(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 960 703**

(51) Int. Cl.:

C07D 495/04 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 17/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2020 PCT/CN2020/133897**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.06.2021 WO21110138**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2020 E 20896372 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2023 EP 4071153**

(54) Título: **Forma cristalina del compuesto de tieno[2,3-*c*]piridazina-4(1*H*)-ona, método de preparación de la misma y uso de la misma**

(30) Prioridad:

05.12.2019 CN 201911235372

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.03.2024

(73) Titular/es:

ZHANGZHOU PIEN TZE HUANG PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)
No. 1, Hupo Road Xiangcheng District Zhangzhou Fujian Province, 363000, CN y
MEDSHINE DISCOVERY INC. (50.0%)

(72) Inventor/es:

YU, JUAN;
CHEN, ZHILIANG;
WANG, SHICONG;
YIN, TINGTING;
JIAN, KAILI;
ZHENG, XIAOPING;
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

Forma cristalina del compuesto de tieno[2,3-*c*]piridazina-4(1*H*)-ona, método de preparación de la misma y uso de la misma

Campo de la técnica

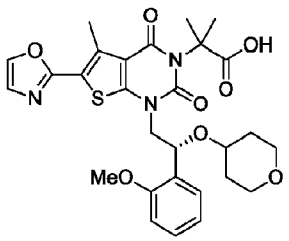
La presente descripción se refiere a una forma cristalina de un compuesto de tieno[2,3-*c*]piridazina-4(1*H*)-ona, y a un método de preparación de la misma.

Antecedentes

El trastorno del metabolismo de los ácidos grasos causado por un aumento de la síntesis de ácidos grasos, una disminución de la oxidación de los ácidos grasos o ambos es un signo de diversos trastornos metabólicos, que incluyen resistencia a la insulina, esteatosis hepática, dislipidemia, obesidad, síndrome metabólico (MetSyn), enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés), etc. Además, el trastorno del metabolismo de los ácidos grasos puede conducir al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés), aterosclerosis y otras enfermedades vasculares. El trastorno del metabolismo de los ácidos grasos también es un signo de cáncer, que puede provocar una proliferación anormal y persistente de células tumorales malignas. Por lo tanto, inhibir la síntesis de los ácidos grasos y/o estimular el metabolismo oxidativo de los ácidos grasos puede ser beneficioso para estas enfermedades (PNAS, 2016, E1796-E1805).

La acetil-CoA carboxilasa (ACC) cataliza la conversión de la acetil-CoA en la malonil-CoA, que es la primera etapa en la síntesis de los ácidos grasos y también es la etapa determinante de la velocidad. Hay dos subtipos de ACC, a saber, ACC1 y ACC2. La ACC1 se distribuye principalmente en el hígado y en el tejido adiposo, mientras que la ACC2 se distribuye principalmente en el hígado, en el corazón y en el tejido muscular. En el hígado, la malonil-CoA formada por catálisis con la ACC1 en el citoplasma es la principal responsable de la síntesis y elongación de los ácidos grasos; la malonil-CoA formada por catálisis con la ACC2 en la superficie de las mitocondrias regula principalmente el metabolismo oxidativo de los ácidos grasos mediante la inhibición de una carnitina transferasa I (PNAS, 2016, E1796-E1805). Por lo tanto, la inhibición simultánea de los dos subtipos de la ACC puede reducir la síntesis de los ácidos grasos y estimular el metabolismo oxidativo de los ácidos grasos.

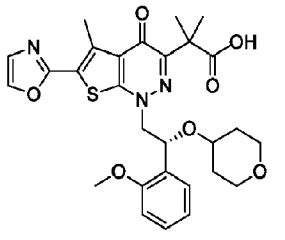
El Documento de Patente de Número WO 2013071169 A1 describe el uso de un inhibidor de la ACC, I-181, en el tratamiento de enfermedades relacionadas.



I-181

Contenido de la presente invención

La presente descripción proporciona una forma cristalina B de un compuesto de fórmula (I), en donde la forma cristalina tiene un patrón de difracción de rayos X de muestras en polvo que comprende picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ: 7,90 ± 0,20°, 17,35 ± 0,20° y 21,50. ± 0,20°; con el patrón de difracción de rayos X de muestras en polvo medido mediante radiación Cu-Kα;



(I) .

En algunas realizaciones de la presente descripción, la forma cristalina B mencionada anteriormente tiene un patrón de difracción de rayos X de muestras en polvo que comprende picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ: 5,79 ± 0,20°, 7,90 ± 0,20°, 13,45 ± 0,20°, 16,51 ± 0,20°, 17,35 ± 0,20°, 18,38 ± 0,20°, 21,50 ± 0,20° y 25,08 ± 0,20°.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la forma cristalina B mencionada anteriormente tiene un patrón de difracción de rayos X de muestras en polvo que comprende picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ: 5,79°, 6,89°, 7,90°, 8,51°, 9,39°, 11,59°, 12,25°, 13,45°, 13,79°, 15,60°, 16,51°, 17,35°, 18,38°, 19,47°, 21,50°, 23,47°, 24,69°, 25,08° y 29,19°.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la forma cristalina B mencionada anteriormente tiene un patrón XRPD (por sus siglas en inglés) como se muestra en la Figura 1.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la forma cristalina B mencionada anteriormente tiene los datos del análisis del patrón de XRPD como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos del análisis del patrón de XRPD de la forma cristalina B

N.º	Ángulo 2θ (°)	Intensidad	Intensidad relativa [%]	N.º	Ángulo 2θ (°)	Intensidad	Intensidad relativa [%]
1	5,79	437,68	23,89	11	16,51	313,35	17,10
2	6,89	148,37	8,10	12	17,35	1.832,41	100,00
3	7,90	1.265,69	69,07	13	18,38	408,20	22,28
4	8,51	195,91	10,69	14	19,47	123,64	6,75
5	9,39	100,79	5,50	15	21,50	426,17	23,26
6	11,59	176,87	9,65	16	23,47	156,44	8,54
7	12,25	86,38	4,71	17	24,69	231,04	12,61
8	13,45	223,69	12,21	18	25,08	403,47	22,02
9	13,79	175,06	9,55	19	29,19	74,22	4,05
10	15,60	134,39	7,33				

En algunas realizaciones de la presente descripción, la forma cristalina B mencionada anteriormente tiene una curva del análisis termogravimétrico que muestra una pérdida de peso del 11,07 % a 120,0°C ± 3°C; una pérdida de peso del 4,84 % entre 120,0°C ± 3°C y 200,0°C ± 3°C; la curva del análisis termogravimétrico se obtiene a una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

En algunas realizaciones de la presente descripción, la forma cristalina B mencionada anteriormente tiene un patrón del TGA como se muestra en la Figura 2.

Efectos técnicos

La forma cristalina B del compuesto de fórmula (I) en la presente descripción es estable, y se ve menos afectada por la luz, el calor y la humedad; además, el compuesto de fórmula (I) y su forma cristalina B en la presente descripción tienen buena eficacia *in vivo*, y tienen una amplia perspectiva para la preparación de fármacos.

Definición y descripción

A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos y frases usados en la presente invención tienen los siguientes significados. Una frase o término específico no se debe considerar incierto o poco claro a menos que esté específicamente definido, sino que se debe entender en su sentido ordinario. Cuando un nombre comercial aparece en la presente invención, se pretende hacer referencia al producto correspondiente o a un ingrediente activo del mismo.

Los compuestos intermedios de la presente descripción se pueden preparar mediante diversos métodos sintéticos bien conocidos por un experto en la técnica, incluidas las realizaciones específicas enumeradas a continuación, las realizaciones formadas por la combinación con otros métodos de síntesis química, y las realizaciones alternativas equivalentes bien conocidas por una persona experta en la técnica, en donde las realizaciones preferidas incluyen, entre otras, los ejemplos de la presente descripción.

Las reacciones químicas descritas en las realizaciones específicas de la presente descripción se completan en un disolvente adecuado, en donde el disolvente debe ser adecuado para los cambios químicos de la presente descripción y para los reactivos y materiales requeridos por los mismos. Para obtener los compuestos de la presente descripción, a veces un experto en la técnica necesita modificar o seleccionar etapas de síntesis o esquemas de reacción basados en las realizaciones existentes.

La presente descripción se describirá específicamente a continuación mediante ejemplos que no pretenden limitar la presente descripción de manera alguna.

Todos los disolventes usados en la presente descripción están disponibles comercialmente y se pueden usar sin purificación adicional.

Los disolventes usados en la presente descripción están disponibles comercialmente. La presente descripción usa las siguientes abreviaturas: EtOH representa etanol; MeOH representa metanol; TFA representa ácido trifluoroacético; TsOH representa ácido *p*-toluenosulfónico; pf representa el punto de fusión; $EtSO_3H$ representa ácido etanosulfónico; $MeSO_3H$ representa ácido metanosulfónico; THF representa tetrahidrofurano; EtOAc representa acetato de etilo; RuPhos representa 2-diciclohexilfosfino-2', 6'-diisopropoxibifenilo; AcCl representa cloruro de acetilo; DCM representa diclorometano; DMSO representa dimetilsulfóxido.

Los compuestos se nombran de manera convencional o mediante el programa informático ChemDraw®, y los compuestos disponibles comercialmente se nombran según los nombres del catálogo de los proveedores.

El método del difractómetro de rayos X de muestras en polvo (XRPD) en la presente descripción

Modelo de instrumento: Difractómetro de rayos X modelo X'Pert^3/Empyrean de PANalytical

Método de prueba: se usan aproximadamente 10 mg de la muestra para la detección de XRPD.

Los parámetros detallados de la XRPD son los siguientes:

Fuente de rayos: Cu, kα (Kα1 = 1,540598 Å, Kα2 = 1,544426 Å, relación de intensidad Kα2/Kα1: 0,5)

Voltaje del tubo de luz: 45 kV, corriente del tubo de luz: 40 mA

Rendija de divergencia: fija 1/8 grados

Primera rendija Sóller: 0,04 rad, segunda rendija Sóller: 0,04 rad

Rendija de recepción: ninguna, rendija antidispersión: 7,5 mm

Tiempo de medición: 5 min

Intervalo del ángulo de escaneo: 3-40 grados

Ángulo del ancho de paso: 0,0263 grado' (X'Pert^3)/0,0167 grados (Empyrean)

Longitud de paso: 46,665 segundo' (X'Pert^3)/17,780 segundos (Empyrean)

Velocidad de rotación del disco de muestra: 15 rpm

El método del analizador termogravimétrico (TGA) usado en la presente descripción

Modelo de instrumento: Analizador termogravimétrico TGA 5500 de TA Discovery

Método de prueba: se tomó una muestra (aproximadamente de 1 a 5 mg) y se colocó en una cubeta de aluminio de TGA para su análisis. La muestra se calentó desde temperatura ambiente hasta 350°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min bajo la condición de 10 mL/min de N_2.

Breve descripción de los dibujos

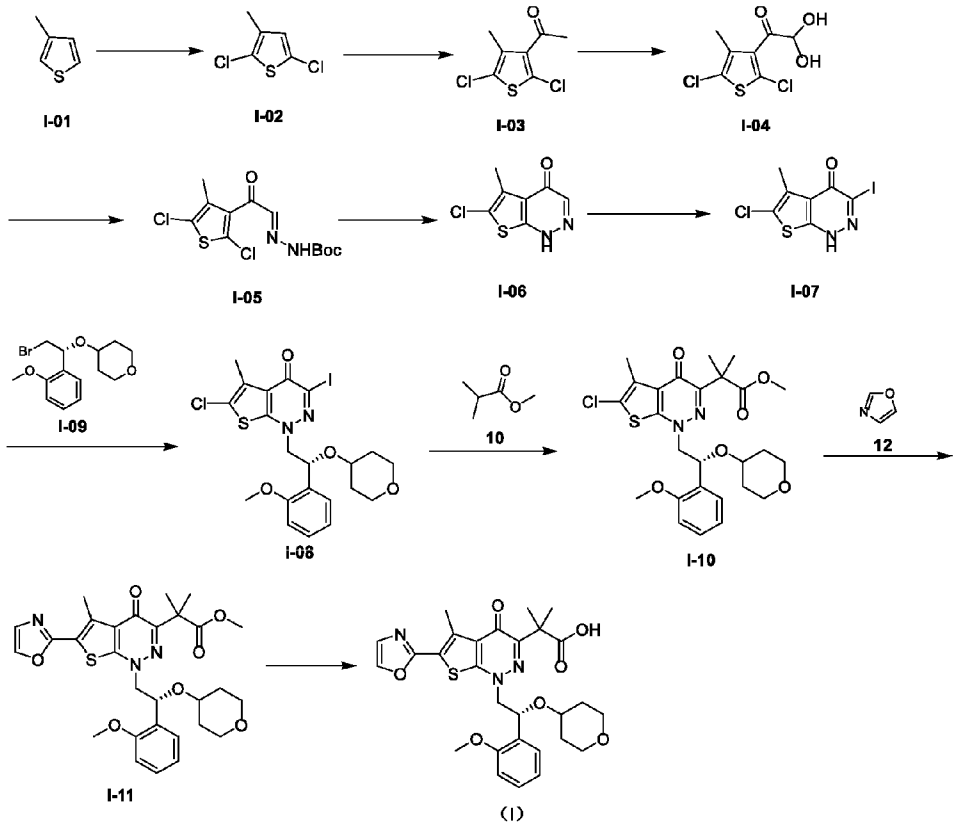
La Figura 1 es un patrón del XRPD de radiación Cu-Kα de una forma cristalina B de la fórmula (I).

La Figura 2 es un patrón del TGA de una forma cristalina B de la fórmula (I).

Descripción detallada de la realización preferida

Para comprender mejor el contenido de la presente descripción, se usan los siguientes ejemplos específicos para una descripción adicional, pero las realizaciones específicas no limitan el contenido de la presente descripción.

Ejemplo 1: Preparación de una forma cristalina B de un compuesto de fórmula (I)



Etapa 1: Preparación del compuesto I-02

A un matraz de tres bocas seco se añadieron una materia prima I-01 (650 g, 6,62 mol) y DCM (1,5 L) a 20°C. La temperatura se enfrió a 0°C, y se añadió SO_2Cl_2 (1,88 kg, 13,90 moles) gota a gota rápidamente durante aproximadamente 1 hora, y la temperatura se mantuvo entre 0°C y 10°C. Una vez que se completó la adición gota a gota, se agitó la mezcla a una temperatura de 15°C a 20°C durante 16 horas adicionales (durante la adición gota a gota, la disolución se volvió negra gradualmente, continuó emergiendo gas y se usó una disolución acuosa de hidróxido de sodio para absorber los gases de escape). La disolución de reacción se concentró a presión reducida a 40°C para obtener el producto bruto I-02 como un líquido amarillo, que se usó directamente en la siguiente etapa. RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6,62 (s, 1H), 2,13 (s, 3H).

Etapa 2: Preparación del compuesto I-03

A un matraz de tres bocas de 5 L seco se añadieron el compuesto I-02 (500 g, 2,99 mol), AcCl (481,6 g, 2,05 eq) y DCM (2,5 L), y la temperatura se enfrió hasta 0°C. Entonces se añadió el $AlCl_3$ (478,4 g, 3,59 moles) por lotes (aproximadamente 100 g por lote), y la temperatura interna se controló de 0°C a 10°C, completándose la adición durante aproximadamente 1 hora. El sistema de reacción se calentó lentamente hasta 20°C y se agitó durante 12 horas adicionales. La disolución de reacción se vertió lentamente sobre aproximadamente 2 kg de hielo triturado para enfriarla y se agitó mientras se vertía para mantener siempre presente una gran cantidad de hielo triturado en el sistema. Una vez que se derritió por completo el hielo, se separó el líquido. La fase acuosa se extrajo con DCM (500 mL x 2). La fase orgánica combinada se lavó con agua (1 L x 2) y salmuera (1 L x 2), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y se concentró a presión reducida para obtener el producto I-03 como un líquido amarillo. RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 2,53 (s, 3H), 2,15 (s, 3H).

Etapa 3: Preparación del compuesto I-04

A un matraz de tres bocas de 5 L seco se añadieron la materia prima I-03 (500 g, 2,39 mol) y DMSO (2,5 L) a 20°C, y luego se añadió HBr acuoso gota a gota rápidamente (1,45 kg, 7,17 mol), completándose la adición gota a gota durante aproximadamente 1 hora (durante la adición gota a gota, aumento la temperatura y la temperatura del sistema se calentó hasta 52°C). La mezcla se calentó lentamente hasta 60°C y se agitó durante 12 horas adicionales. La disolución de reacción se vertió lentamente en aproximadamente 5 kg de hielo triturado para enfriarla y se añadió éter de petróleo (1,5 L). La mezcla se agitó rápidamente durante aproximadamente 20 minutos hasta que precipitó una gran cantidad de sólido amarillo y se filtró. La torta de filtración se lavó con éter de petróleo (500 mL x 3) y luego se escurrió a presión reducida para obtener el producto I-04 como un sólido amarillo. El producto bruto se usó

directamente en la siguiente etapa.

Etapa 4: Preparación del compuesto I-05

A un matraz de tres bocas de 5 L seco se añadieron la materia prima I-04 (300 g, 1,25 mol) y 2-MeTHF (3 L) a 20°C, y luego HOAc (75 g, 1,25 mol) y $BocNHNH_2$ (165,2 g, 1,25 moles). La mezcla se agitó durante 16 horas adicionales. La disolución de reacción se lavó sucesivamente con agua (1 L), con una disolución acuosa de carbonato de potasio al 20% (500 mL x 2) y con salmuera (1 L x 2), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida para obtener el producto I-05 como un líquido aceitoso negro. El producto bruto se usó directamente en la siguiente etapa.

Etapa 5: Preparación del compuesto I-06

A un matraz de tres bocas de 5 L seco se añadieron la materia prima I-05 (560 g, 1,66 mol) y DMSO (2,5 L) a 20°C , y luego K_2CO_3 (229,5 g, 1,66 moles). La mezcla se calentó a 100°C y se agitó durante 16 horas. La disolución de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y luego se vertió en una disolución mixta de agua (4 L) y éter de petróleo/acetato de etilo (4/1, 1 L). La mezcla se agitó durante 5 minutos, después se ajustó el pH a 3 con una disolución acuosa saturada de bisulfato de potasio hasta que precipitó un sólido arenoso y se filtró para obtener el producto bruto en forma de un sólido negro. El producto bruto en forma de un sólido negro se agitó con acetonitrilo (1 L) a temperatura ambiente durante 1 hora adicional para obtener el producto I-06 como un sólido marrón. El producto bruto se usó directamente en la siguiente etapa. RMN ^{1}H (400 MHz, d_6-DMSO) δ ppm 2,47 (s, 3H).

Etapa 6: Preparación del compuesto I-07

A un tanque de reacción de 50 L seco se añadieron la materia prima I-06 (3,0 kg, 15,0 mol) y DMF (15 L) a 20°C, y después se añadió NIS (2,5 kg, 11,1 mol) en lotes (250 g por lote). Una vez que se completó la alimentación, se calentó la mezcla de reacción a 50°C y se agitó durante 1,5 horas. La disolución de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y luego se vertió en 45 litros de una disolución acuosa en donde se disolvieron 500 g de bisulfito de sodio. La mezcla se agitó durante 5 minutos hasta que precipitó un sólido marrón y se filtró para obtener un producto bruto de color marrón. El producto bruto de color marrón se agitó con acetonitrilo (15 L) a temperatura ambiente durante 1 hora y se filtró. La torta de filtración se secó al vacío para obtener el producto I-07 como un sólido marrón. El producto bruto se usó directamente en la siguiente etapa. RMN ^{1}H (400 MHz, d_6-DMSO) δ ppm 2,47 (s, 3H).

Etapa 7: Preparación del compuesto I-08

A un tanque de reacción de 50 L con una camisa y seco se añadió DMF (25 L) a 20°C y se inició la agitación. A continuación, se añadieron las materias primas I-07 (5,2 kg, 15,9 moles) y I-09 (4.0 kg, 12,7 moles) y K_2CO_3 (1,75 kg, 12,7 moles). Una vez completada la alimentación, la mezcla se calentó a 115°C y se agitó durante 24 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente. La disolución de reacción se combinó con otro lote (de 4,5 kg de materia prima I-07) y luego se procesó. La disolución de reacción combinada se añadió a una disolución mixta de agua (37,5 L) y acetato de etilo (8 L) hasta que precipitó un sólido y se filtró. Se separó el filtrado y se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (8 L x 2). La fase orgánica se combinó, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión aumentada para obtener un residuo. Se combinaron la torta de filtración y el residuo concentrado, y se añadió metanol (15 L). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida y se añadió *n*-heptano (5 L) al residuo, seguido de agitación durante 1 hora. Se decantó el *n*-heptano y se añadió metil *ter*-butil éter (4 L). La mezcla se calentó a 60°C, se agitó rápidamente durante 0,5 horas, luego se enfrió hasta 25°C, se agitó durante 1 hora adicional y luego se filtró. Todas las tortas de filtración se combinaron y se secaron al vacío a 40°C para obtener el producto I-08 como un sólido amarillo. RMN ^{1}H (400 MHz, d_6-DMSO) δ ppm 7,48-7,46 (m, 1H), 7,36-7,33 (m, 1H), 7,07-7,02 (m, 2H), 5,30 (dd, j = 9,2, 3,6 Hz, 1H), 4,41 (dd, j = 14,4, 3,6 Hz, 1H), 4,17 (dd, j = 14,4, 9,2 Hz, 1H), 3,85 (s, 3H), 3,38-3,36 (m, 1H), 3,35-3,24 (m, 2H), 3,24-3,14 (m, 2H), 2,45 (s, 3H), 1,63-1,62 (m, 1H), 1,56-1,54 (m, 1H), 1,34-1,31 (m, 1H), 1,05-1,00 (m, 1H).

Etapa 8: Preparación del compuesto I-10

A un tanque de reacción de 50 L se añadieron los reactivos tolueno (22 L) y diciclohexilamina (1.422,0 mL, 2 eq). La mezcla de reacción se burbujeó con nitrógeno durante 5 minutos, y el tanque de reacción se ajustó a una temperatura de -10°C a 5°C. Bajo protección con nitrógeno, se añadió lentamente butil-litio (2,86 L, 2 eq) gota a gota a la disolución de reacción (con la temperatura interna controlada de -10°C a 5°C), la temperatura interna de la disolución de reacción se controló de -10°C a 5°C, y la disolución de reacción se agitó durante 50 a 70 minutos. Luego, bajo protección con nitrógeno, se añadió lentamente isobutirato de metilo (817,2 mL, 2 eq) gota a gota a la disolución de reacción (con la temperatura interna controlada de -10°C a 5°C), la temperatura interna de la disolución de reacción se controló de -10°C a 5°C, y la disolución de reacción se agitó durante 50 a 70 minutos. Bajo nitrógeno burbujeante, se añadió I-08 (2.001,6 g, 1 eq) a la disolución de reacción, y luego bajo protección con nitrógeno, se añadieron $Pd_2(dba)_3$ (32,4 g, 0,01 eq) y P*t*Bu_3 (disolución de tolueno al 10 %, 251,6 mL, 0,03 eq) a la disolución de reacción. La disolución de reacción se calentó lentamente hasta 20°C y luego se agitó a 20°C durante 50 a 70 minutos.

A la disolución de reacción se añadió agua (8 L) y se separó la fase acuosa mediante técnica de separación de líquidos. Luego, se añadió lentamente una disolución acuosa de ácido clorhídrico (3 M, 5 L) a la disolución de reacción para ajustar el pH a aproximadamente 4 a 5, y se filtró la mezcla a través de celite. La torta de filtración se lavó con acetato de etilo (15 L). El filtrado se dejó reposar para formar capas, y se separó la fase acuosa. La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa de ácido clorhídrico (1 M, 10 L) y luego con una disolución acuosa de carbonato potásico (0,2 M, 10 L). La fase acuosa se separó y se filtró a través de diatomita ya que había una gran cantidad de productos que contenían flóculos en la fase acuosa. La torta de filtración se lavó con acetato de etilo (10 L), y la fase acuosa se separó mediante técnica de separación de líquidos. La fase orgánica se combinó, se lavó con una disolución acuosa saturada de cloruro de sodio (15 L) y se concentró a presión reducida para obtener un producto bruto de este lote (según este método, se añadieron 2 kg y 1,4 kg de los materiales a lotes adicionales de reacciones, que se sometieron a procesamientos posteriores respectivamente para obtener productos brutos). Todos los lotes de con los productos brutos se combinaron, se separaron y purificaron mediante cromatografía en columna (*n*-heptano:acetato de etilo = 10:1 a 3:1) usando acetato de etilo y *n*-heptano como eluyentes para obtener un sólido amarillo I-10. LCMS (por sus siglas en inglés): $[M+H]^+$= 431,3, RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7,51 (dd, *j* = 7,6, 1,6 Hz, 1 H), 7,36-7,32 (m, 1 H), 7,05-7,02 (m, 1 H), 6,91 (d, *j* = 8,0 Hz, 1 H), 5,44 (dd, *j* = 8,8, 3,2 Hz, 1 H), 4,35 (dd, *j* = 14,0, 3,2 Hz, 1 H), 4,06 (dd, *j* = 14,0, 8,8 Hz, 1 H), 3,87 (s, 3 H), 3,80-3,74 (m, 1 H), 3,68 (s, 3 H), 3,58-3,52 (m, 1 H), 3,43-3,23 (m, 3 H), 2,56 (s, 3 H), 1,76-1,72 (m, 1 H), 1,60-1,45 (m, 8 H), 1,28-1,20 (m, 1 H).

Etapa 9: Preparación del compuesto I-11

A un tanque de reacción de tres bocas de 10 L se añadieron sucesivamente 2-metiltetrahidrofurano (1 L) y oxazol (96,0 mL, 4,0 eq), y la mezcla se burbujeó con nitrógeno durante 5 minutos. La temperatura en el matraz de reacción se ajustó a una temperatura de -30°C a -15°C. Bajo protección con nitrógeno, se añadió lentamente TMPMgCl-LiCl (1,8 L, 4,8 eq) gota a gota a la disolución de reacción (con la temperatura interna controlada de -30°C a -15°C), la temperatura interna de la disolución de reacción se controló de -30°C a -15°C, y la disolución de reacción se agitó durante 30 a 40 minutos. Luego, bajo protección con nitrógeno, se añadió lentamente el $ZnCl_2$ (1,5 L, 8 eq) gota a gota a la disolución de reacción (con la temperatura interna controlada de -30°C a -15°C). Una vez que se completó la adición gota a gota, se retiró el baño de enfriamiento, y la disolución de reacción se agitó y se calentó lentamente de 15°C a 20°C para obtener un reactivo de zinc de oxazol.

A otro recipiente de reacción de tres bocas de 10 litros se añadieron sucesivamente 2-Metiltetrahidrofurano (2 L) y un intermedio I-10 (200 g), y la mezcla se burbujeó con nitrógeno durante 5 minutos. Bajo protección de nitrógeno, al recipiente de reacción se añadieron $Pd_2(dba)_3$ (34,6 g, 0,1 eq) y RuPhos (34,9 g, 0,3 eq), y luego la disolución de reacción se calentó de 60°C a 70°C y se agitó durante 30 a 50 minutos. Luego se añadió el reactivo de zinc de oxazol a la disolución de reacción, y la disolución de reacción se calentó de 90°C a 95°C y se agitó a esta temperatura durante 13 a 16 horas adicionales.

Se combinaron cinco recipientes de reacciones paralelas y luego se procesó la mezcla. La disolución de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y luego se añadió a una disolución acuosa de ácido clorhídrico (1 M, 20 L, de 0°C a 5°C) para ajustar el pH a 3 a 4. La fase acuosa se separó mediante técnica de separación de líquidos y se extrajo con acetato de etilo (5 L). La fase orgánica se combinó, se lavó con una disolución acuosa saturada de cloruro de sodio (10 L x 2) y se concentró a presión reducida para obtener un producto bruto (según este método, se dividieron los 15 recipientes de reacción adicionales (se añadieron 200 g del material a cada reacción) en tres lotes y luego se procesaron, con 1 kg por lote, para obtener los productos brutos), que se separó y purificó mediante cromatografía en columna. El sólido purificado se añadió a isopropanol (4 L). La mezcla se calentó a una temperatura de 50°C a 55°C, se agitó hasta que se disolvió completamente el sólido y se agitó durante 30 a 40 minutos adicionales. Luego, la mezcla se enfrió naturalmente hasta una temperatura de 25°C a 30°C y se agitó durante 2,0 a 2,5 horas. A la disolución de reacción se añadió *n*-heptano (4 L) y se agitó de una temperatura de 25°C a 30°C durante 12 a 13 horas, seguido de filtración. La torta de filtración se enjuagó con *n*-heptano (2 L), luego se drenó y se concentró a presión reducida para obtener un sólido amarillo I-11. LCMS: $[M+H]^+$ = 568,3, RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7,75 (s, 1 H), 7,54 (dd, *j* = 7,6, 1,2 Hz, 1H), 7,33 (td, *j* = 7,8, 1.6 Hz, 1H), 7,26 (s, 1H), 7,06-7,04 (m, 1H), 6,91 (d, *j* = 8,0 Hz, 1H), 5,49 (dd, *j* = 8,8, 3,2 Hz, 1 H), 4,41 (dd, *j* = 14,0, 3,2 Hz, 1 H), 4,17 (dd, *j* = 14,0, 8,8 Hz, 1 H), 3,87 (s, 3 H), 4,23-4,12 (m, 1 H), 3,78-3,71 (m, 1 H), 3,70 (s, 3 H), 3,56-3,49 (m, 1 H)), 3,45-3,21 (m, 3 H), 3,00 (s, 3 H), 1,71-1,70 (m, 1 H), 1,64-1,48 (m, 8 H), 1,27-1,21 (m, 1 H).

Etapa 10: Preparación del producto bruto del compuesto de fórmula (I)

A un tanque de reacción de 50 litros se añadieron sucesivamente etanol (25 L) y el intermedio I-11, y la mezcla se calentó a una temperatura de 55°C a 60°C. La mezcla se agitó hasta que se disolvió completamente el sólido, y al recipiente de reacción se añadió la disolución preparada de NaOH (1.091,1 g) en agua (5 L). El recipiente de reacción se calentó a una temperatura de 70°C a 80°C y se agitó a esta temperatura durante 17 a 19 horas adicionales.

La disolución de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró a presión reducida para eliminar el etanol. Luego, se ajustó el pH de la disolución de reacción a un valor de 2 a 3 con una disolución acuosa de ácido clorhídrico 3 M (10 L) (durante el ajuste, la temperatura interna fue de 15°C a 25°C) y se filtró. Al producto bruto obtenido por filtración se le añadió una disolución de ácido clorhídrico en agua desionizada 0,3 M (10 L). La mezcla se agitó a una temperatura de 25°C a 30°C durante 50 a 60 minutos y se filtró. Al sólido obtenido por filtración se

añadió etanol (2 L), y la mezcla resultante se agitó durante 15 a 20 minutos y luego se filtró nuevamente. El sólido obtenido por filtración se concentró a presión reducida para obtener el producto bruto del compuesto de fórmula (I) en forma de un sólido blanquecino. LCMS: $[M+H]^+$ = 554,3, RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7,76 (s, 1 H), 7,53 (dd, *j* = 7,6, 1,6 Hz, 1H), 7,37-7,30 (m, 1H), 7,27 (s, 1H), 7,06-7,02 (m, 1H), 6,90 (d, *j* = 8,0 Hz, 1H), 5,49 (dd, *j*= 8,8, 4,0 Hz, 1 H), 4,44 (dd, *j* = 14,0, 4,0 Hz, 1 H), 4,21 (dd, *j* = 14,0, 8,8 Hz, 1 H), 3,86 (s, 3 H), 3,79-3,70 (m, 1 H), 3,61-3,49 (m, 1 H), 3,47-3,20 (m, 3 H), 3,02 (s, 3 H)), 1,74-1,70 (m, 1 H), 1,63-1,50 (m, 8 H), 1,28-1,20 (m, 1 H).

Etapa 11: Preparación de la forma cristalina B del compuesto de fórmula (I)

A un tanque de reacción de tres bocas de 10 L se añadieron sucesivamente etanol (2,5 L) y el producto bruto del compuesto de fórmula (I) (850,0 g), y después la disolución de reacción se calentó a una temperatura de 75°C a 80°C, se agitó durante 30 a 35 minutos, luego se enfrió naturalmente a temperatura ambiente (25°C a 30°C) y se filtró. La torta de filtración se lavó con etanol (300 mL x4) y se concentró a presión reducida para obtener un sólido, que se secó al vacío hasta peso constante para obtener el compuesto de fórmula (I). Se pesaron aproximadamente 15 mg del compuesto de fórmula (I) y se añadieron a un matraz de 5 mL, y al mismo se añadieron 0,1 mL de DMSO y 3 mL de tolueno para obtener una disolución transparente, que se transfirió a temperatura ambiente para su evaporación, para obtener la forma cristalina B del compuesto de fórmula (I). LCMS: $[M+H]^+$ = 554,2, RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7,76 (d, *j* = 0,8 Hz, 1 H), 7,53 (dd, *j* = 7,2, 1,2 Hz, 1 H), 7,35-7,31 (m, 1 H), 7,27 (s, 1 H), 7,06-7,02 (m, *j* = 7,2 Hz, 1 H), 6,90 (d, *j*= 8,0 Hz, 1 H), 5,49 (dd, *j* = 8,8, 4,0 Hz, 1 H), 4,44 (dd, *j* = 14,0, 4,0 Hz, 1 H), 4,21 (dd, *j* = 14,0, 8.8 Hz, 1 H), 3,86 (s, 3 H), 3,79-3,70 (m, 1 H), 3,59-3,49 (m, 1 H), 3,44-3,20 (m, 3 H), 3,02 (s, 3 H)), 1,74-1,69 (m, 1 H), 1,64-1,50 (m, 8 H), 1,30-1,19 (m, 1 H).

Ejemplo experimental 1: Evaluación *in vitro*

Objetivo experimental:

Evaluar la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la acetil-CoA carboxilasa (ACC) mediante la determinación del valor IC_{50}.

Materiales experimentales:

1. Proteínas: acetil-CoA carboxilasa 1 humana (hACC1) y acetil-CoA carboxilasa 2 humana (hACC2).

2. Substrato: $NaHCO_3$

3. Cofactores: acetil-CoA y ATP (adenosín trifosfato)

4. Activador: citrato de potasio

Método experimental:

1. Se añadió una cantidad única de enzima/sustrato/cofactor a los micropocillos de una placa de pocillos.

2. Según una técnica acústica, se añadió una disolución de un compuesto en DMSO a la mezcla de enzimas y la mezcla resultante se preincubó durante 15 minutos.

3. Se añadió ATP para iniciar la reacción y la mezcla se agitó uniformemente.

4. La mezcla se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

5. La reacción se detuvo, y luego se incubó durante 40 minutos más.

6. Se añadió un reactivo de detección y la mezcla resultante se incubó durante 30 minutos.

7. Se probó la fluorescencia.

8. Se realizó un análisis de datos: basándose en la curva estándar de ADP, la señal de fluorescencia se convirtió en la concentración del producto ADP, y se calculó la actividad enzimática. La curva se ajustó usando el programa informático Graphpad Prism para obtener el valor IC_{50}. Los resultados experimentales son los que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados de las pruebas *in vitro* de detección del compuesto de la presente descripción

Compuesto	hACC1 (nM)	hACC2 (nM)
Compuesto de fórmula (I)	14,1	10,3

Conclusión: El compuesto de la presente descripción tiene una fuerte actividad inhibidora sobre la enzima ACC 1/ACC2 humana.

Ejemplo experimental 2: Evaluación farmacocinética de un compuesto

Objetivo experimental:

Probar la farmacocinética del compuesto en ratones C57BL/6

Materiales experimentales:

Ratones C57BL/6 (machos, de 18 a 30 g, de 7 a 9 semanas de edad, Shanghai Lingchang Biotechnology Co., Ltd.)

Operaciones experimentales:

Se inyectó una disolución transparente de un compuesto de prueba (0,5 mg/mL, 10 % de DMSO, 10 % de estearato de polietilenglicol y 80 % de agua) a través de las venas de la cola en 4 ratones macho C57BL/6 (en ayunas durante la noche, de 7 a 9 semanas de edad), a una dosis de 2,0 mg/kg. Se administró mediante sonda forzada una suspensión del compuesto de prueba o su disolución transparente (1 mg/mL, 10 % PEG400, 90 % (0,5 % metilcelulosa + 0,2 % Tween 80)) a 4 ratones macho C57BL/6 (en ayunas durante la noche, de 7 a 9 semanas de edad), a una dosis de 10 mg/kg.

Se colocaron dos ratones en un grupo y se los sometió a muestreos de sangre alternativamente, con 4 a 5 puntos de tiempo de muestreo de sangre por ratón. A las 0,0833 h (solo grupo IV), 0,25 h, 0,5 h, 1,0 h, 2,0 h, 4,0 h, 6,0 h, 8,0 h y 24 h después de que los ratones fueron administrados por vía intravenosa o por sonda, se recogieron aproximadamente 30 µl de sangre mediante punción de vena safena, y se colocaron en un tubo de anticoagulación suplementado con EDTA-K2, y el plasma se separó mediante centrifugación. Se usó el método LC-MS/MS (por sus siglas en inglés) para determinar la concentración del fármaco en sangre, y se usó el programa informático farmacocinético WinNonlin™ versión 6.3 (Pharsight, Mountain View, CA) para calcular los parámetros farmacocinéticos relevantes de un modelo no compartimental usando el método de integración numérica de la regla del trapecio compuesto.

Los resultados experimentales son como se muestran en la Tabla 3:

Tabla 3. Resultados de las pruebas farmacocinéticas

Muestra a analizar	Tasa de aclaramiento (mL/min/kg)	Vida media $T_{1/2}$ (h)	Concentración integral AUC (nM·h)	Biodisponibilidad F (%)
Compuesto de fórmula (I)	27,3	1,85	7.211	66,7

Conclusión: El compuesto de fórmula (I) de la presente descripción puede mejorar significativamente un indicador único o indicadores parciales de la farmacocinética en ratones.

Ejemplo experimental 3: Estudio farmacodinámico *in vivo* en un modelo de ratón de NASH inducido por HFD+CCl_4

Objetivo experimental:

Estudiar el efecto de un compuesto sobre la mejora del NASH y de la fibrosis hepática en un modelo de ratón inducido por HFD (por sus siglas en inglés, dieta rica en grasas)+CCl_4, con I-181 como un compuesto de referencia.

El I-181 es un inhibidor de la acetil-CoA carboxilasa y actualmente se encuentra en un estudio clínico de fase II sobre la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD). El modelo de ratón inducido por HFD+CCl_4 usado en este estudio es un modelo animal que simula la enfermedad del hígado graso no alcohólico humano que evoluciona hacia NASH. Una dieta rica en grasas provoca acumulación de grasa y esteatosis en las células del hígado; CCl_4 (inyección intraperitoneal, dos veces por semana) simula el "segundo golpe" de la lesión hepática. Este modelo es estable y confiable, y tiene una gran similitud con la patogénesis de la NASH humana; además, tiene las principales características patológicas de la NASH, que incluyen esteatosis, apoptosis, inflamación y fibrosis, y también muestra un aumento en los niveles de aminotransferasas plasmáticas (ALT y AST).

Diseño experimental:

El modelado para este experimento incluyó dos etapas: alimentación con dieta alta en grasas e inducción con CCl_4. En primer lugar, los ratones se alimentaron con una dieta alta en grasas para inducir el hígado graso no alcohólico, y se seleccionaron aquellos ratones que pesaban más de (>) 38 g, y se continuaron alimentando con una dieta alta en grasas, acompañada de la inyección intraperitoneal del CCl_4 al 25 % (0,5 mg/kg, dos veces por semana, durante un total de cuatro semanas). El día del inicio de la administración del CCl_4 se fijó como el día 0 y el momento del inicio de la administración del CCl_4 se fijó en la hora 0. En el día del inicio de la administración del CCl_4, se inició la administración por sonda, y el volumen de administración de cada grupo fue de 5 mL/kg, una vez al día durante 4 semanas (28 días). El momento para la inyección del CCl_4 debe tener una diferencia de más de 4 horas desde el primer momento de la administración del día. El experimento se dividió en 6 grupos, es decir, el grupo de control sano, el grupo modelo, el grupo del compuesto de referencia (GS-0976) y los grupos del compuesto de prueba (un compuesto de fórmula (I), tres dosis). El grupo de control sano estaba formado por 10 ratones normales, que fueron alimentados con una dieta normal durante el experimento, sin inyección de CCl_4; se usaron 50 ratones obesos en el grupo modelo y en los grupos de administración, con 10 ratones en cada grupo. Después del agrupamiento, se inició la inyección intraperitoneal del CCl_4 y se administraron diferentes dosis del fármaco respectivamente. En la Tabla 4 se muestra el diseño de la agrupación y la dosificación.

Tabla 4. Agrupación de animales y régimen posológico.

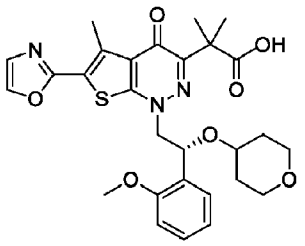
Grupo	Número de animales	Compuesto a probar	Vehículo	Régimen posológico (dosificación | modo de administración | frecuencia | duración total)	Dieta e inyección de CCl_4
Grupo de control sano	10	Vehículo	40 % polietilenglicol/10% polietilenglicol-15 hidroxiestearato/50 % agua	0 | por sonda | QD | del día 0 al día 27	Dieta normal, sin inyección de CCl_4
Grupo modelo	10	Vehículo	40 % polietilenglicol/10% polietilenglicol-15 hidroxiestearato/50 % agua	0 | por sonda | QD | del día 0 al día 27	Dieta alta en grasas, con inyección de CCl_4
1-181, 3 mpk	10	1-181	40 % polietilenglicol/10% polietilenglicol-15 hidroxiestearato/50 % agua	3 mg/kg | por sonda | QD | del día 0 al día 27	Dieta alta en grasas, con inyección de CCl_4
Compuesto de fórmula (I), 0,5 mpk	10	Compuesto de fórmula (I)	40 % polietilenglicol/10% polietilenglicol-15 hidroxiestearato/50 % agua	0,5 mg/kg | Administración intragástrica | QD | del día 0 al día 27	Dieta alta en grasas, con inyección de CCl_4
Compuesto de fórmula (I), 1 mpk	10	Compuesto de fórmula (I)	40 % polietilenglicol/10% polietilenglicol-15 hidroxiestearato/50 % agua	1 mg/kg | Administración intragástrica | QD | del día 0 al día 27	Dieta alta en grasas, con inyección de CCl_4
Compuesto de fórmula (I), 3 mpk	10	Compuesto de fórmula (I)	40 % polietilenglicol/10% polietilenglicol-15 hidroxiestearato/50 % agua	3 mg/kg | por sonda | QD | del día 0 al día 27	Dieta alta en grasas, con inyección de CCl_4

Resultados experimentales:

En el modelo de ratón inducido por la combinación de dieta rica en grasas y CCl_4, el compuesto de fórmula (I) logra la misma eficacia que el compuesto de referencia a una dosis mayor en ambas dimensiones de NAS y fibrosis.

REIVINDICACIONES

1. Una forma cristalina B de un compuesto de fórmula (I), en donde la forma cristalina tiene un patrón de difracción de rayos X de muestras en polvo que comprende picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ: 7,90 ± 0,20°, 17,35 ± 0,20° y 21,50 ± 0,20°; con el patrón de difracción de rayos X de muestras en polvo medido mediante radiación Cu-Kα;



(I) .

2. La forma cristalina B según la reivindicación 1, en donde la forma cristalina tiene un patrón de difracción de rayos X de muestras en polvo que comprende picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ: 5,79 ± 0,20°, 7,90 ± 0,20°, 13,45 ± 0,20°, 16,51 ± 0,20, 17,35 ± 0,20°, 18,38 ± 0,20°, 21,50 ± 0,20° y 25,08 ± 0,20°.

3. La forma cristalina B según la reivindicación 1, en donde la forma cristalina tiene un patrón de difracción de rayos X de muestras en polvo que comprende picos de difracción característicos en los siguientes ángulos 2θ: 5,79°, 6,89°, 7,90°, 8,51°, 9,39°, 11,59°, 12,25°, 13,45°, 13,79°, 15,60°, 16,51°, 17,35°, 18,38°, 19,47°, 21,50°, 23,47°, 24,69°, 25,08° y 29,19°.

4. La forma cristalina B según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la forma cristalina tiene una curva de análisis termogravimétrico que muestra una pérdida de peso del 11,07 % a 120,0°C ± 3°C; una pérdida de peso del 4,84% entre 120,0°C ± 3°C y 200,0°C ± 3°C; con la curva de análisis termogravimétrico obtenida a una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

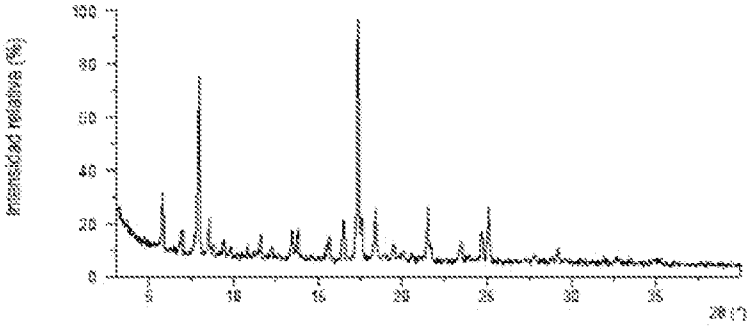

Intensidad relativa (%)
100
80
60
40
20
0
5
10
15
20
25
30
35
2θ (°)

Fig. 1

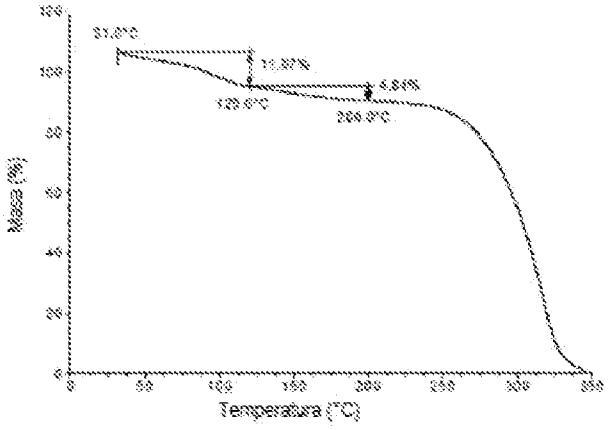

Masa (%)
Temperatura (°C)

Fig. 2