(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 982 663**

(51) Int. Cl.:

C07D 417/12 (2006.01)
C07D 277/54 (2006.01)
A61K 31/426 (2006.01)
A61P 31/22 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2019 PCT/CN2019/094824**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2020 WO20007355**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2019 E 19831293 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2024 EP 3819297**

(54) Título: **Formas cristalinas de un compuesto de tiazol y aplicación del mismo**

(30) Prioridad:

06.07.2018 CN 201810738963

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.10.2024

(73) Titular/es:

PHAENO THERAPEUTICS CO., LTD. (100.0%)
Room 1-404
No. 291 Fucheng Road, Xiasha Street
Economic and Technical District Hangzhou
Zhejiang 310018, CN

(72) Inventor/es:

SHI, WEIHUA;
JIANG, ZHIGAN y
HE, HAIYING

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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 de un compuesto de tiazol y aplicación del mismo

Esta solicitud reivindica la prioridad de: documento CN201810738963.X, presentado el 6 de julio de 2018.

Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a una forma cristalina A de un compuesto de fórmula (I), un compuesto de fórmula (II) y una forma cristalina B del mismo, y al uso de la forma cristalina A de un compuesto de fórmula (I), el compuesto de fórmula (II) y la forma cristalina B del mismo en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el virus del herpes simple.

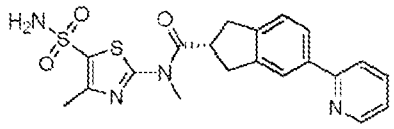
Antecedentes de la invención

Existe una gran demanda de nuevos métodos de tratamiento en el tratamiento de enfermedades víricas. Aunque se ha realizado un gran progreso en el desarrollo de métodos de tratamiento para diversas infecciones bacterianas, hay pocos métodos viables para el tratamiento de virus. La zidovudina es la principal especie que se ha aprobado para el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana. El ganciclovir, el aciclovir y el foscarnet se usan actualmente para tratar infecciones por virus del herpes. Sin embargo, estos métodos de tratamiento tienen efectos secundarios considerables porque dañan la replicación del ADN de las células huésped o solo tienen un efecto sobre un número limitado de infecciones víricas. Además, se sabe que los virus pueden desarrollar resistencia al tratamiento, haciendo que el efecto del tratamiento disminuya cada vez más.

La herpesviridae es una familia de virus de ADN, que incluye virus del herpes simple-1 (VHS-1), virus del herpes simple-2 (VHS-2), citomegalovirus (CMV), virus de la varicela zóster (VVZ), virus de Epstein-Barr, virus del herpes humano-6 (VHH6), virus del herpes humano-7 (VHH7), virus del herpes humano-8 (VHH8), virus de la pseudorrabia y virus de la rinotraqueitis, etc.

Sumario de la invención

La presente divulgación proporciona el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (I) que tiene picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ: 10,81 ± 0,2°, 15,97 ± 0,2° y 21,69 ± 0,2°.



(I)

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina A descrita anteriormente tiene picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ: 10,81 ± 0,2°, 13,03 ± 0,2°, 15,97 ± 0,2°, 18,48 ± 0,2°, 21,69 ± 0,2°, 23,78 ± 0,2°, 25,14 ± 0,2° y 26,96 ± 0,2°.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina A descrita anteriormente tiene picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ: 6,581°, 10,807°, 13,031°, 15,301°, 15,637°, 15,971°, 17,253°, 18,160°, 18,475°, 20,076°, 20,644°, 21,688°, 22,381°, 23,782°, 25,141°, 26,167°, 26,959°, 29,108°, 31,492°, 31,904°, 32,061°, 33,385° y 36,623°.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de XRPD de la forma cristalina A descrita anteriormente se muestra en la figura 1.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, los datos analíticos del patrón de XRPD de la forma cristalina A descrita anteriormente se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Datos analíticos del patrón de XRPD de la forma cristalina A

n.º	Ángulo de difracción 2θ (°)	Intensidad relativa (%)	n.º	Ángulo de difracción 2θ (°)	Intensidad relativa (%)
1	6,581	15,2	13	22,381	29,7
2	10,807	42,3	14	23,782	60,1
3	13,031	17,7	15	25,141	44,3
4	15,301	54,1	16	26,167	21,4

5	15,637	97,9	17	26,959	42,4
6	15,971	100,0	18	29,108	12,9
7	17,253	16,3	19	31,492	14,8
8	18,160	44,0	20	31,904	7,5
9	18,475	47,9	21	32,061	7,1
10	20,076	31,0	22	33,385	11,5
11	20,644	24,6	23	36,623	7,4
12	21,688	86,5			

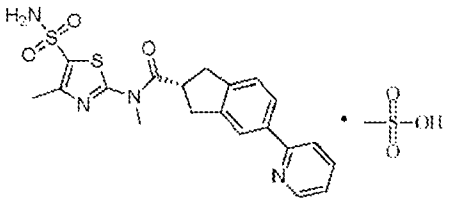
En algunas realizaciones de la presente divulgación, la curva de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la forma cristalina A descrita anteriormente tiene un punto de partida del pico endotérmico a 216,04 ± 3 °C.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, la curva de DSC de la forma cristalina A descrita anteriormente se muestra en la figura 2.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, la curva de análisis termogravimétrico (TGA) de la forma cristalina A descrita anteriormente tiene una pérdida de peso de hasta el 0,4442 % a 120 ± 3 °C y hasta el 2,4492 % a 204 ± 3 °C.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, la curva de TGA de la forma cristalina A descrita anteriormente se muestra en la figura 3.

La presente divulgación también proporciona un compuesto de fórmula (II),



(II)

La presente divulgación también proporciona el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II) que tiene picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ: 10,17 ± 0,2°, 11,85 ± 0,2° y 15,94 ± 0,2°.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina B descrita anteriormente tiene picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ: 8,46 ± 0,2°, 10,17 ± 0,2°, 11,85 ± 2°, 13,98 ± 0,2°, 15,94 ± 0,2°, 20,39 ± 0,2°, 21,32 ± 0,2° y 23,78 ± 0,2°.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina B descrita anteriormente tiene picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ: 8,460°, 10,174°, 11,535°, 11,850 °, 13,982°, 15,935°, 19,110°, 19,464°, 19,939°, 20,391°, 21,888°, 23,309°, 23,780°, 24,517°, 24,929°, 26,034°, 26,367°, 26,959°, 27,352°, 28,772°, 30,626°, 31,297°, 32,067°, 33,845° y 38,235°.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de XRPD de la forma cristalina B descrita anteriormente se muestra en la figura 4.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, los datos analíticos del patrón de XRPD de la forma cristalina B descrita anteriormente se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Datos analíticos del patrón de XRPD de la forma cristalina B

n.º	Ángulo de difracción 2θ (°)	Intensidad relativa (%)	n.º	Ángulo de difracción 2θ (°)	Intensidad relativa (%)
1	8,460	23,1	14	23,780	100,0
2	10,174	62,4	15	24,517	10,4
3	11,535	13,0	16	24,929	22,0
4	11,850	63,1	17	26,034	10,8
5	13,982	51,7	18	26,367	10,2
6	15,935	91,8	19	26,959	22,3
7	19,110	13,9	20	27,352	16,4
8	19,464	32,8	21	28,772	11,3
9	19,939	34,5	22	30,626	25,0
10	20,391	44,2	23	31,297	12,3
11	21,319	57,5	24	32,067	21,6
12	21,888	22,3	25	33,845	13,5
13	23,309	68,8	26	38,235	12,0

En algunas realizaciones de la presente divulgación, la curva de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la forma cristalina B descrita anteriormente tiene un punto de partida del pico endotérmico a 185,89 ± 3 °C.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, la curva de DSC de la forma cristalina B descrita anteriormente se muestra en la figura 5.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, la curva de análisis termogravimétrico (TGA) de la forma cristalina B descrita anteriormente tiene una pérdida de peso de hasta el 0,7160 % a 187,16 ± 3 °C

En algunas realizaciones de la presente divulgación, la curva de TGA de la forma cristalina B descrita anteriormente se muestra en la figura 6.

La presente divulgación también proporciona un uso de la forma cristalina A descrita anteriormente en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el virus del herpes simple.

La presente divulgación también proporciona un uso del compuesto de fórmula (II) y la forma cristalina B del mismo descritos anteriormente en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el virus del herpes simple.

Efectos técnicos

Como nuevo compuesto de tiazol, el compuesto de la presente divulgación tiene buena actividad antivírica contra el virus del herpes simple (VHS); y muestra una menor exposición en plasma y una mejor seguridad a la misma dosis eficaz en el estudio farmacocinético *in vivo*. La forma cristalina A del compuesto de fórmula (I) y la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II) divulgadas en el presente documento son estables, están menos afectadas por la luz, el calor y la humedad, y tienen buena eficacia para la administración *in vivo*, teniendo de ese modo una amplia perspectiva de capacidad de fármaco.

Definición y descripción

A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos y frases usados en la presente memoria pretenden tener los siguientes significados. Una frase o término específico no debe considerarse incierto o poco claro sin una definición específica, sino que debe entenderse en el sentido ordinario. Cuando aparece un nombre comercial en el presente documento, se pretende que se refiera al producto correspondiente o al principio activo del mismo.

Los compuestos intermedios de la presente divulgación pueden prepararse mediante una variedad de métodos de síntesis bien conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo las realizaciones específicas enumeradas a continuación, las realizaciones formadas combinándolos con otros métodos de síntesis química y los métodos alternativos equivalentes bien conocidos por los expertos en la técnica. Las realizaciones preferidas incluyen, pero no se limitan a, los ejemplos de la presente divulgación.

Las reacciones químicas en las realizaciones específicas divulgadas en el presente documento se completan en un disolvente adecuado, que debe ser adecuado para los cambios químicos de la presente divulgación y los reactivos y materiales requeridos. Para obtener el compuesto de la presente divulgación, a veces es necesario que los expertos en la técnica modifiquen o seleccionen etapas de síntesis o esquemas de reacción basándose en las realizaciones existentes.

La presente divulgación se describirá en detalle a continuación a través de ejemplos, que no pretenden limitar la presente divulgación.

Todos los disolventes usados en la presente divulgación están disponibles comercialmente y pueden usarse sin purificación adicional.

Todos los disolventes usados en la presente divulgación están disponibles comercialmente. La presente divulgación usa las siguientes abreviaturas: EtOH representa etanol; MeOH representa metanol; TFA representa ácido trifluoroacético; TsOH representa ácido p-toluenosulfónico; p.f. representa punto de fusión; $EtSO_3H$ representa ácido etanosulfónico; $MeSO_3H$ representa ácido metanosulfónico; THF representa tetrahidrofurano; EtOAc representa acetato de etilo; NBS representa N-bromosuccinimida; AIBN representa azobisisobutironitrilo; DMSO representa dimetilsulfóxido; DMF representa N,N-dimetilformamida; EDCI representa carbodiimida; y HOBt representa 1-hidroxibenzotriazol.

Método de difracción de rayos X en polvo (XRPD) usado en la presente divulgación

Modelo de instrumento: difractómetro de rayos X Bruker D8 advance

Método de prueba: Se usaron de aproximadamente 10 a 20 mg de muestra para el análisis de XRPD.

Los parámetros de XRPD detallados fueron los siguientes:

Tubo de luz: Cu, kα, (λ=1,54056 Å).

Voltaje del tubo de luz: 40 kV, corriente del tubo de luz: 40 mA

Ranura de divergencia: 0,60 mm

Rendija de detector: 10,50 mm

Rendija anti-dispersión: 7,10 mm

Intervalo de exploración: 4-40 grados

Tamaño de etapa: 0,02 grados

Longitud de etapa: 0,12 segundos

Velocidad de rotación del disco de muestra: 15 rpm

Método de calorimetría diferencial de barrido (DSC) usado en la presente divulgación

Modelo de instrumento: Calorímetro diferencial de barrido TA Q2000

Método de prueba: Se tomó la muestra (~1 mg) y se puso en un recipiente de aluminio de DSC para las pruebas. En condiciones de N_2 50 ml/min, la muestra se calentó desde 30 °C (temperatura ambiente) hasta 300 °C (o 350 °C) a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

Método de análisis termogravimétrico (TGA) usado en la presente divulgación

Modelo de instrumento: Termogravímetro TA Q5000IR

Método de prueba: Se tomó la muestra (2 a 5 mg) y se puso en un recipiente de platino de TGA para las pruebas. En condiciones de N_2 25 ml/min, la muestra se calentó desde temperatura ambiente hasta 300 °C o una pérdida de peso del 20 % a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

Método de sorción dinámica de vapor (DVS) usado en la presente divulgación

Modelo de instrumento: Aparato de sorción dinámica de vapor SMS DVS Advantage

Condiciones de prueba: Se tomó la muestra (10 ~ 15 mg) y se puso en una bandeja de muestras de DVS para las pruebas.

Los parámetros detallados de DVS fueron los siguientes:

Temperatura: 25 °C

Equilibrio: dm/dt = 0,01 %/min (tiempo más corto: 10 min, y tiempo más largo: 180 min)

Secado: Secado durante 120 min al 0 % de HR

Gradiente de prueba de HR (%): 10 %

Intervalo de gradiente de prueba de HR (%): 0 %-90 %-0 %

La clasificación de la evaluación de la higroscopicidad fue la siguiente:

Clasificación de la higroscopicidad	Aumento de peso por absorción de humedad*
Delicuescencia	Absorber suficiente agua y formar un líquido
Muy higroscópico	$\Delta W\% \geq 15\ \%$
Higroscópico	$15\ \% > \Delta W\% \geq 2\ \%$
Ligeramente higroscópico	$2\ \% > \Delta W\% \geq 0{,}2\ \%$
No hay o casi no hay higroscopicidad	$\Delta W\% < 0{,}2\ \%$

* Aumento de peso por absorción de humedad a 25 ± 1 °C y 80 ± 2 % de HR

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es el patrón de XRPD de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (I) usando radiación de Cu-Kα;

la figura 2 es la curva de DSC de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (I);

la figura 3 es la curva de TGA de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (I);

la figura 4 es el patrón de XRPD de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II) usando radiación de Cu-Kα;

la figura 5 es la curva de DSC de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II);

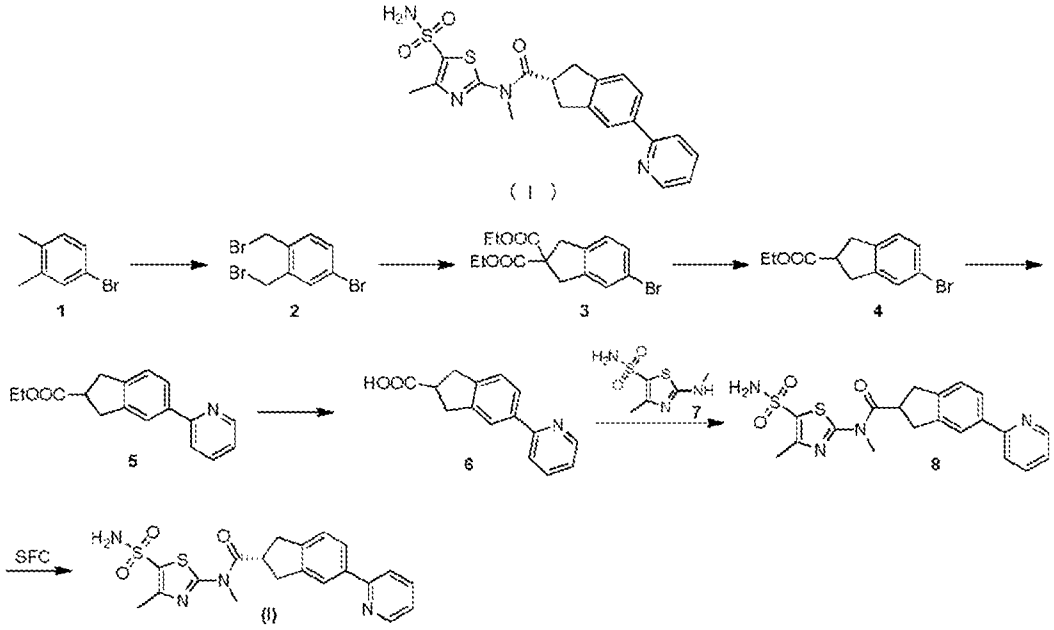
la figura 6 es la curva de TGA de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II); y

la figura 7 es la isoterma de DVS de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II).

Descripción detallada de la invención

Para comprender mejor el contenido de la presente divulgación, la presente divulgación se ilustra adicionalmente a continuación junto con ejemplos específicos, pero las realizaciones específicas no pretenden limitar el contenido de la presente divulgación.

Ejemplo 1: Preparación del compuesto de fórmula (I)



Etapa 1: Síntesis del compuesto 2

A una disolución del compuesto 1 (30,00 g, 162,11 mmol) en tetracloruro de carbono (400,00 ml) se le añadieron NBS (57,70 g, 324,22 mmol) y AIBN (5,32 g, 32,42 mmol), y el sistema se agitó a 80 °C durante 2 horas. Después de que la reacción se completara, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna para dar el compuesto 2 como un aceite incoloro. ^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ7,55 (s, 1H), 7,47-7,45 (m, 1H), 7,28-7,25 (m, 1H), 4,62 (s, 1H), 4,60 (s, 2H).

Etapa 2: Síntesis del compuesto 3

Se añadió lentamente hidruro sódico (9,60 g, 240,02 mmol, un contenido del 60 %) a una disolución de etanol (144,00 ml) y tetrahidrofurano (432,00 ml), y el sistema se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después, al sistema se le añadieron malonato de dietilo (18,22 g, 113,75 mmol) y el compuesto 2 (39,00 g, 113,75 mmol). El sistema se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de que la reacción se completara, la mezcla se inactivó añadiendo agua y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna para dar el compuesto 3 como un aceite incoloro. ^{1}H-RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,36 (s, 1H), 7,34-7,32 (m, 1H), 7,22-7,12 (m, 1H), 4,13 (q, *J1*= 14,0 Hz, J2= 7,2 Hz, 6H), 1,18-1,14 (m, 8H).

Etapa 3: Síntesis del compuesto 4

A una disolución del compuesto 3 (10,00 g, 29,31 mmol) en agua (10,00 ml) y DMSO (100,00 ml) se le añadió cloruro de litio (7,45 g, 175,86 mmol) y el sistema se agitó a 160 °C durante 4 horas. Después de que la reacción se completara, se añadieron 100 ml de agua y el sistema se extrajo con acetato de etilo (50 ml x 5). La capa orgánica se lavó con disolución acuosa de bicarbonato de sodio (50 ml x 2), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (éter de petróleo:acetato de etilo = 10:1) para dar el compuesto 4 como un aceite amarillo. ^{1}H-RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,40 (s, 1H), 7,29 (d, *J*=8,0 Hz, 1H), 7,15 (d, *J*=8,0 Hz, 1H), 4,07 (t, J=14,0Hz 2H), 3,42-3,35 (m, 1H), 3,16-3,04 (m, 4H), 1,18 (t, *J*= 15,6 Hz, 3H).

Etapa 4: Síntesis del compuesto 5

Una disolución del compuesto 4 (3,50 g, 13,00 mmol) y tributil(piridin-2-il)estanano en tolueno (50,00 ml) se purgó tres veces con nitrógeno. A continuación, se añadió tetra(trifenilfosfino)paladio (901,67 mg, 780,00 pmol) a la disolución de reacción, y el sistema se agitó a 110 °C bajo nitrógeno durante 5 horas. Después de que la reacción se completara, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (éter de petróleo:acetato de etilo = 3:1) para dar el compuesto 5 como un sólido amarillo claro. ^{1}H-RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ8,62 (d, *J*= 6,4 Hz, 1H), 7,92-7,81 (m, 4H), 7,29 (d, *J* = 5,2 Hz, 2H), 4,09 (q, *J1*=18,0 Hz, J2=6,8 Hz, 2H), 3,40-3,23 (m, 1H), 3,21-3,15 (m, 4H), 1,20 (t, *J*=14,4 Hz, 3H).

Etapa 5: Síntesis del compuesto 6

A una disolución del compuesto 5 (2,00 g, 7,48 mmol) en etanol (20 ml) y agua (5 ml) se le añadió hidróxido sódico (1,50 g, 37,41 mmol) a 20 °C, y el sistema se agitó a 20 °C durante 30 minutos. Después de que la reacción se completara, la disolución de reacción se concentró hasta sequedad. El sólido se disolvió en 20 ml de agua. La disolución se acidificó hasta pH 4-6 y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico

anhidro, se filtró y se concentró para dar el compuesto 6 como un aceite de color amarillo claro. ^{1}H-RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8,63 (d, J= 4,4 Hz, 1H), 7,94-7,83 (m, 3H), 7,34-7,31 (m, 2H), 3,30-3,00 (m, 1H), 3,22-3,16 (m, 4H).

Etapa 6: Síntesis del compuesto 8

A una disolución del compuesto 6 (200,00 mg, 835,88 μmol) y el compuesto 7 (207,90 mg, 1,00 mmol) en DMF se le añadieron EDCI (192,29 mg, 1,00 mmol) y HOBt (135,53 mg, 1,00 mmol), y el sistema se agitó a 50 °C durante 6 horas. Después de que la reacción se completara, la disolución de reacción se concentró a presión reducida hasta sequedad, y el residuo se purificó por cromatografía preparativa para dar el compuesto 8 como un sólido blanco. ^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,70 (d, J= 4,0 Hz, 1H), (s, 1H), 7,81-7,71 (m, 3H), 7,34 (d, J=8,0 Hz, 1H), 7,26-7,25 (m, 1H), (s, 2H), 3,91-3,83 (m, 1H), 3,79 (s, 3H), 3,45-3,35 (m, 4H), 2,60 (s, 3H).

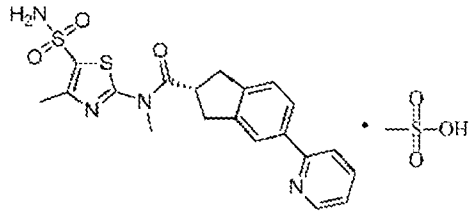
Etapa 7: Preparación del compuesto de fórmula (I)

El compuesto 8 (690,00 mg, 1,61 mmol) se resolvió quiralmente por cromatografía de fluidos supercríticos (instrumento: SFC-10; columna quiral: AD (250 mm*50 mm, 10 μm); fase móvil: CO_2 supercrítico/MeOH (0,1 % de NH_3H_2O) = 55/45, caudal: 180 ml/min; temperatura de la columna: 38 °C), para dar el compuesto de fórmula (I), y el tiempo de retención fue de aproximadamente 1,7 min. ^{1}H-RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8,62 (d, J=3,2 Hz, 1H), (m, 4H), 7,63 (s, 2H), 7,34-7,29 (m, 2H), 4,09-4,06 (m, 1H), 3,74 (s, 3H), (m, 4H), 2,45 (s, 3H).

Ejemplo 2: Preparación de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (I)

Se pesaron aproximadamente 20 g del compuesto de fórmula (I) y se añadieron a 800 ml de etanol. La mezcla se agitó durante la noche con un agitador magnético. La mezcla se filtró, la torta de filtro se enjuagó con una pequeña cantidad de etanol y el sólido resultante se secó a presión reducida. La detección por XRPD mostró que se obtuvo la forma cristalina A del compuesto de fórmula (I).

Ejemplo 3: Preparación de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II)



(II)

El compuesto de fórmula (I) (56,5 g, 131,85 mmol) se pesó y se añadió a un matraz de fondo redondo (3 l), al que se añadieron después 2 l de tetrahidrofurano anhidro. La mezcla se calentó hasta 50-55 °C de modo que se disolvió completamente. La mezcla se filtró. Se añadió gota a gota ácido metanosulfónico (12,67 g, 131,85 mmol) diluido con 50 ml de tetrahidrofurano anhidro al filtrado a 55 °C. Precipitó un sólido, y la mezcla se agitó adicionalmente durante 2 horas. La mezcla se filtró, y la torta de filtro se secó a presión reducida. El sólido resultante se añadió a un matraz de fondo redondo, al que se añadió después 1 l de etanol anhidro. La mezcla se calentó hasta 40 °C y se agitó durante 14 horas. La mezcla se filtró, y la torta de filtro se secó al vacío. La detección por XRPD mostró que se obtuvo la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II).

Ejemplo 4: Estudio sobre la higroscopicidad de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II)

Materiales del ensayo:

Aparato de sorción dinámica de vapor SMS DVS Advantage

Método del ensayo:

Se tomaron 10-15 mg de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II) y se pusieron en una bandeja de muestras de DVS para las pruebas.

Resultados del ensayo:

El espectro de DVS de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II) se muestra en la figura 7, en donde ΔW es el 1,158 %.

Conclusión del ensayo:

El aumento de peso por absorción de humedad de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II) a 25 °C y un 80 % de HR fue del 1,158 %, lo que indica que la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II) era ligeramente higroscópica.

Ejemplo de ensayo 1: Ensayo del efecto citopático del virus del herpes simple-1 (evaluación *in vitro)*

Objeto del ensayo:

Se usó el ensayo del efecto citopático (CPE) para determinar la actividad antivírica del compuesto contra la cepa GHSV-UL 46 del virus del herpes simple-1 (VHS-1).

Instrumentos del ensayo:

Incubador de células: Thermo 240I

Contador de células: Beckman Vi-CellTM XR

Dispensador automático: Thermo Multidrop

Sistema de transferencia de líquido para el compuesto: manipulador de líquidos Labcyte ECHO 555

Lector de microplacas: SpectraMax340PC384 de Molecular Devices.

Materiales del ensayo:

Virus: VHS-1 GHSV-UL46, n.º de la ATCC VR-1544

Célula: célula de riñón de mono verde africano, Vero E6, donada por Wuhan Institute of Virology, China Academy of Sciences.

Reactivos del ensayo:

Nombre del reactivo	Marca y número
DMEM, un medio de cultivo celular	Gibco n.º 11995-065
Suero bovino fetal	Corning n.º 35-076-CV
Anticuerpo doble	HyClone n.º SV30010
Aminoácidos no esenciales (NEAA)	Gibco n.º 11140050, 100*
Tampón fosfato	Corning n.º 21-031-CVR
Kit de recuento celular-8 (CCK8)	Biolite n.º 35004

Método de preparación del medio:

Medio de crecimiento celular: 500 ml de medio DMEM + 50 ml de suero bovino fetal + 5 ml de anticuerpo doble + 5 ml de aminoácidos no esenciales.

Medio para el ensayo del efecto citopático: 500 ml de medio DMEM + 10 ml de suero bovino fetal + 5 ml de anticuerpo doble + 5 ml de aminoácidos no esenciales.

Etapas del ensayo:

1. Siembra en placa de células (día 1)

1.1 La superficie de trabajo de la cabina de seguridad biológica se limpió con alcohol al 75 %; la cabina de seguridad biológica se irradió con luz ultravioleta durante 15 minutos; el ventilador se encendió; y la ventana de vidrio se estiró hasta el borde inferior de la línea de advertencia, que se mantuvo durante 5 minutos para estabilizar el flujo de aire en la cabina.

1.2. Se extrajo un matraz (matraz de cultivo celular T 150) de células Vero E6 con una densidad celular del 80 %. El medio de crecimiento se aspiró y las células se lavaron dos veces con 10 ml de tampón fosfato. Se añadieron 2 ml de tripsina, y las células se pusieron en un incubador de CO_2 a 37 °C para su digestión.

1.3. Después de separar las células y de que cayeran, se añadieron 15 ml del medio para el ensayo del efecto citopático para detener la digestión; las células se pipetearon varias veces y se tomó 1 ml de suspensión celular y se contó con un contador de células.

1.4. Las células se diluyeron hasta 1,33 x 10^5 células/ml con el medio para el ensayo del efecto citopático. La suspensión celular diluida se añadió a una placa de 384 pocillos (Corning n.º 3701) con 30 µl de 4000 células por pocillo mediante Multidrop.

1.5. La periferia de la placa de células se agitó ligeramente para hacer que las células se distribuyeran uniformemente, y la placa de células se puso después en un incubador de células con CO_2 a 37 °C y se incubaron durante la noche.

2. Dilución del compuesto, tratamiento e inoculación del virus (día 2)

2.1. El compuesto se diluyó en gradientes con DMSO, y el compuesto diluido se añadió a la placa ECHO.

2.2. El compuesto se añadió a la placa de 384 pocillos sembrada con células con la estación de trabajo de líquidos ECHO 555. Cada compuesto de prueba se midió a 8 concentraciones por duplicado. Para los pocillos de control celular, no se añadieron compuesto ni virus. Para los pocillos de control de virus, no se añadió compuesto. La concentración final de DMSO en todos los pocillos fue del 0,5 %.

2.3. El virus se diluyó con el medio de ensayo y se inoculó a 1,5 $TCID_{90}$/pocillo, 30 µl. El medio de ensayo se añadió con Multidrop a los pocillos de control celular, 30 µl por pocillo. El virus diluido se añadió después con Multidrop a los pocillos de prueba del compuesto y los pocillos de control de virus, 30 µl por pocillo.

2.4. La placa de células se puso en un incubador de células con CO_2 a 37 °C, y se incubó durante 5 días.

3. Prueba de viabilidad celular (día 7)

3.1. Después de 5 días de cultivo, se observaron cambios citopáticos en todos los pocillos de la placa de células. Las células en los pocillos de control no deberían estar enfermas, mientras que casi todas las células en los pocillos de control de virus estaban enfermas.

3.2. Se añadió CCK8 a la placa de células con Multidrop, 6 µl por pocillo.

3.3. La placa de células se puso en un incubador de células con CO_2 a 37 °C, y se incubó durante 3 horas.

3.4. El valor de absorbancia de cada pocillo de la placa de células se leyó con un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm, y se usó 630 nm como longitud de onda de referencia. El valor de los datos sin procesar fue la absorbancia a 450 nm menos la absorbancia a 630 nm (datos sin procesar = DO_{450}-DO_{630}).

4. Análisis de datos

4.1. La actividad antivírica del compuesto de prueba (% de inhibición) se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\%\ de\ inhibición = \left(\frac{muestra - control\ de\ virus}{control\ celular - control\ de\ virus}\right) \times 100$$

en donde la muestra es el valor de absorbancia de los pocillos de prueba del compuesto, el control celular es el valor de absorbancia promedio de los pocillos de control celular, y el control de virus es el valor de absorbancia promedio de los pocillos de control de virus.

4.2. La curva de dosis-respuesta se representó gráficamente usando el software GraphPad Prism, y se obtuvo la concentración eficaz media (CE_{50}) del compuesto de prueba.

5. Los resultados del ensayo se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados de la prueba del ensayo citopático de VHS-1

Compuesto n.º	Ensayo citopático de VHS-1, CE_{50} (µM)
Compuesto de fórmula (I)	0,007

6. Conclusión: El compuesto de la divulgación tiene buena actividad antivírica contra el virus del herpes simple (VHS).

Ejemplo de ensayo 2: Evaluación de la farmacocinética del compuesto

Objeto del ensayo: someter a prueba la farmacocinética del compuesto en ratones *in vivo*.

Materiales del ensayo:

Ratones Balb/c (machos, 18-22 g, 6-8 semanas de edad, de Shanghai SLAC)

Procedimientos del ensayo:

El perfil farmacocinético del compuesto después de inyección intravenosa y administración oral en roedores se sometió a prueba mediante el protocolo estándar. El compuesto candidato se formuló en una disolución correspondiente, y se administró a través de una única inyección intravenosa (1,0 mg/kg, 5 % de DMSO/95 % de hidroxipropil-beta-ciclodextrina al 20 %) o una administración intragástrica (1,0 mg/kg, 0,5 % de metilcelulosa MC4000). La muestra de sangre completa se recogió en el plazo de 24 horas y se centrifugó a 3000 g durante 15 minutos. El sobrenadante se separó para dar la muestra de plasma, y se añadió 4 veces el volumen de disolución de acetonitrilo que contenía un patrón interno para precipitar las proteínas. La mezcla resultante se centrifugó y se extrajo el sobrenadante, al que se añadió un volumen igual de agua y se centrifugó. Se extrajo el sobrenadante y se inyectó como muestra para analizar cuantitativamente la concentración de fármaco en plasma mediante el método de análisis de CL-EM/EM. Se calcularon los parámetros farmacocinéticos, tales como concentración máxima, tiempo máximo, tasa de aclaramiento, semivida, área bajo la curva fármaco-tiempo, biodisponibilidad, etc.

Los resultados del ensayo se muestran en la tabla 4:

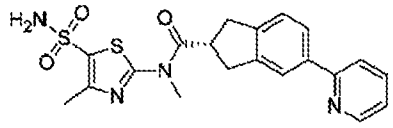
Tabla 4. Resultados del ensayo farmacocinético

Producto de prueba (compuesto preparado en cada ejemplo)	Velocidad de aclaramiento (ml/min/kg)	Semivida $T_{1/2}$ (h)	AUC integral de la concentración (nM·h)	Biodisponibilidad F (%)
	Parámetros de la administración intravenosa		Parámetros de la administración oral	
Control (Pritelivir)	0,4	6	128921	100
Compuesto de fórmula (I)	1,2	6	24371	75

Conclusión: El compuesto de la presente divulgación muestra una menor exposición en plasma y una mejor seguridad a la misma dosis eficaz en el estudio de farmacocinética *in vivo* de administración intragástrica en ratones.

REIVINDICACIONES

1. Una forma cristalina A del compuesto de fórmula (I), en donde el patrón de difracción de rayos X en polvo usando radiación de Cu-Kα a la longitud de onda de 1,54056 Å del mismo tiene picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ: 10,81 ± 0,2°, 15,97 ± 0,2° y 21,69 ± 0,2°,



(I)

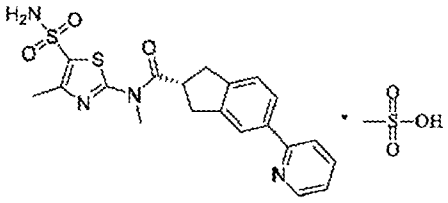
2. La forma cristalina A según la reivindicación 1, en donde el patrón de difracción de rayos X en polvo usando radiación de Cu-Kα a la longitud de onda de 1,54056 Å del mismo tiene picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ: 10,81 ± 0,2°, 13,03 ± 0,2°, 15,97 ± 0,2°, 18,48 ± 0,2°, 21,69 ± 0,2°, 23,78 ± 0,2°, 25,14 ± 0,2° y 26,96 ± 0,2°.

3. La forma cristalina A según la reivindicación 2, en donde el patrón de XRPD usando radiación de Cu-Kα a la longitud de onda de 1,54056 Å del mismo tiene picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ: 6,581°, 10,807°, 13,031°, 15,301°, 15,637°, 15,971°, 17,253°, 18,160°, 18,475°, 20,076°, 20,644°, 21,688°, 22,381°, 23,782°, 25,141°, 26,167°, 26,959°, 29,108°, 31,492°, 31,904°, 32,061°, 33,385° y 36,623°.

4. La forma cristalina A según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la curva de calorimetría diferencial de barrido de la misma tiene un punto de partida del pico endotérmico a 216,04 ± 3 °C.

5. La forma cristalina A según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la curva de análisis termogravimétrico de la misma tiene una pérdida de peso de hasta el 0,4442 % a 120±3 °C y hasta el 2,4492 % a 204±3 °C.

6. Un compuesto de fórmula (II),



(II)

7. El compuesto de fórmula (II) según la reivindicación 6, que es una forma cristalina B del compuesto de fórmula (II),

en donde el patrón de difracción de rayos X en polvo usando radiación de Cu-Kα a la longitud de onda de 1,54056 Å del mismo tiene picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ: 10,17 ± 0,2°, 11,85 ± 0,2° y 15,94 ± 0,2°.

8. La forma cristalina B según la reivindicación 7, en donde el patrón de difracción de rayos X en polvo usando radiación de Cu-Kα a la longitud de onda de 1,54056 Å del mismo tiene picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ: 8,46 ± 0,2°, 10,17 ± 0,2°, 11,85 ± 0,2°, 13,98 ± 0,2°, 15,94 ± 0,2°, 20,39 ± 0,2°, 21,32 ± 0,2° y 23,78 ± 0,2°.

9. La forma cristalina B según la reivindicación 8, en donde el patrón de XRPD usando radiación de Cu-Kα a la longitud de onda de 1,54056 Å del mismo tiene picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ: 8,460°, 10,174°, 11,535°, 11,850°, 13,982°, 15,935°, 19,110°, 19,464°, 19,939°, 20,391°, 21,319°, 21,888°, 23,309°, 23,780°, 24,517°, 24,929°, 26,034°, 26,367°, 26,959°, 27,352°, 28,772°, 30,626°, 31,297°, 32,067°, 33,845° y 38,235°.

10. La forma cristalina B según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde la curva de calorimetría diferencial de barrido de la misma tiene un punto de partida del pico endotérmico a 185,89 ± 3 °C.

11. La forma cristalina B según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde la curva de análisis termogravimétrico de la misma tiene una pérdida de peso de hasta el 0,7160 % a 187,16 ± 3 °C.

12. La forma cristalina A del compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el virus del herpes simple.

13. El compuesto de fórmula (II) y la forma cristalina B del compuesto de fórmula (II) según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el virus del herpes simple.

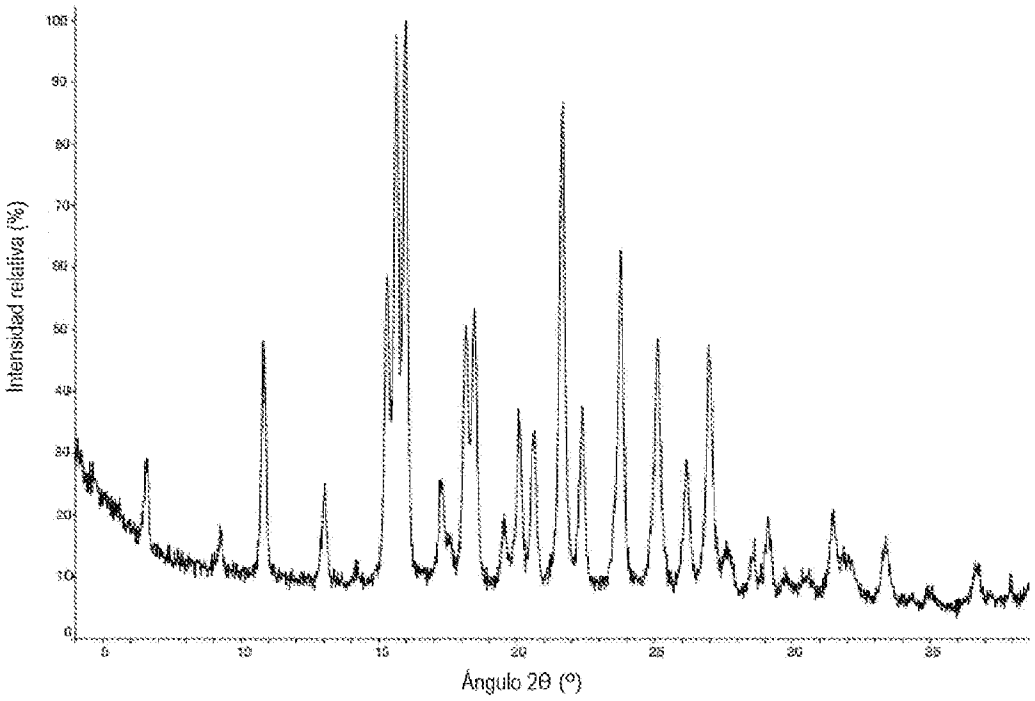

Intensidad relativa (%)
Ángulo 2θ (°)

FIG. 1

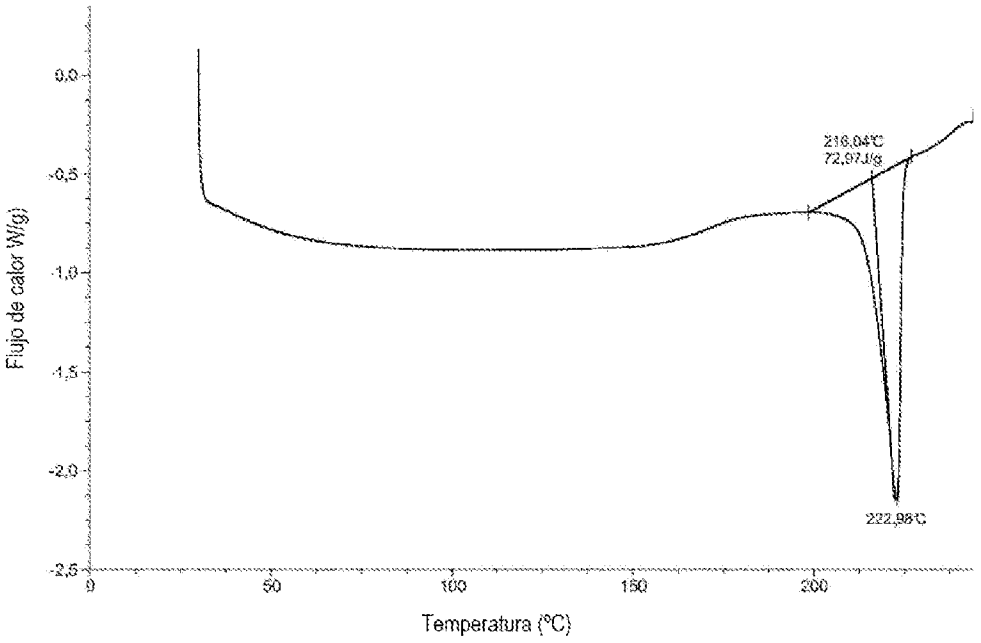

Flujo de calor W/g)
Temperatura (°C)
216,04°C
72,97J/g
222,98°C

FIG. 2

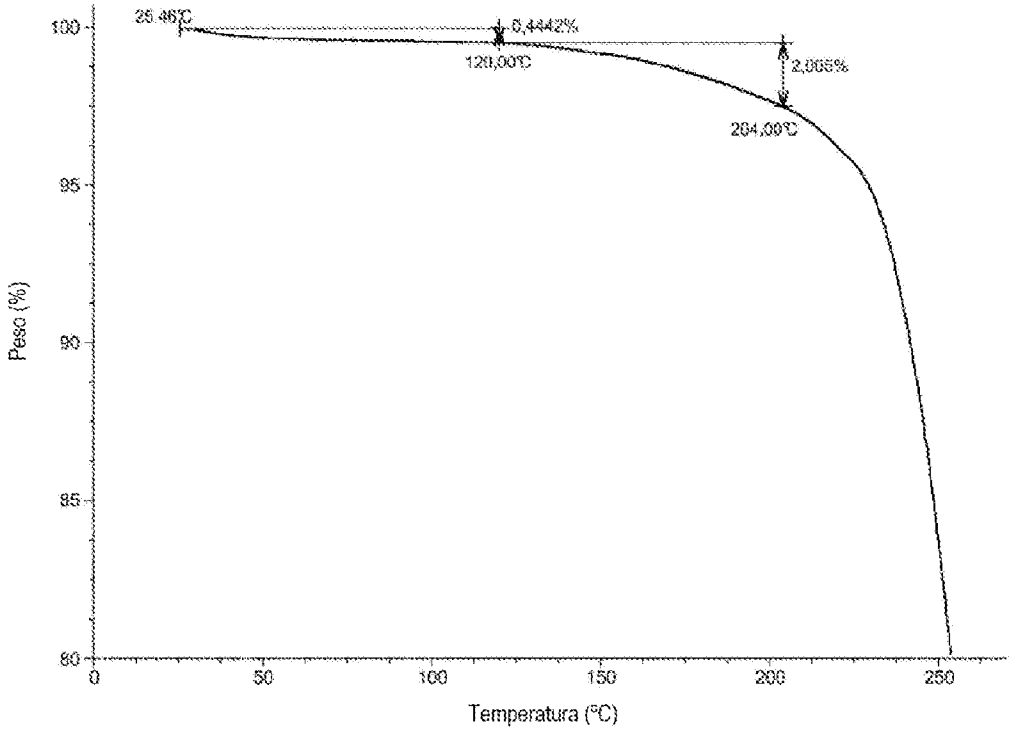

25,46°C
6,4442%
120,00°C
2,0055%
204,09°C
Peso (%)
Temperatura (°C)

FIG. 3

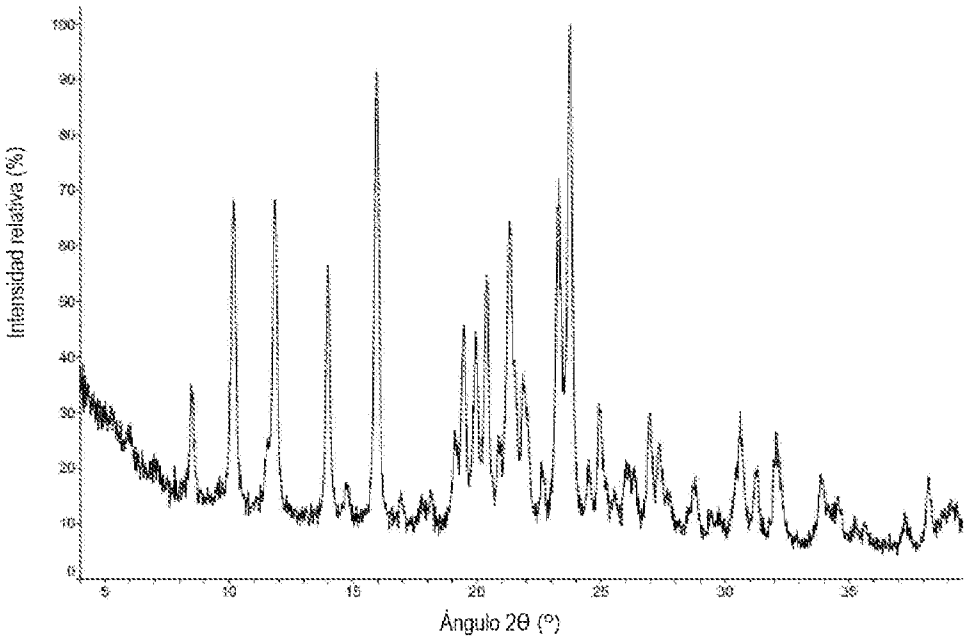

Intensidad relativa (%)
Ángulo 2θ (°)

FIG. 4

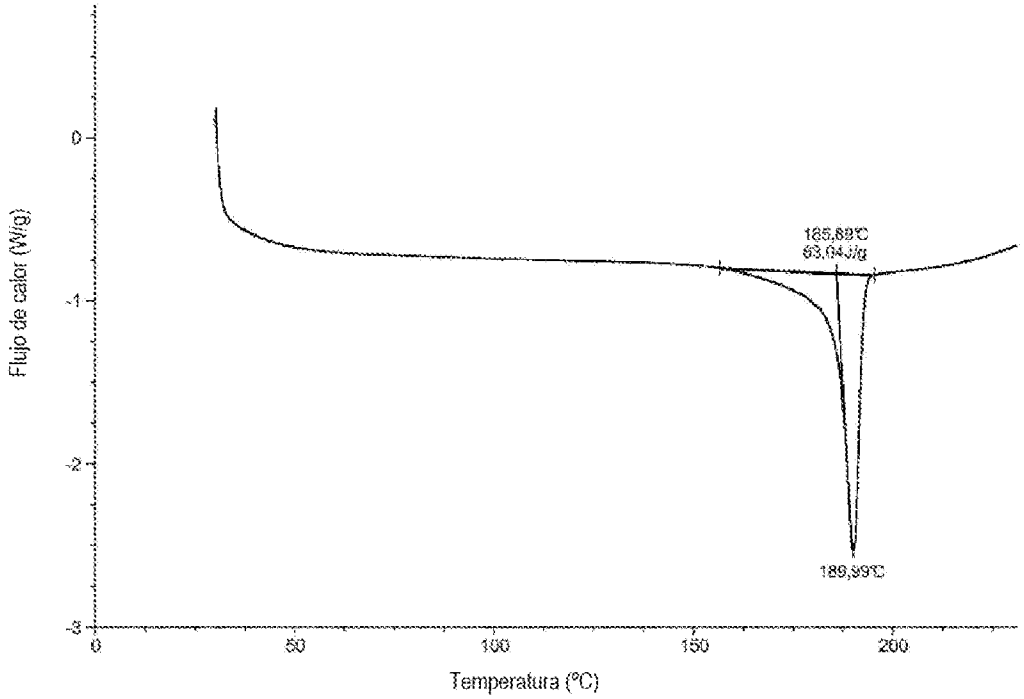

Flujo de calor (W/g)
0
-1
-2
-3
185,88°C
63,04 J/g
189,99°C
0
50
100
150
200
Temperatura (°C)

FIG. 5

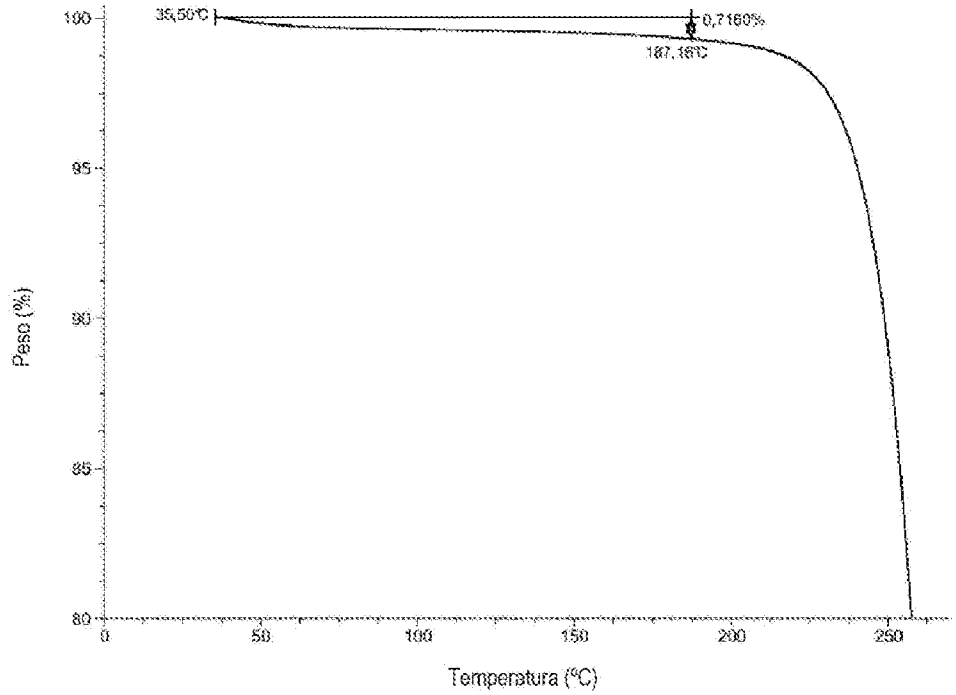

100
95
90
85
80
Peso (%)
35,50°C
0,7160%
187,16°C
0
50
100
150
200
250
Temperatura (°C)

FIG. 6

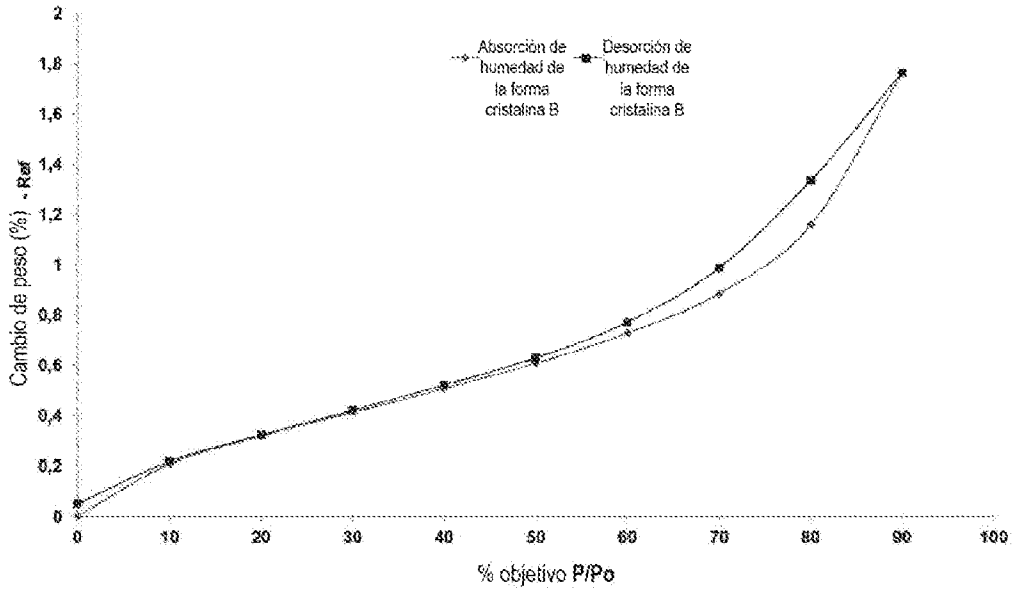

Absorción de humedad de la forma cristalina B
Desorción de humedad de la forma cristalina B
Cambio de peso (%) - Ref
% objetivo P/Po
0
0,2
0,4
0,6
0,8
1
1,2
1,4
1,6
1,8
2
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100

FIG. 7