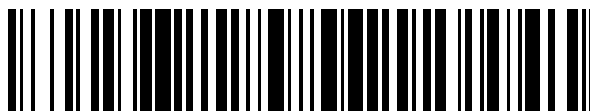


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 826**

51 Int. Cl.:

C07D 473/04 (2006.01)

A61K 31/522 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2016** **PCT/CN2016/103487**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.05.2017** **WO17071607**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2016** **E 16859042 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020** **EP 3369733**

54 Título: **Forma cristalina de un compuesto de 4H-pirazol[1,5-]benzimidazol, procedimiento de preparación de la misma e intermediario de la misma**

30 Prioridad:

29.10.2015 CN 201510719196

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

01.10.2020

73 Titular/es:

**GUANGDONG RAYNOVENT BIOTECH CO., LTD.
(100.0%)
3406A Jinzhonghuan International, Business
Building, 3037 Jintian Road, Fu An Community,
Futian Street, Futian District
Shenzhen 518000, CN**

72 Inventor/es:

**WU, LINGYUN;
LONG, CHAOFENG;
ZHANG, PENG;
CHEN, XIAOXIN;
ZHANG, LI;
LIU, ZHUOWEI;
WANG, ZHENG;
CHEN, SHUHUI y
CHEN, LIJUAN**

74 Agente/Representante:

TORNER LASALLE, Elisabet

ES 2 784 826 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 de un compuesto de 4H-pirazol[1,5-benzimidazol, procedimiento de preparación de la misma e intermediario de la misma

Campo de la invención

- 5 La presente invención versa sobre una forma cristalina A de un compuesto (I) y sobre un procedimiento de preparación de la misma, así como sobre la aplicación de la forma cristalina A como inhibidor de la PDE2 o de la TNF- α .

Técnicas antecedentes

- 10 La fosfodiesterasa (PDE) cataliza la hidrólisis de los nucleótidos cíclicos cGMP y cAMP, y regula diversas respuestas fisiológicas controlando las concentraciones intramoleculares de los dos factores importantes de señalización secundaria. La regulación intramolecular anormal de los nucleótidos cíclicos cGMP y cAMP es la causa de muchas enfermedades. En la actualidad, muchos fármacos mejoran y tratan enfermedades inhibiendo las actividades de la PDE. Por ejemplo, el inhibidor de PDE5 se usa para la hipertensión pulmonar, y el inhibidor de PDE4 se usa para la artritis causada por psoriasis. En la actualidad se conoce un total de 11 clases fundamentales de genes de la fosfodiesterasa, y cada clase incluye varios subtipos, lo que hace más de 100 subtipos de PDE en total. Los diferentes subtipos tienen estructuras diferentes y diferentes distribuciones tisulares, y presentan actividades muy diferentes ante los nucleótidos cíclicos cGMP y cAMP, y presentan una capacidad muy diferente de regular las funciones fisiológicas.

- 20 La fosfodiesterasa PDE2 puede catalizar la hidrólisis de los nucleótidos cíclicos cGMP y cAMP, y la actividad de cAMP es regulada por cGMP, por lo que PDE2 desempeña un papel clave en el equilibrio intracelular de cGMP y cAMP. La PDE2 está expresada de forma generalizada en tejidos humanos, y está distribuida principalmente en el corazón, el sistema nervioso central, el hígado, la glándula suprarrenal, células endoteliales, plaquetas y similares. La PDE2 está implicada en la regulación de diversas actividades fisiológicas, tales como los procesos de aprendizaje, la memoria y la cognición en el sistema nervioso central, manteniendo los ritmos básicos de las células del corazón, de los músculos lisos y del endotelio y manteniendo la permeabilidad de la célula endotelial y regulando las respuestas inflamatorias. La inhibición de la PDE2 en ratones lleva directamente a la muerte fetal. La estrategia de inhibir las actividades de la PDE2 puede ser usada para tratar diversas enfermedades cardiovasculares y del sistema nervioso central, y en el control de las respuestas inflamatorias.

- 30 Se descubrieron pronto actividades no selectivas de inhibición de la PDE en varios compuestos naturales y sintéticos de purinas, tales como cafeína, teofilina y pentoxifilina. La pentoxifilina (actividad de PDE2) está autorizada para el tratamiento de cojera en las extremidades inferiores causada por un bloqueo vascular periférico, y principalmente desempeña un papel en la reducción de la viscosidad de la sangre, en la mejora de la deformación de los eritrocitos, en la inhibición de la agregación plaquetaria, etcétera. También se ha documentado el uso de nuevos inhibidores de PDE2 de alta selectividad en el control de la división celular endotelial y en la revascularización, así como en la mejora del deterioro cognitivo central. Sin embargo, en general, el desarrollo y la aplicación de nuevos inhibidores selectivos de PDE2 siguen estando limitados, y el descubrimiento y la aplicación de nuevos inhibidores de PDE2 presentan amplias perspectivas.

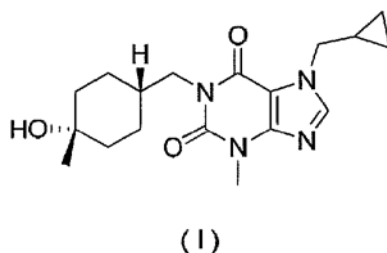
- 40 El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) es una citocina con diversas actividades biológicas y tiene una importante influencia en la incidencia, el desarrollo y el tratamiento de muchas enfermedades, especialmente enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario y con la inflamación. El TNF- α es producido fundamentalmente por monocitos y macrófagos, y está implicado en la regulación inmunitaria y en la coordinación de la red de citocina de los organismos. En circunstancias normales, el TNF- α desempeña un importante papel en la defensa inmunológica y en la vigilancia inmunológica, pero tiene efectos adversos en algunas circunstancias. Las investigaciones muestran que la sobreexpresión del TNF- α puede inducir la expresión de una citocina proinflamatoria, tal como la interleucina-1 (IL-1) y la IL-6, aumentar la permeabilidad de las células endoteliales, aumentar la expresión de moléculas de adhesión, activar neutrófilos y acidófilos, e inducir que las células sinoviales y a las células de los cartílagos secreten sustancias de la fase aguda, degradada tisular y similares, que promueven la inflamación. Estas respuestas patológicas desempeñan un importante papel en la incidencia y el desarrollo de muchas enfermedades inflamatorias inmunomediadas (IMID), como la artritis reumatoide (RA), la artritis psoriásica (PsA), la espondilitis anquilosante (AS), la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), la artritis idiopática juvenil (JCA) y vasculitis. Las investigaciones muestran que el TNF- α es una diana deseada de las varias IMID. Además, para algunas enfermedades causadas por lesiones de larga duración o inflamación crónica, como la esteatosis hepática y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, el uso de fármacos antagonistas del TNF- α (inhibidores del TNF- α) para neutralizar un exceso de TNF- α es efectivo en los planteamientos de prevención y tratamiento. El uso clínico de fármacos monoclonales de TNF- α ha demostrado que la inhibición de TNF- α es un medio muy efectivo para tratar las enfermedades asociadas con la inflamación. La PDE2 puede regular la expresión del TNF- α del mecanismo. Por lo tanto, el nivel de TNF- α puede ser controlado regulando las actividades de la PDE2, logrando con ello el control sobre las respuestas inflamatorias.

El documento US 5321029 describe ciertos derivados de la xantina que pueden ser usados en medicina.

El documento WO 98/52948 versa sobre compuestos efectivos en la modulación de la respuesta celular estimulada por la transducción de señales arbitradas por ceramidas, en particular en respuesta a un estímulo por parte del factor de necrosis tumoral α (TNF- α).

5 Contenido de la presente invención

La invención proporciona una forma cristalina A de un compuesto (I), que tiene el patrón de XRPD mostrado en la Fig. 1,



En la Tabla 1 se muestran los datos del patrón de XRPD de la forma cristalina A en algunas realizaciones según la invención.

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

Nº	2-Zeta	I%	Nº	2-Zeta	I%
1	9,578	100	16	22,141	31,1
2	10,43	40,1	17	22,928	6,4
3	12,502	18,2	18	23,387	4,4
4	13,996	4	19	24,27	4,6
5	15,086	7,7	20	24,548	39,8
6	15,38	16,5	21	25,116	3
7	16,287	7,4	22	25,834	9,5
8	16,661	6,3	23	26,719	5,3
9	17,428	85,8	24	27,665	3,6
10	17,646	29,8	25	29,477	16
11	18,298	11,3	26	30,956	5,6
12	19,977	10,2	27	32,416	3,4
13	20,427	10,2	28	34,623	3,4
14	20,879	29,7	29	37,243	3,5
15	21,314	8,6	30	39,237	3,6

En algunas realizaciones según la invención, el procedimiento de preparación de la forma cristalina A mencionado anteriormente incluye la disolución de cualquier forma del compuesto (I) en disolvente estérico, disolvente alcohólico, acetonitrilo, acetona o un disolvente mezclado del disolvente alcohólico con agua mientras se calienta, y, a continuación, la cristalización con enfriamiento.

15 En algunas realizaciones según la invención, el procedimiento de preparación mencionado anteriormente incluye, además, la etapa de concentración del disolvente hasta 1/30-1/2 de su volumen original, después de la etapa de disolución mientras se calienta.

En algunas realizaciones según la invención, el procedimiento de preparación mencionado anteriormente incluye, además, la etapa de concentración del disolvente hasta 1/20-1/5 de su volumen original, después de la etapa de disolución mientras se calienta.

20 En algunas realizaciones según la invención, la relación en peso entre el compuesto (I) y el disolvente se selecciona de 10:1 a 1:1.

En algunas realizaciones según la invención, la relación en peso entre el compuesto (I) y el disolvente se selecciona de 6:1 a 3:1.

25 En algunas realizaciones según la invención, la relación en peso entre el compuesto (I) y el disolvente se selecciona de 5:1 a 4:1.

En algunas realizaciones según la invención, la mencionada temperatura de calentamiento es de 40°C a la temperatura de reflujo.

En algunas realizaciones según la invención, la mencionada temperatura de calentamiento es de 50°C a 60°C.

En algunas realizaciones según la invención, la mencionada temperatura para la cristalización se selecciona de 0°C a 30°C.

5 En algunas realizaciones según la invención, la mencionada temperatura para la cristalización se selecciona de 20°C a 30°C.

En algunas realizaciones según la invención, el disolvente estérico se selecciona del grupo constituido por acetato etílico, acetato isopropílico y acetato propílico.

En algunas realizaciones según la invención, el disolvente estérico es acetato etílico.

10 En algunas realizaciones según la invención, el disolvente alcohólico se selecciona del grupo constituido por metanol, etanol, isopropanol y butanol terciario.

En algunas realizaciones según la invención, el mencionado disolvente mezclado de disolvente alcohólico con agua se selecciona del grupo constituido por metanol/agua, etanol/agua e isopropanol/ agua.

En algunas realizaciones según la invención, la relación en volumen entre el alcohol y el agua se selecciona de 1:0,5 a 1:1.

15 En algunas realizaciones según la invención, la relación en volumen entre el alcohol y el agua es de 1:1.

La invención proporciona, además, una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente efectiva de la forma cristalina A mencionada anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 La invención proporciona, además, la aplicación de la forma cristalina A mencionada anteriormente y la composición de la misma en la preparación de un fármaco para tratar enfermedades asociadas con el inhibidor de la PDE2 y el inhibidor del TNF- α .

La invención proporciona, además, la aplicación de la forma cristalina A mencionada anteriormente y la composición de la misma en la preparación de un fármaco para tratar enfermedades hepáticas.

En algunas realizaciones según la invención, la mencionada enfermedad hepática se selecciona entre esteatosis hepática y fibrosis hepática.

25 La forma cristalina de la invención presente buena estabilidad y es conveniente durante la preparación de fármacos.

Definiciones y descripción

30 A no ser que se especifique algo distinto, se pretende que los siguientes términos y frases usados en la presente memoria comprendan los siguientes significados. No debería considerarse que una frase o un término particular sea incierto o poco claro en ausencia de una definición específica, sino que debe ser entendido según su significado ordinario. Se pretende que un nombre de producto que aparezca en la presente memoria se refiera al correspondiente producto o al ingrediente activo del mismo.

35 Los compuestos intermedios de la invención pueden prepararse a través de diversos procedimientos de síntesis conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo las realizaciones enumeradas posteriormente, y realizaciones formadas por combinación de las realizaciones enumeradas posteriormente con otros procedimientos químicos de síntesis, y sustituciones equivalentes conocidas por los expertos en la técnica. Las realizaciones preferidas incluyen, sin limitación, las realizaciones según la invención.

40 Las reacciones químicas de las realizaciones según la invención se completan en disolventes apropiados, que deben ser aplicables a cambios químicos y a reactivos requeridos y materiales de los mismos según la invención. Para obtener los compuestos según la invención, a veces es necesario que los expertos en la técnica modifiquen o seleccionen etapas de síntesis o procesos de reacción basados en las realizaciones existentes.

Un importante factor que debe considerarse en la planificación de cualquier ruta de síntesis en esta técnica es seleccionar grupos protectores apropiados para grupos funcionales reactivos, como el grupo amino en la invención. Para profesionales capacitados, es normativo en este sentido Protective Groups in Organic Synthesis (Wiley and Sons, 1991) de Greene y Wuts.

45 A continuación, la invención será descrita específicamente junto con ejemplos, que no se pretende que limiten la invención en modo alguno.

Todos los disolventes usados en la invención están disponibles en el mercado y pueden ser usados sin purificación ulterior. Las reacciones se llevan a cabo generalmente en una atmósfera inerte de nitrógeno en un disolvente anhidro. Los datos de resonancia magnética nuclear protónica se registran en un espectrómetro Bruker Avance III

400 (400 MHz), y el desplazamiento químico se expresa en (ppm) a campo más bajo de tetrametilsilano. El espectro de masas se mide en un control Agilent serie 1200 y 6110 (y 1956A). La LC/MS o MS Shimadzu incluye DAD: SPD-M20A (LC) y detector Shimadzu Micromass 2020. El espectrómetro de masas está equipado con una fuente de ionización por electroaspersión (ESI) que opera en modo positivo o negativo.

- 5 En la invención se usan las siguientes abreviaturas: DCM representa diclorometano; PE representa éter de petróleo; EA representa acetato etílico; DMF representa N,N-dimetilformamida; DMAC representa N,N-dimetilacetamida; DMSO representa dimetilsulfóxido; EtOAc representa acetato etílico; tol representa tolueno; THF representa tetrahidrofurano; EtOH representa etanol; MeOH representa metanol; NMP representa N-metilpirrolidona; 2-METHF representa 2-metiltetrahidrofurano; *i*-PrOH representa 2-propanol; Bn representa bencilo; Cbz representa carbobenzoxi, y es un grupo protector de amina; Boc representa butilcarbonilo terciario, y es un grupo protector de amina; Fmoc representa fluorenilmetoxycarbonilo, y es un grupo protector de amina; Alloc representa aliloxycarbonilo, y es un grupo protector de amina; Teoc representa trimetilsiletoxicarbonilo, y es un grupo protector de amina; Boc₂O representa dicarbonato di-terc-butílico; HCl (g) representa gas cloruro de hidrógeno; H₂SO₄ representa ácido sulfúrico; HOAc representa ácido acético; TFA representa ácido trifluoroacético; DIPEA representa diisopropiletilamina; DIEA representa diisopropiletilamina; NMM representa N-metilmorfolino; DBU representa 1,8-diazabicycloundec-7-eno; Et₃N representa trietilamina; LDA representa diisopropilamida de litio; NaHMDS representa bis(trimetilsilil)amida de sodio; KHMDS representa bis(trimetilsilil)amida de potasio; LiAlH₄ representa hidruro de litio y aluminio; *t*-BuOK representa terc-butóxido de potasio; H₂O₂ representa peróxido de hidrógeno; NH₄Cl representa cloruro amónico; BaSO₄ representa sulfato de bario; CaCO₃ representa carbonato cálcico; SnCl₂ representa cloruro de estaño; Zn(BH₄)₂ representa borohidruro de cinc; PPh₃ representa trifenilfosfina; HMDS representa hexametildisilazano; Pd/C representa paladio sobre carbón activado; PtO₂ representa dióxido de platino; Pd(OH)₂ representa hidróxido de platino; Pd₂(dba)₃ representa tris(dibencilidenoacetona)dipaladio; Pd(PPh₃)₄ representa tetraquis(trifenilfosfina)paladio; Pd(dppf)Cl₂ representa 1,1'-bis[(difenilfosfina)ferroceno]dicloropaladio; Pd(PPh₃)₂Cl₂ representa diclorobis(trifenilfosfina)platino (II); Pd(OAc)₂ representa acetato de paladio; PdCl₂ representa cloruro de paladio; CuI representa yoduro de cobre; CuBr representa bromuro cuproso; CuCl representa cloruro cuproso; Cu representa cobre en polvo; Cu₂O representa óxido cuproso; Xantphos representa 4,5-bis(difenilfosfina)-9,9-dimetilxanteno; Sphos representa 2-diciclohexilfosfina-2',6'-dimetoxibifenilo; Xphos representa 2-diciclohexilfosfina-2',4',6'-triisopropil-bifenilo; Ruphos representa 2-diciclohexilfosfina-2',6'-diisopropoxi-1,1'-bifenilo; y Brettphos representa 2-(diciclohexilfosfina)-3,6-dimetoxi-2',4',6'-triisopropil-1,1'-bifenilo.
- 30 Los compuestos reciben una denominación artificial o según el soporte lógico ChemDraw®, y los compuestos disponibles en el mercado reciben la denominación según los catálogos de los proveedores.

Difractómetro de rayos X en polvo (XRPD) según la invención

Instrumento: difractómetro de rayos X Bruker D8 ADVANCE;

- 35 Procedimiento: diana: Cu: K-Alfa;

Longitud de onda $\lambda=1,54179\text{\AA}$;

Tensión del tubo: 40 kV;

- 40 Corriente del tubo: 40 mA;

Área de barrido: 4-40°;

- 45 Velocidad de rotación de muestras: 15 rpm;

Velocidad de barrido: 10°/min.

Calorímetro diferencial de barrido (DSC) según la invención

- 50 Instrumento: calorímetro diferencial de barrido TA Q2000;

Procedimiento: se presenta aproximadamente 1 mg de muestra en un crisol de aluminio de DSC y se lo somete a ensayo como sigue: TA-300°C, velocidad de calentamiento: 10°C/min.

- 55 Analizador termogravimétrico (TGA) según la invención

Instrumento: analizador termogravimétrico TA Q5000;

Procedimiento: se presentan 2-5 mg de muestra en un crisol de platino de un TGA y se los somete a ensayo como sigue: TA-300°C, velocidad de calentamiento: 10°C/min.

Descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un patrón de XPRD de la forma cristalina A usando radiación Cu-K α ;

la Fig. 2 es un diagrama de DSC de la forma cristalina A;

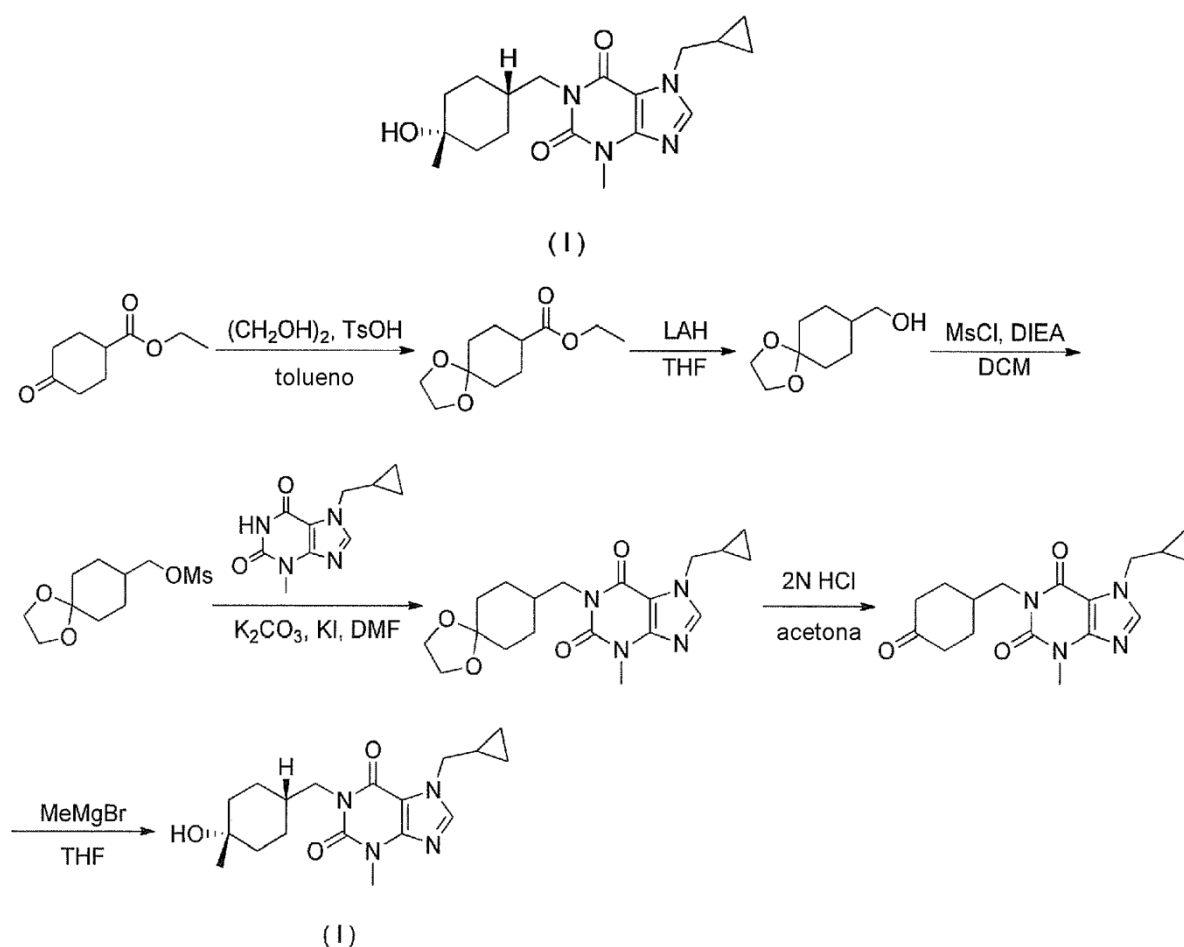
la Fig. 3 es un diagrama de TGA de la forma cristalina A.

Descripción de las realizaciones

Para hacer que el contenido de la invención se entienda con mayor claridad, la invención es descrita adicionalmente a continuación junto con realizaciones que, sin embargo, no son limitaciones del contenido de la invención.

Ejemplo 1

7-(ciclopropilmetil)-1-(((cis)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)metil)-3-metil-1*H*-purina-2,6-(3*H*, 7*H*)-diona



Etapa 1: 1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-carboxilato etílico

La solución de 4-oxociclohexanodicarboxilato etílico (30,0 g, 176 mmol), etanodiol (22,0 g, 353 mmol) y ácido p-metilbencenosulfónico (304 mg, 1,70 mmol) en metilbenceno (315 mL) fue sometida a reflujo en un recipiente Dean-Stark durante la noche. La solución de reacción fue enfriada hasta la temperatura ambiente, y fue lavada sucesivamente con agua (300 mL $\times$ 2) y bicarbonato sódico saturado (500 mL $\times$ 2). La fase orgánica fue secada con sulfato de magnesio anhidro y filtrada. El filtrado fue concentrado a presión reducida y el residuo fue purificado por cromatografía en columna de gel de sílice (1:1, éter de petróleo/acetato etílico, R_f=0,3), obteniendo como producto 1, 4-dioxaspiro[4,5]decan-8-carboxilato etílico (37,2 g, líquido amarillo) con un rendimiento del 99%. Valor calculado por MS-ESI: [M + H]⁺ 215, valor medido: 215.

Etapa 2: 1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-il-metanol

Se añadió lentamente hidruro de litio y aluminio (2,30 g, 61,0 mmol) a tetrahidrofurano (60 mL) en atmósfera de nitrógeno a 0°C, y, a continuación, se añadió gota a gota una solución de 1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-carboxilato etílico (10,0 g, 42,0 mmol) en tetrahidrofurano (40 mL). La solución resultante fue calentada lentamente hasta 25°C, y fue agitada durante 3,5 horas. La solución de reacción fue enfriada a 0°C, y luego se le añadieron agua (2,30g, 127 mmol), hidróxido sódico al 15% (2,30 g, 8,60 mmol) y agua (6,9 g, 383 mmol). La solución resultante fue filtrada, y la torta de filtrado fue lavada con tetrahidrofurano (50 mL×3). La fase orgánica fue combinada, secada con sulfato sódico anhidro y fue filtrada. El filtrado fue concentrado a presión reducida, obteniendo como producto 1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-il-metanol (6,22 g, líquido amarillo) con un rendimiento del 89%. Valor calculado por MS-ESI: $[M + H]^+$ 173, valor medido: 173.

10 Etapa 3: 1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-il-metilmetanosulfonato

Se disolvieron 1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-il-metanol (2,00 g, 12,0 mmol) y diisopropiletilamina (3,10 g, 24,0 mmol) en diclorometano (40 mL), y se añadió lentamente cloruro de metanosulfonilo (3,90 g, 30,0 mmol) a 0°C. La solución de reacción fue calentada hasta 25°C, y agitada durante la noche. Se añadió una solución acuosa saturada de cloruro amónico (100 mL) para apagar la reacción, y la solución resultante fue extraída con acetato etílico (200 mL×3). La fase orgánica fue combinada, secada con sulfato de magnesio anhidro, y filtrada. El filtrado fue concentrado a presión reducida, y separado y purificado por cromatografía en columna de gel de sílice (3:1 éter de petróleo/acetato etílico, $R_f=0,4$), obteniendo como producto 1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-il-metilmetanosulfonato (1,80 g, líquido amarillo) con un rendimiento del 60%. Valor calculado por MS-ESI: $[M + H]^+$ 251, valor medido: 251.

Etapa 4: 1-(1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-il-metil-7-(ciclopropilmetil)-3-metil-1H-purina-2,6-(3H, 7H)-diona

Se disolvieron 1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-il-metilmetanosulfonato (682 mg, 2,72 mmol), 7-(ciclopropilmetil)-3-metil-1H-purina-2,6-(3H,7H)-diona (500 mg, 2,27 mmol) y yoduro potásico (37,7 mg, 0,227 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (10 mL), se añadió carbonato potásico (627 mg, 4,54 mmol), y la solución resultante fue sometida a reflujo mientras se calentó a 130°C durante 4 horas. La solución de reacción fue enfriada hasta temperatura ambiente y fue filtrada. El filtrado fue concentrado a presión reducida, obteniendo como producto en bruto 1-(1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-il-metil-7-(ciclopropilmetil)-3-metil-1H-purina-2,6-(3H, 7H)-diona (1,10 g, amarillo aceitoso). Valor calculado por MS-ESI: $[M + H]^+$ 375, valor medido: 375.

Etapa 5: 7-(ciclopropilmetil)-3-metil-1-((4-oxociclohexil)metil)-1H-purina-2,6-(3H,7H)-diona

Se disolvió 1-(1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-il-metil-7-(ciclopropilmetil)-3-metil-1H-purina-2,6-(3H, 7H)-diona (1,20 g, 2,09 mmol) en acetona (12 mL), y se añadió una solución acuosa de ácido clorhídrico (3 mL). La solución de reacción fue enfriada hasta la temperatura ambiente, y fue agitada durante la noche. Se añadió agua (20 mL); la solución resultante fue extraída con acetato etílico (30 mL×3); la fase orgánica fue secada con sulfato de magnesio anhidro, y la solución resultante fue filtrada. El filtrado fue concentrado a presión reducida, y el producto resultante fue purificado por cromatografía en columna de gel de sílice (1:1, éter de petróleo/acetato etílico, $R_f=0,3$), obteniendo como producto 7-(ciclopropilmetil)-3-metil-1-((4-oxociclohexil)metil)-1H-purina-2,6-(3H,7H)-diona (52,0 mg, sólido amarillo) con un rendimiento del 8%. Valor calculado por MS-ESI: $[M + H]^+$ 331, valor medido: 331.

Etapa 6: 7-(ciclopropilmetil)-1-(((cis)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)metil)-3-metil-1H-purina-2,6-(3H, 7H)-diona

Se disolvió 7-(ciclopropilmetil)-3-metil-1-((4-oxociclohexil)metil)-1H-purina-2,6-(3H,7H)-diona (100 mg, 0,303 mmol) en tetrahidrofurano (5 mL), y se añadió lentamente un reactivo metílico de Grignard (solución de éter etílico 3 M, 0,60mL, 1,8 mmol) bajo protección de nitrógeno a -78°C. La solución resultante fue agitada a -78°C durante media hora, y luego mantenida a 0°C durante 2 horas. Se añadió lentamente agua (10 mL) gota a gota para apagar la reacción, y la solución de reacción fue extraída con acetato etílico (30 mL×3). La fase orgánica fue combinada, secada con sulfato de magnesio anhidro, y fue filtrada. El filtrado fue concentrado a presión reducida, obteniendo un producto en bruto, que fue purificado por cromatografía líquida de alto rendimiento, obteniendo como producto 7-(ciclopropilmetil)-1-(((cis)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)metil)-3-metil-1H-purina-2,6-(3H, 7H)-diona (42,0 mg, sólido blanco) como compuesto (I), con un rendimiento del 40%. RMN 1H : (400 MHz, methonal- d_4) δ 7,99 (s, 1H), 4,19 (d, $J=8,0$ Hz, 2H), 3,89 (d, $J=8,0$ Hz, 2H), 3,54 (s, 3H), 1,81-1,70 (m, 1H), 1,69-1,62 (m, 2H), 1,51-1,41 (m, 4H), 1,39-1,25 (m, 3H), 1,15 (s, 3H), 0,63-0,56 (m, 2H), 0,48-0,42 (m, 2H). Valor calculado por MS-ESI: $[M+ H-H_2O]^+$ 329, valor medido: 329.

Etapa 7: Preparación de la forma cristalina A

Se disolvió 7-(ciclopropilmetil)-1-(((cis)-4-hidroxi-4-metilciclohexil)metil)-3-metil-1H-purina-2,6-(3H, 7H)-diona (42,0 mg) en acetato etílico (10 mL) mientras se calentaba a 50°C. La solución fue concentrada a presión reducida hasta 0,5 mL para separar un sólido, y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla fue filtrada, y se recogió la torta de filtrado. La torta de filtrado fue secada al vacío, obteniendo la forma cristalina A.

Ejemplo experimental 1: Evaluación *in vitro* de las actividades inhibitorias de la fosfodiesterasa PDE2

Objetivo experimental: A través de un análisis de polarización de fluorescencias, se detectaron las concentraciones de AMP/GMP generadas en el sistema de reacción detectando un fluorocromo AlexaFluor 633 sustituido en anticuerpos AMP/GMP, y se calculó la CI_{50} de la fosfodiesterasa PDE2 contra el compuesto que había de ser detectado.

5 Materiales experimentales:

Solución tampón para la determinación: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM $MgCl_2$, 0,01% Brij 35, 1 mM DTT, y 1% DMSO.

10 Enzima: Se expresó una proteína A de PDE2A humana recombinante de longitud máxima mediante un baculovirus en células de insecto Sf9 usando una etiqueta GST N-terminal

Sustrato: 1 μM cGMP

Procedimiento de ensayo:

Anticuerpo Transcreener® AMP²/GMP², fluorocromo AMP2/GMP2 AlexaFluor 633

15 Operaciones experimentales:

Se preparó una solución enzimática a partir de una solución tampón recién preparada y, a continuación, se añadió a una cavidad de reacción una solución en DMSO del compuesto que había de detectarse a través de un sistema de pipeteo de nanolitros Echo550 sin contacto, y la solución resultante fue preincubada durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadió un sustrato (1 μM cGMP) para iniciar la reacción, que fue mantenida a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, se añadió un sistema de detección (anticuerpos Transcreener® AMP²/GMP², fluorocromos AMP2/GMP2 AlexaFluor 633), y se mantuvo a temperatura ambiente durante 90 minutos. La polarización de fluorescencia se detectó usando Ex/Em 620/688.

25 La intensidad de la polarización de fluorescencia se convirtió en una concentración nM a través de curvas estándar AMP/GMP; a continuación, se calculó la inhibición relativa de la actividad enzimática comparada con la muestra de control de DMSO, y la CI_{50} y la curva de la misma se calcularon usando un paquete de soporte lógico Prism (GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU.).

Resultados experimentales:

Tabla 2: Resultado del ensayo de actividades inhibitorias de la fosfodiesterasa PDE2

Muestra del ensayo	Actividades inhibitorias de la fosfodiesterasa PDE2
Compuesto (I)	++
Nota:	
$1 \mu M \leq "++" < 10 \mu M$.	

30 Conclusión: el compuesto (I) demostró actividades inhibitorias significativas o incluso inesperadas de la proteasa PDE2A.

Ejemplo experimental 2: Evaluación *in vitro* de la influencia del compuesto en el TNF- α inducido por LPS en la sangre de ratones

Objetivo experimental: Detectar *in vitro* la influencia del compuesto en el TNF- α inducido por LPS en la sangre de ratones, y evaluar los efectos inhibitorios del compuesto en el TNF- α inducido por LPS en la sangre de ratones.

35 Materiales experimentales:

Ratas Sprague Dawley (machos, 210-260g, de 8-10 semanas de edad, Shanghai SLAC)

Juego de reactivos Rat TNF-alpha Quantikine ELISA (R&D, #SRTA00)

Operaciones experimentales:

40 Se preparó la solución del compuesto que había de ser detectado a una concentración de 1mM, y, respectivamente, se añadieron 40 μL (concentración final del compuesto: 100 μM) a una placa de cultivos celulares de 48 pocillos. Después de que las ratas fueran anestesiadas con isoflurano, se recogieron muestras de sangre de su corazón (anticoagulación con heparina). La sangre fue añadida al compuesto que había de ser detectado presente en la placa de 48 pocillos, a razón de 320 μL /pocillo. La placa de 48 pocillos fue incubada en una incubadora de células durante 30 minutos. A continuación se añadieron 40 μL de solución de LPS (100 $\mu g/ml$), y se mezclaron por completo. 45 La placa fue incubada adicionalmente en la incubadora. Cinco horas más tarde, se extrajo la placa de 48 pocillos. Las muestras de sangre fueron transferidas a tubos de centrifugadora de 1,5ml, y se centrifugaron en una

centrifugadora (4.500 rpm, 4°C, 5 minutos). Se separó el sobrenadante para obtener plasma sanguíneo, que fue subenvasado, congelado rápidamente y mantenido en un refrigerador a -80°C. Al día siguiente, se detectaron los niveles de TNF- α en las muestras de plasma sanguíneo usando un equipo de reactivos ELISA de R&D.

Resultados experimentales:

5 Tabla 3: Resultado del ensayo de actividades inhibitorias del TNF- α

Muestra del ensayo	Relación de inhibición del TNF- α
Compuesto químico (I)	++
Nota:	
$80\% \leq "++" < 100\%$	

Conclusión: el compuesto según la invención demostró actividades inhibitorias significativas o incluso inesperadas del TNF- α .

Ejemplo experimental 3: Evaluación de la farmacocinética del compuesto

Objetivo experimental: Someter a ensayo la farmacocinética de un compuesto en ratas SD

10 Materiales experimentales: Ratas Sprague Dawley (machos, 200-300g, de 7-9 semanas de edad, Shanghai SLAC)

Operaciones experimentales:

Las características farmacocinéticas de los roedores después de la inyección intravenosa y la administración oral del compuesto fueron sometidas a ensayo usando un esquema estándar. En el experimento, se preparó un compuesto candidato formando una solución transparente, que fue administrada a ratas mediante una sola inyección intravenosa y administración oral. El disolvente para la inyección intravenosa y la administración oral es una solución acuosa o una solución salina normal de ciclodextrina hidroxipropílica β en cierta proporción. Se recogió una muestra de sangre completa en 24 horas, y se centrifugaron 3000 g de la muestra durante 15 minutos. Se separó el sobrenadante, obteniendo muestras de plasma sanguíneo, a las que se añadieron 4 veces el volumen de una solución de acetonitrilo que contenía una sustancia estándar interna para precipitar la proteína. Después de centrifugar, se recogió el sobrenadante, se añadió un volumen equivalente de agua, se volvió a centrifugar la solución resultante, y se recogió el sobrenadante para la inyección de muestras. La concentración en sangre fue analizada cuantitativamente por LC-MS/MS, y se calcularon los parámetros farmacocinéticos, tales como la concentración pico, el tiempo hasta el pico, tasa de eliminación, vida media, el área bajo la curva y biodisponibilidad.

Resultados experimentales:

25 Tabla 4: Resultados del ensayo farmacocinético

Muestra de ensayo	Tasa de eliminación (mL/min/kg)	Vida media $T_{1/2}$ (h)	ABC: integral de concentración (nM·hr)	Biodisponibilidad F (%)
Pentoxifilina	74,1	0,191	6622	
Compuesto (I)	54,4	0,793	4390	47,9

Conclusión: el compuesto (I) puede mejorar significativamente uno o algunos índices farmacocinéticos de las ratas.

Ejemplo experimental 4: Solubilidad de la forma cristalina A en diferentes disolventes

Se pesaron aproximadamente 2 mg de la forma cristalina A puestos en una ampolla de 1,5 mL de la fase líquida, a la que, respectivamente, se añadieron los siguientes disolventes mediante pipetas por etapas para disolver la forma cristalina A mientras se hacía vibrar manualmente. El ensayo se llevó a cabo a temperatura ambiente, y la disolución se determinó a simple vista según se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5: Solubilidad de la forma cristalina A en diferentes disolventes

Nº	Disolvente	Solubilidad (mg/mL)	Nº	Disolvente	Solubilidad (mg/mL)
1	Metanol	~28,7	14	Metilbenceno	<1,0
2	Etanol	~11,2	15	n-heptano	<1,0
3	Isopropanol	~10,1	16	Ciclohexano	<1,0
4	n-butanol	~20,5	17	Dioxano	>57,0
5	Acetonitrilo	~13,0	18	Agua	<1,0
6	Acetona	~17,2	19	Metanol-agua (1:1)	~7,8
7	Butanona	~37,2	20	Metanol-agua (3:1)	~19,0
8	Cetona metilisobutílica	~10,9	21	Etanol-agua (1:1)	~16,3
9	Acetato etílico	~15,2	22	Etanol-agua (3:1)	~24,5

Nº	Disolvente	Solubilidad (mg/mL)	Nº	Disolvente	Solubilidad (mg/mL)
10	Acetato isopropílico	~12,0	23	Acetonitrilo-agua (1:1)	~22,2
11	Éter metilbutilico terciario	~2,6	24	Acetona-agua (1:2)	~1,0
12	Tetrahidrofurano	>67,0	25	Isopropanol-agua (1:1)	~17,3
13	2-metiltetrahidrofurano	~24,2		-	-

Ejemplo experimental 5: Ensayo de estabilidad de un sólido de la forma cristalina A

Se puso una forma cristalina A en un recipiente abierto a una temperatura y una humedad constantes para un ensayo acelerado, respectivamente, a 40°C/75% de humedad (abierto). Se recogieron muestras en los meses 1º, 2º y 3º y se las sometió a ensayo, y los resultados del ensayo fueron comparados con los resultados del ensayo inicial del día 0. Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 6 a continuación:

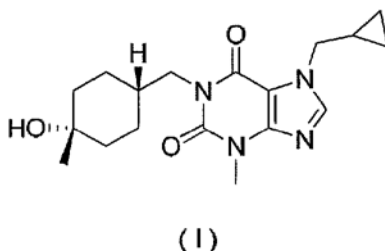
5

Tabla 6: Ensayo de estabilidad de un sólido de la forma cristalina A

Condiciones del ensayo	Momento de muestreo (mes)	Aspecto	Contenido (%)	Impurezas totales (%)
Inicial	0	Polvo blanco	101,6	0,33
40°C/75% de humedad (abierto)	1	Polvo blanco	101,4	0,31
40°C/75% de humedad (abierto)	2	Polvo blanco	98,8	0,34
40°C/75% de humedad (abierto)	3	Polvo blanco	101,8	0,32

REIVINDICACIONES

1. Una forma cristalina A de un compuesto (I):



en la que los picos del patrón de XRPD de la forma cristalina A se muestra como sigue:

Nº	2-Zeta	I%	Nº	2-Zeta	I%
1	9,578	100	16	22,141	31,1
2	10,43	40,1	17	22,928	6,4
3	12,502	18,2	18	23,387	4,4
4	13,996	4	19	24,27	4,6
5	15,086	7,7	20	24,548	39,8
6	15,38	16,5	21	25,116	3
7	16,287	7,4	22	25,834	9,5
8	16,661	6,3	23	26,719	5,3
9	17,428	85,8	24	27,665	3,6
10	17,646	29,8	25	29,477	16
11	18,298	11,3	26	30,956	5,6
12	19,977	10,2	27	32,416	3,4
13	20,427	10,2	28	34,623	3,4
14	20,879	29,7	29	37,243	3,5
15	21,314	8,6	30	39,237	3,6

2. Una forma cristalina A del compuesto (I) según la reivindicación 1, teniendo la forma cristalina A un inicio extrapolado de fusión de 161,58°C y un calor de fusión de 119,8 J/g según un DSC con una velocidad de calentamiento de 10°C/min desde la TA hasta 300°C.
3. Una forma cristalina A del compuesto (I) según la reivindicación 1, teniendo la forma cristalina A una pérdida de peso del 0,13% a 170°C según un TGA usando una velocidad de calentamiento de 10°C/min desde la TA hasta 300°C.
4. Un procedimiento de preparación de la forma cristalina A según la reivindicación 1 que comprende la disolución de cualquier forma del compuesto (I) en disolvente estérico, disolvente alcohólico, acetonitrilo, acetona o un disolvente mezclado del disolvente alcohólico con agua mientras se calienta, y, a continuación, el enfriamiento para cristalizar el producto.
5. Un procedimiento según la reivindicación 4 que, además, comprende una etapa de concentración del disolvente hasta 1/30-1/2 de su volumen original, después de la etapa de disolución mientras se calienta, preferiblemente hasta 1/20-1/5 de su volumen original.
6. Un procedimiento según la reivindicación 4 en el que la relación en peso entre el compuesto (I) y el disolvente es de 10:1 a 1:1, preferiblemente de 6:1 a 3:1, y más preferiblemente de 5:1 a 4:1.
7. Un procedimiento según la reivindicación 4 en el que la temperatura de calentamiento es de 40°C a la temperatura de reflujo, y preferiblemente de 50°C a 60°C.
8. Un procedimiento según la reivindicación 4 en el que la temperatura para la cristalización es de 0°C a 30°C, y preferiblemente de 20°C a 30°C.
9. Un procedimiento según la reivindicación 4 en el que el disolvente estérico se selecciona del grupo constituido por acetato etílico, acetato isopropílico y acetato propílico, y preferiblemente se selecciona de acetato etílico; o el disolvente alcohólico se selecciona del grupo constituido por metanol, etanol, isopropanol y butanol terciario; y el disolvente mezclado de disolvente alcohólico con agua se selecciona del grupo constituido por metanol/agua, etanol/agua e isopropanol/ agua, seleccionándose la relación en volumen entre el alcohol y el agua de 1:0,5 a 1:1, y seleccionándose preferiblemente de 1:1.

10. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la forma cristalina A según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable de la misma.

5 11. Una forma cristalina A según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o la composición según la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y del sistema nervioso central, y en el control de las respuestas inflamatorias.

12. Una forma cristalina A según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o la composición según la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento de enfermedades hepáticas, opcionalmente en la que la enfermedad hepática se selecciona entre esteatosis hepática y fibrosis hepática.

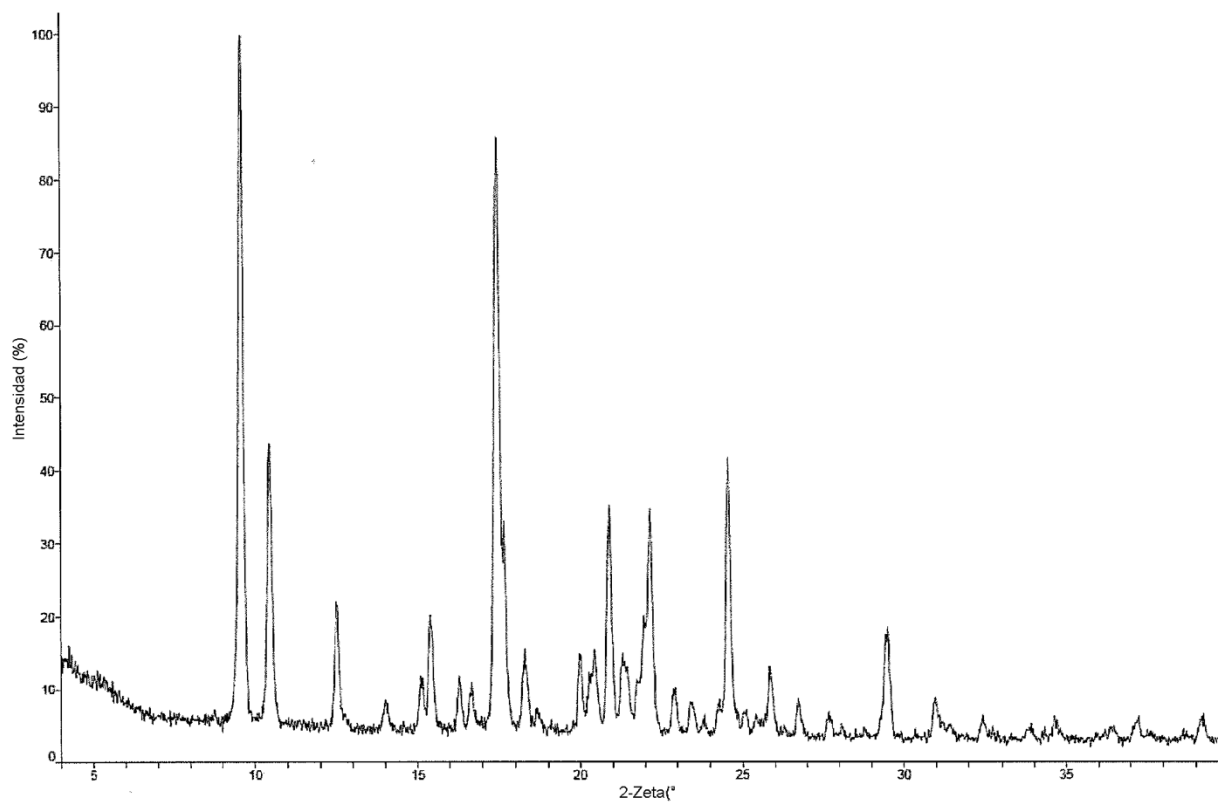


Fig. 1

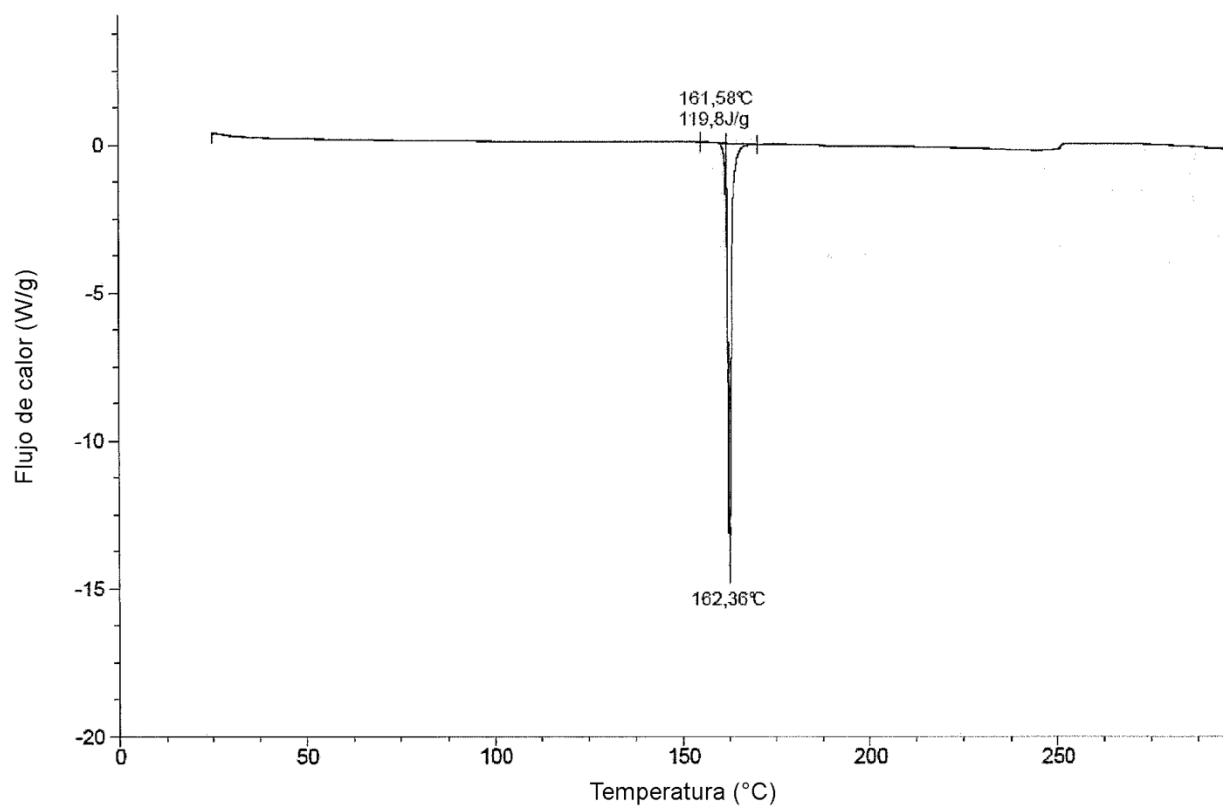


Fig. 2

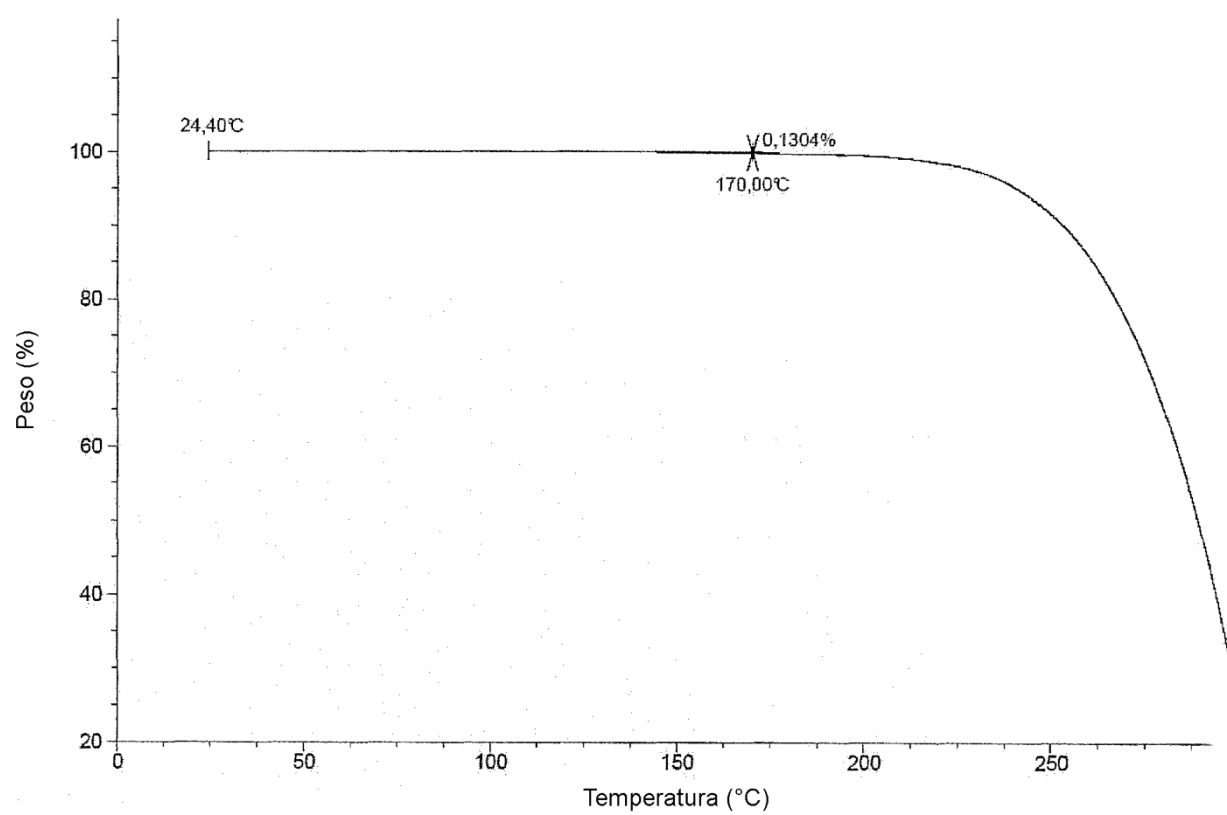


Fig. 3