

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 830 443**

(51) Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2017 PCT/CN2017/072891**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.08.2017 WO17133684**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2017 E 17747004 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 3412672**

(54) Título: **Forma cristalina A de (2-butoxi-7-(4-(pirrolidin-1-ilmetil)bencil)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-4-amina) como agonista de TLR7, método de preparación y uso de la misma**

(30) Prioridad:

05.02.2016 CN 201610082029

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2021

(73) Titular/es:

**CHIA TAI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD. (100.0%)
No. 369 Yuzhou South Road, Haizhou District Lianyungang, Jiangsu 222062, CN**

(72) Inventor/es:

**DING, ZHAOZHONG;
SUN, FEI;
HU, YINGHU;
ZHOU, YILONG;
WANG, ZHENG;
ZHAO, RUI y
YANG, LING**

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 830 443 T3

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

DESCRIPCIÓN

Forma cristalina A de (2-butoxi-7-(4-(pirrolidin-1-ilmetil)bencil)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-4-amina) como agonista de TLR7, método de preparación y uso de la misma

5

Campo técnico

La presente invención se refiere al campo de la química medicinal y, en particular, se refiere a la forma cristalina A de un agonista de TLR7 (2-butoxi-7-(4-(pirrolidin-1-ilmetil)bencil)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-4-amina), a un proceso de preparación de la misma, a una composición cristalina que comprende la forma cristalina A, a una composición farmacéutica que comprende la forma cristalina A o la composición cristalina y uso de las mismas.

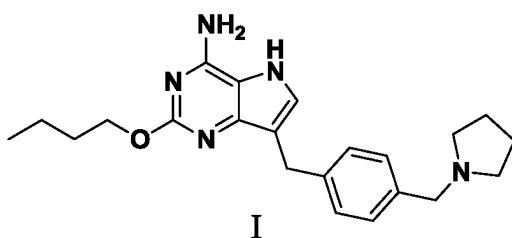
Antecedentes

15 El receptor de tipo Toll es expresado por diversas células inmunitarias y reconoce motivos estructurales altamente reservados: Patrón Molecular Asociado a Patógeno (PAMP, por sus siglas en inglés) expresado por microorganismos patógenos o Patrones Moleculares Asociados a Daño (DAMP, por sus siglas en inglés) liberados por células muertas. PAMP o DAMP estimulan el receptor similar a Toll para desencadenar la cascada de señales que induce la activación de factores de transcripción como AP-1, NF- κ B y reguladores de interferón (función de respuesta a pulsos). Da como resultado diversas respuestas celulares, incluyendo la producción de interferones, citocinas proinflamatorias y citocinas efectoras, por lo que se produce una respuesta inmunitaria. Con mucho, se han descubierto 13 tipos de receptores de tipo Toll en mamíferos. Los receptores de tipo Toll 1, 2, 4, 5 y 6 se expresan principalmente sobre la superficie celular mientras que los receptores de tipo Toll 3, 7, 8 y 9 se expresan en el endosoma. Diferentes receptores de tipo Toll reconocen ligandos derivados de diferentes patógenos. El receptor de tipo Toll 7 (TLR7) es expresado principalmente por las células dendríticas plasmacitoides (pDC) y se reconoce a través de ligando para inducir la secreción de interferón α (IFN- α). El receptor de tipo Toll 7 (TLR7) y el receptor de tipo Toll 8 (TLR8) son altamente homólogos y, por tanto, el ligando de TLR7 en la mayoría de los casos es también el de TLR8. La estimulación de TLR8 induce principalmente la producción de citocinas de tipo factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y quimioatraventante. El interferón α es uno de los medicamentos para tratar la hepatitis B o la hepatitis C crónicas, mientras que el TNF- α es una citocina proinflamatoria, cuya sobresecreción dará como resultado efectos secundarios graves.

Se han publicado varios agonistas de TLR7, como imiquimod (*British Journal of Dermatology* 2003; 149 (Supl. 66): 5-8), resiquimod (*Antiviral Research* 64 (2004) 79-83), GS-9620 (*Gastroenterology* (2013), 144(7), 1508-1517). No obstante, es deseable tener agonistas de TLR7 novedosos con mejor selectividad, actividad y seguridad.

35

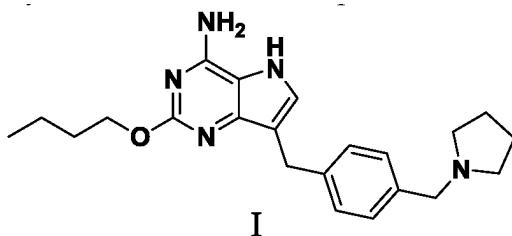
El documento WO2016/023511 (correspondiente al documento EP 3190113) desvela una molécula pequeña, es decir, 2-butoxi-7-(4-(pirrolidin-1-ilmetil)bencil)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-4-amina, que tiene la siguiente estructura:



40

Sumario

En un aspecto, se proporciona la forma cristalina A del compuesto de fórmula I:



45

La forma cristalina A se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X de polvo (DRXP) que tiene picos de difracción a $2\theta = 5,5^\circ \pm 0,2^\circ$, $10,1^\circ \pm 0,2^\circ$, $13,8^\circ \pm 0,2^\circ$, $19,7^\circ \pm 0,2^\circ$, $23,7^\circ \pm 0,2^\circ$, $24,1^\circ \pm 0,2^\circ$.

50 En otro aspecto, se proporciona un proceso para preparar forma cristalina A del compuesto de fórmula I, que comprende las siguientes etapas:

- 1) disolver el compuesto de fórmula I en un disolvente de cristalización, que preferentemente se calienta para promover la disolución; y
 2) enfriar para la cristalización, filtrar, lavar y secar para obtener la forma cristalina A.

- 5 En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica, que comprende la forma cristalina A o la composición cristalina de la misma de acuerdo con la invención. La composición farmacéutica puede comprender además, opcionalmente, un vehículo, excipiente y/o medio farmacéuticamente aceptables.
- 10 En otro aspecto, se proporciona un método para tratar o prevenir enfermedades asociadas al receptor de tipo Toll 7 (TLR7), que comprende administrar a un sujeto que lo necesite la forma cristalina A o la composición cristalina de la misma o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención en una cantidad eficaz. Preferentemente, la enfermedad es una infección vírica.
- 15 En un aspecto adicional, se proporciona un uso de la forma cristalina A o la composición cristalina de la misma o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir enfermedades asociadas al receptor de tipo Toll 7 (TLR7). Preferentemente, la enfermedad es una infección vírica.
- 20 En otro aspecto más, se proporciona la forma cristalina A o la composición cristalina de la misma o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas al receptor de tipo Toll 7 (TLR7). Preferentemente, la enfermedad es una infección vírica.

En una realización de la invención, la infección vírica es una infección con el virus de la hepatitis, en particular una infección con el virus de la hepatitis B o la hepatitis C.

25 **Breve descripción de los dibujos**

- Figura 1: Patrón de DRXP de la forma cristalina A del compuesto de fórmula I.
 Figura 2: Diagrama de celda unitaria de la forma cristalina A del compuesto de fórmula I.
 30 Figura 3: Patrón de CDB de la forma cristalina A del compuesto de fórmula I.

Descripción detallada

Definición y terminología general

- 35 A menos que se indique lo contrario, los términos y frases utilizados en el presente documento tienen el siguiente significado. No se considerará que un término o una frase específicos son poco claros o indefinidos cuando no se definen específicamente. Deben comprenderse de acuerdo con el significado general. El nombre comercial utilizado en el presente documento se refiere al producto correspondiente o al principio activo.
- 40 A menos que se defina específicamente de otro modo, una proporción (incluyendo el porcentaje) o una parte se calculan basándose en el peso del presente documento.
- 45 Cuando se usa con una variable numérica, el término "aproximado" o "aproximadamente" se refiere por lo general al valor de la variable y a todos los valores de la variable dentro del error experimental (por ejemplo, dentro de un intervalo de confianza promedio del 95 %) o dentro del $\pm 10\%$ del valor especificado, o un intervalo más amplio.
- 50 La expresión "comprender" o sus sinónimos "contener", "incluir", "tener" o similares es abierto, que no excluye otros elementos, etapas o ingredientes no enumerados. La expresión "consistir en" excluye cualesquier elementos, etapas o ingredientes no enumerados. La expresión "consistir sustancialmente en" se refiere a elementos, etapas o ingredientes específicos dentro de un intervalo dado, junto con elementos, etapas o componentes opcionales que no afectan sustancialmente a la característica básica y novedosa de la materia objeto reivindicada. Debe comprenderse que la expresión "comprender" abarca las expresiones "consistir sustancialmente en" y "consistir en".
- 55 El término "opcional" u "opcionalmente" significa que el acontecimiento que se describe posteriormente al mismo puede o no suceder. Este término abarca los casos en los que el evento puede o no suceder.
- 60 La expresión "composición farmacéutica" se refiere a un principio activo, que se combina opcionalmente con uno o más componentes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, pero sin limitación, un vehículo y/o excipiente). El principio activo se ejemplifica como el compuesto de fórmula I o una sal del mismo, la forma cristalina de acuerdo con la invención, o la composición cristalina de acuerdo con la invención.
- 65 La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a los vehículos que no presentan una irritación significativa y no alteran la bioactividad y las propiedades del compuesto activo. El "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sustancia inerte que se administra con el principio activo y que es beneficiosa para la administración del mismo, y comprende, pero sin limitación, cualesquiera de las siguientes sustancias aprobadas por

- la Administración Estatal de Alimentos y Fármacos para su uso en seres humanos o animales (por ejemplo, ganado): agente de deslizamiento, agente edulcorante, diluyente, conservante, tinte/colorante, agente aromatizante, tensioactivo, agente humectante, dispersante, disagregante, agente de suspensión, agente estabilizante, agente isotónico, disolvente o agente emulsionante. Los ejemplos no limitantes de los vehículos comprenden carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y almidones, derivado de celulosa, gelatina, aceite vegetal y polietilenglicol o similares. Puede encontrarse otra información con respecto a los vehículos en Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 21^a Ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2005), cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia. El término "excipiente" generalmente se refiere al vehículo, diluyente y/o medio utilizados para formular una composición farmacéutica eficaz.
- El término "administración" o "administrar" o similar se refiere a un método que permite suministrar un compuesto o composición a un sitio de acción biológica deseado. Dichos métodos comprenden, pero sin limitación, la administración oral, parenteral (incluyendo intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, por inyección o infusión intravascular), local, rectal o similar.
- En cuanto al agente activo farmacéutico o farmacológico, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad del medicamento o agente que no es tóxica pero que es suficiente para conseguir el efecto deseado. Con respecto a la formulación oral del presente documento, la "cantidad eficaz" para una sustancia activa en la composición se refiere a la cantidad necesaria para conseguir el efecto deseado en combinación con otra sustancia activa en la composición.
- La cantidad eficaz puede determinarse individualmente y depende de la edad y el estado general del receptor, así como de la sustancia activa específica. La cantidad eficaz en un caso específico puede ser determinada por un experto en la materia a través de un ensayo convencional.
- Las expresiones "principio activo", "agente terapéutico", "sustancia activa" o "agente activo" se refieren a una entidad química útil para el tratamiento o la prevención de un trastorno, enfermedad o afección objetivo eficazmente. El término del presente documento puede referirse, por ejemplo, al compuesto de fórmula I o a una sal del mismo, la forma cristalina de acuerdo con la invención o la composición cristalina de acuerdo con la invención.
- En espectros de difracción de rayos X de polvo (DRXP o DRX), el patrón de difracción obtenido a partir del compuesto cristalino es generalmente característico para una forma cristalina particular en la que las intensidades relativas de las bandas (especialmente a ángulos bajos) pueden variar con el efecto de orientación dominante debido a la diferencia de las condiciones de cristalización, los diámetros de partícula y otras condiciones de medición. Por tanto, las intensidades relativas de los picos de difracción no son características para la forma cristalina dada. Es más importante observar las posiciones relativas de los picos en lugar de sus intensidades relativas cuando se determina si la forma cristalina es la misma que la conocida en la técnica. Asimismo, puede haber ligeros errores en la posición de los picos para cualquier forma cristalina dada, lo que también es bien sabido en la técnica de la cristalografía. Por ejemplo, la posición del pico puede desplazarse debido al cambio de temperatura, al movimiento de la muestra o a la calibración del instrumento durante el análisis de la muestra; y el error de medición del valor de 2θ puede ser en ocasiones de aproximadamente $\pm 0,2^\circ$, normalmente de aproximadamente $\pm 0,1^\circ$. Por tanto, este error debe tenerse en cuenta cuando se determina la estructura cristalina. Si las formas cristalinas de acuerdo con la invención se describen sustancialmente como se muestra en la figura, el término "sustancialmente" también tiene por objeto abarcar dichas diferencias en el pico de difracción.
- En el patrón de DRXP, la posición del pico por lo general se representa por el ángulo 2θ o la distancia de la superficie del cristal d y una conversión simple entre d y θ es $d = \lambda/2\sin\theta$, donde d representa la distancia de la superficie del cristal, λ representa la longitud de onda de los rayos X incidentes y θ es el ángulo de difracción. En cuanto a la misma forma cristalina del mismo compuesto, las posiciones de pico del patrón de DRXP son similares en su conjunto y el error de intensidad relativa puede ser grande. Cabe señalar también que, en la identificación de una mezcla, algunas líneas de difracción pueden perderse debido a factores como la disminución del contenido, etc. y, por tanto, no es necesario basarse en todas las bandas observadas en la muestra de alta pureza e incluso una banda puede ser característica para un cristal dado.
- En la presente invención, el patrón de difracción de los rayos X de polvo se determina de la siguiente manera: aparato: difractómetro de rayos X Bruker D8 ADVANCE; método: objetivo: Cu: K-Alfa; longitud de onda $\lambda = 1,54179 \text{ \AA}$; tensión: 40 kV; corriente: 40 mA; intervalo de barrido: 4-40°; velocidad de rotación de la muestra: 15 rpm; velocidad de barrido: 10°/min.
- Se usa calorimetría diferencial de barrido (CDB) para medir la temperatura de transición cuando un cristal absorbe o libera calor debido a cambios en su estructura cristalina o a la fusión cristalina. El error de la temperatura de transición térmica y del punto de fusión está normalmente dentro de aproximadamente 5 °C, por lo general aproximadamente 3 °C para la misma forma cristalina del mismo compuesto en un análisis continuo. Cuando un compuesto se describe como si tuviera un pico de CDB o punto de fusión dados, significa el pico de CDB o el punto de fusión $\pm 5^\circ\text{C}$. Se proporciona un método auxiliar mediante CDB para identificar diferentes formas cristalinas. Pueden identificarse diferentes formas cristalinas de acuerdo con sus diferentes características de temperatura de transición. Se observa que el pico de CDB o el punto de fusión de la mezcla puede variar en un intervalo amplio. Asimismo, la temperatura de fusión se asocia a la tasa de aumento de la temperatura debido a la descomposición durante la fusión de la

sustancia.

La calorimetría diferencial de barrido (CDB) del presente documento se mide mediante el siguiente método: aparato: calorímetro de barrido diferencial TA Q2000; método: una muestra (~1 mg) se coloca en un recipiente de aluminio de CDB, método: 25 °C~300 °C, velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

5 La forma cristalina de acuerdo con la invención también puede caracterizarse mediante parámetros de celda. Dichos parámetros pueden determinarse mediante un análisis cristalográfico de rayos X monocristalino. Por ejemplo, la 10 información detallada de los parámetros de celda puede encontrarse en el Capítulo 3 de Stout y Jensen, *X-Ray structure Determination: A Practical Guide*, MacMillian Co., Nueva York, N.Y. (1968).

10 Los parámetros de celda del presente documento se determinan mediante el siguiente método: Difractómetro: Rigaku MicroMax-007HF; Longitud de onda: 1,54178 Å; Temperatura: 296 K.

15 20 La expresión "composición cristalina" se refiere a una forma sólida, que comprenden la forma cristalina A de acuerdo con la invención. Las cantidades de la forma cristalina A contenidas en la composición cristalina pueden ser del 50 % o más, del 80 % o más, del 90 % o más, o del 95 % o más. Además de la forma cristalina de acuerdo con la invención, la composición cristalina también puede comprender opcionalmente otra forma cristalina o amorfía del compuesto de fórmula I o la sal del mismo o las impurezas distintas de estas sustancias. Los expertos en la materia deben comprender que la suma del contenido de los componentes de la composición cristalina debe ser del 100 %.

Forma cristalina A

25 Se proporciona la forma cristalina A del compuesto de fórmula I, que tiene picos de difracción a $2\theta = 5,5^\circ, 10,1^\circ, 13,8^\circ, 19,7^\circ, 23,7^\circ, 24,1^\circ \pm 0,2^\circ$ en un patrón de difracción de rayos X de polvo (DRXP).

En una realización específica, la forma cristalina A tiene picos de difracción a $2\theta = 5,5^\circ, 10,1^\circ, 13,8^\circ, 16,4^\circ, 19,7^\circ, 23,7^\circ, 24,1^\circ, 27,9^\circ \pm 0,2^\circ$ en un patrón de difracción de rayos X de polvo (DRXP).

30 En una realización más específica, la forma cristalina A tiene picos de difracción a $2\theta = 5,5^\circ, 10,1^\circ, 13,8^\circ, 16,4^\circ, 17,9^\circ, 19,0^\circ, 19,7^\circ, 20,3^\circ, 21,8^\circ, 22,1^\circ, 23,7^\circ, 24,1^\circ, 25,5^\circ, 27,9^\circ, 32,9^\circ, 34,0^\circ \pm 0,2^\circ$ en un patrón de difracción de rayos X de polvo (DRXP).

35 En una realización particular, los picos de difracción de la forma cristalina A del compuesto de fórmula I se caracterizan de la siguiente manera:

Número	$2\theta \pm 0,2^\circ$	Intensidad relativa (%)	Número	$2\theta \pm 0,2^\circ$	Intensidad relativa (%)
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

En una realización, el patrón de difracción de rayos X de polvo de la forma cristalina A del compuesto de fórmula I se muestra sustancialmente en la Figura 1.

40 45 En otra realización, la forma cristalina A del compuesto de fórmula I tiene los siguientes parámetros de celda (como se muestra en la Figura 2):

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

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

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

$$\alpha = 90^\circ$$

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

$$\gamma = 90^\circ$$

50 Grupos espaciales: P21/c

Z = 4.

La forma cristalina A también puede caracterizarse mediante CDB, con una temperatura inicial de 199,0 °C y una temperatura máxima de 200,4 °C.

- 5 En una realización, el patrón de CDB de la forma cristalina A del compuesto de fórmula I se muestra en la Figura 3.

Proceso de preparación

- 10 Se proporciona también un proceso para preparar la forma cristalina A del compuesto de fórmula I, que comprende precipitar la forma cristalina A del compuesto de fórmula I en un disolvente.

En una realización, el proceso comprende las siguientes etapas:

- 15 1) disolver el compuesto de fórmula I en un disolvente de cristalización, que preferentemente se calienta para promover la disolución; y
2) enfriar para la cristalización, filtrar, lavar y secar para obtener la forma cristalina A.

- 20 En la etapa 1), el disolvente de cristalización se selecciona entre el grupo que consiste en metanol, etanol, propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, butanol terciario, acetona, acetato de etilo, agua y disolvente mixto de los mismos; preferentemente etanol.

En la etapa 1), la cantidad de disolvente de cristalización añadido por 1 g del compuesto de fórmula I es de 2 a 10 ml, preferentemente de 4 a 8 ml, más preferentemente de 5 a 7 ml.

- 25 En la etapa 1), se usa calentamiento para formar un sistema homogéneo del compuesto de fórmula I y el disolvente de cristalización. La temperatura de calentamiento puede ser de 40 °C a 90 °C, preferentemente de 50 a 80 °C, más preferentemente de 70 °C a 80 °C.

- 30 Se proporciona también una composición cristalina, que comprende la forma cristalina A del compuesto de fórmula I. En una realización, basándose en el peso de la composición cristalina, el contenido de la forma cristalina A es del 50 % o más, preferentemente del 80 % o más, más preferentemente del 90 % o más y mucho más preferentemente del 95 % o más. La composición cristalina, además de la forma cristalina A, también puede comprender el compuesto de fórmula I o una sal del mismo en otras formas cristalinas o amorfas, o impurezas distintas de estas sustancias.

- 35 Composición farmacéutica y administración

- 40 Se proporciona una composición farmacéutica, que comprende la forma cristalina A del compuesto de fórmula I o la composición cristalina de la misma en una cantidad eficaz. Además, la composición farmacéutica también puede comprender o no un vehículo, excipiente y/o medio farmacéuticamente aceptables.

- 45 El compuesto de acuerdo con la invención se administra en forma pura o en una forma de composición farmacéutica adecuada, que puede realizarse a través de cualquier modo de administración aceptable del agente con un uso similar. La composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede prepararse combinando el compuesto de acuerdo con la invención o la sal del mismo con un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, puede formularse en una formulación sólida, semisólida, líquida o gaseosa, tal como comprimido, píldora, cápsula, polvo, gránulo, pomada, emulsión, suspensión, solución, suppositorio, inyección, inhalador, gel, microesfera, aerosol o similares.

- 50 La composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede prepararse mediante los procesos bien conocidos en la técnica, tales como mezcla, disolución, granulación, recubrimiento de grageas, levigación, emulsión, liofilización o similares convencionales.

- 55 Las vías típicas para la administración del compuesto de acuerdo con la invención o la composición farmacéutica del mismo comprenden, pero sin limitación, la administración oral, rectal, transmucosa, enteral o la administración local, transcutánea, inhalada, parenteral, sublingual, intravaginal, intranasal, intraocular, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intravenosa.

- 60 En una realización preferida, la composición farmacéutica es en una forma de administración oral. En cuanto a la administración oral, los compuestos activos pueden mezclarse con los vehículos, excipientes y/o medios farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica para preparar la composición farmacéutica. Los vehículos, excipientes y medios pueden usarse para preparar los compuestos de acuerdo con la invención en comprimido, píldora, trocisco, gragea, cápsula, líquido, gel, pasta, suspensión o similares útiles para la administración oral al paciente.

- 65 La composición oral sólida puede prepararse mediante procesos convencionales de mezcla, llenado o compresión, por ejemplo, mediante los siguientes procesos: mezclar el compuesto activo con excipientes sólidos, opcionalmente

5 moler la mezcla resultante, añadir otros adyuvantes adecuados si es necesario y después procesar la mezcla en gránulos de manera que se obtenga el núcleo del comprimido o la gragea. Los excipientes adecuados comprenden, pero sin limitación, carga, tal como azúcar, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparación de celulosa tal como celulosa microcristalina, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz y almidón de patata; y otras sustancias, tales como gel de sílice, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetylcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona; desengrasante, tal como almidón de carboximetilo de sodio, croscarmelosa de sodio, polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico. También puede usarse sal, tal como alginato de sodio. El núcleo de la gragea puede recubrirse opcionalmente a través de procesos bien conocidos en la práctica farmacéutica general, especialmente mediante recubrimiento entérico.

10

Efectos beneficiosos

15

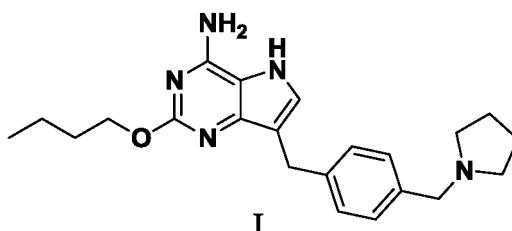
La forma cristalina A del compuesto de fórmula I de acuerdo con la invención tiene las ventajas de una alta pureza, una alta cristalinidad y una buena estabilidad. Por otra parte, el proceso de preparación de la forma cristalina A de acuerdo con la invención es simple, el disolvente es barato y fácil de obtener, la condición de la forma cristalina es suave y el proceso es adecuado para la producción industrial.

20

Las soluciones técnicas de la invención se ilustran de acuerdo con los siguientes párrafos [1] a [20]:

25

[1] Una forma cristalina A del compuesto de fórmula I



25

caracterizada por que tiene picos de difracción a $2\theta = 5,5^\circ \pm 0,2^\circ, 10,1^\circ \pm 0,2^\circ, 13,8^\circ \pm 0,2^\circ, 19,7^\circ \pm 0,2^\circ, 23,7^\circ \pm 0,2^\circ, 24,1^\circ \pm 0,2^\circ$ en un patrón de difracción de rayos X de polvo.

30

[2] La forma cristalina A del compuesto de fórmula I de acuerdo con el párrafo [1], caracterizada por que tiene picos de difracción a $2\theta = 5,5^\circ \pm 0,2^\circ, 10,1^\circ \pm 0,2^\circ, 13,8^\circ \pm 0,2^\circ, 16,4^\circ \pm 0,2^\circ, 19,7^\circ \pm 0,2^\circ, 23,7^\circ \pm 0,2^\circ, 24,1^\circ \pm 0,2^\circ, 27,9^\circ \pm 0,2^\circ$ en un patrón de difracción de rayos X de polvo.

35

[3] La forma cristalina A del compuesto de fórmula I de acuerdo con el párrafo [2], caracterizada por que tiene picos de difracción a $2\theta = 5,5^\circ \pm 0,2^\circ, 10,1^\circ \pm 0,2^\circ, 13,8^\circ \pm 0,2^\circ, 16,4^\circ \pm 0,2^\circ, 17,9^\circ \pm 0,2^\circ, 19,0^\circ \pm 0,2^\circ, 19,7^\circ \pm 0,2^\circ, 20,3^\circ \pm 0,2^\circ, 21,8^\circ \pm 0,2^\circ, 22,1^\circ \pm 0,2^\circ, 23,7^\circ \pm 0,2^\circ, 24,1^\circ \pm 0,2^\circ, 25,5^\circ \pm 0,2^\circ, 27,9^\circ \pm 0,2^\circ, 32,9^\circ \pm 0,2^\circ, 34,0^\circ \pm 0,2^\circ$ en un patrón de difracción de rayos X de polvo.

40

[4] La forma cristalina A de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos [1]-[3], caracterizada por que, tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo que se muestra sustancialmente en la Figura 1.

45

[5] La forma cristalina A de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos [1]-[4], caracterizada por que, tiene los siguientes parámetros de celda:

$$\begin{aligned} a &= 16,560 (3) \text{ \AA} \\ b &= 10,426 (2) \text{ \AA} \\ c &= 12,203 (2) \text{ \AA} \end{aligned}$$

$$\alpha = 90^\circ$$

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

$$\gamma = 90^\circ$$

Grupos espaciales: P21/c

$$Z = 4.$$

50

[6] La forma cristalina A de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos [1]-[5], caracterizada por que, cuando se caracteriza mediante CDB, la temperatura inicial es de $199,0^\circ \text{C} \pm 5^\circ \text{C}$ y la temperatura máxima es de $200,4^\circ \text{C} \pm 5^\circ \text{C}$.

55

[7] Un proceso para preparar la forma cristalina A de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos [1]-[6], que comprende las siguientes etapas:

- 1) disolver el compuesto de fórmula I en un disolvente de cristalización, que preferentemente se calienta para

promover la disolución; y

2) enfriar para la cristalización, filtrar, lavar y secar para obtener la forma cristalina A.

5 [8] El proceso de preparación de acuerdo con el párrafo [7], caracterizado por que el disolvente de cristalización de la etapa 1) se selecciona entre el grupo que consiste en metanol, etanol, propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, butanol terciario, acetona, acetato de etilo, agua y disolvente mixto de los mismos.

10 [9] El proceso de preparación de acuerdo con el párrafo [8], caracterizado por que el disolvente de cristalización es etanol.

15 [10] El proceso de preparación de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos [7]-[9], caracterizado por que, en la etapa 1), la cantidad de disolvente de cristalización añadido por 1 g del compuesto de fórmula I es de 2 a 10 ml.

[11] El proceso de preparación de acuerdo con el párrafo [10], caracterizado por que la cantidad de disolvente de cristalización añadido por 1 g del compuesto de fórmula I es de 4 a 8 ml.

[12] El proceso de preparación de acuerdo con el párrafo [11], caracterizado por que la cantidad de disolvente de cristalización añadido por 1 g del compuesto de fórmula I es de 5 a 7 ml.

20 [13] El proceso de preparación de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos [7]-[12], caracterizado por que, en la etapa 1), se usa calentamiento para formar un sistema homogéneo del compuesto de fórmula I y el disolvente de cristalización.

25 [14] El proceso de preparación de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos [7]-[13], caracterizado por que, en la etapa 1), la temperatura de calentamiento puede ser de 40 °C a 90 °C.

[15] El proceso de preparación de acuerdo con el párrafo [14], caracterizado por que, en la etapa 1), la temperatura de calentamiento puede ser de 50 °C a 80 °C.

30 [16] El proceso de preparación de acuerdo con el párrafo [15], caracterizado por que, en la etapa 1), la temperatura de calentamiento puede ser de 70 °C a 80 °C.

35 [17] Una composición cristalina, caracterizada por que, basándose en el peso de la composición cristalina, la forma cristalina A del compuesto de fórmula I de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos [1]-[6] es del 50 % o más, preferentemente del 80 % o más, más preferentemente del 90 % o más y mucho más preferentemente del 95 % o más.

[18] Una composición farmacéutica, que comprende la forma cristalina A de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos [1]-[6] o la composición cristalina de acuerdo con el párrafo [17] en una cantidad eficaz.

40 [19] Uso de la forma cristalina A del compuesto de fórmula I de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos [1]-[6] o la composición cristalina de acuerdo con el párrafo [17] o la composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo [18] para la fabricación de un medicamento para tratar enfermedades asociadas al receptor de tipo Toll 7 (TLR7).

45 [20] El uso de acuerdo con el párrafo [19], caracterizado por que la enfermedad es una infección vírica, particularmente la infección vírica es la infección con el virus de la hepatitis, por ejemplo, la infección con el virus de la hepatitis B o la hepatitis C.

Ejemplos

50 En el presente documento se usan las siguientes abreviaturas: SEM-Cl: cloruro de 2-(trimetilsilil)etoximetilo; SEM: 2-(trimetilsilil)etoximetilo; DIPEA: diisopropiletilamina; TFA: ácido trifluoroacético; DMF: N,N-dimetilformamida; n-BuOH: n-butanol; NH₃·H₂O: amoníaco acuoso; Na: sodio; DRXP: difracción de rayos X de polvo; CDB: análisis térmico diferencial.

55 Los disolventes utilizados en el presente documento están disponibles en el mercado y pueden usarse sin purificación adicional. Las reacciones de síntesis en los ejemplos de preparación se realizan generalmente en atmósfera de nitrógeno inerte en disolvente anhídrico. Los datos de la resonancia magnética de protones se recodifican en el espectrómetro Bruker Avance III 400 (400 MHz), con el desplazamiento químico que se muestra como (ppm) en el campo bajo de tetrametilsilano. La espectrometría de masas se determina en Agilent 1200 plus 6110 (&1956A). CL/EM o EM Shimadzu incluyen un DMD: SPD-M20A(CL) y el detector Shimadzu Micromass 2020. El espectrómetro de masas está equipado con una ionización por electronebulización (IEN) que funciona en modo positivo o negativo.

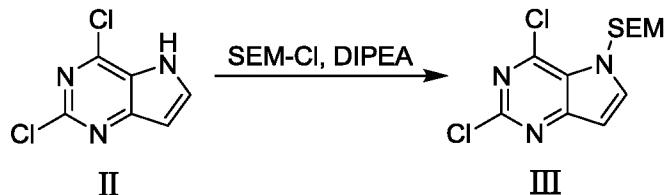
Ejemplo de Preparación 1:

65 Preparación de 2-butoxi-7-(4-(pirrolidin-1-ilmetil)bencil)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-4-amina

Fórmula III:

2,4-dicloro-5-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina

5

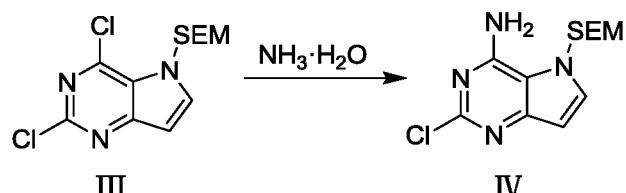


10 El compuesto de fórmula II (2,4-dicloro-5H-pirrol[3,2-d]pirimidina) (4,00 kg, 21,28 mol) se disolvió en DMF (20,00 l) y se añadió DIPEA (2,58 kg, 20,00 mol) en porciones a temperatura ambiente (25 °C) seguido de agitación durante 30 min. El líquido de reacción se enfrió a 0 °C con un baño de hielo y después se añadió SEM-Cl (4,00 kg, 24,00 mol) gota a gota lentamente durante 5 h a una velocidad de goteo de 1 a 2 gotas por segundo. Después de la adición, el líquido de reacción se agitó a 0 °C durante 4 h. La reacción se controló mediante HPLC. Después de la finalización, el líquido de reacción se inactivó y se diluyó con 70 l de agua y después se extrajo con acetato de etilo (15 l x 3). La fase orgánica combinada se lavó sucesivamente con ácido clorhídrico acuoso 1 M (5 l x 2) y salmuera saturada (7 l x 2), y el disolvente se retiró mediante destilación a presión reducida para proporcionar el compuesto de fórmula III (6,40 kg, 20,11 mol, rendimiento del 94,50 %).

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,24 - 8,35 (m, 1 H), 6,70 - 6,85 (m, 1 H), 5,77 (s, 2 H), 3,45 - 3,57 (m, 2 H), 0,74 - 0,86 (m, 2 H), 0,00 (s, 9 H).

20 Fórmula IV:

2-cloro-5-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-4-amina



25 El compuesto de fórmula III (1,60 kg, 5,03 mol) se disolvió en isopropanol (1,60 l) en un autoclave de 10 l. Se añadió amoníaco acuoso (4 l) a temperatura ambiente (25 °C) en una porción y la mezcla de reacción se agitó a 95 °C durante 7 h. La reacción se controló mediante HPLC. Después de la finalización, el líquido de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró a través de un embudo Buchner para proporcionar un sólido de color pardo oscuro.

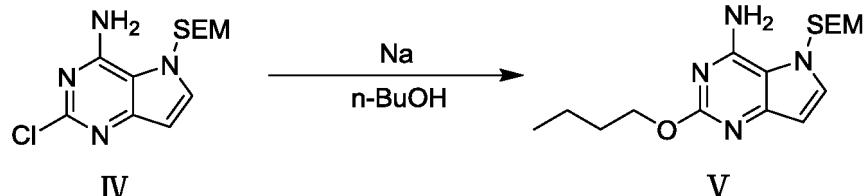
30 El sólido se suspendió sucesivamente con acetato de etilo/n-heptano (1/1,5 l x 2) y acetato de etilo (4 l) para proporcionar el compuesto de fórmula IV en forma de un sólido de color pardo (1,25 kg, 4,18 mol, rendimiento del 83,1 %).

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,61 - 7,77 (m, 1 H), 6,97 - 7,19 (m, 2 H), 6,28 - 6,38 (m, 1 H), 5,54 - 5,67 (m, 2 H), 3,43 - 3,53 (m, 2 H), 0,76 - 0,91 (m, 2 H), 0,07 (s, 9 H).

35 www.ijerph.com | dx.doi.org/10.3390/ijerph1603035

Fórmula V:

2-butoxi-5-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-4-amina

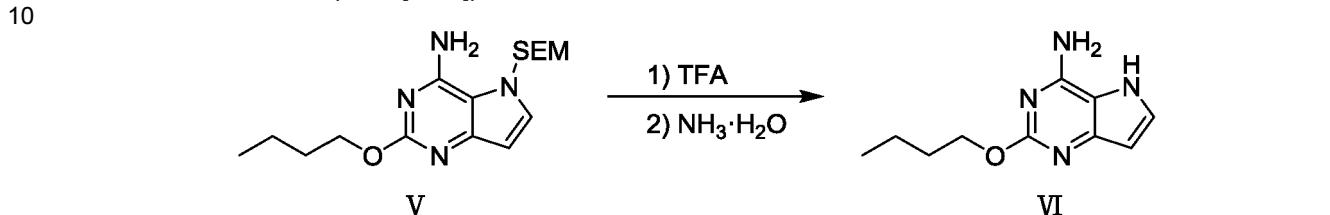


45 A n-BuOH (17,0 l) se le añadió lentamente sodio metal (525,05 g, 22,84 mol) en porciones en nitrógeno. Después de la adición, la temperatura del sistema se elevó a 60 °C y se agitó de forma continua a la temperatura hasta que el sodio metal se disolvió completamente. Después, el sistema se enfrió a 25 °C y el compuesto de fórmula IV (1,95 kg, 6,53 mol) se añadió en porciones. Después de mezclarla homogéneamente con agitación, la mezcla de reacción se agitó de forma continua durante 8 h a 90 °C. La reacción se controló mediante HPLC. Después de la finalización, la mezcla de reacción se dejó enfriar espontáneamente a 25 °C y se vertió lentamente en 30 l de cloruro de amonio acuoso saturado. Después, la mezcla de reacción se extrajo se extrajo con acetato de etilo (15 l x 3) y la fase orgánica

combinada se lavó con salmuera saturada (20 l x 2), se secó con Na_2SO_4 anhídrico y se filtró. Después de retirar el disolvente por destilación a presión reducida, el residuo se suspendió en n-heptano (4 l) y el sólido se separó por filtración y después se mezcló en acetato de etilo (5 l) para proporcionar el compuesto de fórmula V en forma de un sólido de color amarillo-blanco (1,53 kg), 4,55 mol, 69,7 %.

- 5 RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,49 - 7,54 (m, 1 H), 6,54 - 6,62 (m, 2 H), 6,15 - 6,20 (m, 1 H), 5,54 (s, 2 H), 4,10 - 4,22 (m, 2 H), 3,42 - 3,55 (m, 2 H), 1,58 - 1,73 (m, 2 H), 1,35 - 1,47 (m, 2 H), 0,90 - 0,96 (m, 3 H), 0,83 - 0,89 (m, 2 H), 0,05 (s, 9 H).

Fórmula VI: 2-butoxi-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-4-amina

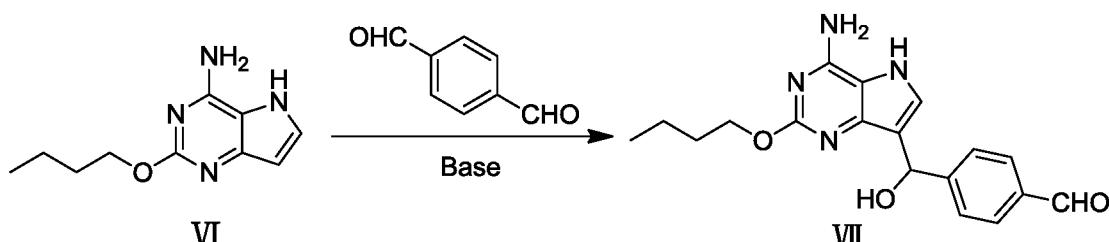


El compuesto de fórmula V (1,10 kg, 3,27 mol) se disolvió en TFA (5,50 l) y el líquido de reacción se agitó a 25 °C durante 16 h. La reacción se controló mediante HPLC. Después de la finalización, el TFA se retiró mediante destilación a presión reducida y el residuo se disolvió en metanol (1,2 l) y agua helada (1,2 l). El pH del sistema se ajustó a 12 con amoníaco acuoso concentrado con agitación uniforme. La mezcla se agitó durante 2 h y el precipitado precipitó en la solución de forma continua. Después de la filtración, la torta de filtro en forma de un sólido de color blanco se mezcló con amoníaco acuoso al 15 % (1,2 l x 3) y acetato de etilo (4 l) sucesivamente para proporcionar el compuesto de fórmula VI en forma de un sólido de color blanco (550,00 g, 2,67 mol, 81,7 %).

- 15
- 20 RMN de ^1H (400 MHz, metanol- d_4) δ 7,37 (d, J = 2,89 Hz, 1 H), 6,29 (d, J = 3,01 Hz, 1 H), 4,27 (t, J = 6,53 Hz, 2 H), 1,75 (d, J = 7,91 Hz, 2 H), 1,44 - 1,61 (m, 2 H), 1,00 (t, J = 7,40 Hz, 3 H).

Fórmula VII:

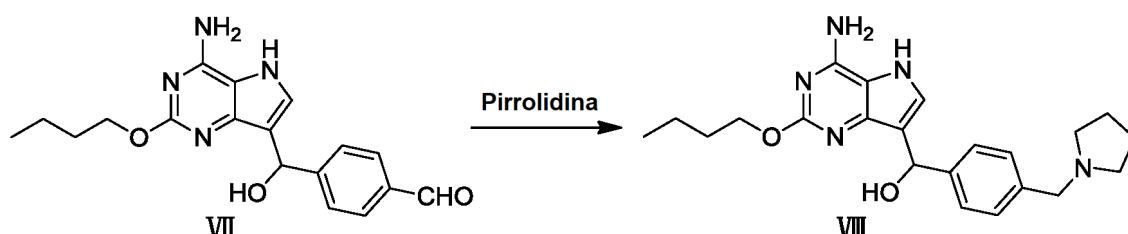
- 25 4-((4-amino-2-butoxi-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)-hidroximetil)benzaldehído



- 30 A un matraz de tres bocas se le añadieron tereftalaldehído (790,64 mg, 5,82 mmol) e isopropanol (10 ml), se añadió 2-butoxi-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-4-amina (1,00 g, 4,85 mmol) con agitación y el sistema se enfrió a 0 °C y se agitó durante otros 10 min. Se añadieron agua purificada (10 ml) y carbonato de potasio (804,17 mg, 5,82 mmol) y la mezcla reaccionó a 25 °C durante 16 h hasta que se agotaron las materias primas con control mediante CLEM. El sólido precipitó después de que la reacción se completase. Después de la filtración, el sólido resultante se mezcló con 20 ml de agua purificada y 30 ml (acetato de etilo/n-heptano=1/20) sucesivamente, se filtró y se secó para proporcionar al compuesto de fórmula VII en forma de un sólido de color amarillo (1,50 g, 4,41 mmol, rendimiento: 90,9 %).
RMN de ^1H (400 MHz, metanol- d_4) δ 9,94 (s, 1 H), 7,86 (d, J = 8,16 Hz, 2 H), 7,72 (d, J = 8,16 Hz, 2 H), 7,12 - 7,17 (m, 1 H), 6,19 (s, 1 H), 4,28 (t, J = 6,53 Hz, 2 H), 1,68 - 1,77 (m, 2 H), 1,44 - 1,54 (m, 2 H), 0,97 (t, J = 7,34 Hz, 3 H).

Fórmula VIII:

- 40 (4-amino-2-butoxi-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-7-il)(4-(pirrolidin-1-ilmetil)fenilo) metanol



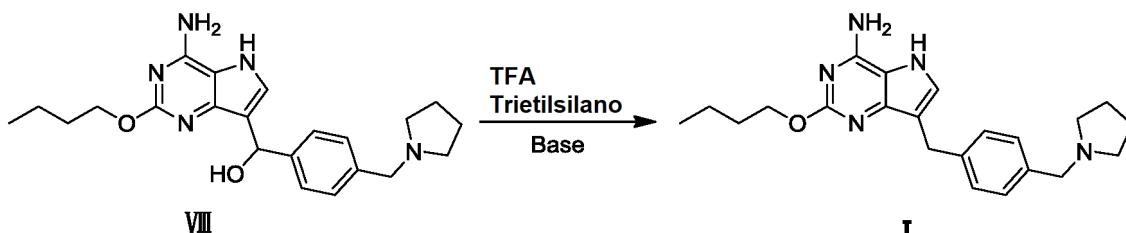
- 45 A un autoclave de 30 l se añadieron el compuesto de fórmula VII (450,0 g, 1,32 mol) e isopropanol (4,5 l), y la mezcla

se agitó durante 5 min. Después se añadió ácido acético glacial (119,0 g, 1,98 mol) y la temperatura del sistema se bajó a 0-10 °C con agitación. Se añadió pirrolidina (112,4 g, 1,58 mol) gota a gota, con la temperatura por debajo de 10 °C. Después de la adición, se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (420,0 g, 1,98 mol) en porciones y reaccionó a 10-20 °C durante 3 h hasta que las materias primas se agotaron con control mediante cromatografía líquida. Después

5 de la finalización de la reacción, se añadieron 5 l de agua purificada y la temperatura de la solución se bajó a aproximadamente -10 °C, y se añadieron 12 l de amoníaco acuoso al 15 % a la solución, con la temperatura de la solución por debajo de 0 °C durante la adición. El sólido precipitó con agitación. Se realizó una filtración y la torta de filtro resultante se suspendió con 2 l de agua y 2 l x 2 de acetato de etilo. Se realizó la filtración y se secó a presión reducida a 40 °C durante 12 h para proporcionar el compuesto de fórmula VIII en forma de un sólido de color amarillo (465,0 g, 1,18 mol, rendimiento del 89,4 %, humedad del 0,9 %).

10 RMN de ^1H (400 MHz, metanol-d₄) δ 7,46 (d, J = 7,91 Hz, 1 H), 7,29 (d, J = 8,03 Hz, 1 H), 7,09 (s, 1 H), 6,12 (s, 1 H), 4,29 (t, J = 6,53 Hz, 2 H), 3,60 (s, 2 H), 2,52 (s a, 4 H), 1,66 - 1,83 (m, 6 H), 1,49 (d, J = 7,53 Hz, 2 H), 0,98 (t, J = 7,40 Hz, 3 H).

15 Fórmula I: 2-butoxi-7-(4-(pirrolidin-1-ilmetil)bencil)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-4-amina



20 A un autoclave de 20 l se le añadieron el compuesto de fórmula VIII (440,0 g, 1,11 mol) y diclorometano (7,0 l), y la temperatura del sistema se redujo a por debajo de -15 °C con agitación. Después de que se añadiese trietilsilano (880 ml, 5,55 mol) gota a gota, se añadió ácido trifluoroacético (880 ml) gota a gota, manteniendo la temperatura por debajo de -10 °C durante la adición. Después de la adición, la reacción se realizó a 0 °C durante 2 h y se controló mediante cromatografía líquida hasta que el punto de la materia prima desapareció. Después de la finalización de la reacción, el líquido de reacción se concentró a sequedad y se añadieron 2,2 l de acetato de etilo a la solución. Se realizó agitación para bajar la temperatura a debajo de 0 °C. Después, se añadió solución saturada de carbonato de sodio para ajustar la solución a pH 9-10, durante lo cual la temperatura del sistema se mantuvo por debajo de 10 °C. Se realizó una filtración y la torta de filtro resultante se suspendió con 2,2 l de agua. Se realizó una filtración y se secó a presión reducida para proporcionar 550 g de trifluoroacetato del compuesto de fórmula I en forma de un sólido de color blanco.

30 35 A 1,6 l de etanol se le añadieron 525 g de trifluoroacetato del compuesto de fórmula I en forma de un sólido de color blanco y la temperatura del sistema se redujo a aproximadamente 0 °C con agitación. Después, se añadieron 2,2 l de solución de hidróxido de sodio 1 mol/l. Se realizó una filtración y la torta de filtro resultante se suspendió con 2,5 l de agua purificada. Se realizó una filtración y se secó a presión reducida para proporcionar 380,0 g del compuesto de fórmula I en forma de un sólido.

RMN de ^1H (400 MHz, metanol-d₄) δ 7,27 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,22 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,04 (s, 1H), 4,32 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 3,99 (s, 2H), 3,60 (s, 2H), 2,55 - 2,52 (m, 4H), 1,85 - 1,71 (m, 6H), 1,55-1,48 (m, 2H), 1,00 (t, J = 7,4 Hz, 3H).

40 Ejemplo 1: preparación de la forma cristalina A de 2-butoxi-7-(4-(pirrolidin-1-ilmetil)bencil)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-4-amina

45 A etanol (2,3 l) se le añadió el compuesto de fórmula I (380 g) obtenido en el ejemplo de preparación 1, y la mezcla se calentó a reflamo y se agitó para que se disolviese totalmente. Después de la filtración, el filtrado se enfrió a temperatura ambiente y se dejó reposar para su cristalización. Se realizó una filtración y la torta de filtro obtenida se secó a presión reducida para proporcionar 310,0 g de sólido, es decir, la forma cristalina A del compuesto de fórmula I.

50 La DRXP se midió de la siguiente manera: aparato: difractómetro de rayos X Bruker D8 ADVANCE; método: objetivo: Cu: K-Alfa; longitud de onda λ = 1,54179 Å; tensión: 40 kV; corriente: 40 mA; intervalo de barrido: 4-40 °; velocidad de rotación de la muestra: 15 rpm; velocidad de barrido: 10 °/min.

El cristal del compuesto obtenido tenía picos de difracción sustancialmente como se muestra en la Figura 1.

Ejemplo 2: Ensayo de estabilidad a temperatura alta

55 La forma cristalina A del compuesto de fórmula I se sometió a ensayo en el ensayo acelerado en condiciones de temperatura alta para determinar su estabilidad de conformidad con las Directrices para el Ensayo de Estabilidad de Ingredientes Farmacéuticos y Preparaciones Farmacéuticas (Farmacopea China 2010 Apéndice XIXC).

La forma cristalina A preparada en el Ejemplo 1 se colocó en un recipiente abierto y limpio a 60 °C. Las muestras se tomaron para el ensayo el día 10, el día 20 y el día 30, respectivamente. Los resultados se compararon con el resultado inicial del ensayo en el día 0 y los resultados se mostraron en la Tabla 1.

5

Tabla 1

Tiempo de muestreo (día)	Aspecto	Contenido (%)	Contenido total de impurezas (%)
0	Polvo de color blanco	99,8	0,92
10	Polvo de color amarillo claro	98,5	1,10
20	Polvo de color amarillo claro	98,1	1,18
30	Polvo de color amarillo claro	98,8	1,29

Se demostró en el ensayo de estabilidad a temperatura alta que, la forma cristalina A del compuesto de fórmula I tiene buena estabilidad en condiciones de temperatura alta.

10 Ejemplo 3: Ensayo de estabilidad con humedad alta

La forma cristalina A del compuesto de fórmula I se sometió a ensayo en el ensayo acelerado en condiciones de humedad alta para determinar su estabilidad de conformidad con las Directrices para el Ensayo de Estabilidad de Ingredientes Farmacéuticos y Preparaciones Farmacéuticas (Farmacopea China 2010 Apéndice XIXC).

15

La forma cristalina A preparada en el Ejemplo 1 se sometió a un ensayo acelerado en un recipiente de temperatura y humedad constantes en las condiciones de 40 °C/humedad del 75 % (abierto). Las muestras se tomaron para el ensayo el día 30, el día 60 y el día 90, respectivamente. Los resultados se compararon con los resultados iniciales del ensayo en el día 0 y los resultados se mostraron en la siguiente Tabla 2.

20

Tabla 2

Condiciones de ensayo	Tiempo de muestreo (día)	Aspecto	Contenido (%)	Contenido total de impurezas (%)
40 °C/humedad del 75 % (abierto)	0	Polvo de color blanco	100,2	0,92
	30	Polvo de color blanco	99,9	0,92
	60	Polvo de color blanco	99,9	0,65
	90	Polvo de color blanco	100,2	0,93

Se demostró en el ensayo de estabilidad con humedad alta que, la forma cristalina A del compuesto de fórmula I tiene buena estabilidad en condiciones de humedad alta.

25

Ejemplos de actividad farmacéutica

Ejemplo de eficacia 1: Detección de actividad de unión a receptores *in vitro* del receptor de tipo Toll 7 y del receptor de tipo Toll 8

30

Reactivos:

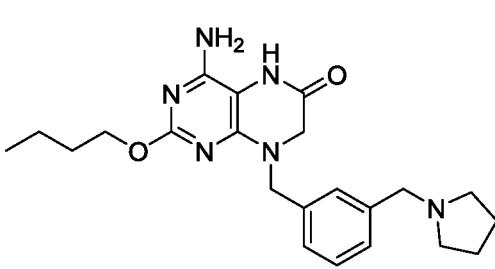
célula hTLR7 HEK-blue y célula hTLR8 HEK-blue (disponible en InvivoGen)
medio DMEM

35

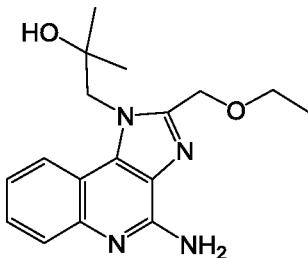
suero fetal bovino inactivado por calor
reactivo anti micoplasma Normocin™
bleomicina
blasticidina

40

Las estructuras de GS-9620 y R848 utilizados son de la siguiente manera, en donde la preparación de GS-9620 podría referirse al proceso desvelado en el documento US20100143301; R848 estaba disponible en el mercado en ABGENT (IMG-2208, especificación: 0,5 mg).



GS9620



R848/Resiquimod

Esquema:

- 5 1. Preparación de una placa de compuesto de 96 pocillos:
Los compuestos se diluyeron en gradiente con DMSO 3 veces usando una estación de trabajo con líquidos POD, comenzando a una concentración de 10 mmol/l y se diluyeron 10 puntos (de la 2^a columna a la 11^a columna, y cada punto se duplicó). En la 12^a columna, se añadió 1 μ l de compuesto positivo R848 5 mg/ml como control positivo; y en la 1^a columna, se añadió 1 μ l de DMSO como control negativo. Cada pocillo contenía 1 μ l de DMSO.

10 2. Se recogieron las células en un matraz de cultivo y la densidad celular se diluyó a 250.000 células/ml.

15 3. Se añadieron 200 μ l (50.000 células/pocillo) de suspensión celular en una placa de compuesto preparado y la concentración final de DMSO en cada pocillo fue del 0,5 %.

20 4. Las placas de cultivo que contenían las células y los compuestos se incubaron en un incubador de CO₂ durante 24 h a 37 °C, CO₂ al 5 %.

25 5. Despues de 24 h de incubación, se retiraron 20 μ l de sobrenadante de cada pocillo a una placa de ensayo transparente de 96 pocillos. A cada pocillo de la placa de ensayo se le añadieron 180 μ l de reactivo Quanti-Blue y la placa se incubó en una incubadora a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 1 h.

6. Despues de 1 h, el contenido de fosfatasa alcalina en 20 μ l de sobrenadante se determinó usando el lector de microplacas Microplate Reader OD650.

25 7. Se obtuvo la CE₅₀ de cada compuesto con el software Prism.

Los resultados se mostraron en la Tabla 3.

Tabla 3

Nombre del compuesto	CE50 de TLR7 (nM)	CE50 de TLR8 (nM)
GS-9620	517	7867
Compuesto de fórmula I	160	11632

El compuesto de fórmula I de acuerdo con la invención mostró una actividad superior de unión a receptores *in vitro* al receptor de tipo Toll 7 con respecto al control (agonista del receptor de tipo Toll 7 GS-9620) y una actividad inferior de unión a receptores *in vitro* al receptor de tipo Toll 8 con respecto al control (agonista del receptor de tipo Toll 7 GS-9620). El compuesto de la presente invención tiene diferencias de selectividad distintivas con respecto a diferentes receptores, y el efecto es superior a la técnica anterior.

Ejemplo de eficacia 2: Esquema de ensayo de células mononucleares de sangre periférica

- 40 El fin de este ejemplo es determinar el nivel de expresión de citocinas 24 h después de la estimulación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas con el compuesto de fórmula I.

El sobrenadante celular se sometió a ensayo sin dilución y se determinaron los niveles de IFN- α directamente. El compuesto de fórmula I se formuló en primer lugar en solución madre 20 mM de DMSO durante el ensayo y se diluyó en gradiente con medio celular 10 veces con el número total de 11 puntos de dilución. Los compuestos en 9 puntos de dilución (la concentración más alta fue de 200 μ mol/l) se añadieron en una placa de 96 pocillos con 50 μ l en cada pocillo. Se inocularon células mononucleares de sangre periférica humana fresca, con 150 μ l en cada pocillo que contenían 450.000 células. La placa de cultivo celular se incubó en una incubadora a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 24 h. Después de la incubación, la placa de cultivo se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min y el sobrenadante se recogió y almacenó a -20 °C para su determinación. La determinación de citocinas se realizó usando matriz de perlas citométricas Cytometric Bead Array (CBA) de BD-Pharmingen en un citómetro de flujo. Usando el método de

determinación anterior, la concentración más baja de fármaco que estimuló la producción de 30 pg/ml de IFN- α se designó como el valor de CME en el ensayo de estimulación de citocinas. Los resultados se mostraron en la Tabla 4.

Tabla 4

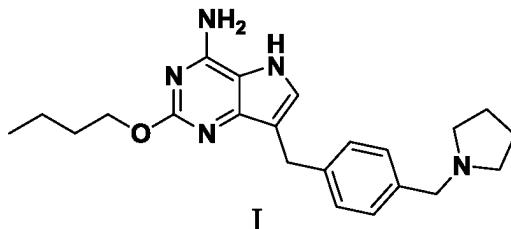
Nombre del compuesto	CME de IFN- α (nM)	CME de TNF- α (nM)
GS-9620	50	500
Compuesto de fórmula I	5	500

5

En comparación con el control (GS-9620), el compuesto de fórmula I de la invención mostró una mejor actividad *in vitro* de inducción de IFN- α de las CMSP y una actividad de inducción de TNF- α comparable.

REIVINDICACIONES

1. Una forma cristalina A del compuesto de fórmula I



caracterizada por que,

la forma cristalina A tiene picos de difracción a $2\theta = 5,5^\circ \pm 0,2^\circ$, $10,1^\circ \pm 0,2^\circ$, $13,8^\circ \pm 0,2^\circ$, $19,7^\circ \pm 0,2^\circ$, $23,7^\circ \pm 0,2^\circ$, $24,1^\circ \pm 0,2^\circ$ en un patrón de difracción de rayos X de polvo.

10 2. La forma cristalina A de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que**,

la forma cristalina A tiene picos de difracción a $2\theta = 5,5^\circ \pm 0,2^\circ$, $10,1^\circ \pm 0,2^\circ$, $13,8^\circ \pm 0,2^\circ$, $16,4^\circ \pm 0,2^\circ$, $19,7^\circ \pm 0,2^\circ$, $23,7^\circ \pm 0,2^\circ$, $24,1^\circ \pm 0,2^\circ$, $27,9^\circ \pm 0,2^\circ$ en un patrón de difracción de rayos X de polvo.

15 3. La forma cristalina A de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizada por que**,

la forma cristalina A tiene picos de difracción a $2\theta = 5,5^\circ \pm 0,2^\circ$, $10,1^\circ \pm 0,2^\circ$, $13,8^\circ \pm 0,2^\circ$, $16,4^\circ \pm 0,2^\circ$, $17,9^\circ \pm 0,2^\circ$, $19,0^\circ \pm 0,2^\circ$, $19,7^\circ \pm 0,2^\circ$, $20,3^\circ \pm 0,2^\circ$, $21,8^\circ \pm 0,2^\circ$, $22,1^\circ \pm 0,2^\circ$, $23,7^\circ \pm 0,2^\circ$, $24,1^\circ \pm 0,2^\circ$, $25,5^\circ \pm 0,2^\circ$, $27,9^\circ \pm 0,2^\circ$, $32,9^\circ \pm 0,2^\circ$, $34,0^\circ \pm 0,2^\circ$ en un patrón de difracción de rayos X de polvo.

20 4. La forma cristalina A de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, **caracterizada por que**, la forma cristalina A tiene picos de difracción a $2\theta = 5,5^\circ \pm 0,2^\circ$, $10,1^\circ \pm 0,2^\circ$, $10,8^\circ \pm 0,2^\circ$, $13,8^\circ \pm 0,2^\circ$, $14,9^\circ \pm 0,2^\circ$, $16,4^\circ \pm 0,2^\circ$, $17,9^\circ \pm 0,2^\circ$, $18,6^\circ \pm 0,2^\circ$, $19,0^\circ \pm 0,2^\circ$, $19,7^\circ \pm 0,2^\circ$, $20,3^\circ \pm 0,2^\circ$, $21,0^\circ \pm 0,2^\circ$, $21,8^\circ \pm 0,2^\circ$, $22,1^\circ \pm 0,2^\circ$, $23,7^\circ \pm 0,2^\circ$, $24,1^\circ \pm 0,2^\circ$, $25,5^\circ \pm 0,2^\circ$, $27,3^\circ \pm 0,2^\circ$, $27,9^\circ \pm 0,2^\circ$, $28,6^\circ \pm 0,2^\circ$, $32,9^\circ \pm 0,2^\circ$, $34,0^\circ \pm 0,2^\circ$ en un patrón de difracción de rayos X de polvo.

25 5. La forma cristalina A del compuesto de fórmula I de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, **caracterizada por que**, la forma cristalina A tiene los siguientes parámetros de celda:

30 $a = 16,560 (3) \text{ \AA}$

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

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

$\alpha = 90^\circ$

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

$\gamma = 90^\circ$

35 Grupos espaciales: $P2_1/c$

$Z = 4$.

40 6. La forma cristalina A del compuesto de fórmula I de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, **caracterizada por que**, cuando se **caracteriza mediante** CDB, la temperatura inicial es de $199,0^\circ \text{ C} \pm 5^\circ \text{ C}$ y la temperatura máxima es de $200,4^\circ \text{ C} \pm 5^\circ \text{ C}$.

45 7. Un proceso para preparar la forma cristalina A del compuesto de fórmula I de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende las siguientes etapas:

- 1) disolver el compuesto de fórmula I en un disolvente de cristalización, que preferentemente se calienta para promover la disolución; y
 2) enfriar para la cristalización, filtrar, lavar y secar para obtener la forma cristalina A.

50 8. El proceso de preparación de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado por que** el disolvente de cristalización de la etapa 1) se selecciona entre el grupo que consiste en metanol, etanol, propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, butanol terciario, acetona, acetato de etilo, agua y disolvente mezclado de los mismos, preferentemente etanol.

55 9. El proceso de preparación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-8, **caracterizada por que**, en la etapa 1), la cantidad de disolvente de cristalización añadido por 1 g del compuesto de fórmula I es de 2 a 10 ml, preferentemente de 4 a 8 ml, más preferentemente de 5 a 7 ml.

10. El proceso de preparación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, **caracterizada por que**, en

la etapa 1), la temperatura de calentamiento es de 40 °C a 90 °C, preferentemente de 50 °C a 80 °C, más preferentemente de 70 °C a 80 °C.

- 5 11. Una composición cristalina, **caracterizada por que**, basándose en el peso de la composición cristalina, la forma cristalina A del compuesto de fórmula I de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 es del 50 % o más, preferentemente del 80 % o más, más preferentemente del 90 % o más y mucho más preferentemente del 95 % o más.
- 10 12. Una composición farmacéutica, que comprende la forma cristalina A del compuesto de fórmula I de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la composición cristalina de acuerdo con la reivindicación 11 o una combinación de las mismas en una cantidad eficaz.
- 15 13. La forma cristalina A del compuesto de fórmula I de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la composición cristalina de acuerdo con la reivindicación 11 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas al receptor de tipo Toll 7, preferentemente la enfermedad es una infección vírica.
- 20 14. La forma cristalina A del compuesto de fórmula I, o la composición cristalina, o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizadas por que**, la infección vírica es la infección con el virus de la hepatitis B o la hepatitis C.

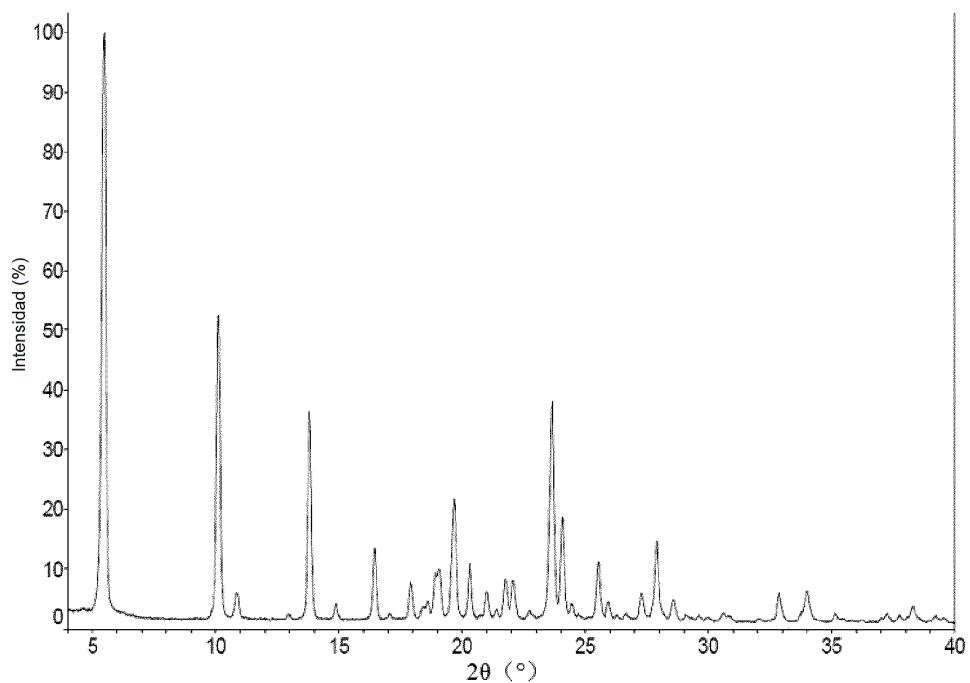


Figura 1

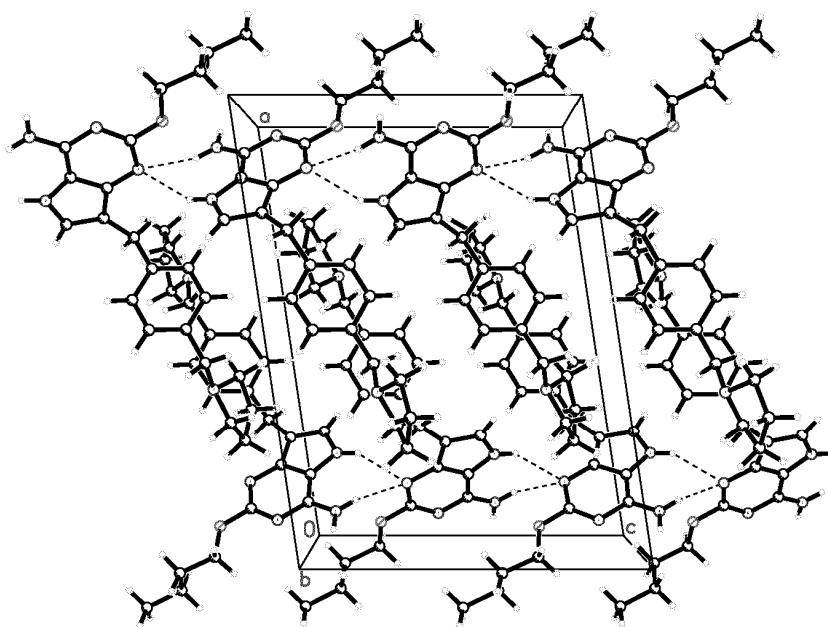


Figura 2

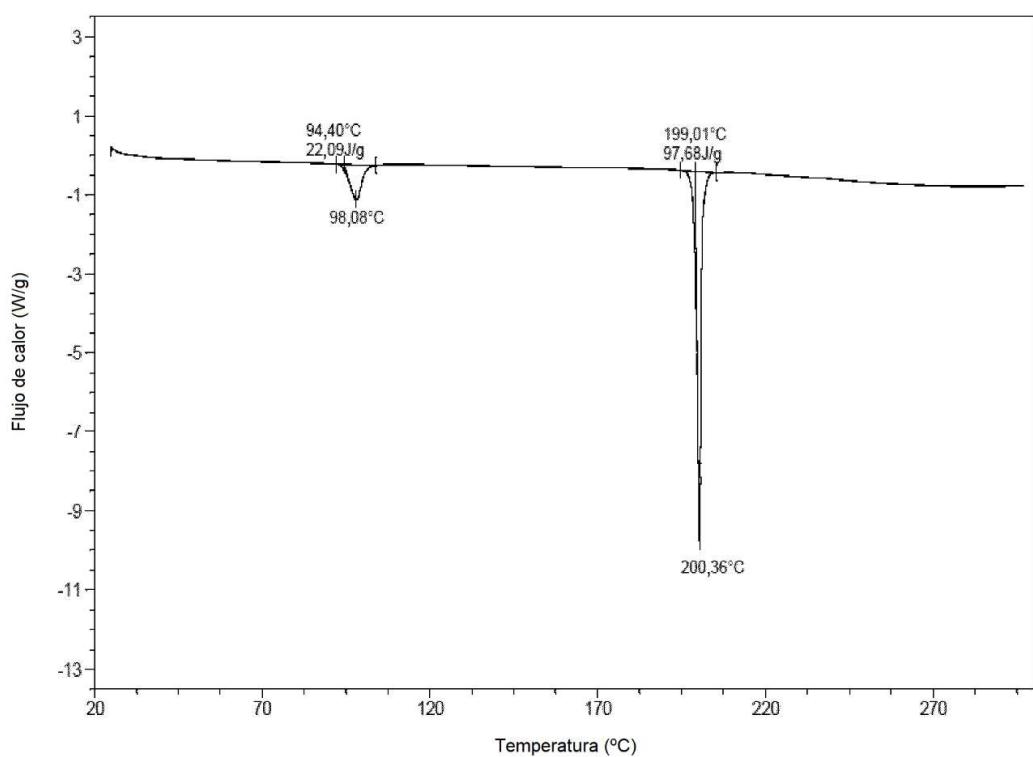


Figura 3