

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 934 533**

51 Int. Cl.:

C07D 249/08 (2006.01)

A61K 31/416 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2018** **PCT/CN2018/121477**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2019** **WO19114838**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2018** **E 18888224 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2022** **EP 3725781**

54 Título: **Cristal y sal del compuesto 4-(naftalen-1-il)-4H-1,2,4-triazol y método para su preparación**

30 Prioridad:

15.12.2017 CN 201711352291

19.12.2017 CN 201711376759

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.02.2023

73 Titular/es:

MEDSHINE DISCOVERY INC. (100.0%)
Room 218, No. 9 Gaoxin Road Jiangbei
New District
Nanjing, Jiangsu 210032, CN

72 Inventor/es:

WANG, JIANFEI;
ZHANG, YANG;
LI, JIAN y
CHEN, SHUHUI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 934 533 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

Cristal y sal del compuesto 4-(naftalen-1-il)-4H-1,2,4-triazol y método para su preparación

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica los beneficios de las siguientes solicitudes:

- 5 Documento de patente CN201711352291.0, fecha de presentación 15 de diciembre de 2017;
Documento de patente CN201711376759.X, fecha de presentación 19 de diciembre de 2017.

Campo de la invención

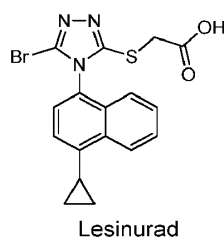
La presente divulgación se refiere a una forma cristalina de un compuesto que contiene 4-(naftalen-1-il)-4H-1,2,4-triazol y a un método de preparación de la misma, y también implica el uso de la forma cristalina en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad relacionada con un nivel anormal de ácido úrico. En particular, la presente invención se refiere a la forma cristalina A del compuesto 1, la forma cristalina B del compuesto 1a y la forma cristalina C del compuesto 1b.

Antecedentes de la invención

En los últimos años, a medida que cambian los hábitos de vida de las personas, la aparición de enfermedades de hiperuricemia y gota muestra una tendencia creciente año tras año. En Europa y los Estados Unidos, los estudios epidemiológicos han demostrado que los pacientes con artritis gotosa representan el 1-2% de la población total y la artritis gotosa es el principal tipo de artritis en hombres adultos. Bloomberg estima que habrá 17,7 millones de pacientes con gota en 2021. En China, una encuesta muestra que, entre la población de 20 a 74 años, el 25,3% de la población tiene un nivel relativamente alto de ácido úrico en la sangre y el 0,36% de la población sufre de la enfermedad de la gota. En la actualidad, los fármacos clínicos incluyen principalmente: 1) fármacos que inhiben la producción de ácido úrico, tales como los inhibidores de la xantina oxidasa alopurinol y febuxostat; 2) fármacos que favorecen la excreción de ácido úrico, tales como probenecid y benzbromarona; 3) inhibidores de la inflamación, tales como la colchicina. Estos fármacos presentan ciertos inconvenientes en el tratamiento, entre los que la escasa eficacia, los efectos secundarios graves y el elevado coste se convierten en los principales cuellos de botella para las aplicaciones clínicas de estos fármacos. Según informes, el 40%-70% de los pacientes no alcanzaron el objetivo terapéutico esperado (< 6 mg/dL) luego de recibir terapias estándar.

URAT1 es un importante transportador de aniones renales, que se encuentra en la membrana del borde en cepillo de las células epiteliales de los túbulos renales, transporta específicamente ácido úrico desde los túbulos renales a las células epiteliales y es una fuerza impulsora importante para la reabsorción de ácido úrico en los túbulos renales. Por lo tanto, la inhibición significativa del transportador de urato URAT1 aumentará la excreción de ácido úrico en el cuerpo, reduciendo así el nivel de ácido úrico en la sangre y disminuyendo la posibilidad de ataques de gota. El documento WO 2009/070740 describe compuestos y composiciones y métodos de uso. El documento WO 2016/000568 describe compuestos para la gota.

En diciembre de 2015, la FDA de EE. UU. aprobó el lesinurad, el primer inhibidor de URAT1 (como se muestra a continuación), desarrollado por AstraZeneca, y también aprobó que el fármaco se use en una dosis de 200 mg/día en combinación con un inhibidor de la xantina oxidasa (XOI) (p. ej., febuxostat) para el tratamiento de la hiperuricemia y la artritis gotosa, pero la terapia combinada no produjo un efecto adicional significativo en comparación con el inhibidor de la xantina oxidasa usado solo. Además, lesinurad no fue aprobado a una dosis de 400 mg/día debido al aumento significativo de los efectos tóxicos y secundarios observados a dosis altas (tasa de incidencia relativamente alta de sucesos renales adversos, especialmente la alta tasa de incidencia de nefrolitiasis), aunque las terapias de combinación de altas dosis exhiben mayores efectos adicionales. Por lo tanto, la FDA requirió una advertencia de recuadro negro en la etiqueta de lesinurad para advertir al personal médico sobre el riesgo de insuficiencia renal aguda, que ocurre con más frecuencia, especialmente cuando el medicamento no se usa en combinación con XOI, y el riesgo de insuficiencia renal es aún mayor si lesinurad se usa en una dosis sobreaprobada. Además, la FDA exigió que AstraZeneca siguiera investigando el perfil de seguridad cardiovascular y renal de lesinurad después de su lanzamiento al mercado. Para el uso a largo plazo en enfermedades metabólicas, la seguridad de los medicamentos es particularmente importante. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de fármacos reductores del ácido úrico seguros en este campo.

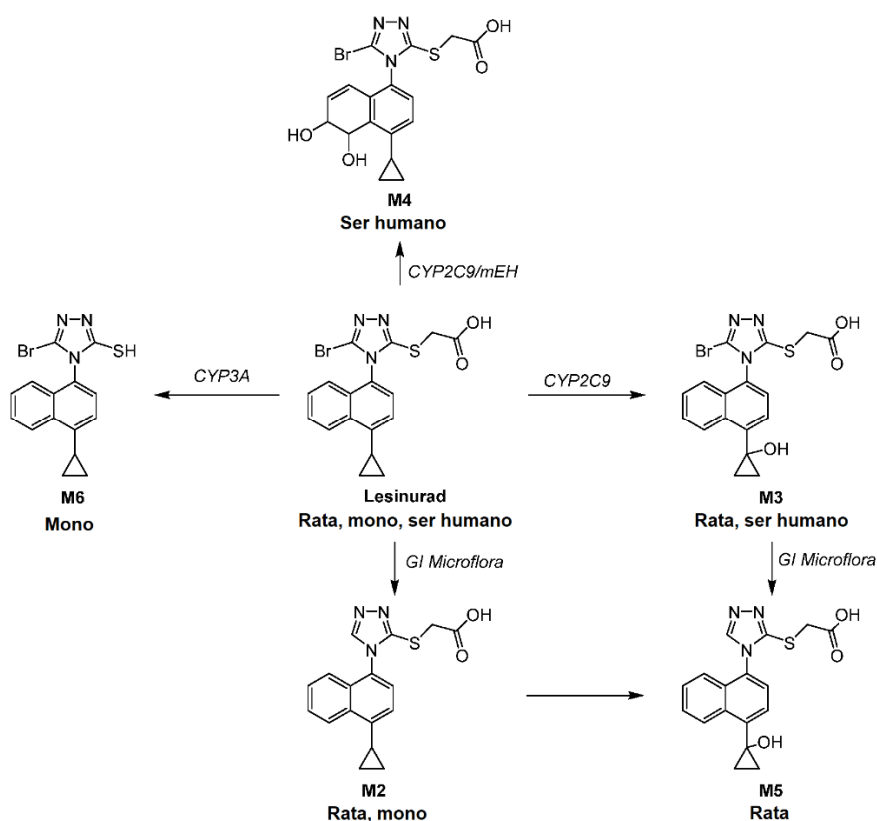


El nuevo informe de aplicación de fármacos de AstraZeneca ha informado en detalle los resultados de la identificación de metabolitos de lesinurad por microsomas hepáticos y en células hepáticas de diferentes géneros de animales in vitro. Los datos mostraron que los principales metabolitos M3 y M4 se detectaron cuando lesinurad se metabolizaba en células hepáticas de monos y seres humanos, pero no se detectaban cuando lesinurad se metabolizaba en células hepáticas de perros o ratas, como se muestra en la Tabla-a a continuación.

Tabla-a

Sistema	Género	M3	M4	Lesinurad	Total
Microsomas hepáticos	Rata	-	-	100	100
	Perro	-	-	100	100
	Mono	7,9	-	92,1	100
	Ser Humano	-	-	100	100
Células hepáticas	Rata	-	-	100	100
	Perro	-	-	100	100
	Mono	1,45	0,47	98,1	100
	Ser humano	2,24	5,69	92,1	100

Además, AstraZeneca también informó sobre los principales metabolitos y vías metabólicas de lesinurad después de la administración a varios géneros de animales, y el metabolito dihidroxi M4 se detectó específicamente en metabolitos de seres humanos:

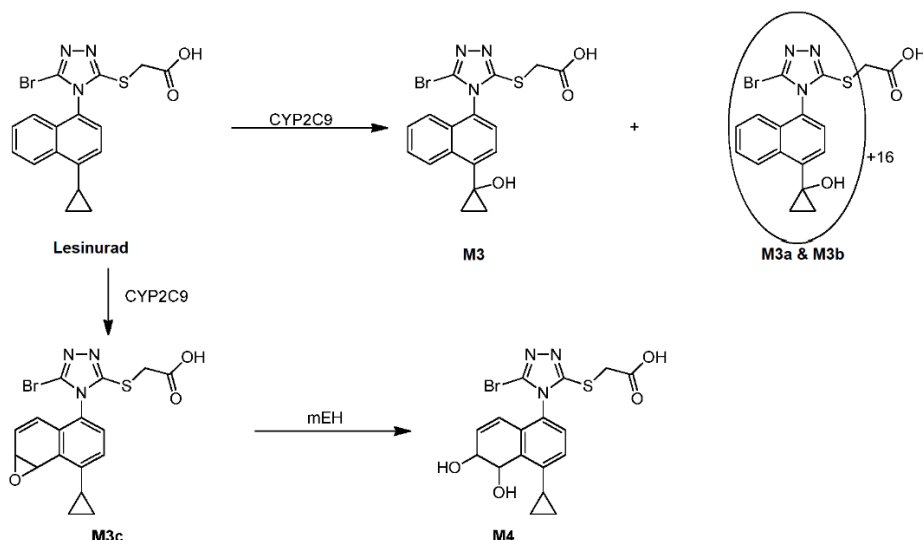


Esto es consistente con los datos clínicos de lesinurad en seres humanos. Los datos experimentales muestran que M3 y M4 son los principales metabolitos encontrados clínicamente en seres humanos, como se muestra en la Tabla-b a continuación.

Tabla-b

Sistema	Tiempo (horas)	Porcentaje de la dosis administrada										Lesinurad	Total
		M1	M2	M3	M3b	M4	M5	M5b	M16	Otros			
Orina	0-144	1,5	0,3	12,0	1,0	15,7	ND	ND	0,5	1,2		31,3	63,4
Excrementos	0-144	ND	4,8	0,3	1,9	5,0	3,6	7,8	1,1	7,5		1,5	33,5

La producción del metabolito M4 se determina como resultado de la acción conjunta del citocromo CYP2C9 y la epóxido hidrolasa mEH de primates. Esta ruta metabólica de mEH es exclusiva de las especies de primates, lo que explica por qué M4 no se observa en ratas y perros.



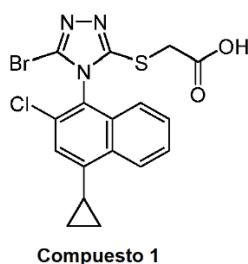
5 Contenido de la invención

La presente invención se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. En particular, la presente invención se refiere a la forma cristalina A del compuesto 1, la forma cristalina B del compuesto 1a y la forma cristalina C del compuesto 1b.

En la presente divulgación, también se hace referencia, únicamente con fines ilustrativos, a la forma cristalina D y la forma amorfa I del compuesto 1, así como a las formas amorfas II y III de los compuestos 1a y 1b, respectivamente.

Dicha forma cristalina D y formas amorfas I, II y III no forman parte de la invención.

La presente divulgación proporciona una forma cristalina A del compuesto 1, en donde el patrón de difracción de rayos X en polvo del mismo comprende picos de difracción característicos en los ángulos 2θ de $7,16 \pm 0,2^\circ$, $17,98 \pm 0,2^\circ$ y $22,30 \pm 0,2^\circ$.



En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina A del compuesto 1 comprende picos de difracción característicos en los ángulos 2θ de $7,16 \pm 0,2^\circ$, $12,50 \pm 0,2^\circ$, $14,61 \pm 0,2^\circ$, $17,98 \pm 0,2^\circ$, $19,62 \pm 0,2^\circ$, $22,30 \pm 0,2^\circ$, $24,63 \pm 0,2^\circ$ y $26,37 \pm 0,2^\circ$.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina A del compuesto 1 comprende picos de difracción característicos en los ángulos 2θ de $7,16 \pm 0,2^\circ$, $9,56 \pm 0,2^\circ$, $11,30 \pm 0,2^\circ$, $12,50 \pm 0,2^\circ$, $14,61 \pm 0,2^\circ$, $17,98 \pm 0,2^\circ$, $18,72 \pm 0,2^\circ$, $19,62 \pm 0,2^\circ$, $22,30 \pm 0,2^\circ$, $24,63 \pm 0,2^\circ$ y $26,37 \pm 0,2^\circ$.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de XRPD de la forma cristalina A del compuesto 1 es como se muestra en la Fig. 1.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, los datos analíticos del patrón de XRPD de la forma cristalina A del compuesto 1 son como se muestran en la Tabla 1.

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

No.	Ángulo 2θ (°)	Espaciado d (Å)	Intensidad (%)	No.	Ángulo 2θ (°)	Espaciado d (Å)	Intensidad (%)
1	7,156	12,342	69,2	24	26,644	3,3429	10
2	9,559	9,2446	21,5	25	27,135	3,2835	33,1
3	11,302	7,8228	19,8	26	27,513	3,2393	9,3
4	12,5	7,0752	68,6	27	27,926	3,1923	10,1
5	12,853	6,882	19,3	28	28,616	3,1169	19,5
6	14,255	6,208	11	29	28,912	3,0856	7,2
7	14,614	6,0564	40,7	30	29,347	3,0408	2,8
8	14,987	5,9066	9,1	31	30,392	2,9387	2,7
9	16,34	5,4202	2,7	32	31,02	2,8805	14,8
10	17,983	4,9286	82,5	33	31,3	2,8554	31,8
11	18,221	4,8649	14,6	34	32,496	2,753	3,4
12	18,716	4,7373	46	35	33,056	2,7076	4,8
13	19,622	4,5205	32,8	36	33,232	2,6937	6,5
14	20,725	4,2822	10,7	37	34,199	2,6197	2,5
15	21,1	4,2071	3	38	34,531	2,5953	12,9
16	22,304	3,9825	100	39	35,852	2,5026	4,6
17	22,678	3,9177	22,4	40	36,363	2,4686	5,7
18	23,569	3,7715	3	41	37,021	2,4263	8,5
19	24,396	3,6457	37,6	42	37,557	2,3928	8,5
20	24,633	3,6111	64,2	43	37,907	2,3716	4,2
21	25,065	3,5498	22,3	44	38,321	2,3469	7,9
22	25,953	3,4303	13,4	45	38,975	2,309	4,3
23	26,367	3,3774	60,7	46	39,306	2,2903	3,2

En algunas realizaciones de la presente divulgación, la curva de calorimetría diferencial de barrido de la forma cristalina A del compuesto 1 tiene un pico endotérmico con un inicio a $167,42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- 5 En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de DSC de la forma cristalina A del compuesto 1 es como se muestra en la Fig. 2.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, la curva de análisis termogravimétrico de la forma cristalina A del compuesto 1 muestra una pérdida de peso de $0,3708\%$ a $143,64\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- 10 En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de TGA de la forma cristalina A del compuesto 1 es como se muestra en la Fig. 3.

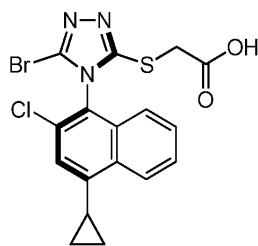
También se describe, pero no forma parte de la invención, una forma amorfa I del compuesto 1, en la que el patrón de difracción de rayos X en polvo del mismo es como se muestra en la Fig. 4.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de DSC de la forma amorfa I del compuesto 1 es como se muestra en la Fig. 5.

- 15 En algunas realizaciones de la presente divulgación, la curva de análisis termogravimétrico de la forma amorfa I del compuesto 1 muestra una pérdida de peso de $0,8970\%$ a $116,02\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de TGA de la forma amorfa I del compuesto 1 es como se muestra en la Fig. 6.

- 20 La presente divulgación también proporciona una forma cristalina B del compuesto 1a, en donde el patrón de difracción de rayos X en polvo del mismo comprende picos de difracción característicos en los ángulos 2θ de $17,34 \pm 0,2^{\circ}$, $20,36 \pm 0,2^{\circ}$ y $27,12 \pm 0,2^{\circ}$.



Compuesto 1a

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina B del compuesto **1a** comprende picos de difracción característicos en los ángulos 2θ de $13,77 \pm 0,2^\circ$, $15,53 \pm 0,2^\circ$, $17,34 \pm 0,2^\circ$, $18,76 \pm 0,2^\circ$, $20,36 \pm 0,2^\circ$, $21,31 \pm 0,2^\circ$, $23,10 \pm 0,2^\circ$ y $27,12 \pm 0,2^\circ$.

- 5 En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de XRPD de la forma cristalina B del compuesto **1a** es como se muestra en la Fig. 7.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, los datos analíticos del patrón de XRPD de la forma cristalina B del compuesto **1a** se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Datos analíticos del patrón XRPD de la forma cristalina B del compuesto **1a**

No.	Ángulo 2θ ($^\circ$)	Espaciado d (Å)	Intensidad (%)	No.	Ángulo 2θ ($^\circ$)	Espaciado d (Å)	Intensidad (%)
1	10,697	8,2639	24,8	20	25,089	3,5465	24,5
2	12,149	7,2792	26,7	21	25,623	3,4737	30,9
3	13,769	6,4259	30,9	22	26,154	3,4044	17,8
4	15,529	5,7016	33,7	23	26,848	3,318	10,1
5	16,055	5,5157	25,5	24	27,123	3,2849	56,2
6	17,025	5,2037	11,6	25	27,38	3,2546	45,1
7	17,338	5,1104	100	26	28,411	3,1389	10,7
8	18,502	4,7914	29,1	27	29,566	3,0188	23,9
9	18,761	4,726	38,9	28	31,225	2,8621	16,9
10	19,902	4,4574	40,7	29	31,48	2,8395	8,4
11	20,355	4,3593	70,3	30	32,254	2,7731	10,2
12	20,949	4,237	32,8	31	32,615	2,7433	10,8
13	21,306	4,1667	40,2	32	33,137	2,7012	17,4
14	21,736	4,0853	10,5	33	33,455	2,6762	15,4
15	22,706	3,913	29,1	34	34,283	2,6135	15,8
16	23,098	3,8474	33,8	35	36,65	2,45	14,1
17	23,806	3,7346	25	36	38,463	2,3385	8,1
18	24,283	3,6623	10,2	37			

- 10 En algunas realizaciones de la presente divulgación, la curva de calorimetría diferencial de barrido de la forma cristalina B del compuesto **1a** tiene un pico endotérmico con un inicio a $140,76^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de DSC de la forma cristalina B del compuesto **1a** es como se muestra en la Fig. 8.

- 15 En algunas realizaciones de la presente divulgación, la curva de análisis termogravimétrico de la forma cristalina B del compuesto **1a** muestra una pérdida de peso de $0,4590\%$ a $128,08^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de TGA de la forma cristalina B del compuesto **1a** es como se muestra en la Fig. 9.

- 20 También se describe, pero no forma parte de la invención, una forma amorfa II del compuesto **1a**, en donde el patrón de difracción de rayos X en polvo de la misma es como se muestra en la Fig. 10.

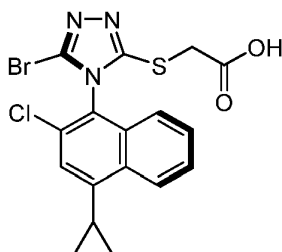
En algunas realizaciones de la presente divulgación, la curva de calorimetría diferencial de barrido de la forma amorfa II del compuesto **1a** tiene un pico exotérmico con inicio a $91,38^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, y un pico endotérmico con inicio a $138,32^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

- 25 En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de DSC de la forma amorfa II del compuesto **1a** es como se muestra en la Fig. 11.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, la curva de análisis termogravimétrico de la forma amorfa II del compuesto **1a** muestra una pérdida de peso del 1,821% a $101,34\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, y una pérdida de peso del 3,629% a $129,17\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de TGA de la forma amorfa II del compuesto **1a** es como se muestra en la Fig. 12.

La presente divulgación también proporciona una forma cristalina C del compuesto **1b**, en donde el patrón de difracción de rayos X en polvo del mismo comprende picos de difracción característicos en los ángulos 2θ de $17,24 \pm 0,2^{\circ}$, $18,68 \pm 0,2^{\circ}$ y $20,26 \pm 0,2^{\circ}$.



Compuesto 1b

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina C del compuesto **1b** comprende picos de difracción característicos en los ángulos 2θ de $12,06 \pm 0,2^{\circ}$, $13,69 \pm 0,2^{\circ}$, $15,46 \pm 0,2^{\circ}$, $17,24 \pm 0,2^{\circ}$, $18,68 \pm 0,2^{\circ}$, $20,26 \pm 0,2^{\circ}$, $21,23 \pm 0,2^{\circ}$ y $27,04 \pm 0,2^{\circ}$.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina C del compuesto **1b** comprende picos de difracción característicos en los ángulos 2θ de $10,65 \pm 0,2^{\circ}$, $12,06 \pm 0,2^{\circ}$, $13,69 \pm 0,2^{\circ}$, $15,46 \pm 0,2^{\circ}$, $15,97 \pm 0,2^{\circ}$, $17,24 \pm 0,2^{\circ}$, $18,68 \pm 0,2^{\circ}$, $20,26 \pm 0,2^{\circ}$, $21,23 \pm 0,2^{\circ}$, $23,01 \pm 0,2^{\circ}$ y $27,04 \pm 0,2^{\circ}$.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de XRPD de la forma cristalina C del compuesto **1b** es como se muestra en la Fig. 13.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, los datos analíticos del patrón de XRPD de la forma cristalina C del compuesto **1b** es como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Datos analíticos del patrón XRPD de la forma cristalina B del compuesto **1b**

No.	Ángulo 2θ ($^{\circ}$)	Espaciado d (Å)	Intensidad (%)	No.	Ángulo 2θ ($^{\circ}$)	Espaciado d (Å)	Intensidad (%)
1	10,652	8,2981	23,5	20	23,714	3,7488	25,6
2	12,057	7,3347	30,9	21	24,995	3,5596	23,6
3	13,691	6,4625	33,9	22	25,53	3,4862	28,7
4	15,463	5,7257	37	23	26,113	3,4097	15,8
5	15,976	5,543	25,5	24	26,751	3,3297	8,1
6	16,947	5,2274	17,6	25	27,044	3,2943	49,1
7	17,245	5,1379	100	26	27,301	3,2639	39
8	18,408	4,8159	29,8	27	27,496	3,2412	16,9
9	18,681	4,7461	44,6	28	28,365	3,1439	7,7
10	19,823	4,4751	44,4	29	29,472	3,0283	20,2
11	20,262	4,3792	68,4	30	31,132	2,8704	13,4
12	20,869	4,253	38,1	31	31,364	2,8498	9,1
13	21,228	4,182	40,1	32	32,566	2,7473	10,6
14	21,644	4,1026	10,8	33	33,043	2,7087	13
15	22,61	3,9294	27,3	34	33,412	2,6796	12
16	23,019	3,8604	32,8	35	34,189	2,6205	15
17	23,519	3,7795	18,7	36	36,587	2,454	10,8

En algunas realizaciones de la presente divulgación, la curva de calorimetría diferencial de barrido de la forma cristalina C del compuesto **1b** tiene un pico endotérmico con un inicio a $140,13\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de DSC de la forma cristalina C del compuesto **1b** es como se muestra en la Fig. 14.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, la curva de análisis termogravimétrico de la forma cristalina C del compuesto **1b** muestra una pérdida de peso de 0,6612% a 134,98 °C ± 3 °C.

- 5 En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de TGA de la forma cristalina C del compuesto **1b** es como se muestra en la Fig. 15.

También se describe, pero no forma parte de la invención, una forma amorfa III del compuesto **1b**, en donde el patrón de difracción de rayos X en polvo de la misma es como se muestra en la Fig. 16.

- 10 En algunas realizaciones de la presente divulgación, la curva de calorimetría diferencial de barrido de la forma amorfa III del compuesto **1b** tiene un pico exotérmico con un inicio a 103,05 °C ± 2 °C, y un pico endotérmico con un inicio a 139,07 °C ± 2 °C.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de DSC de la forma amorfa III del compuesto **1b** es como se muestra en la Fig. 17.

- 15 En algunas realizaciones de la presente divulgación, la curva de análisis termogravimétrico de la forma amorfa III del compuesto **1b** muestra una pérdida de peso del 1,035% a 67,14 °C ± 3 °C, una pérdida de peso del 1,647% a 104,04 °C ± 3 °C y una pérdida de peso del 4,137% a 139,58 °C ± 3 °C.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de TGA de la forma amorfa III del compuesto **1b** es como se muestra en la Fig. 18.

- 20 También se describe, pero no forma parte de la invención, una forma cristalina D del compuesto **1**, en donde el patrón de difracción de rayos X en polvo de la misma comprende picos de difracción característicos en los ángulos 2θ de 9,19 ± 0,2°, 14,41 ± 0,2° y 19,95 ± 0,2°.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina D del compuesto **1** comprende picos de difracción característicos en los ángulos 2θ de 9,19 ± 0,2°, 10,87 ± 0,2°, 11,63 ± 0,2°, 13,72 ± 0,2°, 14,41 ± 0,2°, 16,90 ± 0,2°, 19,95 ± 0,2° y 22,22 ± 0,2°.

- 25 En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina D del compuesto **1** comprende picos de difracción característicos en los ángulos 2θ de 9,19 ± 0,2°, 10,87 ± 0,2°, 11,63 ± 0,2°, 13,72 ± 0,2°, 14,41 ± 0,2°, 16,90 ± 0,2°, 19,95 ± 0,2°, 22,22 ± 0,2° y 26,11 ± 0,2°.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de XRPD de la forma cristalina D del compuesto **1** es como se muestra en la Fig. 19.

- 30 En algunas realizaciones de la presente divulgación, los datos analíticos del patrón de XRPD de la forma cristalina D del compuesto **1** es como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Datos analíticos del patrón de XRPD de la forma cristalina D del compuesto **1**

No.	Ángulo 2θ (°)	Espaciado d (Å)	Intensidad (%)	No.	Ángulo 2θ (°)	Espaciado d (Å)	Intensidad (%)
1	7,200	12,2671	2,9	23	26,111	3,4099	67,9
2	9,189	9,6157	34,7	24	26,444	3,3677	15,5
3	10,869	8,1332	20,3	25	27,156	3,2810	4,5
4	11,628	7,6037	11,9	26	27,416	3,2505	18,6
5	13,002	6,8033	2,0	27	27,689	3,2190	16,2
6	13,722	6,4478	32,0	28	27,963	3,1881	27,6
7	14,414	6,1399	45,9	29	28,615	3,1170	3,9
8	15,397	5,7499	10,0	30	29,172	3,0587	3,6
9	15,955	5,5503	2,8	31	29,801	2,9955	8,9
10	16,901	5,2415	33,3	32	30,274	2,9498	5,5
11	17,548	5,0498	4,4	33	31,360	2,8501	6,4
12	18,109	4,8945	2,3	34	31,513	2,8366	12,3
13	18,38	4,823	11,7	35	33,332	2,6859	4,1
14	19,069	4,6502	15,1	36	34,102	2,6269	9,8
15	19,954	4,4461	100,0	37	34,769	2,578	4,2
16	21,713	4,0895	5,0	38	35,300	2,5405	7,3
17	22,225	3,9965	33,8	39	36,621	2,4518	5,1
18	23,196	3,8314	4,0	40	36,939	2,4314	5,6
19	23,923	3,7166	26,4	41	37,903	2,3718	3,4

20	24,476	3,6339	5,8	42	38,648	2,3278	1,9
21	25,698	3,4638	14,1	43	38,974	2,3091	6,2
22	25,913	3,4355	28,7	44	39,659	2,2707	2,2

En algunas realizaciones de la presente divulgación, la curva de calorimetría diferencial de barrido de la forma cristalina D del compuesto **1** tiene un pico endotérmico con un inicio a 183,17 °C $\pm$ 2 °C.

5 En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de DSC de la forma cristalina D del compuesto **1** es como se muestra en la Fig. 20.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, la curva de análisis termogravimétrico de la forma cristalina D del compuesto **1** muestra una pérdida de peso de 0,2658% a 130,95 °C $\pm$ 3 °C.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el patrón de TGA de la forma cristalina D del compuesto **1** es como se muestra en la Fig. 21.

10 La presente divulgación también proporciona un uso de la forma cristalina A del compuesto **1**, la forma cristalina D del compuesto **1**, la forma amorfa I del compuesto **1**, la forma cristalina B del compuesto **1a**, la forma amorfa II del compuesto **1a**, la forma cristalina C del compuesto **1b**, la forma amorfa III del compuesto **1b** en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección relacionada con un nivel anormal de ácido úrico. Solo el uso que involucra las formas cristalinas A, B y C está de acuerdo con la invención.

15 En algunas realizaciones de la presente divulgación, la afección descrita anteriormente es hiperuricemia, artritis gotosa, nefrolitiasis, cálculos urinarios o hipertensión.

Efecto técnico

20 Las formas cristalinas del compuesto **1** (forma cristalina A), compuesto **1a** (forma cristalina B), compuesto **1b** (forma cristalina C) son todas formas cristalinas estables de los compuestos que exhiben una estabilidad relativamente buena. Además, el compuesto **1a** (forma cristalina B), el compuesto **1b** (forma cristalina C), el compuesto **1** (forma cristalina A) y ($\pm$)-lesinurad exhiben diferentes comportamientos farmacocinéticos en monos cynomolgus. Cuando se administran por vía nasal a la misma dosis, en comparación con ($\pm$)-lesinurad, el compuesto **1a** (forma cristalina B), el compuesto **1b** (forma cristalina C) y el compuesto **1** (forma cristalina A) muestran una mayor exposición al plasma y un mejor comportamiento farmacocinético general. Comparados con ($\pm$)-lesinurad, el compuesto **1a** (forma cristalina B) y el compuesto **1** (forma cristalina A) también muestran una mayor tasa de cobertura efectiva de la diana por la concentración de los compuestos en la orina (0-24 h).

Definiciones y explicaciones

30 A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos y frases utilizados en este documento tienen los siguientes significados. Un término o frase específica no debe considerarse indefinido o poco claro en ausencia de una definición particular, sino que debe entenderse en el sentido ordinario. Cuando aparece un nombre comercial en este documento, se pretende hacer referencia a su correspondiente producto o ingrediente activo del mismo.

35 Los compuestos intermedios de la presente divulgación se pueden preparar mediante varios métodos sintéticos conocidos por los expertos en la técnica, incluidas las realizaciones descritas a continuación, las realizaciones formadas mediante la combinación de las realizaciones descritas a continuación con otros métodos de síntesis química y alternativas equivalentes bien conocidas por los expertos en la materia. Las realizaciones preferidas incluyen, pero no se limitan a, las realizaciones de la presente divulgación.

40 Las reacciones químicas en las realizaciones de la presente divulgación se llevan a cabo en un disolvente adecuado, y el disolvente debe ser adecuado para el cambio químico junto con los reactivos y materiales requeridos en la presente divulgación. Para obtener los compuestos de la presente divulgación, a veces es necesario que los expertos en la materia modifiquen o seleccionen las etapas sintéticas o los esquemas de reacción en función de las realizaciones existentes.

La presente divulgación se describirá específicamente a continuación a través de realizaciones, pero el alcance de la presente divulgación no se limita a las mismas.

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

La presente divulgación emplea las siguientes abreviaturas: DMF representa dimetilformamida; MsOH representa ácido metanosulfónico; EtOH representa etanol; NaOH representa hidróxido de sodio.

Los compuestos se nombran manualmente o mediante el programa ChemDraw®, y los compuestos disponibles comercialmente emplean sus nombres de directorio de los proveedores.

Análisis de difracción de rayos X en polvo (difractómetro de rayos X en polvo, XRPD) en la presente divulgación

Modelo de instrumento: difractómetro de rayos X Bruker D8 Advanced.

Método de detección: para el análisis de XRPD se usaron alrededor de 10-20 mg de las muestras.

5 Los parámetros detallados de XRPD son los siguientes:

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

Voltaje del tubo de rayos X: 40 kV, corriente del tubo de rayos X: 40 mA

Ranura de divergencia: 0,60 mm

Rendija del detector: 10,50 mm

10 Rendija antidispersión: 7,10 mm

Rango de escaneo: 4-40 grados

Tamaño de etapa: 0,02 grados

Tiempo de etapa: 0,12 segundos

Velocidad de rotación de la bandeja de muestra: 15 rpm

15 **Análisis de calorimetría de barrido diferencial (calorímetro de barrido diferencial, DSC) en la presente divulgación**

Modelo de instrumento: calorímetro diferencial de barrido TA Q2000

Método de detección: las muestras (alrededor de 1 mg) se colocaron en un crisol de aluminio para DSC para su análisis y se calentaron de 25 °C a 350 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

20 **Análisis termogravimétrico (Analizador Termogravimétrico, TGA) en la presente divulgación**

Modelo de instrumento: analizador termogravimétrico TA Q5000IR

Método de detección: las muestras (2 mg a 5 mg) se colocaron en un crisol de platino para TGA para su análisis y se calentaron desde temperatura ambiente hasta 350 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

Breve descripción de los dibujos

25 La Fig. 1 es el patrón de XRPD de la forma cristalina A del compuesto **1** medido mediante radiación de Cu-K α .

La Fig. 2 es el patrón de DSC de la forma cristalina A del compuesto **1**.

La Fig. 3 es el patrón de TGA de la forma cristalina A del compuesto **1**.

La Fig. 4 es el patrón de XRPD de la forma amorfa I del compuesto **1** medido mediante radiación de Cu-K α .

La Fig. 5 es el patrón de DSC de la forma amorfa I del compuesto **1**.

30 La Fig. 6 es el patrón de TGA de la forma amorfa I del compuesto **1**.

La Fig. 7 es el patrón de XRPD de la forma cristalina B del compuesto **1a** medido mediante radiación de Cu-K α .

La Fig. 8 es el patrón de DSC de la forma cristalina B del compuesto **1a**.

La Fig. 9 es el patrón de TGA de la forma cristalina B del compuesto **1a**.

La Fig. 10 es el patrón de XRPD de la forma amorfa II del compuesto **1a** medido mediante radiación de Cu-K α .

35 La Fig. 11 es el patrón de DSC de la forma amorfa II del compuesto **1a**.

La Fig. 12 es el patrón de TGA de la forma amorfa II del compuesto **1a**.

La Fig. 13 es el patrón de XRPD de la forma cristalina C del compuesto **1b** medido mediante radiación de Cu-K α .

La Fig. 14 es el patrón de DSC de la forma cristalina C del compuesto **1b**.

La Fig. 15 es el patrón de TGA de la forma cristalina C del compuesto **1b**.

La Fig. 16 es el patrón de XRPD de la forma amorfa III del compuesto **1b** medido mediante radiación de Cu-K α .

La Fig. 17 es el patrón de DSC de la forma amorfa III del compuesto **1b**.

La Fig. 18 es el patrón de TGA de la forma amorfa III del compuesto **1b**.

5 La Fig. 19 es el patrón de XRPD de la forma cristalina D del compuesto **1** medido mediante radiación de Cu-K α .

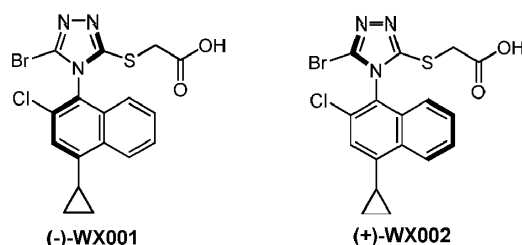
La Fig. 20 es el patrón de DSC de la forma cristalina D del compuesto **1**.

La Fig. 21 es el patrón de TGA de la forma cristalina D del compuesto **1**.

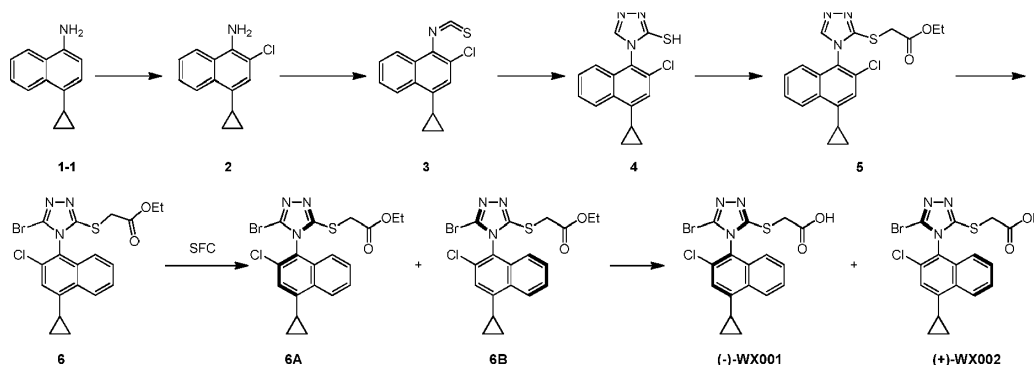
Descripción detallada de la realización preferida

10 Para comprender mejor el contenido de la presente divulgación, las siguientes realizaciones ilustran mejor la presente divulgación.

Realización 1: preparación del compuesto **1a** ((-)-WX001) y el compuesto **1b** ((+)-WX002)



Ruta de síntesis:



15 Etapa 1: síntesis del compuesto **2**

Se añadieron a ácido acético (5,00 mL) el compuesto **1-1** (500,00 mg, 2,73 mmoles, 1,00 equivalentes) y *N*-clorosuccinimida (364,34 mg, 2,73 mmoles, 1,00 eq) y la mezcla resultante se agitó a 20 °C durante 16 horas. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se concentró directamente para eliminar el ácido acético, se trató con gel de sílice (1,0 g) y luego se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida automatizada (EtOAc/PE = 0-10%) para obtener el compuesto **2** como un sólido marrón (383,00 mg, 1,76 mmoles, rendimiento: 64,47%), ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,41-8,35 (m, 1H), 7,85-7,80 (m, 1H), 7,57-7,52 (m, 2H), 7,19 (d, J = 0,8 Hz, 1H), 4,43 (s, 2H), 2,26-2,17 (m, 1H), 1,07-0,97 (m, 2H), 0,74-0,67 (m, 2H).

Etapa 2: síntesis del compuesto **3**

25 El compuesto **2** (360,00 mg, 1,65 mmoles, 1,00 eq) y trietilamina (502,02 mg, 4,96 mmoles, 687,70 μL, 3,00 eq) se disolvieron en diclorometano (5,00 mL) y se enfrió a 0 °C, seguido de la adición gota a gota de tiosfogeno (228,17 mg, 1,98 mmoles, 152,12 μL, 1,20 eq). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 0,5 horas. Luego se añadió ácido clorhídrico diluido (1 mol/L, 20 mL) para extinguir la reacción y la mezcla resultante se extrajo con diclorometano (10 mL x 3). Las fases orgánicas se combinaron, se lavó con salmuera saturada (30 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El filtrado se concentró para obtener el compuesto **3** como un líquido negro (520,00 mg, producto bruto), que se utilizó directamente en la siguiente etapa.

Etapa 3: síntesis del compuesto **4**

Se añadieron a *N,N*-dimetilformamida (5,00 mL) el producto bruto obtenido del compuesto **3** (520,00 mg, 2,00 mmoles, 1,00 eq), hidrato de hidrazina (100,12 mg, 2,00 mmoles, 97,20 µL, 1,00 eq) y *N,N*-dimetilformamida dimetil acetal (285,98 mg, 2,40 mmoles, 317,76 µL, 1,20 eq), y la mezcla resultante se agitó a 20 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se concentró para eliminar *N,N*-dimetilformamida. El residuo se disolvió en acetato de etilo (20 mL), se trató con gel de sílice (2 g) y luego se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida automatizada (EtOAc/PE = 0-35%) para obtener el compuesto **4** como un sólido blanco (813,00 mg, producto bruto). ¹H-RMN (400 MHz, metanol-*d*₄) δ: 8,58 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 8,37 (s, 1H), 7,73-7,67 (m, 1H), 7,67-7,62 (m, 1H), 7,48-7,45 (m, 1H), 7,38-7,34 (m, 1H), 2,59-2,49 (m, 1H), 1,25-1,18 (m, 2H), 0,96-0,84 (m, 2H).

Etapa 4: síntesis del compuesto **5**

Se añadieron a *N,N*-dimetilformamida (5,00 mL) el compuesto **4** (813,00 mg, 2,69 mmoles, 1,00 eq), acetato de 2-bromoetilo (539,86 mg, 3,23 mmoles, 357,53 µL, 1,20 eq) y carbonato de cesio (1,76 g, 5,39 mmoles, 2,00 eq), y la mezcla resultante se agitó a 20 °C durante 16 horas. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se concentró mediante una bomba de aceite para dar una mezcla de aceite amarillo y un sólido blanco, a la que se añadió acetonitrilo (20 mL). La mezcla resultante se agitó durante 2 minutos y se filtró. La torta del filtro se enjuagó con acetonitrilo (20 mL) y los filtrados se combinaron y concentraron para obtener un producto crudo del compuesto **5** (1,10 g, producto bruto) como un aceite de color marrón amarillento. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,49 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 8,24 (s, 1H), 7,68-7,63 (m, 1H), 7,62-7,59 (m, 1H), 7,39-7,37 (m, 1H), 7,22 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 4,19-4,17 (m, 2H), 4,16-4,15 (m, 2H), 2,46-2,39 (m, 1H), 1,22-1,18 (m, 2H), 1,06 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 0,90-0,85 (m, 2H). MS m/z: 388,0 [M+H]⁺.

Etapa 5: síntesis del compuesto **6**

Se añadieron a acetonitrilo (10,00 mL) el producto bruto del compuesto **5** (1,10 g, producto crudo) y *N*-bromosuccinimida (505,46 mg, 2,84 mmoles, 1,00 eq) y la mezcla resultante se agitó a 18 °C durante 2 horas. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida automatizada (EtOAc/PE = 0-25%) para obtener un producto bruto como un aceite marrón. El producto bruto se purificó por HPLC preparativa para obtener el compuesto **6** como un sólido blanco (201,1 mg, 430,82 µmoles). ¹H-RMN (400 MHz, metanol-*d*₄) δ: 8,64 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,79-7,74 (m, 1H), 7,74-7,69 (m, 1H), 7,52 (d, J = 0,8 Hz, 1H), 7,27-7,22 (m, 1H), 4,17-4,09 (m, 2H), 4,08-3,96 (m, 2H), 2,63-2,52 (m, 1H), 1,28-1,23 (m, 5H), 0,97-0,90 (m, 2H). MS m/z: 468,0 [M+H+2]⁺.

Etapa 6: síntesis de los compuestos **6A** y **6B**

El compuesto **6** (201,1 mg, 430,82 µmoles, 1,00 eq) se sometió a cromatografía de fluidos supercríticos SFC (columna quiral: Chiralpak AD (250 mm × 30 mm, 5 µm); fase móvil: CO₂ supercrítico/etanol (hidróxido de amonio al 0,1%) = 30%, 30 min; caudal: 60 mL/min; longitud de onda de detección: 220 nm) para obtener el compuesto **6A** como un aceite transparente (50,30 mg, 107,76 µmoles) y el compuesto **6B** como un aceite transparente (52,60 mg, 112,69 µmoles).

Compuesto **6A**: SFC (columna quiral: Chiralpak AD-3 (100 mm × 4,6 mm, 3 µm); fase móvil: etanol (dietilamina al 0,05%)/CO₂ supercrítico = 5-40%, 4,5 minutos; 40%, 2,5 minutos; 5%, 1 minuto; caudal: 2,8 mL/min; longitud de onda de detección: 220 nm; temperatura de la columna: 40 °C), R_t = 3,513 min. El exceso de este isómero axialmente quiral fue 99,69%.

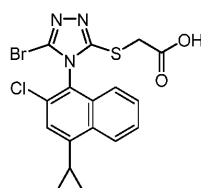
Compuesto **6B**: SFC (columna quiral: Chiralpak AD-3 (100 mm × 4,6 mm, 3 µm); fase móvil: etanol (dietilamina al 0,05%)/CO₂ supercrítico = 5-40%, 4,5 minutos; 40%, 2,5 minutos; 5%, 1 minuto; caudal: 2,8 mL/min; longitud de onda de detección: 220 nm; temperatura de la columna: 40 °C), R_t = 3,911 min. El exceso de este isómero axialmente quiral fue 99,87%.

Etapa 7: síntesis de los compuestos (-)-**WX001** y (+)-**WX002**

Se añadieron a etanol (2,00 mL)/agua (2,00 mL) el compuesto **6A** (50,00 mg, 107,12 µmoles, 1,00 eq) e hidróxido de litio monohidratado (22,47 mg, 535,60 µmoles, 5,00 eq) y la mezcla resultante se agitó a 20 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se concentró para eliminar el etanol y el valor de pH de la fase acuosa residual se ajustó a 2 con ácido clorhídrico diluido (2 mol/L), durante lo cual precipitó un sólido blanco. La mezcla se filtró y la torta del filtro se enjuagó con agua (5 mL). La torta del filtro se disolvió en etanol (1 mL), seguido de la adición de agua (20 mL). La mezcla se liofilizó para obtener (-)-**WX001**, que era la forma amorfa II del compuesto **1a** (36,30 mg, 82,74 µmoles, rendimiento: 77,24%). ¹H-RMN (400 MHz, metanol-*d*₄) δ: 8,52 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,67-7,55 (m, 2H), 7,39 (s, 1H), 7,13 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 4,56 (s, 1H), 3,95-3,79 (m, 2H), 2,53-2,39 (m, 1H), 1,18-1,10 (m, 2H), 0,85-0,76 (m, 2H). MS m/z: 439,9 [M+H+2]⁺. SFC (columna quiral: Chiralpak AS-3 (150 mm × 4,6 mm, 3 µm); fase móvil: metanol (dietilamina al 0,05%)/CO₂ supercrítico = 5-40%, 5 minutos; 40%, 2,5 minutos; 5%, 2,5 minutos; caudal: 2,5 mL/min; longitud de onda de detección: 220 nm; temperatura de la columna: 35 °C), R_t = 3,548 min. El exceso de este isómero axialmente quiral fue del 100%. [α]_D²⁵ = -0,350 (c = 5,0 mg/mL en metanol).

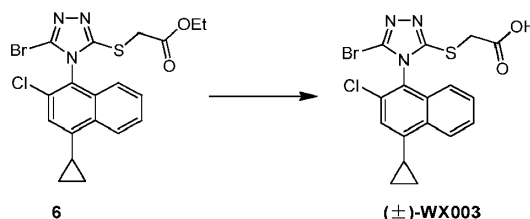
Se añadieron a etanol (2,00 mL)/agua (2,00 mL) el compuesto **6B** (52,00 mg, 111,40 μ moles, 1,00 eq) e hidróxido de litio monohidratado (23,37 mg, 557,00 μ moles, 5,00 eq) y la mezcla resultante se agitó a 20 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se concentró para eliminar el etanol y el valor de pH de la fase acuosa residual se ajustó a 2 con ácido clorhídrico diluido (2 mol/L), durante lo cual precipitó un sólido blanco. La mezcla se filtró y la torta del filtro se enjuagó con agua (5 mL). La torta del filtro se disolvió en etanol (1 mL), seguido de la adición de agua (20 mL). La mezcla se liofilizó para obtener **(+)-WX002**, que era la forma amorfa III del compuesto **1b** (36,80 mg, 83,88 μ moles, rendimiento: 75,29%). ¹H-RMN (400 MHz, metanol-*d*₄) δ : 8,64 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,81-7,67 (m, 2H), 7,51 (s, 1H), 7,26 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 4,14-3,93 (m, 2H), 2,63-2,53 (m, 1H), 1,30-1,23 (m, 2H), 0,97-0,90 (m, 2H). MS m/z: 439,9 [M+H+2]⁺. SFC (columna quiral: Chiralpak AS-3 (150 mm $\times$ 4,6 mm, 3 μ m); fase móvil: metanol (dietilamina al 0,05%)/CO₂ supercrítico = 5-40%, 5 minutos; 40%, 2,5 minutos; 5%, 2,5 minutos; caudal: 2,5 mL/min; longitud de onda de detección: 220 nm; temperatura de la columna: 35 °C); R_t = 3,774 min. El exceso de este isómero axialmente quiral fue del 99,22%. [a]_D²⁵ = +1,191 (c = 4,6 mg/mL en metanol).

Realización 2: preparación del compuesto **1 ((±)-WX003)**



Compuesto 1

Ruta de síntesis:



Etapla 1: síntesis del compuesto **1 ((±)-WX003)**

Se añadieron a etanol (2,00 mL)/agua (2,00 mL) el compuesto **6** (56,30 mg, 120,61 μ moles, 1,00 eq) e hidróxido de litio monohidratado (25,30 mg, 603,07 μ moles, 5,00 eq). La reacción se agitó a 20 °C durante 16 horas. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se concentró para eliminar el etanol y se añadió agua para obtener una mezcla con un volumen final de 2 mL. El valor de pH de la mezcla se ajustó a 3 con ácido clorhídrico diluido (2 mol/L), durante lo cual precipitó un sólido blanco. La mezcla se filtró y la torta del filtro se enjuagó con agua (10 mL) y luego se disolvió en metanol (1 mL). Posteriormente, se añadió agua (20 mL) a la solución de metanol y la mezcla resultante fue blanca sin ningún sólido precipitado. La mezcla se liofilizó para obtener el compuesto **(±)-WX003** como un polvo blanco, que era la forma amorfa I del compuesto **1** (50,30 mg, 114,65 μ moles, rendimiento: 91,43%). ¹H-RMN (400 MHz, metanol-*d*₄) δ : 8,64 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,80-7,67 (m, 2H), 7,52 (s, 1H), 7,26 (br d, J = 8,4 Hz, 1H), 4,13-3,95 (m, 2H), 2,63-2,53 (m, 1H), 1,30-1,23 (m, 2H), 0,98-0,90 (m, 2H). MS m/z: 439,6 [M+H]⁺.

Realización 3: preparación de la forma cristalina B del compuesto **1a**

Se añadieron 50 mg de la forma amorfa II del compuesto **1a** a 0,2 mL de una mezcla de disolventes de etanol y agua (etanol:agua = 1:1) o 0,2 mL de una mezcla de disolventes de metanol y agua (metanol:agua = 1:1), y la mezcla resultante se agitó hasta formar una suspensión. La suspensión se colocó en un homogeneizador termostático (40 °C) y se agitó durante 2 días (protegida de la luz). El sólido residual se aisló por centrifugación y se secó en un horno de vacío a 30 °C durante la noche. Se ensayó la forma cristalina del sólido obtenido mediante XRPD y se confirmó que era la forma cristalina B del compuesto **1a**.

Realización 4: preparación de formas cristalinas del compuesto **1a** en diferentes disolventes

Se tomaron múltiples porciones de una cantidad apropiada de la forma amorfa II del compuesto **1a** y se añadieron respectivamente 0,2 mL de un disolvente único o mixto que se muestra en la siguiente tabla. La mezcla resultante se agitó a 40 °C. Después de agitar durante 2 días, si la muestra estaba en estado de solución, el disolvente se eliminó por evaporación natural; si la muestra estaba todavía en estado de suspensión, la muestra se centrifugó. Se recogieron los sólidos de todas las muestras y se analizaron en forma de cristal mediante XRPD. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Preparación de formas cristalinas del compuesto **1a** en diferentes disolventes

No.	Disolvente	Apariencia (después de 2 días)	Resultado
1	Metanol	Se separó un sólido por precipitación después de que el disolvente se evaporara naturalmente	Forma amorfa II
2	Etanol	Se separó un sólido por precipitación después de que el disolvente se evaporara naturalmente	Forma amorfa II
3	Acetona	Se separó un sólido por precipitación después de que el disolvente se evaporara naturalmente	Forma amorfa II
4	Acetonitrilo	Suspensión	Forma cristalina B
5	Acetato de etilo	Suspensión	Forma cristalina B
6	Tetrahidrofurano	Se separó un sólido por precipitación después de que el disolvente se evaporara naturalmente	Forma amorfa II
7	Agua	Suspensión	Forma cristalina B
8	Metanol:agua = 1:1	Suspensión	Forma cristalina B
9	Etanol:agua = 1:1	Suspensión	Forma cristalina B
10	Acetona:agua = 1:2	Suspensión	Forma cristalina B

Realización 5: preparación de la forma cristalina C del compuesto **1b**

- 5 Se añadieron 50 mg de la forma amorfa III del compuesto **1b** a 0,2 mL de una mezcla de disolventes de etanol y agua (etanol:agua = 1:1) o 0,2 mL de una mezcla de disolventes de metanol y agua (metanol:agua = 1:1), y la mezcla resultante se agitó hasta formar una suspensión. La suspensión se colocó en un homogeneizador termostático (40 °C) y se agitó durante 2 días (protegida de la luz). El sólido residual se aisló por centrifugación y se secó en un horno de vacío a 30 °C durante la noche. Se ensayó la forma cristalina del sólido obtenido mediante XRPD y se confirmó que era la forma cristalina C del compuesto **1b**.

10 Realización 6: preparación de formas cristalinas del Compuesto **1b** en diferentes disolventes

- 15 Se tomaron múltiples porciones de una cantidad apropiada de la forma amorfa III del Compuesto **1b** y se añadieron respectivamente 0,2 mL de un disolvente único o mixto que se muestra en la siguiente tabla. La mezcla resultante se agitó a 40 °C. Después de agitar durante 2 días, si la muestra estaba en estado de solución, el disolvente se eliminó por evaporación natural; si la muestra estaba todavía en estado de suspensión, la muestra se centrifugó. Se recogieron los sólidos de todas las muestras y se analizaron en forma de cristal mediante XRPD. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Preparación de formas cristalinas del compuesto **1b** en diferentes disolventes

No.	Disolvente	Apariencia (después de 2 días)	Resultado
1	Metanol	Se separó un sólido por precipitación después de que el disolvente se evaporara naturalmente	Forma amorfa III
2	Etanol	Se separó un sólido por precipitación después de que el disolvente se evaporara naturalmente	Forma amorfa III
3	Acetona	Se separó un sólido por precipitación después de que el disolvente se evaporara naturalmente	Forma amorfa III
4	Acetonitrilo	Suspensión	Forma cristalina C
5	Acetato de etilo	Suspensión	Forma cristalina C
6	Tetrahidrofurano	Se separó un sólido por precipitación después de que el disolvente se evaporara naturalmente	Forma amorfa III
7	Agua	Suspensión	Forma cristalina C
8	Metanol:agua = 1:1	Suspensión	Forma cristalina C
9	Etanol:agua = 1:1	Suspensión	Forma cristalina C
10	Acetona:agua = 1:2	Suspensión	Forma cristalina C

Realización 7: preparación de la forma cristalina A del compuesto 1

Se añadieron 100 mg de la forma amorfa I del compuesto 1 a una botella de vidrio, seguido de la adición de etanol/agua (1:1, 1 mL), y la mezcla resultante se agitó para formar una suspensión. La suspensión se colocó en un homogeneizador termostático (40 °C) y se agitó durante 20 horas, y luego se filtró para recolectar la muestra, que se secó en una estufa de vacío a 40 °C durante la noche. La forma cristalina de la muestra se analizó por XRPD y se confirmó que era la forma cristalina A del compuesto 1.

Realización 8: preparación de formas cristalinas del compuesto 1 en diferentes disolventes

Se tomaron múltiples porciones de una cantidad apropiada de la forma amorfa I del compuesto 1 y se añadió respectivamente 1,0 mL de un disolvente único o mixto que se muestra en la siguiente tabla. La mezcla resultante se agitó a 40 °C. Después de agitar durante 1 día, si la muestra estaba en estado de solución, el disolvente se eliminó por evaporación natural; si la muestra estaba todavía en estado de suspensión, la muestra se centrifugó. Se recogieron los sólidos en todas las muestras y se analizaron en forma de cristal mediante XRPD. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Preparación de las formas cristalinas del compuesto 1 en diferentes disolventes

No.	Disolvente	Apariencia (después de 1 día)	Resultado
2	Metanol	La muestra se convirtió en un gel después de que el disolvente se evaporara naturalmente.	Forma amorfa I
3	Etanol	Se separó un sólido por precipitación después de que el disolvente se evaporara naturalmente	Forma cristalina A
4	Acetona	La muestra se convirtió en un gel después de que el disolvente evaporara naturalmente	Forma amorfo I
5	Acetonitrilo	Suspensión	Forma cristalina A
6	Acetato de etilo	Suspensión	Forma cristalina A
7	Tetrahidrofurano	Se separó un sólido por precipitación después de que el disolvente se evaporara naturalmente	Forma cristalina A
8	Agua	Suspensión	Forma cristalina A
9	Metil terc-butil éter	Suspensión	Forma cristalina A
10	isopropanol	Suspensión	Forma cristalina A
11	n-Heptano	Suspensión	Forma cristalina A
12	tolueno	Suspensión	Forma cristalina A
13	2-Tetrahidrofurano	Se separó un sólido por precipitación después de que el disolvente se evaporara naturalmente	Forma cristalina A
14	Metanol:agua = 1:1	Suspensión	Forma cristalina A
15	Etanol:agua = 1:1	Suspensión	Forma cristalina A
16	Acetona:agua = 1:2	Suspensión	Forma cristalina A
17	Isopropanol:agua = 1:1	Suspensión	Forma cristalina A
18	Tetrahidrofurano:agua = 1:1	La muestra se convirtió en un gel después de que el disolvente se evaporara naturalmente.	Forma cristalina I
19	Tolueno:agua = 1:1	Suspensión	Forma cristalina A

Realización 8: preparación de la forma cristalina D del compuesto 1 (ejemplo de referencia)

Se añadieron 53 g de la forma amorfa I del compuesto 1 a una botella de vidrio, seguido de la adición de etanol/agua (1:1, 350 mL), y la mezcla resultante se agitó para formar una suspensión. La suspensión se colocó en un homogeneizador termostático (40 °C) y se agitó durante 48 horas, y luego se filtró para recolectar la muestra, la cual se secó en una estufa de vacío a 40 °C durante la noche. La forma cristalina de la muestra se analizó por XRPD y se confirmó que era la forma cristalina D del compuesto 1.

Realización 9: ensayo de estabilidad en estado sólido de la forma cristalina A del compuesto 1

De acuerdo con "Guidelines for the Stability Test of APIs and Preparations" (Farmacopea china, edición de 2015, Parte IV, General Rules 9001), la estabilidad de la forma cristalina A del compuesto 1 se investigó a alta temperatura (60 °C, abierto), alta humedad (temperatura ambiente/humedad relativa 92,5%, abierto) y luz fuerte (5000 lx, cerrado).

- 5 Se pesaron 15 mg de la forma cristalina A del compuesto 1 y se colocaron en el fondo de un vial de vidrio para formar una capa fina. Las muestras colocadas en condiciones de alta temperatura y humedad se sellaron con papel de aluminio y se perforaron pequeños orificios en el papel de aluminio para garantizar que la muestra pudiera entrar en contacto total con el aire ambiente; las muestras colocadas en condiciones de luz fuerte se sellaron con tapas roscadas. Las muestras colocadas en diferentes condiciones se muestrearon y analizaron el día 5 y el día 10 (XRPD y HPLC), y los resultados del ensayo se compararon con los resultados del ensayo inicial obtenidos el día 0. Los resultados se muestran en la Tabla 7 a continuación:

Tabla 7. Ensayo de estabilidad en estado sólido de la forma cristalina A del compuesto 1

Condiciones del ensayo	Momento de tiempo	Forma cristalina
-	Día 0	Forma cristalina A
Alta temperatura (60 °C, abierto)	Día 5	Forma cristalina A
	Día 10	Forma cristalina A
Alta humedad (temperatura ambiente/humedad relativa 92,5%, abierto)	Día 5	Forma cristalina A
	Día 10	Forma cristalina A
Luz fuerte (5000 lx, cerrado)	Día 10	Forma cristalina A

- 15 Conclusión: la forma cristalina A del compuesto 1 tiene buena estabilidad en condiciones de alta temperatura, alta humedad y luz intensa.

Ejemplo de ensayo 1: ensayo in vitro

1. Objetivo experimental

Los valores de IC₅₀ en la inhibición de la reabsorción de ácido úrico se determinaron utilizando la línea celular MDCK (células de riñón canino) transfectada de forma estable con el gen URAT-1 (transportador de ácido úrico).

20 2. Antecedentes

La gota es una enfermedad progresiva causada por un nivel anormalmente elevado de ácido úrico en la sangre. El gen URAT-1 codifica los transportadores de ácido úrico existentes en los túbulos renales. Los compuestos de molécula pequeña pueden promover la excreción de ácido úrico al inhibir la función de estos transportadores, previniendo así la aparición de la gota.

25 3. Materiales experimentales

Línea celular URAT-1 (MDCK): células MDCK transfectadas de forma estable con el gen URAT-1.

Medio de cultivo celular: Medio MEM (medio mínimo esencial Eagle) suplementado con FBS al 10% (suero fetal bovino), piruvato de sodio al 1% y 250 µg/mL de G418 (geneticina).

HBSS (solución salina equilibrada de Hank).

30 Solución de NaOH 0,1 M.

Solución de ácido úrico marcado con ¹⁴C.

Incubadora de CO₂.

Contador de centelleo líquido Tri-Carb.

4. Procedimiento y método experimental

35 4.1. Inoculación celular

1) El sobrenadante del medio de cultivo celular se eliminó por aspiración y las células se enjuagaron con 10 mL de PBS (solución salina tamponada con fosfato).

2) Se añadió tripsina precalentada al matraz de cultivo celular enjuagado y luego se giró el matraz para que la tripsina cubriera uniformemente el fondo del matraz y las células se digirieron a temperatura ambiente.

3) Se utilizaron 10-15 mL de medio de cultivo para suspender las células en cada matraz T150. Se succionaron 0,1 mL de las células y se diluyeron al doble con solución de azul de tripano y luego se contaron las células.

4) Las células se diluyeron con medio de cultivo a $2,5 \times 10^5/\text{mL}$ y las células diluidas se añadieron a una placa de 24 pocillos (800 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$, 2×10^5 células/pocillo). La placa se colocó en una incubadora con CO_2 al 5% a 37 °C durante la noche.

4.2 Preparación celular

1) Después de inocular las células en la placa de 24 pocillos durante 16-18 horas, se descartó el sobrenadante. Se añadieron 600 μL de tampón HBSS a cada pocillo para enjuagar las células dos veces.

2) Después de aspirar el tampón HBSS, se agregaron 180 μL de tampón HBSS a cada pocillo.

4.3 Preparación, dilución y adición de las soluciones de compuestos

1) El polvo de compuesto se disolvió en DMSO al 100%. El compuesto se diluyó 3 veces para obtener seis concentraciones diferentes, o se diluyó 10 veces para obtener dos concentraciones diferentes, a partir de una concentración inicial máxima de 50 mM.

2) Se transfirieron 5 μL de la solución de DMSO obtenida en el etapa 1) a 120 μL de tampón HBSS para diluir 25 veces.

3) Se añadieron 10 μL de la dilución obtenida en el etapa 2) a una placa de células de 24 pocillos, que luego se colocó en una incubadora con CO_2 al 5% a 37 °C durante 15 minutos. La concentración final de DMSO fue del 0,2%. Pocillo de control celular: sin compuesto añadido, sólo contiene DMSO al 0,2%.

4.4 Determinación

La solución de ácido úrico marcado con ^{14}C se diluyó y se añadió a la placa de células para obtener una concentración final de 50 μM . Las células se incubaron en una incubadora con CO_2 al 5% a 37 °C durante 10 minutos. Después de descartar el sobrenadante, las células se enjuagaron dos veces con tampón HBSS. Se añadió solución de NaOH 0,1 M para lisar las células. Los lisados celulares se recogieron y se añadieron a viales de centelleo líquido. Después de añadir el líquido de centelleo, se leyó la señal en un contador de centelleo líquido Tri-Carb.

4.5 Procesamiento y análisis de datos

Según los datos luminiscentes, se analizó el efecto inhibitorio de los compuestos sobre URAT-1 y se calculó el porcentaje de inhibición. Los valores IC_{50} se obtuvieron usando el software GraphPad Prism para realizar un análisis de ajuste no lineal en el porcentaje de inhibición (% inh). Los resultados experimentales se muestran en la siguiente Tabla 7.

Tabla 7. Resultados IC_{50} del efecto inhibitorio de cada realización sobre URAT-1

No.	Compuesto	IC_{50}
1	Forma amorfa II del compuesto 1a	8,0 μM
2	Forma amorfa III del compuesto 1b	>20 μM
3	Forma amorfa I del compuesto 1	10,36 μM
4	($\pm$)-Lesinurad	23,97 μM

Conclusión: para la línea celular URAT-1 (MDCK), en comparación con ($\pm$)-lesinurad, el compuesto **1** y el compuesto **1a** muestran un efecto inhibitorio más fuerte sobre el transporte de ácido úrico mediado por URAT-1.

Ejemplo de ensayo 2: ensayo in vitro

1. Objetivo experimental

El objetivo de este experimento es detectar los metabolitos de los compuestos después de la incubación en células hepáticas humanas durante 120 minutos mediante LC-UV-MSⁿ (n = 1-2). Después de la recopilación de datos, se utilizó el software MetaboLynxTM para analizar los datos de MS y MS².

2. Método experimental

2.1 Sistema de incubación con células hepáticas

Concentración de células hepáticas congeladas	1,0 × 10 ⁶ células/mL
Especies	Ser humano
Muestras por ensayar	(-)-WX001, (+)-WX002, (±)-lesinurad
Concentración de las muestras por ensayar	10 µM
Medio de incubación	Medio de incubación E de William
Condición de incubación	37 °C, CO ₂ 5%/humedad 95%
Duración de la incubación	0, 120 min
Volumen de incubación	200 µL
Control positivo	7-Etoxicumarina (7-EC, 30 µM)

2.2 Tratamiento y análisis de las muestras

5 Después de incubar las células con las muestras durante 2 horas, se precipitó la proteína usando acetonitrilo que contenía ácido fórmico al 0,1% y luego se centrifugó la mezcla. El sobrenadante se extrajo y se secó borboteando nitrógeno, y luego se volvió a disolver y se inyectó para su análisis.

3. Resultado experimental

3.1 El resultado de la identificación de los metabolitos del compuesto **1a** se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8

Metabolito	Tiempo de retención (min)	Porcentaje de área UV	Ruta metabólica
Compuesto 1a	9,71	100%	NA

10

3.2 El resultado de la identificación de los metabolitos del compuesto **1b** se muestra en la Tabla 9

Tabla 9

Metabolito	Tiempo de retención (min)	Porcentaje de área UV	Ruta metabólica
Compuesto 1b	9,71	100%	NA

3.3 El resultado de la identificación de los metabolitos de (±)-lesinurad se muestra en la Tabla 10.

15

Tabla 10

Metabolito	Tiempo de retención (min)	Porcentaje de área UV	Ruta metabólica
(±)-Lestinurad-M1	6,26	4,40%	Oxidación
(±)-Lestinurad	9,02	95,60%	NA

4. Conclusión experimental

20 Los resultados experimentales mostraron que, en las mismas condiciones metabólicas en células hepáticas de ser humano, el compuesto (±)-lesinurad produjo el 4,40% del metabolito M1, mientras que en el estudio de la forma amorfa II del compuesto **1a** y la forma amorfa III del compuesto **1b** no se detectó ningún metabolito. Comparados con (±)-lesinurad, el compuesto **1a** y el compuesto **1b** exhiben una mejor estabilidad in vitro en las células hepáticas.

Ejemplo de ensayo 3: ensayo in vivo

1. Objetivo experimental

25 Se estudió el comportamiento farmacocinético y las características de los compuestos de la presente divulgación en monos cynomolgus, utilizando monos cynomolgus como animales de experimentación y determinando las concentraciones de compuesto **1a**, compuesto **1b**, compuesto **1** y (±)-lesinurad en plasma en diferentes momentos mediante el método LC/MS/MS después de administrar el compuesto **1a** (forma cristalina B), el compuesto **1b** (forma cristalina C), el compuesto **1** (forma cristalina A) y (±)-lesinurad a través de IV (inyección intravenosa) y PO (alimentación nasal) a monos cynomolgus.

30

2. Método experimental

2.1 Compuestos experimentales

Compuesto **1a** (forma cristalina B), compuesto **1b** (forma cristalina C), compuesto **1** (forma cristalina A) y ($\pm$)-lesinurad

2.2 Animales de experimentación

- 5 Se dividieron 24 monos cynomolgus macho adultos sanos en 8 grupos (había grupos IV y PO para cada compuesto) con 3 animales por grupo.

2.3 Preparación de fármacos

- 10 Se pesó una cantidad apropiada de las muestras y se disolvió en una cierta cantidad de DMSO por ultrasonidos, seguido de la adición de una solución de PEG400 para obtener soluciones transparentes (DMSO/PEG400/H₂O (5/40/55)) de los compuestos a ensayar con una concentración de 2 mg/mL para administración IV.

Se pesó una cantidad apropiada de las muestras y se disolvió en una cierta cantidad de DMSO por ultrasonidos, seguido de la adición de una solución de MC al 0,5% para obtener suspensiones (DMSO/MC al 0,5% (5/95)) de los compuestos a ensayar con una concentración de 2 mg/mL para administración PO.

2.4 Administración

- 15 Los 24 monos cynomolgus macho se dividieron en 8 grupos con 3 animales por grupo, y los fármacos se administraron por vía IV y PO después de que los animales hubieran estado en ayunas durante la noche. La dosis para administración IV fue de 2 mg/kg y el volumen de dosificación fue de 1 mL/kg; la dosis para administración PO fue de 10 mg/kg y el volumen de dosificación fue de 5 mL/kg.

3. Operación experimental

- 20 En los grupos de administración IV, se recogieron aproximadamente 200 μ L de sangre 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 horas después de la administración; las muestras de sangre recogidas se añadieron a tubos de anticoagulación que contenían K2-EDTA y se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos; el plasma se aisló y almacenó a -80°C. En los grupos de administración PO, la sangre se recogió a las 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 horas después de la administración, y las demás operaciones fueron las mismas que en el grupo de administración IV. Después de pretratar las muestras de plasma para precipitar la proteína, se determinó la concentración de fármaco en el plasma mediante el método LC/MS/MS. El rango lineal del método de análisis fue 20,00-6000 nM. En el grupo de administración PO, la orina se recogió 0-24 horas después de la administración y la concentración de fármaco en la orina se determinó mediante el método LC/MS/MS. El rango lineal del método de análisis fue de 20,00 a 6000 nM.

4. Parámetros farmacocinéticos

- 30 Los resultados experimentales muestran que el compuesto **1a** (forma cristalina B), el compuesto **1b** (forma cristalina C), el compuesto **1** (forma cristalina A) y ($\pm$)-lesinurad exhiben diferentes comportamientos farmacocinéticos en monos cynomolgus. Cuando se administra a la misma dosis por vía PO, en comparación con ($\pm$)-lesinurad, el compuesto **1a** (forma cristalina B), el compuesto **1b** (forma cristalina C), y el compuesto **1** (forma cristalina A) exhiben una mayor exposición al plasma y un mejor comportamiento farmacocinético general. Comparados con ($\pm$)-lesinurad, el compuesto **1a** (forma cristalina B) y el compuesto **1** (forma cristalina A) también exhiben mayores tasas de cobertura efectiva (0-24 h) de la diana por la concentración de los compuestos en la orina. Nota: la tasa de cobertura efectiva de la diana por la concentración del compuesto en orina = concentración media de fármaco en orina (0-24 h)/IC₅₀ del fármaco en la diana URAT1. Además, no se observó ninguna transformación mutua entre los dos isómeros axialmente quirales **1a** y **1b** in vivo, y se retuvieron como isómeros axialmente quirales únicos estables en el sistema de circulación. Además, los resultados experimentales se muestran en la siguiente Tabla 11.

Tabla 11. Parámetros farmacocinéticos de cada realización en monos cynomolgus

Ejemplo de ensayo			Compuesto 1 (forma cristalina A)	Compuesto 1a (forma cristalina B)	Compuesto 1b (forma cristalina C)	($\pm$)-Lesinurad
IV	Dosis real	mg/kg	2,00	1,77	2,10	
	Concentración inicial	C ₀ (nM)	42185	32033	42077	
	Vida media	T _{1/2} (h)	3,61	3,39	4,28	
	Volumen aparente de distribución	Vd _{ss} (L/Kg)	1,09	0,533	0,661	

	Tasa de aclaramiento	Cl (mL/min/Kg)	4,20	4,88	4,78	
	Área bajo la curva	AUC _{0-inf} (nM.h)	18389	15709	16092	
	Tiempo de residencia	MRT _{0-inf} (h)	4,01	1,83	2,34	
P O	Dosis real	mg/kg	10,2	7,63	10,6	9,91
	Concentración máxima	C _{máx} (nM)	46100	22600	13173	37233
	Tiempo hasta alcanzar el pico	T _{máx} (h)	0,83	1,33	2,33	0,58
	Vida media	T _{1/2} (h)	3,34	4,10	4,46	3,78
	Área bajo la curva	AUC _{0-inf} (nM.h)	120062	89770	62456	69300
	Tiempo de residencia	MRT _{0-inf} (h)	3,76	4,65	5,74	3,44
	Biodisponibilidad	F (%)	131%	132	77,6	
	Concentración media de fármaco en orina (0-24 h)	C _{orina,0-24h} (nM)	38915	54403	7976	71622
	Cobertura de la diana por la concentración media de fármaco en orina (0-24 h)/IC ₅₀	Veces	3,8	6,8	0,4	3,0

Ejemplo de ensayo 4: ensayo in vitro

1. Objetivo experimental

- 5 Los valores de IC₅₀ de los compuestos en la inhibición de la reabsorción de sustratos específicos se determinaron utilizando la línea celular MDCK (células de riñón canino) transfectadas de manera estable con el gen OAT-4 (transportador de aniones orgánicos-4).

2. Procedimiento y método experimental

- 10 El medio de cultivo celular utilizado en el experimento de inhibición de la ingesta fue DMEM (medio de cultivo de medio esencial celular) suplementado con FBS al 10% (que contenía penicilina y estreptomycin). Se recuperaron y subcultivaron la línea celular que sobreexpresa el transportador de fármacos de ser humano (MDCK-OAT4) y las células con el vector vacío (MDCK-pcDNA3.1), y luego se seleccionaron y digirieron las células adherentes en buen estado de crecimiento con tripsina para dispersarlas en suspensiones de células individuales. Las suspensiones celulares se ajustaron para obtener una densidad de 2,0-3,0 × 10⁵ células/mL con medio y luego se inocularon en placas de cultivo celular de 24 pocillos en una cantidad de 1 mL/pozo. Las células se cultivaron en una incubadora con CO₂ al 5% y humedad del aire saturada a 37 °C durante 2-3 días, después de lo cual las células crecieron sobre los pocillos. Se retiró el medio de cultivo de las placas de cultivo y se lavaron las células una vez con solución salina tamponada de Hanks (sin Cl⁻) o PBS. Posteriormente, se añadió a cada pocillo solución salina tamponada de Hanks (sin Cl⁻) o solución salina tamponada con PBS a 37 °C y las células se incubaron durante 10 minutos. Luego, la solución salina tamponada de Hanks (sin Cl⁻) o la solución salina tamponada con PBS en las placas de 24 pocillos se reemplazó con 500 µL de solución de sustrato de sonda radiomarcada y se inició la administración. Después de completar la administración (2 min), la reacción se terminó con la solución salina tamponada preenfriada respectiva y las células se enjuagaron 3 veces. Se añadieron 400 µL de NaOH 0,1 mmol/L a cada pocillo para lisar las células. Los lisados celulares se agregaron a viales de centelleo, seguido de la adición de 3 mL de solución de centelleo Aquasol-2. La intensidad de la radiactividad en las muestras se midió con un centelleador líquido Tri-Carb 2910TR. Se colocaron tres pocillos (n = 3) para cada concentración de fármaco, control positivo y control blanco (simulado) en el ensayo de transporte celular.
- 25

3. Procesamiento de datos

El valor de captación de las células transportadoras en el grupo que contenía solo el sustrato radiomarcado (deduciendo el valor de captación U₀ de las células con vector vacío en el grupo de fondo) se definió como 100%

(control, U_c), que se contó como estándar para el cálculo del porcentaje (%) del valor de captación U (tras deducir el fondo) en cada grupo de administración tras añadir los compuestos ensayados frente al valor de captación U_c en el grupo control, y la tasa inhibitoria (IR) de cada concentración sobre la actividad del transportador se calculó para expresar la extensión del efecto inhibitor de los compuestos sobre los transportadores. La fórmula de cálculo es la siguiente:

$$IR = 1 - [100 \times (U - U_0) / (U_c - U_0)]\%$$

Se establecieron tres repeticiones para cada concentración de fármaco (es decir, $n = 3$). La media $\pm$ error estándar (SD) se calculó utilizando la fórmula estadística en el programa Microsoft® Excel 2010. De acuerdo con la tasa inhibitoria (IR) de cada concentración en cada transportador, el IC_{50} de cada compuesto sobre la actividad de transporte del transportador de fármacos fue calculada por Prism5.0 y la función Forecast en el programa Microsoft® Excel 2010.

Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 12

Tabla 12. Resultados IC_{50} del efecto inhibitorio de cada realización sobre OAT-4

No.	Compuesto	IC ₅₀ de la inhibición del sustrato transportador de URAT-1	IC ₅₀ de la inhibición de OAT-4 que transporta diferentes sustratos	
		Datos ¹⁴ C-UA (ácido ¹⁴ C-úrico) véase la tabla 7	¹⁴ C-UA (ácido ¹⁴ C-úrico)	³ H-ES (sulfato de H ³ -estrona y amonio)
1	Forma amorfa I del compuesto 1	10,36 μ M	7,92 μ M	17,09 μ M
2	($\pm$)-Lesinurad	23,97 μ M	2,17 μ M	12,74 μ M

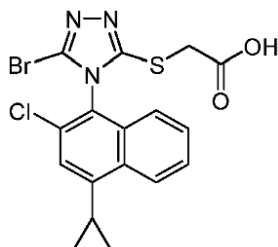
Conclusión: en la línea celular OAT4-4 (MDCK), el compuesto 1 presenta un efecto inhibitorio más débil que el ($\pm$)-lesinurad sobre el transporte de los dos sustratos diferentes (ácido úrico y sal amónica de sulfato de estrona) mediado por OAT-4.

Dado que tanto OAT-4 como URAT-1 se encuentran en la membrana del borde en cepillo de las células epiteliales de los túbulos renales, los compuestos son capaces de inhibir simultáneamente estos dos transportadores. Por lo tanto, comparando el IC_{50} de los compuestos en la inhibición del transporte de ácido C^{14} -úrico mediado por URAT-1 y el IC_{50} de los compuestos en la inhibición del transporte del ácido C^{14} -úrico y de la sal de amonio de sulfato de 3H -estrona mediado por OAT-4, se encuentra que: mientras que ($\pm$)-lesinurad produce una inhibición efectiva del transporte de ácido úrico mediado por URAT-1, produce una inhibición más fuerte en el transporte de ácido úrico mediado por OAT-4 (11 veces) y en el transporte de la sal amónica de sulfato de estrona mediado por OAT-4 (2 veces); por el contrario, mientras que el compuesto 1 produce una inhibición eficaz del transporte de ácido úrico mediado por URAT-1, sólo produce una inhibición comparable (1 vez) del transporte de ácido úrico mediado por OAT-4 y una inhibición más débil del transporte de la sal amónica de sulfato de estrona mediado por OAT-4 (0,6 veces). Dado que el transportador OAT-4 juega un papel importante en el mantenimiento de la función normal de los cuerpos humanos, el ($\pm$)-lesinurad tiene un cierto grado de riesgo de seguridad por su fuerte inhibición preferencial del transportador OAT-4, mientras que el compuesto 1 muestra una mayor seguridad por su inhibición relativamente débil del transportador OAT-4.

REIVINDICACIONES

1. Una forma cristalina A del compuesto **1**, en donde la forma cristalina A del compuesto **1** tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende picos de difracción característicos en los ángulos 2θ de $7,16 \pm 0,2^\circ$, $17,98 \pm 0,2^\circ$ y $22,30 \pm 0,2^\circ$;

5

Compuesto **1**

2. La forma cristalina A del compuesto **1** según la reivindicación 1, en donde la forma cristalina A del compuesto **1** tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende picos de difracción característicos en los ángulos 2θ de $7,16 \pm 0,2^\circ$, $12,50 \pm 0,2^\circ$, $14,61 \pm 0,2^\circ$, $17,98 \pm 0,2^\circ$, $19,62 \pm 0,2^\circ$, $22,30 \pm 0,2^\circ$, $24,63 \pm 0,2^\circ$ y $26,37 \pm 0,2^\circ$.

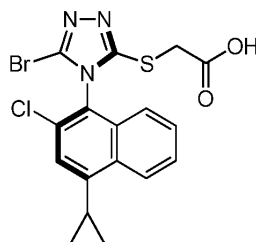
10 3. La forma cristalina A del compuesto **1** según la reivindicación 2, en donde la forma cristalina A del compuesto **1** tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende picos de difracción característicos en los ángulos 2θ de $7,16 \pm 0,2^\circ$, $9,56 \pm 0,2^\circ$, $11,30 \pm 0,2^\circ$, $12,50 \pm 0,2^\circ$, $14,61 \pm 0,2^\circ$, $17,98 \pm 0,2^\circ$, $18,72 \pm 0,2^\circ$, $19,62 \pm 0,2^\circ$, $22,30 \pm 0,2^\circ$, $24,63 \pm 0,2^\circ$ y $26,37 \pm 0,2^\circ$.

15 4. La forma cristalina A del compuesto **1** según la reivindicación 3, en donde la forma cristalina A del compuesto **1** tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo con los datos analíticos que se muestran en la siguiente tabla

No.	Ángulo 2θ ($^\circ$)	Espaciado d (Å)	Intensidad (%)	No.	Ángulo 2θ ($^\circ$)	Espaciado d (Å)	Intensidad (%)
1	7,156	12,342	69,2	24	26,644	3,3429	10
2	9,559	9,2446	21,5	25	27,135	3,2835	33,1
3	11,302	7,8228	19,8	26	27,513	3,2393	9,3
4	12,5	7,0752	68,6	27	27,926	3,1923	10,1
5	12,853	6,882	19,3	28	28,616	3,1169	19,5
6	14,255	6,208	11	29	28,912	3,0856	7,2
7	14,614	6,0564	40,7	30	29,347	3,0408	2,8
8	14,987	5,9066	9,1	31	30,392	2,9387	2,7
9	16,34	5,4202	2,7	32	31,02	2,8805	14,8
10	17,983	4,9286	82,5	33	31,3	2,8554	31,8
11	18,221	4,8649	14,6	34	32,496	2,753	3,4
12	18,716	4,7373	46	35	33,056	2,7076	4,8
13	19,622	4,5205	32,8	36	33,232	2,6937	6,5
14	20,725	4,2822	10,7	37	34,199	2,6197	2,5
15	21,1	4,2071	3	38	34,531	2,5953	12,9
16	22,304	3,9825	100	39	35,852	2,5026	4,6
17	22,678	3,9177	22,4	40	36,363	2,4686	5,7
18	23,569	3,7715	3	41	37,021	2,4263	8,5
19	24,396	3,6457	37,6	42	37,557	2,3928	8,5
20	24,633	3,6111	64,2	43	37,907	2,3716	4,2
21	25,065	3,5498	22,3	44	38,321	2,3469	7,9
22	25,953	3,4303	13,4	45	38,975	2,309	4,3
23	26,367	3,3774	60,7	46	39,306	2,2903	3,2

20 5. La forma cristalina A del compuesto **1** según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la forma cristalina A del compuesto **1** tiene una curva de calorimetría diferencial de barrido que comprende un pico endotérmico con un inicio a $167,42 \pm 2^\circ\text{C}$; y/o la forma cristalina A del compuesto **1** tiene una curva de análisis termogravimétrico que muestra una pérdida de peso de $0,3708\%$ a $143,64 \pm 3^\circ\text{C}$.

6. Una forma cristalina B del compuesto **1a**, en donde la forma cristalina B del compuesto **1a** tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende picos de difracción característicos en los ángulos 2θ de $17,34 \pm 0,2^\circ$, $20,36 \pm 0,2^\circ$ y $27,12 \pm 0,2^\circ$;



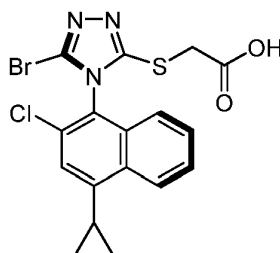
Compuesto 1a

7. La forma cristalina B del compuesto **1a** según la reivindicación 6, en donde la forma cristalina B del compuesto **1a** tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende picos de difracción característicos en los ángulos 2θ de $13,77 \pm 0,2^\circ$, $15,53 \pm 0,2^\circ$, $17,34 \pm 0,2^\circ$, $18,76 \pm 0,2^\circ$, $20,36 \pm 0,2^\circ$, $21,31 \pm 0,2^\circ$, $23,10 \pm 0,2^\circ$ y $27,12 \pm 0,2^\circ$; opcionalmente, la forma cristalina B del compuesto **1a** tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo con los datos analíticos que se muestran en la siguiente tabla

No.	Ángulo 2θ ($^\circ$)	Espaciado d (Å)	Intensidad (%)	No.	Ángulo 2θ ($^\circ$)	Espaciado d (Å)	Intensidad (%)
1	10,697	8,2639	24,8	20	25,089	3,5465	24,5
2	12,149	7,2792	26,7	21	25,623	3,4737	30,9
3	13,769	6,4259	30,9	22	26,154	3,4044	17,8
4	15,529	5,7016	33,7	23	26,848	3,318	10,1
5	16,055	5,5157	25,5	24	27,123	3,2849	56,2
6	17,025	5,2037	11,6	25	27,38	3,2546	45,1
7	17,338	5,1104	100	26	28,411	3,1389	10,7
8	18,502	4,7914	29,1	27	29,566	3,0188	23,9
9	18,761	4,726	38,9	28	31,225	2,8621	16,9
10	19,902	4,4574	40,7	29	31,48	2,8395	8,4
11	20,355	4,3593	70,3	30	32,254	2,7731	10,2
12	20,949	4,237	32,8	31	32,615	2,7433	10,8
13	21,306	4,1667	40,2	32	33,137	2,7012	17,4
14	21,736	4,0853	10,5	33	33,455	2,6762	15,4
15	22,706	3,913	29,1	34	34,283	2,6135	15,8
16	23,098	3,8474	33,8	35	36,65	2,45	14,1
17	23,806	3,7346	25	36	38,463	2,3385	8,1
18	24,283	3,6623	10,2	37			

8. La forma cristalina B del compuesto **1a** según una cualquiera de las reivindicaciones 6-7, en donde la forma cristalina B del compuesto **1a** tiene una curva de calorimetría diferencial de barrido que comprende un pico endotérmico con un inicio a $140,76^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$; y/o la forma cristalina B del compuesto **1a** tiene una curva de análisis termogravimétrico que muestra una pérdida de peso de $0,4590\%$ a $128,08^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$.

9. Una forma cristalina C del compuesto **1b**, en donde la forma cristalina C del compuesto **1b** tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende picos de difracción característicos en los ángulos 2θ de $17,24 \pm 0,2^\circ$, $18,68 \pm 0,2^\circ$ y $20,26 \pm 0,2^\circ$;



Compuesto 1b

10. La forma cristalina C del compuesto **1b** según la reivindicación 9, en donde la forma cristalina C del compuesto **1b** tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende picos de difracción característicos en los ángulos 2θ de $12,06 \pm 0,2^\circ$, $13,69 \pm 0,2^\circ$, $15,46 \pm 0,2^\circ$, $17,24 \pm 0,2^\circ$, $18,68 \pm 0,2^\circ$, $20,26 \pm 0,2^\circ$, $21,23 \pm 0,2^\circ$ y $27,04 \pm 0,2^\circ$; opcionalmente, la forma cristalina C del compuesto **1b** tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo con los datos analíticos que se muestran en la siguiente tabla

5

No.	Ángulo 2θ (°)	Espaciado d (Å)	Intensidad (%)	No.	Ángulo 2θ (°)	Espaciado d (Å)	Intensidad (%)
1	10,652	8,2981	23,5	20	23,714	3,7488	25,6
2	12,057	7,3347	30,9	21	24,995	3,5596	23,6
3	13,691	6,4625	33,9	22	25,53	3,4862	28,7
4	15,463	5,7257	37	23	26,113	3,4097	15,8
5	15,976	5,543	25,5	24	26,751	3,3297	8,1
6	16,947	5,2274	17,6	25	27,044	3,2943	49,1
7	17,245	5,1379	100	26	27,301	3,2639	39
8	18,408	4,8159	29,8	27	27,496	3,2412	16,9
9	18,681	4,7461	44,6	28	28,365	3,1439	7,7
10	19,823	4,4751	44,4	29	29,472	3,0283	20,2
11	20,262	4,3792	68,4	30	31,132	2,8704	13,4
12	20,869	4,253	38,1	31	31,364	2,8498	9,1
13	21,228	4,182	40,1	32	32,566	2,7473	10,6
14	21,644	4,1026	10,8	33	33,043	2,7087	13
15	22,61	3,9294	27,3	34	33,412	2,6796	12
16	23,019	3,8604	32,8	35	34,189	2,6205	15
17	23,519	3,7795	18,7	36	36,587	2,454	10,8

11. La forma cristalina C del compuesto **1b** según una cualquiera de las reivindicaciones 9-10, en donde la forma cristalina C del compuesto **1b** tiene una curva de calorimetría diferencial de barrido que comprende un pico endotérmico con un inicio a $140,13^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$; y/o la forma cristalina C del compuesto **1b** tiene una curva de análisis termogravimétrico que muestra una pérdida de peso de $0,6612\%$ a $134,98^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$.

10

12. La forma cristalina A del compuesto **1** según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, la forma cristalina B del compuesto **1a** según una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, o la forma cristalina C del compuesto **1b** según una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, para su uso en el tratamiento de una afección relacionada con un nivel anormal de ácido úrico, en donde la afección es hiperuricemia, artritis gotosa, nefrolitiasis, cálculos urinarios o hipertensión.

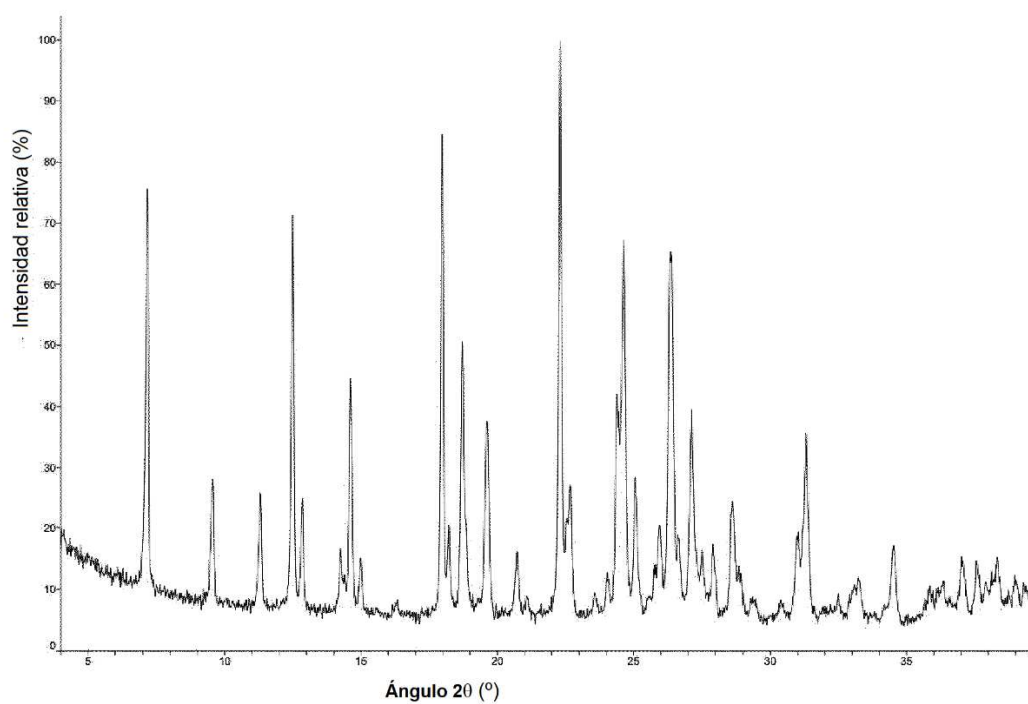


Fig. 1

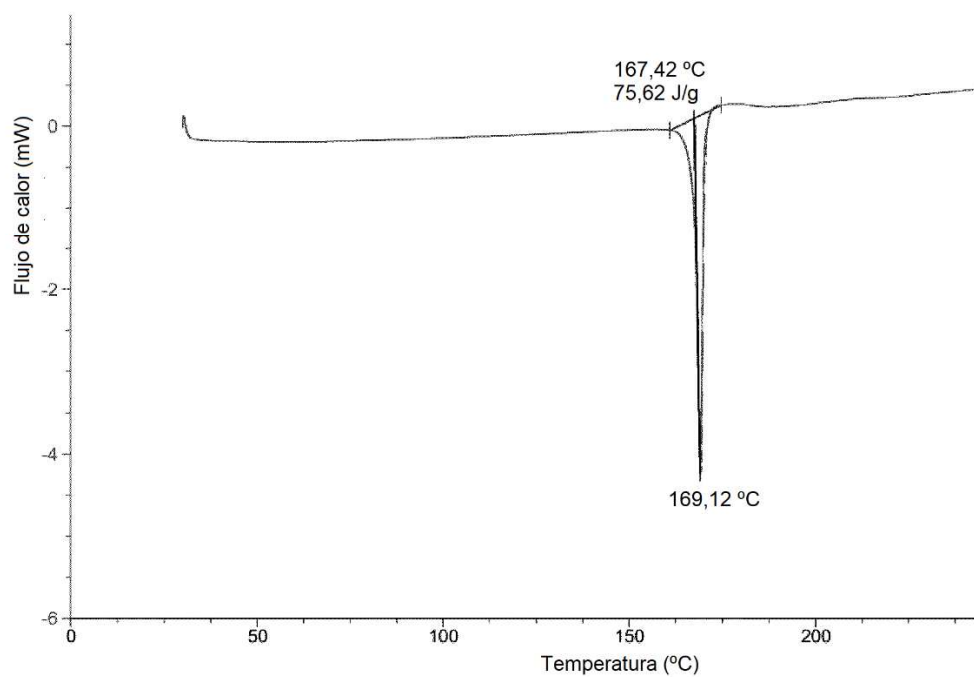


Fig. 2

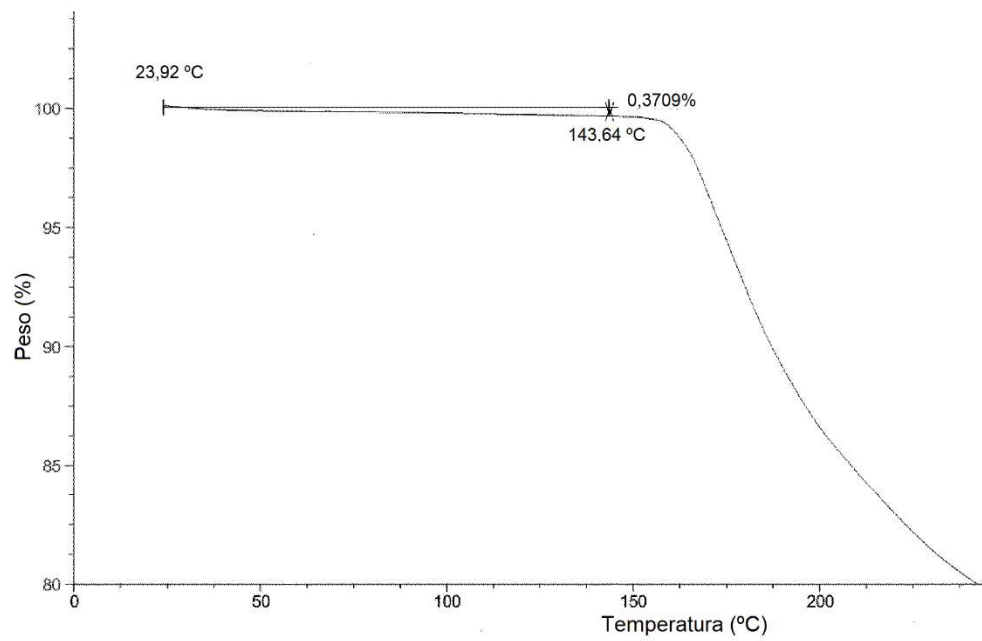


Fig. 3

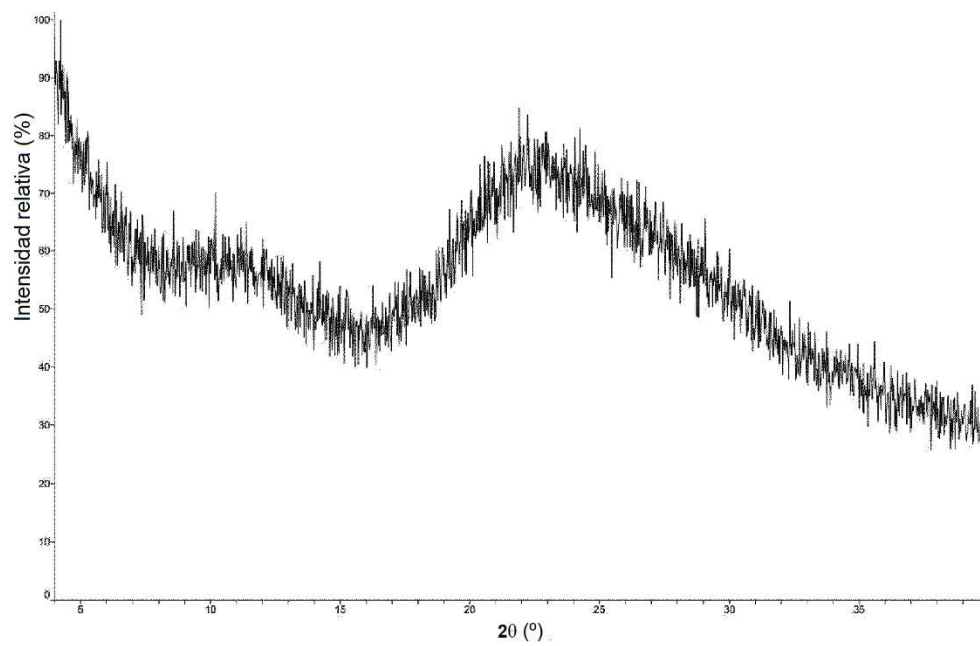


Fig. 4

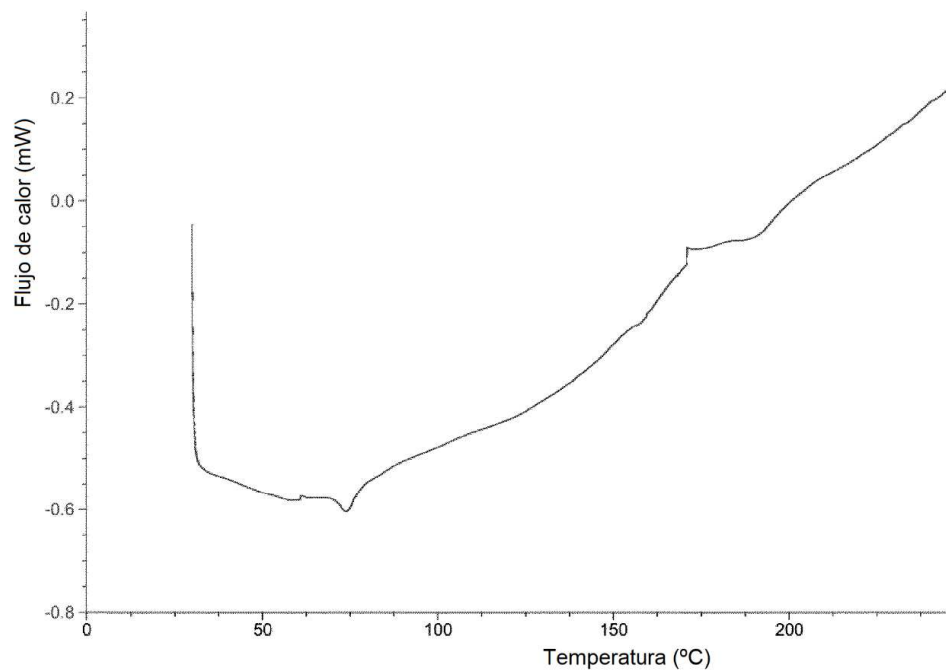


Fig. 5

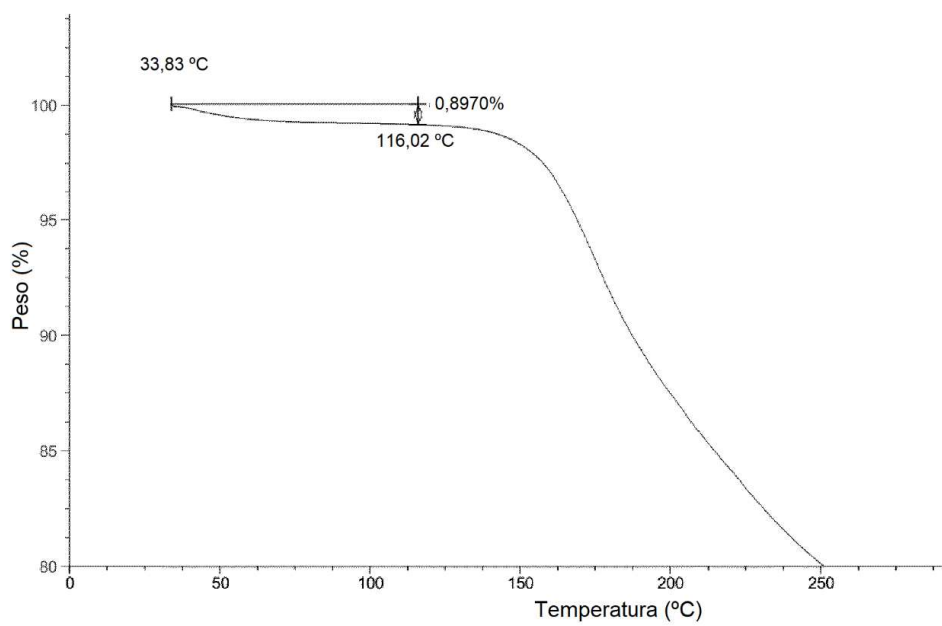


Fig. 6

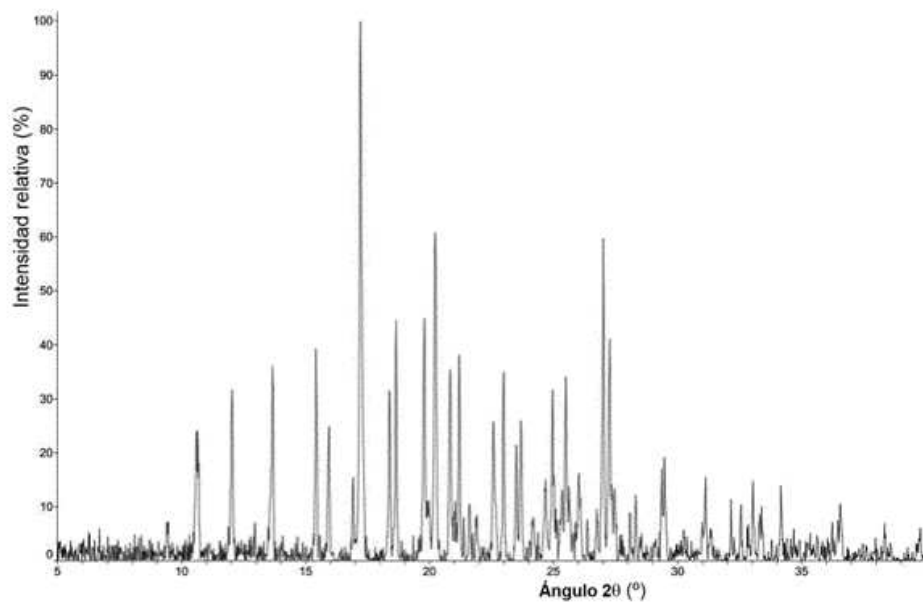


Fig. 7

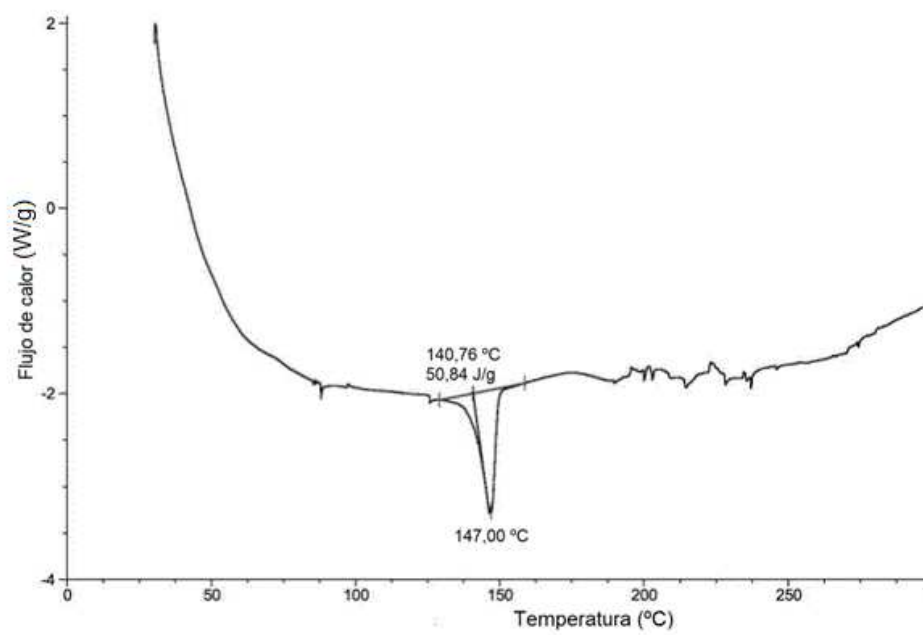


Fig. 8

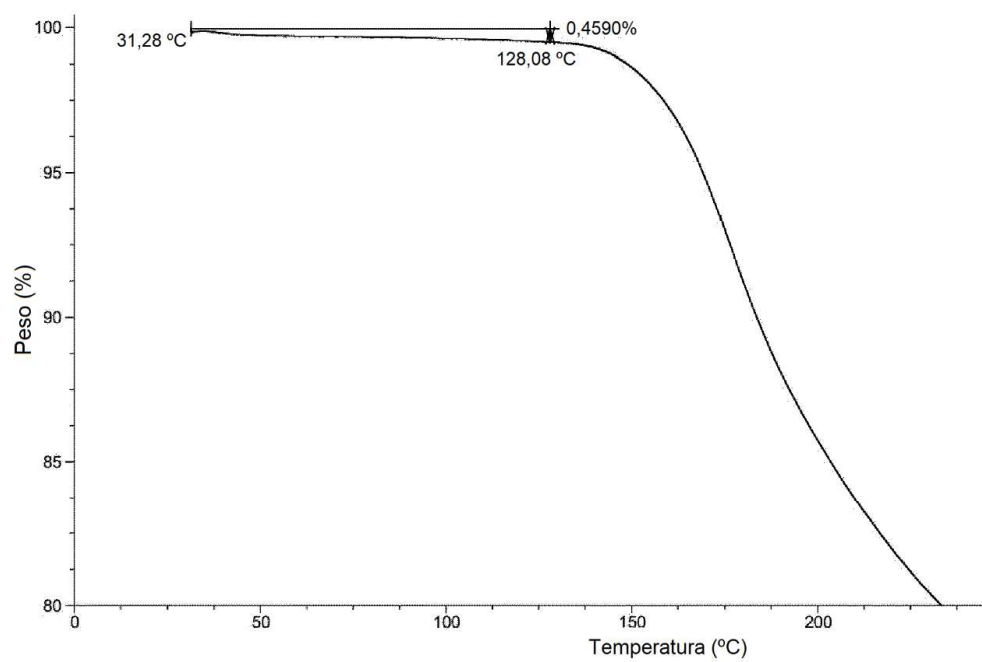


Fig. 9

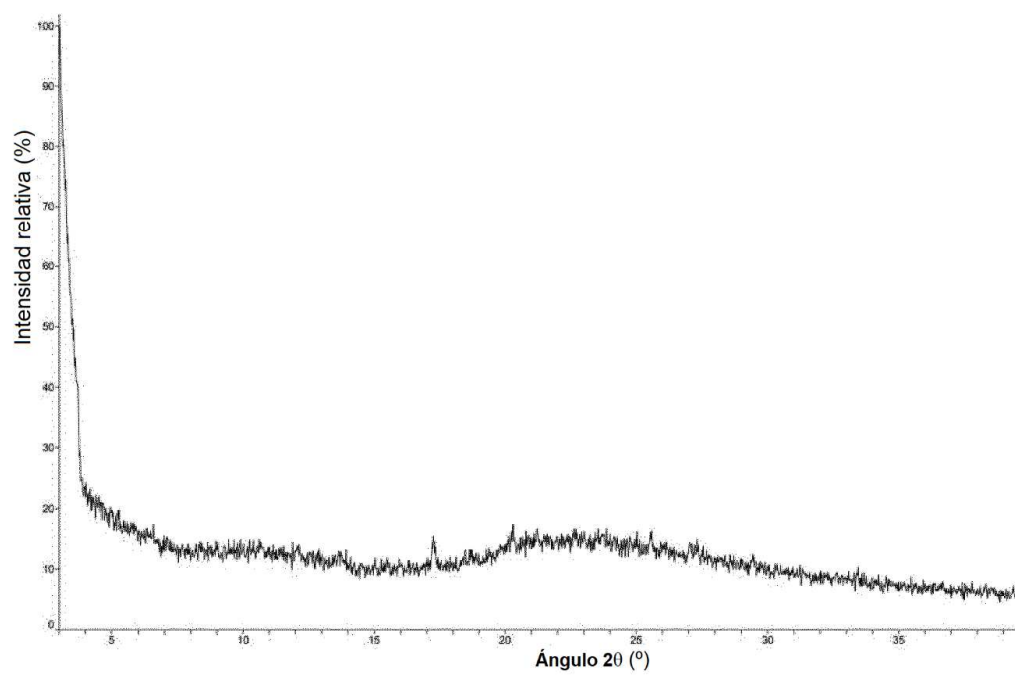


Fig. 10

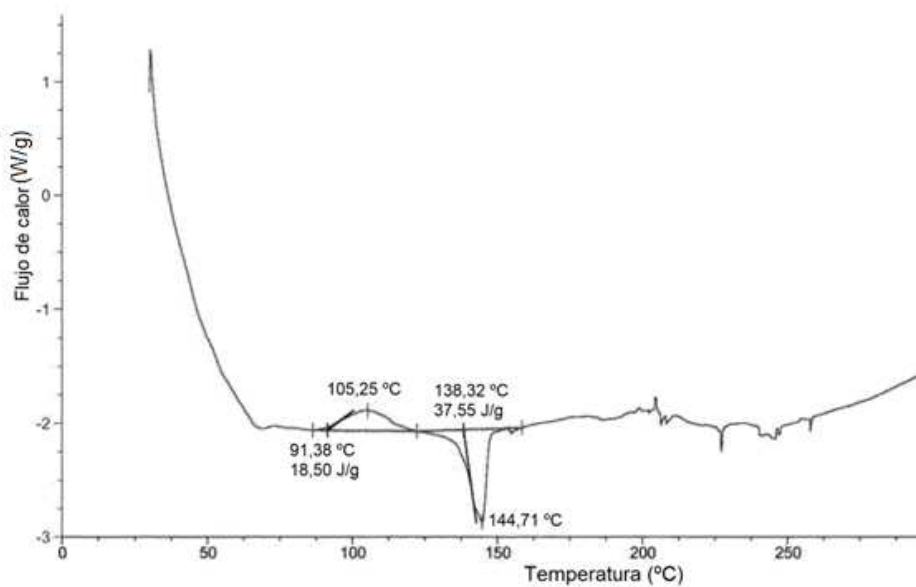


Fig. 11

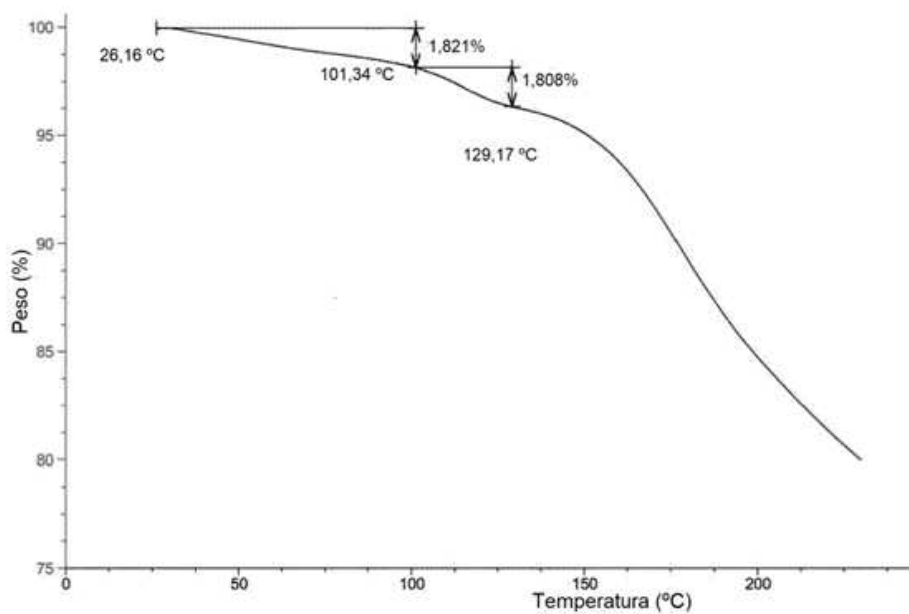


Fig. 12

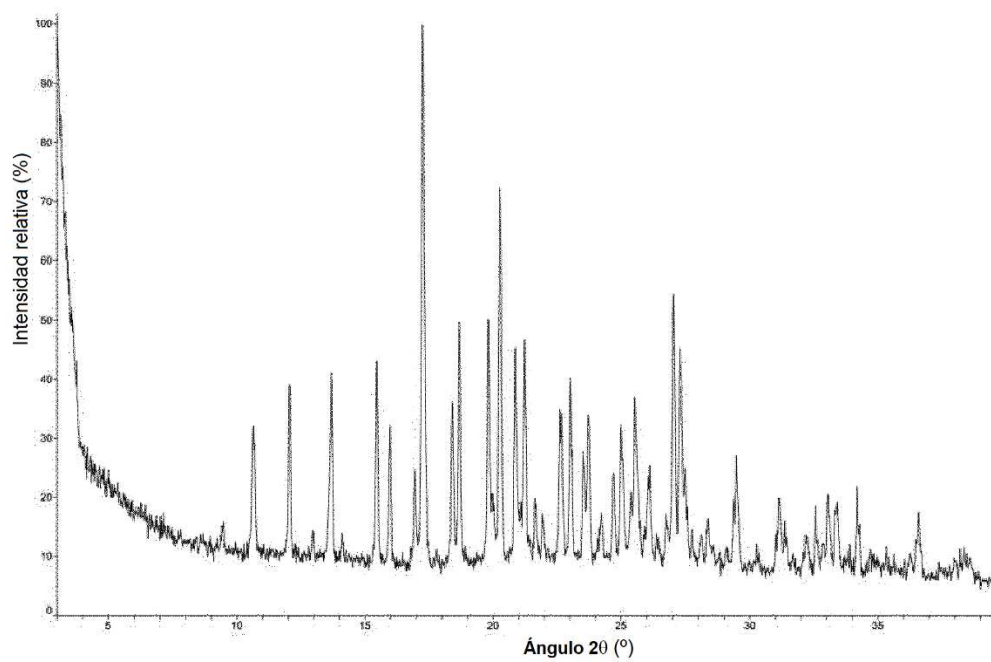


Fig. 13

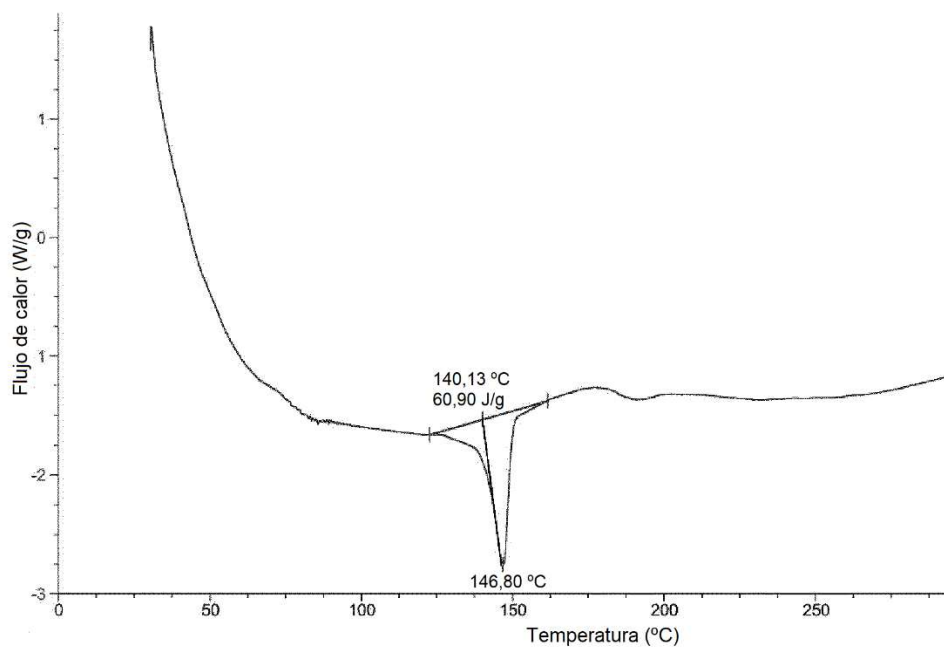


Fig. 14

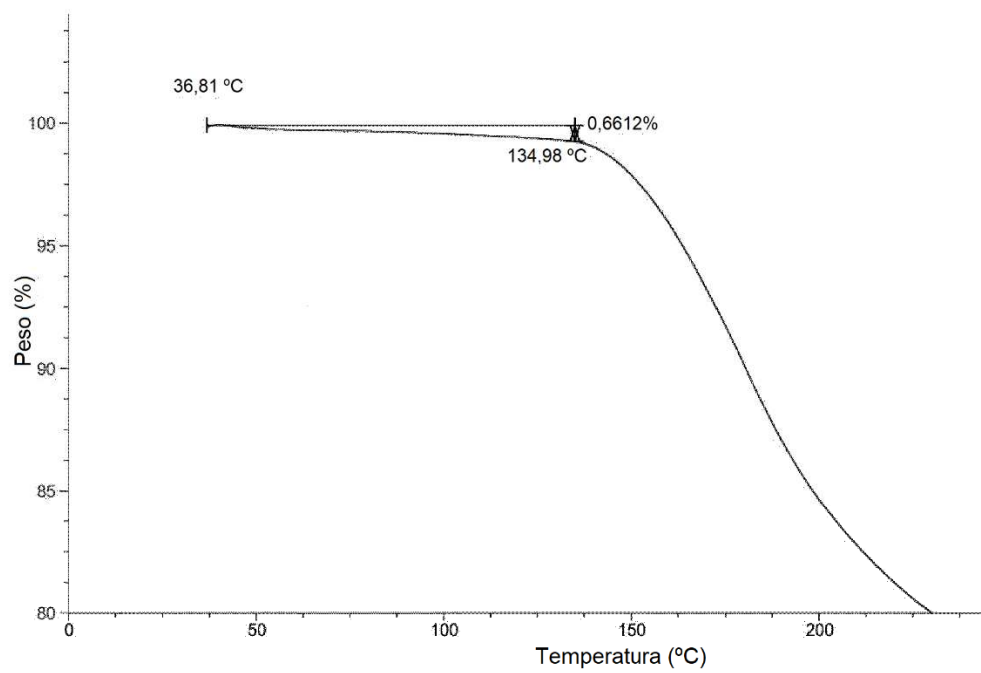


Fig. 15

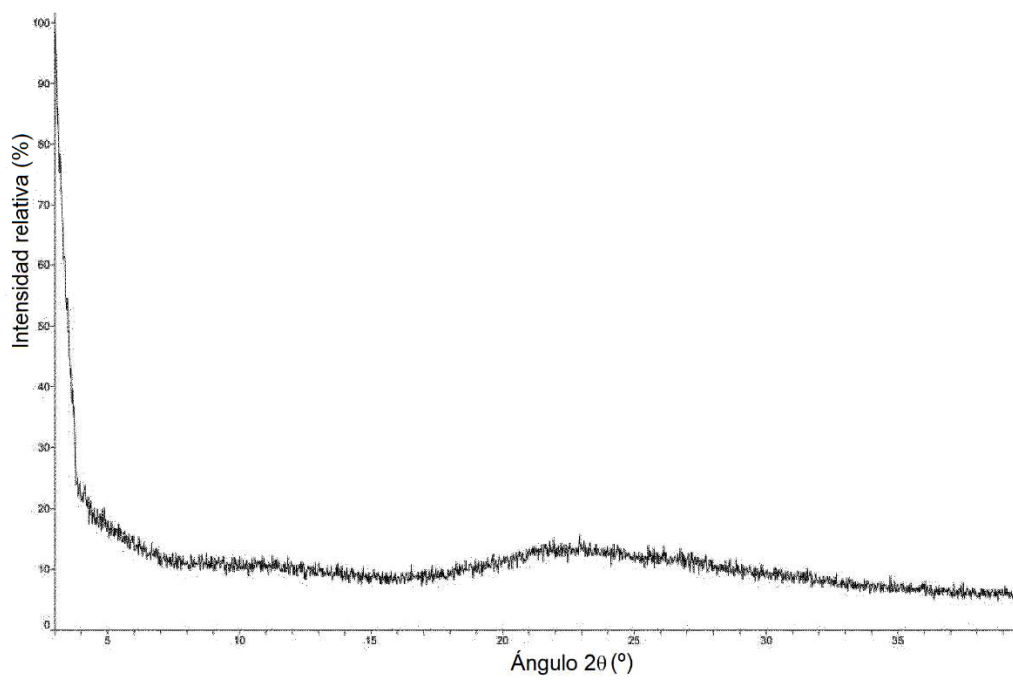


Fig. 16

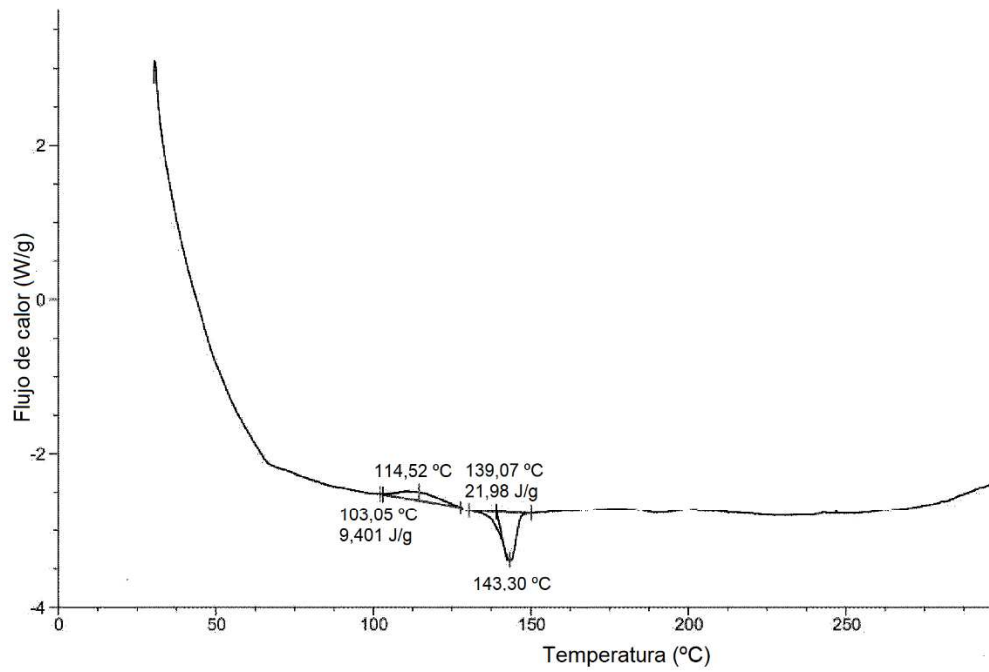


Fig. 17

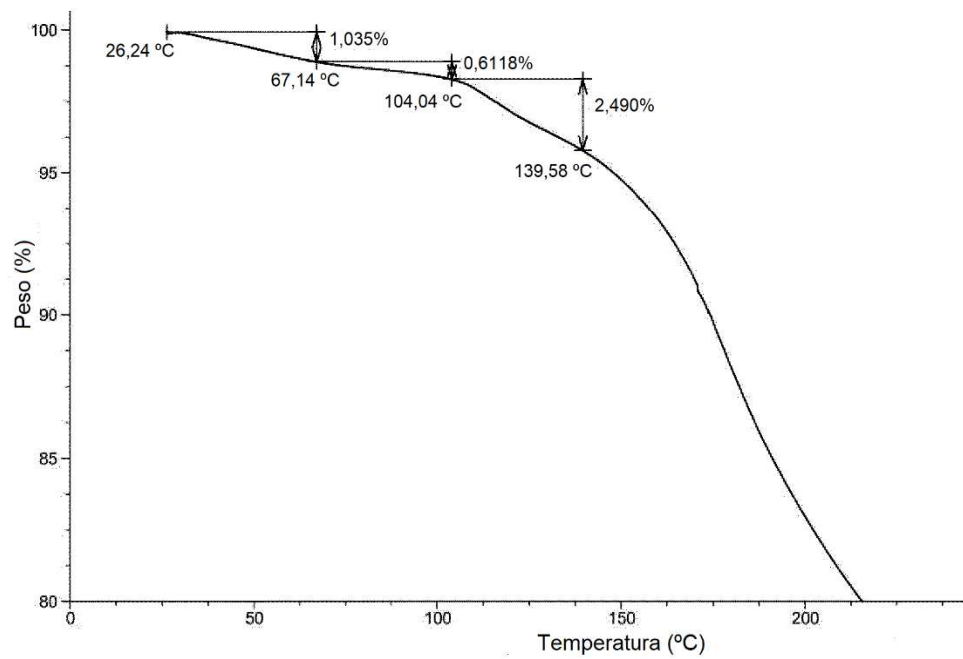


Fig. 18

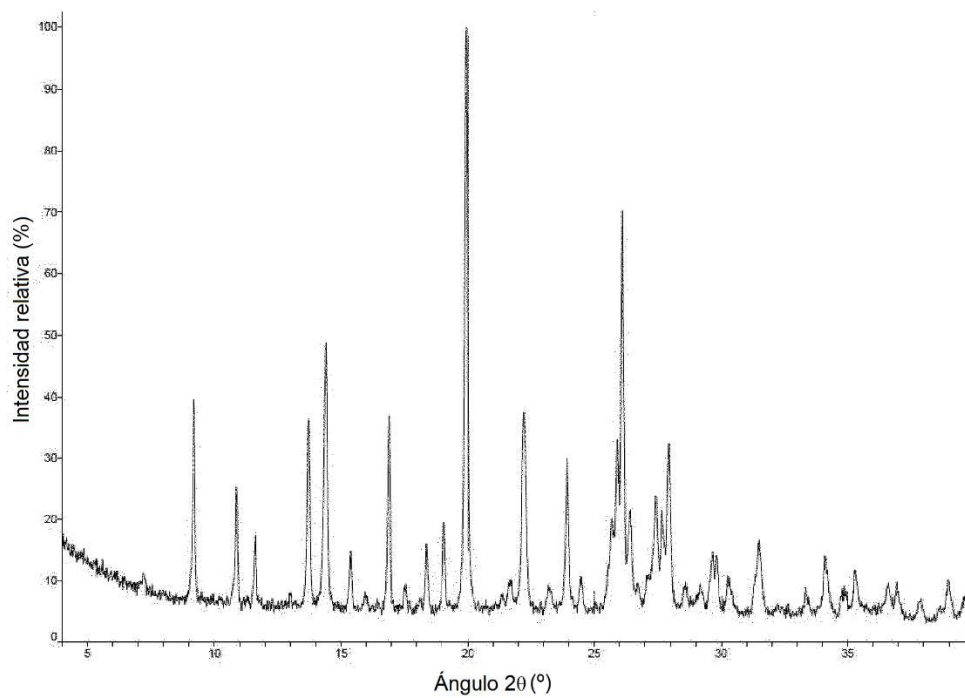


Fig. 19

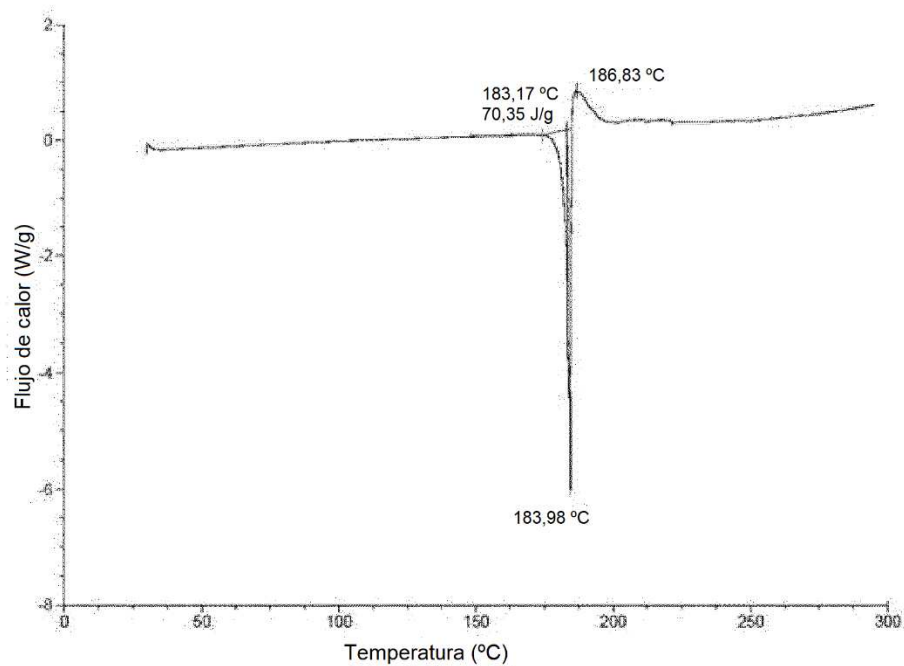


Fig. 20

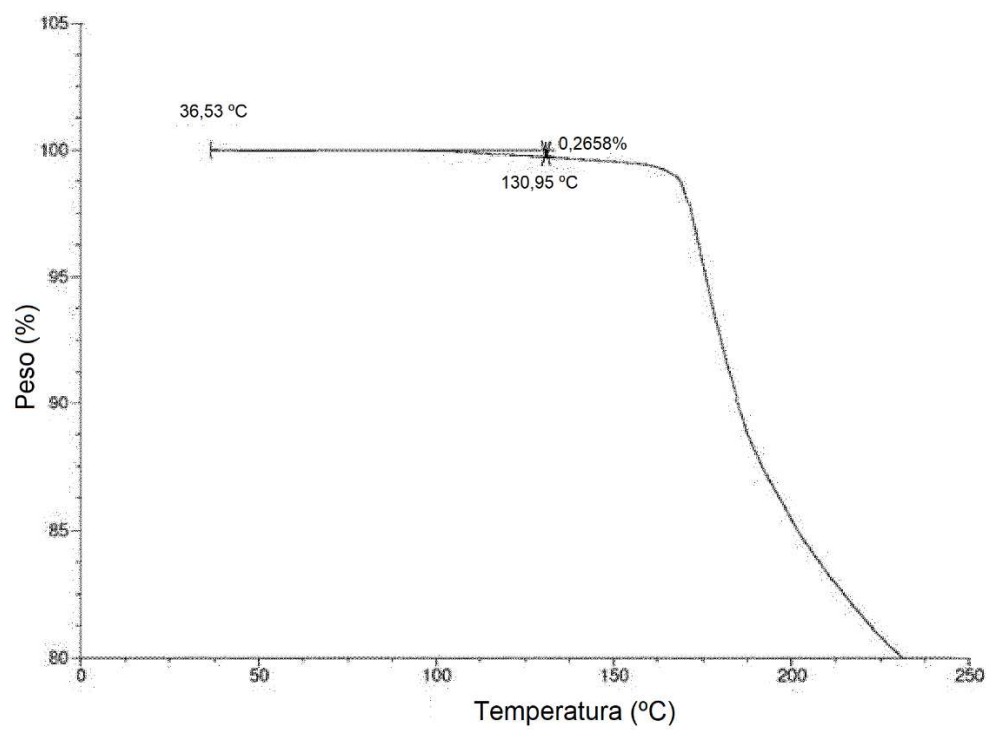


Fig. 21