



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **123156** (13) **C2**
(51) МПК (2021.01)
C07D 471/04 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61P 37/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2018 03820	(72) Винахідник(и): Айссауї Хамед (CH), Босс Крістоф (CH), Буа Патрік (CH), Аземанн Жульєн (CH), Зіґріст Ромен (CH), фон Раумер Маркус (CH)
(22) Дата подання заявки: 14.09.2016	(73) Володілець (володільці): ІДОРСІЯ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ ЛТД, Hegenheimermattweg 91, 4123 Allschwil, Switzerland (CH)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 25.02.2021	(74) Представник: Шпакович Тетяна Іванівна, реєстр. №240
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: PCT/EP2015/071060	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2015/140684 A1, 24.09.2015 WO 2011/117798 A1, 29.09.2011 WO 2010/054113 A2, 14.05.2010
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 15.09.2015	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: EP	
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.07.2018, Бюл.№ 13	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 24.02.2021, Бюл.№ 8	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/EP2016/071637, 14.09.2016	

(54) КРИСТАЛІЧНА ФОРМА (S)-2-(8-((5-ХЛОРПІРИМІДИН-2-ІЛ)(МЕТИЛ)АМІНО)-2-ФТОР-6,7,8,9-ТЕТРАГІДРО-5Н-ПІРИДО[3,2-b]ІНДОЛ-5-ІЛ)ОЦТОВОЇ КИСЛОТИ, ЇЇ ЗАСТОСУВАННЯ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ, ЩО ЇЇ МІСТИТЬ

(57) Реферат:

Винахід належить до кристалічної форми (S)-2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-піридо[3,2-b]індол-5-іл)оцтової кислоти, способів її одержання, фармацевтичних композицій, що містять зазначені кристалічні форми, фармацевтичних композицій, отриманих з таких кристалічних форм, та їх застосування як лікарських засобів, особливо як модуляторів рецептора CRTH₂.

UA 123156 C2

Винахід відноситься до нової кристалічної форми (S)-2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5H-піридо[3,2-b]індол-5-іл)оцтової кислоти (яку надалі також називають "СПОЛУКА"), способів її одержання, фармацевтичних композицій, що включають зазначені кристалічні форми, фармацевтичних композицій, отриманих з таких кристалічних форм, та їх застосування як модуляторів рецептору простагландину D₂ ("DP рецептор"), найбільш особливо як модуляторів рецептора CRTH₂ ("рецептор DP2"), у лікуванні ряду хвороб і порушень, індукованих простагландином. Зокрема СПОЛУКА в кристалічній формі також може застосовуватися, самостійно або у фармацевтичних композиціях для лікування хронічних і гострих алергічних/імунних хвороб/порушень, таких як астма, алергічна астма, еозинофільна астма, важка астма, риніт, алергічний риніт, набряк Квінке, алергія на отруту комах, лікарські алергії, алергічний синусит, алергічний нефрит, алергічний кон'юнктивіт, атопічний дерматит, бронхіальна астма, харчова алергія, системні порушення мастоциту, анафілактичний шок, кропивниця, екзема, виразковий коліт, хронічна обструктивна хвороба легені (COPD), запальне захворювання кишечника, ревматоїдний артрит і назальний поліпоз; хвороб, пов'язаних з еозинофілами, що включають васкуліти малих судин, такі як синдром Черга-Страуса, гранулематоз Вегенера, мікроскопічний поліваскуліт (та орган специфічні підмножини останнього), гіпереозинофільні синдроми, такі як еозинофільна пневмонія, еозинофільний езофагіт, рефлюксний езофагіт, еозинофільний ендокардит (ендокардит Леффлера), еозинофільно-міалгічний синдром, еозинофільний фасциїт, еозинофільний пустульозний фолікуліт (хвороба Офуджі), еозинофільні виразки, ангіолімфоїдна гіперплазія з еозинофілією (ALHE), еозинофільний целюліт (синдром Уелса), хронічна еозинофільна лейкемія, DRESS синдром (лікарська шкірна реакція, з еозинофілією і системними проявами) та хвороба Стіла (системний напад ювенільного ідіопатичного артриту); хвороб, пов'язаних з базофілами, включаючи базофільну лейкемію та базофільний лейкоцитоз; і кістозного фіброзу.

Передумови створення винаходу:

У якості відповіді на вплив алергену в алергічних реакціях, мастоцити активуються і звільняють медіатори, такі як гістамін, тромбоксан A₂ (TxA₂), цистеїнілові лейкотриєни (CysLTs) і простагландин D₂ (PGD₂). Ці медіатори взаємодіють з відповідними рецепторами та викликають фізіологічні ефекти, такі як збільшена судинна прохідність, набряк, сверблячка, назальна та легенева гіперемія, бронхоконстрикція та секреція слизу. Збільшена судинна прохідність, наприклад, забезпечує надлишкове проникнення еозинофільних і базофільних лейкоцитів у тканину й, таким чином, підсилює алергічну реакцію.

Сучасні способи лікування алергічних хвороб включають агенти, які можуть блокувати або інакше переривати подібні взаємодії, такі як, антигістаміни (антагоністи рецептора гістаміну H₁), антагоністи рецептора лейкотриєну, агоністи бета-адренергічного рецептора та кортикостероїди. Звичайне лікування антигістамінами та антагоністами лейкотриєну обмежене в ефективності, і довгострокове застосування кортикостероїдів часто пов'язане з небажаними побічними ефектами.

PGD₂ являє собою агоніст, який, як відомо, діє на два пов'язані G-протеїнових рецептора, PGD₂ рецептор DP1 і нещодавно ідентифікований рецептор CRTH₂ (хемоатрактантний рецептор - гомологічна молекула що експресується на клітинах Th2) (який також називають "DP2 рецептор").

Підвищені рівні PGD₂, як вважається, викликають запалення, що так само спостерігається при алергічних хворобах, таких як алергічний риніт, алергічна астма, алергічний кон'юнктивіт, атопічний дерматит і подібні. Тому, блокування взаємодії PGD₂ з його рецепторами вважають корисною терапевтичною стратегією для лікування таких хвороб.

GB 2388540 розкриває застосування раматробану ((3R)-3-(4-фторбензол-сульфонамідо)-1,2,3,4-тетрагідрокарбазол-9-пропіонова кислота), антагоніста рецептору TxA₂ (який також називають "TP рецептор") з додатковою антагоністичною активністю за CRTH₂, для профілактики та лікування алергічних хвороб, таких як астма, алергічний риніт або алергічний кон'юнктивіт. В Т. Ishizuka et al., Cardiovascular Drug Rev. 2004, 22(2), 71-90 описана дія раматробану на пізній фазі запалення. Крім того, описана біодоступність раматробану при пероральному введенні та його здатність інгібувати еозинофільну міграцію, індувану простагландином D₂ in vitro (Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 305(1), p. 347-352 (2003)).

Азаїндольні похідні оцтової кислоти з антагоністичною активністю CRTH₂ розкриті в WO 2010/054113, WO 2010/054114 та в B.A. Stearns et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009, 19, 4647-4651.

WO 2011/117798 і WO 2012/140612 розкривають (похідні 3-геретоариламіно-1,2,3,4-тетрагідро-9H-карбазол-9-іл)-оцтової кислоти та (7-геретоариламіно-6,7,8,9-

тетрагідропіридо[1,2-а]індол-10-іл)оцтової кислоти, відповідно, похідні яких мають CRTN_2 антагоністичну активність.

Несподіваним чином було встановлено, що СПОЛУКА має значно кращі властивості в *in vitro* випробуванні цитотоксичності в первинних культивованих гепатоцитах пацюка. Тому очікують, що СПОЛУКА має поліпшений профіль токсичності *in-vivo*.

Було встановлено, що певні кристалічні форми СПОЛУКИ можуть бути виділені за певних умов. Зазначені кристалічні форми СПОЛУКИ є новими і можуть мати перспективні властивості з погляду потенційного застосування СПОЛУКИ як активного фармацевтичного компонента. Такі переваги можуть включати кращі реологічні властивості, меншу гігроскопічність; кращу відтворюваність у виробництві (наприклад, кращі параметри фільтрування, кращу відтворюваність формування та/або краще осадження); та/або певну морфологію. Такі кристалічні форми СПОЛУКИ можуть особливо придатними в способі виробництва певних фармацевтичних композицій.

Опис фігур

ФІГ. 1 демонструє діаграму дифракції рентгенівських променів на порошку СПОЛУКИ у кристалічній формі 1, виміряну при 5 % ВВ і 25 °С, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку продемонстрована щодо $\text{Cu K}\alpha$ опромінення. Діаграма дифракції рентгенівських променів демонструє піки, що мають відносну інтенсивність, у порівнянні з самим інтенсивним піком на діаграмі, з наступним процентним вмістом (відносна інтенсивність піку, наведена у круглих дужках) при зазначених кутах заломлення 2θ (наведено вибрані піки з діапазону 8-30° 2θ з відносною інтенсивністю, більше, ніж 10 %): 12,6° (27 %), 14,0 (28 %), 15,6° (11 %), 19,8° (14 %), 20,0° (11 %), 21,1° (100 %) і 26,4° (27 %).

ФІГ. 2 демонструє діаграму дифракції рентгенівських променів на порошку СПОЛУКИ в кристалічній формі 1, виміряну при 20 % ВВ і 25 °С, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку продемонстрована відносно $\text{Cu K}\alpha$ опромінення. Діаграма дифракції рентгенівських променів демонструє піки, що мають відносну інтенсивність, у порівнянні з самим інтенсивним піком на діаграмі, з наступним процентним вмістом (відносна інтенсивність піка, наведена у круглих дужках) при зазначених кутах заломлення 2θ (наведено вибрані піки з діапазону 8-30° 2θ з відносною інтенсивністю, більше, ніж 10 %): 12,6° (34 %), 14,0 (23 %), 19,7° (14 %), 21,1° (100 %) і 26,4° (19 %).

ФІГ. 3 демонструє діаграму дифракції рентгенівських променів на порошку СПОЛУКИ в кристалічній формі 1, виміряну при 50 % ВВ і 25 °С, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку продемонстрована відносно $\text{Cu K}\alpha$ опромінення. Діаграма дифракції рентгенівських променів демонструє піки, що мають відносну інтенсивність, у порівнянні з самим інтенсивним піком на діаграмі, з наступним процентним вмістом (відносна інтенсивність піка, наведена у круглих дужках) при зазначених кутах заломлення 2θ (наведено вибрані піки з діапазону 8-30° 2θ з відносною інтенсивністю, більше, ніж 10 %): 12,6° (54 %), 14,0 (27 %), 19,5° (30 %), 21,1° (100 %), 21,4° (12 %), 23,0° (11 %) і 26,1° (43 %).

ФІГ. 4 демонструє діаграму дифракції рентгенівських променів на порошку СПОЛУКИ в кристалічній формі 1, виміряну при 95 % ВВ і 25 °С, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку продемонстрована відносно $\text{Cu K}\alpha$ опромінення. Діаграма дифракції рентгенівських променів демонструє піки, що мають відносну інтенсивність, у порівнянні з самим інтенсивним піком на діаграмі, з наступним процентним вмістом (відносна інтенсивність піка, наведена у круглих дужках) при зазначених кутах заломлення 2θ (наведено вибрані піки з діапазону 8-30° 2θ з відносною інтенсивністю, більше, ніж 10 %): 12,6° (62 %), 14,0 (24 %), 16,2° (13 %), 18,9° (11 %), 19,5° (32 %), 21,1° (100 %), 21,5° (17 %), 22,9° (18 %) і 26,0° (47 %).

На діаграмах дифракції рентгенівських променів з ФІГ. 1 по ФІГ. 4 кут заломлення 2θ (2θ) заданий на горизонтальній осі, а відлік на вертикальній осі.

Для уникнення будь-яких сумнівів, перераховані вище піки описують результати експерименту дифракції рентгенівських променів на порошку, показані на ФІГ. 1-4. Потрібно розуміти, що, на відміну від вищезгаданого списку піків, необхідний вибір тільки характерних піків, які повністю, і однозначно характеризують СПОЛУКУ у відповідній кристалічній формі даного винаходу.

ФІГ. 5 показує гравіметричну діаграму сорбції пари СПОЛУКИ в кристалічній формі 1, отриманої відповідно до Прикладу 1.

У гравіметричній діаграмі сорбції пари ФІГ. 5 відносна вологість (% ВВ) задана на горизонтальній осі, а зміна маси (% dm) на вертикальній осі.

ФІГ. 6 показує криву ДСК СПОЛУКИ у кристалічній формі 1.

У діаграмі ДСК на ФІГ. 6 температура (°С) задана на горизонтальній осі, а потужність (мВт) на вертикальній осі.

Детальний опис винаходу

1) Перший варіант здійснення винаходу відноситься до кристалічної форми (S)-2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5H-піrido[3,2-b]індол-5-іл)оцтової кислоти (СПОЛУКА); яка характеризується присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : 12,6, 14,0° і 21,1, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 5 %, при близько 20 %, при близько 50 %, або при близько 95 % відносній вологості та при температурі близько 25 °C.

Потрібно розуміти, що кристалічна форма згідно з варіантом здійснення 1) включає СПОЛУКУ в кристалічній формі вільної кислоти (тобто не у формі солі). Крім того, зазначена кристалічна форма може включати некоординований та/або координований розчинник (особливо некоординовану та/або координовану воду). Координований розчинник (особливо координована вода) застосовують тут як термін для кристалічного сольвату (зокрема, кристалічного гідрату). Щоб уникнути сумнівів застосовності, термін "кристалічний гідрат" в цій заявці включає нестехіометричні гідрати. Аналогічно, некоординований розчинник застосовують в цій заявці як термін для фізично сорбованого або фізично захопленого розчинника (визначення відповідно до Polymorphism in the Pharmaceutical Industry (Ed. R. Hilfiker, VCH, 2006), Chapter 8: U.J. Griesser: The Importance of Solvates). Також зрозуміло, що кристалічна форма може містити різну кількість координованої води залежно від відносної вологості, і що діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку, може, таким чином, мінятися залежно від відносної вологості. Щоб уникнути сумнівів, даний винахід охоплює всі кристалічні підформи кристалічної форми, які обернено перетворюються одна в одну залежно від відносної вологості, і які характеризуються присутністю конкретних піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку, при конкретній відносній вологості та при приблизно 25 °C. Розуміють, що посилання на вимірювання при даній відносній вологості та при даній температурі означає, що вимірювання виконали після того, як кристалічна форма адаптувалася до певної відносній вологості та температури (тобто після часу урівноважування); як правило, час урівноважування становить від близько 0,5 год. до близько 24 год., зокрема від 1 год. до 12 год. та особливо від 1 год. до 6 год.

2) Інший варіант здійснення відноситься до кристалічної форми СПОЛУКИ згідно з варіантом здійснення 1), що характеризується:

а. присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : 12,6, 14,0, 19,8, 20,0, 21,1° і 26,4, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 5 % відносній вологості та при температурі близько 25 °C; або

б. присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : 12,6, 14,0, 19,7, 21,1, і 26,4, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 20 % відносній вологості та при температурі близько 25 °C; або

в. присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : 12,6, 14,0, 19,5, 21,1° і 26,1, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 50 % відносній вологості та при температурі близько 25 °C; або

г. присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : 12,6, 14,0, 19,5, 21,1, 21,5° і 26,0, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 95 % відносній вологості та при температурі близько 25 °C.

3) Інший варіант здійснення відноситься до кристалічної форми СПОЛУКИ згідно з варіантом здійснення 1), що характеризується:

а. присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : 12,6, 14,0, 15,6, 19,8, 20,0, 21,1, 23,7, 26,4, 27,5° і 28,4, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 5 % відносній вологості та при температурі близько 25 °C; або

б. присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : 12,6, 14,0, 15,6, 19,7, 21,1, 23,3, 23,6, 26,4, 27,4, і 28,4, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 20 % відносній вологості та при температурі близько 25 °C; або

в. присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку, з наступними кутами заломлення 2θ : 12,6, 14,0, 15,2, 16,1, 19,5, 21,1, 21,4, 23,0, 26,1, і 27,0, де діаграма

13) Інший варіант здійснення відноситься до кристалічної форми, такої як особливо чиста кристалічна форма СПОЛУКИ (S)-2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5H-піrido[3,2-b]індол-5-іл)оцтової кислоти, яку одержують шляхом:

а. приготування розчину СПОЛУКИ в ТГФ при 25 мг/мл;

5 б. дозування 0,2 мл розчину в 4 мл скляну віалу;

в. упарювання ТГФ, застосовуючи обладнання, що дозволяє упарювання шляхом комбінованого застосування інфрачервоного опромінення, обертання та вакууму заданого при 30 °C і 100 мбар протягом 30 хвилин (наприклад, Combidancer від Hettich AG, Switzerland);

10 г. додавання 0,02 мл розчинника, вибраного з етилацетату, ацетонітрилу, ацетону або ізопропілового спирту (бажано ацетону) до сухого залишку та забезпечення витримки протягом 3 днів при температурі навколишнього середовища в закритій віалі; і

д. виділення отриманого твердого осаду.

14) Інший варіант здійснення відноситься до кристалічної форми СПОЛУКИ згідно з варіантом здійснення 13), що характеризується присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : 12,6, 14,0, і 21,1, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 5 %, при близько 20 %, при близько 50 %, або при близько 95 % відносній вологості та при температурі близько 25 °C.

15) Інший варіант здійснення відноситься до кристалічної форми СПОЛУКИ згідно з варіантом здійснення 13), що характеризується:

а. присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : 12,6, 14,0, 19,8, 20,0, 21,1° і 26,4, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 5 % відносній вологості та при температурі близько 25 °C; або

25 б. присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : 12,6, 14,0, 19,7, 21,1° і 26,4, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 20 % відносній вологості та при температурі близько 25 °C; або

30 в. присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : 12,6, 14,0, 19,5, 21,1, 21,4° і 26,1, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 50 % відносній вологості та при температурі близько 25 °C; або

35 г. присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : 12,6, 14,0, 19,5, 21,1, 21,5° і 26,0, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 95 % відносній вологості та при температурі близько 25 °C.

16) Інший варіант здійснення відноситься до кристалічної форми СПОЛУКИ згідно з варіантом здійснення 13), що характеризується:

40 а. присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : 12,6, 14,0, 15,6, 19,8, 20,0, 21,1, 23,7, 26,4, 27,5° і 28,4, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 5 % відносній вологості та при температурі близько 25 °C; або

45 б. присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : 12,6, 14,0, 15,6, 19,7, 21,1, 23,3, 23,6, 26,4, 27,4° і 28,4, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 20 % відносній вологості та при температурі близько 25 °C; або

50 в. присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : 12,6, 14,0, 15,2, 16,1, 19,5, 21,1, 21,4, 23,0, 26,1, і 27,0, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 50 % відносній вологості та при температурі близько 25 °C; або

г. присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : 12,6, 14,0, 16,2, 18,9, 19,5, 21,1, 21,5, 22,9, 26,0, і 27,0, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 95 % відносній вологості та при температурі близько 25 °C.

55 17) Інший варіант здійснення відноситься до кристалічної форми СПОЛУКИ згідно з варіантом здійснення 13), що характеризується присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : 12,6, 14,0, і 21,1° (і особливо 12,6, 14,0, 19,8, 20,0, 21,1° і 26,4), де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 5 % відносній вологості та при температурі близько 25 °C.

18) Інший варіант здійснення відноситься до кристалічної форми СПОЛУКИ згідно з варіантом здійснення 13), що характеризується присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : 12,6, 14,0, і 21,1° (і особливо 12,6, 14,0, 19,7, 21,1° і 26,4°), де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 20 % відносній вологості і при температурі близько 25 °С.

19) Інший варіант здійснення відноситься до кристалічної форми СПОЛУКИ згідно з варіантом здійснення 13), що характеризується присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : 12,6, 14,0, і 21,1° (і особливо 12,6, 14,0, 19,5, 21,1, 21,4° і 26,1°), де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 50 % відносній вологості та при температурі близько 25 °С.

20) Інший варіант здійснення відноситься до кристалічної форми СПОЛУКИ згідно з варіантом здійснення 13), що характеризується присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : 12,6, 14,0, і 21,1° (і особливо 12,6, 14,0, 19,5, 21,1, 21,5° і 26,0°), де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 95 % відносній вологості та при температурі близько 25 °С.

21) Інший варіант здійснення відноситься до кристалічної форми СПОЛУКИ згідно з варіантом здійснення 13),

а. яка, у значній мірі, представляє діаграму дифракції рентгенівських променів зразку порошку, що зображена на ФІГ. 1, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 5 % відносній вологості та при температурі близько 25 °С; або

б. яка, у значній мірі, представляє діаграму дифракції рентгенівських променів зразку порошку, що зображена на ФІГ. 2, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 20 % відносній вологості та при температурі близько 25 °С; або

в. яка, у значній мірі, представляє діаграму дифракції рентгенівських променів зразку порошку, що зображена на ФІГ. 3, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 50 % відносній вологості та при температурі близько 25 °С; або

г. яка, у значній мірі, представляє діаграму дифракції рентгенівських променів зразку порошку, що зображена на ФІГ. 4, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 95 % відносній вологості та при температурі близько 25 °С.

22) Інший варіант здійснення відноситься до кристалічної форми СПОЛУКИ згідно з варіантом здійснення 13), яка, у значній мірі, представляє діаграму дифракції рентгенівських променів зразку порошку, що зображена на ФІГ. 1, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 5 % відносній вологості та при температурі близько 25 °С.

23) Інший варіант здійснення відноситься до кристалічної форми СПОЛУКИ згідно з варіантом здійснення 13), яка, у значній мірі, представляє діаграму дифракції рентгенівських променів зразку порошку, що зображена на ФІГ. 2, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 20 % відносній вологості та при температурі близько 25 °С.

24) Інший варіант здійснення відноситься до кристалічної форми СПОЛУКИ згідно з варіантом здійснення 13), яка, у значній мірі, представляє діаграму дифракції рентгенівських променів зразку порошку, що зображена на ФІГ. 3, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 50 % відносній вологості та при температурі близько 25 °С.

25) Інший варіант здійснення відноситься до кристалічної форми СПОЛУКИ згідно з варіантом здійснення 13), яка, у значній мірі, представляє діаграму дифракції рентгенівських променів зразку порошку, що зображена на ФІГ. 4, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при близько 95 % відносній вологості та при температурі близько 25 °С.

26) Інший варіант здійснення відноситься до кристалічної форми СПОЛУКИ відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1) - 25), яка демонструє ендотермічний процес у діапазоні від близько 260 °С до 276 °С, як виявлено диференціальною скануючою калориметрією із застосуванням способу відповідно до даного опису.

27) Інший варіант здійснення відноситься до кристалічної форми СПОЛУКИ відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1) - 26), яка, у значній мірі, представляє профіль гравіметричного поглинання води, зображений на ФІГ. 5, де профіль гравіметричного поглинання води виміряний при 25 °С.

28) Інший варіант здійснення відноситься до кристалічної форми СПОЛУКИ відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1) - 12), одержуваний у варіанті здійснення 13).

На основі залежностей різних варіантів здійснення 1) - 28), як розкрито вище, відповідно є можливими, маються на увазі та при цьому особливо розкриваються в індивідуалізованій формі наступні варіанти здійснення:

1, 2+1, 3+1, 4+1, 5+1, 6+1, 7+1, 8+1, 9+1, 10+1, 11+1, 12+1, 13, 14+13, 15+13, 16+13, 17+13, 18+13, 19+13, 20+13, 21+13, 22+13, 23+13, 24+13, 25+13, 26+1, 26+2+1, 26+3+1, 26+4+1, 26+5+1, 26+6+1, 26+7+1, 26+8+1, 26+9+1, 26+10+1, 26+11+1, 26+12+1, 26+13, 26+14+13, 26+15+13, 26+16+13, 26+17+13, 26+18+13, 26+19+13, 26+20+13, 26+21+13, 26+22+13, 26+23+13, 26+24+13, 26+25+13, 27+1, 27+2+1, 27+3+1, 27+4+1, 27+5+1, 27+6+1, 27+7+1, 27+8+1, 27+9+1, 27+10+1, 27+11+1, 27+12+1, 27+13, 27+14+13, 27+15+13, 27+16+13, 27+17+13, 27+18+13, 27+19+13, 27+20+13, 27+21+13, 27+22+13, 27+23+13, 27+24+13, 27+25+13, 27+26+1, 27+26+2, 27+26+3, 28+1, 28+2+1, 28+3+1, 28+4+1, 28+5+1, 28+6+1, 28+7+1, 28+8+1, 28+9+1, 28+10+1, 28+11+1, 28+12+1;

У наведеному вище переліку, числа відносяться до варіантів здійснення згідно з їхньою нумерацією, наведеною вище, тоді як "+" вказує на залежність від іншого варіанта здійснення. Різні індивідуалізовані варіанти здійснення відділені комами. Інакше кажучи, наприклад, "26+2+1" відноситься до варіанту здійснення 26) залежного від варіанту здійснення 2), залежного від варіанту здійснення 1), тобто варіант здійснення "26+2+1" відповідає варіанту здійснення 1), який додатково характеризується ознаками варіантів здійснення 2) і 26).

Для уникнення будь-яких сумнівів, кожного разу, коли один з вищезгаданих варіантів здійснення відноситься до "пиків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ ", зазначена діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку була отримана за допомогою комбінованого $\text{Cu K}\alpha_1$ і $\text{K}\alpha_2$ опромінення, без видалення $\text{K}\alpha_2$; і потрібно розуміти, що точність значень 2θ передбачувано знаходиться в діапазоні $\pm 0,1$ - $0,2$. Зокрема, коли визначається кут заломлення 2θ для піку у варіантах здійснення винаходу та у формулі винаходу, вказане значення 2θ , потрібно розуміти як інтервал від вказаного значення мінус $0,2^\circ$ до вказаного значення плюс $0,2^\circ$ ($2\theta \pm 0,2^\circ$); і переважно від вказаного значення мінус $0,1^\circ$ до вказаного значення плюс $0,1^\circ$ ($2\theta \pm 0,1^\circ$).

Якщо форму множини застосовують для сполук, твердих фаз, фармацевтичних композицій, хвороб і подібного, то вона також спрямована на окрему сполуку, тверду фазу, фармацевтичну композицію, хворобу та подібне.

Визначення, наведені тут, призначені для застосування так само до об'єкта винаходу відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1) - 28), і зробивши відповідні зміни, до всього опису та до формули винаходу, якщо інше прямо передбачене визначення не забезпечує більш широкого або більш вузького визначення. Добре відомо, що визначення або краще визначення терміну або виразу визначає і може замінити відповідний термін або вираз незалежно від (та в комбінації з) будь-яким визначенням або кращим визначенням будь-яких або всіх інших термінів або виразів, як визначено тут.

Термін "енантімерно збагачений" у контексті даного винаходу означає в першу чергу, що щонайменше 90, переважно щонайменше 95, і найбільш переважно щонайменше 99 мас. відсотків СПОЛУКИ знаходиться у формі одного енантімеру СПОЛУКИ. Розуміють, що СПОЛУКА присутня в енантімерно збагаченій абсолютній (S)-конфігурації.

Термін "у значній мірі чистий" у контексті даного винаходу означає особливо, що щонайменше 90, переважно щонайменше 95, і найбільш переважно щонайменше 99 мас. відсотків кристалів СПОЛУКИ присутні в кристалічній формі відповідно до даного винаходу.

Коли визначають присутність піку, наприклад, на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку, загальний підхід полягає в тому, щоб робити це відносно співвідношення S/N (S = сигнал, N = шум). Згідно з цим визначенням, при твердженні, що пік присутній на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку, то зрозуміло, що пік на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку, визначений наявним співвідношенням S/N (S = сигнал, N = шум) більшим, ніж x (де x є числовим значенням, більшим, ніж 1), зазвичай більшим, ніж 2, особливо більшим, ніж 3.

У контексті викладеного про те, що кристалічна форма в значній мірі демонструє діаграму дифракції рентгенівських променів на порошку зразку, як зображено на ФІГ. 1, 2, 3 або 4, відповідно, термін "у значній мірі" означає, що щонайменше основні піки діаграми, зображені на зазначених фігурах, тобто такі, що мають відносну інтенсивність більшу, ніж 20 %, особливо більшу, ніж 10 %, у порівнянні з найбільш інтенсивним присутнім на діаграмі піком. Проте, фахівець в галузі дифракції рентгенівських променів на порошку, визнає, що відносні інтенсивності в діаграмах дифракції рентгенівських променів на порошку можуть піддаватися сильним змінам інтенсивності через переважні орієнтаційні ефекти.

Якщо не застосовують у відношенні відносної вологості та температури, термін "близько", розміщений перед числовим значенням "X", має відношення в даній заявці до інтервалу, що поширюється від X мінус 10 % від X до X плюс 10 % до X, і переважно до інтервалу, що поширюється від X мінус 5 % від X до X плюс 5 % до X. В особливому випадку відносної вологості, термін "близько" розміщений перед відносною вологістю "Y" має відношення в даній заявці до інтервалу, що поширюється від відносній вологості Y мінус 3 від Y до Y плюс 3 до Y і переважно до інтервалу, що поширюється від Y мінус 1 від Y до Y плюс 1 до Y; наприклад, термін "близько 5 % відносна вологість" відноситься до відносної вологості між 2 % і 8 %, і переважно до відносній вологості між 4 % і 6 %. В особливому випадку температур термін "близько" розміщений перед температурою "Y" має відношення в даній заявці до інтервалу, що поширюється від температури Y мінус 5 °C до Y плюс 5 °C, переважно до інтервалу, що поширюється від Y мінус 3 °C до Y плюс 3 °C. Кімнатна температура означає температуру близько 25 °C.

Щоразу, коли застосовують слово "між" або "до", щоб описати числовий діапазон, потрібно розуміти, що кінцеві точки зазначеного діапазону однозначно включені в діапазон. Наприклад: якщо діапазон температури описаний між 40 °C і 80 °C (або від 40 °C до 80 °C), те це означає, що кінцеві точки 40 °C і 80 °C включені в діапазон; або якщо змінна визначена як ціле число між 1 і 4 (або 1-4), це означає, що змінна є цілим числом 1, 2, 3 або 4.

Вираз % мас/мас відноситься до масової процентної частки відносно загальної маси розглянутої композиції. Аналогічно, вираз об/об відноситься до співвідношення за об'ємом двох розглянутих компонентів.

Кристалічні форми, зокрема, особливо чисті кристалічні форми, СПОЛУКИ відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1) - 28), можуть застосовуватись як лікарські засоби, наприклад, у формі фармацевтичних композицій для ентерального (такого як, особливо, перорального) або парентерального введення (включаючи місцеве застосування або інгаляцію).

29) Інший варіант здійснення, таким чином, відноситься до кристалічної форми сполуки (S)-2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5H-піридо[3,2-b]індол-5-іл)оцтової кислоти, відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1) - 28) для застосування як лікарського засобу.

Кристалічна тверда форма, зокрема, особливо чиста кристалічна тверда форма СПОЛУКИ відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1) - 28), може застосовуватися як єдиний компонент або як суміш з іншими кристалічними формами або аморфною формою СПОЛУКИ.

Одержання фармацевтичних композицій може бути здійснене способом, який відомий будь-якому фахівцеві в даній галузі техніки (див., наприклад, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition (2005), Part 5, "Pharmaceutical Manufacturing" [Опублікована Lippincott Williams & Wilkins]), шляхом внесення кристалічної форми даного винаходу, необов'язково в комбінації з іншими терапевтично важливими речовинами, у галенову форму введення разом з підходящими, нетоксичними, інертними, фармацевтично прийнятними твердими або рідкими матеріалами-носіями та за необхідності звичайними фармацевтичними ад'ювантами.

30) Додатковий варіант здійснення винаходу відноситься до фармацевтичних композицій, що включають як активний компонент кристалічну форму СПОЛУКИ відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1) - 28), і щонайменше один фармацевтично прийнятний матеріал носія.

31) Додатковий варіант здійснення винаходу відноситься до кристалічної форми СПОЛУКИ відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1) - 28), для застосування в одержанні фармацевтичної композиції, де зазначена фармацевтична композиція включає як активний компонент СПОЛУКУ і щонайменше один фармацевтично прийнятний матеріал носія.

32) Додатковий варіант здійснення винаходу відноситься до кристалічної форми СПОЛУКИ відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1) - 28) для застосування у запобіганні або лікуванні хвороб, вибраних з групи, що включає хронічні та гострі алергічні/імунні хвороби/порушення, що включають астму, алергічну астму, еозинофільну астму, важку астму, риніти, алергічні риніти, набряк Квінке, алергію на отруту комах, лікарські алергії, алергічний синусит, алергічний нефрит, алергічний кон'юнктивіт, атопічний дерматит, бронхіальну астму, харчову алергію, системні порушення мастоциту, анафілактичний шок, кропивницю, екзему, виразковий коліт, хронічну обструктивну хворобу легені (COPD), запальне захворювання кишечника, ревматоїдний артрит і назальний поліпоз; хвороб, пов'язаних з еозинофілами, що включають васкуліти малих судин, такі як синдром Черга-Страуса, грануломатоз Вегенера, мікроскопічний поліваскуліт (і орган специфічні підмножини останнього), гіпереозинофільні синдроми, такі як еозинофільна пневмонія, еозинофільний езофагіт, рефлюксний езофагіт, еозинофільний ендокардит (ендокардит Леффлера), еозинофільно-міалгічний синдром, еозинофільний фасцит, еозинофільний пустульозний фолікуліт (хвороба Офуджі),

еозинофільні виразки, ангіолімфоїдну гіперплазію з еозинофілією (ALHE), еозинофільний целюліт (синдром Уелса), хронічну еозинофільну лейкемію, DRESS синдром (лікарська шкірна реакція, що супроводжується еозинофілією і системними проявами) і хворобу Стіла (системний напад ювенільного ідіопатичного артрити); хвороб, пов'язаних з базофілами, включаючи базофільну лейкемію та базофільний лейкоцитоз і кістозний фіброз.

33) Кращий варіант здійснення винаходу відноситься до кристалічної форми СПОЛУКИ відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1) - 28) для застосування в запобіганні або лікуванні хвороб, вибраних з групи, що включає астму, еозинофільну астму, алергічний риніт, atopічний дерматит, назальний поліпоз, харчову алергію (особливо харчову алергію, пов'язану з IgE), кропивницю (особливо хронічну кропивницю), еозинофільний езофагіт, синдром Черга-Страуса, гіпереозинофільний синдром, еозинофільну пневмонію (особливо хронічну еозинофільну пневмонію), DRESS синдром, хворобу Стіла, COPD і кістозний фіброз (особливо астму, еозинофільну астму, алергічний риніт, atopічний дерматит, харчову алергію, пов'язану з IgE, хронічну кропивницю, еозинофільний езофагіт і синдром Черга-Страуса).

34) Додатковий варіант здійснення винаходу відноситься до кристалічної форми СПОЛУКИ відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1) - 28) для застосування в одержанні фармацевтичної композиції для запобігання або лікування хвороб, вибраних з групи, що включає хронічні та гострі алергічні/імунні хвороби/порушення, що включають астму, алергічну астму, еозинофільну астму, важку астму, риніти, алергічні риніти, ангіоедему, алергію на отруту комах, лікарські алергії, алергічний синусит, алергічний нефрит, алергічний кон'юнктивіт, atopічний дерматит, бронхіальну астму, харчову алергію, системні порушення мастоциту, анафілактичний шок, кропивницю, екземи, виразкові коліти, хронічну обструктивну хворобу легені (COPD), запальне захворювання кишечника, ревматоїдний артрит і назальний поліпоз; хвороб, пов'язаних з еозинофілами, що включають васкуліти малих судин, такі як синдром Черга-Страуса, грануломатоз Вегенера, мікроскопічний поліваскуліт (і орган специфічні підмножини останнього), гіпереозинофільні синдроми, як еозинофільна пневмонія, еозинофільний езофагіт, рефлюксний езофагіт, еозинофільний ендокардит (ендокардит Леффлера), еозинофільно-міалгічний синдром, еозинофільний фасциїт, еозинофільний пустульозний фолікуліт (хвороба Офуджі), еозинофільні виразки, ангіолімфоїдну гіперплазію з еозинофілією (ALHE), еозинофільний целюліт (синдром Уелса), хронічну еозинофільну лейкемію, DRESS синдром (лікарська шкірна реакція, що супроводжується еозинофілією і системними проявами) і хворобу Стіла (системний напад ювенільного ідіопатичного артрити); хвороб, пов'язаних з базофілами, включаючи базофільну лейкемію та базофільний лейкоцитоз і кістозний фіброз.

35) Кращий варіант здійснення винаходу відноситься до кристалічної форми СПОЛУКИ відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1) - 28) для застосування в одержанні фармацевтичної композиції для запобігання або лікування хвороб, вибраних з групи, що включає астму, еозинофільну астму, алергічний риніт, atopічний дерматит, назальний поліпоз, харчову алергію (особливо харчову алергію, пов'язану з IgE), кропивницю (особливо хронічну кропивницю), еозинофільний езофагіт, синдром Черга-Страуса, гіпереозинофільний синдром, еозинофільну пневмонію (особливо хронічну еозинофільну пневмонію), DRESS синдром, хворобу Стіла, COPD і кістозний фіброз (а особливо астму, еозинофільну астму, алергічний риніт, atopічний дерматит, харчову алергію, пов'язану з IgE, хронічну кропивницю, еозинофільний езофагіт і синдром Черга-Страуса).

36) Додатковий варіант здійснення винаходу відноситься до фармацевтичних композицій згідно з варіантом здійснення 30) для застосування в запобіганні або лікуванні хвороб, вибраних з групи, що включає хронічні та гострі алергічні/імунні хвороби/порушення, що включають астму, алергічну астму, еозинофільну астму, важку астму, риніти, алергічний риніт, ангіоедему, алергію на отруту комах, лікарську алергію, алергічний синусит, алергічний нефрит, алергічний кон'юнктивіт, atopічний дерматит, бронхіальну астму, харчову алергію, системні порушення мастоциту, анафілактичний шок, кропивницю, екзему, виразковий коліт, хронічну обструктивну хворобу легені (COPD), запальне захворювання кишечника, ревматоїдний артрит і назальний поліпоз; хвороб, пов'язаних з еозинофілами, що включають васкуліти малих судин, такі як синдром Черга-Страуса, грануломатоз Вегенера, мікроскопічний поліваскуліт (і орган специфічні підмножини останнього), гіпереозинофільні синдроми, як еозинофільна пневмонія, еозинофільний езофагіт, рефлюксний езофагіт, еозинофільний ендокардит (ендокардит Леффлера), еозинофільно-міалгічний синдром, еозинофільний фасциїт, еозинофільний пустульозний фолікуліт (хвороба Офуджі), еозинофільні виразки, ангіолімфоїдна гіперплазія з еозинофілією (ALHE), еозинофільний целюліт (синдром Уелса), хронічна еозинофільна лейкемія, DRESS синдром (лікарська шкірна реакція, що супроводжується еозинофілією і

системними проявами) і хвороба Стіла (системний напад ювенільного ідіопатичного артрити); хвороб, пов'язаних з базофілами, включаючи базофільну лейкемію та базофільний лейкоцитоз і кістозний фіброз.

37) Кращий варіант здійснення винаходу відноситься до фармацевтичних композицій згідно з варіантом здійснення 30) для застосування в запобіганні або лікуванні хвороб, вибраних з групи, що включає астму, еозинофільну астму, алергічний риніт, atopічний дерматит, назальний поліпоз, харчову алергію (особливо харчову алергію, пов'язану з IgE), кропивницю (особливо хронічну кропивницю), еозинофільний езофагіт, синдром Черга-Страуса, гіпереозинофільний синдром, еозинофільну пневмонію (особливо хронічну еозинофільну пневмонію), DRESS синдром, хворобу Стіла, COPD і кістозний фіброз (і особливо астму, алергічний риніт, atopічний дерматит, харчову алергію, пов'язану з IgE, хронічну кропивницю, еозинофільний езофагіт і синдром Черга-Страуса).

Даний винахід також відноситься до способу запобігання або лікування хвороби або порушення, згаданих тут, що включає введення фармацевтично активної кількості кристалічної форми СПОЛУКИ відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1) - 28) або фармацевтичної композиції відповідно до варіанту здійснення 30).

Даний винахід також відноситься до способу одержання СПОЛУКИ в енантімерно збагаченій формі, та до способів одержання та характеристики кристалічної форми СПОЛУКИ відповідно до будь-якого з варіантів здійснення 1) - 28). Зазначені способи описані у варіанті здійснення 13), а також у процедурах експериментальної частини нижче.

Експериментальні процедури:

Скорочення (використані вище або нижче):

Ac Ацетил (такі як в OAc = ацетат, AcOH = оцтова кислота)

aq. вода

Boc трет-бутоксикарбоніл

BSA Сироватка бичачого альбуміну

Bu Бутил такий як у n-Bu = n-бутил

конц. Концентрований

DXM Дихлорметан

DEA Діетиламін

DEA Диізопропілетиламін

DMFA N,N-Диметилформамід

DMCO Диметилсульфоксид

dpm розпадів на хвилину

EDTA Етилендіамінтетраоцтова кислота

ELS(D) Світлорозсіювання випарів (Детектування)

екв. Еквівалент(и)

Et Етил

EtOAc Етилацетат

EtOH Етанол

FX Флеш-хроматографія на силікагелі

FIG. Фігура

год. Година(и)

HEPES 4-(2-гідроксиетил)-піперазин-1-етансульфонова кислота

¹H-ЯМР Протонний ядерно-магнітний резонанс

VERX Високоєфективна рідинна хроматографія

PX-MS Рідинна хроматографія - Мас-спектрометрія

M Молярність

M Точна маса (застосовується для PX-MS)

Me Метил

MeCN Ацетонітрил

MeOH Метанол

MXв Мікрохвилі

mВт мілі-Ватт

мкл мікролітр

хв. Хвилина(и)

MS Мас-спектрометрія

N Нормальність

PBS Фосфато-сольовий буфер

Ph Феніл

	PPh ₃	Трифенілфосфін
	преп.	Препаративна
	ВВ	Відносна вологість
	КТ	Кімнатна температура
5	насич.	Насичений(а)
	ТФОК	Трифтороцтова кислота
	ТГФ	Тетрагідрофуран
	t _{ут}	Час утримання
	ТРИС	Трис-(гідроксиметил)амінометановий буфер
10	УФ	Ультрафіолет

Усі використані розчинники та реактиви, отримані з комерційних джерел, якщо не зазначено інакше.

Температури зазначені в градусах Цельсія (°C). Якщо не зазначено інакше, реакції відбуваються при кімнатній температурі (КТ).

У сумішах співвідношення частин розчинника або елюента або сумішей реактивів у рідкій формі наведені як співвідношення за об'ємом (об/об), якщо не зазначено інакше.

Сполуки очищені колонковою флеш-хроматографією на силікагелі (СГ) або препаративною ВЕРХ. Сполуки, описані у винаході, характеризуються РХ-МС (час утримання t_{ут} зазначений у хвиликах; молекулярна маса, отримана за мас-спектром, зазначена в г/моль, із застосуванням зазначених нижче умов).

Умови аналітичної РХ-МС, які застосовуються в прикладах нижче:

Аналізи РХ-МС виконані на системі Agilent 1100, обладнаній бінарним насосом Dionex P580, детектором з фотодіодною матрицею Dionex PDA-100 і мас-спектрометром Finnigan AQA.

Час утримання РХ отримували, застосовуючи наступні умови елюювання:

- Аналітична ВЕРХ на колонці Zorbax® SB-AQ (4,6×50 мм, 3,5 мкм, Agilent); лінійний градієнт вода/0,04 % ТФОК (А) і MeCN (В) від 5 % до 95 % В протягом 1,5 хв; швидкість потоку 4,5 мл/хв., детектування при 210 нм.

Очищення за допомогою препаративної ВЕРХ/МС (основні умови) виконували на системі бінарного градієнтного насоса високого тиску Gilson 333/334 з автосемплером і колектором фракцій Gilson 215, детектором Dionex UVD340U DAD, детектором Polymerlabs MH-ELS 1000 ELS і детектором Thermo MSQ Plus MS, із застосуванням колонки Waters XBridge C18 (10 мкм, 30×75 мм), з лінійним градієнтом вода/0,5 % 25 % NH₄OH (В) і MeCN (А), починаючи від 80/20 до 5/95 (В) / (А) впродовж 5 хвилин; швидкість потоку рідини 75 мл/хв.

Аналітичну ВЕРХ на хіральній стаціонарній фазі виконували на колонці Daicel ChiralPak AD-H (4,6×250 мм, 5 мкм) або на колонці ChiralPak AY-H (4,6×250 мм, 5 мкм). Звичайними умовами хіральної ВЕРХ є ізократична суміш 50 % гептану + 0,05 % ДЕА і 50 % EtOH+0,05 % ДЕА, при швидкості потоку 0,8 мл/хв., детектування при 210 нм (хіральна ВЕРХ-1) або ізократична суміш 40 % гептану та 60 % EtOH + 0,1 % ТФОК, при швидкості потоку 1,0 мл/хв., детектування при 210 нм (хіральна ВЕРХ-2).

Препаративну ВЕРХ на хіральній стаціонарній фазі виконували на колонці Daicel ChiralPak AD-H (20×250 мм, 5 мкм). Звичайними умовами хіральної ВЕРХ є ізократична суміш 50 % EtOH + 0,05 % ДЕА і 50 % гептану, при швидкості потоку 34 мл/хв, детектування при 210 нм.

Дифракція рентгенівських променів на порошку (XRPD)

Діаграми дифракції рентгенівських променів на порошку були отримані на рентгенівському дифрактометрі Bruker D8 Advance, обладнаному камерою задавання та керування температурною та відносною вологістю зразка Anton-Paar CHCplus+. Дифрактометр був обладнаний детектором Lynxeye, який працює з CuKα-випромінюванням з паралельною оптикою променю та роботою в режимі відбивання. Зазвичай, рентгенівську трубку запускали при 40кВ/40мА. Застосовували крок 0,02° (2θ) і крок часу 95 сек. на діапазон сканування 3-35° в 2θ. Порошок злегка пресували в стандартний фіксатор зразку Anton-Paar ТТК. Дані дифракції переглядали, застосовуючи Cu Kα1 (λ = 1,54060 Å). Точність значень 2θ, як забезпечено тут, знаходиться у діапазоні +/- 0,1-0,2°, що, як правило, має місце для стандартно отриманих зразків діаграм дифракції рентгенівських променів на порошку.

Аналіз гравіметричної сорбції пари (GVS)

Вимірювання виконували на приладі для множини проб SPS-100nSPS-100n (Projekt Messtechnik, Ulm, Germany), який застосовували у кроковому режимі при 25 °C. Зразок урівноважували при 40 % ВВ перед запуском попередньо заданої програми вологості (застосовували 40-0-95-0-95-40 % ВВ), з кроком 5 % ΔВВ і з максимальним часом урівноважування 24 години на крок. Застосовували від близько 20 до 30 мг кожного зразка. Гіроскопічну класифікацію виконували згідно European Pharmacopeia Technical Guide (1999,

сторінка 86), наприклад, незначно гігроскопічний: збільшення маси становить менше, ніж 2 % і рівне або більше, ніж 0,2 % мас/мас; гігроскопічний: збільшення маси менше, ніж 15 % і рівне або більше, ніж 2 % мас/мас. При першому адсорбційному скануванні оцінювали зміну маси між 20 % відносною вологістю та 80 % відносною вологістю.

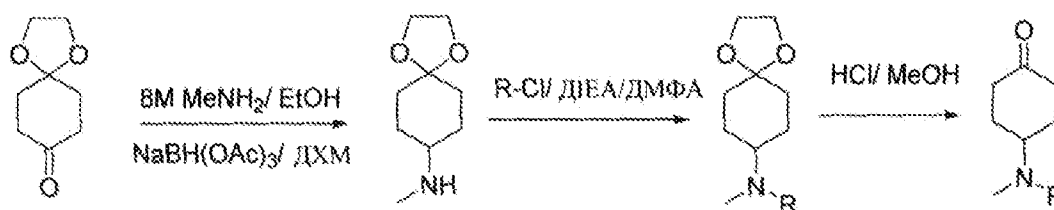
5 Диференціальна Скануюча Калориметрія (ДСК)

ДСК дані були зібрані на системі Mettler Toledo STARe System (модуль DSC822e, вимірювальна комірка з керамічним сенсором і програмним забезпеченням STAR версії 13.00) обладнаному 34 позиційним автосемплером. Прилад був відкалібрований щодо енергії та температури із застосуванням сертифікованого індію. Як правило, 2 мг кожного зразка, в автоматично проколотих 40 мкл алюмінієвих кюветах Mettler, нагрівали зі швидкістю 10 °C хв.⁻¹, якщо не зазначено інакше, від -20 °C до 320 °C. Підтримували продувку азотом над зразком зі швидкістю 20 мл хв.⁻¹.

I-хімія

15 Синтез (S)-2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5H-піридо[3,2-b]індол-5-іл)оцтової кислоти

1) Синтез 4-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)циклогексанону



(R являє собою 5-хлор-піримідин-2-іл)

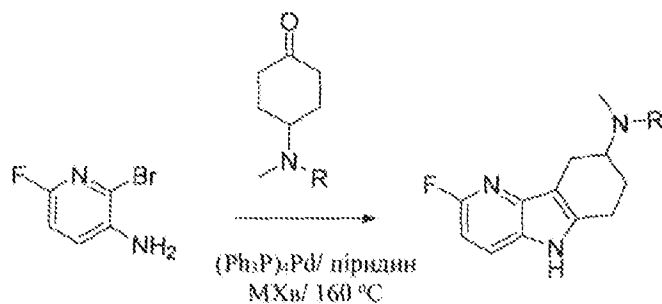
20 До розчину, комерційно доступного 1,4-діоксаспіро[4.5]декан-8-ону (1 екв.) в ДХМ (20 мл / 10 ммоль), послідовно додавали при 0 °C метиламін (8М в EtOH, 1 екв.) і NaBH(OAc)₃ (1,5 екв.). Реакційній суміші давали нагрітися до КТ і перемішували протягом 2 год. Реакційну суміш переливали в насичений розчин NaHCO₃, органічний шар промивали насиченим сольовим розчином, сушили над MgSO₄ і випаровували у вакуумі, щоб одержати N-метил-1,4-діоксаспіро[4.5]декан-8-амін, який застосовували для наступного етапу без подальшого очищення.

25 До розчину N-метил-1,4-діоксаспіро[4.5]декан-8-аміну (1 екв.) в ДМФА (10,5 мл / 6 ммоль) додавали DIEA (2 екв.) і 2,5-дихлорпіримідин (1,05 екв.). Реакційну суміш перемішували при 90 °C протягом ночі. Після охолодження до КТ, додавали ізопропілацетат. Суміш промивали водою та 10 % водним розчином лимонної кислоти. Органічний шар сушили (MgSO₄) і концентрували у вакуумі. Неочищений продукт очищали ФХ (від 0 до 15 % EtOAc у гептані), щоб одержати необхідну проміжну сполуку у вигляді твердої речовини.

30 Розчин цієї проміжної сполуки (1 екв.) у суміші 2Н HCl (2,7 мл/ 5 ммоль) і MeOH (2,7 мл/ 5 ммоль) перемішували при КТ протягом ночі. Водний шар екстрагували ДХМ. Органічний шар сушили (MgSO₄), концентрували у вакуумі. Неочищений продукт очищали ФХ (від 0 до 17 % EtOAc у гептані), щоб одержати зазначену сполуку у вигляді твердої речовини.

35 РХ-МС: t_г = 0,78 хв; [M+H]⁺ = 240,2

2.1) Синтез N-(5-хлорпіримідин-2-іл)-2-фтор-N-метил-6,7,8,9-тетрагідро-5H-піридо[3,2-b]індол-8-аміну (спосіб А)



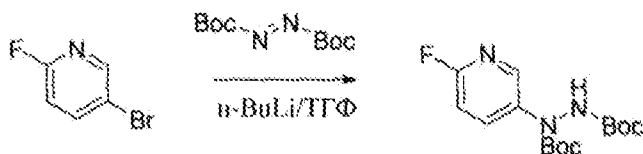
(R являє собою 5-хлор-піримідин-2-іл)

Розчин 3-аміно-2-бром-6-фтор-піридину (1 екв.), 4-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)циклогексанону (1,2 екв.), $(\text{Ph}_3\text{P})_4\text{Pd}$ (0,05 екв.) і піридину (8,17 екв.) змішали у віалі. Віалу піддавали дії МХв опромінення при 160 °С протягом 1 години. Знову додали $(\text{Ph}_3\text{P})_4\text{Pd}$ (0,025 екв.) і реакційну суміш знову піддавали дії МХв опромінення при 160 °С протягом 30 хв. Після охолодження до КТ, реакційну суміш змішували з водою та екстрагували двічі ДХМ. Об'єднані органічні екстракти сушили (MgSO_4) , фільтрували та концентрували у вакуумі. Залишок очищали за допомогою препаративної ВЕРХ (основні умови), щоб одержати цільовий продукт.

PX-МС: $t_{\text{г}} = 0,87$ хв; $[\text{M}+\text{H}]^+ = 332,09$.

2.2) Синтез N-(5-хлорпіримідин-2-іл)-2-фтор-N-метил-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-піrido[3,2-b]індол-8-аміну (спосіб В)

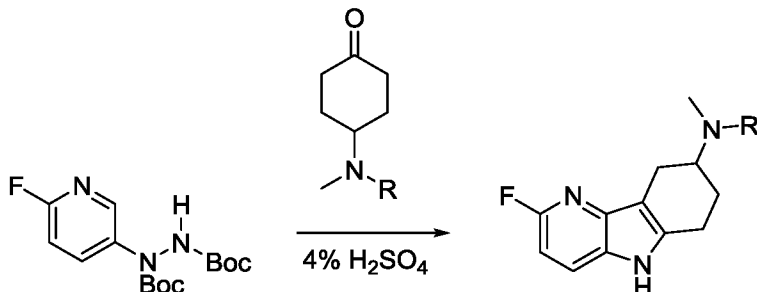
а) Синтез ди-трет-бутил 1-(6-фторпіридин-3-іл)гідразин-1,2-дикарбоксилату



Розчин н-бутиллітію (1,6М у гексані, 1,1 екв.) додавали по краплям при -40 °С до розчину 5-бром-2-фтор-піридину (1 екв.) у діетиловому ефірі (14,5 екв.) в атмосфері N_2 . Реакційну суміш перемішували протягом 20 хв. при -40 °С і потім по краплям додавали розчин трет-бутил-азодикарбоксилату (1,1 екв.) в ТГФ (18,5 екв.). Реакційну суміш перемішували при -40 °С протягом 30 хв. і залишали нагрітися до КТ протягом 30 хв. Додавали воду, а потім ДХМ. Відокремлювали органічну фазу та сушили над MgSO_4 , фільтрували та концентрували у вакуумі. Залишок очищали ФХ (EtOAc /н-гептан: 2/8), щоб одержати цільовий продукт.

PX-МС: $t_{\text{г}} = 0,88$ хв; $[\text{M}+\text{H}]^+ = 328,12$.

б) Синтез N-(5-хлорпіримідин-2-іл)-2-фтор-N-метил-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-піrido[3,2-b]індол-8-аміну

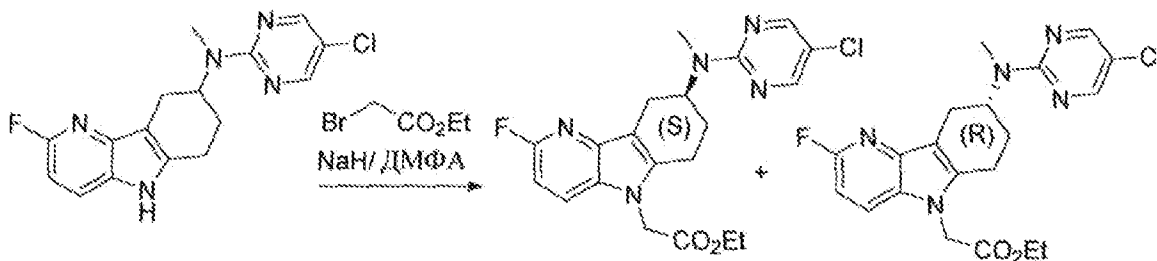


(R являє собою 5-хлор-піримідин-2-іл)

Розчин ди-трет-бутил 1-(6-фторпіридин-3-іл)гідразин-1,2-дикарбоксилат (1 екв.), 4-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)циклогексанон (1 екв.) в 4 % водному розчині H_2SO_4 (10 мл/0,04 моль) перемішували при 100 °С протягом 150 хв. Після охолодження до КТ, реакційну суміш змішували з насиченим NaHCO_3 і екстрагували EtOAc . Об'єднані органічні екстракти сушили (MgSO_4) , фільтрували та концентрували у вакуумі. Залишок очищали за допомогою препаративної ВЕРХ (основні умови), щоб одержати цільовий продукт.

PX-МС: $t_{\text{г}} = 0,87$ хв; $[M+H]^+ = 332,03$.

3) Синтез (S)-етил 2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-піридо[3,2-б]індол-5-іл)ацетату та (R)-етил 2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-піридо[3,2-б]індол-5-іл)ацетату



5

NaH (95 %, 56,1 мг, 2,22 ммоль, 1,2 екв.) обережно додавали до холодного розчину (0 °C) N-(5-хлорпіримідин-2-іл)-2-фтор-N-метил-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-піридо[3,2-б]індол-8-аміну (614 мг, 1,85 ммоль, 1 екв.) в ДМФА (6,36 мл). Реакційну суміш перемішували 20 хв. Повільно додавали етилбромацетат (0,23 мл, 2,04 ммоль, 1,1 екв.) і реакційну суміш поступово нагрівали до КТ і перемішували протягом 2 годин. Реакційну суміш розчиняли в EtOAc, і промивали насиченим NaHCO_3 . Органічний екстракт сушили над MgSO_4 , фільтрували та концентрували у вакуумі. Залишок очищали ФХ (н-гептан до н-гептан/EtOAc: 7/3) до одержання цільового продукту у вигляді рацемічної суміші.

10

PX-МС: $t_{\text{г}} = 0,96$ хв./ $[M+H]^+ = 418,01$

Два енантіомери отриманого продукту розділяли за допомогою препаративної ВЕРХ на хіральній стаціонарній фазі.

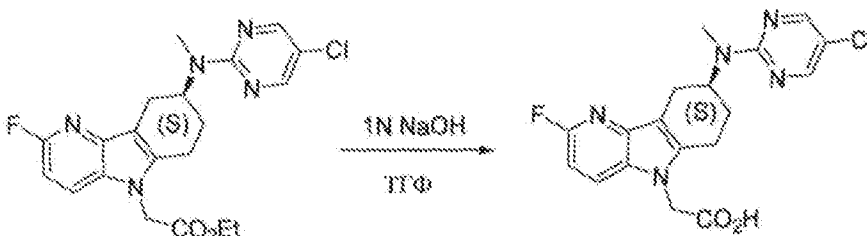
(S)-етил 2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-піридо[3,2-б]індол-5-іл)ацетат

(271 мг, 35 %): ВЕРХ (хіральна ВЕРХ-1): $t_{\text{г}} = 6,22$ хв.;

(R)-етил 2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-піридо[3,2-б]індол-5-іл)ацетат

(273 мг, 35 %): ВЕРХ (хіральна ВЕРХ-1): $t_{\text{г}} = 7,66$ хв.

4) Синтез (S)-2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-піридо[3,2-б]індол-5-іл)оцтової кислоти



До розчину (S)-етил 2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-піридо[3,2-б]індол-5-іл)ацетату (271 мг, 0,649 ммоль, 1 екв.) в ТГФ (10 мл) додавали NaOH (1N, 10 мл, 10 ммоль, 15,4 екв.) при КТ. Реакційну суміш перемішували при КТ протягом 1 години. Реакційну суміш концентрували у вакуумі до видалення тільки ТГФ. Її підкислювали HCl конц. до $\text{pH} \sim 5-6$ і перемішували при КТ. Суспензію екстрагували EtOAc (4х). Об'єднані органічні шари сушили над MgSO_4 , фільтрували та концентрували у вакуумі, щоб одержати зазначену в заголовку сполуку у вигляді бежевої твердої речовини (255 мг, 100 %).

PX-МС: $t_{\text{г}} = 0,82$ хв./ $[M+H]^+ = 390,12$

ВЕРХ (хіральна ВЕРХ-2): $t_{\text{г}} = 4,96$ хв.

II. Одержання кристалічної форми СПОЛУКИ

Приклад 1: Одержання та визначення характеристик СПОЛУКИ у кристалічній формі 1

0,1 г СПОЛУКИ розчиняли в 4 мл ТГФ, і 0,2 мл розчину поміщали в 4 мл віалу з коричневого скла. ТГФ випаровували з віали, застосовуючи установку Combidancer при 30 °C і 100 мБар протягом 30 хвилин (Hettich AG, Switzerland). Твердий залишок залишився в скляній віалі в аморфному стані. До твердого залишку додавали 0,02 мл ацетону, віалу герметично закривали та суміші забезпечували витримку протягом 3 днів при кімнатній температурі в закритій віалі. Твердий залишок являв собою СПОЛУКУ у кристалічній формі 1. Як альтернатива ацетону в способі може бути застосований етилацетат, ацетонітрil або ізопропанол.

40

Таблиця 1

Характеристичні дані для СПОЛУКИ в кристалічній формі 1

Процедура	Перелік даних	Примітки
XRPD	Кристалічна	Див. ФІГ. 1-4
¹ H-ЯМР	Щільний	
ДСК	виражений ендотермічний процес менше 100 °С, внаслідок випаровування розчинника. Далі ендотермічний процес у діапазоні від близько 260 °С до близько 276 °С і екзотермічний сигнал, що починається в діапазоні від близько 250 °С до близько 260 °С, що та розвивається за межами близько 280 °С. Це інтерпретується як супутній процес плавлення/розкладання. Точна позиція супутніх процесів протилежного знаку дуже залежить від кінетики відповідних процесів, і фахівець у даній галузі техніки дійде висновків, що визначення точної точки плавлення як пікової температури не рекомендується в таких випадках.	Див. ФІГ. 6
Гігроскопічність	Злегка гігроскопічний (зміна маси, більше, ніж 0,2 % і менше, ніж 2 %)	Див. ФІГ. 5

III. Аналіз біологічної активності

Підготовка мембран рецепторів hCRTH₂ і аналіз зсуву міченого ліганду:

- 5 У першу чергу виділяли рекомбінантні клітини HEK293-hCRTH₂ з чашок Петрі в 5 мл буферу А/чашку (Буфер А: 5 mM Tris, 1 mM MgCl₂-6H₂O pH=7,4) застосовуючи скляну паличку з гумовим наконечником. Потім клітини переносили в пробірки для центрифуги і центрифугувались протягом 5 хвилин при 400 g. Конгломерат клітин повторно суспендували в тому ж буфері і пробірки заморожували при -80 °С. Клітини розморожували і одержували фрагменти мембран
- 10 гомогенізацією, застосовуючи гомогенізатор політрон (30 секунд). Потім фрагменти мембран центрифугували при 3000 g протягом 20 хвилин і повторно суспендували в буфері С (Буфер С: 75 mM Tris, 25 mM MgCl₂, 250 mM сахарози pH 7,4). Аліквотні кількості фрагментів мембран зберігали при -20 °С.

- 15 Аналіз зв'язування виконували при об'ємі кінцевому аналізу в 250 мкл. Спочатку у кожен лунку поміщали 25 мкл досліджуваної сполуки, попередньо розчиненої в зв'язуючому буфері (зв'язуючий буфер: 50 mM Tris-Base, 100 mM NaCl, 1 mM ЕДТА, 0,1 % BSA (без протеази), 0,01 % NaN₃, 10mM MnCl₂ pH 7,0). Після додавання 75 мкл зв'язуючого буфера в кожен лунку додавали 50 мкл міченого ліганду ³H-PGD₂ (у кількості 2,5 nM (220,000 dpm/лунку) з ANAWA ART0662). Аналіз зв'язування починали додаванням 100 мкл фрагментів мембран CRTH₂ до досягнення
- 20 кінцевої концентрації 20 мкг/лунку. Для неспецифічного зв'язування, в реакційну суміш додавали PGD₂ до кінцевої концентрації 10 mM. Суміш зразка інкубували протягом 90 хвилин при кімнатній температурі, а потім фільтрували через 96-лунковий планшет з GF/C фільтром, який попередньо замочували протягом 3 годин в 0,5 % поліетиленіміні (PEI). Фільтрувальні лунки промивали три рази льодяним зв'язуючим буфером. Потім у кожен лунку додавали 40 мкл
- 25 Microscint-40 (Packard) і вимірювали кількість збереженої радіоактивності на Topcount (Packard).

Антагоністична активність СПОЛУКИ: IC₅₀=5,6 nM.

Аналіз зсуву міченого ліганду - Альбумін сироватки людини (HSA):

- 30 Аналіз зсуву міченого ліганду в присутності альбуміну сироватки людини (HSA) виконували, як описано вище з наступними модифікаціями. Зв'язуючий буфер-HSA: зв'язуючий буфер + 0,5 % Sigma альбуміну з сироватки людини A1887 (замість 0,1 % BSA). У кожен лунку поміщали 25 мкл об'єм досліджуваної сполуки, попередньо розчиненої в зв'язуючому буфері-HSA. Після додавання 75 мкл зв'язуючого буфера-HSA у кожен лунку додавали 50 мкл ³H-PGD₂ (у кількості 2,5 nM (220,000 dpm/лунку) з ANAWA ART0662). Наступний протокол був ідентичний описаному вище.

- 35 Антагоністична активність СПОЛУКИ: IC₅₀=5,0 nM.

Аналіз зміни форми еозинофілу з плазмою людини

Після одержання інформованої згоди, відбирали зразки крові пункцією з вени у відповідності з протоколом, схваленим етикою комітету Базеля, Швейцарія. Поліморфнонуклеарні лейкоцити

(що містять еозинофіли, базофіли і нейтрофіли) ізолювали, застосовуючи спосіб Polymorphprep™ (Axis-Shield). Стисло, антикоагульовану, цільну кров нашаровували на градієнт Polymorphprep (щільність 1,113 г/мл) і центрифугували при 500 g протягом 30 хвилин. Поліморфнонуклеарну фракцію клітин збирали та виснажували на еритроцити за допомогою лізису гіпотонічним сольовим розчином.

Поліморфнонуклеарні клітини повторно суспендували в буфері для аналізу (1 x PBS з $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ з додаванням 0,1 % BSA, 10 mM HEPES і 10 mM глюкози, pH 7,4) близько 5×10^6 клітин/мл і зафарблювали анти-CD49d-APC ((APC=Алофікоціанін) протягом 1 години при КТ. Досліджувані сполуки, в різних концентраціях, попередньо інкубували протягом 10 хвилин у людській плазмі (антикоагульованій інгібітором тромбіну). Потім плазму людини додавали до поліморфнонуклеарних клітин до 50 % кінцевого аналізованого обсягу з поліморфнонуклеарними клітинами на рівні 4×10^6 клітин/мл. Після інкубування протягом 10 хвилин при 37 °C, поліморфнонуклеарні клітини активували протягом 5 хвилин при 37 °C додаванням PGD₂ при кінцевій концентрації 100 nM. Активацію зупиняли додаванням 0,5 мл параформальдегіду (1 %).

Відразу після фіксації параформальдегідом, зразки аналізували за допомогою проточного цитометру FACSCanto (BD Biosciences) і визначали цільові клітини за їхніми характеристикам прямого розсіювання (FSC) і бічного розсіювання (SSC). Еозинофіли визначали за сигналом анти-CD49d-APC та їх характерному профілю бічного розсіювання (SSC). Зміни форми відгуку, що вказують активацію еозинофілу, визначали кількісно як відсоток клітин з підвищеним прямим розсіюванням.

Антагоністична активність СПОЛУКИ: $\text{IC}_{50}=3,1$ nM.

In vitro цитотоксичність у первинно вирощених гепатоцитах пацюка

1. Способи

1.1 Виділення та вирощування гепатоцитів пацюка.

Дорослих пацюків Wistar чоловічої статі присипляли пентобарбіталом натрію і виділяли гепатоцити відповідно до стандартної процедури, тобто in situ перфузією печінки розчином колагенази. Життєздатність очищених гепатоцитів, перевірена способом витиснення трипанового синього, була більше, ніж 85 %. Ізольовані гепатоцити повторно суспендували в стандарті Williams Medium E, без фенолового червоного, збагаченому (WME supp.) трансферином (100 мкг/мл), трийодтироном (10 мкг/мл), гентаміцином (50 мкг/мл), гідрокортизонгемісукцинатом (13,36 мкг/мл), глюкагоном (5 мкг/мл), HEPES (10 mM), інозином (10 мкг/мл), інсуліном (10 мкг/мл), стрептоміцином (100 мкг/мл) і пеніциліном (100 од/мл) і 10 % ембріональною бичачою сироваткою (FBS). Клітини наносили на покритий колагеном 24-лунковий планшет при початковій щільності 2×10^5 клітин/лунку. Після 4 год., для фіксації на чашках Петрі, середовище видаляли та заміняли новим WME supp. без FBS, що містило досліджувані сполуки, і витримували протягом 24 год. при 37 °C в атмосфері 95 % O₂ і 5 % CO₂. Для кожного експерименту, тобто, з кожного партією гепатоцитів, проводили чотириразову обробку досліджуваними сполуками. У кожній чашці Петрі також проводили чотириразовий контроль (обробка тільки середовищем носія).

1.2 In vitro експозиція досліджуваними сполуками

Вихідні розчини досліджуваних сполук одержували в ДМСО за кілька годин до початку обробки. Відповідні розведення цих вихідних розчинів додавали до живильного середовища безпосередньо перед обробкою в порядку забезпечення кінцевих концентрацій 0, 3, 10, 30, 100 і 300 мкМ. Кінцева концентрація носія ДМСО становила 1 % (об./об.).

1.3 Життєздатність культур клітин

1.3.1 Контроль морфології моношару

Морфологія моношарів гепатоциту була проконтрольована світловою мікроскопією після 24 годинної експозиції досліджуваними сполуками. Пов'язані з проведеною обробкою ефекти описані відповідно наведеної нижче класифікації:

0 Спостерігають відсутність морфологічних після обробки при порівнянні з контрольними культурами

1-3 Обробка приводить до будь-яких морфологічних змін, наприклад, внутрішньоклітинного гранулювання, вакуолізації або загибелі клітин. Залежно від серйозності, ці зміни класифікують як незначні (1), помірні (2) або значні (3).

К Обробка закінчується 100 % загибеллю клітин та/або повним відділенням моношару, що приводить до чистої безклітинної чашки.

1.3.2 Втрата лактатдегідрогенази

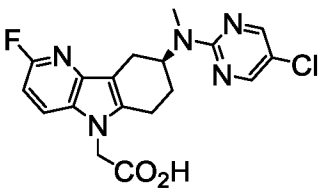
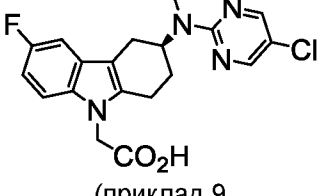
Після 24 год. обробки культур гепатоцитів, ретельно збирали аліквотні кількості культивованого середовища та застосовували для аналізу активності лактатдегідрогенази

(LDH) за допомогою спектрофотометрії, застосовуючи набір виявлення цитотоксичності LDH від Clontech (каталожний № 630117, Mountain View, CA, USA). Для кожного експерименту застосовували додаткові посіви для визначення повної внутрішньоклітинної активності LDH на початку обробки. Для цього 4 лунки клітинної культури за експеримент перед початком обробки вимивали холодним насиченим розчином солі, обробляли ультразвуком у свіжому середовищі та гомогенізуват аналізували на загальну активність LDH. Активність ферментів у живильному середовищі оцінювали та виражали у вигляді процентної частки від загальної активності, що була у культивованих гепатоцитах на початку обробки.

2. Аналіз даних

Найнижча цитотоксична концентрація (LCC) і неефективна концентрація (NoEC) представлені для кожної сполуки, на основі морфології клітини та втрати LDH після 24 год. обробки. LCC визначають як найнижчу концентрацію досліджуваної сполуки, що приводить до чистого ефекту на культивованих гепатоцитах пацюка (морфологічна оцінка ≥ 2 або ≥ 2 -кратного збільшення втрати LDH). Значення LCC >300 мкМ вказує на відсутність ефекту на обох кінцевих точках при найвищій концентрації 300 мкМ досліджуваної сполуки. NoEC визначають, як найвищу концентрацію досліджуваної сполуки, яка не мала ефекту на культивованих гепатоцитах пацюка (морфологія та втрата LDH).

3. Результати: значення LCC і NoEC.

СПОЛУКА	LCC [мкМ]	NoEC [мкМ]	СПОЛУКА	LCC [мкМ]	NoEC [мкМ]
 СПОЛУКА	>300	>300	 (приклад 9 з WO 2011/117798)	300	30

In-vivo гепатотоксичність:

Гепатотоксичність сполуки формули (I) може бути проаналізована пероральною обробкою пацюків і видів, що не мають відношення до класу гризунів, аж до 4 тижнів, застосуванням трьох різних доз сполуки. Відновлення можливої токсичності може бути досліджене за наступної обробки у вільний період (період відновлення). Рівні доз вибрані на основі діапазону доз, виявленого дослідженням відповідних зразків. Висока доза потенційно визначає токсичність для органів близько до максимально стерпної дози. Середню та низьку дозу вибирають на основі передбачуваних терапевтичних впливів на організм людини. Вплив сполуки оцінюють при кожному рівні дози.

У кінці обробки та кінці відновлення оцінюють біомаркери печінки (такі як, наприклад, ферменти печінки, білок, тригліцериди або холестерин) за кров'ю. На додаток, зрізи печінки, забарвлені Гематоксилином-Еозином досліджують за допомогою мікроскопу, щоб безпосередньо оцінити можливу шкоду для органів. Спеціалізоване забарвлення зрізів печінки може бути необхідно, щоб додатково охарактеризувати можливі результати досліджень у відношенні печінки.

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

1. Кристалічна форма (S)-2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5H-піrido[3,2-b]індол-5-іл)оцтової кислоти, що характеризується присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : $12,6^\circ$, $14,0^\circ$ і $21,1^\circ$, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при відносній вологості $(5\pm 3)\%$, при $(20\pm 3)\%$, при $(50\pm 3)\%$ або при $(95\pm 3)\%$ та при температурі $25\pm 5^\circ\text{C}$ з використанням комбінованого $\text{CuK}\alpha 1$ і $\text{K}\alpha 2$ опромінення, без видалення $\text{K}\alpha 2$.

2. Кристалічна форма (S)-2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5H-піrido[3,2-b]індол-5-іл)оцтової кислоти за п. 1, що характеризується:

а) присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : $12,6^\circ$, $14,0^\circ$, $19,8^\circ$, $20,0^\circ$, $21,1^\circ$ і $26,4^\circ$, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при відносній вологості $(5\pm 3)\%$ та при температурі $25\pm 5^\circ\text{C}$ або

- б) присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : $12,6^\circ$, $14,0^\circ$, $19,7^\circ$, $21,1^\circ$ і $26,4^\circ$, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при відносній вологості $(20\pm 3)\%$ та при температурі $25\pm 5^\circ\text{C}$; або
- в) присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : $12,6^\circ$, $14,0^\circ$, $19,5^\circ$, $21,1^\circ$, $21,4^\circ$ і $26,1^\circ$, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при відносній вологості $(50\pm 3)\%$ та при температурі $25\pm 5^\circ\text{C}$; або
- г) присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : $12,6^\circ$, $14,0^\circ$, $19,5^\circ$, $21,1^\circ$, $21,5^\circ$ і $26,0^\circ$, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при відносній вологості $(95\pm 3)\%$ та при температурі $25\pm 5^\circ\text{C}$.
3. Кристалічна форма (S)-2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-піридо[3,2-б]індол-5-іл)оцтової кислоти за п. 1, що характеризується:
- а) присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : $12,6^\circ$, $14,0^\circ$, $15,6^\circ$, $19,8^\circ$, $20,0^\circ$, $21,1^\circ$, $23,7^\circ$, $26,4^\circ$, $27,5^\circ$ і $28,4^\circ$, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при відносній вологості $(5\pm 3)\%$ та при температурі $25\pm 5^\circ\text{C}$ або
- б) присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : $12,6^\circ$, $14,0^\circ$, $15,6^\circ$, $19,7^\circ$, $21,1^\circ$, $23,3^\circ$, $23,6^\circ$, $26,4^\circ$, $27,4^\circ$ і $28,4^\circ$, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при відносній вологості $(20\pm 3)\%$ та при температурі $25\pm 5^\circ\text{C}$; або
- в) присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : $12,6^\circ$, $14,0^\circ$, $15,2^\circ$, $16,1^\circ$, $19,5^\circ$, $21,1^\circ$, $21,4^\circ$, $23,0^\circ$, $26,1^\circ$ і $27,0^\circ$, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при відносній вологості $(50\pm 3)\%$ та при температурі $25\pm 5^\circ\text{C}$; або
- г) присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : $12,6^\circ$, $14,0^\circ$, $16,2^\circ$, $18,9^\circ$, $19,5^\circ$, $21,1^\circ$, $21,5^\circ$, $22,9^\circ$, $26,0^\circ$ і $27,0^\circ$, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при відносній вологості $(95\pm 3)\%$ та при температурі $25\pm 5^\circ\text{C}$.
4. Кристалічна форма (S)-2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-піридо[3,2-б]індол-5-іл)оцтової кислоти за п. 1, що характеризується присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : $12,6^\circ$, $14,0^\circ$ та $21,1^\circ$, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при відносній вологості $(20\pm 3)\%$ та при температурі $25\pm 5^\circ\text{C}$.
5. Кристалічна форма (S)-2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-піридо[3,2-б]індол-5-іл)оцтової кислоти за п. 1, що характеризується присутністю піків на діаграмі дифракції рентгенівських променів на порошку при наступних кутах заломлення 2θ : $12,6^\circ$, $14,0^\circ$ та $21,1^\circ$, де діаграма дифракції рентгенівських променів на порошку виміряна при відносній вологості $(50\pm 3)\%$ та при температурі $25\pm 5^\circ\text{C}$.
6. Кристалічна форма (S)-2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-піридо[3,2-б]індол-5-іл)оцтової кислоти за будь-яким з пп. 1-5, яка демонструє ендотермічний процес у діапазоні від 260 ± 5 до $276\pm 5^\circ\text{C}$, як визначено диференціальною скануючою калориметрією.
7. Кристалічна форма (S)-2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-піридо[3,2-б]індол-5-іл)оцтової кислоти за будь-яким з пп. 1-6 для застосування як лікарського засобу.
8. Фармацевтична композиція, що включає як активний компонент кристалічну форму (S)-2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-піридо[3,2-б]індол-5-іл)оцтової кислоти за будь-яким з пп. 1-6 і щонайменше один фармацевтично прийнятний носій.
9. Кристалічна форма (S)-2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-піридо[3,2-б]індол-5-іл)оцтової кислоти за будь-яким з пп. 1-6 для застосування в одержанні фармацевтичної композиції, де зазначена фармацевтична композиція включає як активний компонент (S)-2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-піридо[3,2-б]індол-5-іл)оцтову кислоту і щонайменше один фармацевтично прийнятний носій.
10. Кристалічна форма (S)-2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-піридо[3,2-б]індол-5-іл)оцтової кислоти за будь-яким з пп. 1-6 для застосування у запобіганні або лікуванні хвороб, вибраних з групи, що включає хронічні та гострі алергічні/імунні хвороби/порушення, що включають астму, алергічну астму, еозинофілну астму, важку астму, риніти, алергічні риніти, набряк Квінке, алергію на отруту комах, лікарські алергії, алергічний синусит, алергічний нефрит, алергічний кон'юнктивіт, atopічний дерматит, бронхіальну астму,

харчову алергію, системні порушення мастоциту, анафілактичний шок, кропивницю, екзему, виразковий коліт, хронічну обструктивну хворобу легені (COPD), запальне захворювання кишечника, ревматоїдний артрит і назальний поліпоз; хвороб, пов'язаних з еозинофілами, що включають васкуліти малих судин, такі як синдром Чарга-Стросса, грануломатоз Вегенера, мікроскопічний поліваскуліт (і органоспецифічні підмножини останнього), гіпереозинофільні синдроми, такі як еозинофільна пневмонія, еозинофільний езофагіт, рефлюксний езофагіт, еозинофільний ендокардит (ендокардит Леффлера), еозинофільно-міалгічний синдром, еозинофільний фасціт, еозинофільний пустульозний фолікуліт (хвороба Офуджі), еозинофільні виразки, ангіолімфоїдна гіперплазія з еозинофілією (ALHE), еозинофільний целюліт (синдром Уеллса), хронічна еозинофільна лейкемія, DRESS-синдром (лікарська шкірна реакція, що супроводжується еозинофілією і системними проявами) і хвороба Стілла (системний напад ювенільного ідіопатичного артрити); хвороб, пов'язаних з базофілами, включаючи базофільну лейкемію та базофільний лейкоцитоз і кістозний фіброз.

11. Кристалічна форма (S)-2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-піридо[3,2-*b*]індол-5-іл)оцтової кислоти за будь-яким з пп. 1-6 для застосування в одержанні фармацевтичної композиції для запобігання або лікування хвороб, вибраних з групи, що включає хронічні та гострі алергічні/імунні хвороби/порушення, що включають астму, алергічну астму, еозинофільну астму, важку астму, риніти, алергічні риніти, набряк Квінке, алергію на отруту комах, лікарські алергії, алергічний синусит, алергічний нефрит, алергічний кон'юнктивіт, atopічний дерматит, бронхіальну астму, харчову алергію, системні порушення мастоциту, анафілактичний шок, кропивницю, екзему, виразковий коліт, хронічну обструктивну хворобу легені (COPD), запальне захворювання кишечника, ревматоїдний артрит і назальний поліпоз; хвороб, пов'язаних з еозинофілами, що включають васкуліти малих судин, такі як синдром Чарга-Стросса, грануломатоз Вегенера, мікроскопічний поліваскуліт (і органоспецифічні підмножини останнього), гіпереозинофільні синдроми, такі як еозинофільна пневмонія, еозинофільний езофагіт, рефлюксний езофагіт, еозинофільний ендокардит (ендокардит Леффлера), еозинофільно-міалгічний синдром, еозинофільний фасціт, еозинофільний пустульозний фолікуліт (хвороба Офуджі), еозинофільні виразки, ангіолімфоїдна гіперплазія з еозинофілією (ALHE), еозинофільний целюліт (синдром Уеллса), хронічна еозинофільна лейкемія, DRESS-синдром (лікарська шкірна реакція, що супроводжується еозинофілією і системними проявами), і хвороба Стілла (системний напад ювенільного ідіопатичного артрити); хвороб, пов'язаних з базофілами, включаючи базофільну лейкемію та базофільний лейкоцитоз і кістозний фіброз.

12. Кристалічна форма (S)-2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-піридо[3,2-*b*]індол-5-іл)оцтової кислоти за будь-яким з пп. 1-6 для застосування в одержанні фармацевтичної композиції для запобігання або лікування хвороб, вибраних з групи, що включає астму, еозинофільну астму, алергічний риніт, atopічний дерматит, назальний поліпоз, харчову алергію, кропивницю, еозинофільний езофагіт, синдром Чарга-Стросса, гіпереозинофільний синдром, еозинофільну пневмонію, DRESS-синдром, хворобу Стілла, хронічну обструктивну хворобу легені (COPD) та кістозний фіброз.

13. Кристалічна форма (S)-2-(8-((5-хлорпіримідин-2-іл)(метил)аміно)-2-фтор-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-піридо[3,2-*b*]індол-5-іл)оцтової кислоти за будь-яким з пп. 1-6 для застосування в одержанні фармацевтичної композиції для запобігання або лікування назального поліпозу.

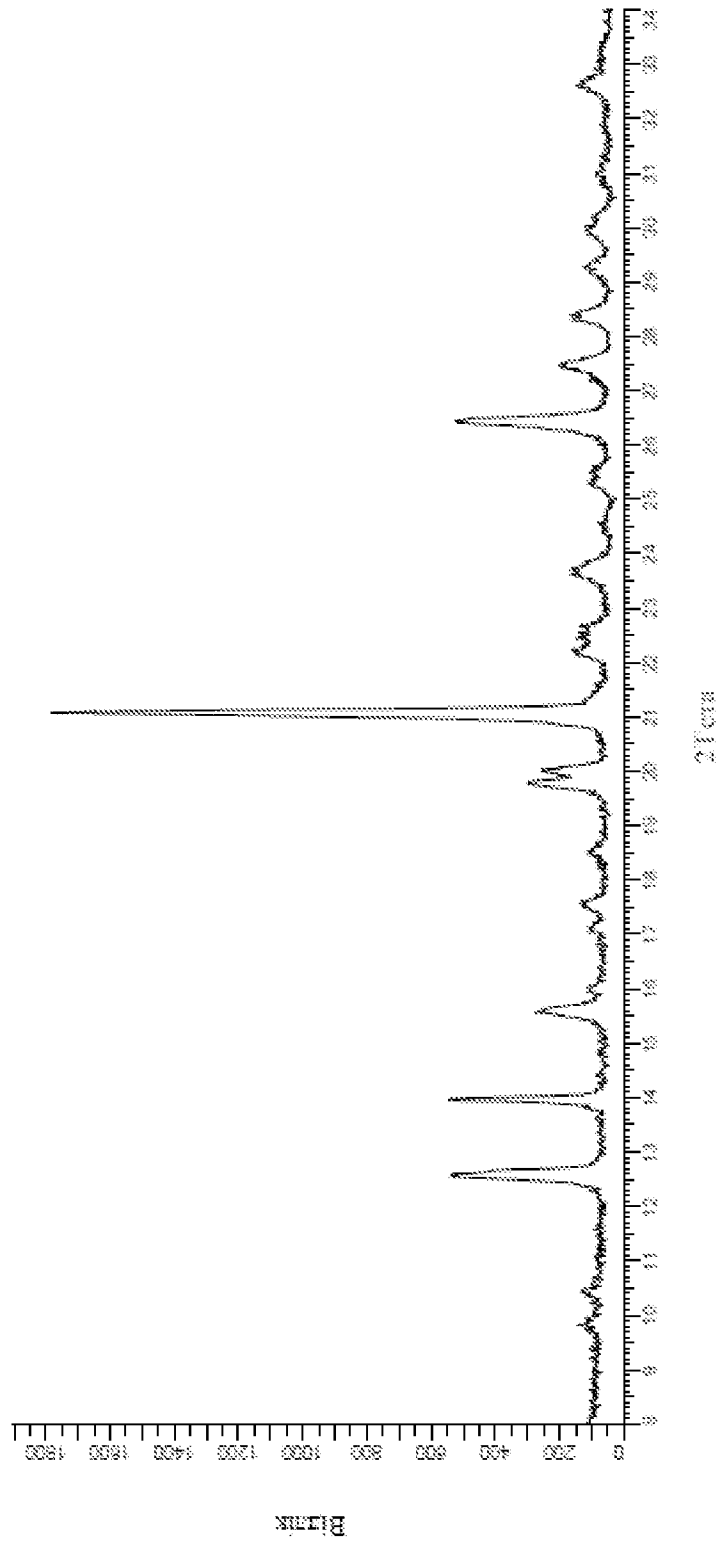


Fig. 1

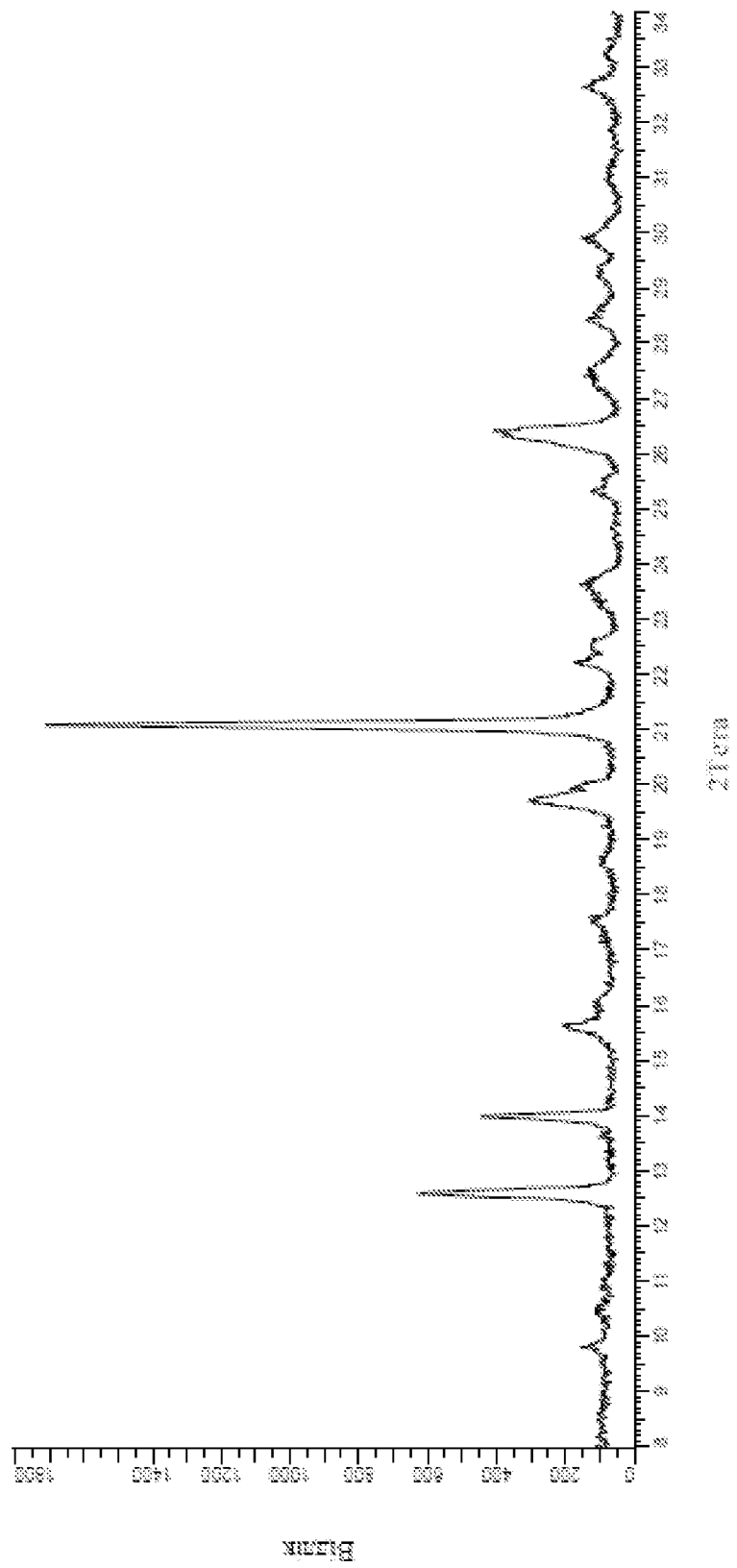


Fig. 2

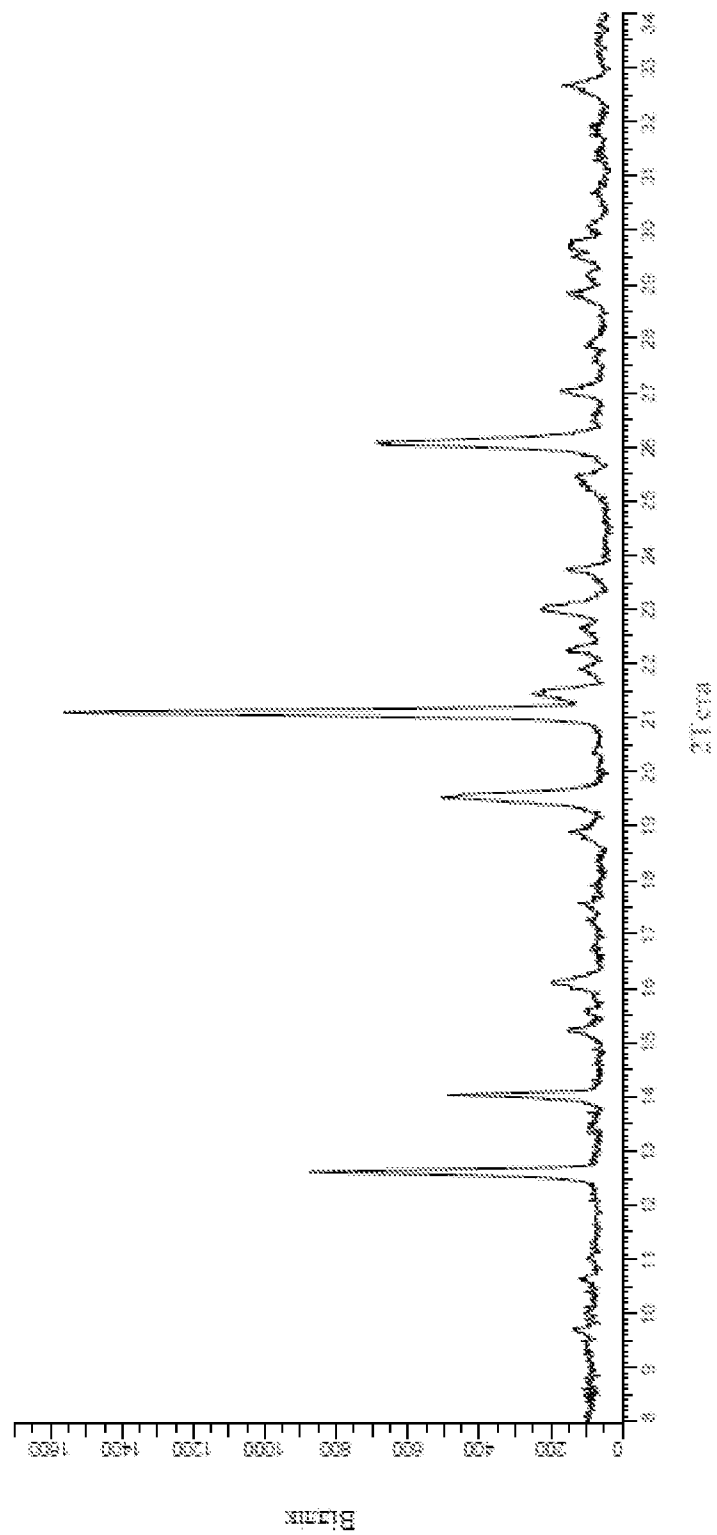


Fig. 3

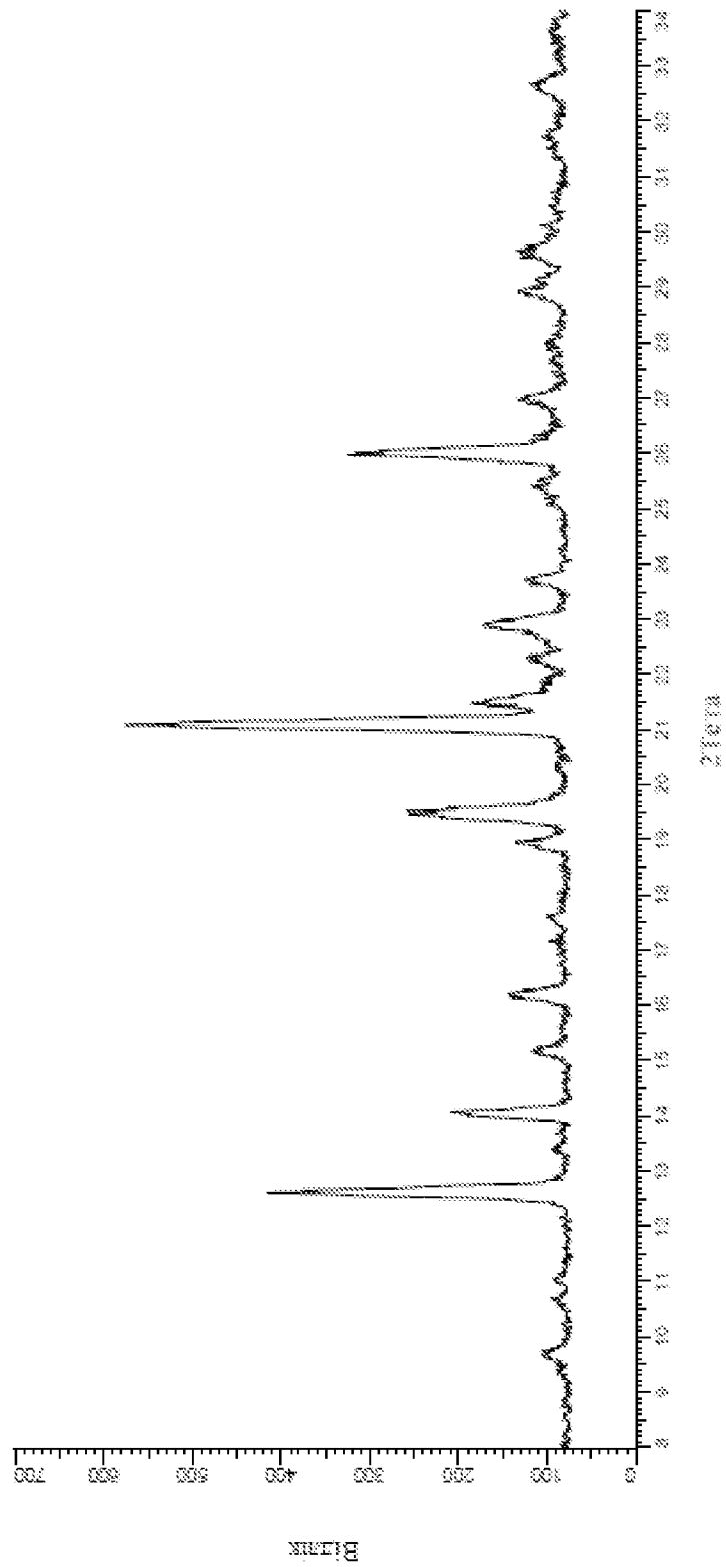


Fig. 4

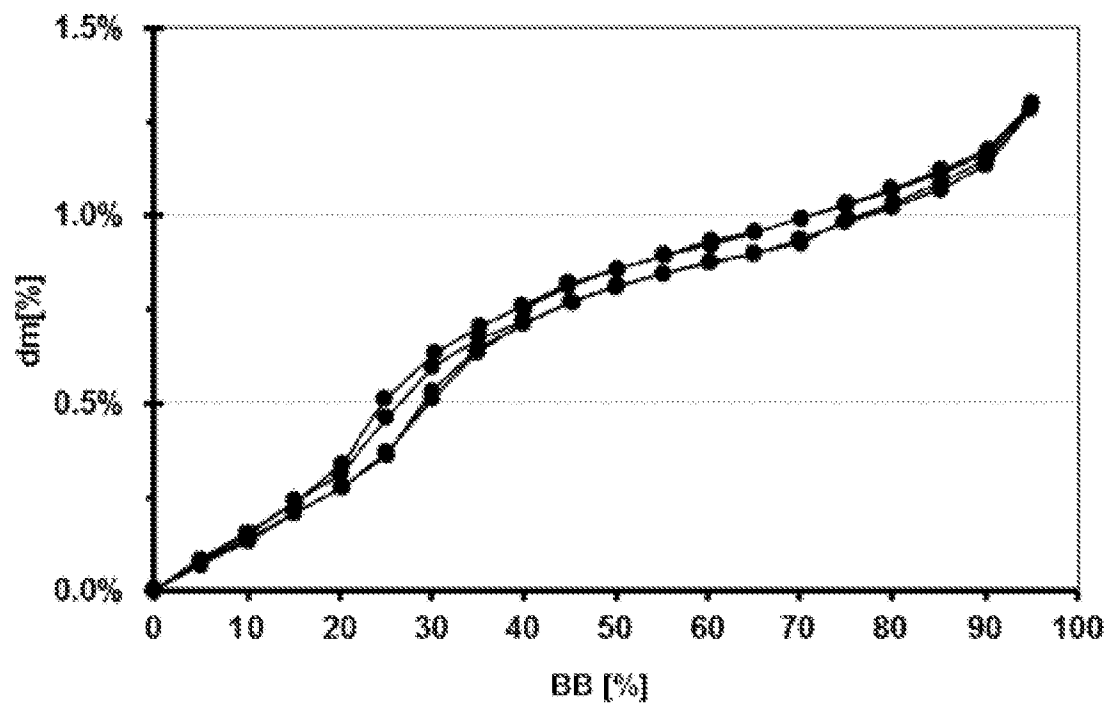
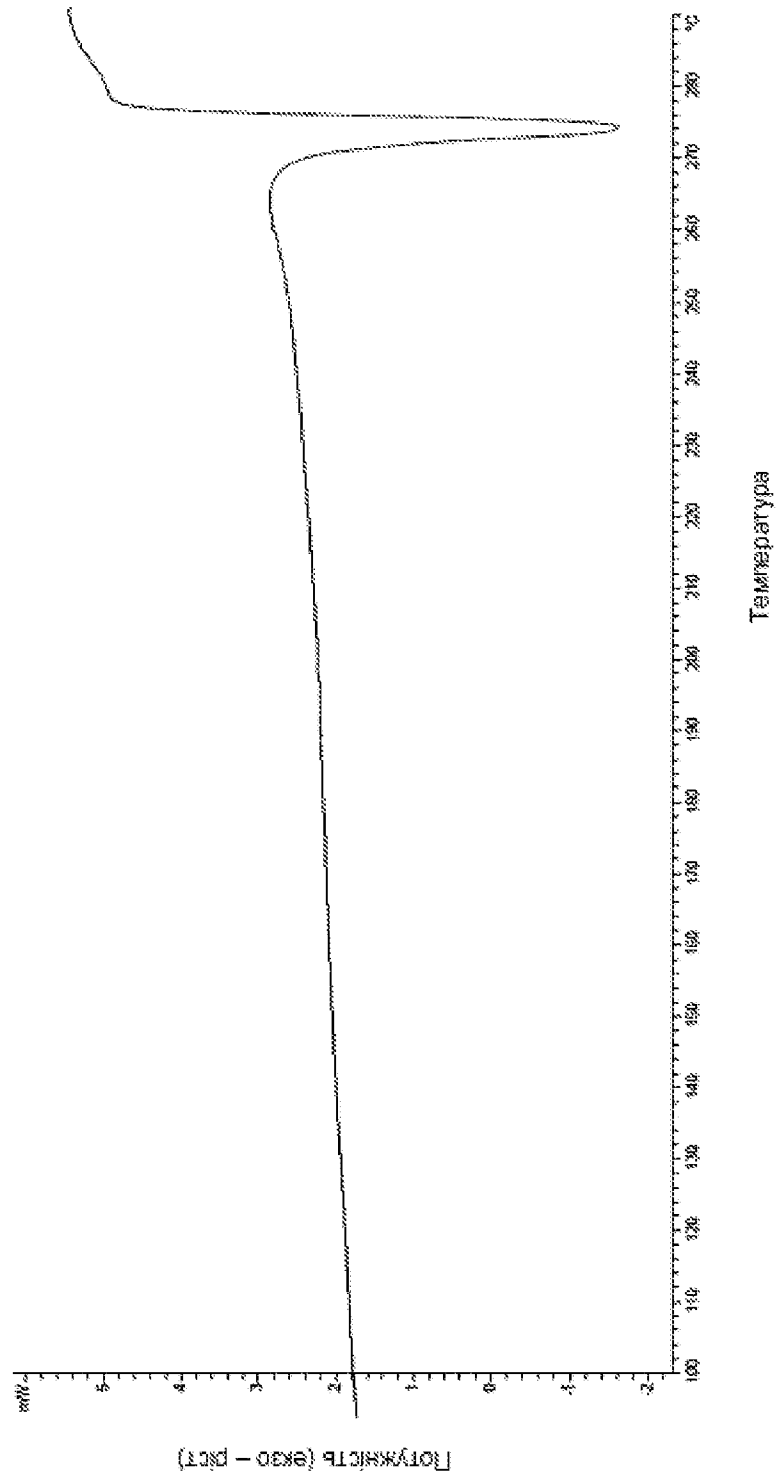


Fig. 5



Фіг. 6

