

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035951**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.09.04

(21) Номер заявки
201891768

(22) Дата подачи заявки
2017.02.04

(51) Int. Cl. **C07D 487/04** (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(54) КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ ФОРМА А АГОНИСТА TLR7, ЕЕ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

(31) 201610082029.8

(32) 2016.02.05

(33) CN

(43) 2019.01.31

(86) PCT/CN2017/072891

(87) WO 2017/133684 2017.08.10

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ЧИА ТАЙ ТЯНЬЦИН
ФАРМАСЬЮТИКАЛ ГРУП КО.,
ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:

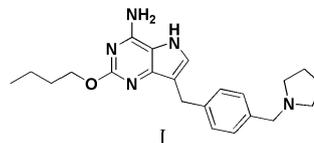
**Дин Чжаочжун, Сунь Фей, Ху Инху,
Чжоу Илун, Ван Чжэн, Чжао Жуй, Ян
Лин (CN)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2016023511
WO-A1-2015168269
CN-A-104780924
CN-A-104780923
CN-A-104837840

(57) Изобретение относится к кристаллической форме А агониста TLR7 2-бутокси-7-(4-(пирролидин-1-илметил)бензил)-5Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-4-амина (формула I), к способу получения кристаллической формы А и ее использованию.



B1

035951

035951

B1

Область техники

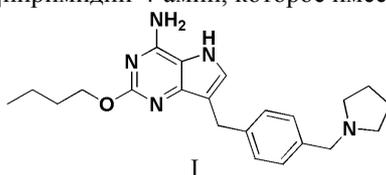
Настоящее изобретение относится к области медицинской химии и, в частности, относится к кристаллической форме А агониста TLR7, представляющего собой (2-бутокси-7-(4-(пирролидин-1-илметил)бензил)-5Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-4-амин), к способу ее получения, кристаллической композиции, содержащей кристаллическую форму А, фармацевтической композиции, содержащей кристаллическую форму А, или кристаллической композиции и их применению.

Предпосылки

Различные клетки иммунной системы экспрессируют Toll-подобный рецептор, который распознает высококонсервативные структурные мотивы: патоген-ассоциированный молекулярный спектр (PAMP), экспрессируемый патогенными микроорганизмами, или ассоциированные с повреждением молекулярные спектры (DAMP), высвобождаемые погибшими клетками. PAMP или DAMP стимулирует Toll-подобный рецептор к запуску сигнального каскада, который индуцирует активацию транскрипционных факторов, таких как AP-1, NF-κB, и регуляторов интерферонов (функция импульсного ответа). Это ведет к различным клеточным ответам, в том числе образованию интерферонов, провоспалительных цитокинов и эффекторных цитокинов, в соответствии с чем возникает иммунный ответ. Определенно, у млекопитающих обнаружены Toll-подобные рецепторы 13 типов. Toll-подобные рецепторы 1, 2, 4, 5 и 6 преимущественно экспрессированы на клеточной поверхности, тогда как Toll-подобные рецепторы 3, 7, 8 и 9 экспрессированы в эндосомах. Различные Toll-подобные рецепторы распознают лиганды, получаемые из различных патогенов. Toll-подобный рецептор 7 (TLR7) преимущественно экспрессируют плазматидные дендритные клетки (pDC), и распознавание его лиганда ведет к индукции секреции интерферона α (IFN-α). Toll-подобный рецептор 7 (TLR7) и Toll-подобный рецептор 8 (TLR8) обладают высокой гомологией, и, следовательно, лиганд TLR7 в большинстве случаев также подходит для TLR8. Стимуляция TLR8 преимущественно индуцирует продуцирование цитокинов, таких как фактор некроза опухоли α (TNF-α) и хемоаттрактант. Интерферон α представляет собой одно из лекарственных средств для лечения хронического гепатита В или гепатита С, тогда как TNF-α представляет собой провоспалительный цитокин, чрезмерная секреция которого ведет к тяжелым побочным эффектам.

Сообщали о нескольких агонистах TLR7, таких как имиквимод (British Journal of Dermatology, 2003; 149 (Suppl. 66): 5-8), резиквимод (Antiviral Research, 64 (2004) 79-83), GS-9620 (Gastroenterology (2013), 144(7), 1508-1517). Тем не менее, желательно иметь новые агонисты TLR7 с более хорошей избирательностью, активностью и безопасностью.

В китайской патентной заявке № 201410405136.0, которая включена в полном объеме по ссылке в настоящее описание, раскрыто одно низкомолекулярное соединение, т.е. 2-бутокси-7-(4-(пирролидин-1-илметил)бензил)-5Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-4-амин, которое имеет следующую структуру:



Краткое изложение

В одном из аспектов предусмотрена кристаллическая форма А соединения формулы I



Кристаллическая форма А отличается спектром рентгеновской порошковой дифракции (XRPD), который имеет дифракционные пики при $2\theta=5,5\pm 0,2^\circ$, $10,1\pm 0,2^\circ$, $13,8\pm 0,2^\circ$, $19,7\pm 0,2^\circ$, $23,7\pm 0,2^\circ$, $24,1\pm 0,2^\circ$.

В другом аспекте предоставлен процесс получения кристаллической формы А соединения формулы I, который включает стадии:

- 1) растворения соединения формулы I в кристаллизационном растворителе, который предпочтительно нагревают для содействия растворению; и
- 2) охлаждения для кристаллизации, фильтрования, промывания и сушки для получения кристаллической формы А.

В другом аспекте предоставлена фармацевтическая композиция, которая содержит кристаллическую форму А или ее кристаллическую композицию в соответствии с изобретением. Фармацевтическая композиция дополнительно необязательно может содержать фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент и/или среду.

В другом аспекте предоставлен способ лечения или предотвращения ассоциированного с Toll-подобным рецептором 7 (TLR7) заболевания, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, кристаллической формы А или ее кристаллической композиции или фармацевтической композиции в

соответствии с изобретением в эффективном количестве. Предпочтительно заболевание представляет собой вирусную инфекцию.

В дополнительном аспекте предоставлено использование кристаллической формы А или ее кристаллической композиции или фармацевтической композиции в соответствии с изобретением для изготовления лекарственного средства для лечения или предотвращения ассоциированного с Toll-подобным рецептором 7 (TLR7) заболевания. Предпочтительно заболевание представляет собой вирусную инфекцию.

В еще одном дополнительном аспекте предусмотрена кристаллическая форма А или ее кристаллическая композиция или фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением для использования в лечении или предотвращении ассоциированного с Toll-подобным рецептором 7 (TLR7) заболевания. Предпочтительно заболевание представляет собой вирусную инфекцию.

В одном из вариантов осуществления изобретения вирусная инфекция представляет собой инфекцию вируса гепатита, в частности, инфекцию вируса гепатита В или гепатита С.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлен XRPD спектр кристаллической формы А соединения формулы I.

На фиг. 2 представлена диаграмма элементарной ячейки кристаллической формы А соединения формулы I.

На фиг. 3 представлен DSC спектр кристаллической формы А соединения формулы I.

Подробное описание

Общие определения и терминология

Если не установлено иное, термины и фразы, используемые в настоящем описании, имеют следующие значения. Конкретный термин или фразу не следует рассматривать в качестве неясных или неопределенных, когда они не определены конкретно. Их следует понимать в соответствии с основным значением. Торговое название, используемое в настоящем описании, относится к соответствующему продукту или активному ингредиенту.

Пока иное не определено конкретно, в настоящем описании долю (в том числе процентную долю) или часть вычисляют на основании массы.

Когда используют с числовыми переменными, термин "около" или "приблизительно" обычно относится к значению переменной и ко всем значениям переменной в пределах ошибки эксперимента (например, в пределах усредненной доверительной области 95%) или в пределах $\pm 10\%$ от точно определенного значения или более широкого диапазона.

Выражение "содержать" или его синонимы "включать", "иметь" или тому подобное является открытым, что не исключает другие не перечисленные элементы, стадии или ингредиенты. Выражение "состоять из" исключает любые не перечисленные элементы, стадии или ингредиенты. Выражение "по существу состоять из" относится к конкретным элементам, стадиям или ингредиентам в заданном диапазоне вместе с необязательными элементами, стадиями или компонентами, которые по существу не оказывают влияния на базовый и новый признак заявленного объекта изобретения. Следует понимать, что выражение "содержать" охватывает выражения "по существу состоять из" и "состоять из".

Термин "необязательный" или "необязательно" обозначает, что событие, следующее за ним, может наступать или не наступать. Этот термин охватывает случаи, когда событие может наступать или не наступать.

Термин "фармацевтическая композиция" относится к активному ингредиенту, который необязательно объединяют с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми компонентами (например, но не ограничиваясь этим, носителем и/или эксципиентом). Активный ингредиент приведен в качестве примера соединения формулы I или его соли, кристаллической формы в соответствии с изобретением или кристаллической композиции в соответствии с изобретением.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к тем носителям, которые не вызывают значимого раздражения и не ослабляют биологическую активность и свойство активного соединения. "Фармацевтически приемлемый носитель" относится к инертному веществу, которое вводят с активным ингредиентом, и которое полезно для его введения, и которое включает, но не ограничиваясь этим, любые из следующих веществ, одобренных в State Food and Drug Administration для использования у человека или животных (например, сельскохозяйственных животных): скользкое средство, подсластитель, разбавитель, консервант, краситель/красящее вещество, ароматизатор, поверхностно-активное средство, смачивающее средство, дисперсант, разрыхлитель, суспендирующее средство, стабилизирующее средство, изотоническое средство, растворитель или эмульгирующее средство. Неограничивающие примеры носителей включают карбонат кальция, фосфат кальция, различные сахара и крахмалы, производные целлюлозы, желатин, растительное масло и полиэтиленгликоль или т.п. Другую информацию о носителях можно найти в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21-е изд., Lippincott, Williams & Wilkins (2005), содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки.

Термин "эксципиент" в целом относится к носителю, разбавителю и/или среде, используемые для того, чтобы формулировать эффективную фармацевтическую композицию.

Термин "введение" или "вводить" или тому подобное относится к способу, который позволяет доставлять соединение или композицию в желаемое место биологического действия. Такие способы включают, но не ограничиваясь этим, оральное, парентеральное (в том числе внутривенные, подкожные, интраперитонеальные, внутримышечные, внутрисосудистые инъекции или инфузии), местное, ректальное введение или т.п.

Что касается фармацевтического или фармакологического активного средства, термин "эффективное количество" относится к количеству лекарства или средства, которое является не токсичным, но достаточным для достижения желаемого эффекта. В отношении орального состава в настоящем описании "эффективное количество" активного вещества в композиции относится к количеству, необходимому для достижения желаемого эффекта в комбинации с другим активным веществом в композиции. Эффективное количество можно определять индивидуально, и оно зависит от возраста и общего состояния реципиента, а также конкретного активного вещества. Эффективное количество в конкретном случае может определять специалист в данной области с помощью стандартного теста.

Термин "активный ингредиент", "терапевтическое средство", "активное вещество" или "активное средство" относится к химической частице, которую можно эффективно использовать для лечения или предотвращения целевого нарушения, заболевания или состояния. Термин в настоящем описании может относиться, например, к соединению формулы I или его соли, кристаллической форме в соответствии с изобретением или кристаллической композиции в соответствии с изобретением.

В спектрах рентгеновской порошковой дифракции (XRPD или XRD) дифракционный спектр, получаемый для кристаллического соединения, в целом характерен для конкретной кристаллической формы, где относительные интенсивности полос (в частности, при малых углах) могут варьировать вместе с эффектом преобладающей ориентации из-за различий в условиях кристаллизации, диаметрах частиц и других условиях измерения. Следовательно, относительные интенсивности дифракционных пиков не являются отличительными для заданной кристаллической формы. Более важно отметить относительные положения пиков, а не их относительные интенсивности при определении, является ли кристаллическая форма такой же, как та, что известна в данной области. Кроме того, могут иметь место небольшие ошибки в положениях пиков для любой заданной кристаллической формы, которые также хорошо известны в области кристаллографии. Например, положение пика может смещаться из-за изменения температуры, движения образца или калибровки прибора во время анализа образца; и ошибка измерения значения 2θ иногда может составлять приблизительно $\pm 0,2^\circ$, обычно приблизительно $\pm 0,1^\circ$. Следовательно, эту ошибку следует учитывать при определении кристаллической структуры. Если кристаллические формы в соответствии с изобретением описаны, по существу, как показано на фиг. 1, термин "по существу" также предназначен для того, чтобы охватывать такие различия в дифракционном пике.

В XRPD спектре положение пика обычно представляют с помощью угла 2θ или расстояния d до поверхности кристалла, и простое преобразование между d и θ представляет собой $d = \lambda / 2 \sin \theta$, где d представляет расстояние до поверхности кристалла, λ представляет длину волны падающего рентгеновского луча и θ представляет собой угол дифракции. Что касается одной и той же кристаллической формы одного и того же соединения, положения пиков XRPD спектра в целом схожи, а ошибка относительной интенсивности может быть большой. Также следует отметить, что при идентификации смеси некоторые дифракционные линии могут быть потеряны из-за таких факторов, как снижение содержания и т.д., и, таким образом, нет необходимости полагаться на все полосы, наблюдаемые в образце высокой чистоты, и даже одна полоса может быть характеристикой для заданного кристалла.

В настоящем изобретении рентгеновский порошковый дифракционный спектр определяют следующим образом:

аппарат: рентгеновский дифрактометр Bruker D8 ADVANCE;

способ: мишень: Cu: K-Alpha;

длина волны $\lambda = 1,54179 \text{ \AA}$;

напряжение: 40 кВ;

ток: 40 мА;

диапазон сканирования: 4-40°;

скорость вращения образца: 15 об/мин;

скорость сканирования: 10°/мин.

Дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC) используют для того, чтобы измерять температуру перехода, когда кристалл поглощает или высвобождает тепло из-за изменений в его кристаллической структуре или плавления кристалла. Ошибка температуры теплового перехода и температуры плавления обычно находится в пределах приблизительно 5°C , обычно приблизительно 3°C для одной и той же кристаллической формы одного и того же соединения при непрерывном анализе. Когда соединение описано как обладающее заданными DSC пиком или температурой плавления, это обозначает DSC пик или температуру плавления $\pm 5^\circ\text{C}$. Предоставлен вспомогательный способ с использованием DSC для того, чтобы идентифицировать различные кристаллические формы. Различные кристаллические формы можно идентифицировать в соответствии с их различными характеристиками температуры пере-

хода. Следует отметить, что DSC пик или температура плавления смеси может варьировать в широком диапазоне. Кроме того, температура плавления связана со скоростью роста температуры из-за разложения во время плавления вещества.

Дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC) в настоящем описании выполняют с помощью следующего способа:

аппарат: дифференциальный сканирующий калориметр TA Q2000;

способ: образец (~1 мг) помещают в алюминиевый лоток для DSC, способ: 25-300°C;

скорость нагрева 10°C/мин.

Кристаллическая форма в соответствии с изобретением также может отличаться параметрами ячейки. Такие параметры можно определять посредством рентгеновского кристаллографического анализа монокристалла. Например, подробную информацию о параметрах ячейки можно найти в 3 главе в Stout & Jensen, X-Ray structure Determination: A Practical Guide, MacMillan Co., New York, N.Y. (1968).

Параметры ячейки в настоящем описании определяют с помощью следующего способа:

дифрактометр: Rigaku MicroMax-007HF;

длина волны: 1,54178 Å;

температура: 296 К.

Термин "кристаллическая композиция" относится к твердой форме, которая содержит кристаллическую форму А в соответствии с изобретением. Количество кристаллической формы А, содержащейся в кристаллической композиции, могут составлять 50% или больше, 80% или больше, 90% или больше или 95% или больше. В дополнение к кристаллической форме в соответствии с изобретением, кристаллическая композиция также может необязательно содержать другую кристаллическую или аморфную форму соединения формулы I или его соли или примеси, отличные от этих веществ. Специалистам в данной области следует понимать, что сумма содержащихся компонентов в кристаллической композиции должна составлять 100%.

Кристаллическая форма А.

Предусмотрена кристаллическая форма А соединения формулы I, которая имеет дифракционные пики при $2\theta = 5,5, 10,1, 13,8, 19,7, 23,7, 24,1 \pm 0,2^\circ$ в спектре рентгеновской порошковой дифракции (XRPD).

В конкретном варианте осуществления кристаллическая форма А имеет дифракционные пики при $2\theta = 5,5, 10,1, 13,8, 16,4, 19,7, 23,7, 24,1, 27,9 \pm 0,2^\circ$ в спектре рентгеновской порошковой дифракции (XRPD).

В более конкретном варианте осуществления, кристаллическая форма А имеет дифракционные пики при $2\theta = 5,5, 10,1, 13,8, 16,4, 17,9, 19,0, 19,7, 20,3, 21,8, 22,1, 23,7, 24,1, 25,5, 27,9, 32,9, 34,0 \pm 0,2^\circ$ в спектре рентгеновской порошковой дифракции (XRPD).

В конкретном варианте осуществления дифракционные пики кристаллической формы А соединения формулы I отличаются следующим образом:

Номер	$2\theta \pm 0,2 (^\circ)$	Относительная интенсивность (%)	Номер	$2\theta \pm 0,2 (^\circ)$	Относительная интенсивность (%)
1	5,5	100,0	12	21,0	4,3
2	10,1	52,4	13	21,8	6,6
3	10,8	4,2	14	22,1	6,4
4	13,8	35,8	15	23,7	37,1
5	14,9	2,7	16	24,1	17,4
6	16,4	12,2	17	25,5	9,9
7	17,9	6,1	18	27,3	4,3
8	18,6	2,6	19	27,9	13,4
9	19,0	8,2	20	28,6	3,1
10	19,7	20,1	21	32,9	5,1
11	20,3	9,2	22	34,0	5,3

В одном из вариантов осуществления рентгеновский порошковый дифракционный спектр кристаллической формы соединения формулы I, по существу, представлен на фиг. 1.

В другом варианте осуществления кристаллическая форма А соединения формулы I имеет следующие параметры ячейки (как показано на фиг. 2):

$a=16,560 (3) \text{ \AA}$,

$b=10,426 (2) \text{ \AA}$,

$c=12,203 (2) \text{ \AA}$,

$\alpha=90^\circ$,

$\beta=98,54(3)^\circ$,

$\gamma=90^\circ$.

Пространственные группы: P21/c

Z=4.

Кристаллическая форма А также может отличаться по DSC при начальной температуре 199,0°C и температуре пика 200,4°C.

В одном из вариантов осуществления DSC спектр кристаллической формы А соединения формулы I представлен на фиг. 3.

Процесс получения.

Также предоставлен процесс получения кристаллической формы А соединения формулы I, который включает преципитацию кристаллической формы А соединения формулы I из растворителя.

В одном из вариантов осуществления процесс включает стадии:

1) растворения соединения формулы I в кристаллизационном растворителе, который предпочтительно нагревают для содействия растворению;

2) охлаждения для кристаллизации, фильтрования, промывания и сушки для получения кристаллической формы А.

На стадии 1) кристаллизационный растворитель выбирают из группы, состоящей из метанола, этанола, пропанола, изопропанола, н-бутанола, изобутанола, третичного бутанола, ацетона, этилацетата, воды и их смешанного растворителя; предпочтителен этанол.

На стадии 1) количество кристаллизационного растворителя, добавляемого на 1 г соединения формулы I, составляет от 2 до 10 мл, предпочтительно от 4 до 8 мл, более предпочтительно от 5 до 7 мл.

На стадии 1) нагревание используют для того, чтобы формировать гомогенную систему соединения формулы I и кристаллизационного растворителя. Температура нагрева может составлять от 40 до 90°C, предпочтительно от 50 до 80°C, более предпочтительно от 70 до 80°C.

Также предоставлена кристаллическая композиция, содержащая кристаллическую форму А соединения формулы I. В одном из вариантов осуществления, на основании массы кристаллической композиции, содержание кристаллической формы А составляет 50% или больше, предпочтительно 80% или больше, более предпочтительно 90% или больше и наиболее предпочтительно 95% или больше. Кристаллическая композиция, в дополнение к кристаллической форме А, также может содержать соединение формулы I или его соль в других кристаллических или аморфных формах или примеси, отличные от этих веществ.

Фармацевтическая композиция и введение.

Предоставлена фармацевтическая композиция, которая содержит кристаллическую форму А соединения формулы I; или ее кристаллическую композицию в эффективном количестве. Кроме того, фармацевтическая композиция также может содержать или не содержать фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент и/или среду.

Соединение в соответствии с изобретением вводят в чистой форме или в форме подходящей фармацевтической композиции, что можно осуществлять через любой приемлемый способ введения средства по схожим использованием. Фармацевтическую композицию в соответствии с изобретением можно получать посредством объединения соединения в соответствии с изобретением или его соли с подходящим фармацевтически приемлемым носителем, например, ее можно формулировать в твердом, полутвердом, жидком или газообразном составе, таком как таблетка, пилюля, капсула, порошок, гранула, мазь, эмульсия, суспензия, раствор, суппозиторий, инъекция, ингаляционное средство, гель, микросфера, аэрозоль или тому подобное.

Фармацевтическую композицию в соответствии с изобретением можно получать с помощью процессов, которые хорошо известны в данной области, таких как стандартное смешивание, растворение, гранулирование, покрывание драже, отмучивание, эмульгирование, лиофилизация или т.п.

Типичные пути введения соединения в соответствии с изобретением или его фармацевтической композиции включают, но не ограничиваясь этим, оральное, ректальное, чресслизистое, энтеральное введение или местное, чрескожное, ингаляционное, парентеральное, сублингвальное, интравагинальное, интраназальное, внутриглазное, интраперитонеальное, внутримышечное, подкожное, внутривенное введение.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция представлена в форме для орального введения. Что касается орального введения, активные соединения можно смешивать с фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами и/или средами, хорошо известными в данной области, чтобы получать фармацевтическую композицию. Носители, эксципиенты и среды можно использовать для того, чтобы получать соединения в соответствии с изобретением в таблетке, пилюле, лепешке, драже, капсуле, жидкости, геле, взвеси, суспензии или тому подобном, которые можно использовать для орального введения пациенту.

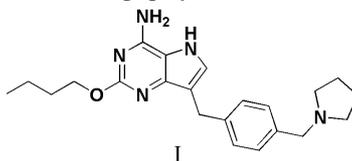
Твердую оральную композицию можно получать с помощью стандартных процессов смешивания, заполнения или прессования, например с помощью следующих процессов: смешивание активного соединения с твердыми эксципиентами, необязательно перемалывание получаемой смеси, добавление других надлежащих адьювантов в случае необходимости и затем переработка смеси в гранулы с тем, чтобы получать сердцевину таблетки или драже. Надлежащие эксципиенты включают, но не ограничиваясь этим, наполнитель, такой как сахар, в том числе лактоза, сахароза, маннит или сорбит; препарат целлюлозы, такой как микрокристаллическая целлюлоза, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал и картофельный крахмал; и другие вещества, такие как силикагель, желатин, трагакант, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза натрия и/или поливинилпирролидон; разрыхлитель, такой как карбоксиметилкрахмал натрия, кроскармеллоза натрия, сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота. Также можно использовать соль, такую как альгинат натрия. Сердцевину драже можно необязательно покрывать с помощью процессов, известных в общей фармацевтической практике, в частности, энтеросолюбильным покрытием.

Положительные эффекты.

Кристаллическая форма А соединения формулы I в соответствии с изобретением имеет преимущества высокой чистоты, высокую кристалличность и хорошую стабильность. Между тем, процесс получения кристаллической формы А в соответствии с изобретением является простым, растворитель является дешевым и легко доступным, условия кристаллической формы являются мягкими, и процесс подходит для промышленного получения.

Технические решения по изобретению проиллюстрированы в соответствии со следующими параграфами с [1] до [20].

[1] Кристаллическая форма А соединения формулы I



которая отличается тем, что она имеет дифракционные пики при $2\theta = 5,5\pm 0,2^\circ$, $10,1\pm 0,2^\circ$, $13,8\pm 0,2^\circ$, $19,7\pm 0,2^\circ$, $23,7\pm 0,2^\circ$, $24,1\pm 0,2^\circ$ на рентгеновской порошковой дифрактограмме.

[2] Кристаллическая форма А соединения формулы I в соответствии с параграфом [1], которая отличается тем, что она имеет дифракционные пики при $2\theta = 5,5\pm 0,2^\circ$, $10,1\pm 0,2^\circ$, $13,8\pm 0,2^\circ$, $16,4\pm 0,2^\circ$, $19,7\pm 0,2^\circ$, $23,7\pm 0,2^\circ$, $24,1\pm 0,2^\circ$, $27,9\pm 0,2^\circ$ на рентгеновской порошковой дифрактограмме.

[3] Кристаллическая форма А соединения формулы I в соответствии с параграфом [2], которая отличается тем, что она имеет дифракционные пики при $2\theta = 5,5\pm 0,2^\circ$, $10,1\pm 0,2^\circ$, $13,8\pm 0,2^\circ$, $16,4\pm 0,2^\circ$, $17,9\pm 0,2^\circ$, $19,0\pm 0,2^\circ$, $19,7\pm 0,2^\circ$, $20,3\pm 0,2^\circ$, $21,8\pm 0,2^\circ$, $22,1\pm 0,2^\circ$, $23,7\pm 0,2^\circ$, $24,1\pm 0,2^\circ$, $25,5\pm 0,2^\circ$, $27,9\pm 0,2^\circ$, $32,9\pm 0,2^\circ$, $34,0\pm 0,2^\circ$ на рентгеновской порошковой дифрактограмме.

[4] Кристаллическая форма А в соответствии с любым одним из параграфов [1]-[3], которая отличается тем, что она имеет рентгеновскую порошковую дифрактограмму, по существу представленную на фиг. 1.

[5] Кристаллическая форма А в соответствии с любым одним из параграфов [1]-[4], которая отличается тем, что она имеет следующие параметры ячейки:

$$a=16,560 (3) \text{ \AA},$$

$$b=10,426 (2) \text{ \AA},$$

$$c=12,203 (2) \text{ \AA},$$

$$\alpha=90^\circ,$$

$$\beta=98,54 (3)^\circ,$$

$$\gamma=90^\circ.$$

Пространственные группы: P21/c

Z=4.

[6] Кристаллическая форма А в соответствии с любым одним из параграфов [1]-[5], которая отличается тем, что, когда её характеризуют по DSC, начальная температура составляет $199,0\pm 5^\circ\text{C}$, и температура пика составляет $200,4\pm 5^\circ\text{C}$.

Способ получения кристаллической формы А в соответствии с любым одним из параграфов [1]-[6], который включает следующие стадии:

1) растворение соединения формулы I в кристаллизационном растворителе, который предпочтительно нагревают для содействия растворению; и

2) охлаждение для кристаллизации, фильтрование, промывание и сушка для получения кристаллической формы А.

[8] Способ получения в соответствии с параграфом [7], который отличается тем, что кристаллизационный растворитель на стадии 1) выбирают из группы, состоящей из метанола, этанола, пропанола,

изопропанола, н-бутанола, изобутанола, третичного бутанола, ацетона, этилацетата, воды и их смешанного растворителя.

[9] Способ получения в соответствии с параграфом [8], который отличается тем, что кристаллизационным растворителем является этанол.

[10] Способ получения в соответствии с любым одним из параграфов [7]-[9], который отличается тем, что на стадии 1) количество кристаллизационного растворителя, добавляемого на 1 г соединения формулы I, составляет от 2 до 10 мл.

[11] Способ получения в соответствии с параграфом [10], который отличается тем, что количество кристаллизационного растворителя, добавляемого на 1 г соединения формулы I, составляет от 4 до 8 мл.

[12] Способ получения в соответствии с параграфом [11], который отличается тем, что количество кристаллизационного растворителя, добавляемого на 1 г соединения формулы I, составляет от 5 до 7 мл.

[13] Способ получения в соответствии с любым одним из параграфов [7]-[12], который отличается тем, что на стадии 1) нагрев используют для того, чтобы формировать гомогенную систему соединения формулы I и кристаллизационного растворителя.

[14] Способ получения в соответствии с любым одним из параграфов [7]-[13], который отличается тем, что на стадии 1) температура нагрева может составлять от 40 до 90°C.

[15] Способ получения в соответствии с параграфом [14], который отличается тем, что на стадии 1) температура нагрева может составлять от 50 до 80°C.

[16] Способе получения в соответствии с параграфом [15], который отличается тем, что на стадии 1) температура нагрева может составлять от 70 до 80°C.

[17] Кристаллическая композиция, которая отличается тем, что, в расчете на массу кристаллической композиции, кристаллическая форма A соединения формулы I в соответствии с любым одним из параграфов [1]-[6] составляет 50% или больше, предпочтительно 80% или больше, более предпочтительно 90% или больше и наиболее предпочтительно 95% или больше.

[18] Фармацевтическая композиция, которая содержит кристаллическую форму A в соответствии с любым одним из параграфов [1]-[6] или кристаллическую композицию в соответствии с параграфом [17] в эффективном количестве.

[19] Применение кристаллической формы A соединения формулы I в соответствии с любым одним из параграфов [1]-[6] или кристаллической композиции в соответствии с параграфом [17] или фармацевтической композиции в соответствии с параграфом [18] для изготовления лекарственного средства для лечения ассоциированного с Toll-подобным рецептором 7 (TLR7) заболевания.

[20] Применение в соответствии с параграфом [19], которое отличается тем, что заболевание представляет собой вирусную инфекцию, в частности, вирусная инфекция представляет собой инфекцию вируса гепатита, например, инфекцию вируса гепатита B или гепатита C.

Примеры

В настоящем описании используют следующие сокращения:

SEM-Cl: 2-(триметилсилил)этоксиметилхлорид;

SEM: 2-(триметилсилил)этоксиметил;

DIPEA: диизопропилэтиламин;

TFA: трифторуксусная кислота;

DMF: N,N-диметилформамид;

n-BuOH: н-бутанол;

NH₃·H₂O: водный аммиак;

Na: натрий;

XRPD: рентгеновская порошковая дифракция;

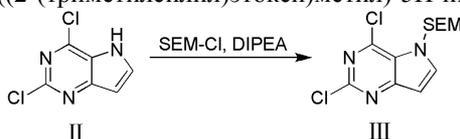
DSC: дифференциальный тепловой анализ.

Растворители, используемые в настоящем описании, коммерчески доступны, и их можно использовать без дополнительной очистки. Реакции синтеза в примерах получения в целом осуществляют в инертной атмосфере азота в безводном растворителе. Данные протонного магнитного резонанса перекодируют на спектрометре Bruker Avance III 400 (400 МГц) с химическим сдвигом, представленным в виде (м.д.) при слабом поле тетраметилсилана. Масс-спектрометрию осуществляют на Agilent 1200 plus 6110 (&1956A). LC/MS или Shimadzu MS включает DAD: SPD-M20A(LC) и детектор Shimadzu Micromass 2020. Масс-спектрометр оборудован ионизацией электрораспылением (ESI), работающей в положительном или отрицательном режиме.

Пример получения 1.

Получение 2-бутокси-7-(4-(пирролидин-1-илметил)бензил)-5Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-4-амина

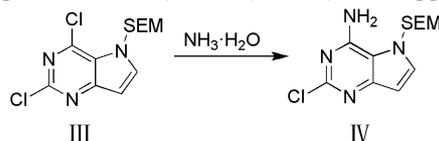
Формула III: 2,4-дихлор-5-((2-(триметилсилил)этоксими)метил)-5Н-пирроло[3,2-d]пиримидин



Соединение формулы II (2,4-дихлор-5Н-пирроло[3,2-d]пиримидин) (4,00 кг, 21,28 моль) растворяли в DMF (20,00 л) и по частям добавляли DIPEA (2,58 кг, 20,00 моль) при комнатной температуре (25°C), после чего следовало перемешивание в течение 30 мин. Реакционную жидкость охлаждали до 0°C с использованием ледяной бани и затем по каплям медленно добавляли SEM-Cl (4,00 кг, 2 4,00 моль) в течение 5 ч при скорости капания от 1 до 2 капель/с. После добавления реакционную жидкость перемешивали при 0°C в течение 4 ч. Мониторинг реакции осуществляли с помощью HPLC. После завершения реакционную жидкость гасили и разводили в 70 л воды и затем экстрагировали этилацетатом (3×15 л). Объединенную органическую фазу промывали последовательно в 1 М водной соляной кислоте (2×5 л) и насыщенном солевом растворе (2×7 л) и растворитель удаляли посредством дистилляции при пониженном давлении для получения соединения формулы III (6,40 кг, 20,11 моль, выход 94,50%).

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 8,24-8,35 (м, 1H), 6,70-6,85 (м, 1H), 5,77 (с, 2H), 3,45-3,57 (м, 2H), 0,74-0,86 (м, 2H), 0,00 (с, 9H).

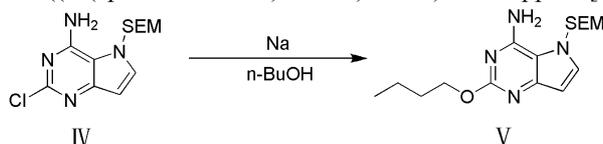
Формула IV: 2-хлор-5-((2-(триметилсилил)этокси)метил)-5Н-пирроло[3,2-d] пиримидин-4-амин



Соединение формулы III (1,60 кг, 5,03 моль) растворяли в изопропанол (1,60 л) в 10 л сосуд. Водный аммиак (4 л) добавляли при комнатной температуре (25°C) одной частью и реакционную смесь перемешивали при 95°C в течение 7 ч. Мониторинг реакции осуществляли с помощью HPLC. После завершения, реакционную жидкость оставляли остывать до комнатной температуры и фильтровали через воронку Бюхнера для получения твердого вещества темно-коричневого цвета. Твердое вещество последовательно разжижали в этилацетате/н-гептане (1/1, 2×5 л) и этилацетате (4 л) для получения соединения формулы IV в виде твердого вещества коричневого цвета (1,25 кг, 4,18 моль, выход 83,1%).

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 7,61-7,77 (м, 1H), 6,97-7,19 (м, 2H), 6,28-6,38 (м, 1H), 5,54-5,67 (м, 2H), 3,43-3,53 (м, 2H), 0,76-0,91 (м, 2H), 0,07 (с, 9H).

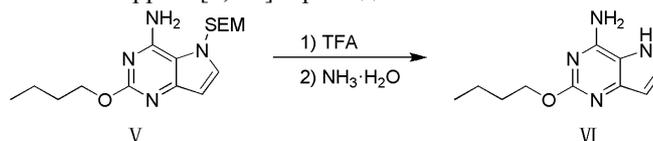
Формула V: 2-бутоксид-5-((2-(триметилсилил)этокси)метил)-5Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-4-амин



В n-BuOH (17,0 л) медленно добавляли металлический натрий (525,05 г, 22,84 моль) по частям под азотом. После добавления температуру системы повышали до 60°C и перемешивание осуществляли непрерывно при этой температуре до полного растворения металлического натрия. Затем систему охлаждали до 25°C и по частям добавляли соединение формулы IV (1,95 кг, 6,53 моль). После гомогенного смешивания при перемешивании, реакционную смесь непрерывно перемешивали в течение 8 ч при 90°C. Мониторинг реакции осуществляли с помощью HPLC. После завершения, реакционную смесь оставляли остывать самопроизвольно до 25°C и медленно выливали в 30 л насыщенного водного хлорида аммония. Затем реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (3×15 л) и объединенную органическую фазу промывали насыщенным соевым раствором (2×20 л), сушили с использованием безводного Na₂SO₄ и фильтровали. После растворитель отгоняли при пониженном давлении, остаток разжижали в н-гептане (4л) и твердое вещество отделяли посредством фильтрования и затем разжижали в этилацетате (5 л) для получения соединения формулы V в виде твердого вещества желто-белого цвета (1,53 кг, 4,55 моль, 69,7%).

В n-BuOH (17,0 л) медленно добавляли металлический натрий (525,05 г, 22,84 моль) по частям под азотом. После добавления температуру системы повышали до 60°C и перемешивание осуществляли непрерывно при этой температуре до полного растворения металлического натрия. Затем систему охлаждали до 25°C и по частям добавляли соединение формулы IV (1,95 кг, 6,53 моль). После гомогенного смешивания при перемешивании реакционную смесь непрерывно перемешивали в течение 8 ч при 90°C. Мониторинг реакции осуществляли с помощью HPLC. После завершения, реакционную смесь оставляли остывать самопроизвольно до 25°C и медленно выливали в 30 л насыщенного водного хлорида аммония. Затем реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (3×15 л) и объединенную органическую фазу промывали насыщенным соевым раствором (2×20 л), сушили с использованием безводного Na₂SO₄ и фильтровали. После растворитель отгоняли при пониженном давлении, остаток разжижали в н-гептане (4 л) и твердое вещество отделяли посредством фильтрования и разжижали в этилацетате (5 л) для получения соединения формулы V в виде твердого вещества желто-белого цвета (1,53 кг, 4,55 моль, 69,7%).

Формула VI: 2-бутокси-5Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-4-амин



Соединение формулы V (1,10 кг, 3,27 моль) растворяли в TFA (5,50 л) и реакционную жидкость перемешивали при 25°C в течение 16 ч. Мониторинг реакции осуществляли с помощью HPLC. После завершения, TFA удаляли посредством дистилляции при пониженном давлении и остаток растворяли в метаноле (1,2 л) и воде со льдом (1,2 л). pH системы корректировали до 12 концентрированным водным аммиаком при равномерном перемешивании. Смесь перемешивали в течение 2 ч и осадок непрерывно осаждали из раствора. После фильтрования фильтровальный осадок в виде твердого вещества белого цвета разжижали 15% водным аммиаком (3×1,2 л) и этилацетатом (4 л) последовательно для получения соединения формулы VI в виде твердого вещества белого цвета (550,00 г, 2,67 моль, 81,7%).

¹H ЯМР (400 МГц, метанол-d₄) δ 7,37 (д, J=2,89 Гц, 1H), 6,29 (д, J=3,01 Гц, 1H), 4,27 (т, J=6,53 Гц, 2H), 1,75 (д, J=7,91 Гц, 2H), 1,44-1,61 (м, 2H), 1,00 (т, J=7,40 Гц, 3H).

Формула VII: 4-((4-амино-2-бутокси-5Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-7-ил)гидрокси)метил)-бензальдегид

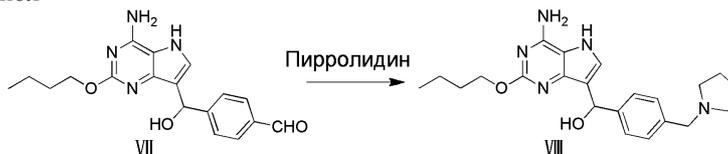


В трехгорлую колбу добавляли терефталевый альдегид (790,64 мг, 5,82 ммоль) и изопропанол (10 мл), 2-бутокси-5Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-4-амин (1,00 г, 4,85 ммоль) добавляли при перемешивании и систему охлаждали до 0°C и перемешивали в течение еще 10 мин. Добавляли очищенную воду (10 мл) и карбонат калия

(804,17 мг, 5,82 ммоль) и проводили реакцию при 25°C в течение 16 ч до исчерпания сырьевых материалов при мониторинге с помощью LCMS. Твердое вещество осаждали после завершения реакции. После фильтрования получаемое твердое вещество последовательно разжижали в 20 мл очищенной воды и 30 мл (этилацетата/н-гептана=1/20), фильтровали и сушили для получения соединения формулы VII в виде твердого вещества желтого цвета (1,50 г, 4,41 ммоль, выход: 90,9%).

¹H ЯМР (400 МГц, метанол-d₄) δ 9,94 (с, 1H), 7,86 (д, J=8,16 Гц, 2H), 7,72 (д, J=8,16 Гц, 2H), 7,12-7,17 (м, 1H), 6,19 (с, 1H), 4,28 (т, J=6,53 Гц, 2H), 1,68-1,77 (м, 2H), 1,44-1,54 (м, 2H), 0,97 (т, J=7,34 Гц, 3H).

Формула VIII: (4-амино-2-бутокси-5Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-7-ил)(4-(пирролидин-1-илметил)фенил)метанол

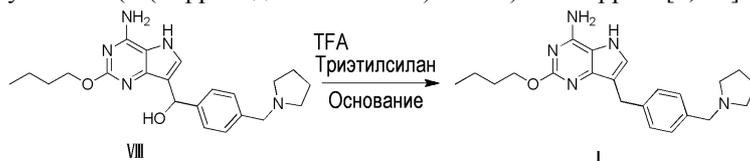


В 30 л сосуд добавляли соединение формулы VII (450,0 г, 1,32 моль) и изопропанол (4,5 л) и перемешивали смесь в течение 5 мин. Затем добавляли ледяную уксусную кислоту (119,0 г, 1,98 моль) и температуру системы снижали до 0-10°C при перемешивании.

Пирролидин (112,4 г, 1,58 моль) добавляли по каплям при температуре ниже 10°C. После добавления по частям добавляли триацетоксиборогидрид натрия (420,0 г, 1,98 моль) и проводили реакцию при 10-20°C в течение 3 ч до исчерпания сырья при мониторинге посредством жидкостной хроматографии. После завершения реакции добавляли 5 л очищенной воды и температуру раствора снижали приблизительно до -10°C и в раствор добавляли 12 л 15% водного аммиака при температуре раствора ниже 0°C во время добавления. Твердое вещество осаждали при перемешивании. Осуществляли фильтрование и получаемый фильтровальный осадок разжижали в 2 л воды и 2 л ×2 этилацетата. Осуществляли фильтрование и сушку проводили при пониженном давлении при 40°C в течение 12 ч для получения соединения формулы VIII в виде твердого вещества желтого цвета (465,0 г, 1,18 моль, выход: 89,4%, влага: 0,9%).

¹H ЯМР (400 МГц, метанол-d₄) δ 7,46 (д, J=7,91 Гц, 1H), 7,29 (д, J=8,03 Гц, 1H), 7,09 (с, 1H), 6,12 (с, 1H), 4,29 (т, J=6,53 Гц, 2H), 3,60 (с, 2H), 2,52 (ушир. с, 4H), 1,66-1,83 (м, 6H), 1,49 (д, J=7,53 Гц, 2H), 0,98 (т, J=7,40 Гц, 3H).

Формула I: 2-бутокси-7-(4-(пирролидин-1-илметил)бензил)-5Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-4-амин



В 20 л сосуд добавляли соединение формулы VIII (440,0 г, 1,11 моль) и дихлорметан (7,0 л) и снижали температуру системы ниже -15°C при перемешивании. После по каплям добавляли триэтилсилан (880 мл, 5,55 моль), по каплям добавляли трифторуксусную кислоту (880 мл), поддерживая температуру ниже -10°C во время добавления. После добавления реакцию осуществляли при 0°C в течение 2 ч и осуществляли мониторинг посредством жидкостной хроматографии до исчезновения точки сырья. После завершения реакции, реакционную жидкость концентрировали досуха и в раствор добавляли 2,2 л этилацетата. Перемешивание осуществляли для снижения температуры ниже 0°C . Затем насыщенный карбонат натрия раствор добавляли для того, чтобы корректировать pH раствора до 9-10, во время чего температуру системы поддерживали ниже 10°C . Осуществляли фильтрацию и получаемый фильтровальный осадок разжижали с использованием 2,2 л воды. Осуществляли фильтрацию и проводили сушку при пониженном давлении для получения 550 г трифторацетата соединения формулы I в виде твердого вещества белого цвета.

К 1,6 л этанола добавляли 525 г трифторацетата соединения формулы I в виде твердого вещества белого цвета и температуру системы снижали приблизительно до 0°C при перемешивании. Затем добавляли 2,2 л раствора гидроксида натрия 1 моль/л. Осуществляли фильтрацию и получаемый фильтровальный осадок разжижали с использованием 2,5 л очищенной воды. Осуществляли фильтрацию и проводили сушку при пониженном давлении для получения 380,0 г соединения формулы I в виде твердого вещества.

^1H ЯМР (400 МГц, метанол- d_4) δ 7,27 (д, $J=8,0$ Гц, 2H), 7,22 (д, $J=8,0$ Гц, 2H), 7,04 (с, 1H), 4,32 (т, $J=6,6$ Гц, 2H), 3,99 (с, 2H), 3,60 (с, 2H), 2,55-2,52 (м, 4H), 1,85-1,71 (м, 6H), 1,55-1,48 (м, 2H), 1,00 (т, $J=7,4$ Гц, 3H).

Пример 1. Получение кристаллической формы С малеата 2-бутокси-7-(4-(пирролидин-1-илметил)бензил)-5Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-4-амина.

В этанол (2,3 л) добавляли соединение формулы I (380 г), полученное в примере получения 1, и смесь нагревали с обратным холодильником и перемешивали до полного растворения. После фильтрации фильтрат охлаждали до комнатной температуры и оставляли стоять для кристаллизации. Осуществляли фильтрацию и полученный фильтровальный осадок сушили при пониженном давлении для получения 310,0 г твердого вещества, т. е. кристаллической формы А соединения формулы I.

XRPD измеряли следующим образом:

аппарат: рентгеновский дифрактометр Bruker D8 ADVANCE;

способ: мишень: Cu: K-Alpha;

длина волны $\lambda=1,54179 \text{ \AA}$;

напряжение: 40 кВ;

ток: 40 мА;

диапазон сканирования: $4-40^{\circ}$;

скорость вращения образца: 15 об/мин;

скорость сканирования: $10^{\circ}/\text{мин}$.

Получаемый кристалл соединения имел дифракционные пики, по существу как показано на фиг. 1.

Пример 2. Тест на высокотемпературную стабильность.

Кристаллическую форму А соединения формулы I тестировали в ускоренном тесте в условиях высоких температур на стабильность в соответствии с Guidelines for the Stability Test of Pharmaceutical Ingredients and Pharmaceutical Preparations (Китайская фармакопея 2 010, приложение XIXC).

Кристаллическую форму А, полученную в примере 1, помещали в открытый чистый контейнер при 60°C . Образцы брали для теста в сутки 10, сутки 20 и сутки 30 соответственно. Результаты сравнивали с результатом начального теста в сутки 0, и результаты приведены в табл. 1.

Таблица 1

Время получения образца (сутки)	Внешний вид	Содержание (%)	Общее содержание примесей (%)
0	Порошок белого цвета	99,8	0,92
10	Порошок светло-желтого цвета	98,5	1,10
20	Порошок светло-желтого цвета	98,1	1,18
30	Порошок светло-желтого цвета	98,8	1,29

В тесте на высокотемпературную стабильность показано, что кристаллическая форма А соединения формулы I имеет хорошую стабильность в условиях высоких температур.

Пример 3. Тест на стабильность при высокой влажности.

Кристаллическую форму А соединения формулы I тестировали в ускоренном тесте в условиях высокой влажности на стабильность в соответствии с Guidelines for the Stability Test of Pharmaceutical Ingredients and Pharmaceutical Preparations (Китайская фармакопея 2010, приложение XIXC).

Кристаллическую форму А, полученную в примере 1, подвергали ускоренному тесту в сосуде с постоянной температурой и влажностью в условиях 40°C/75% влажность (открыт). Образцы брали для теста в сутки 30, сутки 60 и сутки 90 соответственно. Результаты сравнивали с результатами начальных тестов в сутки 0, и результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2

Условия теста	Время получения образца (сутки)	Внешний вид	Содержание (%)	Общее содержание примесей (%)
40°C/75% влажность (открыт)	0	Порошок белого цвета	100,2	0,92
	30	Порошок белого цвета	99,9	0,92
	60	Порошок белого цвета	99,9	0,65
	90	Порошок белого цвета	100,2	0,93

В тесте на стабильность при высокой влажности показано, что кристаллическая форма А соединения формулы I имеет хорошую стабильность в условиях высокой влажности.

Примеры фармацевтической активности

Пример эффекта 1. Скрининг активности связывания рецептора *in vitro* для Toll-подобного рецептора 7 и Toll-подобного рецептора 8.

Реактивы:

Клетки HEK-blue hTLR7 и клетки HEK-blue hTLR8 (доступны в InvivoGen).

Среда DMEM.

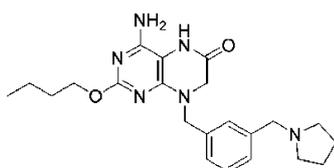
Инактивированная теплом эмбриональная телячья сыворотка.

Реактив Normosin™ против Mycoplasma.

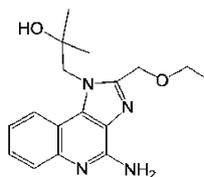
Блеомицин.

Бластцидин.

Структуру GS-9620 и R848 использовали следующим образом, где получение GS-9620 можно найти в процессе, раскрытом в US20100143301; R848 коммерчески доступен в ABGENT (IMG-2208, описание: 0,5 мг).



GS9620



R848/Резиквимод

Схема:

1. Получение 96-луночного планшета с соединениями.

Получали градиент разведений соединений в DMSO 3-кратно с использованием станции для работы с жидкостями POD, начиная с концентрации 10 ммоль/л и разводили 10 точек (со 2-й колонки до 11-й колонки и каждую точку дублировали). В 12-ю колонку добавляли 1 мкл 5 мг/мл положительного соединения R848 в качестве положительного контроля и в 1-ю колонку добавляли 1 мкл DMSO в качестве отрицательного контроля. Каждая лунка содержала 1 мкл DMSO.

2. Клетки в культуральной колбе собирали и плотность клеток разводили до 250000 клеток/мл.

3. 200 мкл (50000 клеток/лунка) клеточной суспензии добавляли в полученный планшет с соединениями и конечная концентрация DMSO в каждой лунке составляла 0,5%.

4. Культуральные планшеты, содержащие клетки и соединения, инкубировали в CO₂ инкубаторе в течение 24 ч при 37°C, 5% CO₂.

5. После 24 ч инкубации 20 мкл супернатанта удаляли из каждой лунки в 96-луночных прозрачный аналитический планшет. В каждую лунку аналитического планшета добавляли 180 мкл реактива Quanti-Blue и планшет инкубировали в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ в течение 1 ч.

6. После 1 ч содержание щелочной фосфатазы в 20 мкл супернатанта определяли с использованием Microplate Reader OD650.

7. EC₅₀ каждого соединения получали с использованием программного обеспечения Prism.

Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Название соединения	TLR7 EC ₅₀ (нМ)	TLR8 EC ₅₀ (нМ)
GS-9620	517	7867
Соединение формулы I	160	11632

Соединение формулы I в соответствии с изобретением демонстрировало более высокую активность связывания рецептора *in vitro* для Toll-подобного рецептора 7, чем контроль (агонист GS-9620 Toll-подобного рецептора 7) и более низкую активность связывания рецептора *in vitro* для Toll-подобного рецептора 8, чем контроль (агонист GS-9620 Toll-подобного рецептора 7).

Соединение по настоящему изобретению обладает выраженными различиями в избирательности в отношении различных рецепторов, и эффект превосходит известный уровень техники.

Пример эффекта 2. Схема теста с мононуклеарными клетками периферической крови.

Цель этого примера состоит в том, чтобы определять уровень экспрессии цитокинов через 24 ч после стимуляции мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека соединением формулы I.

Клеточный супернатант анализировали без разведения, и уровни IFN-α определяли непосредственно. Соединение формулы I сначала формулировали в 20 мМ стоковом растворе в DMSO в течение теста и получали градиент разведений клеточной средой 10-кратно при общем числе в 11 точек разведения. Соединения в 9 точках разведения (наивысшая концентрация составляла 200 мкмоль/л) добавляли в 96-луночный планшет по 50 мкл в каждую лунку. Свежие мононуклеарные клетки периферической крови человека инокулировали в каждую лунку по 150 мкл, которые содержали 450000 клеток. Планшет с клеточными культурами инкубировали в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ в течение 24 ч. После инкубации культуральный планшет центрифугировали на 1200 об/мин в течение 5 мин и супернатант собирали и хранили при -20°C для определения. Определение цитокина осуществляли с использованием Cytometric Bead Array (CBA) из BD-Pharmingen на проточном цитометре. Используя вышеуказанный способ определения, наименьшую концентрацию лекарственного средства, которая стимулирует образование 30 пг/мл IFN-α, обозначали как значение MEC в тесте стимуляции цитокинов. Результаты представлены в табл. 4.

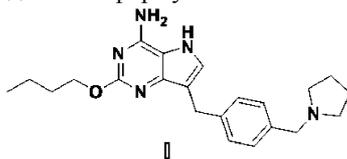
Таблица 4

Название соединения	IFN-α MEC (нМ)	TNF-α MEC (нМ)
GS-9620	50	500
Соединение формулы I	5	500

По сравнению с контролем (GS-9620) соединение формулы I по изобретению демонстрировало более хорошую активность индуцирования IFN-α *in vitro* в PBMC и сравнимую активность индуцирования TNF-α.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Кристаллическая форма А соединения формулы I



где кристаллическая форма А имеет дифракционные пики при $2\theta = 5,5\pm 0,2^\circ, 10,1\pm 0,2^\circ, 13,8\pm 0,2^\circ, 19,7\pm 0,2^\circ, 23,7\pm 0,2^\circ, 24,1\pm 0,2^\circ$ на рентгеновской порошковой дифрактограмме.

2. Кристаллическая форма А соединения формулы I по п.1, где кристаллическая форма А имеет дифракционные пики при $2\theta = 5,5\pm 0,2^\circ, 10,1\pm 0,2^\circ, 13,8\pm 0,2^\circ, 16,4\pm 0,2^\circ, 19,7\pm 0,2^\circ, 23,7\pm 0,2^\circ, 24,1\pm 0,2^\circ, 27,9\pm 0,2^\circ$ на рентгеновской порошковой дифрактограмме.

3. Кристаллическая форма А соединения формулы I по п.1, где кристаллическая форма А имеет дифракционные пики при $2\theta = 5,5\pm 0,2^\circ, 10,1\pm 0,2^\circ, 13,8\pm 0,2^\circ, 16,4\pm 0,2^\circ, 17,9\pm 0,2^\circ, 19,0\pm 0,2^\circ, 19,7\pm 0,2^\circ, 20,3\pm 0,2^\circ, 21,8\pm 0,2^\circ, 22,1\pm 0,2^\circ, 23,7\pm 0,2^\circ, 24,1\pm 0,2^\circ, 25,5\pm 0,2^\circ, 27,9\pm 0,2^\circ, 32,9\pm 0,2^\circ, 34,0\pm 0,2^\circ$ на рентгеновской порошковой дифрактограмме.

4. Кристаллическая форма А соединения формулы I по любому из пп.1-3, где кристаллическая форма А характеризуется рентгеновской порошковой дифрактограммой по существу такой, как показано на фиг. 1.

5. Кристаллическая форма А соединения формулы I по любому из пп.1-4, где кристаллическая форма А имеет следующие параметры ячейки:

$$a=16,560 (3) \text{ \AA},$$

$$b=10,426 (2) \text{ \AA},$$

$$c=12,203 (2) \text{ \AA},$$

$$\alpha=90^\circ,$$

$$\beta=98,54 (3)^\circ,$$

$$\gamma=90^\circ.$$

Пространственные группы: P21/c

$$Z=4.$$

6. Кристаллическая форма А соединения формулы I по любому из пп.1-5, где кристаллическая форма А охарактеризована по DSC начальной температурой, которая составляет $199,0\pm 5^\circ\text{C}$, и температурой пика, которая составляет $200,4\pm 5^\circ\text{C}$.

7. Способ получения кристаллической формы А соединения формулы I по любому одному из пп.1-6, который включает стадии:

1) растворения соединения формулы I в кристаллизационном растворителе, который нагревают для содействия растворению; и

2) охлаждения для кристаллизации, фильтрования, промывание и сушки для получения кристаллической формы А,

где кристаллизационный растворитель на стадии 1) представляет собой этанол.

8. Способ получения по п.7, где на стадии 1) количество кристаллизационного растворителя, добавляемого на 1 г соединения формулы I, составляет от 2 до 10 мл.

9. Способ получения по п.8, где на стадии 1) количество кристаллизационного растворителя, добавляемого на 1 г соединения формулы I, составляет от 4 до 10 мл.

10. Способ получения по п.9, где на стадии 1) количество кристаллизационного растворителя, добавляемого на 1 г соединения формулы I, составляет от 5 до 7 мл.

11. Способ получения по любому из пп.7-10, в котором на стадии 1) температура нагрева составляет от 40 до 90°C .

12. Способ получения по п.11, в котором на стадии 1) температура нагрева составляет от 50 до 80°C .

13. Способ получения по п.12, в котором на стадии 1) температура нагрева составляет от 70 до 80°C .

14. Кристаллическая композиция, в которой содержание кристаллической формы А соединения формулы I по любому из пп.1-6 составляет 50% или больше в расчёте на массу кристаллической композиции.

15. Кристаллическая композиция по п.14, в которой содержание кристаллической формы А соединения формулы I по любому из пп.1-6 составляет 80% или больше в расчёте на массу кристаллической композиции.

16. Кристаллическая композиция по п.15, в которой содержание кристаллической формы А соединения формулы I по любому из пп.1-6 составляет 90% или больше в расчёте на массу кристаллической композиции.

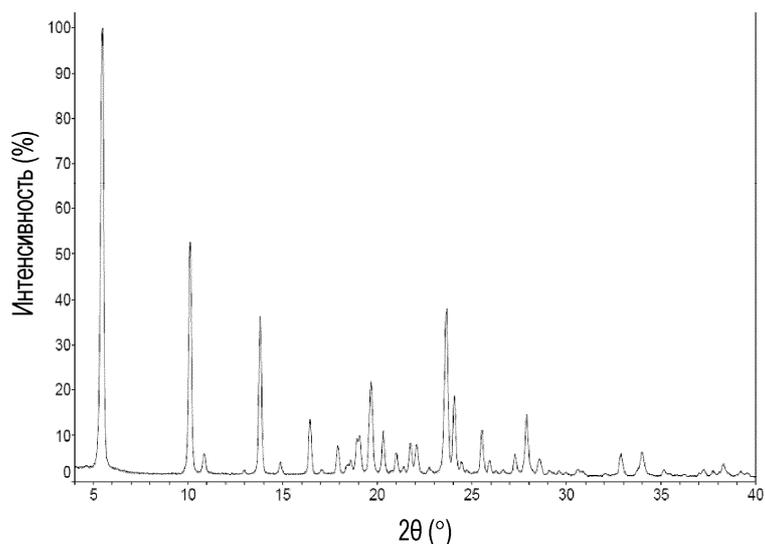
17. Кристаллическая композиция по п.16, в которой содержание кристаллической формы А соединения формулы I по любому из пп.1-6 составляет 95% или больше в расчёте на массу кристаллической композиции.

18. Фармацевтическая композиция, которая содержит кристаллическую форму А соединения формулы I по любому одному из пп.1-6, или кристаллическую композицию по любому из пп.14-17, или их сочетание в эффективном количестве.

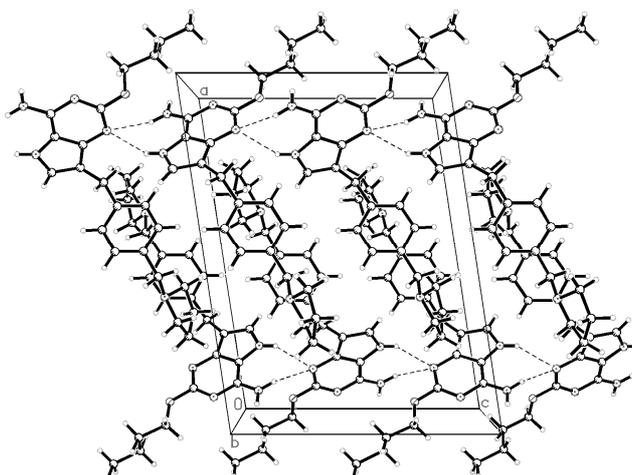
19. Применение кристаллической формы А соединения формулы I по любому одному из пп.1-6, или кристаллической композиции по любому одному из пп.14-17, или фармацевтической композиции по п.18 для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания, ассоциированного с Toll-подобным рецептором 7.

20. Применение по п.19, где заболевание представляет собой вирусную инфекцию.

21. Применение по п.20, где вирусная инфекция представляет собой инфекцию вируса гепатита В или гепатита С.

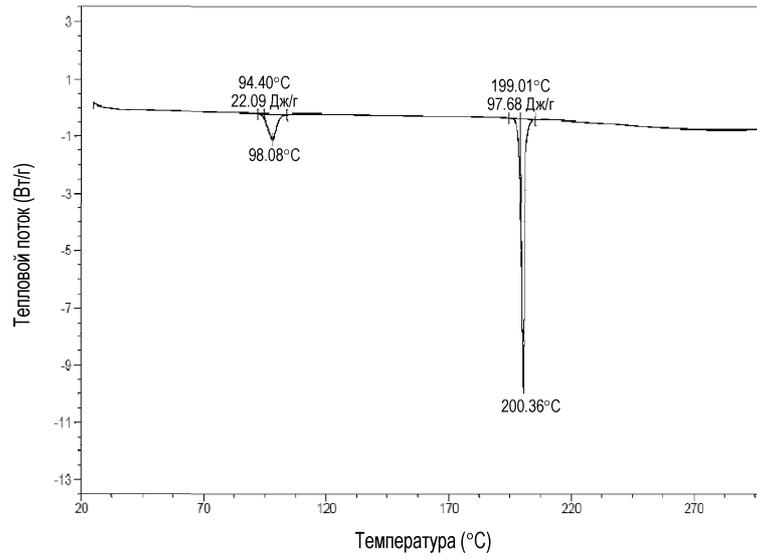


Фиг. 1



Фиг. 2

035951



Фиг. 3



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2