

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 025 192**

51 Int. Cl.:

C07J 9/00 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 31/573 (2006.01)

A61P 27/12 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2019 PCT/CN2019/097773**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.01.2020 WO20020306**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2019 E 19841413 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2025 EP 3828193**

54 Título: **Forma cristalina del compuesto profármaco de lanosterol y aplicación del mismo**

30 Prioridad:

25.07.2018 CN 201810826425

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

06.06.2025

73 Titular/es:

**GUANGZHOU OCUSUN OPHTHALMIC
BIOTECHNOLOGY CO., LTD. (100.00%)
Room 1108, 11/F, Tower A R&F Winner Plaza No.
100 West Huangpu Road Tianhe District
Guangzhou
Guangdong 510627, CN**

72 Inventor/es:

**LIU, YIZHI;
WANG, YANDONG;
LI, XIAOLIN;
LUO, ZHI;
HE, HAIYING;
LI, JIAN y
CHEN, SHUHUI**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 3 025 192 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 del compuesto profármaco de lanosterol y aplicación del mismo

5 La presente solicitud reivindica la prioridad de CN201810826425.6, presentada el 25 de julio de 2018.

Campo técnico

10 La presente descripción se refiere a una forma cristalina del compuesto de fórmula (I) y a esta misma forma cristalina para su uso en el tratamiento de una enfermedad oftálmica.

Antecedentes

15 La catarata es una enfermedad del ojo que se produce en el cristalino del globo ocular y la turbidez del cristalino se denomina colectivamente catarata. El envejecimiento, la herencia, las anomalías metabólicas, los traumatismos, la radiación, el envenenamiento y la malnutrición local pueden dañar la cápsula del cristalino, lo que resulta en un aumento de la permeabilidad y la pérdida de la función de barrera, o provocar trastornos metabólicos del cristalino que provocan la desnaturalización de la proteína del cristalino y la formación de turbidez. Si el cristalino del globo ocular cambia de transparencia a opacidad y tiene un impacto en la luz solar que reciben los ojos, afectará a la vista de los ojos. Cuando el grado de turbidez del globo ocular es leve, el efecto sobre la visión es menor, pero a medida que el grado de turbidez se profundiza gradualmente, la agudeza visual aumentará y los casos graves provocarán ceguera. La catarata es una de las enfermedades oculares más comunes que conducen a la ceguera y es una de las principales causas de ceguera. Dado que el mecanismo de formación de cataratas aún no está claro, no se ha logrado ningún avance en la farmacoterapia. Por lo tanto, actualmente el único tratamiento efectivo es el quirúrgico.

25 Si bien la mejora continua de la cirugía de cataratas ha brindado una gran ayuda al tratamiento de las cataratas, la tasa de curación del tratamiento quirúrgico aún está muy por debajo de la tasa de incidencia y existe la posibilidad de complicaciones graves. Por otro lado, el costo del tratamiento quirúrgico de la catarata es muy alto, e incluso en los países desarrollados, la catarata impone una enorme carga al sistema de seguros médicos. Por lo tanto, la prevención y el tratamiento con fármacos juegan un papel decisivo. En la actualidad, los fármacos terapéuticos disponibles clínicamente para la catarata incluyen: 1, inhibidores de la aldosa reductasa, tales como catalina (Catalin, Kary Uni, Prifinoxinesodium), facolisina, bendazac L-lisina, etc.; 2, fármacos contra el deterioro oxidativo, como el glutatión, la taurina, la aspirina, etc.; 3, fármacos para el metabolismo de los nutrientes, como vitaminas, carotenoides, etc.; 4, compuesto herbal chino que incluye la pastilla Shihu Yeguanguang, la pastilla Qiju Dihuang, Shijueming San, etc. Se ha confirmado mediante ensayos clínicos a largo plazo que estos fármacos para el tratamiento de la catarata solo pueden retrasar el deterioro de la catarata, pero no pueden revertir la afección para tratar la catarata. Mientras tanto, a medida que China comienza a entrar en una sociedad que envejece, el número de pacientes con cataratas aumenta y la demanda de medicamentos para las cataratas será más urgente. Por lo tanto, clínicamente se necesitan nuevas variedades de fármacos oftálmicos externos contra las cataratas con seguridad, buen efecto curativo, fuerte penetración intraocular y naturaleza estable.

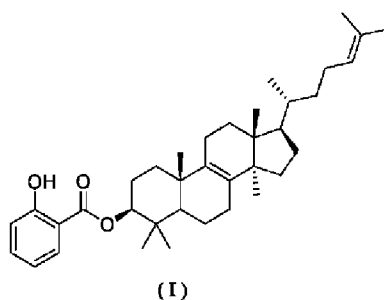
45 El lanosterol es una molécula anfífilica enriquecida en el cristalino. Se sintetiza a partir de la lanosterol sintasa (LSS) a través de una reacción de ciclación clave de la vía de síntesis del colesterol. El lanosterol puede reducir la agregación anormal de las proteínas del cristalino y hacer que se reorganicen regularmente para restaurar la transparencia cristalina. Los estudios han demostrado que la lanosterol sintasa se puede detectar en el cristalino. Además, en el estudio de cataratas de Shumiya en ratas, una combinación específica de mutaciones homocigotas de la lanosterol sintasa y el difosfato de farnesil farnesiltransferasa 1 (FDFT1) puede aliviar los niveles de colesterol en el cristalino y provocar cataratas. Mientras tanto, estudios recientes de los presentes investigadores han descubierto que el lanosterol puede reducir significativamente los agregados proteicos preformados del cristalino *in vitro* y a nivel celular. También se ha confirmado que el lanosterol puede revertir el estado de la catarata y provocar la clarificación y la transparencia del cristalino *in vivo*. Este resultado se ha publicado recientemente en Nature y ha atraído la atención mundial y es una nueva molécula para la prevención y el tratamiento de las cataratas.

55 Tanto el documento WO-A-2016/029199 como el documento Nature Vol 523 (7562) págs. 607-611 (2015) describen la eficacia del lanosterol en el tratamiento de las cataratas.

Contenido de la invención

60 La presente descripción proporciona una forma cristalina A del compuesto de fórmula (I), donde el patrón de difracción de rayos X en polvo (XPRD) de la forma cristalina A comprende picos de difracción característicos en los siguientes ángulos de 2 θ : 8,60 \pm 0,2°, 15,06 \pm 0,2° y 17,22 \pm 0,2°.

65



En algunas realizaciones de la presente descripción, el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina A comprende picos de difracción característicos en los siguientes ángulos de 2θ : $8,60\pm 0,2^\circ$, $9,38\pm 0,2^\circ$, $10,57\pm 0,2^\circ$, $12,54\pm 0,2^\circ$, $14,43\pm 0,2^\circ$, $15,06\pm 0,2^\circ$, $17,22\pm 0,2^\circ$ y $25,18\pm 0,2^\circ$.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina A comprende picos de difracción característicos en los siguientes ángulos de 2θ : $4,350^\circ$, $8,598^\circ$, $9,383^\circ$, $10,566^\circ$, $12,542^\circ$, $13,448^\circ$, $14,428^\circ$, $14,591^\circ$, $15,063^\circ$, $15,453^\circ$, $15,820^\circ$, $16,803^\circ$, $17,216^\circ$, $20,985^\circ$, $21,181^\circ$, $22,225^\circ$, $22,601^\circ$, $22,856^\circ$, $23,726^\circ$, $24,039^\circ$, $24,534^\circ$, $25,185^\circ$, $25,514^\circ$, $25,935^\circ$, $26,570^\circ$, $27,867^\circ$, $28,125^\circ$, $28,416^\circ$, $29,114^\circ$, $29,445^\circ$, $31,914^\circ$, $33,710^\circ$, $34,297^\circ$, $34,329^\circ$, $36,014^\circ$, $36,108^\circ$ y $38,196^\circ$.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina A es como se muestra en la Fig. 1.

En algunas realizaciones de la presente descripción, los datos analíticos del patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina A son los que se muestran en la Tabla 1.

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

Núm.	Ángulo de 2θ ($^\circ$)	Espaciado d (Å)	Intensidad relativa	Núm.	Ángulo de 2θ ($^\circ$)	Espaciado d	Intensidad relativa
1	4,350	20,297	20,2	20	24,039	3,6989	4,6
2	8,598	10,2761	85,3	21	24,534	3,6255	4,8
3	9,383	9,4178	6,4	22	25,185	3,5331	16,8
4	10,566	8,366	8,4	23	25,514	3,4884	2,4
5	12,542	7,0517	11,2	24	25,935	3,4327	5,4
6	13,448	6,5785	3,4	25	26,570	3,352	4,8
7	14,428	6,1338	47	26	27,867	3,1989	2,9
8	14,591	6,0658	39,8	27	28,125	3,1701	1,7
9	15,063	5,8766	50,3	28	28,416	3,1384	2
10	15,453	5,7294	5,3	29	29,114	3,0646	3,4
11	15,820	5,5974	14	30	29,445	3,031	1,6
12	16,803	5,2721	78,4	31	31,914	2,8019	1,7
13	17,216	5,1464	100	32	33,710	2,6566	3,8
14	20,985	4,2298	4,7	33	34,297	2,6124	3,7
15	21,181	4,1912	12,5	34	34,329	2,6101	2
16	22,225	3,9965	3	35	36,014	2,4917	1,6
17	22,601	3,9309	3,5	36	36,108	2,4855	1,3
18	22,856	3,8876	2,4	37	38,196	2,3543	2,1
19	23,726	3,7469	4,7				

En algunas realizaciones de la presente descripción, el patrón de calorimetría de barrido diferencial (DSC) de la forma cristalina A tiene un pico endotérmico que comienza a 151,75 °C.

5 En algunas realizaciones de la presente descripción, el patrón de DSC de la forma cristalina A es como se muestra en la Fig. 2.

En algunas realizaciones de la presente descripción, el patrón de análisis termogravimétrico (TGA) de la forma cristalina A tiene una pérdida de peso del 0,04540 % que se produce a $151,57 \pm 3$ °C.

10 En algunas realizaciones de la presente descripción, el patrón de TGA de la forma cristalina A es como se muestra en la Fig. 3.

La presente descripción también proporciona la forma cristalina A, para su uso en el tratamiento de enfermedades oftálmicas.

15 Efecto técnico

20 Como nuevo profármaco del lanosterol, el compuesto de la presente descripción tiene una buena permeabilidad y se convierte eficazmente en lanosterol en el cuerpo, lo que mejora en gran medida la tasa de utilización de fármaco del lanosterol; la forma cristalina del mismo tiene una buena estabilidad.

Definición y descripción

25 A menos que se indique lo contrario, se pretende que los siguientes términos y frases utilizados en este documento tengan los siguientes significados. Un término o una expresión específicos no deben considerarse indefinidos o poco claros en ausencia de una definición particular, sino que deben entenderse en el sentido habitual. Cuando aparece un nombre comercial en la presente memoria, se pretende hacer referencia a su correspondiente producto básico o principio activo del mismo.

30 Los compuestos intermedios de la presente descripción se pueden preparar mediante diversos métodos sintéticos conocidos por los expertos en la técnica, incluidas las realizaciones descritas a continuación, las realizaciones formadas combinando las realizaciones descritas a continuación con otros métodos de síntesis química y alternativas equivalentes conocidas por los expertos en la técnica. Las realizaciones preferidas incluyen, aunque no de forma limitativa, las realizaciones de la presente descripción.

35 Las reacciones químicas de las realizaciones de la presente descripción se llevan a cabo en un disolvente adecuado, y el disolvente debe ser adecuado para el cambio químico y los reactivos y materiales requeridos para ello de la presente descripción. Para obtener los compuestos de la presente descripción, a veces es necesario que los expertos en la técnica modifiquen o seleccionen las etapas de síntesis o los esquemas de reacción basándose en las realizaciones existentes.

40 La presente descripción se describirá específicamente mediante realizaciones, pero el alcance de la presente descripción no se limita a estas.

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

50 Los disolventes utilizados en la presente descripción están comercialmente disponibles. La presente descripción emplea las siguientes abreviaturas: DCM representa diclorometano; DMF representa *N,N*-dimetilformamida; DMSO representa sulfóxido de dimetilo; EtOH representa etanol; MeOH representa metanol; TFA representa ácido trifluoroacético; TsOH representa ácido *p*-toluenosulfónico; mp representa punto de fusión; EtSO₃H representa ácido etanosulfónico; MeSO₃H representa ácido metanosulfónico; El ATP representa trifosfato de adenosina; HEPES representa ácido 4-hidroxietilpiperazinetanosulfónico; EGTA representa ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)tetraacético; MgCl₂ representa dicloruro de magnesio; MnCl₂ representa dicloruro de manganeso; DTT representa ditioneitol; DCC representa dicitclohexilcarbodiimida; DMAP representa 4-dimetilaminopiridina; Profármaco de lanosterol 026 representa el compuesto de fórmula (I) de la presente descripción.

Difractómetro de rayos X en polvo, XRPD

60 Aproximadamente de 10 a 20 mg de la muestra se sometieron a detección por XRPD.

Los parámetros detallados de XRPD son los siguientes:

65 Tubo de rayos X: Cu, α , ($\lambda = 1,54056$ Å)

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

Ranura de divergencia: 0,60 mm

Ranura del detector: 10,50 mm

Ranura antidispersión: 7,10 mm

Rango de escaneo: 4-40 grados

Tamaño del paso: 0,02 grados

Tiempo de paso: 0,12 segundos

Velocidad de rotación de la bandeja de muestras: 15 rpm

Sorción dinámica de vapor (DVS)

Método de detección: las muestras (de 10 mg a 20 mg) se colocaron en una bandeja de muestras DVS para su análisis.

Temperatura: 25 °C

Equilibrio: dm/dt: 0,01 %/min: (El más corto: 10 minutos, el más largo: 180 min)

Secado: 0 % de HR, 120 min

Gradiente de HR (%) para la prueba: 10 %

Intervalo de gradiente de HR (%) para la prueba: de 0 % a 90 % a 0 %

La higroscopicidad se evaluó utilizando las siguientes escalas:

Escalas de higroscopicidad	Aumento higroscópico de peso*
Delicuescencia	Absorción de suficiente agua para formar líquido
Alta higroscopicidad	Aumento higroscópico de peso ≥ 15 %
Higroscopicidad media	15 % > Aumento higroscópico de peso ≥ 2 %
Ligera higroscopicidad	2 % > Aumento higroscópico de peso $\geq 0,2$ %
Higroscopicidad nula o casi nula	Aumento higroscópico de peso < 0,2 %
*Aumento higroscópico de peso a 25 ± 1 °C y 80 ± 2 % de HR	

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 es el patrón de XRPD de la forma cristalina A irradiada por Cu-K α .

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

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

La Fig. 4 es la isoterma de DVS de la forma cristalina A.

La Fig. 5 es el efecto de las gotas oculares de lanosterol y su profármaco 026 (el compuesto de fórmula (I)) en un modelo de catarata de conejo de Nueva Zelanda neonatal inducida por selenito de sodio observado con una lámpara de hendidura. NC: grupo de control normal; MC: grupo de control modelo; PC: grupo de control positivo; LT: grupo de tratamiento con gotas oculares de lanosterol; 026: grupo de tratamiento con gotas oculares de profármaco de lanosterol 026.

La Fig. 6 es la comparación de la transparencia del cristalino de un modelo de catarata de conejo de Nueva Zelanda neonatal inducida por selenito de sodio en cada grupo *in vitro* después de 42 días de administración. NC: grupo de control normal; MC: grupo de control modelo; PC: grupo de control positivo; LT: grupo de tratamiento con gotas oculares de lanosterol; 026: grupo de tratamiento con gotas oculares de profármaco de lanosterol 026. La rejilla es de 2,12 × 2,12 mm.

La Fig. 7 es la comparación de la actividad de glutatión peroxidasa (GSH-PX) del cristalino del modelo de catarata neonatal de conejo de Nueva Zelanda inducida por selenito de sodio después de 42 días de administración. NC: grupo de control normal; MC: grupo de control modelo; PC: grupo de control positivo; LT: grupo de tratamiento con gotas oculares de lanosterol; 026: grupo de tratamiento con gotas oculares de profármaco de lanosterol 026. CONTRA NC: ** significa $p < 0,01$, * significa $p < 0,05$; CONTRA MC: ## significa $p < 0,01$, # significa $p < 0,05$; CONTRA PC: ++ significa $p < 0,01$, + significa $p < 0,05$.

La Fig. 8 es el efecto de gotas oculares de lanosterol y su profármaco 026 en el modelo de catarata de conejo de Nueva Zelanda inducida por ultravioleta observado por la lámpara de hendidura. NC: grupo de control normal; MC: grupo de control modelo; PC: grupo de control positivo; LT: grupo de tratamiento con gotas oculares de lanosterol; 026: grupo de tratamiento con gotas oculares de profármaco de lanosterol 026.

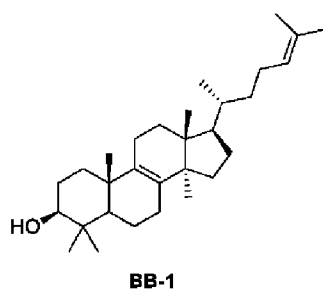
La Fig. 9 es la comparación de la transparencia del cristalino de la catarata de conejo de Nueva Zelanda inducida por ultravioleta en cada grupo *in vitro* después de 42 días de administración. NC: grupo de control normal; MC: grupo de control modelo; PC: grupo de control positivo; LT: grupo de tratamiento con gotas oculares de lanosterol; 026: grupo de tratamiento de gotas oculares de profármaco de lanosterol 026. La rejilla es de $2,12 \times 2,12$ mm.

La Fig. 10 es la comparación de la actividad de glutatión peroxidasa (GSH-PX) del cristalino de la catarata neonatal de conejo de Nueva Zelanda inducida por ultravioleta en cada grupo después de 42 días de administración. NC: grupo de control normal; MC: grupo de control modelo; PC: grupo de control positivo; LT: grupo de tratamiento con gotas oculares de lanosterol; 026: grupo de tratamiento con gotas oculares de profármaco de lanosterol 026. CONTRA NC: ** significa $p < 0,01$, * significa $p < 0,05$; CONTRA MC: ## significa $p < 0,01$, # significa $p < 0,05$; CONTRA PC: ++ significa $p < 0,01$, + significa $p < 0,05$.

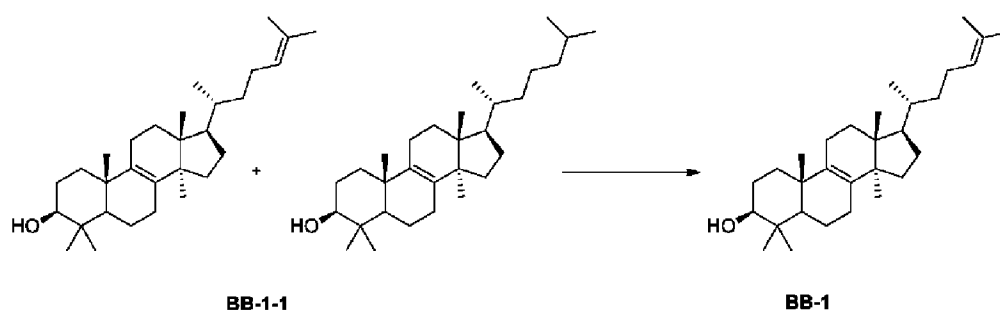
Descripción detallada de la realización

Para una mejor comprensión del contenido de la presente descripción, la presente descripción se describe en detalle a través de las modalidades, lo que no significa ninguna limitación de la presente descripción.

Ejemplo de referencia 1: Fragmento BB-1



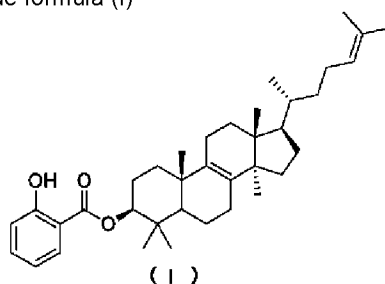
Ruta de síntesis:



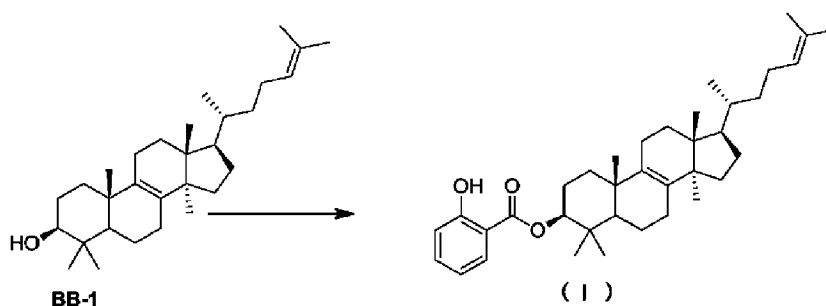
Etapas: Síntesis del compuesto **BB-1**.

La mezcla **BB-1-1** se sometió a cromatografía de fluidos supercríticos (condiciones de separación: columna: ChiralpakAD-3 $150 \times 4,6$ mm DI., $3 \mu\text{m}$; fase móvil: A: CO_2 , B: etanol (dietanolamina al 0,05 %); gradiente: B del 5 % al 40 % en 5 minutos, B 40 % mantenido durante 2,5 minutos, a continuación B 5 % mantenido durante 2,5 minutos; velocidad de flujo: 2,5 ml/min; temperatura de la columna: 35°C ; longitud de onda: 220 nm) para dar el compuesto **BB-1**. ^1H RMN (CDCl_3 400 MHz): $\delta = 5,06\text{-}5,15$ (m, 1H), 5,10 (br t, $J=7,2$ Hz, 1H), 3,20-3,22 (m, 1H), 3,24 (dd, $J=11,5, 4,5$ Hz, 1H), 1,64-2,09 (m, 15H), 0,77-1,57 (m, 29H), 0,65-0,72 ppm (m, 3H).

Ejemplo 1: Preparación del compuesto de fórmula (I)



Ruta de síntesis:



Etapa 1: Síntesis del compuesto de fórmula (I).

30 Se disolvieron 35,2 g del compuesto **BB-1** en 550 ml de diclorometano anhidro, se añadieron 22,8 g de ácido salicílico, a continuación, se añadieron 39,2 g de DCC y finalmente se añadieron 23,2 g de DMAP, dando como resultado una suspensión blanca, que se calentó a 35 °C y se dejó que la reacción se desarrollara durante 96 horas. La TLC mostró que quedaba una pequeña cantidad de materias primas y la reacción se detuvo. La mezcla de reacción se filtró, el residuo del filtro se lavó con 150 ml de diclorometano y el filtrado se combinó y se concentró hasta sequedad para dar un residuo bruto. Se añadieron 500 ml de metanol al residuo bruto y se calentó a reflujo durante 16 horas para dar una suspensión blanca, la temperatura se redujo a 15 °C y la mezcla se filtró para dar un sólido blanco, que se confirmó como la forma cristalina A del compuesto de fórmula (I) después del ensayo de XRPD.

35 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 10,89 (s, 1H), 7,77 (dd, J=1,76, 8,03 Hz, 1H), 7,38 (ddd, J=1,76, 7,09, 8,47 Hz, 1H), 6,91 (dd, J=0,88, 8,41 Hz, 1H), 6,78-6,85 (m, 1H), 5,00-5,07 (m, 1H), 4,68-4,74 (m, 1H), 1,64-2,04 (m, 12H), 1,62 (s, 3H), 1,57 (br s, 2H), 1,54 (s, 3H), 1,04-1,51 (m, 9H), 0,98 (s, 3H), 0,98 (s, 3H), 0,89 (s, 3H), 0,85 (d, J=6,27 Hz, 3H), 0,82 (s, 3H), 0,63 (s, 3H).

Ejemplo 2: Estudio sobre la higroscopicidad de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (I)

45 Materiales experimentales:

Sistema de sorción dinámica de vapor SMS DVS Advantage

Método experimental:

50 Se colocaron de 10 a 15 mg de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (I) en la bandeja de muestras del DVS para su ensayo.

Resultados experimentales:

55 El patrón DVS de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (I) se muestra en la Fig. 4, ΔW = 0,747 %.

Conclusión experimental:

60 La ganancia de peso higroscópica de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (I) a 25 °C y 80 % de HR es del 0,747 %, que es ligeramente higroscópica.

Ejemplo 3: Experimento de preestabilidad de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (I)

65

La forma cristalina A del compuesto de fórmula (I) se colocó en las siguientes 3 condiciones y se analizó para determinar su aspecto, XRPD, contenido y sustancias relacionadas en diferentes puntos temporales. Las condiciones de investigación y los elementos de prueba se muestran en la Tabla 2.

5 Tabla 2: Condiciones de investigación y objetos de prueba

Artículo de prueba	Condición	Día 0	Día 5	Día 10
Factores que influyen	Alta temperatura (60 °C, abierto)	X*	X	X
	Humedad alta (humedad relativa del 92,5 %, abierto)		X	X
	Luz (iluminancia total = $1,2 \times 10^6$ Lux•h/ultravioleta cercano = 200 w•h/m ² , abierto)		X (1 ICH)	
15 Nota: *El elemento de prueba X incluye: aspecto, XRPD, contenido y sustancias relacionadas. El experimento continuó durante 10 días; ICH indica la pauta de estabilidad para las pruebas de estabilidad de la luz.				

20 Pasos experimentales:

Se pesaron con precisión 10 mg de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (I) y se colocaron en una botella de muestra, y a continuación se extendieron para formar una capa delgada. Las muestras se colocaron a 60 °C, con una HR del 92,5 %, la boca de la botella se envolvió directamente con papel de aluminio que se perforó para obtener algunos orificios pequeños y garantizar que la muestra pudiera entrar en contacto total con el aire ambiente. Las muestras se colocaron respectivamente en una caja seca y un frasco de vidrio que contenía una solución saturada de nitrato de potasio. La muestra iluminada (abierta, no cubierta con papel de aluminio) y la muestra de control iluminada (abierta, la botella de muestra estaba completamente cubierta con papel de aluminio) se colocaron en la caja de luz. Se ponderaron 2 partes de la muestra en cada punto temporal como muestra de prueba formal. Además, se pesaron aproximadamente 5 mg de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (I) para el ensayo de XRPD; la botella de muestra se envolvió con papel de aluminio que se perforó para obtener algunos orificios pequeños; las muestras también se colocaron en la caja de secado correspondiente y en el frasco de vidrio que contenía una solución saturada de nitrato de potasio.

35 Método de análisis de contenido:

Modelo de columna: Ultimate XB-C18 3,0*50 mm, 3 µm; fase móvil: 0,5 ml de TFA en 1 l de agua (solvente A) y 0,4 ml de TFA en 1 l de acetonitrilo (solvente B), elución: un gradiente de elución de 95 % a 100 % (solvente B) durante más de 2 minutos y a continuación 100 % durante 13 minutos. La velocidad de flujo fue de 1,5 ml/min; temperatura de la columna: 30 °C.

Resultados y conclusiones experimentales: la forma cristalina no ha cambiado después del experimento, y su estabilidad es buena.

45 Prueba de actividad biológica

Ejemplo experimental 1: Estudio sobre la penetración de fármacos oculares en el organismo y la conversión de fármacos en lanosterol

50 En este estudio, se utilizaron conejos blancos de Nueva Zelanda (el peso corporal era de más de 2 kg, con una edad de más de 12 semanas) como animales de experimentación. Cada compuesto se estudió en dos conejos blancos de Nueva Zelanda. A cada conejo se le instilaron 50 µl de gotas oculares en cada ojo, se usaron tres ojos para recolectar muestras de humor acuoso y se usó un ojo como respaldo. La fórmula de los gotas oculares era 1,2 % de hidroxipropilmetilcelulosa (tamaño E5), 20,5 % de poloxámero (tamaño P407), 1,6 % de poloxámero (tamaño P188), la concentración del compuesto era de 5 mM y los gotas oculares eran suspensiones homogéneas. Tras gotear las gotas oculares en los ojos del conejo, se recogió el humor acuoso anterior 0,5, 2, 4 y 6 horas después de la administración. El volumen de cada muestra no fue superior a 50 µl. A cada animal se le administró anestesia leve antes de recolectar las muestras. Se recogieron tres muestras en cada punto temporal. Las muestras de humor acuoso recolectadas se almacenaron en hielo seco inmediatamente después de la recolección o se almacenaron en un refrigerador a -80 ± 10 °C. Tras la recogida de la muestra, los animales fueron sacrificados. La concentración del compuesto en cada muestra se determinó usando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (API 4000). Las Tablas 3 y 4 muestran las condiciones de determinación de la DMPK *in vivo*; las Tablas 5 y 6 muestran la concentración del fármaco en el humor acuoso después de que el compuesto lanosterol (fármaco original) y el compuesto profármaco se gotearon en los ojos (250 nM por ojo).

65

ES 3 025 192 T3

Resultados y conclusiones experimentales: tanto el propio lanosterol como su compuesto profármaco de la presente descripción son capaces de penetrar en el humor acuoso desde la córnea o a través de otras vías; y el compuesto profármaco es capaz de convertirse en el fármaco original lanosterol durante el proceso de infiltración y presenta una mayor concentración y exposición de lanosterol en el humor acuoso.

5

Tabla 3: Métodos de análisis y determinación de DMPK *in vivo*

Nombre del compuesto	El compuesto de fórmula (I) y el lanosterol			
Método de cromatografía líquida				
Fase móvil A	Una solución de agua y acetonitrilo (la relación en volumen es 95:5) que contiene ácido fórmico al 0,025 %, 1 mmol de sal tampón de acetato de amonio			
Fase móvil B	Una solución de acetonitrilo y agua (la relación en volumen de 95:5) que contiene ácido fórmico al 0,025 %, 1 mmol de sal tampón de acetato de amonio			
Columna cromatográfica	Proteína ACQUITY UPLC® BEH 300A C4 1,7 µm 2,1 × 50 mm			
Gradiente	Caudal (µl/min)	A (%)	B (%)	
	500 a 600	2 a 80	98 a 20	
Método de espectrometría de masas				
Fuente de iones	APCI o ESI			
Modo de escaneo	Monitorización iónica multipolar			
Polaridad	Iones positivos			
Nombre del compuesto	Par de iones	Tiempo de retención (min)	Potencial de desagrupamiento (eV)	Energía de colisión (eV)
El compuesto de fórmula (I)	409,3/109,1	2,05	50	38
Lanosterol	409,4/149,1	1,48	50	38

Tabla 4: Método de cromatografía líquida en gradiente para la prueba de DMPK del lanosterol y el compuesto de fórmula (I) *in vivo*

Caudal	Gradiente		
500 µl/min	Tiempo (minuto)	A (%)	B (%)
	comienzo	80,0	20,0
	0,30	70,0	30,0
	1,20	20,0	80,0
	2,00	2,0	98,0
	2,30	2,0	98,0
	2,31	80,0	20,0
	2,40	80,0	20,0

Tabla 5: Concentración promedio de la muestra en el humor acuoso (nM) después de que se gotearan 250 nmol de lanosterol en cada ojo de un conejo blanco de Nueva Zelanda

Nombre del compuesto de gotas oculares	Lanosterol (fármaco original)
Nombre del compuesto de prueba	Lanosterol (fármaco original)
Hora (hora)	Concentración media (nM)
0,5	106*

	2	496
	4	300
5	6	225
	AUC (nM.h)	1779
* BQL: por debajo del límite de cuantificación, AUC: cantidad de exposición.		

10 Tabla 6: Concentración media de la muestra en el humor acuoso (nM) después de gotearse 250 nmol del compuesto de fórmula (I) en cada ojo de conejo blanco de Nueva Zelanda

Nombre del compuesto de gotas oculares	El compuesto de fórmula (I) (profármaco)		
	Nombre del compuesto de prueba	El compuesto de fórmula (I)	Lanosterol
Hora (hora)	Concentración media (nM)	Concentración media (nM)	Concentración media (nM)
0,5	41,0	471	471
20	2	33,3	478
	4	25,5	403
	6	BQL	586
25	AUC (nM.h)	124	2700
* BQL: por debajo del límite de cuantificación, AUC: cantidad de exposición.			

30 Ejemplo experimental 2: Estudio farmacodinámico de gotas oculares de lanosterol y su profármaco en un modelo de catarata inducida por selenito de sodio en conejo neonatal de Nueva Zelanda

1. Animal de experimentación

35 Conejos neonatales de Nueva Zelanda de 7 días de edad, de grado normal, y 5 conejos jóvenes por camada fueron amamantados con una coneja madre.

2. Agrupación y procesamiento

40 Los conejos jóvenes experimentales se dividieron aleatoriamente en 5 grupos con 5 conejos por grupo.

1) Grupo de control normal (NC): en el día P10, a los conejos jóvenes se les inyectó por vía subcutánea 0,25 ml de solución salina fisiológica del cuello, y no se les administró después del día P15.

45 2) Grupo de control modelo (MC): en el día P10, se inyectó a los conejos jóvenes por vía subcutánea una solución de selenito de sodio (en solución salina fisiológica) a una dosis de 20 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal, y después del día P15, se gotearon gotas para los ojos en blanco sin fármaco en el ojo derecho 3 veces al día durante 42 días.

50 3) Grupo de control positivo (PC): en el día P10, se inyectó a los conejos jóvenes por vía subcutánea una solución de selenito de sodio (en solución salina fisiológica) a una dosis de 20 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal, y después del día P15, se gotearon gotas oculares Kary Uni (Santen Pharmaceutical Co., Ltd en Japón) en el ojo derecho 3 veces al día durante 42 días.

55 4) Grupo de tratamiento con gotas oculares de lanosterol (LT): en el día P10, se inyectó a los conejos jóvenes por vía subcutánea una solución de selenito de sodio (en solución salina fisiológica) a una dosis de 20 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal, y después del día P15, se gotearon gotas oculares de lanosterol en el ojo derecho 3 veces al día durante 42 días.

60 5) Grupo de tratamiento con gotas oculares de profármaco de lanosterol 026 (026, el compuesto de fórmula (I)): en el día P10, se inyectó a los conejos jóvenes por vía subcutánea una solución de selenito de sodio (en solución salina fisiológica) a una dosis de 20 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal, y después del día P15, se gotearon gotas oculares de profármaco de lanosterol 026 en el ojo derecho 3 veces al día durante 42 días.

3. Ensayo experimental

65

1) Fotografía con lámpara de hendidura: se observaron conejos neonatales de Nueva Zelanda de inducción por selenito de sodio en cada grupo con lámpara de hendidura antes de la administración, y 7 días, 14 días, 21 días y 42 días después de la administración, respectivamente;

5 2) Prueba de transparencia del cristalino *in vitro*: el último día, se diseccionó el globo ocular del animal, se separó completamente el cristalino que contenía la cápsula y se colocó el cristalino en un papel cuadrado (2,12 × 2,12 mm). Las fotografías muestran la nitidez de la cuadrícula fotografiada a través del cristalino.

10 3) Ensayo de actividad de la glutatión peroxidasa (GSH-PX): La actividad de GSH-PX del cristalino de conejo aislado en cada grupo se determinó mediante el método proporcionado en la especificación del kit de detección de actividad de GSH-PX (Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute). Los datos experimentales se analizaron mediante ANOVA unidireccional con el software estadístico SPSS. Se utilizó el método LSD para comparar los grupos, y el nivel de diferencia estadística fue $p < 0,05$.

15 4. Resultados experimentales

1) Observación de la lámpara de hendidura: La Fig. 5 muestra que el selenito de sodio podía inducir cataratas en el cristalino de conejo neonatal de Nueva Zelanda. La lámpara de hendidura muestra que los síntomas de cataratas se redujeron significativamente después de administrar las gotas oculares de profármaco de lanosterol 026 durante 42 días (Fig. 5-I) en comparación con los síntomas antes de la administración (Fig. 5-J). Los síntomas de la catarata no mostraron cambios evidentes antes y después de la administración de gotas oculares Kary Uni (Figs. 5-E, 5-F) y gotas oculares de lanosterol (Fig. 5-G, 5-H).

25 2) Prueba de transparencia del cristalino *in vitro*: La Fig. 6 muestra la transparencia del cristalino de conejos de Nueva Zelanda neonatales con catarata inducida por selenito de sodio en cada grupo después de 42 días de administración. En el lado izquierdo de cada fotografía está el cristalino del ojo izquierdo (no se administró al ojo izquierdo como autocontrol) y en el lado derecho está el cristalino del ojo derecho (al ojo derecho se administró según la agrupación). Después de 42 días de la administración de las gotas oculares del profármaco de lanosterol 026, la transparencia del cristalino del ojo derecho fue significativamente mayor que la del ojo izquierdo, y también significativamente mayor que la del grupo MC, pero siguió siendo inferior a la del grupo NC. No hubo cambios significativos en la transparencia del cristalino después de la administración al ojo derecho en el grupo LT.

30 3) Ensayo de actividad de GSH-PX: después de 42 días de administración, el resultado de la actividad de GSH-PX del cristalino en cada grupo muestra (véase Fig. 7) que después de la inyección subcutánea de selenito de sodio, la actividad de GSH-PX en el cristalino de los ojos de conejo se había reducido significativamente y había una diferencia estadística ($p < 0,01$) en comparación con el grupo NC. Las gotas oculares de profármaco de lanosterol 026 y las gotas oculares de fármaco de control positivo Kary Uni fueron capaces de aumentar la actividad GSH-PX del cristalino, y hubo una diferencia estadística en comparación con el grupo MC ($p < 0,01$), y el efecto de mejora de 026 fue mejor que el de Kary Uni ($p < 0,01$). El efecto de las gotas oculares de lanosterol sobre la actividad del cristalino GSH-PX fue significativamente menor que el de 026 y Kary Uni, y no hubo diferencias estadísticas en comparación con el grupo MC ($p > 0,05$).

5. Conclusión

45 Los resultados anteriores indican que las gotas oculares de profármaco de lanosterol 026 son capaces de aliviar los síntomas de cataratas de conejos neonatales de Nueva Zelanda inducida por selenito de sodio y mejorar la transparencia del cristalino y la actividad GSH-PX del cristalino.

50 Ejemplo experimental 3: estudio farmacodinámico de gotas oculares de lanosterol y su profármaco en un modelo de catarata de conejo neonatal de Nueva Zelanda inducida por ultravioleta

1. Animal de experimentación

55 Conejos adultos de Nueva Zelanda 2,0-2,5 kg, grado normal, machos y hembras, un total de 25.

Agrupación y procesamiento

Los conejos experimentales se dividieron aleatoriamente en 5 grupos con 5 conejos por grupo.

60 1) Grupo de control normal (NC): alimentación normal, sin administración de fármacos.

2) Grupo de control modelo (MC): Irradiación UV de 313 nm durante 24 horas para hacer el modelo, a continuación, se gotearon gotas oculares en blanco sin fármaco en el ojo derecho 3 veces al día durante 42 días.

65

3) Grupo de control positivo (PC): irradiación UV de 313 nm durante 24 horas para hacer el modelo, a continuación, se gotearon gotas oculares Kary Uni (Santen Pharmaceutical Co., Ltd en Japón) en el ojo derecho 3 veces al día durante 42 días.

5 4) Grupo de tratamiento con gotas oculares de lanosterol (LT): Irradiación UV de 313 nm durante 24 horas para hacer el modelo, a continuación, se gotearon gotas oculares de lanosterol en el ojo derecho 3 veces al día durante 42 días.

10 5) Grupo de tratamiento con gotas oculares de profármaco de lanosterol 026 (026): irradiación UV de 313 nm durante 24 horas para hacer el modelo, a continuación, se gotearon gotas oculares de profármaco de lanosterol 026 en el ojo derecho 3 veces al día durante 42 días.

3. Ensayo experimental

15 1) Fotografía con lámpara de hendidura: Los animales de cada grupo se observaron con una lámpara de hendidura antes de la administración y 7 días, 14 días, 21 días y 42 días después de la administración, respectivamente;

20 2) Prueba de transparencia del cristalino *in vitro*: el último día, se diseccionó el globo ocular del animal, se separó completamente el cristalino que contenía la cápsula y se colocó el cristalino en un papel cuadrículado (2,12 × 2,12 mm). Las fotografías muestran la nitidez de la cuadrícula fotografiada a través del cristalino.

25 3) Ensayo de actividad de la glutatión peroxidasa (GSH-PX): La actividad de GSH-PX del cristalino de conejo aislado en cada grupo se determinó mediante el método proporcionado en la especificación del kit de detección de actividad de GSH-PX (Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute). Los datos experimentales se analizaron mediante ANOVA unidireccional con el software estadístico SPSS. Se utilizó el método LSD para comparar los grupos, y el nivel de diferencia estadística fue $p < 0,05$.

4. Resultados experimentales

30 1) Observación de la lámpara de hendidura: La Fig. 8 muestra que el ultravioleta indujo catarata en el cristalino del conejo de Nueva Zelanda. La lámpara de hendidura muestra que los síntomas de cataratas se redujeron significativamente después de administrar las gotas oculares de profármaco de lanosterol 026 durante 42 días (Fig. 8-I) en comparación con los síntomas antes de la administración (Fig. 8-J). Los síntomas de la catarata no mostraron cambios evidentes antes y después de la administración de gotas oculares Kary Uni (Figs. 8-E, 8-F) y gotas oculares de lanosterol (Fig. 8-G, 8-H).

40 2) Prueba de transparencia del cristalino *in vitro*: La Fig. 9 muestra la transparencia del cristalino de conejos de Nueva Zelanda con cataratas inducidas por ultravioleta en cada grupo después de 42 días de administración. En el lado izquierdo de cada fotografía está el cristalino del ojo izquierdo (no se administró al ojo izquierdo como autocontrol) y en el lado derecho está el cristalino del ojo derecho (al ojo derecho se administró según la agrupación). Después de 42 días de la administración de las gotas oculares del profármaco de lanosterol 026, la transparencia del cristalino del ojo derecho fue significativamente mayor que la del ojo izquierdo, y también significativamente mayor que la del grupo MC, pero siguió siendo inferior a la del grupo NC. No hubo cambios significativos en la transparencia del cristalino después de la administración del fármaco en el ojo derecho en el grupo LT.

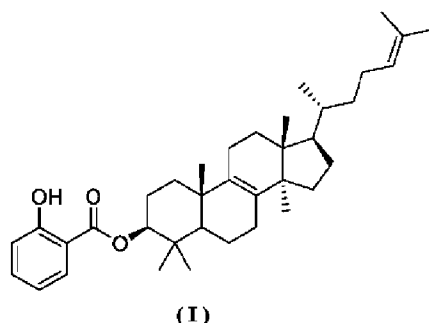
50 3) Ensayo de actividad de GSH-PX: después de 42 días de administración, la actividad de GSH-PX del cristalino en cada grupo muestra (véase Fig. 10) que después de la irradiación con UV, la actividad de GSH-PX en el cristalino de los ojos de conejo se había reducido significativamente y había una diferencia estadística en comparación con el grupo NC ($p < 0,01$ o $p < 0,05$). Las gotas oculares de profármaco de lanosterol 026 y las gotas oculares de fármaco de control positivo Kary Uni fueron capaces de aumentar la actividad GSH-PX del cristalino, y hubo una diferencia estadística en comparación con el grupo MC ($p < 0,01$), y el efecto de mejora de 026 fue mejor que el de Kary Uni ($p < 0,05$). El efecto de las gotas oculares de lanosterol sobre la actividad del cristalino GSH-PX fue significativamente menor que el de 026 y Kary Uni, y no hubo diferencias estadísticas en comparación con el grupo MC ($p > 0,05$).

5. Conclusión

60 Los resultados anteriores indican que las gotas oculares del profármaco de lanosterol 026 son capaces de aliviar los síntomas de cataratas de conejos de Nueva Zelanda inducidos por irradiación UV y mejorar la transparencia del cristalino y la actividad GSH-PX del cristalino.

REIVINDICACIONES

1. Una forma cristalina A del compuesto de fórmula (I), en donde el patrón de difracción de rayos X en polvo (XPRD) de la forma cristalina A comprende picos de difracción característicos en los siguientes ángulos de 2θ : $8,60 \pm 0,2^\circ$, $15,06 \pm 0,2^\circ$ y $17,22 \pm 0,2^\circ$;



2. La forma cristalina A como se define en la reivindicación 1, en donde el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina A comprende picos de difracción característicos en los siguientes ángulos de 2θ : $8,60 \pm 0,2^\circ$, $9,38 \pm 0,2^\circ$, $10,57 \pm 0,2^\circ$, $12,54 \pm 0,2^\circ$, $14,43 \pm 0,2^\circ$, $15,06 \pm 0,2^\circ$, $17,22 \pm 0,2^\circ$ y $25,18 \pm 0,2^\circ$.
3. La forma cristalina A como se define en la reivindicación 2, en donde el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina A comprende picos de difracción característicos en los siguientes ángulos de 2θ : $4,350^\circ$, $8,598^\circ$, $9,383^\circ$, $10,566^\circ$, $12,542^\circ$, $13,448^\circ$, $14,428^\circ$, $14,591^\circ$, $15,063^\circ$, $15,453^\circ$, $15,820^\circ$, $16,803^\circ$, $17,216^\circ$, $20,985^\circ$, $21,181^\circ$, $22,225^\circ$, $22,601^\circ$, $22,856^\circ$, $23,726^\circ$, $24,039^\circ$, $24,534^\circ$, $25,185^\circ$, $25,514^\circ$, $25,935^\circ$, $26,570^\circ$, $27,867^\circ$, $28,125^\circ$, $28,416^\circ$, $29,114^\circ$, $29,445^\circ$, $31,914^\circ$, $33,710^\circ$, $34,297^\circ$, $34,329^\circ$, $36,014^\circ$, $36,108^\circ$ y $38,196^\circ$.
4. La forma cristalina A como se define en la reivindicación 3, en donde el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina A es como se muestra en la Figura 1.
5. La forma cristalina A como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el patrón de calorimetría de barrido diferencial (DSC) de la forma cristalina A tiene un pico endotérmico con inicio a $151,75^\circ\text{C}$.
6. La forma cristalina A como se define en la reivindicación 5, en donde el patrón de DSC de la forma cristalina A es como se muestra en la Figura 2.
7. La forma cristalina A como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el patrón de análisis termogravimétrico (TGA) de la forma cristalina A tiene una pérdida de peso del $0,04540\%$ producida a $151,57 \pm 3^\circ\text{C}$.
8. La forma cristalina A como se define en la reivindicación 7, en donde el patrón de TGA de la forma cristalina A es como se muestra en la Figura 3.
9. La forma cristalina A como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en el tratamiento de una enfermedad oftálmica.

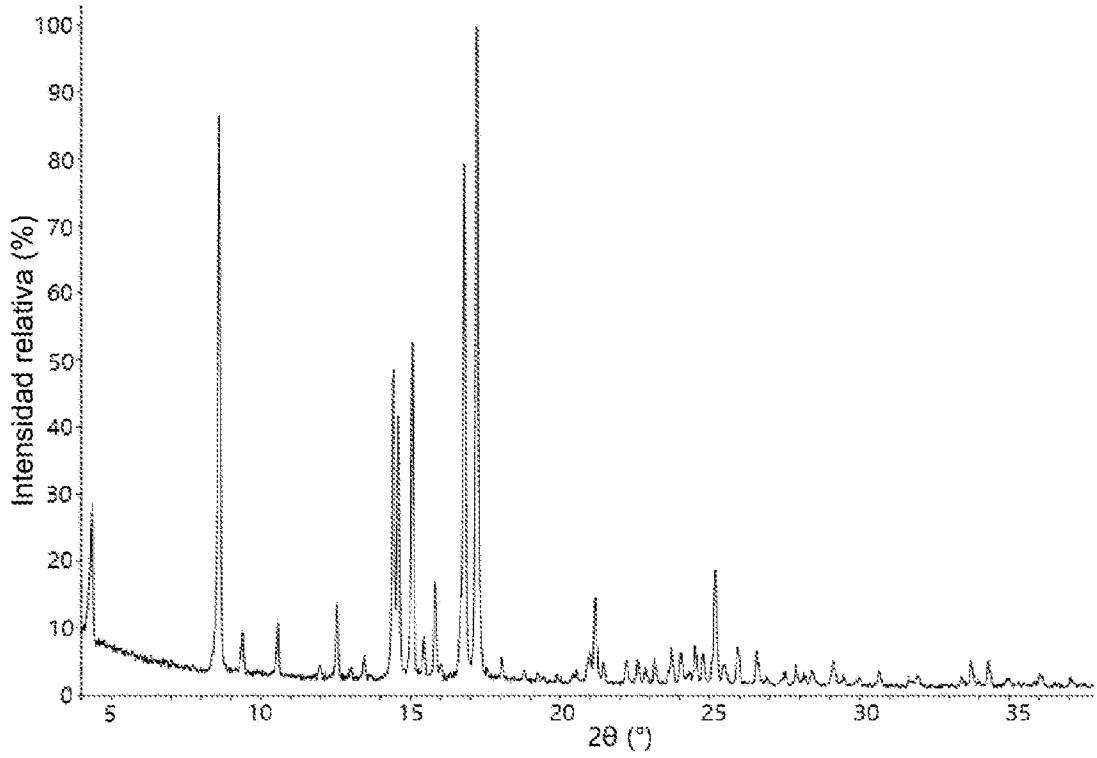


Figura 1

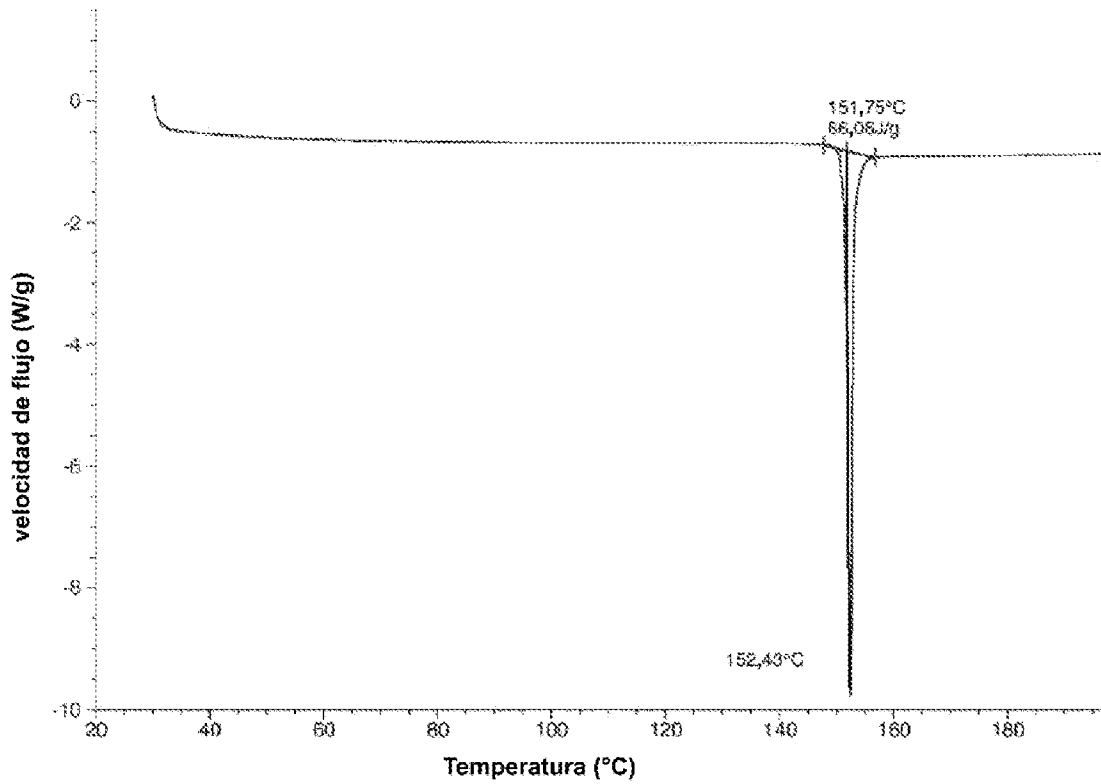


Figura 2

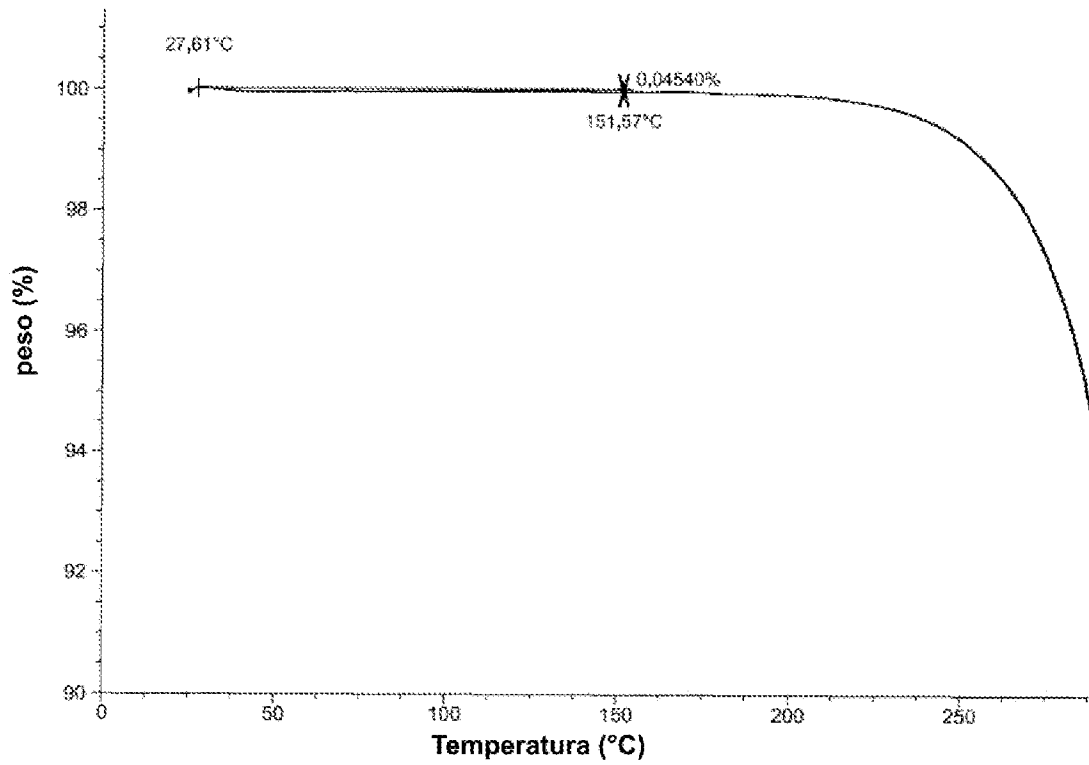


Figura 3

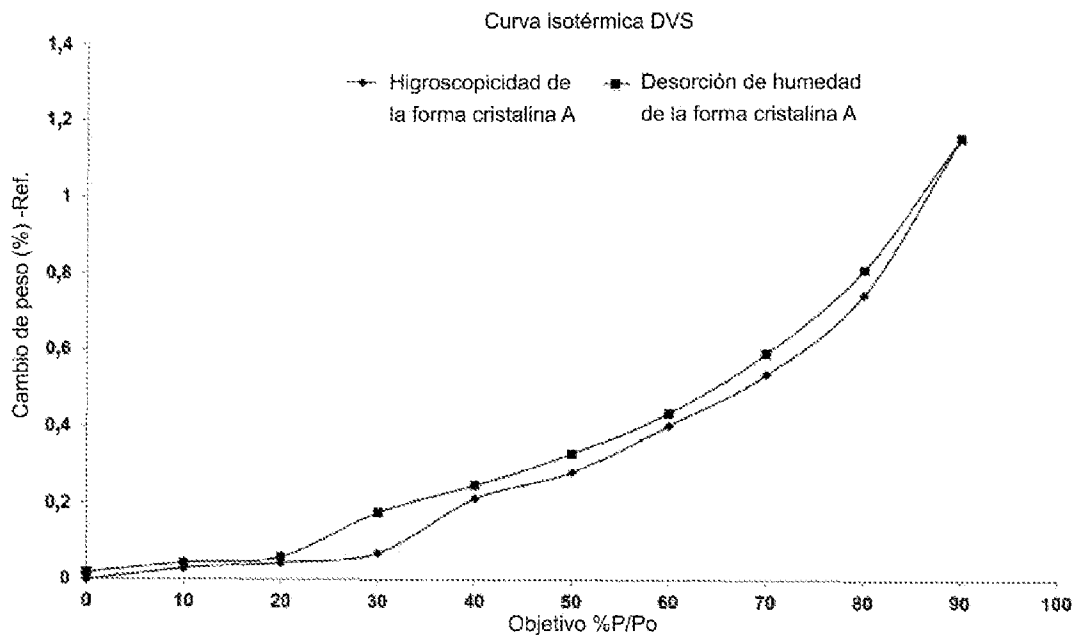


Figura 4

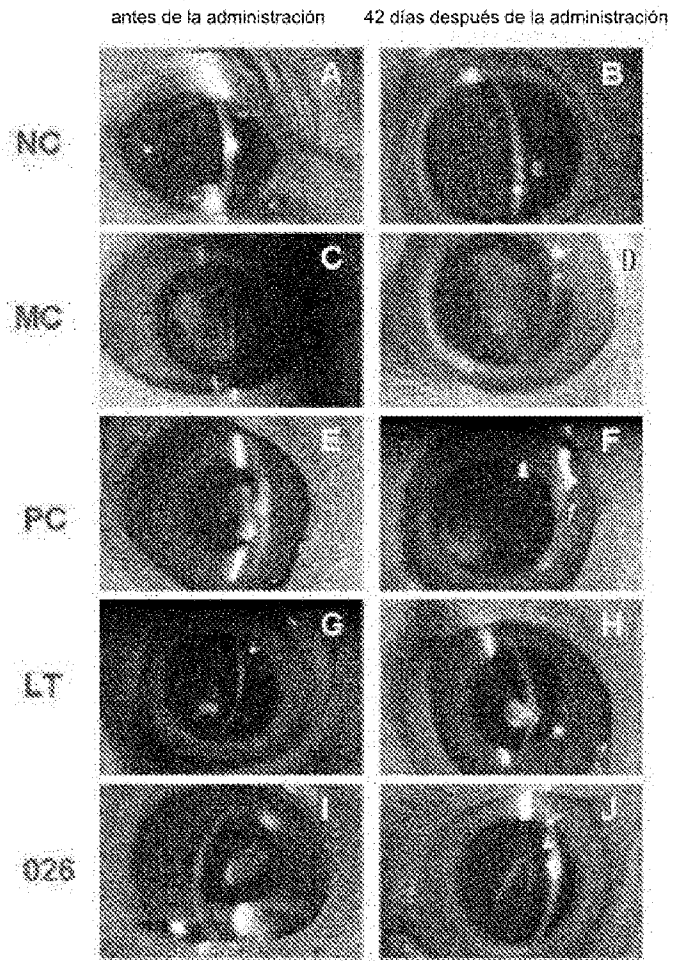


Figura 5

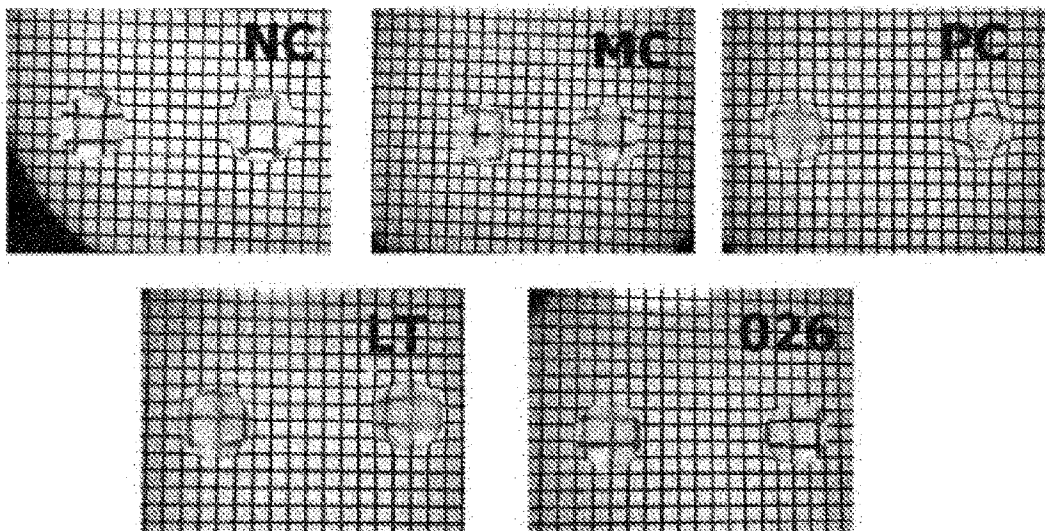


Figura 6

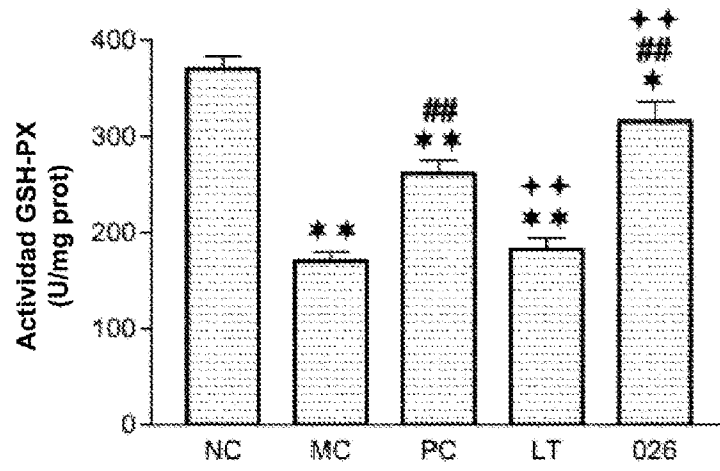


Figura 7

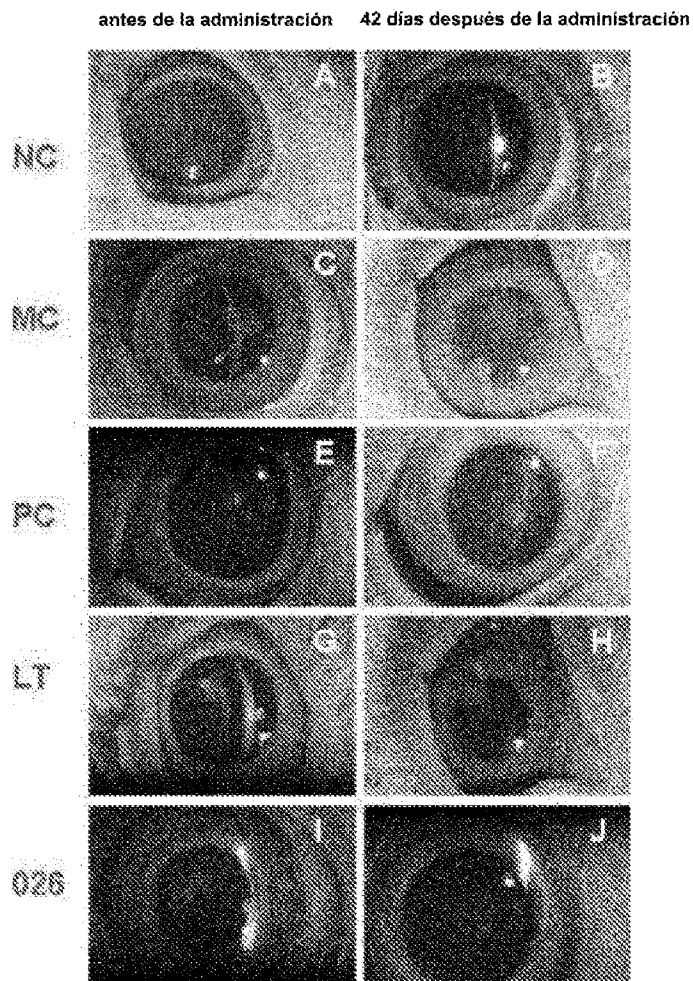


Figura 8

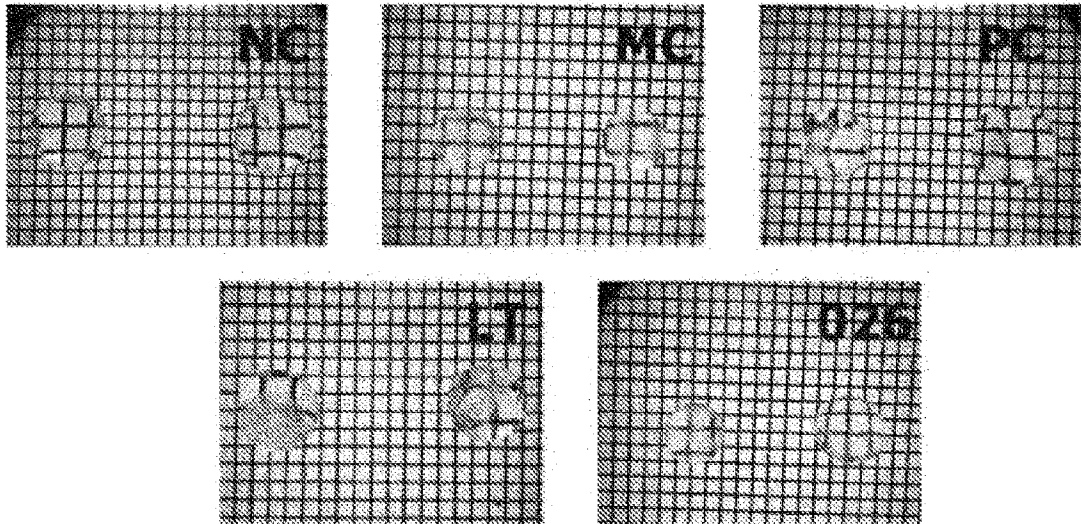


Figura 9

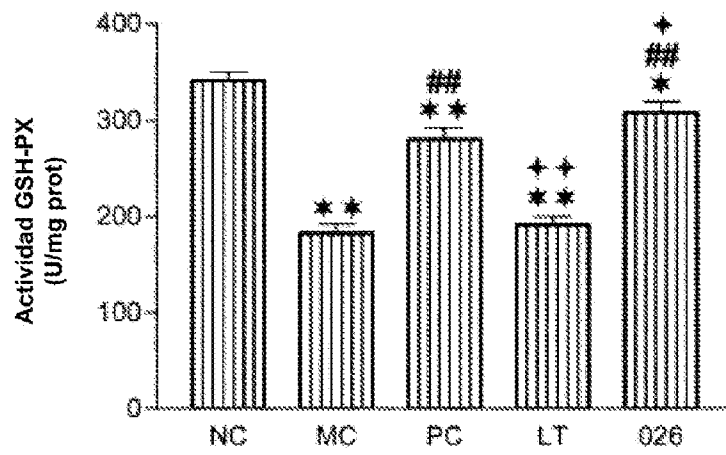


Figura 10