

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 382**

51 Int. Cl.:

C07D 417/10	(2006.01) A61K 31/427	(2006.01)
A61P 3/06	(2006.01) A61P 1/04	(2006.01)
A61P 3/10	(2006.01) A61P 9/10	(2006.01)
A61P 9/00	(2006.01) A61P 9/12	(2006.01)
A61P 11/00	(2006.01) A61P 13/02	(2006.01)
A61P 13/04	(2006.01) A61P 19/06	(2006.01)
A61P 13/12	(2006.01)	
A61P 35/00	(2006.01)	
A61P 37/06	(2006.01)	
A61P 43/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2015 PCT/JP2015/071512**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2016 WO16017696**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2015 E 15827012 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 3176165**

54 Título: **Cristal de derivado de azol benceno como inhibidor de xantina oxidasa**

30 Prioridad:

30.07.2014 JP 2014155031

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

11.12.2018

73 Titular/es:

**TEIJIN PHARMA LIMITED (100.0%)
2-1, Kasumigaseki 3-chome Chiyoda-ku
Tokyo 100-0013, JP**

72 Inventor/es:

**KAWANA, ASAHI y
MIYAZAWA, YUKI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 693 382 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 de derivado de azol benceno como inhibidor de xantina oxidasa

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un cristal de un nuevo derivado de azol benceno útil como un agente terapéutico o un agente profiláctico para enfermedades asociadas con la xantina oxidasa tal como gota, hiperuricemia, síndrome de lisis tumoral, cálculos urinarios, hipertensión, dislipidemia, diabetes, enfermedades cardiovasculares tales como arteriosclerosis o fallo cardíaco, enfermedades renales tales como nefropatía diabética, enfermedades respiratorias tales como enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, enfermedades intestinales inflamatorias o enfermedades autoinmunes.

10 Antecedentes de la técnica

La xantina oxidasa es una enzima que cataliza la conversión de hipoxantina a xantina y seguidamente a ácido úrico en el metabolismo de los ácidos nucleicos.

15 Un inhibidor de la xantina oxidasa inhibe la síntesis del ácido úrico para reducir un nivel de ácido úrico en la sangre con respecto a la acción de la xantina oxidasa. Es decir, un inhibidor de la xantina oxidasa es efectivo como un agente terapéutico para la hiperuricemia y diversas enfermedades provocadas por la hiperuricemia. Por otro lado, hay artritis gotosa y tofos gotosos denominados gota como una condición clínica provocada por un resultado de deposición de cristales de urato después de hiperuricemia prolongada. Además, la hiperuricemia se considera que es importante como un factor de las enfermedades por el estilo de vida asociadas con obesidad, hipertensión, dislipidemia y diabetes o síndromes metabólicos, y recientemente, se ha aclarado que la hiperuricemia es un factor de riesgo de daño renal, 20 cálculos urinarios y enfermedades cardiovasculares mediante encuestas epidemiológicas (The Guideline Revising Committee of Japanese Society of Gout and Nucleic Acid Metabolism, ed., Guideline for the management of hyperuricemia and gout, segunda edición, Medical Review (2010)). Además, se espera que un inhibidor de xantina oxidasa sea útil para el tratamiento de enfermedades asociadas con las especies de oxígeno activo mediante la actividad inhibidora frente a la generación de especies de oxígeno activo, por ejemplo, para el tratamiento de 25 enfermedades cardiovasculares a través de acción que mejora la función vascular (Circulation. 2006; 114: 2508-2516).

El alopurinol y el febuxostat se usan clínicamente como un agente terapéutico para la hiperuricemia, pero se ha presentado que el alopurinol tiene un efecto secundario tal como síndrome de Stevens-Johnson, necrosis epidérmica tóxica, trastorno hepático y disfunción renal (Nippon Rinsho, 2003; 61, Supl. 1: 197-201).

30 Como un compuesto que tiene una actividad inhibidora de xantina oxidasa, por ejemplo, se presenta un derivado de 2-feniltiazol (PTL 1 a 3).

Por otro lado, en PTL 4 y 5, se presenta un derivado de ácido ditiazol-carboxílico que tiene un anillo de benceno en el centro. Además, en PTL 6 y 7, se presenta un derivado de ácido bifeniltiazol-carboxílico.

Lista de citas

Bibliografía de patentes

35 [PTL 1] Publicación internacional núm. 92/09279

[PTL 2] Patente japonesa abierta a inspección pública núm. 2002-105067

[PTL 3] Publicación internacional núm. 96/31211

[PTL 4] Publicación internacional núm. 2011/139886

[PTL 5] Publicación internacional núm. 2011/101867

40 [PTL 6] Publicación internacional núm. 2010/018458

[PTL 7] Publicación internacional núm. 2010/128163

Compendio de la invención

Problema técnico

45 Un objeto de la presente invención es proporcionar un cristal de un nuevo compuesto útil como agente terapéutico o agente profiláctico para enfermedades asociadas con xantina oxidasa tal como gota, hiperuricemia, síndrome de lisis tumoral, cálculos urinarios, hipertensión, dislipidemia, diabetes, enfermedades cardiovasculares tales como arteriosclerosis o fallo cardíaco, enfermedades renales tales como nefropatía diabética, enfermedades respiratorias tales como enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, enfermedades intestinales inflamatorias o enfermedades autoinmunes.

Solución al problema

Como resultado de estudios serios con el objeto anterior, los actuales inventores han encontrado que el ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico (en adelante, también denominado como un compuesto (I)) puede cristalizarse y existe como al menos un tipo de polimorfo cristalino.

5 Es decir, la presente invención proporciona lo siguiente.

[1] Un cristal de ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico;

[2] El cristal según [1], en donde el cristal tiene una forma cristalina A;

[3] El cristal según [2], en donde el cristal tiene picos característicos a ángulos de difracción de $2\theta = 7,2^\circ, 11,3^\circ, 15,9^\circ, 17,9^\circ, 20,8^\circ, 22,3^\circ, 23,1^\circ, 23,8^\circ, 24,3^\circ$ y $28,6^\circ$ en su espectro de difracción de rayos X a través de polvo;

10 [4] El cristal según [2], en donde su espectro de difracción de rayos X a través de polvo tiene un patrón mostrado en la Fig. 1;

[5] El cristal según [2], en donde su pico exotérmico en termogravimetría/análisis térmico diferencial es a 232°C ;

[6] Una composición farmacéutica que comprende el cristal según cualquiera de [1] a [5] y un vehículo farmacéuticamente aceptable;

15 [7] Un inhibidor de xantina oxidasa que comprende el cristal según cualquiera de [1] a [5] como un ingrediente activo; y

[8] Un agente terapéutico o profiláctico para usar en una o más enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en gota, hiperuricemia, síndrome de lisis tumoral, cálculos urinarios, hipertensión, dislipidemia, diabetes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades renales, enfermedades respiratorias, enfermedades intestinales inflamatorias y enfermedades autoinmunes, que comprende el cristal según cualquiera de [1] a [5] como un ingrediente activo.

Efectos ventajosos de la invención

25 La presente invención proporciona cristales de un derivado de azol benceno, que son útiles como agentes terapéuticos o profilácticos para enfermedades asociadas con la xantina oxidasa tales como gota, hiperuricemia, síndrome de lisis tumoral, cálculos urinarios, hipertensión, dislipidemia, diabetes, enfermedades cardiovasculares tales como arteriosclerosis o fallo cardíaco, enfermedades renales tales como nefropatía diabética, enfermedades respiratorias tales como enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, enfermedades intestinales inflamatorias o enfermedades autoinmunes. Estos cristales pueden usarse como un ingrediente farmacéutico activo para producir el agente farmacéutico.

30 **Breve descripción de los dibujos**

[Fig. 1] La Fig. 1 es un espectro de difracción de rayos X a través de polvo de la forma cristalina A.

Descripción de realizaciones

35 La "xantina oxidasa" se usa tanto en un amplio sentido que es una enzima para catalizar una reacción de oxidación de hipoxantina a xantina y además a ácido úrico como en un sentido limitado que es una xantina oxidoreductasa tipo oxidasa que es una de las enzimas que cataliza la misma reacción. En la presente invención, a menos que se especifique otra cosa, "xantina oxidasa" se denomina de forma colectiva a una enzima que cataliza una reacción de oxidación de hipoxantina a xantina y además a ácido úrico. En la xantina oxidoreductasa que es responsable de esta reacción, están presentes dos tipos de oxidoreductasa tipo oxidasa y oxidoreductasa tipo deshidrogenasa y ambos tipos están incluidos en la xantina oxidasa de la presente invención. A menos que se especifique otra cosa, "xantina oxidasa" tiene el mismo significado que se define anteriormente también en la "actividad inhibidora de la xantina oxidasa", "inhibidor de la xantina oxidasa" y similares.

40 Los cristales de la presente invención se caracterizan por los espectros de difracción de rayos X a través de polvo, y/o termogravimetría/análisis térmico diferencial (TG/DTA) y similares. Los espectros de difracción de rayos X (XRD) de polvos de estos cristales muestran patrones característicos, y cada cristal tiene valores 2θ de ángulo de difracción específicos. Además, cada uno de estos cristales también muestra su propio comportamiento térmico característico en la termogravimetría/análisis térmico diferencial (TG/DTA).

45 La forma cristalina A de la presente invención tiene picos característicos en ángulos de difracción de $2\theta = 7,2^\circ, 11,3^\circ, 15,9^\circ, 17,9^\circ, 20,8^\circ, 22,3^\circ, 23,1^\circ, 23,8^\circ, 24,3^\circ$ y $28,6^\circ$ en su espectro de difracción de rayos X a través de polvo. Además, la forma cristalina A de la presente invención tiene un patrón en su espectro de difracción de rayos X a través de polvo mostrado en la Fig. 1, y tiene un pico exotérmico a 232°C en la termogravimetría/análisis térmico diferencial (TG/DTA). La forma cristalina A es un cristal anhidro.

Como se usa en esta memoria, "picos característicos" significa picos que se observan principalmente en el espectro de difracción de rayos X a través de polvo de cada polimorfo cristalino, además de picos únicos. Los cristales de la presente invención identificados por los ángulos de difracción también incluyen picos distintos de los observados como los picos característicos descritos anteriormente.

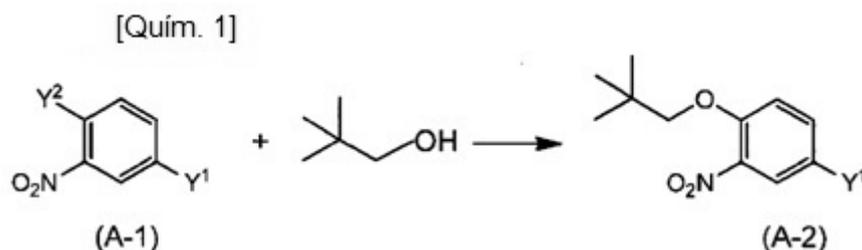
- 5 La posición y la intensidad relativa del ángulo de difracción 2θ en el espectro de difracción de rayos X a través de polvo pueden variar ligeramente dependiendo de las condiciones de medida, y por lo tanto, incluso si 2θ tiene una ligera diferencia, la identidad de una forma cristalina se reconocería haciendo referencia de forma apropiada al patrón del espectro completo. Los cristales en el intervalo de dichos errores también están incluidos en la presente invención. Los errores en 2θ pueden estar, por ejemplo, en el intervalo de $\pm 0,5^\circ$ o $\pm 0,2^\circ$. En otras palabras, los cristales
10 identificados por los ángulos de difracción anteriores también incluyen aquellos con ángulos de difracción dentro del intervalo de error de $\pm 0,5^\circ$ o $\pm 0,2^\circ$.

- En el análisis termogravimétrico/térmico diferencial (TG/DTA), un "pico exotérmico" y un "pico endotérmico" se definen como la temperatura en el punto de partida de un pico y quieren decir la temperatura de partida exotérmica y endotérmica determinadas por extrapolación. El "pico exotérmico" y "pico endotérmico" en el TG/DTA pueden variar un poco dependiendo de las condiciones de medida. Por ejemplo, el error se considera que está en el intervalo de $\pm 5^\circ\text{C}$ o $\pm 2^\circ\text{C}$. En otras palabras, los cristales identificados por los picos anteriores también incluyen aquellos con picos dentro del intervalo de error de $\pm 5^\circ\text{C}$ o $\pm 2^\circ\text{C}$.
15

- Además, tanto para el espectro de difracción de rayos X a través de polvo como para TG/DTA, la diferencia entre los valores medidos para un material de referencia de los cristales, por ejemplo, cada cristal obtenido por el método descrito en los presentes ejemplos y los valores numéricos descritos en la presente solicitud pueden aceptarse como los errores de medida. Es decir, los cristales que tienen los mismos ángulos de difracción y picos exotérmico y endotérmico en el intervalo de los errores calculados por dichos métodos están incluidos en los cristales de la presente invención.
20

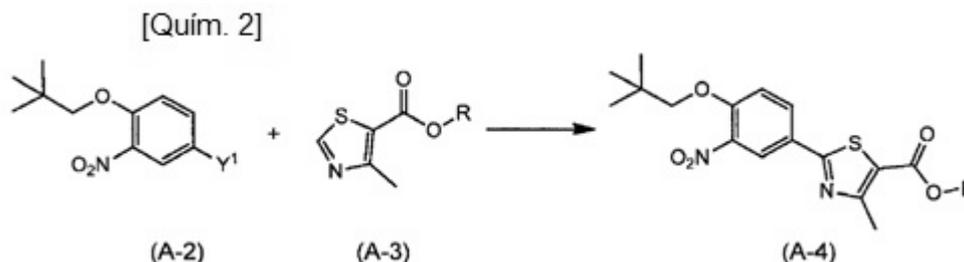
- Una forma cristalina A de ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico puede sintetizarse, por ejemplo, según el método de síntesis descrito a continuación.
25

Síntesis del Compuesto (A-2)



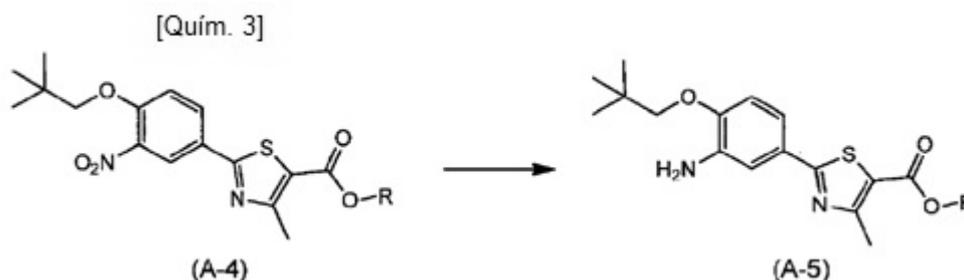
- (en donde Y^1 e Y^2 representan un grupo saliente). Los ejemplos de un grupo saliente representado por Y^1 e Y^2 incluyen un átomo de halógeno, un grupo metanosulfonilo, un grupo p-toluensulfonilo, un grupo trifluorometanosulfonilo y similares. La reacción es un método para sintetizar un compuesto (A-2) mediante la reacción de alcohol de neopentilo con un grupo saliente Y^2 en un compuesto (A-1) en presencia de una base. Ejemplos de la base a usar incluyen una sal inorgánica tal como hidruro sódico, hidróxido sódico, hidróxido de potasio, hidróxido de litio, carbonato sódico, carbonato de potasio, carbonato de cesio; un alcóxido metálico tal como etóxido sódico, metóxido sódico y t-butoxido de potasio; y una amina orgánica tal como trietilamina, piridina, 4-aminopiridina, N-etil-N,N-diisopropilamina (DIPEA) y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno (DBU). La reacción se realiza haciendo reaccionar una base en una cantidad equivalente o ligeramente excesiva respecto al compuesto (A-1) y alcohol de neopentilo en una cantidad equivalente o excesiva respecto al compuesto (A-1) en un disolvente inactivo para la reacción en el intervalo entre 0°C y 140°C , seguido por la adición del compuesto (A-1) a la mezcla permitiendo a la reacción continuar generalmente de 0,5 a 16 horas. La reacción se realiza preferiblemente bajo una atmósfera de gas inerte tal como nitrógeno. Aquí, el disolvente incluye, aunque no está particularmente limitado a, por ejemplo, hidrocarburos aromáticos tales como benceno, tolueno y xileno; éteres tales como dietiléter, tetrahidrofurano (THF), 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxietano y 1,2-dietoxietano; hidrocarburos halogenados tales como diclorometano, 1,2-dicloroetano y cloroformo; N,N-dimetilformamida (DMF); N-metilpirrolidona; dimetilsulfóxido (DMSO); agua; o un disolvente mezclado de los mismos.
30
35
40

Síntesis del compuesto (A-4)



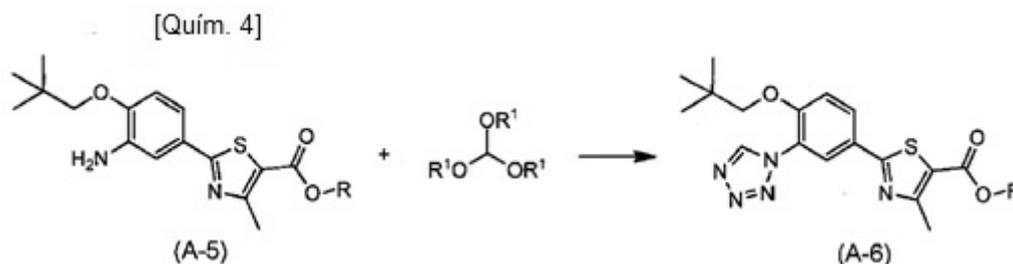
(en donde R representa un grupo alquilo que tiene 1 a 6 átomos de carbono). El método de síntesis es un método para sintetizar un compuesto (A-4) acoplando compuestos (A-2) y (A-3) juntos. Los ejemplos de un grupo saliente representado por Y¹ incluyen un átomo de halógeno, un grupo metanosulfonyloxi, un grupo p-toluensulfonyloxi y un grupo trifluorometanosulfonyloxi. La reacción se realiza haciendo reaccionar los compuestos (A-2) y (A-3) usando una cantidad equivalente o excesiva de un compuesto respecto al otro en un disolvente inactivo para la reacción en presencia de una base y un catalizador de metal de transición, añadiendo un ligando, un ácido carboxílico y una sal de cobre monovalente o divalente cuando sea necesario, en el intervalo entre la temperatura ambiente y una temperatura de reflujo generalmente durante 0,5 horas a 2 días. La reacción se realiza preferiblemente en una atmósfera de gas inerte tal como nitrógeno. Aquí, el disolvente incluye, aunque no está particularmente limitado a, por ejemplo, hidrocarburos aromáticos tal como benceno, tolueno y xileno; éteres tales como dietiléter, tetrahydrofurano (THF), 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxietano y 1,2-dietoxietano; hidrocarburos halogenados tales como diclorometano, 1,2-dicloroetano y cloroformo; alcoholes tales como metanol, etanol, 2-propanol y butanol; N,N-dimetilformamida (DMF); N-metilpirrolidona; dimetilsulfóxido (DMSO); agua; y un disolvente mezclado de los mismos. Ejemplos de la base incluyen hidruro de litio, hidruro sódico, hidruro de potasio, hidróxido sódico, hidróxido de potasio, carbonato sódico, carbonato de potasio, carbonato de cesio, fluoruro de potasio, fluoruro de cesio, fosfato de tripotasio, acetato sódico y acetato de potasio, una sal metálica de un alcóxido que tiene 1 a 6 átomos de carbono (sal de litio, sal sódica, sal de potasio y sal de magnesio); una sal metálica de un anión alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono (sal de litio, sal sódica, sal de potasio y sal de magnesio); sal (fluoruro, cloruro y bromuro) de tetra (alquilo que tiene 1 a 4 átomos de carbono) amonio; diisopropiletilamina; tributilamina; N-metilmorfolina; diazabicycloundeceno; diazabicyclooctano; e imidazol. Los ejemplos del catalizador de metal de transición incluyen cobre, paladio, cobalto, hierro, rodio, rutenio e iridio. Los ejemplos del ligando incluyen tri(t-butil)fosfina, tri(ciclohexil)fosfina, t-butildiciclohexilfosfina, di(t-butil)ciclohexilfosfina y di(t-butil)metilfosfina. Los ejemplos de la sal de cobre monovalente o divalente incluyen cloruro de cobre (I), bromuro de cobre (I), yoduro de cobre (I), acetato de cobre (I), fluoruro de cobre (II), cloruro de cobre (II), bromuro de cobre (II), yoduro de cobre (II), acetato de cobre (II) un hidrato de los mismos y una mezcla de los mismos. Ejemplos del ácido carboxílico incluyen ácido fórmico, ácido acético, ácido propionico, ácido n-butírico, ácido isobutírico, ácido pentanoico, ácido isopentanoico, ácido pivalico y ácido trifluoroacético.

Síntesis del compuesto (A-5)



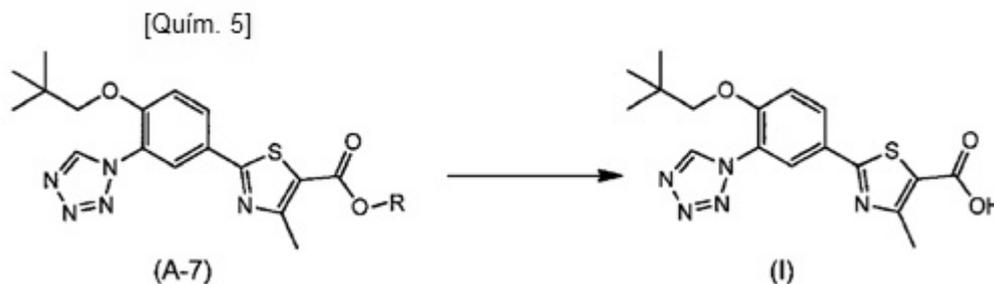
(en donde R representa un grupo alquilo que tiene 1 a 6 átomos de carbono). El método de síntesis es un método para sintetizar un compuesto (A-5) mediante la reducción de un grupo nitro del compuesto (A-4). La reacción se realiza haciendo reaccionar el compuesto (A-4) en una atmósfera de gas hidrógeno en un disolvente inactivo para la reacción en presencia de un catalizador de metal de transición en el intervalo entre la temperatura ambiente y una temperatura de reflujo generalmente durante 0,5 horas a 2 días. Aquí, el disolvente incluye, aunque no está particularmente limitado a, por ejemplo, hidrocarburos aromáticos tales como benceno, tolueno y xileno; éteres tales como dietiléter, tetrahydrofurano (THF), 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxietano y 1,2-dietoxietano; hidrocarburos halogenados tales como diclorometano, 1,2-dicloroetano y cloroformo; alcoholes tales como metanol, etanol, 2-propanol y butanol; N,N-dimetilformamida (DMF); N-metilpirrolidona; dimetilsulfóxido (DMSO); acetato de etilo; y un disolvente mezclado de los mismos. Los ejemplos preferidos del catalizador de metal de transición incluyen paladio-carbono, hidróxido de paladio, negro de paladio, platino-carbono, níquel Raney y similares.

Síntesis del compuesto (A-6): un alquiléster de ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico



(en donde R y R¹ representan independientemente un grupo alquilo que tiene 1 a 6 átomos de carbono). El método de síntesis es un método para sintetizar un anillo de tetrazol haciendo reaccionar el compuesto (A-5) con un ortoformiato y un compuesto azida. La reacción se realiza haciendo reaccionar el compuesto (A-5), un ortoformiato y un compuesto azida que usa una cantidad equivalente o excesiva de uno de los compuestos en un disolvente inactivo para la reacción en presencia de un ácido en el intervalo entre la temperatura ambiente y una temperatura de reflujo generalmente durante 0,5 horas a 2 días. La reacción se realiza preferiblemente en una atmósfera de gas inerte tal como nitrógeno. Ejemplos del ortoformiato incluyen ortoformiato de trimetilo y ortoformiato de trietilo. Además, los ejemplos del compuesto de azida incluyen azida sódica y trimetilsililazida. Ejemplos del ácido a usar incluyen un ácido orgánico tal como ácido fórmico y ácido acético, un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico y ácido sulfúrico, y un ácido de Lewis tal como triflato de indio, triflato de iterbio, triflato de zinc y tricloroindio. El disolvente a usar para estas reacciones incluye, aunque no está particularmente limitado a, por ejemplo, benceno, tolueno, diclorometano, dicloroetano, cloroformo, tetracloruro de carbono, dietiléter, tetrahidrofurano (THF), 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxietano, 1,2-dietoxietano, N,N-dimetilformamida (DMF), N-metilpirrolidona, dimetilsulfóxido (DMSO) y un disolvente mezclado de los mismos, y un ácido tal como ácido acético puede usarse también como un disolvente.

Síntesis de una forma cristalina A del compuesto (I): ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico



(en donde, R representa un grupo alquilo que tiene 1 a 6 átomos de carbono). Una forma cristalina A del compuesto (I) puede producirse por un método que comprende una etapa de suspensión de un compuesto (A-7) en un disolvente e hidrólisis de la suspensión añadiendo una disolución acuosa de una base y una etapa de neutralización del producto de reacción. Además, el método puede comprender además una etapa de adición de agua al producto neutralizado y una etapa posterior de agitación de la disolución de reacción. El disolvente usado para suspender el compuesto (A-7) incluye, por ejemplo, hidrocarburos aromáticos tal como benceno, tolueno y xileno; éteres tales como dietiléter, tetrahidrofurano (THF), 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxietano y 1,2-dietoxietano; hidrocarburos halogenados tales como diclorometano, 1,2-dicloroetano y cloroformo; alcoholes tales como metanol, etanol, 2-propanol y butanol; N,N-dimetilformamida (DMF); N-metilpirrolidona; dimetilsulfóxido (DMSO); agua; y un disolvente mezclado de los mismos. El disolvente preferiblemente es un éter, un alcohol, agua o un disolvente mezclado de los mismos.

En el compuesto (A-7), R preferiblemente es un grupo alquilo que tiene 1 a 6 átomos de carbono y más preferiblemente un grupo etilo. Aquí, un grupo alquilo se denomina como un grupo hidrocarburo saturado alifático lineal o ramificado. Los ejemplos específicos de un grupo alquilo que tiene 1 a 6 átomos de carbono incluyen un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo propilo, un grupo isopropilo, un grupo butilo, un grupo isobutilo, un grupo terc-butilo, un grupo pentilo, un grupo isopentilo y un grupo hexilo.

La reacción de hidrólisis del compuesto (A-7) al compuesto (I) continúa suspendiendo el compuesto (A-7) en el disolvente (por ejemplo, en una cantidad de 15 veces la cantidad del compuesto (A-7)) y después haciendo reaccionar el compuesto (A-7) con una base en una cantidad equivalente o ligeramente excesiva respecto al compuesto (A-7). Ejemplos de bases preferidas incluyen hidróxido sódico, hidruro de potasio e hidróxido de litio. La reacción continúa en el intervalo entre 0°C y 100°C aunque se realiza preferiblemente en el intervalo entre 20°C y 30°C. Después de la reacción de hidrólisis, el producto de reacción se neutraliza haciendo reaccionar la base usada con un ácido en una cantidad equivalente o ligeramente excesiva respecto a la base usada. Un ejemplo de un ácido preferido incluye ácido

clorhídrico. La reacción de neutralización continúa en el intervalo entre 0°C y 100°C aunque se realiza preferiblemente en el intervalo entre 0°C a 30°C.

Posteriormente, se añade agua (por ejemplo, en una cantidad de 5 veces la cantidad del compuesto (A-7)) al producto de reacción neutralizado y la mezcla se agita durante una hora, y después el precipitado se filtra y se seca para obtener cristales. Aunque la cantidad del disolvente, la cantidad de agua añadida, las condiciones de agitación y el tiempo hasta la separación por filtrado no están particularmente limitadas, como estas condiciones pueden tener una influencia en el rendimiento de los cristales, la pureza química, el diámetro de las partículas y la distribución de tamaño de partículas, estas condiciones se combinan preferiblemente y se ajustan según el propósito. Para la filtración, puede usarse un método habitual, por ejemplo, filtración natural, filtración por presión, filtración al vacío o separación centrífuga. Para el secado, puede usarse un método habitual, por ejemplo, secado natural, secado al vacío, secado por calentamiento y secado por calentamiento al vacío. El compuesto intermedio de la reacción puede purificarse por un método habitual tal como re-cristalización, re-precipitación y diversos métodos de cromatografía, si fuera necesario, durante el proceso de síntesis.

Aunque los cristales de la presente invención pueden identificarse por un espectro de difracción de rayos X a través de polvo o análisis termogravimétrico/térmico diferencial (TG/DTA) característico, cuando otras formas cristalinas están presentes, no se hace referencia a la velocidad de incorporación de los mismos. Cuando solo se obtiene una forma específica de cristal, al menos la incorporación de las demás formas cristalinas puede aceptarse en un grado que no puede detectarse por estos métodos de medida. Además, cuando una forma específica de cristal se usa como un ingrediente farmacéutico activo para un agente farmacéutico, no significa que la inclusión de las demás formas de cristales sea inaceptable.

Los cristales de la presente invención pueden usarse como un ingrediente activo farmacéutico. Además, cuando las demás formas cristalinas están presentes, puede usarse no solo una forma de los cristales sino también una mezcla de dos o más formas de cristales. En la presente invención, la capacidad de manejo durante la producción, capacidad de reproducción, estabilidad y estabilidad en el almacenaje se hacen de forma ventajosa obteniendo cristales de ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico en comparación con aquellos que no son cristalinos.

Una composición farmacéutica puede obtenerse usando los cristales de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un preparado que contiene los cristales de la presente invención se prepara usando aditivos normalmente usados para la formulación. Ejemplos de los aditivos para un preparado sólido incluyen un excipiente tal como lactosa, sacarosa, glucosa, almidón de maíz, almidón de patata blanco, celulosa cristalina, ácido silícico anhidro ligero, silicato de aluminio sintético, aluminometasilicato de magnesio y fosfato de hidrógeno y calcio; un aglutinante tal como celulosa cristalina, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y polivinilpirrolidona; un agente disgregante tal como almidón, carboximetilcelulosa sódica, carboximetilcelulosa de calcio, croscarmelosa sódica y almidón de carboximetilo sódico; un lubricante tal como talco y ácido esteárico; un agente de recubrimiento tal como hidroximetilpropilcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa y etilcelulosa; y un agente colorante, los aditivos para un preparado semisólido incluyen una base tal como vaselina blanca, y los aditivos para un preparado líquido incluyen un disolvente tal como etanol; un agente solubilizante tal como etanol; un conservante tal como para-hidroxibenzoato; un agente de tonicidad tal como glucosa; un agente tamponante tal como ácido cítrico; un antioxidante tal como ácido L-ascórbico; un agente quelante tal como EDTA; y un agente de suspensión y un agente emulgente tal como polisorbato 80.

Los cristales de la presente invención pueden usarse en cualquier forma de dosificación tal como un preparado sólido, un preparado semisólido y un preparado líquido, y usarse en un preparado para cualquier forma de administración tal como un preparado oral y un preparado parenteral (tal como un preparado en inyección, un preparado percutáneo, un preparado oftálmico, un preparado en supositorio, un preparado trans-nasal y un preparado para inhalación).

Una composición farmacéutica que contiene los cristales de la presente invención como un ingrediente activo puede usarse como un inhibidor de xantina oxidasa o un agente terapéutico y un agente profiláctico para enfermedades asociadas con la xantina oxidasa tal como gota, hiperuricemia, síndrome de lisis tumoral, cálculos urinarios, hipertensión, dislipidemia, diabetes, enfermedades cardiovasculares tales como esclerosis arterial y fallo cardíaco, enfermedades renales tal como nefropatía diabética, enfermedades respiratorias tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedades intestinales inflamatorias o enfermedades autoinmunes. Aquí, el término "profiláctico" significa evitar la incidencia o comienzo de las enfermedades en un individuo que no está afectado por enfermedades o no ha desarrollado aún enfermedades y el término "terapéutico" significa tratar, suprimir o remediar enfermedades o síntomas en un individuo que ya ha sido afectado por enfermedades o ha desarrollado enfermedades.

55 Ejemplos

Método de medida

La difracción de rayos X a través de polvo de los cristales de la presente invención se midió en las siguientes condiciones.

Aparato: D8 DISCOVER con GADDS CS fabricado por Bruker AXS

Fuente de radiación: Cu K α , longitud de onda: 1,541838 (10^{-10} m), 40 kV-40 mA, monocromador de grafito de superficie plana incidente, diámetro del colimador 300 μ m, detector PSPC bi-dimensional, barrido de 3 a 40°

5 El análisis termogravimétrico/térmico diferencial (TG/DTA) de los cristales de la presente invención se midió en las siguientes condiciones.

Aparato: TG8120 fabricado por Rigaku

Velocidad de elevación de temperatura: 10°C/min, atmósfera: nitrógeno, recipiente de muestra: aluminio, Referencia: alúmina, Muestreo: 1,0 seg., intervalo de temperatura de medida: 25 a 300°C.

10 Con respecto a los compuestos para los que se midió el espectro ^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6 o CDCl_3), se muestran el desplazamiento químico (δ : ppm) y la constante de acoplamiento (J: Hz).

Aparato: JMTC-400/54/SS fabricado por JEOL

Las abreviaturas representan lo siguiente: s= singlete, d= duplete, t= triplete, q= cuadruplete; brs= singlete ancho, m= multiplete

Ejemplo de referencia 1

15 Producción de 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxilato de etilo

(1) Una mezcla preparada suspendiendo 1,06 g de alcohol de neopentilo en 40,0 mL de tolueno se enfrió a 0°C en una atmósfera de nitrógeno, y se añadieron 1,35 g de t-butoxisodio y la mezcla resultante se agitó a 0°C durante 30 minutos. Posteriormente, después de añadir 2,20 g de 4-bromo-1-fluoro-2-nitrobenceno a la mezcla anterior a 0°C, la disolución de la mezcla de reacción resultante se calentó a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la adición de agua a la disolución de mezcla de reacción, se realizó la extracción usando acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con una solución salina, seguido por secado y concentración a presión reducida para obtener 3,12 g de 4-bromo-1-(2,2-dimetilpropoxi)-2-nitrobenceno.

(2) Se preparó una suspensión añadiendo 3,04 g de bicarbonato de potasio, 63 mg de cloruro de paladio (II) y 297 mg de bromuro de cobre (I) a 4,18 g de 4-bromo-1-(2,2-dimetilpropoxi)-2-nitrobenceno, y suspendiendo la mezcla en 45 mL de tolueno. Posteriormente, una disolución de mezcla de reacción preparada añadiendo 2,97 g de 4-metil-1,3-tiazol-5-carboxilato de etilo, 133 μ L de ácido isobutírico y 333 μ L de di-t-butilciclohexilfosfina a la suspensión se calentó a 120°C durante 14 horas en una atmósfera de nitrógeno. La disolución de mezcla de reacción se filtró con celite para eliminar la materia insoluble, se añadió agua al filtrado, y se realizó la extracción usando acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con una solución salina y después se sometió a secado y concentración a presión reducida, seguido por purificación mediante un método convencional para obtener 5,13 g de 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-nitrofenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxilato de etilo.

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 1,08 (9H, s), 1,39 (3H, t, J = 6,8 Hz), 2,77 (3H, s), 3,79 (2H, s), 4,36 (2H, q, J = 6,8 Hz), 7,12 (1H, d, J = 8,8 Hz), 8,10 (1H, dd, J = 2,0, 8,8 Hz), 8,45 (1H, d, J = 2,0 Hz)

(3) Una disolución de mezcla de reacción se preparó suspendiendo 5,13 g de 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-nitrofenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxilato de etilo en 50 mL de etanol, y añadiendo 500 mg de paladio/carbono (10% en peso) a la suspensión, y la mezcla de reacción se agitó a 50°C durante 20 horas en una atmósfera de hidrógeno. La disolución de mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para obtener 4,66 g de 2-[3-amino-4-(2,2-dimetilpropoxi)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxilato de etilo.

(4) Una disolución de mezcla de reacción preparada suspendiendo 2,58 g de 2-[3-amino-4-(2,2-dimetilpropoxi)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxilato de etilo en 30 mL de ácido acético y añadiendo 962 mg de azida sódica y 2,19 g de ortoformiato de trietilo se calentó a 70°C durante 2 horas en una atmósfera de nitrógeno. Después de enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente, se añadieron 20 mL de agua, seguido por purificación mediante un método convencional para obtener 2,78 g de 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxilato de etilo.

45 ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 1,00 (9H, s), 1,39 (3H, t, J = 6,8 Hz), 2,78 (3H, s), 3,80 (2H, s), 4,36 (2H, q, J = 6,8 Hz), 7,18 (1H, d, J = 8,8 Hz), 8,08 (1H, dd, J = 2,4, 8,8 Hz), 8,42 (1H, d, J = 2,4 Hz), 9,19 (1H, s)

Ejemplo 1

Producción de una forma cristalina A de ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico

50 Una disolución de mezcla de reacción preparada disolviendo 2,58 g de 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxilato de etilo en 30,0 L de una disolución mixta de tetrahidrofurano/metanol = 1/1

seguido por la adición de 6,50 mL de disolución acuosa de hidróxido sódico 2 M se agitó en el intervalo entre 20°C y 30°C durante 3 horas. Mientras se agitaba en el intervalo entre 20°C y 30°C, se añadieron lentamente 6,50 mL de ácido clorhídrico 2 M a la disolución de mezcla de reacción y además se añadieron lentamente 17,0 mL de agua. La disolución de mezcla de reacción se agitó en el intervalo entre 20°C y 30°C durante una hora y se obtuvieron cristales por filtración. Los cristales resultantes se lavaron con 7,0 mL de una disolución mixta de metanol/agua = 1/1 y 7,0 mL de agua. Los cristales se secaron al vacío a 50°C para dar 2,25 g de cristales de ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico. La XRD de los cristales resultantes se muestra en la Fig. 1. Se observaron picos a ángulos de difracción de $2\theta = 7,2^\circ, 11,3^\circ, 15,9^\circ, 17,9^\circ, 20,8^\circ, 22,3^\circ, 23,1^\circ, 23,8^\circ, 24,3^\circ$ y $28,6^\circ$. Además, se observó un pico exotérmico en la termogravimetría/análisis térmico diferencial (TG/DTA) a 232°C.

- 5
10 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0,83 (9H, s), 2,66 (3H, s), 3,83 (2H, s), 7,47 (1H, d, J = 8,8 Hz), 8,18 (1H, dd, J = 2,4, 8,8 Hz), 8,27 (1H, d, J = 2,0 Hz), 9,78 (1H, s), 13,40 (1H, s)

Ejemplo de referencia 2

Producción de ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico

- 15 Una disolución de mezcla de reacción preparada disolviendo 307 mg de 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxilato de etilo en 8,0 mL de una disolución mixta de tetrahydrofurano/metanol = 1/1 seguido por la adición de 1,0 mL de disolución acuosa de hidróxido sódico 2 M se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de añadir 1,0 mL de ácido clorhídrico 2 M a la disolución de mezcla de reacción, se añadieron 6,0 mL de agua, seguido de purificación mediante un método convencional para obtener 244 mg de ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico.

- 20 $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6) δ : 0,83 (9H, s), 2,66 (3H, s), 3,83 (2H, s), 7,47 (1H, d, J = 8,8 Hz), 8,18 (1H, dd, J = 2,4, 8,8 Hz), 8,27 (1H, d, J = 2,0 Hz), 9,78 (1H, s), 13,40 (1H, s)

Ejemplo de referencia 3

Medida de la actividad inhibidora de la xantina oxidasa

(1) Preparación del compuesto de ensayo

- 25 Después de disolver ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico en DMSO (producido por Sigma Corporation) de manera que la concentración es 20 mM, la disolución se usó ajustando la concentración a un valor deseado para el propósito durante el uso.

(2) Método de medida

- 30 La evaluación de la actividad inhibidora de la xantina oxidasa del ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico se realizó por el método descrito en la referencia (Method Enzymatic Analysis, 1, 521-522, 1974) con modificación parcial. Esta evaluación se realizó midiendo la actividad de la xantina oxidoreductasa tipo oxidasa. Concretamente, una disolución de xantina (fabricada por Sigma Co.) se preparó a 10 mM usando una disolución de hidróxido sódico 20 mM y después se mezcló con tampón fosfato 100 mM para ajustar a 30 μM . Se añadieron 75 μL de la disolución a cada pocillo de la placa de 96 pocillos. El compuesto de ensayo diluido con DMSO a 100 veces de una concentración final se añadió a cada pocillo a 1,5 μL por pocillo. Después de mezclar la placa, se midió la absorbancia a 290 nm mediante un lector de microplacas SPECTRA MAX Plus 384 (fabricado por Molecular Devices, LLC). Posteriormente, se preparó la xantina oxidoreductasa tipo oxidasa (a partir de suero de leche, fabricada por Calbiochem Novabiochem Corp.) a 30,6 mU/mL usando una disolución de tampón fosfato 100 mM y se añadió a cada pocillo a 73,5 μL por pocillo. Inmediatamente después de la mezcla, el cambio de absorbancia a 290 nm se midió durante 5 minutos. La actividad enzimática de la disolución DMSO sin compuesto de ensayo se usó como control al 100%, y se calculó la velocidad de inhibición del compuesto de ensayo. Se calculó la concentración inhibidora al cincuenta por ciento del compuesto de ensayo en la actividad de la xantina oxidoreductasa tipo oxidasa ajustando a la curva de respuesta a la dosis.

- 45 El ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico mostró una actividad inhibidora de la xantina oxidasa de $1,0 \text{ nM} \leq \text{CI}_{50} < 5,0 \text{ nM}$.

Ejemplo de referencia 4

Efecto hipouricémico (ratas normales)

- 50 El efecto hipouricémico se confirmó para el ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico. Un compuesto de ensayo suspendido en una disolución de metilcelulosa al 0,5% se administró a la fuerza a ratas macho Sprague-Dawley de 8 a 9 semanas de edad (Japan Charles River Co.) por administración gástrica oral usando una aguja de alimentación. Después de recogerse la sangre desde la vena de la cola a las 2 horas después de la administración, se separó el plasma. El nivel de ácido úrico en la muestra de sangre se midió por el método de la uricasa usando un espectrómetro de absorción además de un kit de determinación de ácido úrico (UA F Wako tipo L: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). El porcentaje de efecto hipouricémico se determinó mediante la

siguiente expresión:

$$\text{Porcentaje de efecto hipouricémico (\%)} = (\text{Nivel de ácido úrico del animal de control} - \text{Nivel de ácido úrico del animal administrado con compuesto de ensayo}) \times 100 / \text{Nivel de ácido úrico del animal de control}$$

El ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico mostró un efecto hipouricémico del 50% o más en ambas dosis de 10 mg/kg y 1 mg/kg.

- 5 A partir de los resultados anteriores, se mostró que el ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico tiene un potente efecto hipouricémico.

Ejemplo 5

Efecto hipouricémico prolongado (ratas normales)

- 10 Se administró ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico a ratas macho Sprague-Dawley de la misma manera que en el Ejemplo de referencia 4. Después de recogerse la sangre de la vena de la cola 24 horas después de la administración, se separó el plasma. El nivel de ácido úrico en la sangre se midió por un método de la uricasa que usa un espectrómetro de absorción y un kit de determinación de ácido úrico (UA F de Wako tipo L: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). El porcentaje del efecto hipouricémico se determinó por la siguiente expresión:

$$\text{Porcentaje de efecto hipouricémico (\%)} = (\text{Nivel de ácido úrico del animal de control} - \text{Nivel de ácido úrico del animal administrado con compuesto de ensayo}) \times 100 / \text{Nivel de ácido úrico del animal de control}$$

- 15 El ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico mostró un efecto hipouricémico del 50% o más en una dosis de 10 mg/kg y 40% o más en una dosis de 3 mg/kg a las 24 horas después de la administración.

- 20 A partir de los resultados anteriores, se mostró que el ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico tiene un efecto hipouricémico prolongado durante un largo periodo de tiempo.

Ejemplo de referencia 6

Efecto hipouricémico (perros Beagle hiperuricémicos)

- 25 El efecto hipouricémico del ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico en un perro Beagle hiperuricémico inducido por ácido oxónico se confirmó. Un compuesto de ensayo suspendido en una disolución de metilcelulosa al 0,5% se administró a un perro Beagle (Kitayama labes) mediante administración gástrica oral. Se administró oxonato de potasio (50 mg/kg) de forma subcutánea antes y 4 horas después de la administración del compuesto. Después de recogerse la sangre de la vena cefálica a las 8 horas después de la administración, se separó el plasma. El nivel de ácido úrico en la muestra de plasma se midió por el método LC-MS/MS y el porcentaje de efecto hipouricémico se determinó mediante la siguiente expresión:

$$\text{Porcentaje de efecto hipouricémico (\%)} = (\text{Nivel de ácido úrico del animal de control} - \text{Nivel de ácido úrico del animal administrado con compuesto de ensayo}) \times 100 / \text{Nivel de ácido úrico del animal de control}$$

- 30 El ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico mostró un efecto hipouricémico del 80% o más en una dosis de 10 mg/kg a las 8 horas después de la administración.

A partir de los resultados anteriores, se mostró que los compuestos de la presente invención tienen un potente efecto hipouricémico en el perro Beagle.

- 35 Ejemplo de referencia 7

Efecto inhibidor prolongado de la xantina oxidasa en el tejido y el plasma.

Para la "xantina oxidasa" en la presente invención, en lo que se refiere a este ejemplo, se distinguen las actividades que catalizan la reacción oxidativa que se producen mediante la xantina oxidorreductasa tipo oxidasa solamente y mediante la xantina oxidorreductasa tanto tipo oxidasa como tipo deshidrogenasa. La primera es la "actividad de XO" y la última es la "actividad de XOR". En la "actividad de XO en el tejido", "actividad de XO en plasma", "inhibición de la actividad de XOR en el tejido", "inhibición de la actividad de XOR en el tejido" y similares, la "actividad de XO" y la "actividad de XOR" tienen el mismo significado que se define anteriormente. El tejido incluye hígado, riñón y vasos. Además, el porcentaje de inhibición de la actividad de XO y el de la inhibición de la actividad de XO en la misma muestra se enseña que son similares, según los resultados posteriores.

El efecto inhibitorio de la actividad de XO en el tejido, la actividad de XOR en el tejido y la actividad de XO en plasma se confirmó para el ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico. Un compuesto de ensayo suspendido en una disolución de metilcelulosa al 0,5% se administró de forma forzada a ratas macho Sprague-Dawley de 7 a 9 semanas de edad (Japan Charles River Co.) mediante administración gástrica oral usando una aguja de alimentación. La sangre se recogió de la vena abdominal y se recogió tejido a las 24 o 27 horas después de la administración. La muestra de plasma se preparó por centrifugado.

La actividad de XO en el tejido, la actividad de XOR en el tejido y la actividad de XO en plasma se midieron mediante el ensayo basado en pterina que utiliza la reacción en que la pterina se oxida por cada tipo de xantina oxidorreductasa para producir isoxantopterina fluorescente. En resumen, los tejidos congelados se homogeneizaron con tampón fosfato de potasio, pH 7,4, que contenía ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM e inhibidores de proteasa para preparar la concentración de tejido como sigue (hígado: 25 mg/mL, riñón: 25 mg/mL, vasos: 30 mg/mL). Después los homogeneizados se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 min a 4°C. Cuando se midió la actividad de XO, el sobrenadante del tejido y el plasma se co-incubaron respectivamente con disolución de pterina 50 µM a 37°C. Cuando se midió la actividad de XOR, el sobrenadante del homogeneizado del tejido se co-incubó con pterina 50 µM y disolución de azul de metileno 50 µM a 37°C. Como un control, también se incubó xantina oxidorreductasa tipo oxidasa (a partir de suero de leche, fabricado por Calbiochem Novabiochem Corp.) con disolución de pterina de la misma manera. La actividad de XO y la actividad de XOR de las muestras se determinaron a partir de la intensidad de fluorescencia que se normalizaron mediante el valor de intensidad del control y la concentración de proteína.

El porcentaje de inhibición de la actividad de XO y de inhibición de la actividad de XOR se determinó mediante la siguiente expresión:

$$\text{Porcentaje de inhibición de actividad de XO o XOR (\%)} = \frac{(\text{actividad de XO o XOR del animal de control} - \text{actividad de XO o XOR del animal administrado con compuesto de ensayo}) \times 100}{\text{actividad de XO o XOR del animal de control}}$$

Las actividades de XO en el hígado y el riñón y la actividad de XO en plasma 27 horas después de la administración se muestran en la tabla posterior.

Tabla 1

Actividad inhibitoria de XO del tejido y el plasma (en la disección aproximadamente 27 horas después de la administración)		
% de inhibición (frente a vehículo)		
Dosis (mg/kg)	1	10
Hígado	≥80%	≥80%
Riñón	≥60%	≥70%
Plasma	≥25%	≥40%

El ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico inhibió el 80% o más de la actividad de XO 27 horas después de la administración del fármaco en comparación con el animal de control en la dosis de 10 mg/kg en el hígado.

El presente compuesto inhibió el 70% o más de la actividad de XO 27 horas después de la administración del fármaco en comparación con el animal de control a la dosis de 10 mg/kg en el riñón.

El presente compuesto inhibió el 40% o más de la actividad de XO 27 horas después de la administración del fármaco en comparación con el animal de control a la dosis de 10 mg/kg en plasma.

El presente compuesto inhibió el 80% o más de la actividad de XOR 27 horas después de la administración del fármaco en comparación con el animal de control a la dosis de 1 mg/kg en el hígado.

El presente compuesto inhibió el 60% o más de la actividad de XOR 27 horas después de la administración del fármaco

en comparación con el animal de control a la dosis de 1 mg/kg en el riñón.

El presente compuesto inhibió el 25% o más de la actividad de XO 27 horas después de la administración del fármaco en comparación con el animal de control a la dosis de 1 mg/kg en plasma.

- 5 Además, la actividad inhibidora de XOR en los vasos a las 24 horas después de la administración se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 2

Actividad inhibidora de XOR del tejido (en la disección 24 horas después de la administración)		
% de inhibición (frente a vehículo)		
Dosis (mg/kg)	1	10
Hígado	≥80%	≥80%
Vasos	≥30%	≥50%

- 10 El ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico inhibió el 80% o más de la actividad de XOR 24 horas después de la administración del fármaco en comparación con el animal de control a la dosis de 10 mg/kg en el hígado.

El presente compuesto inhibió el 50% o más de la actividad de XOR 24 horas después de la administración del fármaco en comparación con el animal de control a la dosis de 10 mg/kg en los vasos.

Además, el presente compuesto inhibió el 80% o más de la actividad de XOR 24 horas después de la administración del fármaco en comparación con el animal de control a la dosis de 1 mg/kg en el hígado.

- 15 El presente compuesto inhibió el 30% o más de la actividad de XOR 24 horas después de la administración del fármaco en comparación con el animal de control a la dosis de 1 mg/kg en los vasos.

A partir de los resultados anteriores, se mostró que el compuesto de la presente invención tiene un prolongado efecto inhibidor de la actividad de XO o la actividad de XOR.

Aplicabilidad industrial

- 20 Los cristales de ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico de la presente invención se usan como un agente farmacéutico. Además, estos cristales pueden usarse como un ingrediente farmacéutico activo para producir un agente farmacéutico.

REIVINDICACIONES

1. Un cristal de ácido 2-[4-(2,2-dimetilpropoxi)-3-(1H-1,2,3,4-tetrazol-1-il)fenil]-4-metil-1,3-tiazol-5-carboxílico.
2. El cristal según la reivindicación 1, en donde el cristal tiene una forma cristalina A.
- 5 3. El cristal según la reivindicación 2, en donde el cristal tiene picos característicos a ángulos de difracción de $2\theta = 7,2^\circ, 11,3^\circ, 15,9^\circ, 17,9^\circ, 20,8^\circ, 22,3^\circ, 23,1^\circ, 23,8^\circ, 24,3^\circ$ y $28,6^\circ$ en su espectro de difracción de rayos X a través de polvo.
4. El cristal según la reivindicación 2, en donde su espectro de difracción de rayos X a través de polvo tiene un patrón mostrado en la Fig. 1.
- 10 5. El cristal según la reivindicación 2, en donde su pico exotérmico en termogravimetría/análisis térmico diferencial está a 232°C .
6. Una composición farmacéutica que comprende el cristal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Un cristal según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una composición farmacéutica según la reivindicación 6, para usar en terapia o profilaxis.
- 15 8. Un cristal según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una composición farmacéutica según la reivindicación 6 para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con la xantina oxidasa.
- 20 9. Un cristal o composición farmacéutica para usar como en la reivindicación 8, en donde la enfermedad asociada con la xantina oxidasa se selecciona del grupo que consiste en gota, hiperuricemia, síndrome de lisis tumoral, cálculos urinarios, hipertensión, dislipidemia, diabetes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades renales, enfermedades respiratorias, enfermedades intestinales inflamatorias y enfermedades autoinmunes.

Fig. 1

