

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 794 639**

51 Int. Cl.:

**C07D 487/04** (2006.01)

**A61P 31/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2016 PCT/CN2016/104325**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2017 WO17076286**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2016 E 16861554 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 3372606**

54 Título: **Forma cristalina, método de preparación y compuesto intermedio de compuesto con anillo dihidropirido**

30 Prioridad:

**04.11.2015 CN 201510742546**

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

**18.11.2020**

73 Titular/es:

**QILU PHARMACEUTICAL CO., LTD (100.0%)  
No. 317, Xinluo Street, High Technical Zone,  
Jinan  
Shandong 250100, CN**

72 Inventor/es:

**HE, HAIYING;  
ZHOU, KAI;  
LI, XIAOLIN;  
WANG, XIAOFEI;  
QIN, DAKUN;  
WANG, XINGXING;  
YANG, FEIFEI;  
WANG, ZHENG y  
LI, ZONGBIN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 794 639 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, método de preparación y compuesto intermedio de compuesto con anillo dihidropirido

**Campo de la invención**

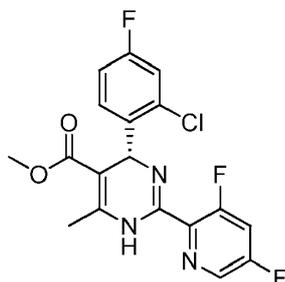
5 La presente invención se refiere a una forma cristalina de un compuesto con anillo dihidropirido, y al método de preparación y compuesto intermedio del mismo.

**Técnicas anteriores**

10 El virus de la hepatitis B pertenece a Hepadnaviridae. Puede provocar enfermedad crónica aguda y/o continua/progresiva. El virus de la hepatitis B también provoca muchas otras manifestaciones clínicas en patomorfología, especialmente inflamación crónica del hígado, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular. Además, la coinfección con hepatitis D puede tener efectos adversos en el desarrollo de la enfermedad.

Los agentes convencionales con licencia para el tratamiento de la hepatitis crónica son interferón e lamivudina. Sin embargo, el interferón es solo moderadamente activo y tiene alta toxicidad; aunque la lamivudina tiene buena actividad, su resistencia aumenta rápidamente durante el tratamiento y, a menudo, la enfermedad rebota después de suspender el tratamiento. El valor IC<sub>50</sub> de la lamivudina (3-TC) es 300 nM (Science, 299 (2003), 893-896).

15 Deres et al. informaron acerca de compuestos tipo dihidropirimidina sustituida con anillos heteroarilo (HAP) representados por Bay41\_4109 y Bay39\_5493 que pueden inhibir la replicación del VHB al prevenir la formación de nucleocápsidas normales. Bay41\_4109 mostró mejores parámetros farmacocinéticos en estudios clínicos (Science, 299 (2003), 893-896) Los estudios sobre su mecanismo de acción han demostrado que los compuestos tipo dihidropirimidina sustituida con anillos heteroarilo alteran el ángulo entre los dímeros que forman la nucleocápsida al actuar con los residuos aminoácidos 113-143 de la proteína central, lo que resulta en la formación de nucleocápsidas hinchadas inestables, acelerando de este modo la degradación de la proteína central (Biochem. Pharmacol. 66 (2003), 2273-2279).

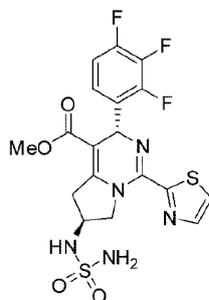


Bay41\_4109

25 Todavía existe la necesidad de nuevos compuestos que puedan usarse efectivamente como medicamentos antivíricos, especialmente para el tratamiento y/o prevención de la hepatitis B.

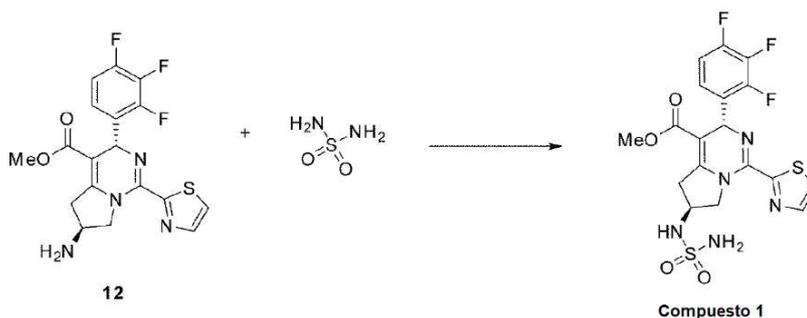
**Contenido de la presente invención.**

La presente invención proporciona un método de preparación del Compuesto 1,



Compuesto 1

que comprende las siguientes etapas:



donde,

la etapa de reacción no requiere la adición de una base orgánica o una base inorgánica;

el disolvente de reacción se selecciona de 1,4-dioxano o tetrahidrofurano;

5 la relación molar de Compuesto 12 a aminosulfonamida se selecciona de 1:1-20;

la temperatura de reacción se selecciona de 60°C a temperatura de reflujo;

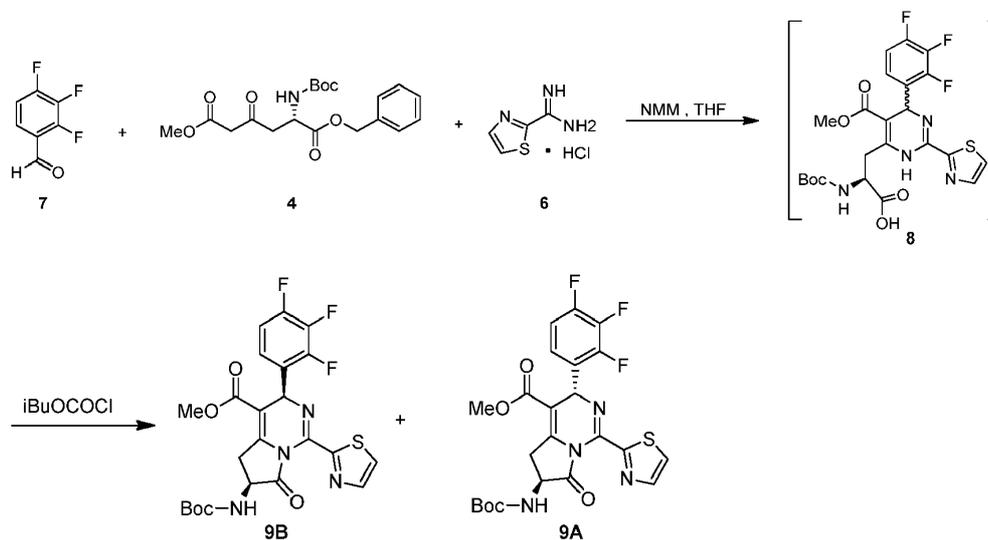
opcionalmente, el Compuesto 1 se purifica por recristalización en un único disolvente o un disolvente mixto de varios disolventes seleccionados del grupo que consiste en diclorometano, acetato de etilo, acetato de isopropilo, n-heptano, n-hexano, ciclohexano y éter de petróleo.

10 En algunas realizaciones de la presente invención, la relación molar de Compuesto 12 a aminosulfonamida es 1:10.

En algunas realizaciones de la presente invención, el Compuesto 1 se purifica por recristalización en un disolvente mixto de diclorometano o acetato de etilo/n-heptano.

En algunas realizaciones de la presente invención, en el disolvente mixto de acetato de etilo/n-heptano, la relación en volumen de acetato de etilo a n-heptano es 0,5:1-2.

15 En algunas realizaciones de la presente invención, el método de preparación anterior comprende las siguientes etapas,



donde,

la relación molar de NMM a Compuesto 4 es 1-4:1, preferiblemente 2-3:1;

20 opcionalmente, el Compuesto 8 se agrega directamente a la siguiente reacción sin separación. En algunas realizaciones de la presente invención, la mezcla de Compuesto 9A y Compuesto 9B proporcionada por la reacción se separa y purifica por recristalización en un único disolvente o un disolvente mixto de varios disolventes seleccionados del grupo que consiste en acetato de etilo, acetato de isopropilo, tetrahidrofurano, dioxano, ciclohexano y n-heptano para dar el Compuesto 9A.

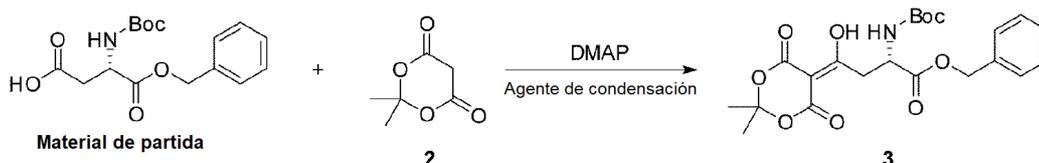
En algunas realizaciones de la presente invención, la relación molar de NMM a Compuesto 4 es 2-3:1.

En algunas realizaciones de la presente invención, la mezcla del Compuesto 9A y el Compuesto 9B proporcionada por la reacción se separa y purifica por recristalización en un disolvente mixto de acetato de etilo, tetrahidrofurano y n-heptano para dar el Compuesto 9A.

5 En algunas realizaciones de la presente invención, en el disolvente de recristalización para la mezcla del Compuesto 9A y el Compuesto 9B, la relación en volumen de n-heptano, acetato de etilo y tetrahidrofurano es (6-54):(2-18):1.

En algunas realizaciones de la presente invención, la relación en volumen de n-heptano, acetato de etilo y tetrahidrofurano es 18:6:1.

En algunas realizaciones de la presente invención, el método de preparación anterior comprende las siguientes etapas,



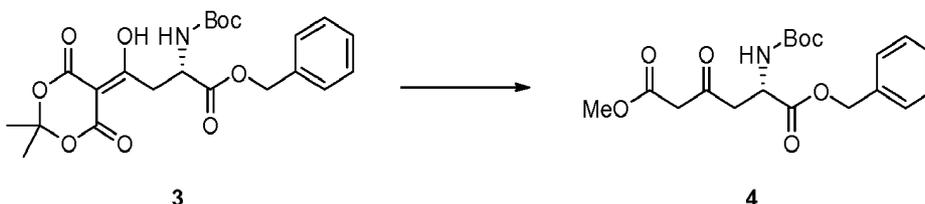
10 el agente de condensación se selecciona de EDCl, DCC, DIC, DMC, HOBT, HATU, CDI;

la temperatura de reacción se selecciona de -20°C a 10°C;

opcionalmente, el Compuesto 3 se agrega directamente a la siguiente reacción sin separación.

En algunas realizaciones de la presente invención, la temperatura de reacción para la preparación del Compuesto 3 se selecciona de -10°C a 0°C.

15 En algunas realizaciones de la presente invención, el método de preparación anterior comprende las siguientes etapas,



el disolvente de reacción es un disolvente único o un disolvente mixto de varios disolventes seleccionados del grupo que consiste en metanol, etanol, isopropanol, n-butanol, t-butanol, tetrahidrofurano, acetato de etilo, tolueno y xileno.

20 En algunas realizaciones de la presente invención, el disolvente de reacción para la preparación del Compuesto 4 es un disolvente mixto de tolueno y metanol.

En algunas realizaciones de la presente invención, el Compuesto 4 se purifica por cristalización, suspensión o recristalización con agitación en un solo disolvente o un disolvente mixto de varios disolventes seleccionados del grupo que consiste en metanol, etanol, isopropanol, n-butanol, ciclohexano, n-hexano, n-heptano y éter de petróleo.

25 En algunas realizaciones de la presente invención, el Compuesto 4 se purifica por cristalización, suspensión o recristalización con agitación en un disolvente mixto seleccionado del grupo que consiste en etanol/ciclohexano, etanol/n-hexano, etanol/n-heptano o etanol/éter de petróleo.

En algunas realizaciones de la presente invención, la relación en volumen de etanol a ciclohexano, n-hexano, n-heptano o éter de petróleo se selecciona de 1:1-3.

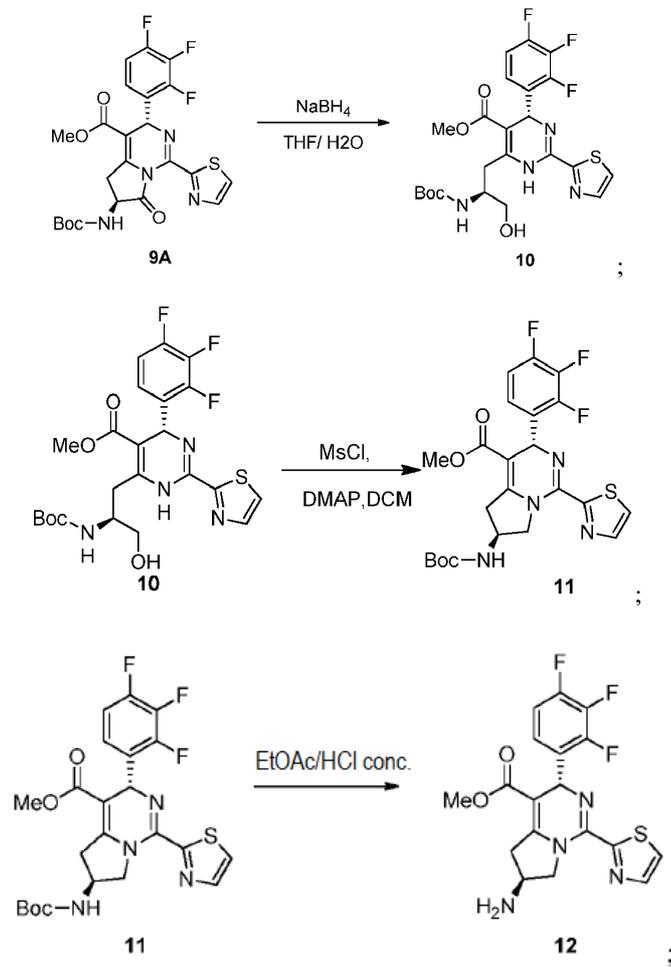
30 En algunas realizaciones de la presente invención, la relación en volumen de etanol a ciclohexano, n-hexano, n-heptano o éter de petróleo se selecciona de 1:1-2.

En algunas realizaciones de la presente invención, el disolvente de purificación para el Compuesto 4 es etanol/éter de petróleo, y la relación en volumen de etanol a éter de petróleo es 3:5.

En algunas realizaciones de la presente invención, el Compuesto 4 se purifica por cristalización o suspensión con agitación a la temperatura de -5°C a 30°C.

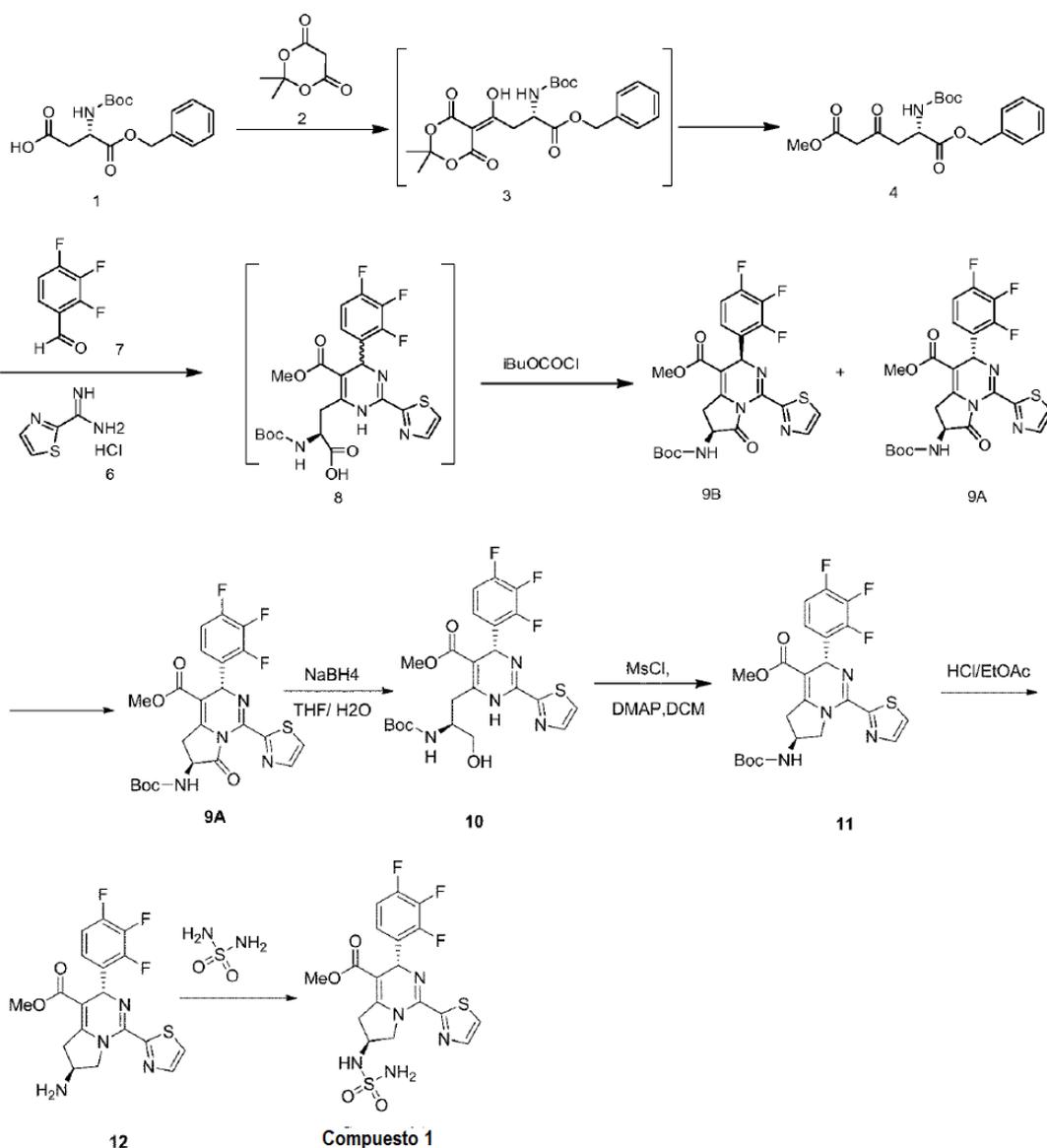
35 En algunas realizaciones de la presente invención, el Compuesto 4 se purifica por cristalización o suspensión con agitación a la temperatura de 10°C a 20°C.

En algunas realizaciones de la presente invención, el método de preparación anterior también comprende las siguientes etapas,



5

o



La presente invención proporciona una forma cristalina I del Compuesto 1, que comprende un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos de difracción característicos en los siguientes ángulos  $2\theta$ :  $15,50 \pm 0,2^\circ$ ,  $17,00 \pm 0,2^\circ$ ,  $20,86 \pm 0,2^\circ$ .

5 En algunas realizaciones de la presente invención, la forma cristalina I comprende un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos de difracción característicos en los siguientes ángulos  $2\theta$ :  $11,04 \pm 0,2^\circ$ ,  $15,50 \pm 0,2^\circ$ ,  $17,00 \pm 0,2^\circ$ ,  $18,57 \pm 0,2^\circ$ ,  $19,36 \pm 0,2^\circ$ ,  $20,19 \pm 0,2^\circ$ ,  $20,86 \pm 0,2^\circ$ ,  $22,68 \pm 0,2^\circ$ .

10 En algunas realizaciones de la presente invención, la forma cristalina I comprende un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos de difracción característicos en los siguientes ángulos de  $2\theta$ :  $7,848^\circ$ ,  $10,489^\circ$ ,  $11,037^\circ$ ,  $12,875^\circ$ ,  $15,497^\circ$ ,  $16,995^\circ$ ,  $18,572^\circ$ ,  $19,360^\circ$ ,  $19,697^\circ$ ,  $20,192^\circ$ ,  $20,861^\circ$ ,  $22,676^\circ$ ,  $22,972^\circ$ ,  $23,225^\circ$ ,  $23,583^\circ$ ,  $23,940^\circ$ ,  $24,571^\circ$ ,  $24,886^\circ$ ,  $25,162^\circ$ ,  $25,476^\circ$ ,  $25,710^\circ$ ,  $26,405^\circ$ ,  $27,393^\circ$ ,  $28,237^\circ$ ,  $28,613^\circ$ ,  $29,007^\circ$ ,  $31,039^\circ$ ,  $32,892^\circ$ ,  $33,858^\circ$ ,  $34,095^\circ$ ,  $34,609^\circ$ ,  $35,000^\circ$ ,  $35,871^\circ$ ,  $36,538^\circ$ ,  $38,433^\circ$ .

La presente invención proporciona la forma cristalina I del Compuesto 1, que comprende un patrón XRPD como se muestra en la Fig. 1.

15 En algunas realizaciones de la presente invención, los datos de análisis del patrón XRPD de la forma cristalina I se muestran en la Tabla-1.

Tabla-1. Análisis del patrón XRPD de datos de la Fig. 1

NO.	2-Theta	I%	NO.	2-Theta	I%
1	7,848	12,1	19	25,162	5,0
2	10,489	9,6	20	25,476	5,8
3	11,037	25,4	21	25,710	7,8
4	12,875	5,3	22	26,405	7,2
5	15,497	100,0	23	27,393	1,9
6	16,995	65,0	24	28,237	7,7
7	18,572	26,0	25	28,613	9,4
8	19,360	25,8	26	29,007	2,9
9	19,697	6,2	27	31,039	18,5
10	20,192	24,8	28	32,892	3,6
11	20,861	28,4	29	33,858	5,2
12	22,676	19,0	30	34,095	3,2
13	22,972	5,8	31	34,609	2,9
14	23,225	9,9	32	35,000	2,9
15	23,583	6,6	33	35,871	2,2
16	23,940	10,6	34	36,538	7,1
17	24,571	12,3	35	38,433	7,3
18	24,886	5,0			

5 En algunas realizaciones de la presente invención, el método de preparación de la forma cristalina I comprende las siguientes etapas: añadir el Compuesto 1 a un disolvente mixto de acetato de etilo y éter de petróleo para recrystalizar, en donde la relación en volumen de acetato de etilo a éter de petróleo es 1:0,5-2.

En algunas realizaciones de la presente invención, en el método de preparación anterior de la forma cristalina I, la relación en volumen de acetato de etilo a éter de petróleo es 1:1.

10 En algunas realizaciones de la presente invención, el método de preparación de la forma cristalina I comprende las siguientes etapas: añadir el Compuesto 1 a acetato de etilo y calentar a reflujo para disolver, luego añadir gota a gota n-heptano y enfriar lentamente la mezcla hasta 10°C a -10°C para cristalizar, en donde la relación en volumen de acetato de etilo a n-heptano de 1:0,5-2.

En algunas realizaciones de la presente invención, en el método de preparación anterior de la forma cristalina I, la relación en volumen de acetato de etilo a n-heptano es 1:1.

15 El otro propósito de la presente invención es proporcionar un uso de la forma cristalina I en la preparación de un medicamento para tratar enfermedades relacionadas con el VHB.

### Definición y descripción

20 A menos que se especifique lo contrario, los siguientes términos y frases utilizados en este documento tienen los siguientes significados. Una frase o término particular no debe considerarse indefinido o poco claro cuando no se define específicamente, sino que debe entenderse en el sentido ordinario. Cuando aparece un nombre comercial en este artículo, se pretende hacer referencia a su producto correspondiente o a su ingrediente activo.

25 Los compuestos intermedios de la presente invención pueden prepararse mediante una variedad de métodos sintéticos bien conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen las realizaciones específicas enumeradas a continuación, realizaciones obtenidas mediante su combinación con otros métodos de síntesis química y equivalentes bien conocidos por los expertos en la técnica, las realizaciones preferidas incluyen, pero no se limitan a, realizaciones de la presente invención.

La reacción química de las realizaciones particulares de la presente invención se lleva a cabo en un disolvente adecuado que sea apropiado para los cambios químicos de la presente invención y los reactivos y materiales del mismo. Para obtener los compuestos de la presente invención, a veces es necesario que los expertos en la técnica modifiquen o seleccionen las etapas sintéticas o los esquemas de reacción basados en las realizaciones existentes.

30 Una consideración importante en cualquiera de los esquemas de rutas sintéticas en la técnica es la selección de un

grupo protector adecuado para un grupo funcional reactivo, tal como un grupo amino en la presente invención. Greene y Wuts (Protective Groups in Organic Synthesis, Wiley and Sons, 1991) son la autoridad en este campo para los practicantes entrenados. Todas las referencias citadas en este documento se incorporan en su totalidad.

5 La presente invención se describirá específicamente a continuación a modo de ejemplos, que no pretenden limitar la presente invención de ninguna manera.

10 Todos los disolventes usados en la presente invención están disponibles comercialmente y pueden usarse sin purificación adicional. La reacción se lleva generalmente a cabo en un disolvente anhidro bajo una atmósfera inerte de nitrógeno. Los datos de RMN de protón se registraron en un espectrómetro Bruker Avance III 400 (400 MHz) con desplazamientos químicos expresados como (ppm) a campo bajo de tetrametilsilano. Los espectros de masas se determinaron en un equipo Agilent 1200 Series Plus 6110 (y 1956A). El LC/MS o Shimadzu MS contiene un DAD: SPD-M20A (LC) y el detector Shimadzu Micromass 2020. El espectrómetro de masas está equipado con una fuente de ionización por electropulverización (ESI) que funciona en modo positivo o negativo.

15 La presente invención adopta las siguientes abreviaturas: DCM para diclorometano; PE para éter de petróleo; EA para acetato de etilo; DMF para N,N-dimetilformamida; DMAC para N,N-dimetilacetamida; DMSO para dimetilsulfóxido; EtOAc para acetato de etilo; tolu para tolueno; THF para tetrahidrofurano; EtOH para etanol; MeOH para metanol; NMP para N-metilpirrolidona; 2-METHF para 2-metiltetrahidrofurano; *i*-PrOH para 2-propanol; Bn para bencilo; Cbz para benciloxicarbonilo, un grupo protector de amina; Boc para *t*-butilcarbonilo, un grupo protector de amina; Fmoc para carbometoxicarbonilo, un grupo protector de aminas; Alloc para aliloxicarbonilo, un grupo protector de aminas; Teoc para trimetilsiloxicarbonilo, un grupo protector de aminas; Boc<sub>2</sub>O para dicarbonato de di-*tert*-butilo; HCl (g) para cloruro de hidrógeno gaseoso; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para ácido sulfúrico; HOAc para ácido acético; TFA para ácido trifluoroacético; DIPEA para diisopropiletilamina; DIEA para diisopropiletilamina; NMM para N-metilmorfolina; DBU para 1,8-diazabicycloundec-7-eno; Et<sub>3</sub>N para trietilamina; LDA para diisopropilamina de litio; NaHMDS para bis(trimetilsilil)amida de sodio; KHMDS para bis(trimetilsilil)amida de potasio; LiAlH<sub>4</sub> para hidruro de litio y aluminio; *t*-BuOK para terc-butóxido de potasio; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para peróxido de hidrógeno; NH<sub>4</sub>Cl para cloruro de amonio; BaSO<sub>4</sub> para sulfato de bario; CaCO<sub>3</sub> para carbonato de calcio; SnCl<sub>2</sub> para cloruro estannoso; Zn(BH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> para el borohidruro de zinc; PPh<sub>3</sub> para trifenilfosfina; HMDS para hexametildisilazano; Pd/C para paladio sobre carbono; PtO<sub>2</sub> para dióxido de platino; Pd(OH)<sub>2</sub> para hidróxido de paladio; Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> para tris(dibencilidenoacetona)dipaladio; Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> para tetraquis(trifenilfosfina)paladio; Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> para 1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocendicloropaladio; Pd(OAc)<sub>2</sub> para acetato de paladio; PdCl<sub>2</sub> para cloruro de paladio; CuI para yoduro cuproso; CuBr para bromuro cuproso; CuCl para cloruro cuproso; Cu para polvo de cobre; Cu<sub>2</sub>O para óxido cuproso; Xantfos para 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno; Sphos para 2-diciclohexilfosfino-2',6'-dimetoxibifenilo; Xphos para 2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-triisopropilbifenilo; Ruphos para 2-diciclohexilfosfino-2',6'-diisopropoxi-1,1'-bifenilo; Brettphos para 2-(diciclohexilfosfino)-3,6-dimetoxi-2'-4'-6'-triisopropil-1,1'-bifenilo.

35 Los compuestos se nombran manualmente o con el software ChemDraw®, y los compuestos comerciales usan el nombre del directorio de proveedores.

#### **Método del difractómetro de rayos X en polvo (XRD) en la presente invención**

Modelo del instrumento: difractómetro de rayos X Bruker D8 Advance

Condiciones de prueba: Los parámetros detallados de XRPD son los siguientes:

Generador de rayos X: Cu,  $\alpha$ , ( $\lambda = 1,54056\text{\AA}$ ).

40 Voltaje del tubo: 40 kV, Corriente del tubo: 40 mA.

Abertura de lanzamiento: 1 grado.

Abertura de altura limitada: 10 mm.

Abertura de dispersión: 1 grado.

Abertura de aceptación: 0,15 mm.

45 Monocromador: monocromador fijo.

Intervalo de escaneo: 4-40 grados.

Velocidad de escaneo: 10 grados/min.

#### **Método del calorímetro diferencial de barrido (DSC) en la presente invención**

Modelo del instrumento: calorímetro de barrido diferencial TA Q2000.

50 Condiciones de ensayo: colocar la muestra (aproximadamente 1 mg) en la cápsula de aluminio para DSC, ensayar

desde una temperatura de 25°C hasta 350°C con una velocidad de rampa de 10°C/min.

**Método del analizador termogravimétrico (TGA) en la presente invención**

Modelo del instrumento: analizador termogravimétrico TA Q5000IR.

5 Condiciones de ensayo: colocar la muestra (2-5 mg) en la cápsula de platino para TGA, ensayar desde temperatura ambiente a 350°C con una velocidad de rampa de 10°C/min.

**Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 es el espectro XRPD de la radiación Cu-K $\alpha$  de la forma cristalina I;

La Fig. 2 es el patrón DSC de la forma cristalina I;

La Fig. 3 es el patrón TGA de la forma cristalina I;

10 La Fig. 4 es el diagrama elipsoide de estructura tridimensional de la molécula individual del Compuesto 14.

Ventajas técnicas:

15 Las ventajas de los métodos de preparación del Compuesto 1 y del compuesto intermedio del mismo proporcionadas por la presente invención son las siguientes: los materiales de partida son baratos y fáciles de obtener; y se superan las desventajas de la gran toxicidad de los reactivos, las duras condiciones de reacción, la difícil separación y purificación, la dificultad de industrialización y similares.

Específicamente:

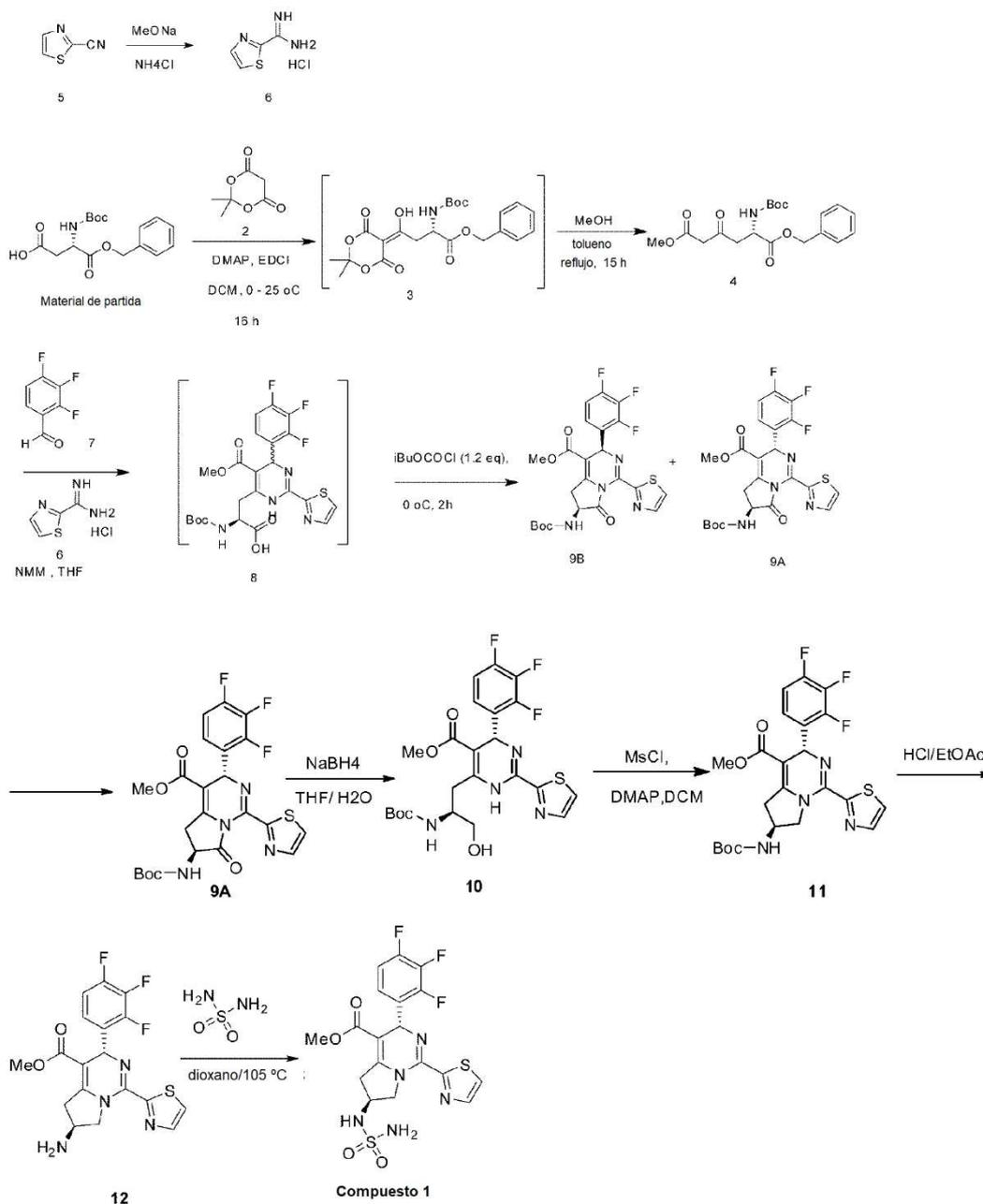
- 1) Las materias primas del procedimiento de la presente invención para preparar el Compuesto 1 son reactivos convencionales o comunes que están fácilmente disponibles en el mercado y son baratos;
- 20 2) En la preparación del Compuesto 4, como agentes de condensación para suavizar las condiciones de reacción se usaron EDCl, DCC, DIC y similares. El Compuesto 4 resultante se purificó por cristalización o suspensión con agitación con etanol y un disolvente de baja polaridad, tal como éter de petróleo o n-heptano, n-hexano o ciclohexano, con operaciones simples y alta pureza del producto;
- 25 3) En la preparación del Compuesto 8, como materiales de partida para sintetizar el Compuesto 8 se usaron el Compuesto 4, el Compuesto 6 y el Compuesto 7 con condiciones de reacción suaves y alto rendimiento. El Compuesto 8 se puede colocar directamente en la siguiente etapa sin ninguna separación, y las operaciones fueron simples.
- 4) La mezcla del Compuesto 9A y el Compuesto 9B obtenida por la reacción se recristalizó en un disolvente mixto de acetato de etilo, tetrahidrofurano y n-heptano. El compuesto 9A se puede obtener directamente con una pureza de más que 95% y un De mayor que 96%.
- 30 5) En las etapas de preparación del Compuesto 1, se hicieron reaccionar a reflujo aproximadamente 10 equivalentes de aminosulfonamida y Compuesto 12 usando dioxano como disolvente, sin añadir una base inorgánica u orgánica, el producto obtenido estaba limpio y el postratamiento fue fácil y simple.
- 6) La forma cristalina I del Compuesto 1 es estable I y tiene una perspectiva prometedora para el uso en medicina.

Por lo tanto, la presente invención tiene una aplicación industrial y un valor económico altos en la preparación del Compuesto 1 y sus intermedios.

35 **Descripción detallada de la realización preferida**

Para una mejor comprensión del contenido de la presente invención, los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la presente invención, pero la presente invención no se limita a los mismos.

## Ejemplo 1: preparación del Compuesto 1 bruto



## Etapa 1: preparación del Compuesto 4

- 5 Se añadió DCM (12 L) a un depósito de reacción de 50 L, y se añadió el material de partida (5,00 kg, 15,46 moles), y se añadió DMAP (2,83 kg, 23,20 moles), y la mezcla se agitó durante 10 min. Se añadió el Compuesto 2 (2,23 kg, 15,46 moles) y la temperatura del depósito se enfrió a 0°C. Se disolvió EDCI (4,45 kg, 23,20 moles) en DCM (20 L) en lotes para formar una suspensión, y luego se añadió lentamente gota a gota al depósito, y la temperatura interna se controló por debajo de 0°C durante el procedimiento de goteo. Una vez completada la adición gota a gota, la solución de reacción se agitó a 0°C durante 16 horas, y luego se tomó una muestra para realizar la detección. La detección por
- 10 TLC (PE:EtOAc = 1:1) y LCMS mostró la desaparición de las materias primas, lo que indicó que la reacción había finalizado completamente. La solución de reacción se lavó con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (20L \* 2). No se detectó DMAP por TLC (PE:EtOAc = 0:1) y la desaparición de DMAP se confirmó por LCMS. La solución de reacción se lavó con solución saturada de NaCl (15 L) una vez, se concentró a presión reducida y se secó por centrifugación, luego se añadió tolueno (3 L) y se concentró adicionalmente a presión reducida para dar el Compuesto 3. El peso separado fue
- 15 6,95 kg, el rendimiento separado fue 87,7% y la pureza fue 85%.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) ppm 1,42 (s, 8 H), 1,65 - 1,76 (m, 5 H), 3,54 - 3,72 (m, 2 H), 4,85 (d, *J* = 6,02 Hz, 1 H), 5,07 - 5,25 (m, 2 H), 5,35 (d, *J* = 8,28 Hz, 1 H), 7,29 - 7,40 (m, 5 H).

LCMS: m/z: 472,1 [M + Na<sup>+</sup>].

Se añadió tolueno anhidro (20 L) a un depósito de reacción de 50 L, y se añadió el Compuesto 3 (6,95 kg, 15,46 moles). Bajo agitación mecánica, se añadió MeOH anhidro (6,26 L, 154,6 moles). La solución de reacción se agitó durante 16 h con la temperatura interna controlada a 70°C, y luego se muestreó para realizar la detección. La detección por TLC (PE:EtOAc = 1:1) y LCMS mostró que la reacción había terminado completamente. La solución de reacción se concentró a presión reducida para dar un líquido viscoso marrón rojizo. El producto bruto se disolvió en 6 L de EtOH y 10 L de éter de petróleo. La solución se agitó a 13°C durante 30 minutos y precipitó un sólido blanco. La mezcla se agitó durante 2 horas, se dejó reposar durante la noche y se filtró. El sólido se lavó tres veces con éter de petróleo (5 L) y se secó al aire para dar un producto blanco (4,2 kg, 11,07 moles). El filtrado se enfrió a -11°C y se filtró para dar un producto blanco (600 g, 1,58 moles). El peso separado total fue 4,8 kg, el rendimiento separado después de las dos etapas fue 81,7%, y la pureza fue 98%.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) ppm 1,43 (s, 9 H), 3,07 - 3,16 (m, 1 H), 3,22 - 3,33 (m, 1 H), 3,44 (s, 2 H), 3,72 (s, 3 H), 4,51 - 4,62 (m, 1 H), 5,16 (s, 2 H), 5,48 (d, *J* = 8,03 Hz, 1 H), 7,29 - 7,40 (m, 5 H).

LCMS: m/z: 402,1 [M + Na<sup>+</sup>].

15 Etapa 2: preparación del Compuesto 6

Se añadió MeOH (12 L) a un depósito de reacción de 50 L y se añadió el Compuesto 5 (2200 g, 20,00 moles, 1 equiv.), y se añadió NaOMe (54 g, 1 moles, 0,05 equiv.) y la mezcla se agitó a 10°C durante 0,5 h. La mezcla de reacción se muestreó para realizar la detección, TLC (PE:EtOAc = 2:1) mostró la desaparición de las materias primas y la generación de compuestos intermedios. Se añadió NH<sub>4</sub>Cl (1296 g, 24,00 moles, 1,2 equiv.) y la mezcla se agitó a 65°C durante 16 h. La mezcla de reacción se muestreó para realizar la detección, TLC (PE:EtOAc = 2:1) mostró la desaparición de los compuestos intermedios, lo que indicó que la reacción había finalizado completamente. La mezcla de reacción se filtró para dar NH<sub>4</sub>Cl (210 g) sólido, y el filtrado se secó para dar el producto bruto. El producto bruto se suspendió en EtOAc (20 L) durante 2 horas y se filtró para obtener el Compuesto 6 producto (3200 g) con una pureza de 98%. El contenido efectivo por RMN medido por Q-RMN fue 95%. El rendimiento separado fue 93%.

25 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm 8,26 (d, *J* = 2,76 Hz, 1 H), 8,38 (d, *J* = 3,01 Hz, 1 H), 9,81 (br. s., 1 H).

LCMS: m/z: 127,9 [M + H<sup>+</sup>].

Etapa 3: preparación del Compuesto 9A

Se añadieron el Compuesto 4 (1140 g, 3 moles) y THF anhidro (7,5 L) a un matraz de reacción encamisado de 30 L y se agitó. Se añadieron el Compuesto 6 (566 g, 3,45 moles), el Compuesto 7 (502 g, 1,1 moles) y NMM (760 g, 7,5 moles). La reacción se calentó a reflujo (60°C) durante 20 h. El contenido del ácido carboxílico intermedio se monitorizó por HPLC y la temperatura se enfrió a 5-10°C. Se añadió gota a gota cloroformato de isobutilo (492 g, 3,6 moles, disuelto en 500 mL de THF) y se hizo reaccionar a 5-10°C durante 1 hora. TLC y HPLC mostraron que el ácido carboxílico intermedio de la reacción reaccionó por completo. La reacción se paró mediante la adición de H<sub>2</sub>O (3 L), y se extrajo con EtOAc (9 L), y el disolvente orgánico se lavó una vez con H<sub>2</sub>O (3 L) y se concentró para dar 2,2 kg de aguas madres. Las aguas madres se disolvieron en EtOAc (3 L), se añadió THF (500 mL), se añadió lentamente n-heptano (aproximadamente 9 L) gota a gota y la mezcla se agitó a 15°C durante la noche con un sólido precipitado y se filtró para dar un sólido bruto con una pureza de 95%, De = 85%. Recristalización del producto bruto: el sólido se disolvió en THF/EtOAc (100 g en 500/500 mL) a 50°C, se añadió gota a gota n-heptano (1 L) y se agitó durante 1 h, luego se enfrió gradualmente a 25°C y se agitó durante la noche, se filtró para dar el Compuesto 9A como un sólido blanco (500 g, pureza: 96%, De > 96%, rendimiento: 27%).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d) ppm 1,46 (s, 9 H), 3,11 (dd, *J* = 17,82, 8,03 Hz, 1 H), 3,70 (s, 3 H), 3,86 - 4,03 (m, 1 H), 4,46 (d, *J* = 7,78 Hz, 1 H), 5,30 (d, *J* = 6,27 Hz, 1 H), 6,02 (s, 1 H), 6,89 - 7,00 (m, 1 H), 7,01 - 7,12 (m, 1 H), 7,49 (d, *J* = 3,26 Hz, 1 H), 7,90 (d, *J* = 3,01 Hz, 1 H).

LCMS: m/z: 523,1 [M + H<sup>+</sup>].

45 Etapa 4: preparación del Compuesto 10

Se añadieron 200 mL de H<sub>2</sub>O a un matraz de reacción de 10 L, y se añadió NaBH<sub>4</sub> (39,2g, 1,03 moles) para disolverlo. Se añadió el Compuesto 9 (270,0 g, 0,52 moles) a 4,0 L de THF para disolverlo a 0°C, y se añadió lentamente gota a gota al matraz de reacción. La mezcla se hizo reaccionar durante 3 h con la temperatura controlada a 0-5°C. La detección en las muestras tomadas mostró que la reacción había finalizado completamente. Se añadieron 750 mL de HCl (1 mol/L) a la mezcla de reacción con el pH ajustado a 7. La mezcla de reacción se concentró para dar el producto bruto. Se añadieron 200 mL de agua al producto bruto y se extrajo con acetato de etilo (500 mL \* 3). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró para dar 299 g de producto bruto con una pureza de 97,23%, rendimiento separado > 100% (bruto), un contenido efectivo de 90% y un rendimiento de 96%.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm 1,14 (s, 9 H), 2,61 - 2,69 (m, 1 H), 3,38 (br. s., 2 H), 3,52 - 3,59 (m, 4 H), 3,84 -

3,94 (m, 1 H), 4,81 (t,  $J = 5,65$  Hz, 1 H), 5,86 (s, 1 H), 6,40 (d,  $J = 9,54$  Hz, 1 H), 7,15 - 7,25 (m, 2 H), 7,94 (d,  $J = 3,26$  Hz, 1 H), 8,01 (d,  $J = 3,01$  Hz, 1 H), 9,71 (s, 1 H).

LCMS:  $m/z$ : 527,1 [M + H<sup>+</sup>].

#### Etapa 5: preparación del Compuesto 11

5 El compuesto 10 (269,0 g, 0,51 moles) se añadió a un matraz de reacción de 5 L y se añadieron 1,2 L de diclorometano para disolverlo, luego se añadió DMAP (187,4 g, 1,53 moles), y la mezcla se agitó durante 10 minutos enfriando a una temperatura interna de 0°C. Se añadió gota a gota una solución de cloruro de metanosulfonilo (118,09 g, 1,03 moles) en DCM (50 mL) controlando la temperatura interna durante la adición gota a gota. Después de completar la adición, la mezcla se hizo reaccionar bajo agitación a 0°C durante 20 minutos, y luego a 35°C durante 16 horas. La detección en las muestras tomadas mostró que la reacción había finalizado completamente. Se añadió 1 mol/L de HCl (500 mL) a la mezcla de reacción para ajustar el pH = 2-3. Se añadieron 500 mL de agua a la mezcla de reacción y se extrajo con diclorometano (700 mL \* 3), y las fases orgánicas se combinaron. Casi no se detectó DMAP en la fase orgánica, y no se detectó ningún producto diana en la fase acuosa. Luego se añadieron 2 mol/L de HCl (50 mL) a la fase orgánica y se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl (500 mL \* 2). Casi no se detectó DMAP en la fase orgánica, y la fase acuosa se extrajo con diclorometano (100 mL \* 3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO<sub>3</sub> 1 M (300 mL \* 2), se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y se concentró para dar 270 g de un sólido amarillo (peso separado 270 g, rendimiento separado 85,7%, pureza 88,56%).

1H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm 1,38 (s, 9 H), 3,01 (dd,  $J = 17,82, 6,27$  Hz, 1 H), 3,35 (dd,  $J = 17,82, 7,53$  Hz, 1 H), 3,53 (s, 3 H), 4,06 - 4,29 (m, 2 H), 4,40 (dd,  $J = 11,04, 6,78$  Hz, 1 H), 5,89 (s, 1 H), 7,21 - 7,27 (m, 2 H), 7,39 (d,  $J = 6,02$  Hz, 1 H), 7,89 (d,  $J = 3,26$  Hz, 1 H), 7,96 (d,  $J = 3,26$  Hz, 1 H).

LCMS:  $m/z$ : 509,2 [M + H<sup>+</sup>].

#### Etapa 6: preparación del Compuesto 12

25 Se añadieron a un depósito de 30 L el compuesto 11 (1,1 kg, 2,1 moles, contenido en peso: 97,14% en peso), acetato de etilo (9,9 kg) y ácido clorhídrico concentrado (0,87 kg). La mezcla se agitó a 25°C durante 3 horas, la detección en las muestras tomadas mostró que la reacción había finalizado completamente. Se añadieron 4,4 kg de agua y la mezcla se extrajo y se separó. La fase de acetato de etilo se descartó. La fase acuosa se lavó dos veces con 6,82 kg de diclorometano, respectivamente, se separó y la fase de diclorometano se desechó. Además, se añadieron 13,25 kg de diclorometano y 1,19 L de metanol a la fase acuosa. La mezcla se agitó y se enfrió a 5°C, y se añadieron gradualmente aproximadamente 4,4 kg de hidróxido de sodio 3 N para ajustar el pH a 13 (aproximadamente 20 minutos). La mezcla se separó y la fase orgánica se recogió. La fase acuosa se extrajo una vez con un disolvente mixto de 9,71 kg de diclorometano y 0,58 kg de metanol (10/1). La fase orgánica se secó para dar 0,85 kg de producto bruto (contenido en peso: 94,19%).

35 1H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm 1,84 (br. s., 2 H), 2,84 (dd,  $J = 17,57, 6,02$  Hz, 1 H), 3,26 (dd,  $J = 17,57, 6,78$  Hz, 1 H), 3,55 (s, 3 H), 3,63 (m,  $J = 6,15$  Hz, 1 H), 4,00 (dd,  $J = 10,92, 5,65$  Hz, 1 H), 4,29 (dd,  $J = 11,04, 6,27$  Hz, 1 H), 5,90 (s, 1 H), 7,14 - 7,31 (m, 2 H), 7,89 (d,  $J = 3,26$  Hz, 1 H), 7,97 (d,  $J = 3,26$  Hz, 1 H).

LCMS:  $m/z$ : 409,1 [M + H<sup>+</sup>].

#### Etapa 7: preparación del Compuesto 1

40 Se añadieron secuencialmente a un depósito de reacción de 30 L el Compuesto 12 (0,82 kg, 1,89 moles, contenido en peso: 94,19%), 1,4-dioxano (8,2 L) y aminosulfonamida (1,89 kg, 2,35 moles) y se purgaron con nitrógeno. La mezcla se hizo reaccionar a reflujo durante 2 horas. La detección en las muestras tomadas mostró que la reacción casi había finalizado. La solución de reacción se centrifugó, se añadieron 4,4 kg de acetato de etilo y se lavó con 12,3 kg de agua corriente una vez. Se añadieron 6,5 kg de diclorometano a la fase orgánica, se lavó tres veces con agua desionizada (3 x 12,3 kg) y se concentró a sequedad para dar el Compuesto 1 bruto.

#### Ejemplo 2: preparación de la forma cristalina I del Compuesto 1

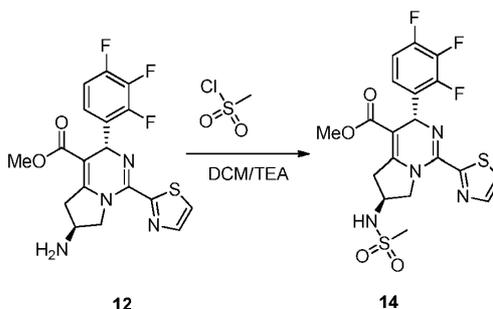
45 El producto bruto del Ejemplo 1 se disolvió en 4,76 kg de diclorometano a reflujo. La solución se enfrió de manera programada a -30°C a una velocidad de 10°C/0,5 h, y se mantuvo a -20°C durante 60 h. Precipitó una gran cantidad de sólido y se filtró, y el sólido resultante se batió con 2,87 kg de diclorometano y se filtró para dar 790 g de sólido. El sólido se disolvió totalmente en 1,58 L de acetato de etilo a reflujo, luego se añadieron gota a gota 1,58 L de n-heptano, se enfrió a 500°C y se agitó hasta que apareció una gran cantidad de sólido, luego se enfrió de forma programada (hasta -10°C en 100 minutos) y se mantuvo a -10°C durante 10 horas. La mezcla se filtró y el sólido resultante se lavó con un disolvente mixto de 0,79 L de acetato de etilo y 0,79 L de n-heptano, y se secó en una estufa de vacío para dar 0,61 kg de la forma cristalina I del Compuesto 1 con una pureza de 98,5%.

1H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) ppm 3,07 (dd,  $J = 17,69, 6,90$  Hz, 1 H), 3,48 (dd,  $J = 17,82, 7,53$  Hz, 1 H), 3,55 (s, 3 H), 4,10 (m,  $J = 6,88$  Hz, 1 H), 4,20 (dd,  $J = 11,29, 6,27$  Hz, 1 H), 4,51 (dd,  $J = 11,29, 6,78$  Hz, 1 H), 5,91 (s, 1 H), 6,76 (s,

2 H), 7,17 (d,  $J = 7,28$  Hz, 1 H), 7,22 - 7,29 (m, 2 H), 7,89 (d,  $J = 3,26$  Hz, 1 H), 7,98 (d,  $J = 3,26$  Hz, 1 H).

LCMS:  $m/z$ : 488,1 [M + H<sup>+</sup>].

Análisis de detección por rayos X: no fue fácil hacer crecer un único cristal del Compuesto 1. Para confirmar la configuración absoluta del Compuesto 1, se hizo reaccionar el Compuesto 12 con cloruro de metanosulfonilo para dar el Compuesto 14, y se hizo crecer un único cristal del Compuesto 14, la ruta es como sigue,



La reacción de sustitución se produjo en el N, y la basicidad de la TEA utilizada fue débil. No se produjo inversión en la configuración de los dos carbonos quirales en el Compuesto 12. Por lo tanto, la configuración de los dos carbonos quirales en el Compuesto 1 fue consistente con la configuración de los dos carbonos quirales en el Compuesto 14. La configuración absoluta del Compuesto 1 también puede determinarse a partir de los datos cristalina único del Compuesto 14. Los rayos X para el Compuesto 14 se muestran en la Fig. 4.

### Ejemplo 3: preparación de la forma cristalina I del Compuesto 1

El producto bruto de Compuesto 1 obtenido en el Ejemplo 1 se purificó por columna de gel de sílice. La fase móvil fue diclorometano/metanol = 100:1. El producto resultante se purificó dos veces por recristalización en un disolvente mixto de acetato de etilo/éter de petróleo (1:1 en volumen) para dar la forma cristalina I del Compuesto 1.

### Ensayo de qPCR para el ensayo in vitro de VHB

#### 1. Propósito experimental:

El contenido de ADN del VHB en células HepG2.2.15 se detectó mediante un ensayo de qPCR en tiempo real, y los valores EC<sub>50</sub> de los compuestos se utilizaron como indicadores para evaluar el efecto inhibitor de los compuestos sobre el VHB.

#### 2. Materiales experimentales:

##### 2.1. Linaje celular: células HepG2.2.15

Medio de cultivo de células HepG2.2.15 (DMEM/F12, Invitrogen-11330057; 10% de suero, Invitrogen-10099141; 100 unidades/mL de penicilina y 10 µg/mL de estreptomina, Invitrogen-15140122; 1% de aminoácidos no esenciales, Invitrogen-11140076; L-GLUTAMINA 2 mM, Invitrogen-25030081; 300 µg/mL de Geneticina, Invitrogen-10131027

##### 2.2. Reactivos:

Tripsina (Invitrogen-25300062)

DPBS (Hyclone-SH30028.01B)

DMSO (Sigma-D2650-100mL)

Kit de purificación de ADN de alto rendimiento (QIAamp 96 DNA Blood Kit, Qiagen-51162)

Sonda maestra universal cuantitativa FastStart (FastStart Universal Probe Master, Roche-04914058001)

##### 2.3. Suministros y equipos:

Placa de cultivo celular de 96 pocillos (Corning-3599)

Incubadora de CO<sub>2</sub> (HERA-CELL-240)

Película de sellado óptico (ABI-4311971)

Placa de 96 pocillos para PCR cuantitativa (Applied Biosystems-4306737)

Instrumento de fluorescencia para PCR cuantitativa (sistema Applied Biosystems-7500 de PCR en tiempo real)

1. Etapas y métodos experimentales:

3.1. Se sembraron células HepG2.2.15 ( $4 \times 10^4$  células/pocillo) en una placa de 96 pocillos y se incubaron a 37°C bajo CO<sub>2</sub> al 5% durante la noche.

5 3.2. El segundo día, el compuesto se diluyó en un total de 8 concentraciones con un gradiente de dilución de 3 veces. Se añadieron diferentes concentraciones del compuesto a los pocillos de cultivo, por duplicado. La concentración final de DMSO en el medio de cultivo fue 1%. Se usó GLS4 1 µM como control de inhibición 100%; se usó DMSO al 1% como control de inhibición 0%.

3.3. Al quinto día, se reemplazó el medio de cultivo fresco que contenía el compuesto.

10 3.4. Al octavo día, se recogió el medio de cultivo en los pocillos de cultivo y se extrajo el ADN usando un kit de purificación de ADN de alto rendimiento (Qiagen-51162). Consulte el manual del producto para conocer el procedimiento específico.

3.5. La preparación de la solución de reacción de PCR fue como se muestra en la Tabla 1:

Tabla 1. Preparación de la solución de reacción de PCR

Artículo	Volumen requerido para la preparación de 1 pocillo (µL)	Volumen requerido para la preparación de 80 pocillos (µL)
Sonda maestra cuantitativa universal FastStart	12,5	1000
Cebador aguas arriba (10 µmol)	1	80
Cebador aguas abajo (10 µmol)	1	80
Sonda (10 µmol)	0,5	40

15

Secuencia de cebador aguas arriba: GTGTCTGCGGCGTTTTATCA

Secuencia de cebador descendente: GACAAACGGGCAACATACCTT

Secuencia de la sonda: 5 '+ FAM + CCTCTKCATCCTGCTGCTATGCCTCATC + TAMRA-3'

20 3.1. Se añadieron 15 µL de mezcla de reacción a cada pocillo de una placa de PCR de 96 pocillos, luego 10 µL de ADN muestra o ADN estándar de VHB a cada pocillo.

3.2. Condiciones de reacción de PCR: calentamiento a 95°C durante 10 minutos; luego desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, extensión a 60°C durante 1 minuto, un total de 40 ciclos.

3.3. Análisis de los datos:

25 3.8.1. Cálculo del porcentaje de inhibición: % Inh. =  $[1 - (\text{número de copias de ADN en la muestra} / \text{número de copias de ADN en GLS41 } \mu\text{M})] / (\text{número de copias de ADN en el DMSO control} / \text{número de copias de ADN en GLS41 } \mu\text{M})$ .

3.8.2. Cálculo de CE<sub>50</sub>: la concentración del compuesto para un valor de inhibición de VHB del 50% del VHB se calculó utilizando el software GraphPad Prism.

4. Resultados experimentales

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 3:

30

Tabla-3. Resultados del ensayo CE<sub>50</sub> del ensayo qPCR

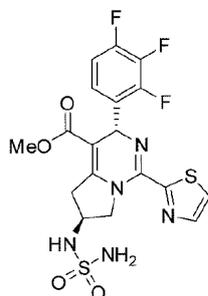
Muestra	Concentración para un índice de inhibición del VHB del 50% (EC <sub>50</sub> )
Compuesto 1	A

Definición de la actividad biológica: A: CE<sub>50</sub> ≤ 100 nM.

Conclusión: el Compuesto 1 tiene un efecto inhibidor significativo sobre el ADN del VHB.

## REIVINDICACIONES

1. La forma cristalina I del Compuesto 1, que comprende un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos de difracción característicos en los siguientes ángulos  $2\theta$ :  $15,50 \pm 0,2^\circ$ ,  $17,00 \pm 0,2^\circ$ ,  $20,86 \pm 0,2^\circ$ ;



Compuesto 1

5 2. La forma cristalina I según la reivindicación 1, que comprende un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos de difracción característicos en los siguientes ángulos  $2\theta$ :  $11,04 \pm 0,2^\circ$ ,  $15,50 \pm 0,2^\circ$ ,  $17,00 \pm 0,2^\circ$ ,  $18,57 \pm 0,2^\circ$ ,  $19,36 \pm 0,2^\circ$ ,  $20,19 \pm 0,2^\circ$ ,  $20,86 \pm 0,2^\circ$ ,  $22,68 \pm 0,2^\circ$ .

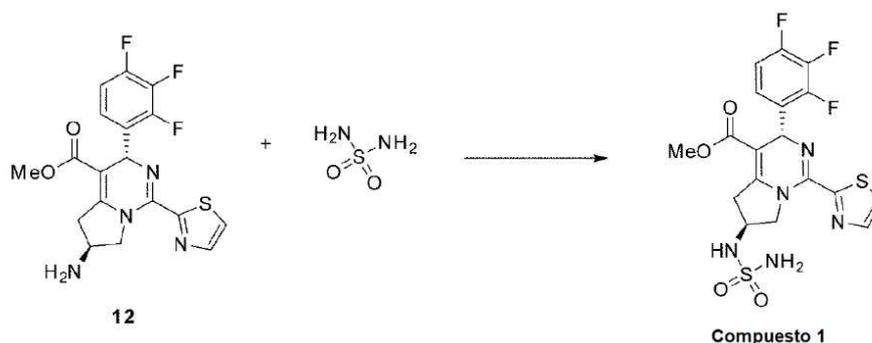
10 3. La forma cristalina I según la reivindicación 2, que comprende un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos de difracción característicos en los siguientes ángulos  $2\theta$ :  $7,848^\circ$ ,  $10,489^\circ$ ,  $11,037^\circ$ ,  $12,875^\circ$ ,  $15,497^\circ$ ,  $16,995^\circ$ ,  $18,572^\circ$ ,  $19,360^\circ$ ,  $19,697^\circ$ ,  $20,192^\circ$ ,  $20,861^\circ$ ,  $22,676^\circ$ ,  $22,972^\circ$ ,  $23,225^\circ$ ,  $23,583^\circ$ ,  $23,940^\circ$ ,  $24,571^\circ$ ,  $24,886^\circ$ ,  $25,162^\circ$ ,  $25,476^\circ$ ,  $25,710^\circ$ ,  $26,405^\circ$ ,  $27,393^\circ$ ,  $28,237^\circ$ ,  $28,613^\circ$ ,  $29,007^\circ$ ,  $31,039^\circ$ ,  $32,892^\circ$ ,  $33,858^\circ$ ,  $34,095^\circ$ ,  $34,609^\circ$ ,  $35,000^\circ$ ,  $35,871^\circ$ ,  $36,538^\circ$ ,  $38,433^\circ$ .

4. La forma cristalina I según la reivindicación 1, que comprende un patrón de XRPD como se muestra en la Fig. 1.

15 5. La forma cristalina I según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende un patrón de DSC como se muestra en la Fig. 2.

6. La forma cristalina I según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende un patrón de TGA como se muestra en la Fig. 3.

7. Un método de preparación del Compuesto 1, que comprende las siguientes etapas:



20 donde,

la etapa de reacción no requiere la adición de una base orgánica o inorgánica;

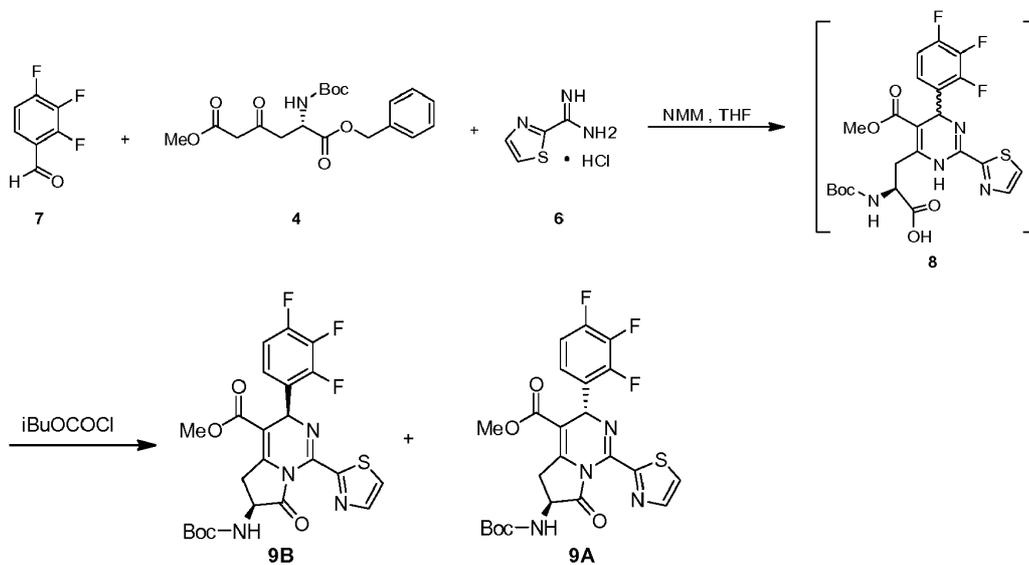
el disolvente de reacción se selecciona de 1,4-dioxano o tetrahydrofurano;

la relación molar del Compuesto 12 a aminosulfonamida se selecciona de 1:1-20, preferiblemente 1:10;

la temperatura de reacción se selecciona de  $60^\circ\text{C}$  a temperatura de reflujo;

25 opcionalmente, el Compuesto 1 se purifica por recristalización en un único disolvente o en un disolvente mixto de varios disolventes seleccionados del grupo que consiste en diclorometano, acetato de etilo, acetato de isopropilo, n-heptano, n-hexano, ciclohexano y éter de petróleo.

8. Método de preparación según la reivindicación 7, que comprende las siguientes etapas:



donde,

la relación molar de NMM a Compuesto 4 es 1-4:1, preferiblemente 2-3:1;

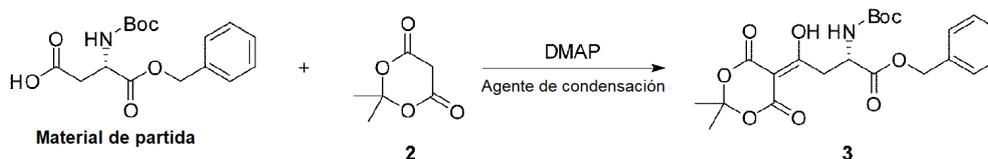
5 opcionalmente, el Compuesto 8 se agrega directamente a la siguiente reacción sin separación;

opcionalmente, la mezcla de Compuesto 9A y Compuesto 9B proporcionada por la reacción se separa y purifica por recristalización en un único disolvente o en un disolvente mixto de varios disolventes seleccionados del grupo que consiste en acetato de etilo, acetato de isopropilo, tetrahidrofurano, dioxano, ciclohexano y n-heptano para dar el Compuesto 9A;

10 preferiblemente, el disolvente de recristalización se selecciona de un disolvente mixto de acetato de etilo, tetrahidrofurano y n-heptano;

más preferiblemente, la relación en volumen de n-heptano, acetato de etilo y tetrahidrofurano en el disolvente mixto es (6-54):(2-18):1, y más preferiblemente 18:6:1.

9. Método de preparación según la reivindicación 7, que comprende las siguientes etapas:



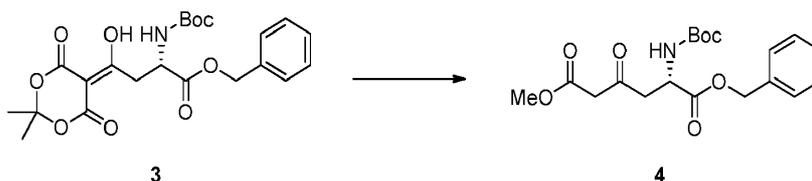
15

el agente de condensación se selecciona de EDCI, DCC, DIC, DMC, HOBT, HATU, CDI;

la temperatura de reacción se selecciona de  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $10^{\circ}\text{C}$ , preferiblemente de  $-10^{\circ}\text{C}$  a  $0^{\circ}\text{C}$ ;

opcionalmente, el Compuesto 3 se agrega directamente a la siguiente reacción sin separación.

10. El método de preparación según la reivindicación 7, que comprende las siguientes etapas:



20

el disolvente de reacción es un disolvente único o un disolvente mixto de varios disolventes seleccionados del grupo que consiste en metanol, etanol, isopropanol, n-butanol, t-butanol, tetrahidrofurano, acetato de etilo, tolueno y xileno,

preferiblemente un disolvente mixto de tolueno y metanol;

opcionalmente, el Compuesto 4 se purifica por cristalización, suspensión o recristalización con agitación en un único disolvente o en un disolvente mixto de varios disolventes seleccionados del grupo que consiste en metanol, etanol, isopropanol, n-butanol, ciclohexano, n-hexano, n-heptano y éter de petróleo;

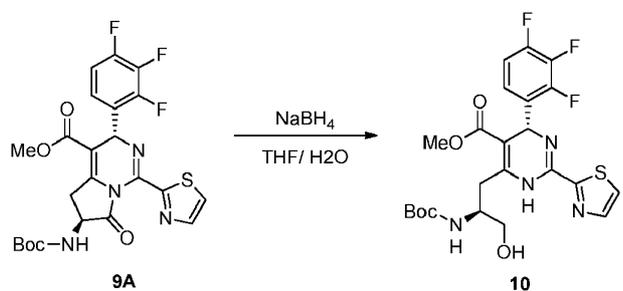
- 5 el Compuesto 4 se purifica por cristalización o suspensión con agitación a la temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$  a  $30^{\circ}\text{C}$ , preferiblemente  $10^{\circ}\text{C}$  a  $20^{\circ}\text{C}$ ;

preferiblemente, el Compuesto 4 se purifica por cristalización, suspensión o recristalización con agitación en un disolvente mixto seleccionado del grupo que consiste en etanol/ciclohexano, etanol/n-hexano, etanol/n-heptano o etanol/éter de petróleo;

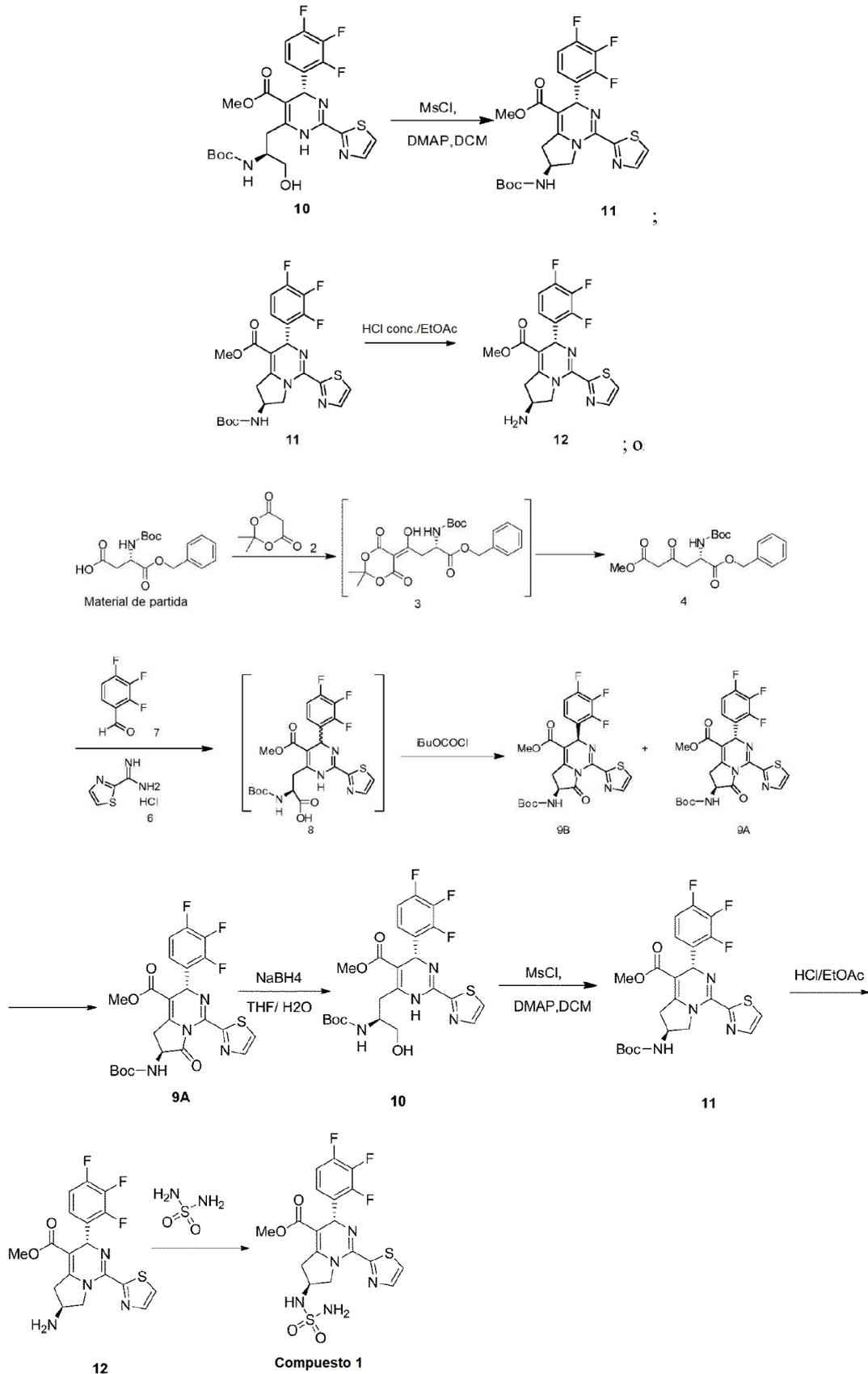
- 10 más preferiblemente, la relación en volumen de etanol a ciclohexano, n-hexano, n-heptano o éter de petróleo en el disolvente mixto se selecciona de 1:1-3;

más preferiblemente, el disolvente mixto es etanol/éter de petróleo, y la relación en volumen de etanol a éter de petróleo es 3:5.

11. El método de preparación según la reivindicación 7, que comprende las siguientes etapas:



15



12. El método de preparación de la forma cristalina I del Compuesto 1 según la reivindicación 4, que comprende las siguientes etapas: añadir el Compuesto 1 a un disolvente mixto de acetato de etilo y éter de petróleo para recristalizar, en donde la relación en volumen de acetato de etilo a éter de petróleo es 1:0,5-2, preferiblemente 1:1; o

5

añadir el Compuesto 1 a acetato de etilo y calentar a reflujo para la disolución, luego añadir gota a gota n-heptano y enfriar lentamente la mezcla hasta 10°C a -10°C para cristalizar, en donde la relación en volumen de acetato de etilo a n-heptano es 1:0,5-2, preferiblemente 1:1.

- 5 **13.** Un uso de la forma cristalina I según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la preparación de un medicamento para tratar enfermedades relacionadas con el VHB.

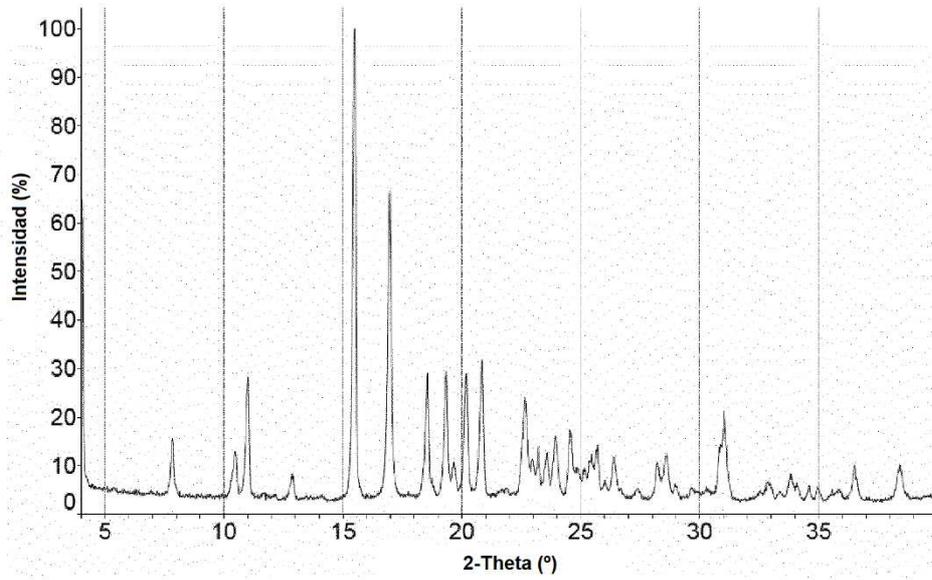


Figura 1

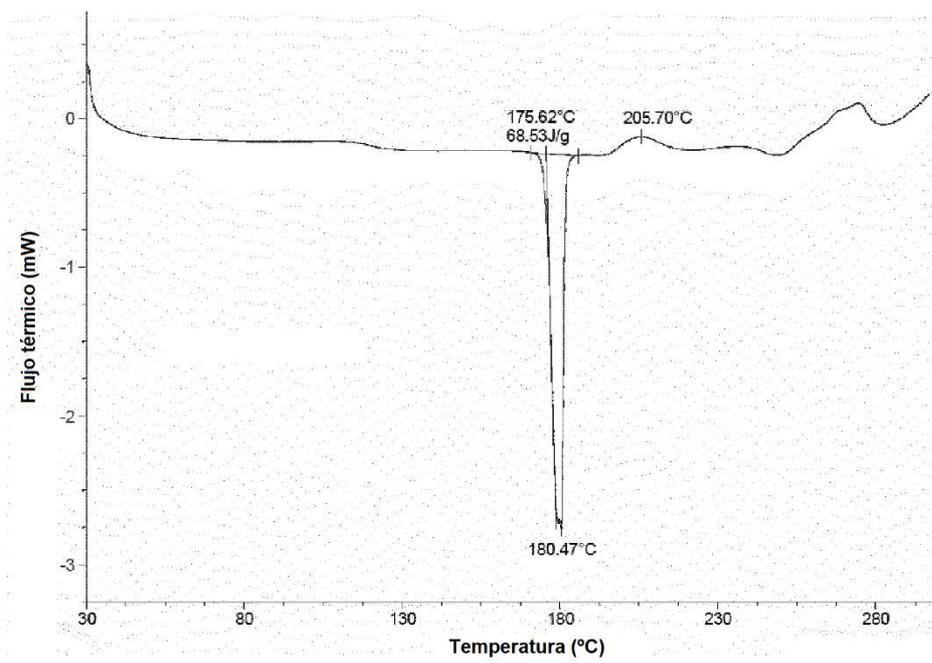


Figura 2

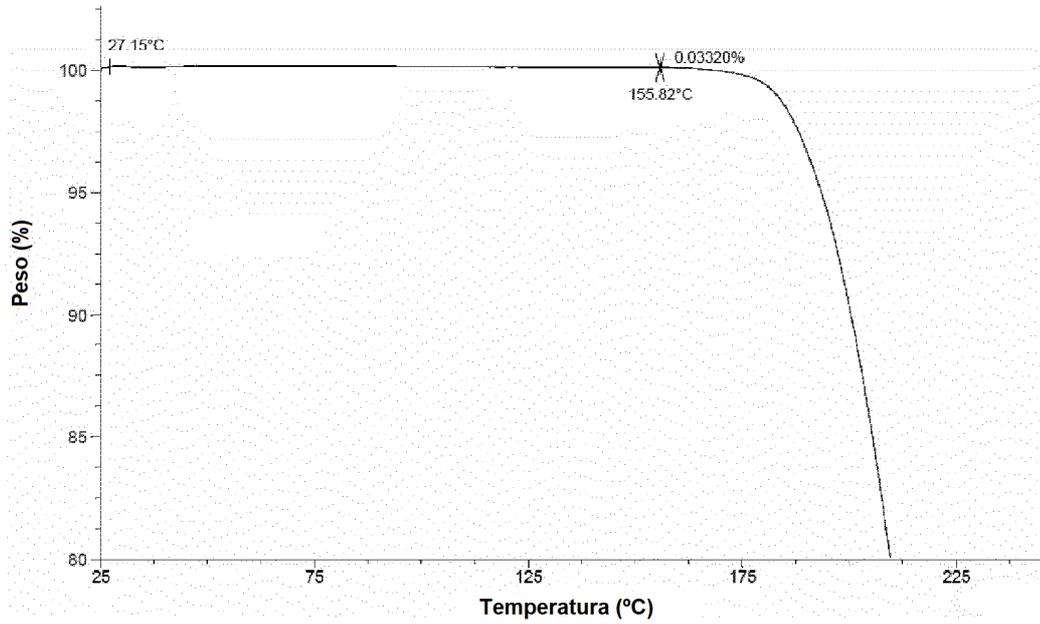


Figura 3

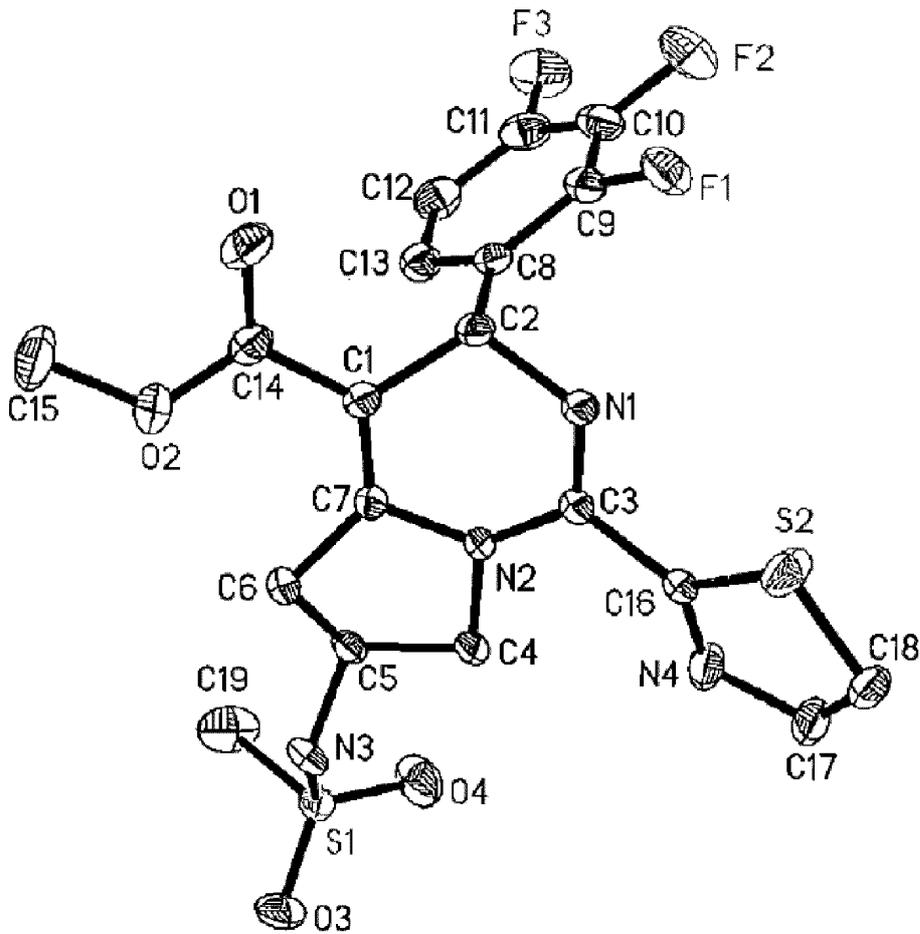


Figura 4