, після чого його охолоджують до 5 °С та залишають при перемішуванні протягом приблизно 1 години. Реакційну масу фільтрують, та промивають безводним ацетоном (2 × 10 мл). Після висушування протягом 14-18 годин при 50 °С та 5 мбар залишкового вакууму, отримують 4,0 г білої кристалічної твердої речовини, що відповідає ізоморфним кристалічним формам А та В.

Удавана щільність: 0,35 г/мл.

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

1. Кристалічна форма, як форма А, S-ацетилглутатіону (SAG), яка характеризується рентгенівським порошковим дифракційним спектром, що отримано із застосуванням α_1 та α_2 випромінювань міді відповідно з 1,54060Å та 1,54439Å, що має характеристичні піки, виражені в градусах 2-тета [°], при 5,2, 10,3, 15,4, 18,6, 19,7, 35,3, 36,3±0,2.

2. Кристалічна форма SAG за п. 1, яка додатково характеризується рентгенівським порошковим дифракційним спектром, що також має характеристичні піки, виражені в градусах 2-тета [°], при 20,4, 21,1, 25,1, 25,7, 27,0, 27,6, 27,9, 32,7±0,2.

3. Кристалічна форма А SAG за п. 1 або 2, яка характеризується ІЧ-спектром, що отримано в матриці броміду калію, з характеристичними смугами поглинання, в тому числі при 3344, 1726, 1687 та 1663 cm^{-1} .

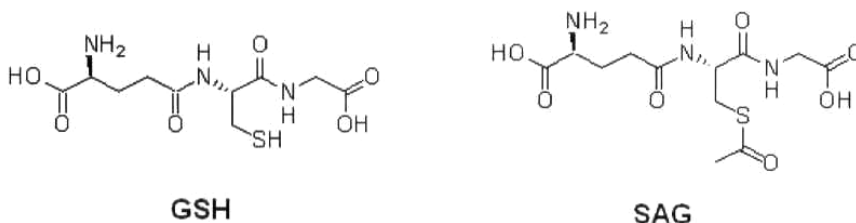
4. Кристалічна форма А SAG за будь-яким з пп. 1-3, яка характеризується ДСК-діаграмою, що має ендотермічний пік розкладання 190-210 °С, що отримано з інтенсивністю нагрівання 10,00 °С/хв.

5. Кристалічна форма А SAG за п. 4, яка характеризується ДСК-діаграмою, що має ендотермічний пік розкладання при 208,2 °С.

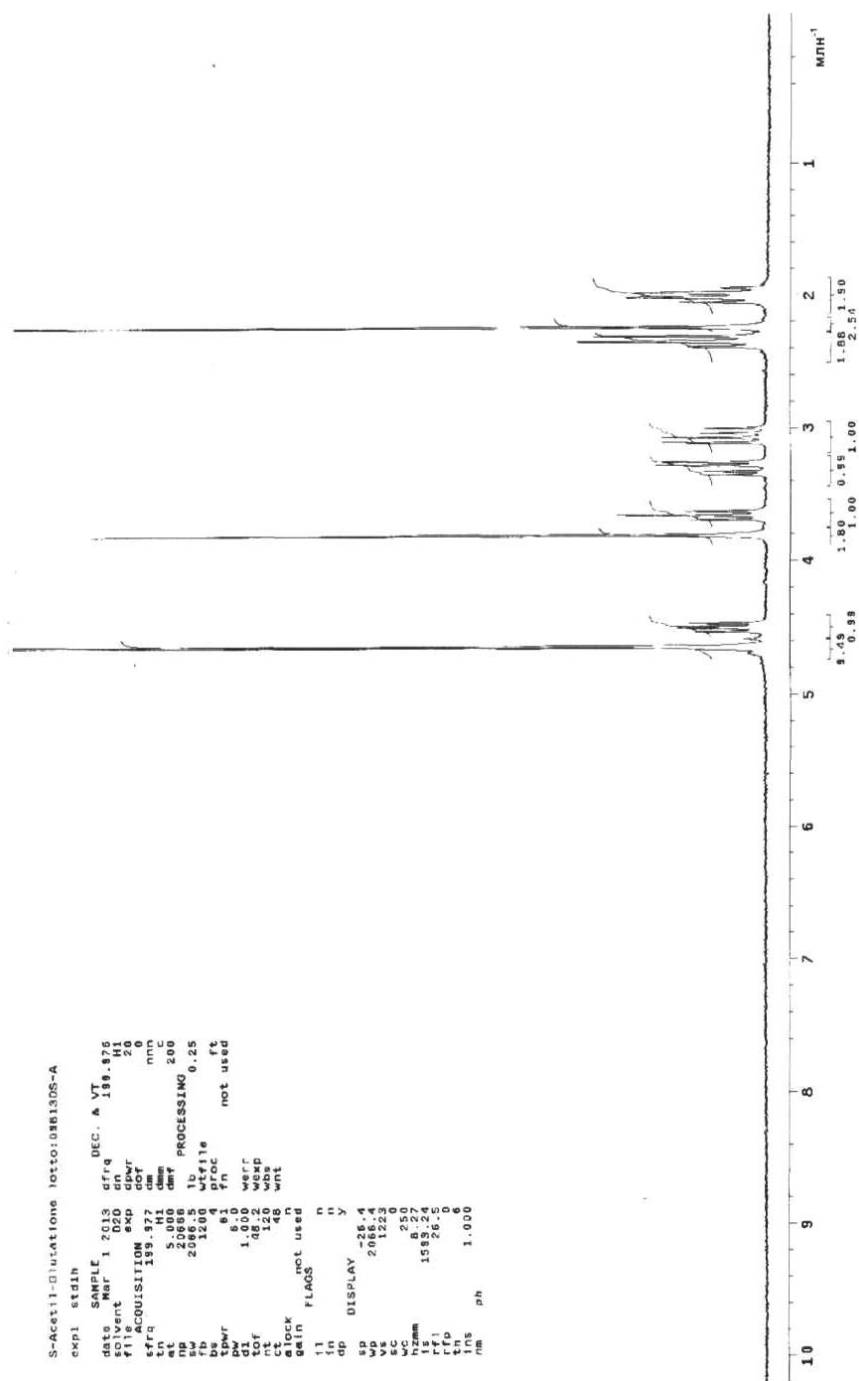
6. Спосіб отримання кристалічної форми А SAG за будь-яким з пп. 1-5, який полягає в:

а) розчиненні SAG у воді при температурі 75-80 °С;

- b) негайному охолодженні розчину, отриманого в операції a), до температури нижче ніж 55 °C, переважно до температури 45-55 °C, з наступним додатковим охолодженням до початку кристалізації;
- 5 c) охолодженні маси, отриманої в операції b), до 20-25 °C, перемішуючи її з інтенсивністю 60-120 об./хв., з наступним додатковим перемішуванням маси при 20-25 °C протягом 2-12 годин;
- d) повільному додаванні до суспензії, отриманої в операції c), розчинника, вибраного з групи, що складається з ацетону, етанолу або метанолу, переважно ацетону, з наступним охолодженням отриманої суспензії при температурі 3-7 °C;
- 10 e) виділенні твердого осаду в операції d), отримуючи кристалічну форму A SAG.
7. Функціональна харчова або фармацевтична композиція, яка містить кристалічну форму A SAG за будь-яким з пп. 1-5.
8. Застосування кристалічної форми A SAG за будь-яким з пп. 1-5 для отримання функціональної харчової або фармацевтичної композиції.



Фігура 1



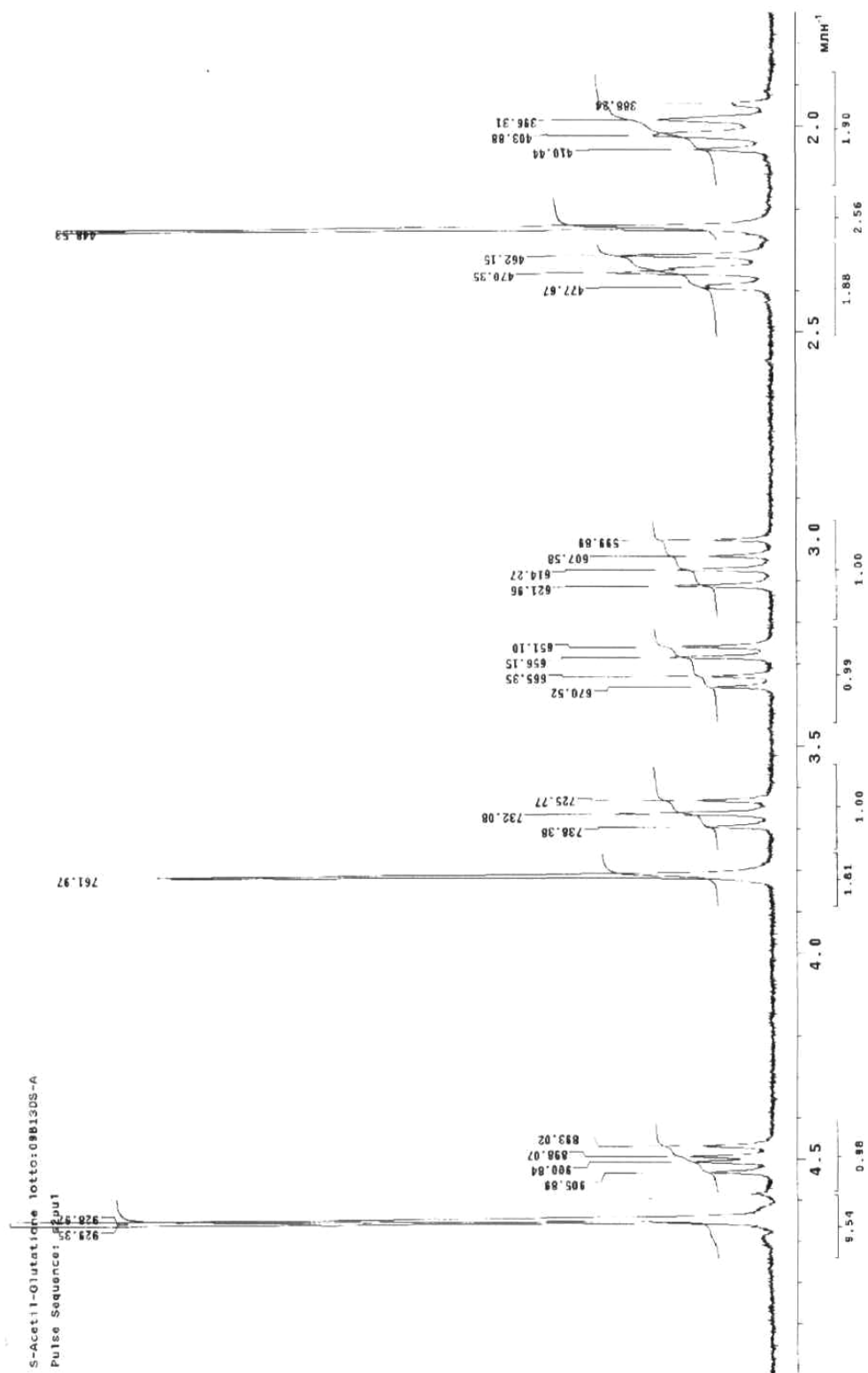
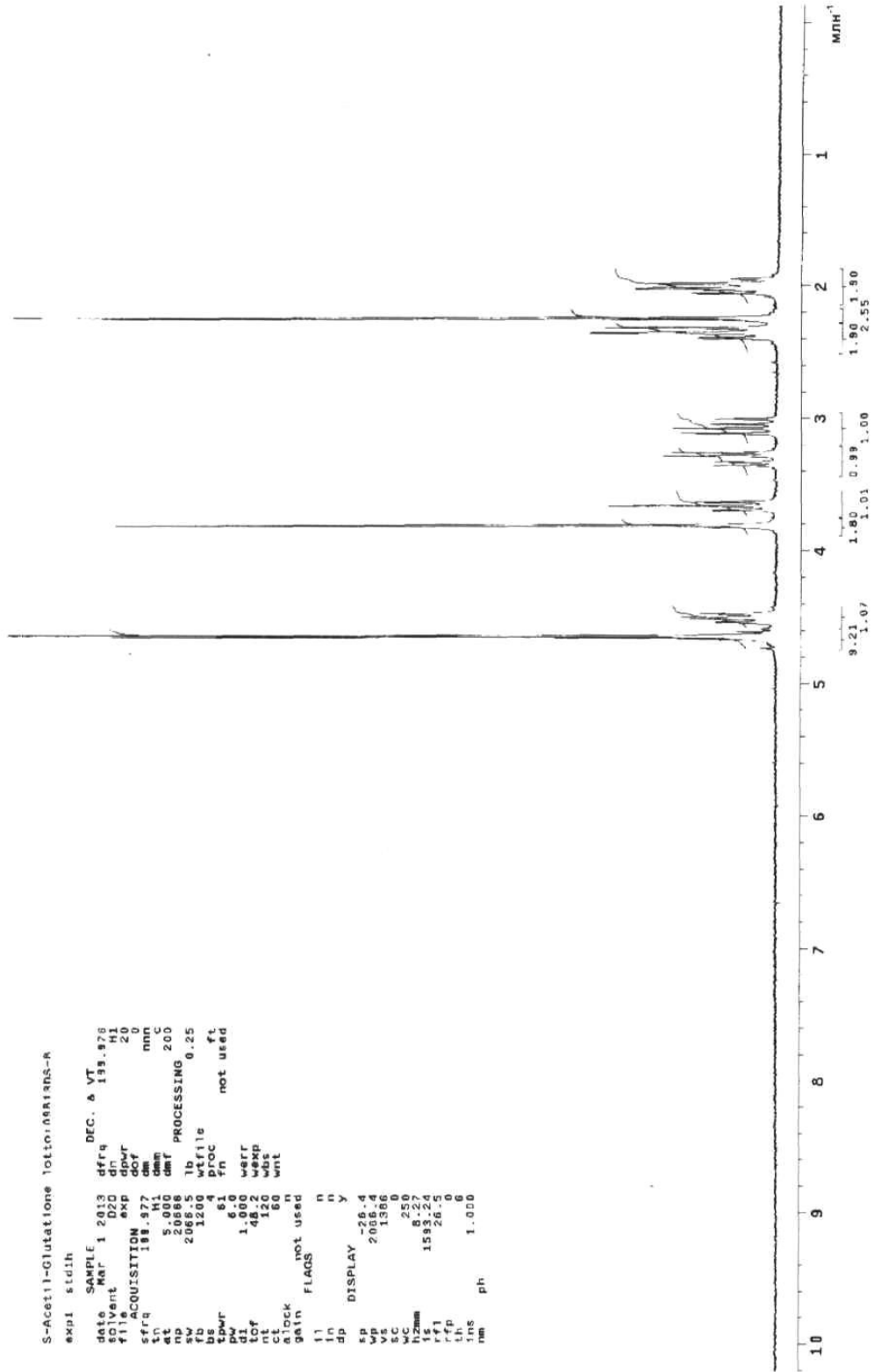
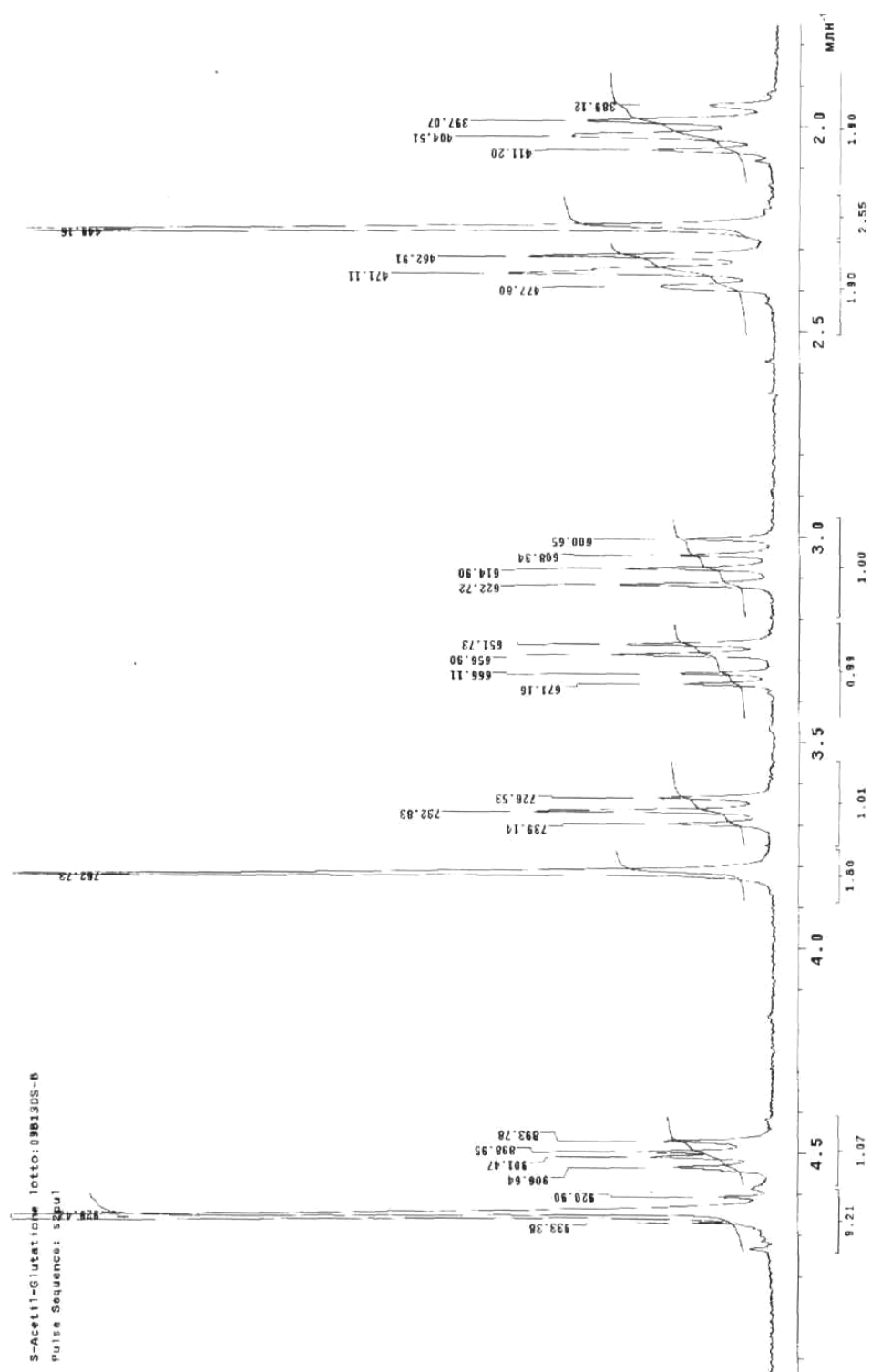


Figure 2A

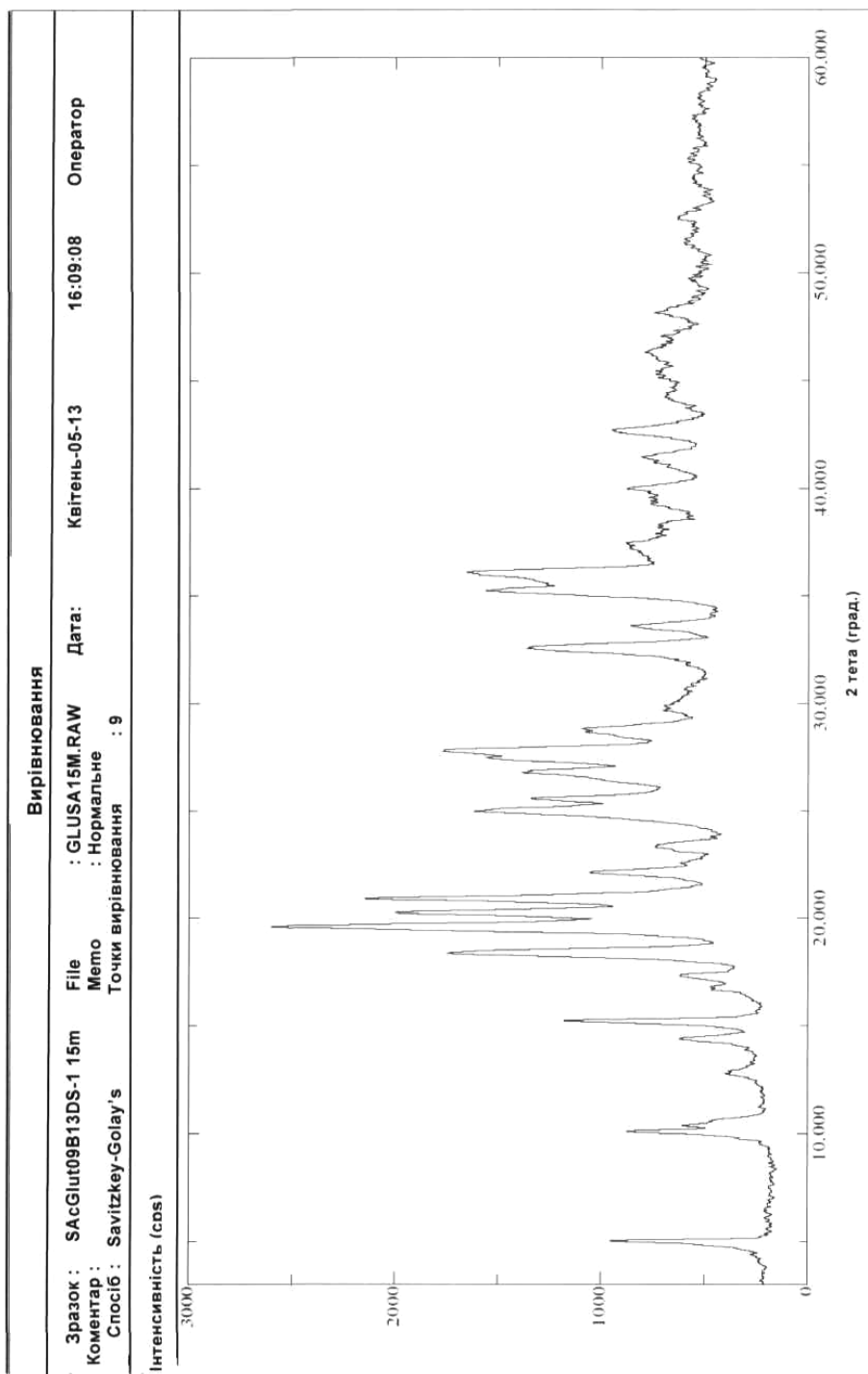


Фігypa 3



Фігура 3А

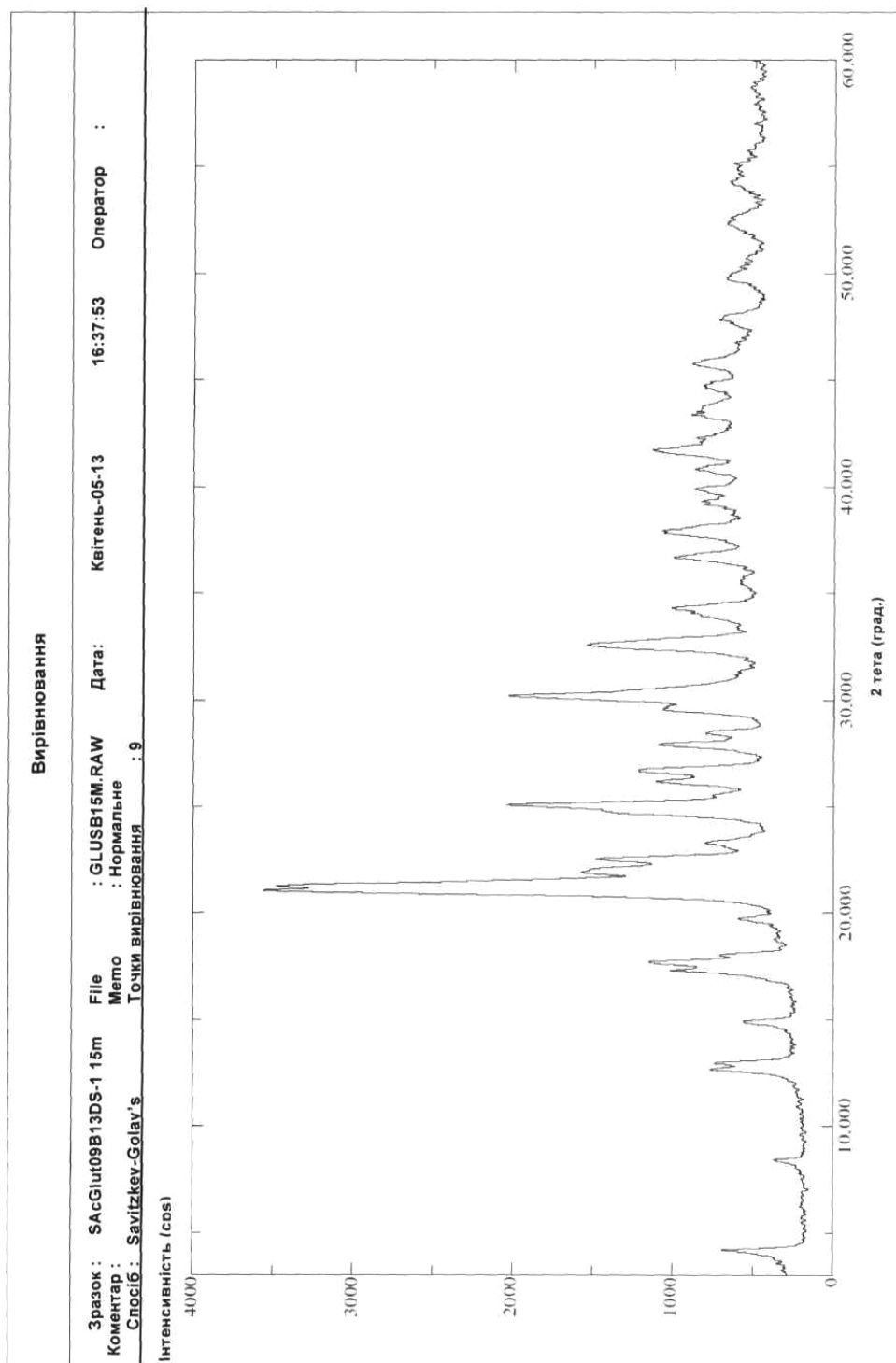
S-АЦЕТИЛГЛУТАТОН 09B13DS-A molino¹⁵ 2sfere 60sc.



Квітень-5-2013 16:42:46 стор-1

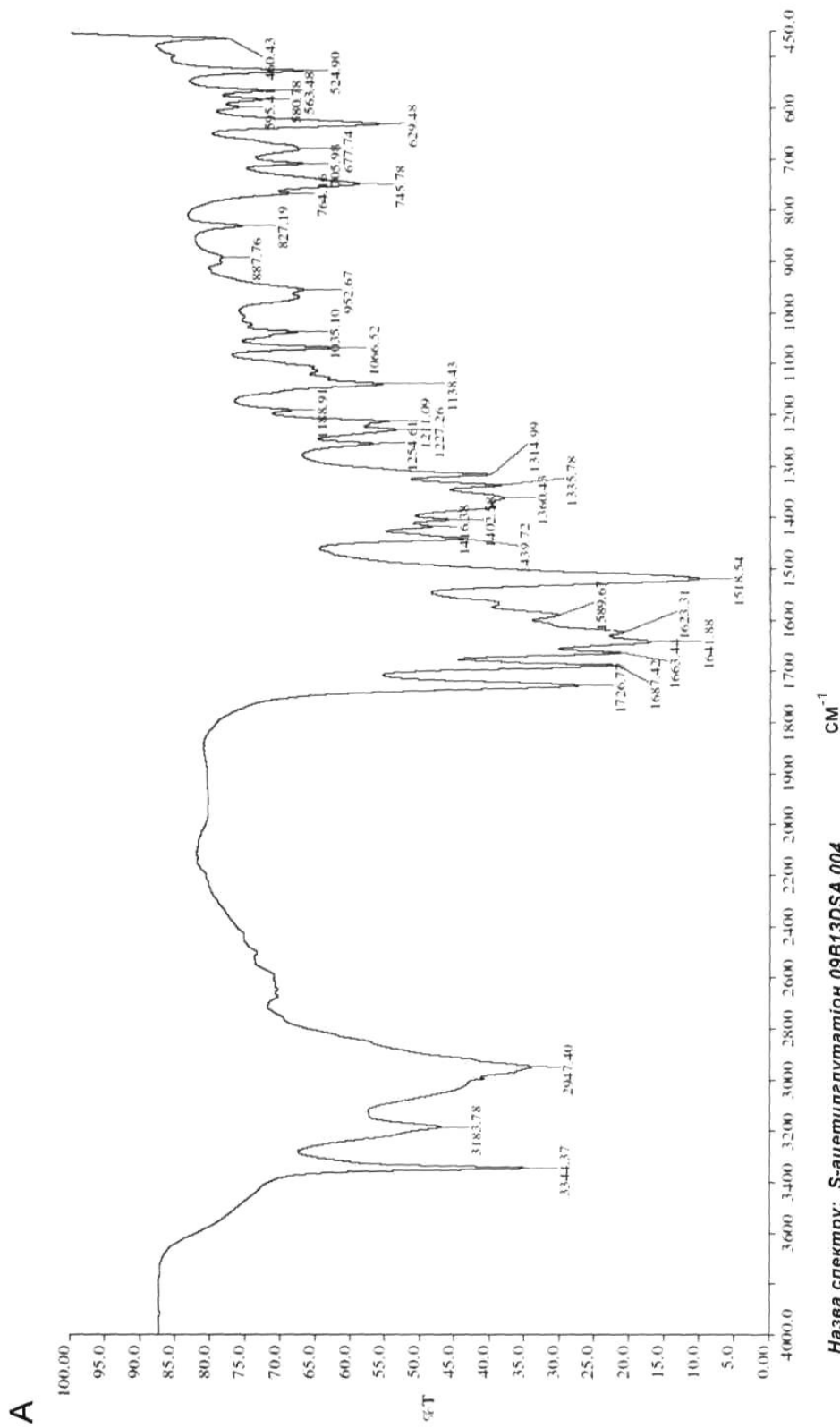
Фігура 4

S- АЦЕТИЛГЛУТАТОН 09B13DS-B molino¹⁵ 2sfere 60sc.

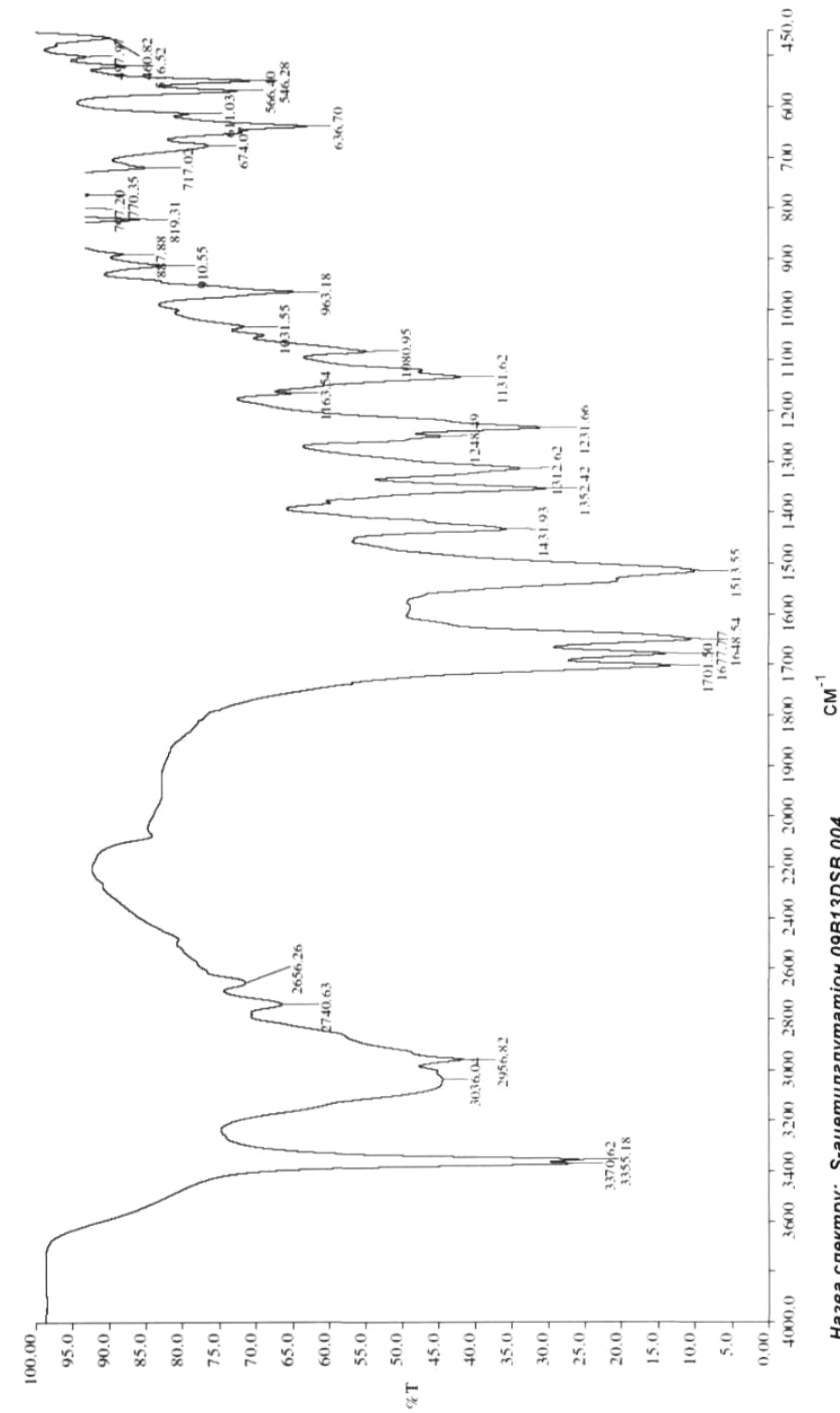


Квітень-5-2013 16.45.43 стор-1

Фігура 5



Фігура 6

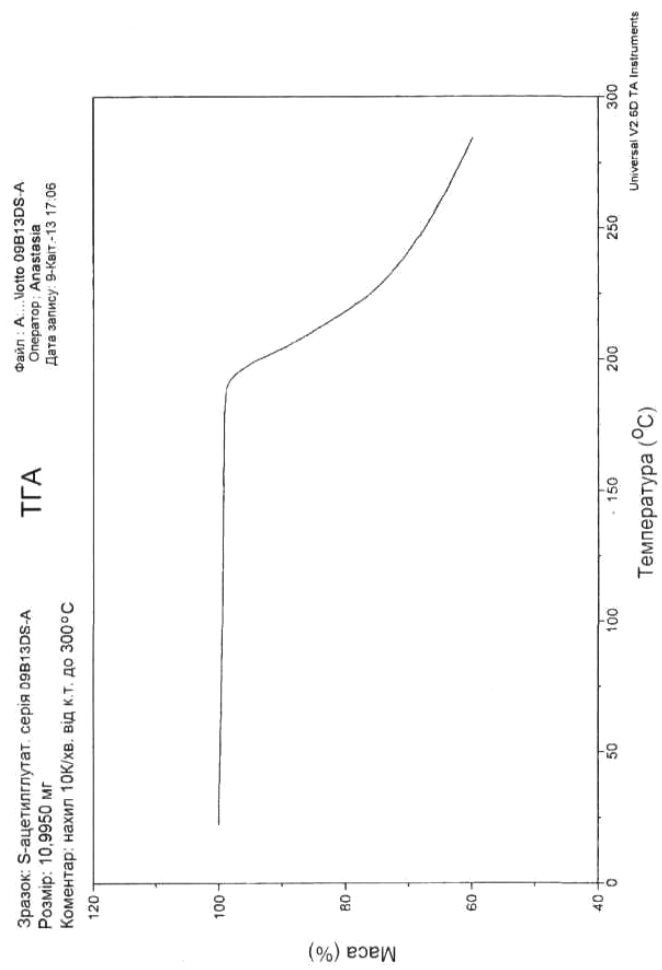


Назва спектру: S-ацетилглутатіон 09B13DSB.004

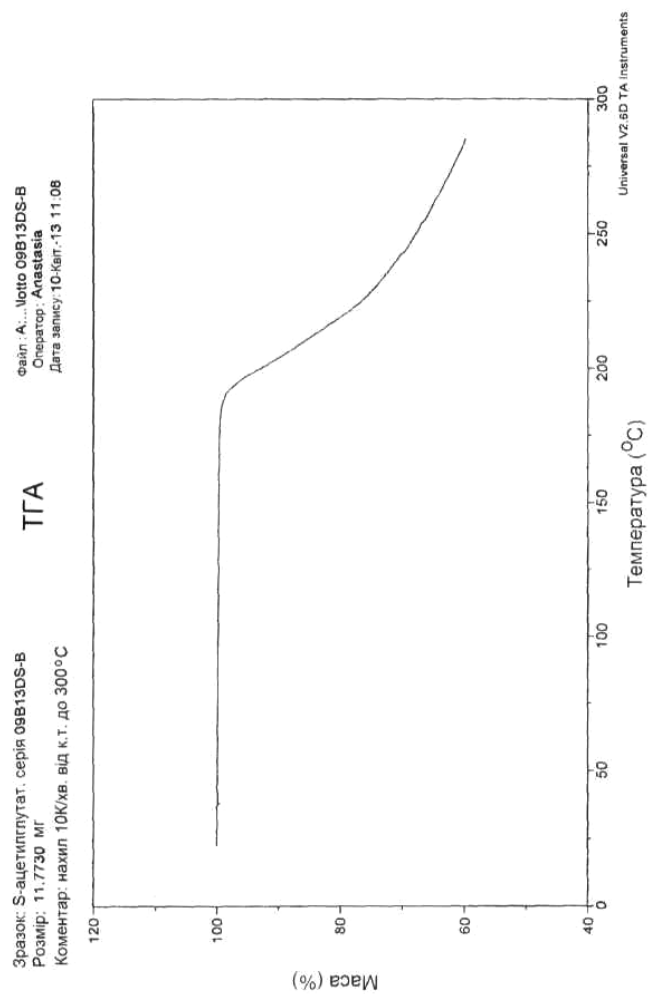
Опис: S-ацетилглутатіон 09B13DSB

Коментарі: Таблетки КВг розб. 1:100 senza vuoto

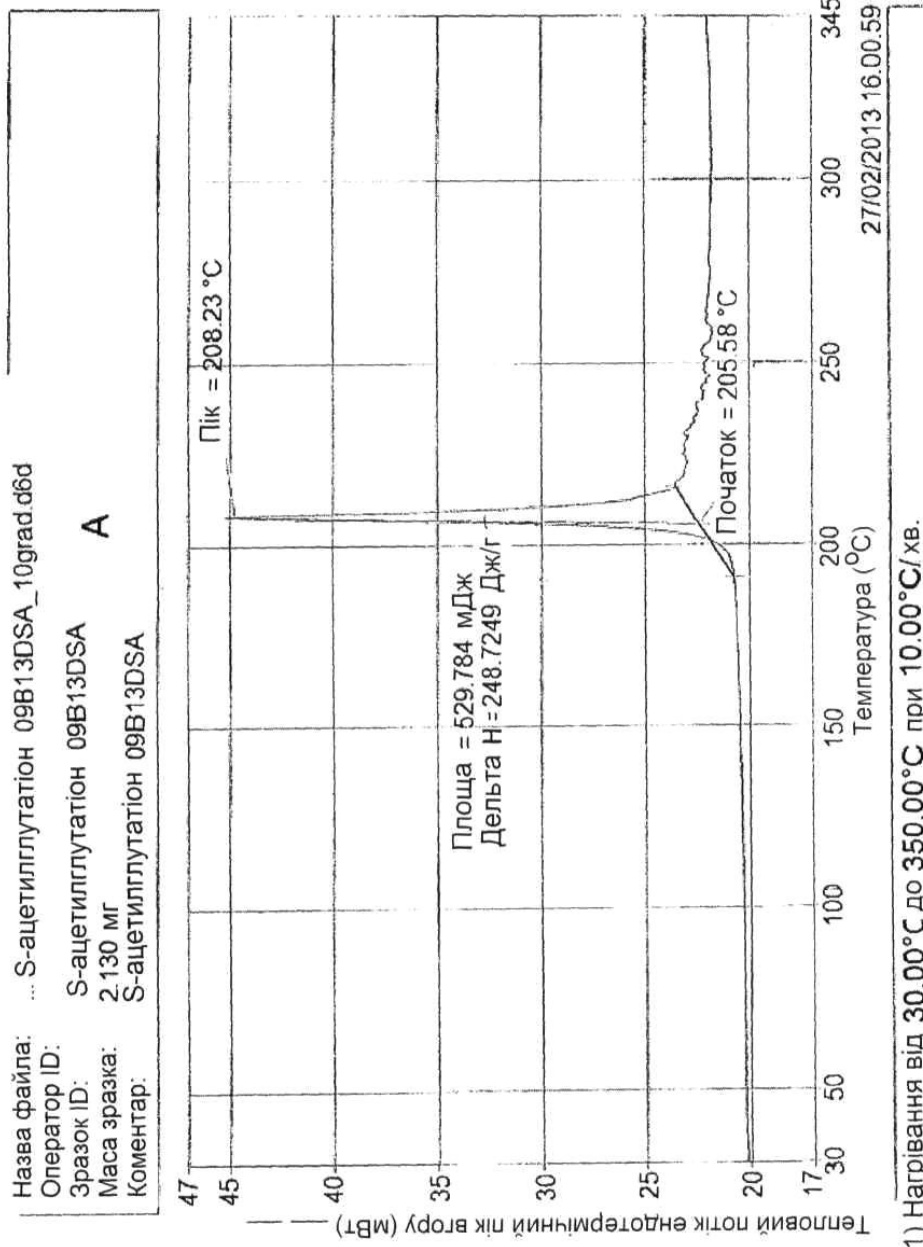
Фігура 7



Фігура 8

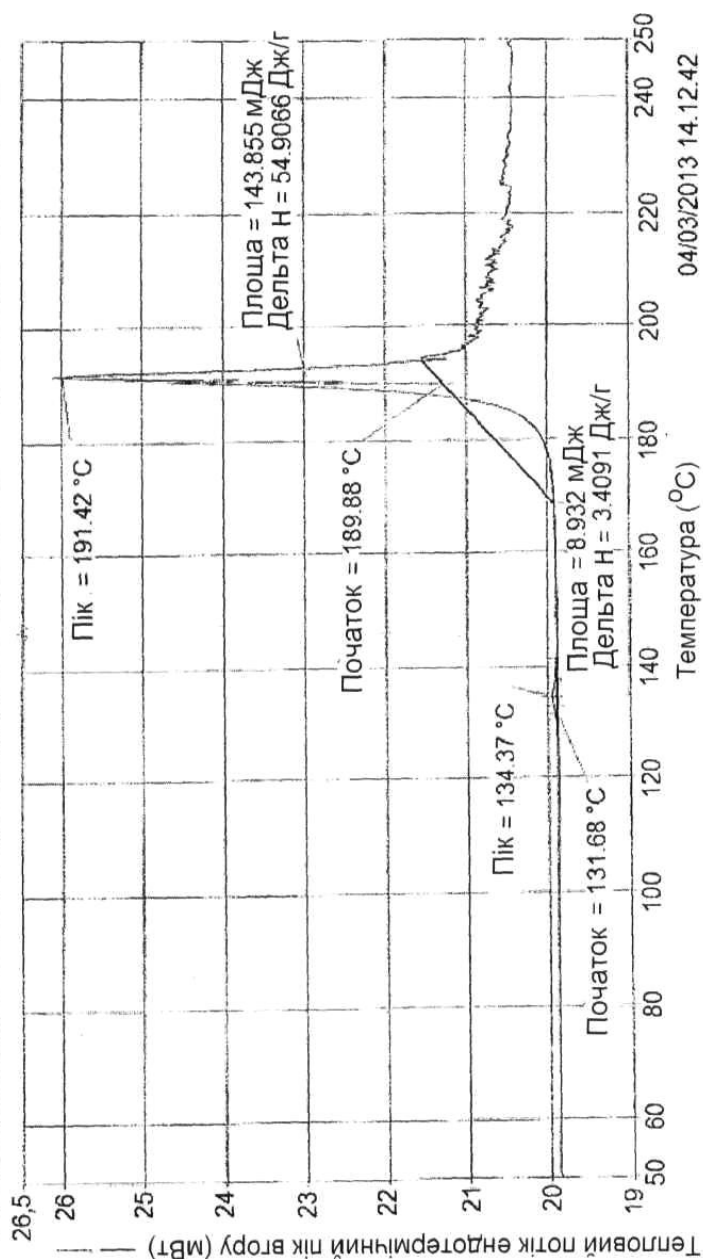


Фігура 9



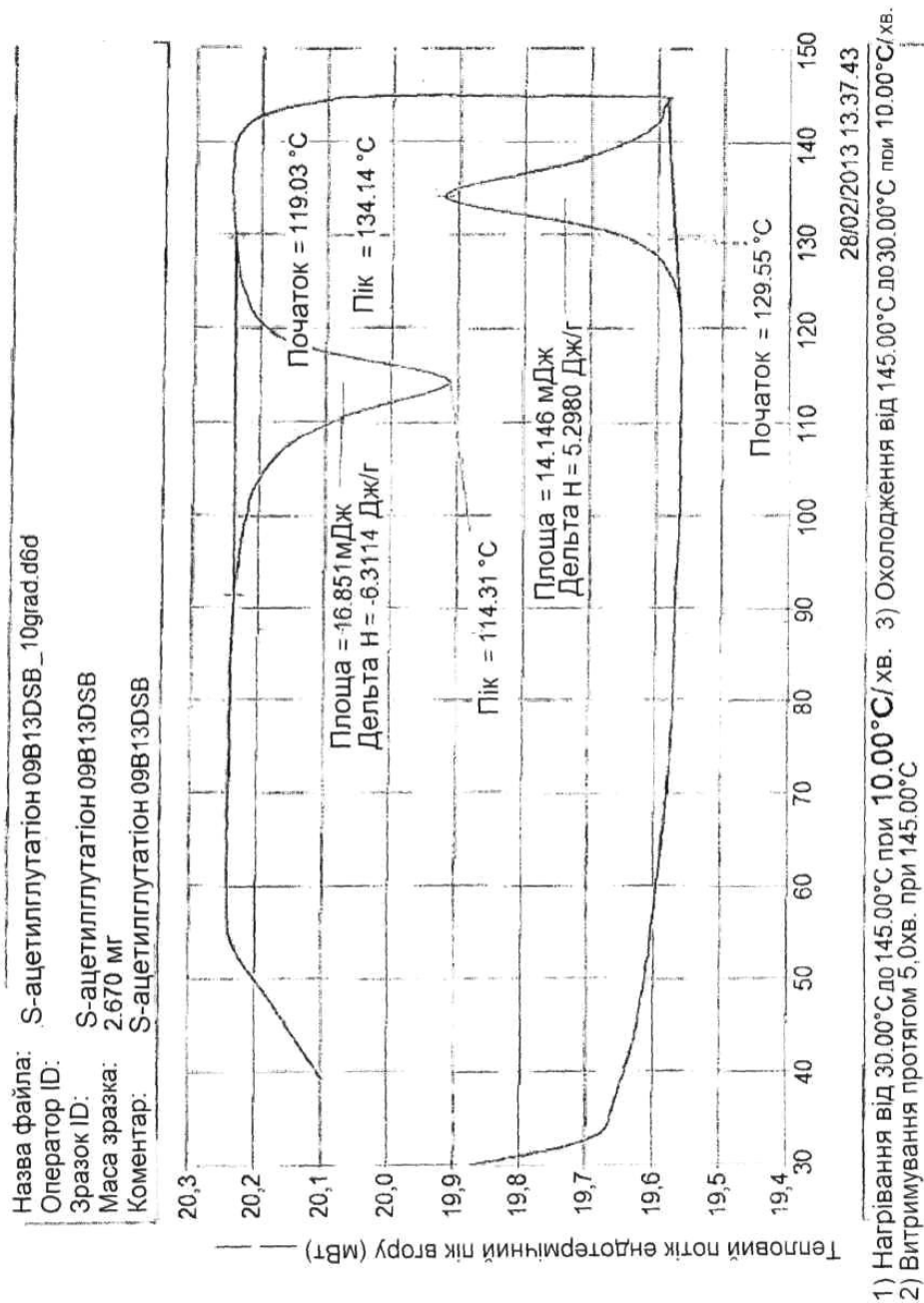
Фігура 10

Назва файла: C:\... \ S-ацетилглютатон 09B13DSB_2grad.d6d
 Оператор ID: S-ацетилглютатон 09B13DSB
 Зразок ID: 2.620 мг
 Маса зразка: S-ацетилглютатон 09B13DSB
 Коментар:



1) Нагрівання від 50.00 °C до 255.00 °C при 2.00 °C/хв.

Фігура 11



Фігура 12

Комп'ютерна верстка С. Чулій

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
 вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601