

FORMA CRISTALINA DE COMPUESTO PROFÁRMACO DE LANOSTEROL Y APLICACIÓN DE LA MISMA

La presente solicitud reivindica la prioridad de:

[0001] Documento CN201810826425.6, presentado el 25 de julio de 2018.

CAMPO TÉCNICO

[0002] La presente divulgación se refiere a una forma cristalina del compuesto de fórmula (I) y a una aplicación de la misma en la preparación de un fármaco para el tratamiento de una enfermedad oftálmica.

ANTECEDENTES

[0003] La catarata es una enfermedad del ojo que se produce en el cristalino en el globo ocular, y la turbidez del cristalino se denomina colectivamente catarata. El envejecimiento, la herencia, la anomalía metabólica, el traumatismo, la radiación, el envenenamiento y la desnutrición local pueden dañar la cápsula del cristalino dando como resultado un aumento de la permeabilidad y una pérdida de la función de barrera, o provocar trastornos metabólicos del cristalino dando como resultado 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 sobre la luz solar recibida por los ojos, afectará a la vista de los ojos. Cuando el grado de turbidez del globo ocular es ligero, el efecto sobre la visión es menos serio, pero a medida que se intensifica gradualmente el grado de turbidez, aumentará la agudeza visual, y los casos graves conducirán a ceguera. La catarata es una de las enfermedades oculares más comunes que conducen a ceguera y es el principal motivo de la ceguera. Dado que el mecanismo de formación de cataratas todavía no está claro, no se ha realizado ningún progreso en la farmacoterapia. Por tanto, actualmente el único tratamiento eficaz es el tratamiento quirúrgico.

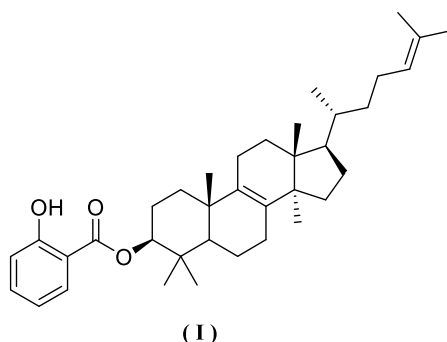
[0004] Aunque la mejora continua de cirugía de cataratas ha proporcionado una gran asistencia al tratamiento de catarata, la tasa de curación del tratamiento quirúrgico todavía está muy por debajo de la tasa de incidencia, y existe la posibilidad de complicaciones serias. Por otro lado, el coste del tratamiento quirúrgico de catarata es muy alto, e incluso en países desarrollados, la catarata impone una gran carga sobre el sistema de seguros sanitarios. Por tanto, la prevención y el tratamiento con fármacos desempeñan un papel decisivo. En la actualidad, los fármacos terapéuticos disponibles clínicamente para la catarata incluyen: 1. inhibidores de aldosa reductasa, tales como catalina (Catalin, Kary Uni, pirenoxina sódica), facolisina, bendazac L-lisina, etc.; 2. fármacos contra el daño oxidativo, tales como glutatión, taurina, aspirina, etc.; 3. fármacos para el metabolismo de nutrientes, tales como vitaminas, carotenoides, etc.; 4. compuesto de hierbas chinas incluyendo pastilla Shihu Yeguang, pastilla Qiju Dihuang, Shijueming San, etc. Se ha confirmado mediante ensayos clínicos a largo plazo que estos fármacos para el tratamiento de catarata sólo pueden retrasar el deterioro de la catarata, pero no pueden revertir el estado para tratar la catarata. Mientras tanto, a medida que China empieza a ser una sociedad envejecida, está aumentando el número de pacientes con catarata, y la demanda de fármacos para la catarata está volviéndose más urgente. Por tanto, clínicamente se necesitan nuevas variedades de fármacos para la catarata externos oftálmicos con seguridad, un buen efecto curativo, una fuerte penetración intraocular y estables por naturaleza.

[0005] El lanosterol es una molécula anfífila enriquecida en el cristalino. Se sintetiza a partir de lanosterol sintasa (LSS) a través de una reacción de ciclización clave de la ruta de síntesis de colesterol. El lanosterol puede reducir la agregación anómala de proteínas del cristalino y hacer que se dispongan de manera regular para restaurar la transparencia cristalina. Los estudios han mostrado que la lanosterol sintasa puede detectarse en el cristalino. Además, en el estudio de catarata en ratas de Shumiya, una combinación específica de mutaciones homocigóticas de lanosterol sintasa y farnesil-difosfato farnesiltransferasa 1 (FDFT1) puede mitigar los niveles de colesterol

en el cristalino y provocar catarata. Mientras tanto, estudios recientes de los presentes inventores han encontrado que el lanosterol puede reducir significativamente los agregados preformados de proteínas del cristalino *in vitro* y a nivel celular. También se ha confirmado que el lanosterol puede revertir el estado de catarata y contribuir a la clarificación y 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 catarata.

CONTENIDO DE LA INVENCION

[0006] La presente divulgación proporciona una forma cristalina A del compuesto de fórmula (I), en la que el espectro de difracción de rayos X de polvo (XPRD) de la forma cristalina A comprende picos de difracción característicos a los siguientes ángulos de 2θ : $8,60\pm0,2^\circ$, $15,06\pm0,2^\circ$ y $17,22\pm0,2^\circ$.



[0007] En algunas realizaciones de la presente divulgación, el espectro de difracción de rayos X de polvo de la forma cristalina A comprende picos de difracción característicos a los siguientes ángulos de 2θ : $8,60\pm0,2^\circ$, $9,38\pm0,2^\circ$, $10,57\pm0,2^\circ$, $12,54\pm0,2^\circ$, $14,43\pm0,2^\circ$, $15,06\pm0,2^\circ$, $17,22\pm0,2^\circ$ y $25,18\pm0,2^\circ$.

[0008] En algunas realizaciones de la presente divulgación, el espectro de difracción de rayos X de polvo de la forma cristalina A comprende picos de difracción característicos a 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°, 25,935°, 26,570°, 27,867°, 28,125°, 28,416°, 29,114°, 29,445°, 31,914°, 33,710°, 34,297°, 34,329°, 36,014°, 36,108° y 38,196°.

[0009] En algunas realizaciones de la presente divulgación, el espectro de difracción de rayos X de polvo de la forma cristalina A es tal como se muestra en la figura 1.

[0010] En algunas realizaciones de la presente divulgación, los datos analíticos del espectro de difracción de rayos X de polvo de la forma cristalina A es tal como se muestra en la tabla 1.

TABLA 1: DATOS ANALÍTICOS DEL ESPECTRO DE XRPD DE LA FORMA CRISTALINA A

N.º	Ángulo de 2θ (°)	Espaciado d (Å)	Intensidad relativa (%)	N.º	Ángulo de 2θ (°)	Espaciado d (Å)	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				

[0011] En algunas realizaciones de la presente divulgación, el espectro de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la forma cristalina A tiene un pico endotérmico con inicio a $151,75\pm 3^{\circ}\text{C}$.

[0012] En algunas realizaciones de la presente divulgación, el espectro de DSC de la forma cristalina A es tal como se muestra en la figura 2.

[0013] En algunas realizaciones de la presente divulgación, el espectro de análisis termogravimétrico (TGA) de la forma cristalina A tiene una pérdida de peso del 0,04540% que se produce a $151,57\pm 3^{\circ}\text{C}$.

[0014] En algunas realizaciones de la presente divulgación, el espectro de TGA de la forma cristalina A es tal como se muestra en la figura 3.

[0015] La presente divulgación también proporciona un uso de la forma cristalina A en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad oftálmica.

EFFECTO TÉCNICO

[0016] Como nuevo profármaco de lanosterol, el compuesto de la presente divulgación tiene una buena permeabilidad y se convierte eficazmente en lanosterol en el organismo, lo que mejora en gran medida la tasa de utilización del fármaco de lanosterol; la forma cristalina del mismo tiene una buena estabilidad.

DEFINICIÓN Y DESCRIPCIÓN

[0017] A menos que se indique lo contrario, se pretende que los siguientes términos y las siguientes expresiones usados en este documento tengan los siguientes significados. Un término o una expresión especificado no debe considerarse indefinido o poco claro en ausencia de una definición particular, sino que debe entenderse en el sentido habitual. Cuando aparece un nombre comercial en el presente documento, se pretende que haga referencia a su producto genérico

correspondiente o al principio activo del mismo.

[0018] Los compuestos intermedios de la presente divulgación pueden prepararse mediante diversos métodos de síntesis conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo las realizaciones descritas a continuación, las realizaciones formadas combinando las realizaciones descritas a continuación con otros métodos de síntesis química y las alternativas equivalentes bien conocidas por los expertos en la técnica. Las realizaciones preferidas incluyen, pero no se limitan a, las realizaciones de la presente divulgación.

[0019] Las reacciones químicas de las realizaciones de la presente divulgación se llevan a cabo en un disolvente adecuado, y el disolvente debe ser adecuado para el cambio químico y los reactivos y materiales necesarios para el mismo de la presente divulgación. Con el fin de obtener los compuestos de la presente divulgación, algunas veces es necesario para los expertos en la técnica modificar o seleccionar las etapas de síntesis o los esquemas de reacción basándose en las realizaciones existentes.

[0020] A continuación, se describirá específicamente la presente divulgación a modo de realizaciones, pero el alcance de la presente divulgación no se limita a las mismas.

[0021] Todos los disolventes usados en la presente divulgación están disponibles comercialmente y pueden usarse directamente sin purificación adicional.

[0022] Los disolventes usados en la presente divulgación están disponibles comercialmente. La presente divulgación emplea las siguientes abreviaturas: DCM representa diclorometano; DMF representa *N,N*-dimetilformamida; DMSO representa dimetilsulfóxido; EtOH representa etanol; MeOH representa metanol; TFA representa ácido trifluoroacético; TsOH representa ácido *p*-toluenosulfónico; p.f. representa punto de fusión; EtSO₃H representa ácido etanosulfónico; MeSO₃H representa ácido metanosulfónico; ATP representa trifosfato de adenosina; HEPES representa ácido 4-hidroxietilpiperazin-etanosulfónico; EGTA representa ácido etilenglicol-bis(2-aminoetil

éter)tetraacético; $MgCl_2$ representa dicloruro de magnesio; $MnCl_2$ representa dicloruro de manganeso; DTT representa ditioneitol; DCC representa diciclohexilcarbodiimida; DMAP representa 4-dimetilaminopiridina; profármaco de lanosterol 026 representa el compuesto de fórmula (I) de la presente divulgación.

[0023] DIFRACTÓMETRO DE RAYOS X DE POLVO, XRPD

[0024] Se someten de aproximadamente 10 a 20 mg de la muestra a detección mediante XRPD.

[0025] Los parámetros de XRPD detallados son los siguientes:

[0026] Tubo de rayos X: Cu, $K\alpha$, ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$)

[0027] Voltaje de tubo de rayos X: 40 kV, corriente de tubo de rayos X: 40 mA

[0028] Rendija de divergencia: 0,60 mm

[0029] Rendija del detector: 10,50 mm

[0030] Rendija antidispersión: 7,10 mm

[0031] Intervalo de barrido: 4-40°

[0032] Tamaño de paso: 0,02°

[0033] Tiempo de paso: 0,12 segundos

[0034] Velocidad de rotación de la bandeja de muestra: 15 rpm

[0035] Sorción dinámica de vapor (DVS)

[0036] Método de detección: se colocaron muestras (de 10 mg a 20 mg) en una bandeja de muestras de DVS para las pruebas.

[0037] Temperatura: 25°C

[0038] Equilibrio: dm/dt : 0,01%/min: (más corto: 10 min, más largo: 180 min)

[0039] Secado: HR del 0%, 120 min

[0040] Gradiente de HR (%) para las pruebas: el 10%

[0041] Intervalo de gradiente de HR (%) para las pruebas: del 0% al 90% al 0%

[0042] Se evaluó la higroscopicidad usando las siguientes escalas:

Escalas para la higroscopicidad	Aumento de peso higroscópico*
Delicuescencia	Absorbe suficiente agua para formar un líquido
Alta higroscopicidad	Aumento de peso higroscópico $\geq 15\%$
Higroscopicidad media	$15\% > \text{Aumento de peso higroscópico} \geq 2\%$
Ligera higroscopicidad	$2\% > \text{Aumento de peso higroscópico} \geq 0,2\%$
Higroscopicidad nula o casi nula	Aumento de peso higroscópico $< 0,2\%$

*Aumento de peso higroscópico a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y HR del $80 \pm 2\%$

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0043] La figura 1 es el espectro de XRPD de la forma cristalina A irradiada mediante Cu-K α .

[0044] La figura 2 es el espectro de DSC de la forma cristalina A.

[0045] La figura 3 es el espectro de TGA de la forma cristalina A.

[0046] La figura 4 es la isoterma de DVS de la forma cristalina A.

[0047] La figura 5 es el efecto de colirio de lanosterol y su profármaco 026 (el compuesto de fórmula (I)) sobre un modelo de catarata inducida por selenito de sodio en conejos de Nueva Zelanda neonatales observado mediante una lámpara de hendidura. NC: grupo de control normal; MC: grupo de control del modelo; PC: grupo de control positivo; LT: grupo de tratamiento con colirio de lanosterol; 026: grupo de tratamiento con colirio de profármaco de lanosterol 026.

[0048] La figura 6 es la comparación de la transparencia del cristalino de un modelo de catarata inducida por selenito de sodio en conejos de Nueva Zelanda neonatales en cada grupo *in vitro* después de 42 días de administración. NC: grupo de control normal; MC: grupo de control del modelo; PC: grupo de control positivo; LT: grupo de tratamiento con colirio de lanosterol; 026: grupo de tratamiento con colirio de profármaco de lanosterol 026. La cuadrícula es de $2,12 \times 2,12$ mm.

[0049] La figura 7 es la comparación de la actividad de glutatión peroxidasa (GSH-

PX) en el cristalino de un modelo de catarata inducida por selenito de sodio en conejos de Nueva Zelanda neonatales después de 42 días de administración. NC: grupo de control normal; MC: grupo de control del modelo; PC: grupo de control positivo; LT: grupo de tratamiento con colirio de lanosterol; 026: grupo de tratamiento con colirio de profármaco de lanosterol 026. V.S NC: ** significa $p < 0,01$, * significa $p < 0,05$; V.S MC: ## significa $p < 0,01$, # significa $p < 0,05$; V.S PC: ++ significa $p < 0,01$, + significa $p < 0,05$.

[0050] La figura 8 es el efecto de colirio de lanosterol y su profármaco 026 sobre un modelo de catarata inducida por luz ultravioleta en conejos de Nueva Zelanda observado mediante una lámpara de hendidura. NC: grupo de control normal; MC: grupo de control del modelo; PC: grupo de control positivo; LT: grupo de tratamiento con colirio de lanosterol; 026: grupo de tratamiento con colirio de profármaco de lanosterol 026.

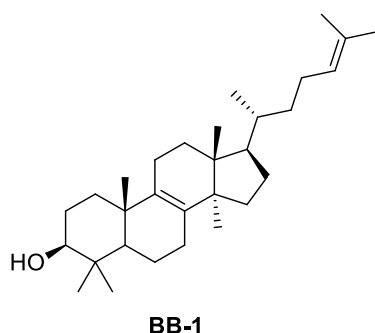
[0051] La figura 9 es la comparación de la transparencia del cristalino de catarata inducida por luz ultravioleta en conejos de Nueva Zelanda en cada grupo *in vitro* después de 42 días de administración. NC: grupo de control normal; MC: grupo de control del modelo; PC: grupo de control positivo; LT: grupo de tratamiento con colirio de lanosterol; 026: grupo de tratamiento con colirio de profármaco de lanosterol 026. La cuadrícula es de 2,12×2,12 mm.

[0052] La figura 10 es la comparación de actividad de glutatión peroxidasa (GSH-PX) en el cristalino de catarata inducida por luz ultravioleta en conejos de Nueva Zelanda neonatales en cada grupo después de 42 días de administración. NC: grupo de control normal; MC: grupo de control del modelo; PC: grupo de control positivo; LT: grupo de tratamiento con colirio de lanosterol; 026: grupo de tratamiento con colirio de profármaco de lanosterol 026. V.S NC: ** significa $p < 0,01$, * significa $p < 0,05$; V.S MC: ## significa $p < 0,01$, # significa $p < 0,05$; V.S PC: ++ significa $p < 0,01$, + significa $p < 0,05$.

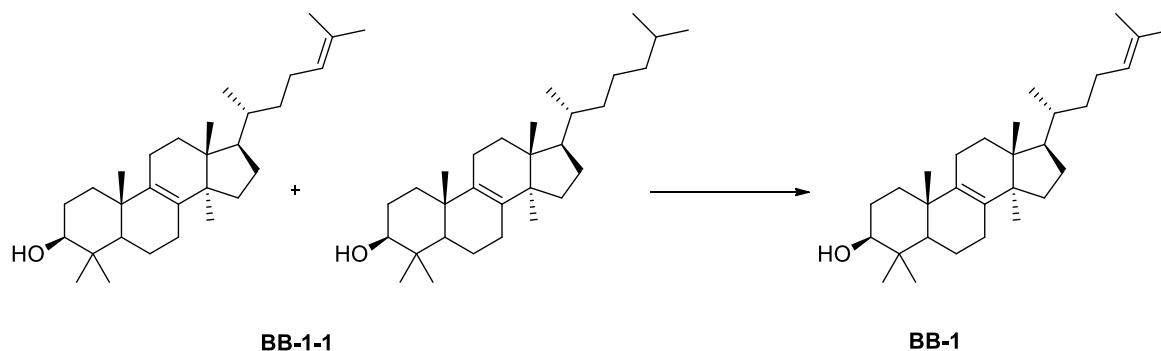
DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA REALIZACIÓN

[0053] Para una mejor comprensión del contenido de la presente divulgación, la presente divulgación se describe con detalle mediante las realizaciones, que no representan ninguna limitación de la presente divulgación.

Ejemplo de referencia 1: fragmento BB-1



[0054] Ruta de síntesis:

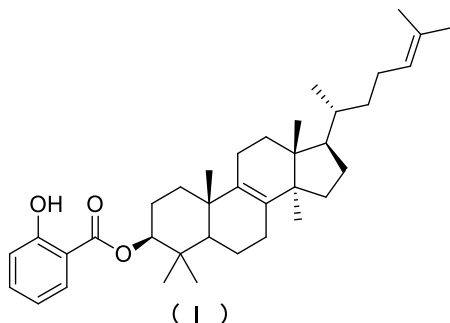


[0055] Etapa 1: síntesis del compuesto **BB-1**.

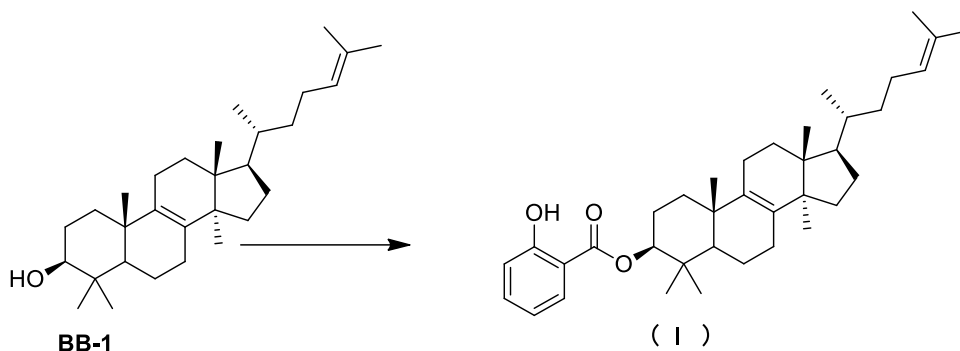
[0056] Se sometió la mezcla **BB-1-1** a cromatografía con fluidos supercríticos (condiciones de separación: columna: Chiralpak AD-3 150 × 4,6 mm de I.D., 3 µm; fase móvil: A: CO₂, B: etanol (el 0,05% de dietanolamina); gradiente: desde el 5% hasta el 40% de B en 5 minutos, el 40% de B mantenido durante 2,5 minutos, luego el 5% de B 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 (CDCl₃, 400 MHz): δ = 5,06-5,15 (m, 1H), 5,10 (t a, 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)



[0057] Ruta de síntesis:



[0058] Etapa 1: síntesis del compuesto de fórmula (I).

[0059] Se disolvieron 35,2 g de compuesto **BB-1** en 550 ml de diclorometano anhidro, se añadieron 22,8 g de ácido salicílico, luego 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 hasta 35°C y se dejó que la reacción progresara durante 96 horas. La CCF mostró que permaneció una pequeña cantidad de materiales de partida, y se detuvo la reacción. Se filtró la mezcla de reacción, se lavó el residuo de la filtración con 150 ml de diclorometano y se combinó el filtrado y se concentró hasta sequedad para dar un residuo en bruto. Se añadieron 500 ml de metanol al residuo en bruto y se sometió a reflujo durante 16 horas para dar una suspensión blanca, se redujo la temperatura hasta 15°C y se filtró la mezcla para dar un sólido blanco, que se confirmó como la forma cristalina A del compuesto de fórmula (I) después de pruebas mediante XRPD.

[0060] ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) $\square$ 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 (s a, 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 de la higroscopicidad de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (I)

[0061] Materiales experimentales:

[0062] Sistema de sorción dinámica de vapor SMS DVS Advantage

[0063] Método experimental:

[0064] Se colocaron de 10 a 15 mg de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (I) en la bandeja de muestras de DVS para las pruebas.

[0065] Resultados experimentales:

[0066] El espectro de DVS de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (I) se muestra en la figura 4, $\square W=0,747\%$.

[0067] Conclusión experimental:

[0068] El aumento de peso higroscópico de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (I) a 25°C y HR del 80% es del 0,747%, que es ligeramente higroscópico.

Ejemplo 3: experimento de estabilidad previa de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (I)

[0069] Se colocó la forma cristalina A del compuesto de fórmula (I) en las siguientes 3 condiciones y se sometió a prueba para determinar el aspecto, XRPD, contenido y sustancias relacionadas en diferentes puntos de tiempo. Las condiciones de investigación y los elementos de prueba se muestran en la tabla 2.

TABLA 2: CONDICIONES DE INVESTIGACIÓN Y ELEMENTOS DE PRUEBA

Elemento de prueba	Condición	Día 0	Día 5	Día 10
Factores influyentes	Alta temperatura (60°C, abierta)	X*	X	X
	Alta humedad (humedad relativa del 92,5%, abierta)		X	X
	Luz (iluminancia total = $1,2 \times 10^6$ Lux•h/ ultravioleta cercano = 200 w•h/m ² , abierta)		X (1 ICH)	

Nota:

*El elemento de prueba X incluye: aspecto, XRPD, contenido y sustancias relacionadas. El experimento se continuó durante 10 días;

ICH indica las pautas de estabilidad de las pruebas de estabilidad a la luz.

[0070] Etapas experimentales:

[0071] Se pesaron con precisión 10 mg de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (I) y se colocaron en un frasco de muestra, y luego se extendieron para formar una capa fina. Se colocaron las muestras a 60°C, HR del 92,5%, la boca del frasco se envolvió directamente con papel de aluminio al que se le hicieron agujeros para conseguir algunos pequeños orificios para garantizar que la muestra puede estar completamente en contacto con el aire ambiental. Se colocaron las muestras respectivamente en una caja seca y un recipiente de vidrio que contenía disolución saturada de nitrato de potasio. Se colocaron la muestra iluminada (abierta, sin cubrir con papel de aluminio) y la muestra de control iluminada (abierta, el frasco de muestra se cubrió completamente con papel de aluminio) en la caja de luz. Se pesaron 2 partes de la muestra en cada punto de tiempo como la muestra de prueba formal. Además, se pesaron aproximadamente 5 mg de la forma cristalina A del compuesto de fórmula (I) para las pruebas mediante XRPD; se envolvió el frasco de muestra con papel de aluminio al que se le hicieron agujeros para conseguir algunos pequeños agujeros; las muestras también se colocaron en la caja de secado correspondiente y el

recipiente de vidrio que contenía la disolución saturada de nitrato de potasio.

[0072] Método de análisis del contenido:

[0073] Modelo de columna: Ultimate XB-C18 3,0*50 mm, 3 µm; fase móvil: 0,5 ml de TFA en 1 l de agua (disolvente A) y 0,4 ml de TFA en 1 l de acetonitrilo (disolvente B), elución: un gradiente de elución del 95% al 100% (disolvente B) durante más de 2 minutos y luego el 100% durante 13 minutos. La velocidad de flujo fue de 1,5 ml/min; temperatura de la columna: 30°C.

[0074] Resultados y conclusiones experimentales: la forma cristalina no ha cambiado después del experimente y su estabilidad es buena.

PRUEBA DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

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

[0075] En este estudio, se usaron conejos blancos de Nueva Zelanda (el peso corporal fue de más de 2 kg, de más de 12 semanas de edad) como animales de experimentación. Se estudio cada compuesto en dos conejos blancos de Nueva Zelanda. Se instiló cada conejo con 50 µl de colirio en cada ojo, se usaron tres ojos para recoger muestras de humor acuoso y se usó un ojo como reserva. La fórmula del colirio fue el 1,2% de hidroxipropilmetilcelulosa (tamaño E5), el 20,5% de poloxámero (tamaño P407), el 1,6% de poloxámero (tamaño P188), la concentración del compuesto fue de 5 mM y el colirio eran suspensiones homogéneas. Después de que se hiciera gotear el colirio 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 de mayor de 50 µl. Se proporcionó una leve anestesia a cada animal antes de recoger las muestras. Se recogieron tres muestras en cada punto de tiempo. Se almacenaron las muestras de humor acuoso recogidas en hielo seco inmediatamente

después de la recogida o se almacenaron en una nevera a $-80 \pm 10^{\circ}\text{C}$. Después de la recogida de muestras, se sacrificaron los animales. Se determinó la concentración del compuesto en cada muestra usando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (API 4000). Las tablas 3 y 4 muestran las condiciones de determinación de DMPK *in vivo*; las tablas 5 y 6 muestran la concentración de fármaco en el humor acuoso después de que se hiciera gotear el compuesto lanosterol (fármaco original) y el compuesto de profármaco en los ojos (250 nM por ojo).

[0076] Resultados y conclusiones experimentales: tanto el propio lanosterol como su compuesto de profármaco de la presente divulgación pueden penetrar en el humor acuoso desde la córnea o a través de otras vías; y el compuesto de profármaco puede convertirse en el fármaco original lanosterol durante el proceso de infiltración y muestra una concentración y exposición mayores de lanosterol en el humor acuoso.

TABLA 3: MÉTODOS DE DETERMINACIÓN Y ANÁLISIS MEDIANTE DMPK *IN VIVO*

Nombre de compuesto	El compuesto de fórmula (I) y lanosterol		
Método de cromatografía de líquidos			
Fase móvil A	Una disolución de agua y acetonitrilo (la razón en volumen es de 95:5) que contiene el 0,025% de ácido fórmico, 1 mmol de sal de tampón de acetato de amonio		
Fase móvil B	Una disolución de acetonitrilo y agua (razón en volumen de 95:5) que contiene el 0,025% de ácido fórmico, 1 mmol de sal de tampón de acetato de amonio		
Columna cromatográfica	ACQUITY UPLC® protein BEH 300A C4 1,7 µm 2,1 × 50 mm		
Gradiente	Velocidad de flujo (µl/min)	A (%)	B (%)
	de 500 a 600	de 2 a 80	de 98 a 20
Método de espectrometría de masas			
Fuente de ionización	APCI o ESI		
Modo de barrido	Monitorización por ionización multipolar		
Polaridad	Iones positivos		

Nombre de compuesto	Par iónico	Tiempo de retención (min)	Potencial de disgregación (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: GRADIENTE DEL MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS PARA LAS PRUEBAS DE DMPK DE LANOSTEROL Y EL COMPUESTO DE FÓRMULA (I) *IN VIVO*

Velocidad de flujo	Gradiente		
500 µl/min	Tiempo (minuto)	A (%)	B (%)
	inicio	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 HICIERAN GOTEAR 250 NMOL DE LANOSTEROL EN CADA OJO DE UN CONEJO BLANCO DE NUEVA ZELANDA

Nombre de compuesto de colirio	Lanosterol (fármaco original)
Nombre de compuesto de prueba	Lanosterol (fármaco original)
Tiempo (hora)	Concentración promedio (nM)
0,5	106*
2	496
4	300
6	225
AUC (nM.h)	1779

* BQL: por debajo del límite de cuantificación, AUC: cantidad de exposición.

TABLA 6: CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE LA MUESTRA EN EL HUMOR ACUOSO (nM) DESPUÉS DE QUE SE HICIERAN GOTEAR 250 NMOL DEL COMPUESTO DE FÓRMULA (I) EN CADA OJO DE UN CONEJO BLANCO DE NUEVA ZELANDA

Nombre de compuesto de colirio	El compuesto de fórmula (I) (profármaco)	
Nombre de compuesto de prueba	El compuesto de fórmula (I)	Lanosterol
Tiempo (hora)	Concentración promedio (nM)	Concentración promedio (nM)
0,5	41,0	471
2	33,3	478
4	25,5	403
6	BQL	586
AUC (nM.h)	124	2700

* BQL: por debajo del límite de cuantificación, AUC: cantidad de exposición.

Ejemplo experimental 2: estudio farmacodinámico de colirio de lanosterol y su profármaco sobre un modelo de catarata inducida por selenito de sodio en conejo de Nueva Zelanda neonatal

[0077] 1. Animal de experimentación

[0078] Se amamantaron conejos de Nueva Zelanda neonatales de P7 días de edad, grado normal, y 5 conejos jóvenes por camada con una conejo madre.

[0079] 2. Agrupamiento y procesamiento

[0080] Se dividieron aleatoriamente los conejos jóvenes de experimentación en 5 grupos con 5 conejos por grupo.

[0081] 1) Grupo de control normal (NC): en el día P10, se inyectaron los conejos jóvenes por vía subcutánea con 0,25 ml de solución salina fisiológica desde el cuello, y no se administraron después del día P15.

[0082] 2) Grupo de control del modelo (MC): en el día P10, se inyectaron los conejos jóvenes por vía subcutánea con disolución 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 hizo gotear colirio de blanco sin fármaco en el ojo derecho 3 veces al día durante 42 días.

[0083] 3) Grupo de control positivo (PC): en el día P10, se inyectaron los conejos jóvenes por vía subcutánea con disolución 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 hizo gotear colirio Kary Uni (Santen Pharmaceutical Co., Ltd en Japón) en el ojo derecho 3 veces al día durante 42 días.

[0084] 4) Grupo de tratamiento con colirio de lanosterol (LT): en el día P10, se inyectaron los conejos jóvenes por vía subcutánea con disolución 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 hizo gotear colirio de lanosterol en el ojo derecho 3 veces al día durante 42 días.

[0085] 5) Grupo de tratamiento con colirio de profármaco de lanosterol 026 (026, el compuesto de fórmula (I)): en el día P10, se inyectaron los conejos jóvenes por vía subcutánea con disolución 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 hizo gotear colirio de profármaco de lanosterol 026 en el ojo derecho 3 veces al día durante 42 días.

[0086] 3. Prueba experimental

[0087] 1) Fotografía mediante lámpara de hendidura: se observaron conejos de Nueva Zelanda neonatales inducido 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.

[0088] 2) Pruebas de transparencia del cristalino *in vitro*: en el último día, se diseccionó el globo ocular del animal, se separó por completo el cristalino que contenía la cápsula y se colocó el cristalino en un papel cuadriculado (2,12 × 2,12 mm). Las fotografías muestran la nitidez de la cuadrícula fotografiada a través del cristalino.

[0089] 3) Ensayo de actividad de glutatión peroxidasa (GSH-PX): se determinó la actividad de GSH-PX del cristalino aislado del conejo en cada grupo mediante el método proporcionado en la memoria descriptiva del kit de detección de actividad de GSH-PX (Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute). Se analizaron los datos experimentales mediante ANOVA unilateral con el software estadístico SPSS. Se usó el método LSD para comparar los grupos, y el nivel de diferencia estadística fue $p < 0,05$.

[0090] 4. Resultados experimentales

[0091] 1) Observación mediante lámpara de hendidura: la figura 5 muestra que el selenito de sodio pudo inducir catarata en el cristalino de conejos de Nueva Zelanda neonatales. La observación mediante lámpara de hendidura muestra que los síntomas de catarata se redujeron significativamente después de que se administrara colirio de profármaco de lanosterol 026 durante 42 días (figura 5-I) en comparación con los síntomas antes de la administración (figura 5-J). Los síntomas de catarata no mostraron ningún cambio evidente antes y después de la administración de colirio Kary Uni (figura 5-E, 5-F) y colirio de lanosterol (figura 5-G, 5-H).

[0092] 2) Prueba de transparencia del cristalino *in vitro*: la figura 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 (ojo izquierdo no administrado como autocontrol) y en el lado derecho está el cristalino del ojo

derecho (el ojo derecho se administró según el agrupamiento). Después de 42 días de administración de colirio de 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 fue todavía menor que la del grupo NC. No hubo ningún cambio significativo en la transparencia del cristalino después de la administración al ojo derecho en el grupo LT.

[0093] 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 la figura 7) que después de la inyección subcutánea de selenito de sodio, la actividad de GSH-PX en el cristalino de los ojos de los conejos se redujo significativamente, y hubo una diferencia estadística ($p < 0,01$) en comparación con el grupo NC. El colirio de profármaco de lanosterol 026 y el colirio de fármaco de control positivo Kary Uni pudieron aumentar la actividad de 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 del colirio de lanosterol sobre la actividad de GSH-PX del cristalino fue significativamente menor que el de 026 y Kary Uni, y no hubo ninguna diferencia estadística en comparación con el grupo MC ($p > 0,05$).

[0094] 5. Conclusión

[0095] Los resultados anteriores indican que el colirio de profármaco de lanosterol 026 puede mitigar los síntomas de catarata de conejos de Nueva Zelanda neonatal inducidos por selenito de sodio y mejorar la transparencia del cristalino y la actividad de GSH-PX del cristalino.

Ejemplo experimental 3: estudio farmacodinámico de colirio de lanosterol y su profármaco en un modelo de catarata inducida por luz ultravioleta en conejos de Nueva Zelanda neonatales

[0096] 1. Animal de experimentación

[0097] Conejos de Nueva Zelanda adultos de 2,0-2,5 kg, grado normal, hembras y machos, un total de 25.

[0098] Agrupamiento y procesamiento

[0099] Se dividieron aleatoriamente los conejos de experimentación en 5 grupos con 5 conejos por grupo.

[0100] 1) Grupo de control normal (NC): alimentación normal, sin administración de fármaco.

[0101] 2) Grupo de control del modelo (MC): irradiación con luz UV a 313 nm durante 24 horas para realizar el modelo, luego se hizo gotear colirio de blanco sin fármaco en el ojo derecho 3 veces al día durante 42 días.

[0102] 3) Grupo de control positivo (PC): irradiación con luz UV a 313 nm durante 24 horas para realizar el modelo, luego se hizo gotear colirio Kary Uni (Santen Pharmaceutical Co., Ltd en Japón) en el ojo derecho 3 veces al día durante 42 días.

[0103] 4) Grupo de tratamiento con colirio de lanosterol (LT): irradiación con luz UV a 313 nm durante 24 horas para realizar el modelo, luego se hizo gotear colirio de lanosterol en el ojo derecho 3 veces al día durante 42 días.

[0104] 5) Grupo de tratamiento con colirio de profármaco de lanosterol 026 (026): irradiación con luz UV a 313 nm durante 24 horas para realizar el modelo, luego se hizo gotear el colirio de profármaco de lanosterol 026 en el ojo derecho 3 veces al día durante 42 días.

[0105] 3. Prueba experimental

[0106] 1) Fotografía mediante lámpara de hendidura: se observaron los animales 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.

[0107] 2) Prueba de transparencia del cristalino *in vitro*: en el último día, se diseccionó el globo ocular del animal, se separó por completo el cristalino que contenía la cápsula y se colocó el cristalino en un papel cuadriculado (2,12 × 2,12 mm). Las fotografías muestran la nitidez de la cuadrícula fotografiada a través del cristalino.

[0108] 3) Ensayo de actividad de glutatión peroxidasa (GSH-PX): se determinó la actividad de GSH-PX del cristalino aislado del conejo en cada grupo mediante el método proporcionado en la memoria descriptiva del kit de detección de actividad de GSH-PX (Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute). Se analizaron los datos experimentales mediante ANOVA unilateral con el software estadístico SPSS. Se usó método el LSD para comparar los grupos, y el nivel de diferencia estadística fue $p < 0,05$.

[0109] 4. Resultados experimentales

[0110] 1) Observación mediante lámpara de hendidura: la figura 8 muestra que la luz ultravioleta indujo catarata en el cristalino de conejos de Nueva Zelanda. La observación mediante lámpara de hendidura muestra que los síntomas de catarata se redujeron significativamente después de que se administrara colirio de profármaco de lanosterol 026 durante 42 días (figura 8-I) en comparación con los síntomas antes de la administración (figura 8-J). Los síntomas de catarata no mostraron ningún cambio evidente antes y después de la administración de colirio Kary Uni (figura 8-E, 8-F) y colirio de lanosterol (figura 8-G, 8-H).

[0111] 2) Prueba de transparencia del cristalino *in vitro*: la figura 9 muestra la transparencia del cristalino de conejos de Nueva Zelanda con catarata inducida por

luz ultravioleta en cada grupo después de 42 días de administración. En el lado izquierdo de cada fotografía está el cristalino del ojo izquierdo (ojo izquierdo no administrado como autocontrol) y en el lado derecho está el cristalino del ojo derecho (el ojo derecho se administró según el agrupamiento). Después de 42 días de administración de colirio de 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 todavía fue menor que la del grupo NC. No hubo ningún cambio significativo en la transparencia del cristalino después de la administración de fármaco al ojo derecho en el grupo LT.

[0112] 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 la figura 10) que después de la irradiación con luz UV, la actividad de GSH-PX en el cristalino de los ojos de los conejos se redujo significativamente, y hubo una diferencia estadística en comparación con el grupo NC ($p < 0,01$ o $p < 0,05$). El colirio de profármaco de lanosterol 026 y el colirio Kary Uni de fármaco de control positivo pudieron aumentar la actividad de 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 es mejor que el de Kary Uni ($p < 0,05$). El efecto del colirio de lanosterol sobre la actividad de GSH-PX del cristalino fue significativamente menor que el de 026 y Kary Uni, y no hubo ninguna diferencia estadística en comparación con el grupo MC ($p > 0,05$).

[0113] 5. Conclusión

[0114] Los resultados anteriores indican que el colirio de profármaco de lanosterol 026 puede mitigar los síntomas de catarata de conejos de Nueva Zelanda inducidos por irradiación con luz UV y mejorar la transparencia del cristalino y la actividad de GSH-PX del cristalino.