

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 867 757**

51 Int. Cl.:

**C07D 471/04** (2006.01)

**A61K 31/506** (2006.01)

**A61P 37/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2016 PCT/EP2016/071637**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.03.2017 WO17046125**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2016 E 16769914 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2021 EP 3350179**

54 Título: **Formas cristalinas**

30 Prioridad:

**15.09.2015 WO PCT/EP2015/071060**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.10.2021**

73 Titular/es:

**IDORSIA PHARMACEUTICALS LTD (100.0%)  
Hegenheimmattweg 91  
4123 Allschwil, CH**

72 Inventor/es:

**AISSAOUI, HAMED;  
BOSS, CHRISTOPH;  
BOUIS, PATRICK;  
HAZEMANN, JULIEN;  
SIEGRIST, ROMAIN y  
VON RAUMER, MARKUS**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

### Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 867 757 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

## Formas cristalinas

La invención se refiere a una novedosa forma cristalina de ácido (S)-2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético, (también de en este documento en adelante denominado "COMPUESTO"), a los procedimientos para la preparación del mismo, las composiciones farmacéuticas que comprenden dichas formas cristalinas, las composiciones farmacéuticas preparadas a partir de tales formas cristalinas, y su uso como moduladores del receptor de D<sub>2</sub> prostaglandina ("receptor DP"), más particularmente como moduladores del receptor CRTH<sub>2</sub> ("receptor DP2"), en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos mediados por prostaglandinas. En particular, el COMPUESTO en forma cristalina se puede usar solo o en composiciones farmacéuticas para el tratamiento de ambos trastornos/enfermedades alérgicas/inmunes, crónicas y agudas tales como asma, asma alérgica, asma eosinofílica, asma severa, rinitis, rinitis alérgica, angioedema, alergia por veneno de insectos, alergia a medicamentos, sinusitis alérgica, nefritis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, asma bronquial, alergia alimentaria, trastornos de mastocitos sistémicos, choque anafiláctico, urticaria, eczema, colitis ulcerativa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, y poliposis nasal; enfermedades relacionadas con eosinófilos que comprenden vasculitis de vasos pequeños como síndrome de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener, poliangeítis microscópica (y los subconjuntos de órganos específicos de la última), síndromes hipereosinofílicos como neumonía eosinofílica, esofagitis eosinofílica, esofagitis por reflujo, endocarditis eosinofílica (endocarditis de Loeffler), síndrome de eosinofilia-mialgia, fascitis eosinofílica, foliculitis pustular eosinofílica (enfermedad de Ofuji), úlceras eosinofílicas, hiperplasia angioliñoide con eosinofilia (ALHE), celulitis eosinofílica (síndrome de Wells), leucemia eosinofílica crónica, síndrome de DRESS (Sarpullido por fármaco con eosinofilia y síntomas sistémicos), y enfermedad de Still (establecimiento sistémico de la artritis idiopática juvenil); enfermedades relacionadas con basófilos, que comprenden leucemia basofílica y leucocitosis basofílica, y fibrosis quística.

## Antecedentes de la invención

Como una respuesta a la exposición de alérgenos en condiciones alérgicas, se activan los mastocitos y liberan mediadores como histamina, tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), cisteinil leucotrienos (CysLTs) y prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>). Estos mediadores interactúan con sus respectivos receptores y provocan efectos fisiológicos tales como permeabilidad vascular aumentada, edema, prurito, congestión nasal y pulmonar, bronco constricción y secreción de mucus. Por ejemplo, una permeabilidad vascular aumentada, permite una infiltración excesiva de leucocitos eosinofílicos y basofílicos hacia el tejido y, por lo tanto, amplifica la respuesta alérgica.

Los tratamientos actuales de enfermedades alérgicas comprenden agentes que pueden bloquear o de otra manera interrumpir tales interacciones, *por ejemplo*, antihistamínicos (antagonistas del receptor H<sub>1</sub> de histamina), antagonistas del receptor de leucotrienos, agonistas del receptor beta-adrenérgico y corticosteroides. Generalmente, los tratamientos con anti-histaminas y con antagonistas de leucotrienos son limitados en su eficacia y el uso a largo plazo de los corticosteroides a menudo está asociado con efectos secundarios indeseados.

PGD<sub>2</sub> es un agonista conocido que actúa sobre dos receptores acoplados a proteína G, el receptor DP<sub>1</sub> para PGD<sub>2</sub> y el receptor CRTH<sub>2</sub> recientemente identificado (molécula homóloga quimioatrayente del receptor expresada sobre células Th<sub>2</sub>) (también denominado en este documento como el "receptor DP2").

Los niveles de PGD<sub>2</sub> elevados se consideran que provocan inflamación como se observa en enfermedades alérgicas tales como rinitis alérgica, asma alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica y similares. Por lo cual, el bloqueo de la interacción de PGD<sub>2</sub> con sus receptores se considera como una estrategia terapéutica útil para el tratamiento de tales enfermedades.

El documento GB 2388540 describe el uso de ramatroban (ácido ((3R)-3-(4-fluorobenceno-sulfonamido)-1,2,3,4-tetrahidrocarbazol-9-propiónico)), un antagonista del receptor TxA<sub>2</sub> (también denominado "receptor TP") con una actividad antagonista adicional sobre CRTH<sub>2</sub>, para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades alérgicas, tales como asma, rinitis alérgica o conjuntivitis alérgica. En la publicación de T. Ishizuka et al., *Cardiovascular Drug Rev.* **2004**, 22(2), 71-90 se describen los efectos de ramatroban sobre la inflamación de fase tardía. Además, se ha reportado la biodisponibilidad oral de ramatroban y su capacidad para inhibir la migración de eosinófilos inducida por prostaglandina D<sub>2</sub> *in vitro* (*Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **305**(1), p.347-352 (2003)).

Los derivados del ácido azaindol acético con actividad antagonista CRTH<sub>2</sub> han sido descritos en las publicaciones WO 2010/054113, WO 2010/054114 y la publicación de B.A. Stearns et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, 19, 4647-4651.

Las publicaciones WO 2011/117798 y WO 2012/140612 describen los derivados del ácido (3-heteroarilamino-1,2,3,4-tetrahidro-9H-carbazol-9-il)-acético y el ácido (7-heteroarilamino-6,7,8,9-tetrahidropirido[1,2-a]indol-10-il)acético, respectivamente, cuyos derivados poseen una actividad antagonista de CRTH<sub>2</sub>.

Sorprendentemente, se ha encontrado que el COMPUESTO posee propiedades significativamente mejoradas en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* en hepatocitos de rata primarios cultivados. Por lo cual, se espera que el COMPUESTO

posea un perfil de toxicidad *in-vivo* mejorado.

El documento WO 2015/140684 divulga el ácido (S)-2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b] indol-5-il)acético como un sólido de color beige. Este sólido tenía una forma polimórfica diferente a la forma cristalina 1.

- 5 Actualmente se ha encontrado que se pueden encontrar ciertas formas cristalinas del COMPUESTO bajo ciertas condiciones. Estas formas cristalinas del COMPUESTO son nuevas y pueden tener propiedades ventajosas en vista del uso potencial del COMPUESTO como un ingrediente farmacéutico activo. Tales ventajas pueden incluir mejores propiedades de flujo; menos higroscopicidad; mejor reproducibilidad para la fabricación (por ejemplo, mejores parámetros de filtración, mejor reproducibilidad de la formación y/o mejor sedimentación); y/o morfología definida.
- 10 Tales formas cristalinas del COMPUESTO pueden ser particularmente adecuadas en un procedimiento de fabricación de ciertas composiciones farmacéuticas.

### Descripción de las figuras

- 15 La figura 1 muestra el diagrama de difracción de rayos X en polvo del COMPUESTO en la forma cristalina 1 medido a 5 % de HR y 25 °C, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se muestra contra radiación Cu K $\alpha$ . El diagrama de difracción de rayos X muestra picos que tienen una intensidad relativa, comparada con el pico más intenso en el diagrama, de los siguientes porcentajes (respecto de las intensidades de pico entregadas en paréntesis) a los ángulos indicados de refracción 2theta (se reportaron picos seleccionados del intervalo 8-30° 2theta con intensidad relativa mayor a 10 %): 12,6° (27 %), 14,0 (28 %), 15,6° (11 %), 19,8° (14 %), 20,0° (11 %), 21,1° (100 %) y 26,4° (27 %).

- 20 La figura 2 muestra el diagrama de difracción de rayos X en polvo del COMPUESTO en la forma cristalina 1 medida a 20 % de HR y 25 °C, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se muestra contra radiación Cu K $\alpha$ . El diagrama de difracción de rayos X muestra picos que poseen una intensidad relativa, comparada con el pico más intenso en el diagrama, de los siguientes porcentajes (intensidades de pico relativas entregadas en paréntesis) a los ángulos de refracción indicados 2theta (se reportaron picos seleccionados del intervalo de 8-30° 2theta con intensidad relativa mayor a 10 %): 12,6° (34 %), 14,0 (23 %), 19,7° (14 %), 21,1° (100 %) y 26,4° (19 %).

- 30 La figura 3 muestra el diagrama de difracción de rayos X en polvo del COMPUESTO en la forma cristalina 1 medido a 50 % de HR y 25 °C, cuando el diagrama de difracción de rayos X en polvo se muestra contra radiación Cu K $\alpha$ . El diagrama de difracción de rayos X muestra los picos que tienen intensidad relativa, comparada con el pico más intenso en el diagrama, de los siguientes porcentajes (intensidades de pico relativas entregadas en paréntesis) a los ángulos de refracción indicados 2theta (se reportaron picos seleccionados del intervalo de 8-30° 2theta con intensidad relativa mayor a 10 %): 12,6° (54 %), 14,0 (27 %), 19,5° (30 %), 21,1° (100 %), 21,4° (12 %), 23,0° (11 %) y 26,1° (43 %).

- 35 La figura 4 muestra el diagrama de difracción de rayos X en polvo del COMPUESTO en la forma cristalina 1 medido a 95 % de HR y 25 °C, cuando el diagrama de difracción de rayos X en polvo se muestra contra radiación Cu K $\alpha$ . El diagrama de difracción de rayos X muestra picos que poseen una intensidad relativa, comparada con el pico más intenso en el diagrama, de los siguientes porcentajes (intensidades de pico relativas se entregan en paréntesis) a los ángulos de refracción indicados 2theta (se reportaron picos seleccionados del intervalo de 8-30° 2theta con intensidad relativa mayor a 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 %) y 26,0° (47 %).

- 40 En los diagramas de difracción de rayos X de la figura 1 a la Figura 4, el ángulo de refracción 2theta (2 $\theta$ ) se grafica sobre el eje horizontal y las cuentas en el eje vertical.

- 45 Para evitar cualquier duda, los picos arriba indicados describen los resultados experimentales de la difracción de rayos X en polvo mostrados en las figuras 1 a 4. Se entiende que, en contraste con la lista de picos anterior, solamente se requiere una selección de picos característicos para caracterizar completamente y de manera no ambigua al COMPUESTO de la presente invención en la forma cristalina respectiva.

La figura 5 muestra el diagrama de sorción de vapor gravimétrico del COMPUESTO en la forma cristalina 1 obtenida a partir del Ejemplo 1.

En el diagrama de sorción de vapor gravimétrico de la figura 5 la humedad relativa (% HR) se grafica en el eje horizontal y el cambio de masa (% dm) en el eje vertical.

- 50 La figura 6 muestra la traza de DSC del COMPUESTO en la forma cristalina 1.

En el diagrama DSC de la figura 6, la temperatura (°C) se grafica sobre el eje horizontal y la potencia (mW) sobre el eje vertical.

### Descripción detallada de la invención

- 1) Una primera realización de la invención se refiere a la forma cristalina del ácido (S)-2-(8-(5-cloropirimidin-2-

il)(metil)amino-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético (COMPUESTO); caracterizado por la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción  $2\theta$ : 12,6°, 14,0° y 21,1°, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 5 %, a aproximadamente 20 %, a aproximadamente 50 %, o aproximadamente 95 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente 25 °C.

Se entiende, que la forma cristalina de acuerdo con la realización 1) comprende al COMPUESTO en una forma cristalina del ácido libre (es decir, no en forma de una sal). Además, dicha forma cristalina puede comprender solvente no coordinado y/o coordinado (especialmente agua no coordinada y/o coordinada). El solvente coordinado (especialmente agua coordinada) se usa en este documento como la definición de un solvato cristalino (especialmente un hidrato cristalino). Para evitar dudas, en esta solicitud el término "hidrato cristalino" abarca a los hidratos no estequiométricos. De la misma forma, el solvente no coordinado se utiliza en este documento como la definición para el solvente fisiosorbido o físicamente atrapado (definiciones de acuerdo con Polymorphism in the Pharmaceutical Industry (Ed. R. Hilfiker, VCH, 2006), Capítulo 8: U.J. Griesser: The Importance of Solvates). Se entiende, además, que la forma cristalina puede contener diferentes cantidades de agua coordinada como una función de la humedad relativa y que el diagrama de difracción de rayos X en polvo puede así variar con la humedad relativa. Para evitar las dudas, la presente invención abarca a todas las sub-formas cristalinas de la forma cristalina que son reversamente convertidas una en la otra dependiendo de la humedad relativa y que se caracterizan por la presencia de los picos específicamente entregados en el diagrama de difracción de rayos X en polvo a una humedad relativa específicamente determinada y a aproximadamente 25 °C. Se entiende que una referencia a la medición a una humedad relativa determinada y a una temperatura determinada significa que la medición se ha realizado después de que la forma cristalina se ha adaptado a la humedad relativa específica y a la temperatura específica (es decir, luego de un tiempo de equilibrio); por lo general el tiempo de equilibrio es de aproximadamente 0,5 horas hasta aproximadamente 24 horas, en particular desde 1 hora hasta 12 horas y especialmente desde 1 hora hasta 6 horas.

2) Otra realización se refiere a una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con la realización 1), caracterizado por:

a. la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción  $2\theta$ : 12,6°, 14,0°, 19,8°, 20,0°, 21,1° y 26,4°, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 5 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente 25 °C; o

b. la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción  $2\theta$ : 12,6°, 14,0°, 19,7°, 21,1° y 26,4°, cuando el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 20 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente 25 °C; o

c. la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción  $2\theta$ : 12,6°, 14,0°, 19,5°, 21,1°, 21,4° y 26,1°, cuando el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 50 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente 25 °C; o

d. la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción  $2\theta$ : 12,6°, 14,0°, 19,5°, 21,1°, 21,5° y 26,0°, cuando el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 95 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente 25 °C.

3) Otra realización se refiere a una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con la realización 1), caracterizado por:

a. la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción  $2\theta$ : 12,6°, 14,0°, 15,6°, 19,8°, 20,0°, 21,1°, 23,7°, 26,4°, 27,5° y 28,4°, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 5 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente 25 °C; o

b. la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción  $2\theta$ : 12,6°, 14,0°, 15,6°, 19,7°, 21,1°, 23,3°, 23,6°, 26,4°, 27,4° y 28,4°, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 20 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente 25 °C; o

c. la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción  $2\theta$ : 12,6°, 14,0°, 15,2°, 16,1°, 19,5°, 21,1°, 21,4°, 23,0°, 26,1° y 27,0°, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 50 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente 25 °C; o

d. la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción  $2\theta$ : 12,6°, 14,0°, 16,2°, 18,9°, 19,5°, 21,1°, 21,5°, 22,9°, 26,0° y 27,0°, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 95 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente 25 °C.

- 5 4) Otra realización se refiere a una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con la realización 1), caracterizada por la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción  $2\theta$ :  $12,6^\circ$ ,  $14,0^\circ$  y  $21,1^\circ$  (y en particular  $12,6^\circ$ ,  $14,0^\circ$ ,  $19,8^\circ$ ,  $20,0^\circ$ ,  $21,1^\circ$  y  $26,4^\circ$ ), donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 5 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ .
- 10 5) Otra realización se refiere a una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con la realización 1), caracterizada por la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción  $2\theta$ :  $12,6^\circ$ ,  $14,0^\circ$  y  $21,1^\circ$  (y en particular  $12,6^\circ$ ,  $14,0^\circ$ ,  $19,7^\circ$ ,  $21,1^\circ$  y  $26,4^\circ$ ), donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 20 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ .
- 15 6) Otra realización se refiere a una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con la realización 1), caracterizado por la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción  $2\theta$ :  $12,6^\circ$ ,  $14,0^\circ$  y  $21,1^\circ$  (y en particular  $12,6^\circ$ ,  $14,0^\circ$ ,  $19,5^\circ$ ,  $21,1^\circ$ ,  $21,4^\circ$  y  $26,1^\circ$ ), donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 50 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ .
- 20 7) Otra realización se refiere a una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con la realización 1), caracterizado por la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción  $2\theta$ :  $12,6^\circ$ ,  $14,0^\circ$  y  $21,1^\circ$  (y en particular  $12,6^\circ$ ,  $14,0^\circ$ ,  $19,5^\circ$ ,  $21,1^\circ$ ,  $21,5^\circ$  y  $26,0^\circ$ ), donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 95 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ .
- 8) Se divulga en este documento una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con la realización 1),
- a. la cual esencialmente muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo tal como se representa en la figura 1, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 5 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ ; o
- 25 b. la cual esencialmente muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo tal como se representa en la figura 2, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 20 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ ; o
- 30 c. la cual esencialmente muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo tal como se representa en la figura 3, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 50 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ ; o
- d. la cual esencialmente muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo tal como se representa en la figura 4, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 95 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ .
- 35 9) También se divulga en este documento una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con la realización 1), que esencialmente muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo tal como se representa en la figura 1, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 5 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ .
- 40 10) También se divulga en este documento una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con la realización 1), que esencialmente muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo tal como se representa en la Figura 2, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 20 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ .
- 45 11) También se divulga en este documento una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con la realización 1), que esencialmente muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo tal como se representa en la figura 3, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 50 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ .
- 12) También se divulga en este documento una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con la realización 1), que esencialmente muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo tal como se representa en la figura 4, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 95 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ .
- 50 13) También se divulga en este documento una forma cristalina, tal como una forma cristalina esencialmente pura, del compuesto ácido (S)-2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético que se puede obtener por:
- a) preparación de una solución del compuesto en THF a 25 mg/ml;

- b) colocación de 0,2 ml de la solución en un vial de vidrio de 4 ml;
- c) evaporación del THF usando un instrumento que permite la evaporación a través del uso combinado de radiación infrarroja, agitación en vórtex y vacío ajustado a 30 °C y 100 mbar por 30 minutos (por ejemplo, un Combidancer de Hettich AG, Suiza);
- 5 d) adición de 0,02 ml de un solvente seleccionado de acetato de etilo, acetonitrilo, acetona o isopropanol (en particular acetona) al residuo sólido y permitir que se incube por 3 días a temperatura ambiente en el vial cerrado; y
- e) aislamiento del residuo sólido obtenido.
- 10 14) También se divulga en este documento una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con la realización 13); caracterizada por la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción 2θ: 12,6°, 14,0°, y 21,1° donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 5 %, a aproximadamente 20 %, a aproximadamente 50 %, o al aproximadamente 95 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente 25 °C.
- 15 15) También se divulga en este documento una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con la realización 13), caracterizada por:
- a. la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción 2θ: 12,6°, 14,0°, 19,8°, 20,0°, 21,1° y 26,4°, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 5 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente 25 °C; o
- 20 b. la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción 2θ: 12,6°, 14,0°, 19,7°, 21,1° y 26,4°, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 20 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente 25 °C; o
- c. la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción 2θ: 12,6°, 14,0°, 19,5°, 21,1°, 21,4° y 26,1°, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 50 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente 25 °C; o
- 25 d. la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción 2θ: 12,6°, 14,0°, 19,5°, 21,1°, 21,5° y 26,0°, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 95 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente 25 °C.
- 16) También se divulga en este documento una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con la realización 13), caracterizada por:
- 30 a. la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción 2θ: 12,6°, 14,0°, 15,6°, 19,8°, 20,0°, 21,1°, 23,7°, 26,4°, 27,5° y 28,4°, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 5 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente 25 °C; o
- 35 b. la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción 2θ: 12,6°, 14,0°, 15,6°, 19,7°, 21,1°, 23,3°, 23,6°, 26,4°, 27,4°, y 28,4°, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 20 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente 25 °C; o
- 40 c. la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción 2θ: 12,6°, 14,0°, 15,2°, 16,1°, 19,5°, 21,1°, 21,4°, 23,0°, 26,1° y 27,0°, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 50 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente 25 °C; o
- 45 d. la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción 2θ: 12,6°, 14,0°, 16,2°, 18,9°, 19,5°, 21,1°, 21,5°, 22,9°, 26,0° y 27,0°, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 95 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente 25 °C.
- 17) También se divulga en este documento una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con la realización 13), caracterizada por la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción 2θ: 12,6°, 14,0° y 21,1° (y en particular 12,6°, 14,0°, 19,8°, 20,0°, 21,1° y 26,4°), donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 5 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente 25 °C.
- 50 18) También se divulga en este documento una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con la realización 13), caracterizada por la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes

ángulos de refracción  $2\theta$ :  $12,6^\circ$ ,  $14,0^\circ$  y  $21,1^\circ$  (y en particular  $12,6^\circ$ ,  $14,0^\circ$ ,  $19,7^\circ$ ,  $21,1^\circ$  y  $26,4^\circ$ ), donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 20 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ .

19) También se divulga en este documento una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con la realización 13), caracterizada por la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción  $2\theta$ :  $12,6^\circ$ ,  $14,0^\circ$  y  $21,1^\circ$  (y en particular  $12,6^\circ$ ,  $14,0^\circ$ ,  $19,5^\circ$ ,  $21,1^\circ$ ,  $21,4^\circ$  y  $26,1^\circ$ ), donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 50 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente  $25^\circ$ .

20) También se divulga en este documento una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con la realización 13), caracterizada por la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción  $2\theta$ :  $12,6^\circ$ ,  $14,0^\circ$  y  $21,1^\circ$  (y en particular  $12,6^\circ$ ,  $14,0^\circ$ ,  $19,5^\circ$ ,  $21,1^\circ$ ,  $21,5^\circ$  y  $26,0^\circ$ ), donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 95 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ .

21) También se divulga en este documento una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con la realización 13),

a. la cual esencialmente muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo como se representa en la figura 1, cuando el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 5 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ ; o

b. la cual esencialmente muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo tal como se representa en la figura 2, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 20 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ ; o

c. la cual esencialmente muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo tal como se representa en la figura 3, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 50 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ ; o

d. la cual esencialmente muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo tal como se representa en la figura 4, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 95 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ .

22) También se divulga en este documento una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con la realización 13), la cual esencialmente muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo tal como se representa en la figura 1, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 5 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ .

23) También se divulga en este documento una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con la realización 13), la cual esencialmente muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo tal como se representa en la figura 2, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 20 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ .

24) También se divulga en este documento una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con la realización 13), la cual esencialmente muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo tal como se representa en la figura 3, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 50 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ .

25) También se divulga en este documento una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con la realización 13), la cual esencialmente muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo tal como se representa en la figura 4, donde el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente 95 % de humedad relativa y a una temperatura de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ .

26) Otra realización se refiere a la forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1) a 7), la cual muestra un evento endotérmico en el intervalo de aproximadamente  $260^\circ\text{C}$  a  $276^\circ\text{C}$  como se determina por calorimetría de barrido diferencial usando el procedimiento como se describe en este documento.

27) También se divulga en este documento la forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1) a 26), la cual esencialmente muestra un perfil de sorción de humedad gravimétrico como se representa en la figura 5, donde el perfil de absorción de humedad gravimétrico se mide a  $25^\circ\text{C}$ .

28) También se divulga en este documento la forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1) a 12), que es obtenido por los procedimientos de la realización 13).

Basado en las dependencias de las distintas realizaciones 1) a 28) como se describe en este documento

anteriormente, las siguientes realizaciones son entonces posibles y son las que se pretende y en este documento específicamente se divulgan en forma individualizada:

1, 2+1, 3+1, 4+1, 5+1, 6+1, 7+1, 26+1, 26+2+1, 26+3+1, 26+4+1, 26+5+1, 26+6+1, 26+7+1; En la lista anterior los números se refieren a las realizaciones de acuerdo con su numeración proporcionada en este documento anteriormente mientras que "+" indica la dependencia de otra realización. Las distintas realizaciones individualizadas se separan por comas. En otras palabras, "26+2+1", por ejemplo se refiere a la realización 26) dependiendo de la realización 2), dependiendo de la realización 1), es decir, la realización "26+2+1" corresponde a la realización 1), además caracterizada por las características de las realizaciones 2) y 26).

Para evitar cualquier duda, siempre que una de las realizaciones anteriores se refiera a "picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción  $2\theta$ ", dichos diagramas de difracción de rayos X en polvo se obtienen usando radiación combinada Cu K $\alpha$ 1 y K $\alpha$ 2, sin eliminación de K $\alpha$ 2; y se debe entender que la precisión de los valores  $2\theta$  como se proporcionan en este documento está en el intervalo de  $\pm 0,1-0,2^\circ$ . En particular, cuando se especifica un ángulo de refracción  $2\theta$  para un pico en las realizaciones de la invención y las reivindicaciones, el valor de  $2\theta$  entregado se debe entender como un intervalo desde ese valor menos  $0,2^\circ$  a dicho valor más  $0,2^\circ$  ( $2\theta \pm 0,2^\circ$ ); y preferentemente, a partir de dicho valor menos  $0,1^\circ$  de dicho valor más  $0,1^\circ$  ( $2\theta \pm 0,1^\circ$ ).

Cuando se usa la forma plural para los compuestos, productos sólidos, composiciones farmacéuticas, enfermedades y similares, esto pretende que signifique que también un compuesto, un producto sólido, una composición farmacéutica o una enfermedad o similares único se encuentren comprendidos.

Las definiciones proporcionadas en este documento están dirigidas a aplicarse de manera uniforme a la materia objetivo según se define en cualquiera de las realizaciones 1) a 28), y, *mutatis mutandis*, a lo largo de la especificación y de las reivindicaciones a menos que se exprese de otra forma en la definición se proporciona una definición más amplia o más restringida. Se entiende bien que una definición o una definición preferida de un término o expresión define y puede reemplazar al respectivo término o expresión de manera independiente de (y en combinación con) cualquier definición o definición preferida de cualquiera o de todos los otros términos o expresiones como se define en este documento.

El término "enantioméricamente enriquecido" se entiende en el contexto de la presente invención que significa especialmente que al menos 90, preferentemente al menos 95, y más preferentemente al menos 99 por ciento en peso del COMPUESTO está presente en la forma de un enantiómero del COMPUESTO. Se entiende que el COMPUESTO está presente en una configuración-(S) enantioméricamente enriquecida absoluta.

El término "esencialmente puro" se entiende que está en el contexto de la presente invención para significar especialmente que al menos 90, preferentemente al menos 95, y más preferentemente al menos 99 por ciento en peso de los cristales del COMPUESTO están presentes en una forma cristalina de acuerdo con la presente invención.

Cuando se define la presencia de un pico en, por ejemplo, un diagrama de difracción de rayos X en polvo, una metodología común es hacer esto en términos de la relación S/R (S = señal, R = ruido). Según esta definición, cuando se establece que un pico tiene que estar presente en un diagrama de difracción de rayos X en polvo, se entiende que el pico en el diagrama de difracción de rayos X en polvo está definido por tener una relación S/R (S = señal, R = ruido) mayor a x (donde x es un valor numérico mayor a 1), generalmente mayor a 2, especialmente mayor a 3.

En el contexto para establecer que la forma cristalina esencialmente muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo como se representa en las figuras 1, 2, 3 o 4, respectivamente, el término "esencialmente" significa que al menos los picos principales del diagrama representados en esas figuras, es decir, aquellos que tienen una intensidad relativa mayor a 20 %, especialmente mayor a 10 %, comparado con el pico más intenso en el diagrama, tienen que estar presentes. Sin embargo, el experto en la técnica de la difracción de rayos X en polvo reconocerá que las intensidades relativas en los diagramas de difracción de rayos X en polvo pueden estar sometidas a fuertes variaciones de intensidad debido a los efectos de orientación preferidos.

A menos que se use respecto de la humedad relativa y temperaturas, el término "aproximadamente" colocado antes de un valor numérico "X" se refiere en esta solicitud a un intervalo que se extiende desde X menos 10 % de X hasta X más 10 % de X, y preferentemente a un intervalo que se extiende desde X menos 5 % de X hasta X más 5 % de X. En el caso particular de la humedad relativa, el término "aproximadamente" colocado antes de una humedad relativa "Y" se refiere en la presente solicitud a un intervalo que se extiende desde la humedad relativa Y menos 3 de Y hasta Y más 3 de Y, y preferentemente, a un intervalo que se extiende desde Y menos 1 de Y hasta Y más 1 de Y; por ejemplo, el término "aproximadamente 5 % de humedad relativa" se refiere a una humedad relativa entre el 2 % y 8 %, y preferentemente a una humedad relativa entre 4 % y 6 %. En el caso particular de temperaturas, el término "aproximadamente" colocado antes de una temperatura "Y" se refiere en esta solicitud a un intervalo que se extiende desde la temperatura Y menos  $5^\circ\text{C}$  hasta Y más  $5^\circ\text{C}$ , preferentemente a un intervalo que se extiende desde Y menos  $3^\circ\text{C}$  hasta Y más  $3^\circ\text{C}$ . Temperatura ambiente se refiere a una temperatura de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ .

Siempre que se use la palabra "entre" o "a" para describir un intervalo numérico, se debe entender que los puntos finales del intervalo indicado se encuentran explícitamente incluidos dentro el intervalo. Por ejemplo: si un intervalo de



temperatura se describe que está entre 40 °C y 80 °C (o 40 °C a 80 °C), esto significa que los puntos finales 40 °C y 80 °C están incluidos en el intervalo; o si una variable se define siendo un número entero entre 1 y 4 (o 1 a 4), esto significa que la variable es el número entero 1, 2, 3 o 4.

5 La expresión % p/p se refiere a un porcentaje en peso comparado con el peso total de la composición considerada. De igual forma, la expresión v/v se refiere a una relación en volumen de los dos componentes considerados.

Las formas cristalinas, especialmente las formas cristalinas esencialmente puras, del COMPUESTO de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1) a 28) se pueden usar como medicamentos, por ejemplo en forma de composiciones farmacéuticas para la administración enteral (tal como, especialmente por vía oral) o parenteral (incluyendo aplicación tópica o la inhalación).

10 29) Otra realización se refiere, por lo tanto, a una forma cristalina del compuesto ácido (S)-2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1) a 7) o 26) para ser usado como un medicamento.

15 El sólido cristalino, especialmente el sólido cristalino esencialmente puro, del COMPUESTO de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1) a 28) se puede usar como un componente único o como una mezcla con otras formas cristalinas o formas amorfas del COMPUESTO.

20 La producción de las composiciones farmacéuticas se puede realizar de una manera que será familiar para cualquier experto en la técnica (ver, por ejemplo, Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Edition (2005), Part 5, "Pharmaceutical Manufacturing" [publicado por Lippincott Williams & Wilkins]) haciendo que la forma cristalina de la presente invención, opcionalmente en combinación con otras sustancias valiosas desde el punto de vista terapéutico, se integre a una forma de administración galénica junto con materiales portadores sólidos o líquidos adecuados, no tóxicos, inertes, farmacéuticamente aceptables y, si se desea, con adyuvantes farmacéuticos habituales.

30) Una realización adicional de la invención se refiere a las composiciones farmacéuticas que comprenden como ingrediente activo una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1) a 7) o 26), y al menos un material portador farmacéuticamente aceptable.

25 31) También se divulga en este documento una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1) a 28), para ser usado en la fabricación de una composición farmacéutica, donde dicha composición farmacéutica comprende, como ingrediente activo el COMPUESTO y al menos un material portador farmacéuticamente aceptable.

30 32) Una realización adicional de la invención se refiere a una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1) a 7) o 26), para ser usada en la prevención o tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en enfermedades/trastornos alérgicos/inmunes crónicos y agudos, que comprenden asma, asma alérgica, asma eosinofílica, asma severa, rinitis, rinitis alérgica, angioedema, alergia por veneno de insectos, alergias a medicamentos, sinusitis alérgica, nefritis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, asma bronquial, alergia alimentaria, trastornos de mastocitos sistémicos, choque anafiláctico, urticaria, 35 eczema, colitis ulcerativa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, y poliposis nasal; enfermedades relacionadas con los eosinófilos que comprenden vasculitis de los vasos pequeños como el síndrome de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener, poliangeítis microscópica (y subconjuntos de órgano específico del mismo), síndromes hipereosinofílicos como neumonía eosinofílica, esofagitis eosinofílica, esofagitis por reflujo, endocarditis eosinofílica (endocarditis de Loeffler), síndrome de eosinofilia-mialgia, fascitis eosinofílica, eosinofilia foliculitis pustular (enfermedad de Ofuji), úlceras eosinofílicas, hiperplasia angiolinfoide con eosinofilia (ALHE), celulitis eosinofílica (síndrome de Wells), leucemia eosinofílica crónica, síndrome de DRESS (Sarpullido por fármacos con eosinofilia y síntomas sistémicos), y enfermedad de Still (establecimiento sistémico juvenil idiopático de la artritis); enfermedades relacionadas con los basófilos, que comprenden leucemia basofílica y leucocitosis basofílica y fibrosis quística.

45 33) Una realización preferida de la invención se refiere a una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1) a 7) o 26), para ser usada en la prevención o tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en asma, asma eosinofílica, rinitis alérgica, dermatitis atópica, poliposis nasal, alergia alimentaria (en particular alergia alimentaria mediada por IgE), urticaria (en particular urticaria crónica), esofagitis eosinofílica, síndrome de Churg Strauss, síndrome hipereosinofílico, neumonía eosinofílica (en particular neumonía eosinofílica crónica), síndrome de DRESS, enfermedad de Still, EPOC y la fibrosis quística (y en particular el asma, asma eosinofílica, rinitis alérgica, dermatitis atópica, alergia alimentaria mediada por IgE, urticaria crónica, esofagitis eosinofílica y el síndrome de Churg Strauss).

55 34) También se divulga en este documento una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1) a 28), para ser usada en la fabricación de una composición farmacéutica para la prevención o tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en enfermedades/trastornos alérgicos/inmunes crónicos y agudos que comprenden asma, asma alérgica, asma eosinofílica, asma severa, rinitis, rinitis alérgica, angioedema, alergia por veneno de insectos, alergia por medicamentos, sinusitis alérgica, nefritis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, asma bronquial, alergia alimentaria, trastornos de

mastocitos sistémicos, choque anafiláctico, urticaria, eczema, colitis ulcerativa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, y poliposis nasal; enfermedades relacionadas con los eosinófilos que comprenden vasculitis de vasos pequeños como el síndrome de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener, poliangeítis microscópica (y los subconjuntos de órganos específicos de la última), síndromes hipereosinofílicos como neumonía eosinofílica, esofagitis eosinofílica, esofagitis por reflujo, endocarditis eosinofílica (endocarditis de Loeffler), síndrome de eosinofilia-mialgia, fascitis eosinofílica, foliculitis pustular eosinofílica (enfermedad de Ofuji), úlceras eosinofílicas, hiperplasia angiolineal con eosinofilia (ALHE), celulitis eosinofílica (síndrome de Wells), leucemia eosinofílica crónica, síndrome de DRESS (Sarpullido por fármacos con eosinofilia y síntomas sistémicos), y enfermedad de Still (establecimiento sistémico juvenil de artritis idiopática); enfermedades relacionadas con los basófilos, que comprenden leucemia basofílica y leucocitosis basofílica; y fibrosis quística.

35) También se divulga en este documento una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1) a 28), para ser usada en la fabricación de una composición farmacéutica para la prevención o tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en asma, asma eosinofílica, rinitis alérgica, dermatitis atópica, poliposis nasal, alergia alimentaria (alergia alimentaria en particular mediada por IgE), urticaria (en particular urticaria crónica), esofagitis eosinofílica, síndrome de Churg Strauss, síndrome hipereosinofílico, neumonía eosinofílica (en particular neumonía eosinofílica crónica), síndrome de DRESS, enfermedad de Still, EPOC y fibrosis quística (y en particular asma, asma eosinofílica, rinitis alérgica, dermatitis atópica, alergia alimentaria mediada por IgE, urticaria crónica, esofagitis eosinofílica y síndrome de Churg Strauss).

36) Una realización adicional de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas de acuerdo con la realización 30), para ser usada en la prevención o tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en enfermedades/trastornos alérgicos/inmunes, crónicos y agudos, que comprende asma, asma alérgica, asma eosinofílica, asma severa, rinitis, rinitis alérgica, angioedema, alergia por veneno de insectos, alergia a medicamentos, sinusitis alérgica, nefritis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, asma bronquial, alergia alimentaria, trastornos de mastocitos sistémicos, choque anafiláctico, urticaria, eczema, colitis ulcerativa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide y poliposis nasal; enfermedades relacionadas con eosinófilos que comprenden vasculitis de vasos pequeños como síndrome de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener, poliangeítis microscópica (y los subconjuntos de órganos específicos de la última), síndromes hipereosinofílicos como neumonía eosinofílica, esofagitis eosinofílica, esofagitis por reflujo, endocarditis eosinofílica (endocarditis de Loeffler), síndrome de eosinofilia-mialgia, fascitis eosinofílica, foliculitis pustular eosinofílica (enfermedad de Ofuji), úlceras eosinofílicas, hiperplasia angiolineal con eosinofilia (ALHE), celulitis eosinofílica (síndrome de Wells), leucemia eosinofílica crónica, síndrome de DRESS (Sarpullido por fármaco con eosinofilia y síntomas sistémicos), y enfermedad de Still (establecimiento sistémico de la artritis idiopática juvenil); enfermedades relacionadas con basófilos, que comprenden leucemia basofílica y leucocitosis basofílica; y fibrosis quística.

37) Una realización preferida de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas de acuerdo con la realización 30), para ser usada en la prevención o tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en asma, asma eosinofílica, rinitis alérgica, dermatitis atópica, poliposis nasal, alergia alimentaria (en particular alergia alimentaria mediada por IgE), urticaria (en particular urticaria crónica), esofagitis eosinofílica, síndrome de Churg Strauss, síndrome hipereosinofílico, neumonía eosinofílica (en particular neumonía eosinofílica crónica), síndrome de DRESS, enfermedad de Still, EPOC y fibrosis quística (y en particular asma, asma eosinofílica, rinitis alérgica, dermatitis atópica, alergia alimentaria mediada por IgE, urticaria crónica, esofagitis eosinofílica y síndrome de Churg Strauss).

La presente divulgación también se refiere a un procedimiento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno mencionado en este documento, que comprende administrar a un individuo una cantidad farmacéuticamente activa de una forma cristalina del COMPUESTO de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1) a 28), o de una composición farmacéutica de acuerdo con la realización 30).

La presente divulgación también se refiere a un procedimiento para la preparación del COMPUESTO en una forma enantioméricamente enriquecida, y a procedimientos para la preparación y caracterización de las formas cristalinas del COMPUESTO de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1) a 28). Dichos procedimientos se describen en la realización 13), así como en los procedimientos de la parte experimental a continuación.

#### Procedimientos experimentales:

##### Abreviaciones (como se utiliza en este documento anteriormente o de en este documento en adelante):

Ac	Acetilo (tal como OAc = acetato, AcOH = ácido acético)
ac.	acuoso
Boc	terc-Butoxicarbonilo
BSA	Albúmina sérica bovina

	Bu	Butilo tal como n-Bu = n-butilo
	conc.	Concentrado
	DCM	Diclorometano
	DEA	Dietilamina
5	DIEA	Diisopropiletilamina
	DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
	DMSO	Dimetilsulfóxido
	dpm	descomposiciones por minuto
	EDTA	Ácido Etilen Diamino Tetraacético
10	ELS (D)	Barrido de Luz evaporativa (Detección)
	Eq	Equivalente (s)
	Et	Etilo
	EtOAc	Acetato de etilo
	EtOH	Etanol
15	FC	Cromatografía ultrarrápida en gel de sílice
	Fig	Figura
	h	Hora(s)
	HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico
	<sup>1</sup> H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
20	HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
	LC-MS	Cromatografía líquida - Espectrometría de masas
	M	Molaridad
	M	Masa exacta (como se usa para LC-MS)
	me	Metilo
25	MeCN	Acetonitrilo
	MeOH	Metanol
	MW	Micro onda
	mW	mili-Watt
	μl	microlitro
30	min	Minuto(s)
	EM	Espectrometría de masas
	N	Normalidad
	PBS	Solución salina tamponada de fosfato
	ph	Fenilo
35	PPh <sub>3</sub>	Trifenilfosfina
	Prep	Preparativa
	HR	humedad relativa

TA	Temperatura ambiente
sat.	Saturado
TFA	ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
5 $t_R$	Tiempo de retención
TRIS	Tampón tris-(hidroximetil)aminometano
UV	Ultravioleta

Todos los solventes y reactivos se usan como se obtienen a partir de fuentes comerciales a menos que se indique lo contrario.

- 10 Las temperaturas se indican en grados Celsius (°C). A menos que se indique lo contrario, las reacciones tienen lugar a temperatura ambiente (TA).

En las mezclas, las relaciones de partes de solventes o eluyentes o mezclas de reactivos en forma líquida se proporcionan como relaciones en volumen (v/v), a menos que se indique lo contrario.

- 15 Los compuestos se purifican por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (FC) o por HPLC preparativa. Los compuestos descritos en la invención se caracterizan por LC-MS (tiempo de retención  $t_R$  que se entrega en minutos; el peso molecular obtenido a partir del espectro de masas se proporciona en g/mol, usando las condiciones que se indican a continuación).

Condiciones analíticas de LC-MS como se usan en los ejemplos a continuación:

- 20 Los análisis LC-MS se realizan en un sistema Agilent 1100, equipado con una bomba binaria Dionex P580, un Detector de Arreglo de Fotodiodo Dionex PDA-100 y un espectrómetro de masa Finnigan AQA.

Los tiempos de retención de LC se obtienen usando la siguiente condición de elución:

- HPLC analítica en una columna Zorbax® SB-AQ (4,6x50 mm, 3,5  $\mu$ m, Agilent); Gradiente lineal de agua/TFA al 0,04 % (A) y MeCN (B) desde 5 % a 95 % de B a lo largo de 1,5 min; velocidad de flujo 4,5 ml/min, detección a 210 nm.

- 25 Las purificaciones HPLC/MS preparativas (condiciones básicas) se realizan en un sistema de bomba de gradiente binaria de alta presión Gilson 333/334 con un automuestreador y un colector de fracciones Gilson 215, un detector Dionex UVD340U DAD, un detector PL-ELS 1000 ELS polymerlabs y un detector MSQ Thermo Plus MS, usando una columna Waters XBridge C18 (10  $\mu$ m, 30 x 75 mm), con un gradiente lineal de agua/ 0,5 % de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 25 % (B) y MeCN (A) a partir de 80/20 a 5/95 (B)/(A) durante 5 minutos; velocidad de flujo 75 ml/min.

- 30 HPLC analítica sobre fase estacionaria quiral, se realizan en una columna Daicel ChiralPak AD-H (4,6 X 250 mm, 5  $\mu$ m) o una columna Chiralpak AY-H (4,6 X 250 mm, 5  $\mu$ m). Las condiciones típicas de HPLC quiral son una mezcla isocrática de heptano al 50 % + DEA al 0,05 % y EtOH al 50 % + DEA al 0,05 %, a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min., detección a 210 nm (HPLC-1 quiral) o una mezcla isocrática de 40 % de heptano y EtOH al 60 % + TFA al 0,1 %, a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min., detección a 210 nm (HPLC-2 quiral).

- 35 HPLC preparativa sobre una fase estacionaria quiral se realiza en una columna Daicel ChiralPak AD-H (20 x 250 mm, 5  $\mu$ m). Las condiciones típicas de HPLC quiral son una mezcla isocrática de EtOH al 50 % + DEA al 0,05 % y heptano al 50 %, a una velocidad de flujo de 34 ml/min, detección a 210 nm.

Análisis por difracción de rayos X en polvo (XRPD)

- 40 Los patrones de difracción de rayos X en polvo fueron recolectados en un difractómetro de rayos X Bruker D8 Advance equipado con una cámara de Anton Paar-CHCplus+ usada para establecer y controlar la temperatura y la humedad relativa en la muestra. El difractómetro fue equipado con un detector Lynxeye, operado con radiación-CuK $\alpha$  con ópticas de haz paralelo y operado en modo de reflexión. Típicamente, el tubo de rayos X se hizo funcionar a 40 kV/40 mA. Se aplicaron un tamaño de paso de 0,02° (2 $\theta$ ) y un tiempo de etapa de 95 segundos a lo largo de un intervalo de barrido de 3 - 35° en 2 $\theta$ . El polvo fue levemente presionado en un porta muestra estándar Anton-Paar TTK. Los datos de difracción se muestran usando Cu K $\alpha$ 1 ( $\lambda$  = 1,54060 Å). La precisión de los valores 2 $\theta$  como se proporcionan en este documento están en el intervalo de +/- 0,1-0,2° como generalmente ocurre en el caso de los patrones de difracción de rayos X en polvo convencionalmente registrados.

Análisis gravimétrico de sorción de vapor (GVS)

Las mediciones fueron realizadas en un instrumento de múltiples muestras SPS-100n (Projekt Messtechnik, Ulm, Alemania) que se hace funcionar en modo de etapa a 25 °C. La muestra se dejó que se equilibrara a un 40 % de HR

antes de iniciar y predefinir un programa de humedad (40-0-95-0-95-40 % de HR, etapas de 5 %  $\Delta$ HR y con un tiempo de equilibrio máximo de 24 horas por etapa fueron aplicados. Se usó aproximadamente 20 a 30 mg de cada muestra. La clasificación higroscópica se realizó de acuerdo con el texto de la European Pharmacopeia Technical Guide (1999, página 86), por ejemplo, ligeramente higroscópico: aumento de la masa de menos de 2 % e igual a o mayor a 0,2 % masa/masa; higroscópico: aumento en la masa en menos de 15 % e igual o mayor a 2 % masa/masa. El cambio de la masa entre 20 % de humedad relativa y 80 % de humedad relativa en el primer barrido de adsorción es considerado.

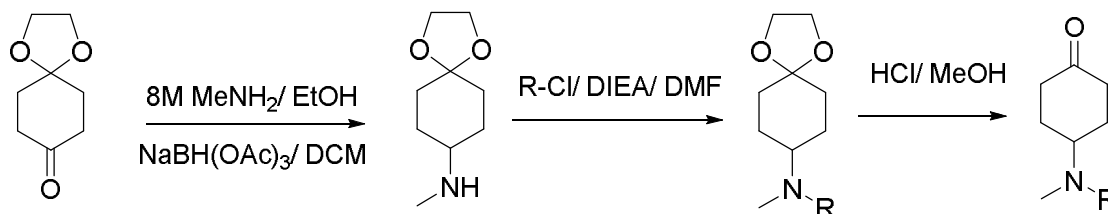
#### Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

Los datos de DSC fueron recolectados en un sistema STARe Mettler Toledo (módulo DSC822e, midiendo la celda con un sensor cerámico y el programa STAR, versión 13.00) equipado con un auto-muestreador de 34 posiciones. El instrumento fue calibrado para energía y temperatura usando indio certificado. Generalmente 2 mg de cada muestra, en un recipiente de aluminio Mettler de 40  $\mu$ L perforado de manera automática, se calentó a 10  $^{\circ}$ C por  $\text{min}^{-1}$ , a menos que se indique lo contrario, a partir de -20  $^{\circ}$ C a 320  $^{\circ}$ C. Se mantuvo una purga de nitrógeno a 20  $\text{ml min}^{-1}$  sobre la muestra.

#### I-Química

#### 15 Síntesis del ácido (S)-2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético

##### 1) Síntesis de 4-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino) ciclohexanona



(R representa 5-cloro-pirimidin-2-ilo)

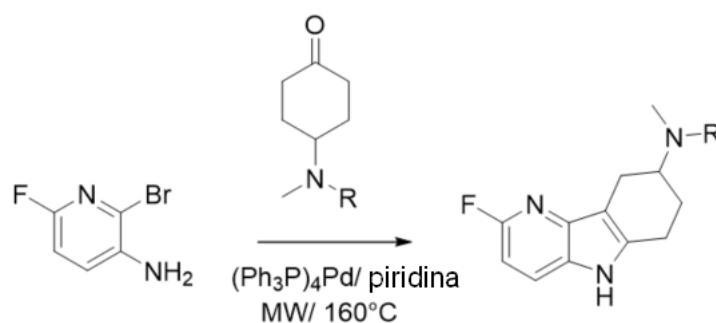
A una solución 1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-ona (1 equiv.) comercialmente disponible en DCM (20 ml/10 mmol) se agregaron sucesivamente a 0  $^{\circ}$ C metilamina (8M en EtOH, 1 equiv.) y  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  (1,5 equiv.). Se dejó que la mezcla de reacción se calentara a temperatura ambiente y se agitó por 2 horas. La mezcla de reacción se vertió sobre una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , la capa orgánica se lavó con solución salina, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se evaporó al vacío para proporcionar N-metil-1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-amina que fue usada para la siguiente etapa sin purificación posterior.

A una solución de N-metil-1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-amina (1 equiv.) en DMF (10,5 ml/6 mmol) se agregaron DIEA (2 equiv.) y 2,5-dicloropirimidina (1,05 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a 90  $^{\circ}$ C durante la noche. Luego de enfriar a temperatura ambiente, se agregó acetato de isopropilo. La mezcla se lavó con agua y ácido cítrico acuoso al 10 %. La capa orgánica se secó ( $\text{MgSO}_4$ ) y se concentró al vacío. El producto crudo se purificó por FC (0 a 15 % de EtOAc en heptano) para proporcionar el compuesto intermedio deseado como un sólido.

Una solución de este producto intermedio (1 equiv.) en una mezcla de HCl 2N (2,7 ml/5 mmol) y MeOH (2,7 ml/5 mmol) se agitó a TA durante la noche. Se extrajo la capa acuosa con DCM. La capa orgánica se secó ( $\text{MgSO}_4$ ) y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó por FC (0 a 17 % EtOAc en heptano) para proporcionar el compuesto del título como un sólido.

LC-MS:  $t_R$  = 0,78 min;  $[\text{M}+\text{H}]^+$  = 240,2

#### 2,1) Síntesis de N-(5-cloropirimidin-2-il)-2-fluoro-N-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-8-amina (procedimiento A)



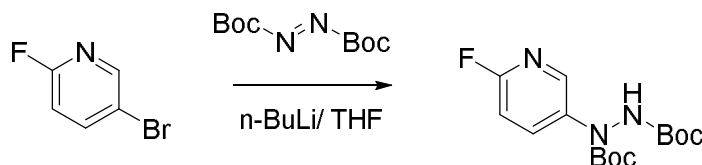
(R representa 5-cloro-pirimidin-2-ilo)

Una solución de 3-amino-2-bromo-6-fluoropiridina (1 equiv.), 4-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)ciclohexanona (1,2 equiv.),  $(\text{Ph}_3\text{P})_4\text{Pd}$  (0,5 equiv.) y piridina (8,17 equiv.) se combinaron en un vial. El vial fue irradiado por MW a 160 °C por 1 hora. Se agregó  $(\text{Ph}_3\text{P})_4\text{Pd}$  (0,025 equiv.) nuevamente y la mezcla de reacción se irradió nuevamente por MW a 160 °C por 30 min. Luego de enfriar a TA, la mezcla de reacción se combinó con agua y se extrajo dos veces con DCM. Los extractos orgánicos combinados fueron secados ( $\text{MgSO}_4$ ), filtrados y concentrados al vacío. El residuo se purificó por HPLC preparativa (condiciones básicas) para proporcionar el producto deseado.

LC-MS:  $t_R = 0,87$  min;  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 332,09$ .

## 2,2) Síntesis de N-(5-cloropirimidin-2-il)-2-fluoro-N-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-8-amina (procedimiento B)

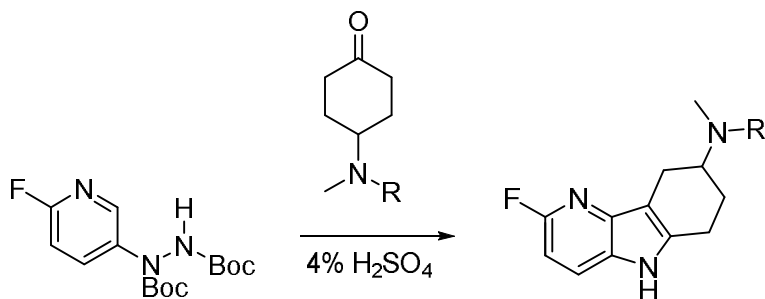
### a) Síntesis de 1-(6-fluoropiridin-3-il)hidrazina-1,2-dicarboxilato de di-terc-butilo



Se agregó una solución de n-butil-litio (1,6 M en hexano, 1,1 equiv.) gota a gota a -40 °C a una solución de 5-bromo-2-fluoropiridina (1 equiv.) en éter dietílico (14,5 equiv.) bajo una atmósfera de  $\text{N}_2$ . La mezcla de reacción se agitó durante 20 min a -40 °C y luego se agregó una solución de di-terc-butil-azodicarboxilato (1,1 equiv.) en THF (18,5 equiv.) gota a gota. La mezcla de reacción se agitó a -40 °C durante 30 minutos y se dejó calentar a TA durante 30 min. Se agregó agua seguida de DCM. La fase orgánica se separó y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por FC (EtOAc/n-heptano: 2/8) para proporcionar el producto deseado.

LC-MS:  $t_R = 0,88$  min;  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 328,12$ .

### b) Síntesis de N-(5-cloropirimidin-2-il)-2-fluoro-N-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-8-amina

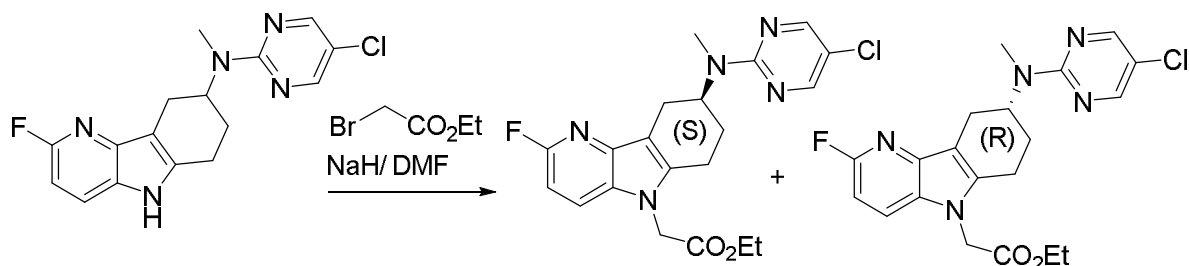


(R representa 5-cloro-pirimidin-2-ilo)

Una solución de 1-(6-fluoropiridin-3-il)hidrazina-1,2-dicarboxilato de di-terc-butilo (1 equiv.), 4-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)ciclohexanona (1 equiv.) en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 4 % acuoso (10 ml/0,04 mol) se agitó a 100 °C por 150 min. Luego de enfriar a TA, la mezcla de reacción se combinó con  $\text{NaHCO}_3$  sat. y se extrajo con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó por HPLC preparativa (condiciones básicas) para proporcionar el producto deseado.

LC-MS:  $t_R = 0,87$  min;  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 332,03$ .

**3) Síntesis de 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato de (S)-etilo y 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il) acetato de (R)-etilo**



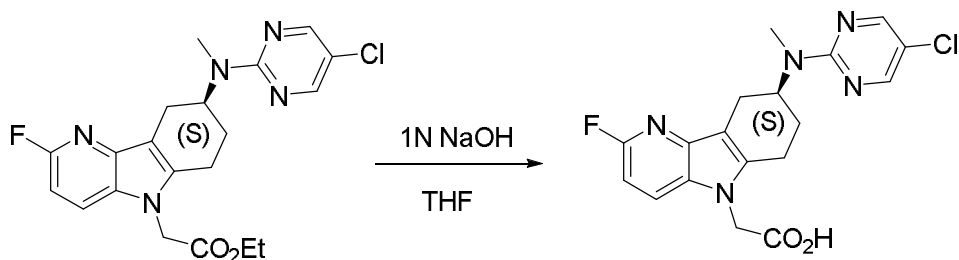
- 5 Se agregó NaH (95 %, 56,1 mg, 2,22 mmol, 1,2 equiv.) cuidadosamente a una solución fría (0 °C) de N-(5-cloropirimidin-2-il)-2-fluoro-N-metil-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-8-amina (614 mg, 1,85 mmol, 1 equiv.) en DMF (6,36 ml). La mezcla de reacción se agitó por 20 min. Se agregó bromoacetato de etilo (0,23 ml, 2,04 mmol, 1,1 equiv.) lentamente y se dejó calentar la mezcla de reacción a TA y se agitó por 2 horas. La mezcla de reacción se disolvió en EtOAc y se lavó con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. El extracto orgánico se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por FC (n-heptano a n-heptano/EtOAc: 7/3) para proporcionar el producto deseado como un racemato.

LC-MS: t<sub>R</sub>: 0,96 min./ [M+H]<sup>+</sup>: 418,01

Los dos enantiómeros del producto obtenido se separaron por HPLC preparativa sobre una fase estacionaria quiral:

- 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato de (S)-etilo  
 15 (271 mg, 35 %): HPLC (quiral HPLC-1): t<sub>R</sub>: 6,22 min;  
 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato de (R)-etilo  
 (273 mg, 35 %): HPLC (quiral HPLC-1): t<sub>R</sub>: 7,66 min.

**4) Síntesis de ácido (S)-2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético**



- 20 A una solución de 2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acetato de (S)-etilo (271 mg, 0,649 mmol, 1 equiv.) en THF (10 ml) se agregó NaOH (1N, 10 ml, 10 mmol, 15,4 equiv.) a TA. La mezcla de reacción se agitó a TA por 1 hora. La mezcla de reacción se concentró al vacío solamente para retirar el THF. Luego, se acidificó con HCl conc. a pH ~ 5-6 y se agitó a TA. Se extrajo la suspensión con EtOAc (4x). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron al vacío para entregar el compuesto del enunciado como un sólido color beige (255 mg, 100 %).

LC-MS: t<sub>R</sub>: 0,82 min./ [M+H]<sup>+</sup>: 390,12

HPLC (HPLC-2 quiral): t<sub>R</sub>: 4,96 min.

**II. Preparación de formas cristalinas del COMPUESTO**

**30 Ejemplo 1: Preparación y caracterización del COMPUESTO en forma cristalina 1**

- Se disuelve 0,1 g del COMPUESTO en 4 ml de THF y 0,2 ml de la solución se entrega en viales de vidrio color café de 4 ml. Se evapora el THF desde el vial usando un conjunto de Combidancer a 30 °C y 100 mbar por 30 minutos (Hettich AG, Suiza). Se mantiene un residuo sólido en el vial de vidrio que es amorfo. Se agregan 0,02 ml de acetona al residuo sólido, se cierra herméticamente el vial y la mezcla se dejó incubar por 3 días a temperatura ambiente en un vial cerrado. El residuo sólido es el COMPUESTO en forma cristalina 1. Alternativamente a la acetona, el

procedimiento se puede hacer usando acetato de etilo, acetonitrilo, o isopropanol.

**Tabla 1: Caracterización de datos para el COMPUESTO en la forma cristalina 1**

Técnica	Resumen de datos	Observaciones
XRPD	Cristalino	Ver Figuras 1-4
<sup>1</sup> H-RMN	Consistente	
DSC	Evento endotérmico amplio inferior a 100 °C, debido a la evaporación del solvente. El evento endotérmico posterior en el intervalo de aproximadamente 260 °C hasta aproximadamente 276 °C dentro de la señal exotérmica iniciando en un intervalo de aproximadamente 250 °C hasta aproximadamente 260 °C y evolucionando más allá de aproximadamente 280 °C. Esto se interpreta como un evento concomitante de fusión/degradación. La posición exacta de los eventos concomitantes de señal opuesta es muy dependiente de la cinética de los eventos respectivos y la persona experta en el arte reconoce que el establecimiento de un punto de fusión preciso como pico de temperatura no es observable en estos casos.	Ver Figura 6
Higroscopicidad	Levemente higroscópico (cambio de masa mayor luego 0,2 % y menor luego 2 %)	Ver Figura 5

### III. Ensayos biológicos

#### 5 Preparación de membranas con el receptor hCRTH2 y ensayo de desplazamiento de radioligandos:

Primero, se despegaron las células recombinantes HEK293-hCRTH<sub>2</sub> de las placas de cultivo en 5 ml de tampón A/placa (Tampón A: Tris 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 1 mM pH=7,4) usando un limpiador de goma. Luego se transfirieron las células en tubos de centrifugación y se centrifugaron por 5 min a 400 g. El sedimento de células se volvió a suspender en el mismo tampón y los tubos se congelaron a -80 °C. Las células se descongelaron y los fragmentos de membrana se generaron por homogeneización usando un homogeneizador Polytron (30 segundos). Los fragmentos de membrana fueron luego centrifugados a 3000 g por 20 minutos y se volvieron a suspender en tampón C (Tampón C: Tris 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, sacarosa 250 mM pH 7,4). Alícuotas de fragmentos de membrana fueron almacenados a -20 °C.

El ensayo de unión fue realizado en un volumen final de ensayo de 250 µL. Primero, 25 µL del compuesto de ensayo, previamente diluido en tampón de unión (tampón de unión: Tris-Base 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, BSA al 0,1 % (libre de proteasa), NaN<sub>3</sub> 0,01 %, MnCl<sub>2</sub> 10 mM pH 7,0) fue colocado en cada pocillo. Luego de la adición de 75 µL de tampón de unión se agregaron a cada pocillo, 50 µL de radioligando <sup>3</sup>H-PGD<sub>2</sub> (a 2,5 nM (220,000 dpm/pocillo) de ANAWA ART0662). El ensayo de unión se inició por adición de 100 µL de fragmentos de membrana de CRTH<sub>2</sub>, alcanzando una concentración final de 20 µg/pocillo. Para la unión no específica, se agregó PGD<sub>2</sub> a la mezcla de reacción a 10 mM de concentración final. Esta mezcla de ensayo se incubó por 90 minutos a temperatura ambiente y luego se filtró a través de una placa de 96 pocillos filtros GF/C la cual fue pre-empapada por 3 horas en polietilenimina al 0,5 % (PEI). Los filtros pocillos se lavaron tres veces con tampón de unión enfriado en hielo. Luego, se agregaron 40 µL de Microscint-40 (Packard) a cada pocillo y la radioactividad retenida se cuantificó en un Topcount (Packard).

Actividad antagonista del COMPUESTO: IC<sub>50</sub> = 5,6 nM.

#### 25 Ensayo de desplazamiento de radioligandos con albúmina sérica humana (HSA):

Se realizó el ensayo de desplazamiento de radioligando en presencia de albúmina sérica humana (HSA) como se describió anteriormente, con las siguientes modificaciones. Tampón de unión-HSA: Tampón de unión + 0,5 % de Albúmina Sigma proveniente de Suero humano A1887 (en lugar de 0,1 % de BSA). Se colocó un volumen de 25 µL del compuesto de ensayo, previamente diluido en tampón de unión HSA en cada pocillo. Luego de la adición de 75 µL de tampón-de unión-HSA, se agregaron 50 µL de <sup>3</sup>H-PGD<sub>2</sub> (a 2,5 nM (220,000 dpm/pocillo) de ANAWA ART0662) a cada pocillo. El resto del protocolo fue idéntico como se ha descrito anteriormente.

Actividad antagonista del COMPUESTO: IC<sub>50</sub> = 5,0 nM.

#### Ensayo de cambio de forma de eosinófilos con plasma humano

Luego de obtener el consentimiento informado, las muestras sanguíneas fueron retiradas por venopunción de acuerdo con el protocolo aprobado por el comité de ética de Basilea, Suiza. Se aislaron leucocitos polimorfonucleares (que



contienen eosinófilos, basófilos y neutrófilos) usando el procedimiento Polymorphprep® (Axis-Shield). En breve, la sangre completa anticoagulada fue depositada sobre una gradiente Polymorphprep (densidad de 1,113 g/ml) y centrifugada a 500 g por 30 min. La fracción de células polimorfonucleares fue cosechada y se redujo para los eritrocitos por lisis salina hipotónica.

- 5 Las células polimorfonucleares se volvieron a suspender en tampón de ensayo (1x PBS con  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  complementado con BSA al 0,1 %, HEPES 10 mM y glucosa 10 mM, pH 7,4) a  $5 \times 10^6$  células/ml y se tiñó con anti-CD49d-APC ((APC = alofocianina) por 1 hora a TA. Los compuestos de ensayo, a varias concentraciones, se pre-incubaron 10 min en plasma humano (anticoagulado con un inhibidor de trombina). Luego, se agregó plasma humano a las células polimorfonucleares hasta 50 % del volumen de ensayo final con células polimorfonucleares a  $4 \times 10^6$  células/ml. Luego de la incubación durante 10 minutos a 37 °C, las células polimorfonucleares se activaron durante 5 min a 37 °C por adición de PGD<sub>2</sub> a 100 nM de concentración final. Se detuvo la activación por la adición de 0,5 ml de paraformaldehído (al 1 %).

- 15 Inmediatamente luego de la fijación con paraformaldehído, se analizaron las muestras por medio de citometría de flujo FACSCanto (BD Biosciences) y las células diana se identificaron por sus características de barrido adelantado (FSC) y de barrido lateral (SSC). Se identificaron los eosinófilos por la señal anti-CD49d-APC y su perfil de barrido lateral característico (SSC). Las respuestas de cambio de forma, indicativas de activación de eosinófilos, se cuantificaron como el porcentaje de células con un barrido adelantado aumentado.

Actividad antagonista del COMPUESTOS:  $\text{IC}_{50} = 3,1 \text{ nM}$ .

#### Citotoxicidad *in vitro* en hepatocitos primarios de rata cultivados

### 20 1. Procedimientos

#### 1.1 Aislamiento y cultivo de hepatocitos de rata

- Se narcotizaron ratas Wistar macho adultas con pentobarbital sódico y se aislaron los hepatocitos de acuerdo con un procedimiento estándar, es decir, por perfusión *in situ* del hígado con una solución de collagenasa. La viabilidad de los hepatocitos purificados, fue verificada por el procedimiento de exclusión del colorante azul de tripano siendo esta mayor a 85 %. Los hepatocitos aislados se volvieron a suspender en medio E de Williams estándar, sin rojo fenol, complementado (WME supp.) con transferrina (100 µg/ml), triyodotironina (10 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml), hemisuccinato de hidrocortisona (13,36 µg/ml), glucagón (5 µg/ml), HEPES (10 mM), inosina (10 µg/mg), insulina (10 µg/ml), estreptomina (100 µg/ml) y penicilina (100 µg/ml) y suero bovino fetal al 10 % (FBS). Las células se colocaron en placas de 24 pocillos recubiertas de colágeno a una densidad inicial de  $2 \times 10^5$  células/pocillo. Luego de 4 horas para permitir la adhesión a las placas de cultivo, se aspiró el medio y se reemplazó por WME supp. fresco sin FBS que contiene los compuestos de ensayo y se incubaron por 24 horas a 37 °C en una atmósfera de 95 % de O<sub>2</sub> y 5 % de CO<sub>2</sub>. Para cada experimento, es decir, con cada lote de hepatocitos, se realizaron los tratamientos con los compuestos de ensayo en cuadruplicado. Los controles cuadruplicados (tratamiento solamente con el vehículo) estuvieron también presentes en cada placa de cultivo.

#### 35 1.2 Exposición *in vitro* a los compuestos de prueba

Las soluciones de reserva de los compuestos de ensayo se prepararon en DMSO unas pocas horas antes del inicio del tratamiento. Las diluciones adecuadas de estas soluciones de reserva se agregaron al medio de cultivo justo antes del tratamiento para poder entregar concentraciones finales de 0, 3, 10, 30, 100 y 300 µM. La concentración final del vehículo DMSO fue de 1 % (v/v).

#### 40 1.3 Viabilidad de los cultivos celulares

##### 1.3.1 Monitoreo de la morfología de la monocapa

La morfología de las monocapas de hepatocitos fue controlada por microscopía de luz después de 24 horas de exposición a los compuestos de ensayo. Los efectos relacionados con el tratamiento se describen de acuerdo con la siguiente graduación:

- 45 0 Sin alteraciones morfológicas observadas debido al tratamiento cuando se compara con los cultivos de control
- 1-3 El tratamiento resultante con cualquier cambio morfológico, por ejemplo granulación intracelular, vacuolización o muerte celular. Dependiendo de la severidad, estos cambios se consideraron como leve (1), moderado (2) o fuerte (3).
- 50 K Tratamiento resultante en 100 % de células muertas y/o la liberación completa de la monocapa proporcionando un disco transparente libre de células.

##### 1.3.2 Filtración de lactato deshidrogenasa

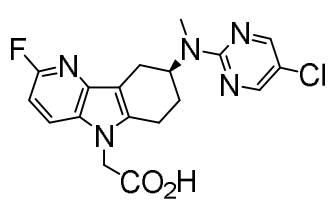
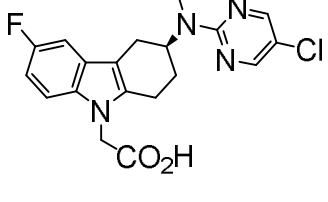
Después de 24 h de tratamiento de los cultivos de hepatocitos, cuidadosamente se recolectaron alícuotas del medio

de cultivo y se usaron para el análisis de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) por espectrofotometría usando un kit de detección para citotoxicidad por LDH de Clontech (catálogo No. 630117, Mountain View, CA, USA). Para cada experimento cultivos adicionales, se usaron para la determinación de la actividad de LDH intracelular total al inicio del tratamiento. Para este propósito, 4 pocillos de cultivo celular por experimento se lavaron con suero salino frío antes del inicio del tratamiento, se sonicaron en medio fresco y el homogeneizado se analizó para la actividad de LDH total. Las actividades de las enzimas en el medio de cultivo fueron evaluadas y expresadas como el porcentaje de la actividad total presente en los hepatocitos cultivados al inicio de los tratamientos.

## 2. Análisis de los datos

La concentración de citotoxicidad (LCC) menor y la concentración sin efecto (NoEC) se entregan para cada compuesto, basado en la morfología celular y la filtración de LDH luego de 24 horas de tratamiento. La LCC se define como la menor concentración del compuesto de ensayo que conduce a un efecto claro en los hepatocitos de rata cultivados (grado de morfología  $\geq 2$  o  $\geq 2$  veces de aumento en la filtración de LDH). Un valor LCC de  $> 300 \mu\text{M}$  indica la ausencia de efecto en ambos puntos finales a la mayor concentración de ensayo de  $300 \mu\text{M}$ . NoEC se define como la mayor concentración de ensayo del compuesto que no tenía el efecto sobre los hepatocitos de rata cultivados (morfología y filtración de LDH).

## 3. Resultados: valores de LCC y NoEC

Compuesto	LCC [ $\mu\text{M}$ ]	NoEC [ $\mu\text{M}$ ]	Compuesto	LCC [ $\mu\text{M}$ ]	NoEC [ $\mu\text{M}$ ]
 <p>COMPUESTO</p>	$>300$	$>300$	 <p>(ejemplo 9 de WO 2011/117798)</p>	300	30

### Toxicidad hepática *in-vivo*:

La toxicidad hepática de un compuesto de la fórmula (I) puede ser analizada por tratamiento oral en ratas y en una especie no roedora de hasta 4 semanas usando tres dosis diferentes del compuesto.

La reversibilidad de la toxicidad posible se puede investigar en un período libre de tratamiento posterior (período de recuperación). Los niveles de dosis se seleccionan basados en los intervalos de dosis encontrando estudios en las especies respectivas. La mayor dosis se espera que identifique la toxicidad de órganos cercano a la dosis tolerada máxima. La dosis media y baja se selecciona basada en las exposiciones humanas terapéuticas estimadas. La exposición del compuesto se mide a cada nivel de dosis.

Al final del tratamiento y al final de la recuperación, los biomarcadores hepáticos (tal como por ejemplo enzimas hepáticas, proteínas, triglicéridos o colesterol) se miden en sangre. Además, láminas de hígado teñidas con hematoxilina eosina son examinadas por vía microscópica para evaluar directamente el posible daño del órgano. Las tinciones especializadas de las láminas hepáticas pueden ser requeridas para además caracterizar posibles hallazgos hepáticos.

## REIVINDICACIONES

1. Una forma cristalina del ácido (S)-2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético, **caracterizada por** la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción 2 $\theta$ : 12,6°, 14,0° y 21,1°, en la que el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a (5 $\pm$ 3) %, a (20 $\pm$ 3) %, a (50 $\pm$ 3) %, o a (95 $\pm$ 3) % de humedad relativa y a una temperatura de 25 $\pm$ 5 °C usando radiación combinada de Cu K $\alpha$ 1 y K $\alpha$ 2 , sin eliminación de K $\alpha$ 2.
2. Una forma cristalina del ácido (S)-2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por**:
  - a. la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción 2 $\theta$ : 12,6°, 14,0°, 19,8°, 20,0°, 21,1° y 26,4°, en la que el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a (5 $\pm$ 3) % de humedad relativa y a una temperatura de 25 $\pm$ 5 °C; o
  - b. la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción 2 $\theta$ : 12,6°, 14,0°, 19,7°, 21,1° y 26,4°, en la que el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a (20 $\pm$ 3) % de humedad relativa y a una temperatura de 25  $\pm$ 5 °C; o
  - c. la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción 2 $\theta$ : 12,6°, 14,0°, 19,5°, 21,1°, 21,4° y 26,1°, en la que el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a (50 $\pm$ 3) % de humedad relativa y a una temperatura de 25 $\pm$ 5 °C; o
  - d. la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción 2 $\theta$ : 12,6°, 14,0°, 19,5°, 21,1°, 21,5° y 26,0°, en la que el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a (95 $\pm$ 3) % de humedad relativa y a una temperatura de 25 $\pm$ 5 °C.
3. Una forma cristalina del ácido (S)-2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por**:
  - a. la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción 2 $\theta$ : 12,6°, 14,0°, 15,6°, 19,8°, 20,0°, 21,1°, 23,7°, 26,4°, 27,5° y 28,4°, en la que el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a (5 $\pm$ 3) % de humedad relativa y a una temperatura de 25 $\pm$ 5 °C; o
  - b. la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción 2 $\theta$ : 12,6°, 14,0°, 15,6°, 19,7°, 21,1°, 23,3°, 23,6°, 26,4°, 27,4° y 28,4°, en la que el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a (20  $\pm$ 3) % de humedad relativa y a una temperatura de 25  $\pm$ 5 °C; o
  - c. la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción 2 $\theta$ : 12,6°, 14,0°, 15,2°, 16,1°, 19,5°, 21,1°, 21,4°, 23,0°, 26,1° y 27,0°, en la que el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a (50 $\pm$ 3) % de humedad relativa y a una temperatura de 25 $\pm$ 5 °C; o
  - d. la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción 2 $\theta$ : 12,6°, 14,0°, 16,2°, 18,9°, 19,5°, 21,1°, 21,5°, 22,9°, 26,0° y 27,0°, en la que el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a aproximadamente (95 $\pm$ 3) % de humedad relativa y a una temperatura de 25 $\pm$ 5 °C.
4. Una forma cristalina de ácido (S)-2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por** la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción 2 $\theta$ : 12,6°, 14,0° y 21,1°, en la que el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a (20 $\pm$ 3) % de humedad relativa y a una temperatura de 25 °C $\pm$ 5 °C.
5. Una forma cristalina de ácido (S)-2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por** la presencia de picos en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en los siguientes ángulos de refracción 2 $\theta$ : 12,6°, 14,0° y 21,1°, en la que el diagrama de difracción de rayos X en polvo se mide a (50 $\pm$ 3) % de humedad relativa y a una temperatura de 25 °C $\pm$ 5 °C.
6. Una forma cristalina del ácido (S)-2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que muestra un evento endotérmico en el intervalo de 260 $\pm$ 5 °C a 276 $\pm$ 5 °C según se determinó por calorimetría de barrido diferencial.
7. Una forma cristalina del ácido (S)-2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para ser usado como un medicamento.
8. Una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo una forma cristalina del ácido (S)-2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.
9. Una forma cristalina del ácido (S)-2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, que sirve para ser usada en la prevención o tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en enfermedades/trastornos alérgicos/inmunes, crónicos y agudos, que comprenden asma, asma alérgica, asma eosinofílica, asma severa, rinitis, rinitis alérgica, angioedema, alergia por veneno de insectos, alergia a medicamentos, sinusitis alérgica, nefritis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis

atópica, asma bronquial, alergia alimentaria, trastornos de mastocitos sistémicos, choque anafiláctico, urticaria, eczema, colitis ulcerativa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, y poliposis nasal; enfermedades relacionadas con eosinófilos que comprenden vasculitis de vasos pequeños como síndrome de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener, poliangéitis microscópica (y los subconjuntos de órganos específicos de la última), síndromes hipereosinofílicos como neumonía eosinofílica, esofagitis eosinofílica, esofagitis por reflujo, endocarditis eosinofílica (endocarditis de Loeffler), síndrome de eosinofilia-mialgia, fascitis eosinofílica, foliculitis pustular eosinofílica (enfermedad de Ofuji), úlceras eosinofílicas, hiperplasia angioloide con eosinofilia (ALHE), celulitis eosinofílica (síndrome de Wells), leucemia eosinofílica crónica, síndrome de DRESS (Sarpullido por fármaco con eosinofilia y síntomas sistémicos), y enfermedad de Still (establecimiento sistémico de la artritis idiopática juvenil); enfermedades relacionadas con basófilos, que comprenden leucemia basofílica y leucocitosis basofílica y fibrosis quística.

10. Una forma cristalina de ácido (S)-2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en asma, asma eosinofílica, rinitis alérgica, dermatitis atópica, poliposis nasal, alergia alimentaria, urticaria, esofagitis eosinofílica, síndrome de Churg Strauss, síndrome hipereosinofílico, neumonía eosinofílica, síndrome de DRESS, enfermedad de Still, EPOC y fibrosis quística.

11. Una forma cristalina de ácido (S)-2-(8-((5-cloropirimidin-2-il)(metil)amino)-2-fluoro-6,7,8,9-tetrahidro-5H-pirido[3,2-b]indol-5-il)acético de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en la prevención o el tratamiento de la poliposis nasal.

Fig. 1

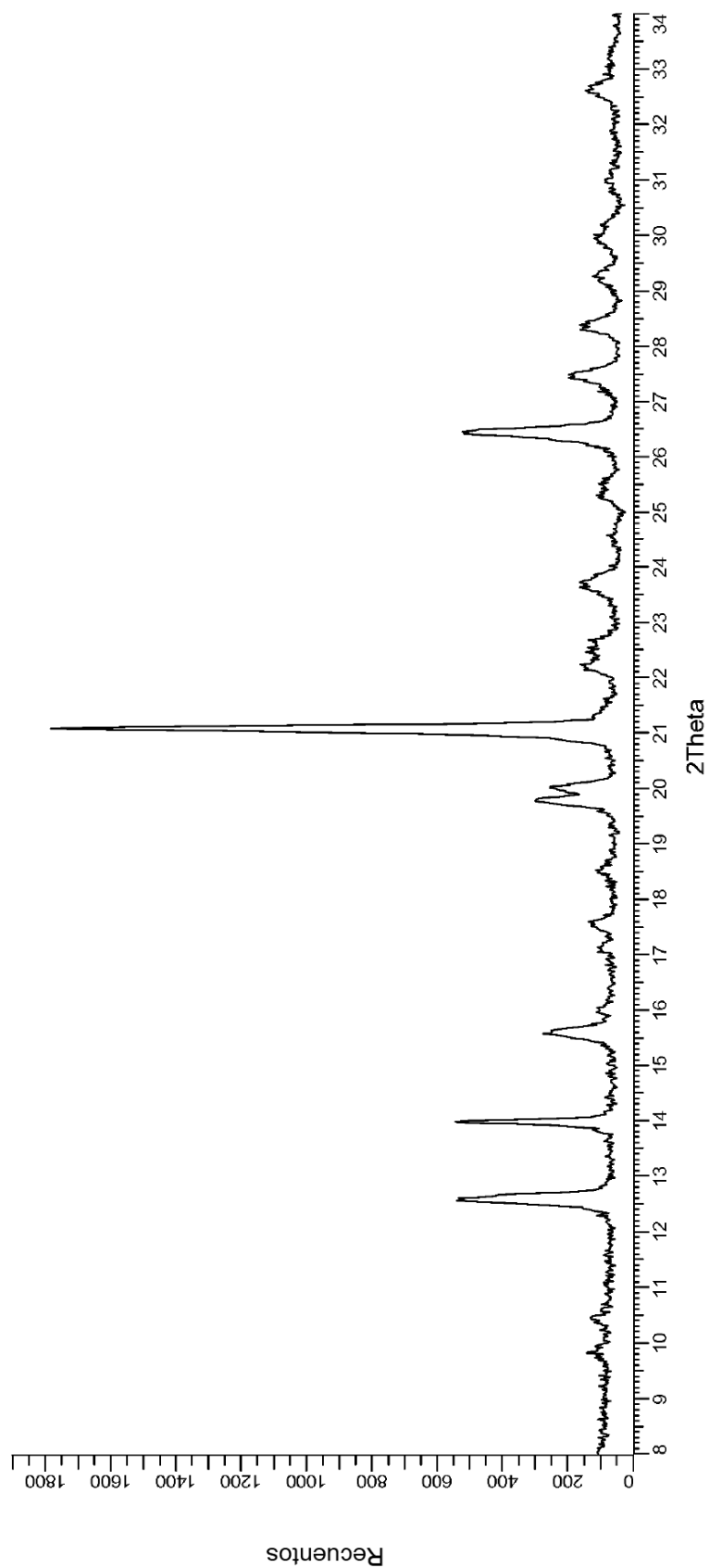


Fig. 2

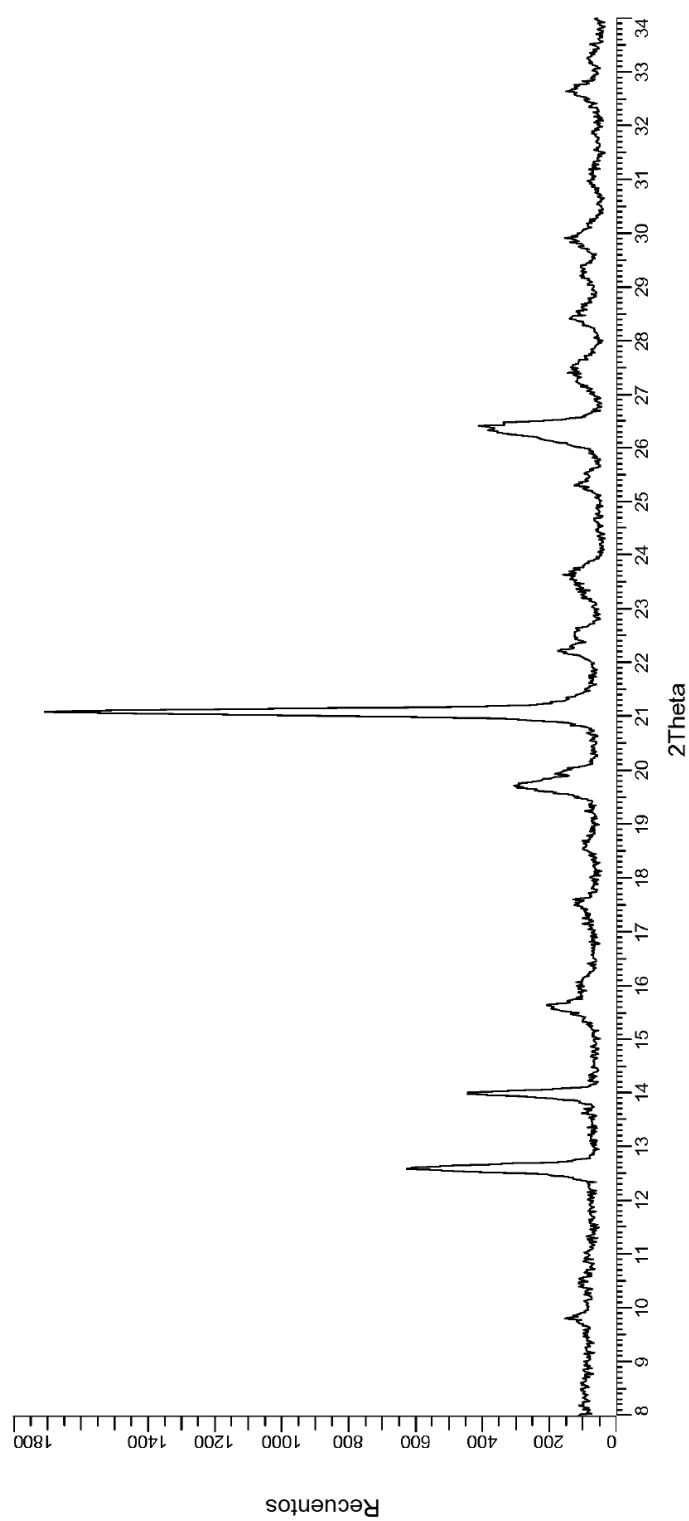


Fig. 3

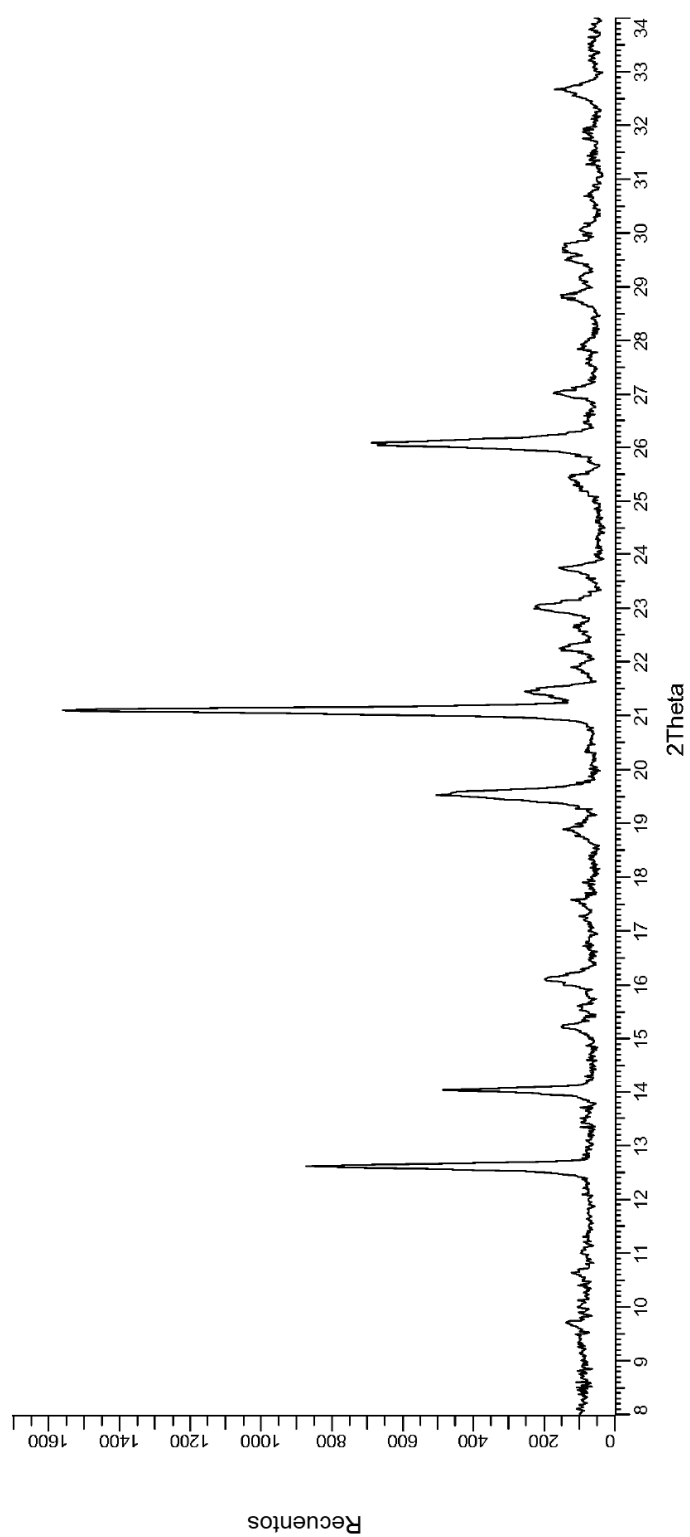


Fig. 4

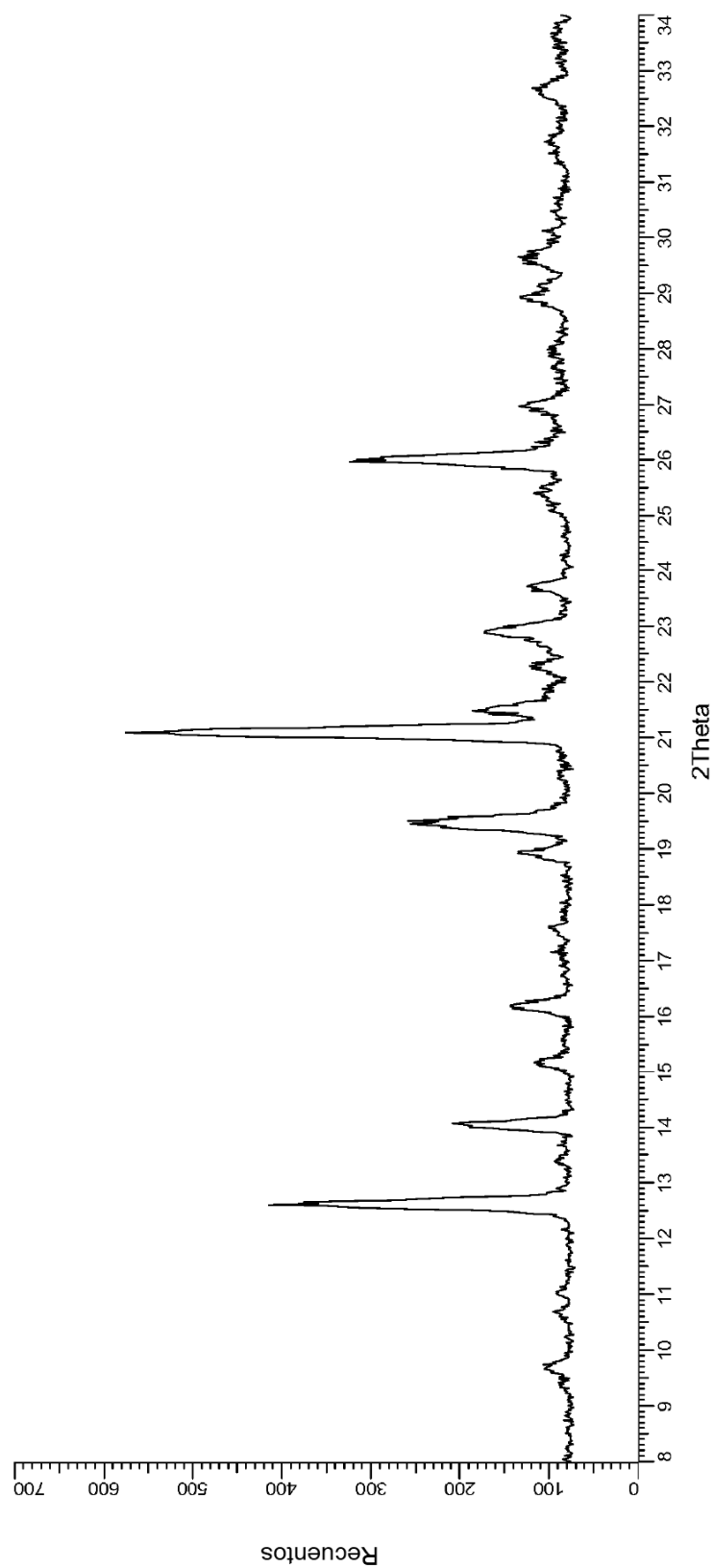




Fig. 5

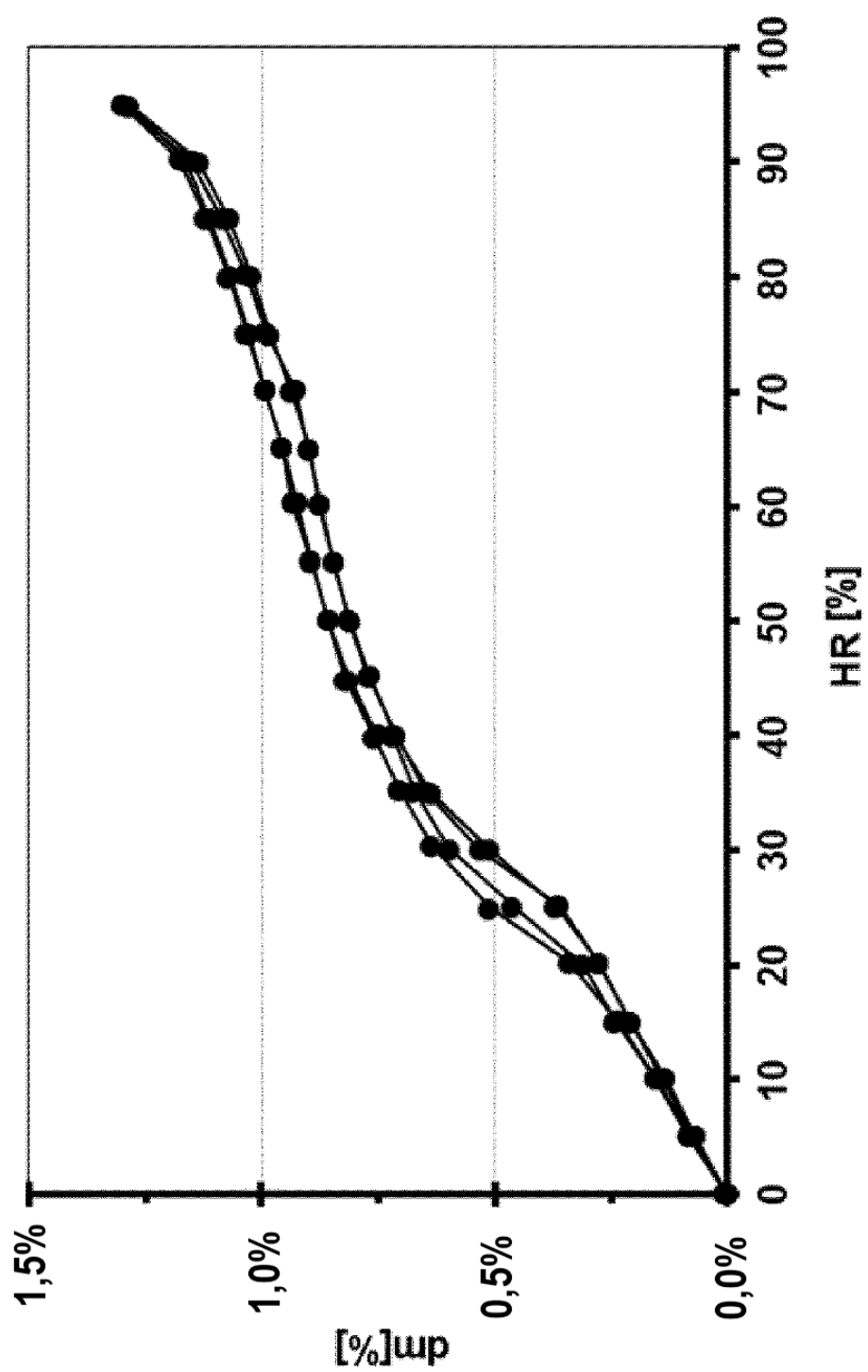


Fig. 6

