

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 817 557**

51 Int. Cl.:

**C07D 241/20** (2006.01)

**A61K 31/4965** (2006.01)

**A61P 11/00** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2009 PCT/JP2009/053582**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.09.2009 WO09107736**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2009 E 09714302 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 2246336**

54 Título: **Inhibidor de fibrosis**

30 Prioridad:

**28.02.2008 JP 2008046999**

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

**07.04.2021**

73 Titular/es:

**NIPPON SHINYAKU CO., LTD. (100.0%)  
14, Kisshoin Nishinosho Monguchicho Minami-ku  
Kyoto-shi  
Kyoto 601-8550, JP**

72 Inventor/es:

**MURAKAMI, KOJI y  
TORAMOTO, TAKUYA**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 817 557 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

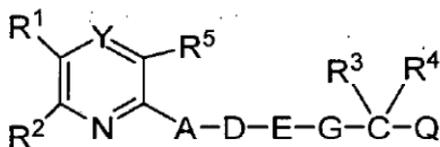
Inhibidor de fibrosis

## 5 [Campo técnico]

La presente invención da a conocer un inhibidor de fibrosis que contiene un derivado heterocíclico (a continuación en el presente documento, denominado "el presente derivado heterocíclico (1)") representado por la siguiente fórmula general (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como principio activo;

10

[Fórm. quím. 1]



(1)

15 En la fórmula (1), R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son iguales o diferentes y cada uno representa un arilo opcionalmente sustituido, y los sustituyentes son iguales o diferentes y se seleccionan de uno a tres sustituyentes del grupo que consiste en átomo de halógeno, alquilo, haloalquilo, arilalquilo, alcoxilo, alquiltio, alcoxialquilo, alquilsulfonilo, hidroxilo, amino, monoalquilamino, dialquilamino, carboxilo, ciano y nitro;

20 R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son iguales o diferentes y cada uno representa átomo de hidrógeno o alquilo;

R<sup>5</sup> representa átomo de hidrógeno, alquilo o átomo de halógeno;

Y representa N o N→O;

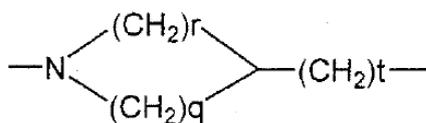
25

A representa NR<sup>6</sup>, y R<sup>6</sup> representa átomo de hidrógeno, alquilo, alquilenilo o cicloalquilo;

D representa alquilenilo o alquilenilo que está opcionalmente sustituido con hidroxilo, o A y D se combinan entre sí para formar un grupo divalente representado por la siguiente fórmula (2)

30

[Fórm. quím. 2]



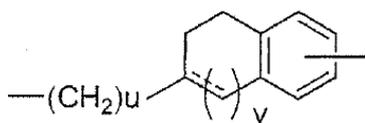
(2)

35 [En la fórmula (2), r representa un número entero de 0 a 2, q representa 2 o 3 y t representa un número entero de 0 a 4.];

E representa fenileno o un enlace sencillo, o D y E se combinan entre sí para formar un grupo divalente representado por la siguiente fórmula (3)

40

[Fórm. quím. 3]



(3)

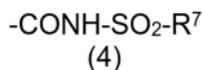
(--- representa un enlace sencillo o un doble enlace).

[En la fórmula (3), u representa un número entero de 0 a 2 y v representa 0 o 1.];

G representa O, S, SO o SO<sub>2</sub>; y

Q representa carboxilo, alcoxicarbonilo, tetrazolilo, carbamoilo, monoalquilcarbamoilo, dialalquilcarbamoilo o el grupo representado por la siguiente fórmula (4).

[Fórm. quím. 4]



[En la fórmula (4), R<sup>7</sup> representa amino, monoalquilamino, dialquilamino, hidroxilo, cualquiera del grupo de los siguientes 1) a 4) que están opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en átomo de halógeno, alquilo, haloalquilo, arilalquilo, alcoxilo, alquiltio, alcoxialquilo, alquilsulfonilo, hidroxilo, amino, monoalquilamino, dialquilamino, carboxilo, cianuro y nitro;

1) alquilo,

2) arilo,

3) ariloxilo, y

4) grupo heterocíclico].

La presente invención proporciona una composición farmacéutica tal como se define en la reivindicación 1 que se adjunta al presente documento.

#### [Técnica anterior]

La fibrosis de órganos se produce de tal manera que se acumula excesivamente matriz extracelular en los órganos a través de invasión o lesión de órganos debido a alguna causa. Cuando el grado de daño de los órganos debido a invasión o lesión es leve, la cicatriz no permanece y los órganos vuelven a la normalidad. Sin embargo, cuando el grado de daño de los órganos debido a invasión o lesión es grave o sostenido, la fibrosis de la cicatriz proporciona un deterioro de su función inherente. Además, induce nueva fibrosis y genera un círculo vicioso de fibrosis, finalmente, se produce la disfunción de los órganos.

Como enfermedad provocada por fibrosis de órganos, se ha conocido la neumonía intersticial (fibrosis pulmonar), etc. La neumonía intersticial es una enfermedad donde la inflamación se produce en la pared alveolar debido a algunas causas; proliferan fibroblastos en los tejidos intersticiales; el pulmón se esclerosa por una sedimentación excesiva de fibras de colágeno; se altera el intercambio de gases; y, finalmente, se produce insuficiencia respiratoria. Después del inicio de la enfermedad, el paciente muere en el plazo de tres a cinco años en promedio. El mecanismo detallado de la patogenia de la neumonía intersticial aún no se ha aclarado y tampoco se ha establecido aún ningún método de tratamiento.

Recientemente se ha notificado que, en ratones modelo de neumonía intersticial inducidos por bleomicina, ONO-1301, que es un agonista del receptor de la prostaglandina I<sub>2</sub> (a continuación, en el presente documento, denominado "PGI<sub>2</sub>"), tiene un efecto inhibitorio para la neumonía intersticial (véase, por ejemplo, el documento no de patente 1).

El presente derivado heterocíclico (1) o una sal farmacéuticamente aceptable ya se ha notificado que es útil para el tratamiento de la hipertensión pulmonar y la arteriosclerosis obstructiva como agonista del receptor de PGI<sub>2</sub> (véase, por ejemplo, el documento de patente 1).

Documento de patente 1: Documento de publicación internacional WO 02/088084

Documento no de patente 1: *American J. Physiology*, 2006, vol. 290, páginas 59 a 65

El documento US 7.205.302 A1 se refiere a compuestos útiles como inhibidores de PGI<sub>2</sub> y a una composición farmacéutica que los comprende.

Nakamura *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 15, n.º 24, págs. 7720-7725 dan a conocer los compuestos A y B como agentes del receptor de PGI<sub>2</sub> para su uso en el tratamiento de arteriosclerosis o embolia.

El documento EP 1 380 307 A1 se refiere a remedios o agentes de prevención para diversas enfermedades asociadas con fibrosis tisular proporcionando fármacos que contienen un agonista de la prostaglandina I<sub>2</sub>.

5 El documento US 6.046.233 A se refiere a un agente para tratar la cardiopatía pulmonar que comprende un derivado de la prostaglandina I<sub>2</sub>.

El documento WO 2006/113704 A2 da a conocer antagonistas de CBI de heteroarilo sustituido.

10 Murakami, The Journal of the Japanese Respiratory Society, 2005, vol. 43, pág. 253 da a conocer compuestos que tienen una acción antagonista del receptor de PGI<sub>2</sub>.

El documento WO 96/26721 A1 se refiere a un remedio para el corazón pulmonar que comprende un derivado de prostaglandina.

15 Bataller y Brenner, The Journal of Clinical Investigation, vol. 115, núm. 2, págs. 209-218 (2005) resume los avances recientes en el estudio de la patogenia y el diagnóstico de la fibrosis hepática y comenta las estrategias actuales con antibióticos.

## 20 **[Divulgación de la invención]**

### **[Problemas que la invención ha de solucionar]**

El objeto principal de la presente invención es proporcionar un inhibidor de fibrosis novedoso.

25

### **[Medios para solucionar los problemas]**

Los presentes inventores han encontrado que el presente derivado heterocíclico (1) tiene un efecto inhibidor del crecimiento de fibroblastos y han logrado la presente invención.

30

Un ejemplo de la presente invención es un inhibidor de fibrosis que contiene el presente derivado heterocíclico (1) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como principio activo.

35

### **[Mejor modo para llevar a cabo la invención]**

En el presente derivado heterocíclico (1), el preferido es aquel donde

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son iguales o diferentes y cada uno representa fenilo opcionalmente sustituido, y los sustituyentes son iguales o diferentes y de uno a tres sustituyentes seleccionados del grupo compuesto por átomo de halógeno, alquilo y alcoxilo;

40

R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son iguales o diferentes y cada uno representa átomo de hidrógeno o alquilo;

R<sup>5</sup> representa átomo de hidrógeno;

45

Y representa N;

A representa NR<sup>6</sup>, y R<sup>6</sup> representa alquilo;

D representa alquileno;

50

E representa un enlace sencillo;

G representa O; y

55

Q representa carboxilo o un grupo representado por la siguiente fórmula (4), y R<sup>7</sup> representa amino, monoalquilamino, dialquilamino, hidroxilo, o cualquiera del grupo de los siguientes 1) a 4) que están opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en átomo de halógeno, alquilo, haloalquilo, arilalquilo, alcoxilo, alquiltio, alcoxialquilo, alquilsulfonilo, hidroxilo, amino, monoalquilamino, dialquilamino, carboxilo, ciano y nitro;

60

1) alquilo,

2) arilo,

3) ariloxilo, y

65

4) grupo heterocíclico.

Para ser más específico, se proporcionan ácido 2-{4-[N-(5,6-difenil-pirazin-2-il)-N-isopropilamino]butiloxi}acético (a continuación en el presente documento, denominado “el compuesto A”) y 2-{4-[N-(5,6-difenilpirazin-2-il)-N-isopropilamino]butiloxi}-N-(metilsulfonil)acetamida (a continuación en el presente documento, denominado “el compuesto B”) por la presente invención tal como se reivindica en la reivindicación 1 adjunta al presente documento.

En cuanto al “alquilo” dado a conocer con el presente documento, puede ejemplificarse aquel que es lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propil, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, n-hexilo o isohexilo. Particularmente, es preferible alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono.

En cuanto a un resto alquilo en “haloalquilo”, “arilalquilo”, “alquiltio”, “alcoxialquilo”, “alquilsulfonilo”, “monoalquilamino”, “dialquilamino”, “monoalquilcarbazoilo” y “dialquilcarbamoilo” en la presente invención, puede ejemplificarse aquel que es el mismo que el alquilo ya mencionado.

En cuanto al “alcoxilo” dado a conocer con el presente documento, puede ejemplificarse aquel que es lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, por ejemplo, metoxilo, etoxilo, n-propoxilo, isopropoxilo, n-butoxilo, isobutoxilo, sec-butoxilo, terc-butoxilo, n-pentiloxilo, isopentiloxilo, n-hexiloxilo o isohexiloxilo. Particularmente, es preferible alcoxilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono.

En cuanto a un resto alcoxilo en “alcoxycarbonilo” y “alcoxialquilo” dados a conocer con el presente documento, puede ejemplificarse aquel que es el mismo que el alcoxilo ya mencionado.

En cuanto al “alqueno” dado a conocer con el presente documento, puede ejemplificarse aquel que es lineal o ramificado que tiene de 2 a 6 átomos de carbono, por ejemplo, vinilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 4-pentenilo, 4-metil-3-pentenilo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 4-hexenilo o 5-hexenilo. Particularmente, es preferible alqueno que tiene 3 o 4 átomos de carbono.

En cuanto al “cicloalquilo” dado a conocer con el presente documento, puede ejemplificarse aquel que tiene de 3 a 8 átomos de carbono, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo o ciclooctilo. Particularmente, es preferible cicloalquilo que tiene de 5 a 7 átomos de carbono.

En cuanto al “átomo de halógeno” dado a conocer con el presente documento, puede ejemplificarse átomo de flúor, átomo de cloro, átomo de bromo y átomo de yodo.

En cuanto al “arilo” dado a conocer con el presente documento, puede ejemplificarse aquel que tiene de 6 a 10 átomos de carbono, por ejemplo, fenilo, 1-naftilo o 2-naftilo. Particularmente, es preferible fenilo.

En cuanto al resto arilo en “arilalquilo” y “ariloxilo” dados a conocer con el presente documento, puede ejemplificarse aquel que es el mismo que el arilo ya mencionado.

En cuanto al “alquileo” dado a conocer con el presente documento, puede ejemplificarse aquel que es lineal o ramificado que tiene de 1 a 8 átomos de carbono, por ejemplo, metileno, etileno, 1-metiletileno, 2-metiletileno, trimetileno, tetrametileno, pentametileno, hexametileno, heptametileno u octametileno. Particularmente, es preferible alquileo que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, y es más preferible alquileo que tiene 4 átomos de carbono.

En cuanto al “alqueniilo” dado a conocer con el presente documento, puede ejemplificarse aquel que es lineal o ramificado que tiene de 2 a 8 átomos de carbono, por ejemplo, etileno, 1-propeniilo, 2-propeniilo, 1-buteniilo, 3-buteniilo, 1-penteniilo, 2-penteniilo, 3-penteniilo, 4-penteniilo, 4-metil-3-penteniilo, 1-hexeniilo, 2-hexeniilo, 3-hexeniilo, 4-hexeniilo, 5-hexeniilo, 1-hepteniilo, 2-hepteniilo, 3-hepteniilo, 4-hepteniilo, 5-hepteniilo, 6-hepteniilo, 1-octeniilo, 2-octeniilo, 3-octeniilo, 4-octeniilo, 5-octeniilo, 6-octeniilo o 7-octeniilo. Particularmente, es preferible alqueniilo que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, y es más preferible alqueniilo que tiene 4 átomos de carbono.

En cuanto al “grupo heterocíclico” dado a conocer con el presente documento, pueden ejemplificarse los siguientes (1) o (2).

(1) Un grupo de anillo aromático de cinco a seis miembros que tiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados de átomo de nitrógeno, átomo de oxígeno y átomo de azufre, o un anillo condensado de benceno del mismo y átomo de nitrógeno y átomo de azufre pueden formar un óxido cuando un átomo constituyente del anillo es átomo de nitrógeno o átomo de azufre. Ejemplos de los mismos incluyen 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-indolilo, 2-furanilo, 3-furanilo, 3-benzofuranilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 3-benzotienilo, 1,3-oxazol-2-ilo, 4-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-benzotiazolilo, 1-imidazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, 2-bencimidazolilo, 1H-1,2,4-triazol-1-ilo, 1H-tetrazol-5-ilo, 2H-tetrazol-5-ilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 3-pirazolilo, 2-pirimidinilo-4-pirimidinilo, 2-pirazinilo y 1,3,5-triazin-2-ilo.

(2) Un grupo de anillo saturado de cuatro a ocho miembros que tiene opcionalmente de uno a cuatro átomos de

nitrógeno, átomos de oxígeno o átomos de azufre iguales o diferentes, o un anillo condensado de benceno del mismo, y átomo de nitrógeno y átomo de azufre puede formar un óxido cuando un átomo constituyente del anillo es átomo de nitrógeno o átomo de azufre. Ejemplos de los mismos incluyen piperidino, piperazinilo, 3-metilpiperazin-1-ilo, homopiperazinilo, morfolino, tiomorfolino, 1-pirrolidinilo, 2-pirrolidinilo y 2-tetrahidrofurano.

5 El presente derivado heterocíclico (1) puede sintetizarse mediante el procedimiento mencionado en el documento de patente 1 anteriormente mencionado (documento de publicación internacional WO 02/088084).

10 Aunque el presente derivado heterocíclico (1) puede usarse como producto farmacéutico tan solo en una forma de ácido o base libre, también es posible usarlo convirtiéndolo en una forma de una sal farmacéuticamente aceptable por un método conocido.

15 Los ejemplos de la "sal" cuando el presente derivado heterocíclico (1) muestra basicidad incluyen una sal con ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido fluorhídrico o ácido bromhídrico y con ácido orgánico tal como ácido acético, ácido tartárico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenosulfónico o ácido canforsulfónico.

20 Los ejemplos de la "sal" cuando el presente derivado heterocíclico (1) muestra acidez incluyen sal de metales alcalinos tal como la sal de sodio o sal de potasio, y sal de metales alcalinotérreos tal como sal de calcio.

25 Existen isómeros geométricos (sustancias Z y E) en el presente derivado heterocíclico (1) y cada uno de los isómeros geométricos y una mezcla de los mismos también se incluyen en el presente derivado heterocíclico (1). Alguno del presente derivado heterocíclico (1) tiene carbono(s) asimétrico(s) y cada uno de los isómeros ópticos y la sustancia racémica de los mismos también se incluyen en el presente derivado heterocíclico (1). Un isómero óptico puede producirse sometiendo la sustancia racémica preparada como anteriormente a una resolución óptica mediante un método conocido usando un ácido ópticamente activo (tal como ácido tartárico, ácido benzoiltartárico, ácido mandélico o ácido 10-canforsulfónico) utilizando la basicidad o usando un compuesto ópticamente activo previamente preparado como material.

30 El inhibidor de fibrosis de la presente invención (es decir, "compuesto A" y "compuesto B") puede usarse para el tratamiento de las siguientes enfermedades, por ejemplo, en las que está implicada la fibrosis de órganos o tejidos.

35 (1) Enfermedades renales

Nefritis tubulointersticial

(2) Enfermedades respiratorias

40 Neumonía intersticial (fibrosis pulmonar)

(3) Enfermedades gastrointestinales

45 Hepatocirrosis, pancreatitis crónica y cáncer gástrico escirroso

(4) Enfermedades cardiovasculares

Fibrosis miocárdica

50 (5) Enfermedades óseas y articulares

Fibrosis de la médula ósea y artritis reumatoide

55 (6) Enfermedades cutáneas

Cicatriz postquirúrgica, cicatriz por quemadura, queloide, cicatriz hipertrófica y esclerodermia

(7) Enfermedades obstétricas

60 Histeromioma

(8) Enfermedades urológicas

Hipertrofia prostática

65 (9) Otras enfermedades

Enfermedad de Alzheimer, peritonitis esclerosante, diabetes tipo I y adhesión postquirúrgica.

5 Por tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un derivado heterocíclico seleccionado del "compuesto A" y "compuesto B" o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de neumonía intersticial (fibrosis pulmonar), hepatocirrosis y esclerodermia.

10 El inhibidor de fibrosis de la presente invención es el presente derivado heterocíclico (1) tal cual o contenido en un portador farmacéuticamente aceptable, no tóxico e inerte a una tasa que oscila entre el 0,01 y el 99,5% o, preferiblemente, que oscila entre el 0,5 y el 90%.

15 Los ejemplos del portador incluyen diluyente sólido, semisólido o líquido, carga y otros agentes auxiliares para la formulación farmacéutica. Estos pueden usarse solos o como una mezcla de dos o más de los mismos.

20 El inhibidor de fibrosis de la presente invención puede estar en cualquiera de las formas de preparaciones orales tales como polvo, cápsulas, comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar, gránulos, polvo diluido, suspensión, líquido, jarabe, elixir o troscisco y preparaciones parenterales tales como inyección o supositorio en una unidad de dosis sólida o líquida. También puede estar en una forma de una preparación de liberación sostenida. Entre ellas, preparaciones orales tales como comprimidos son particularmente preferibles.

El polvo puede fabricarse haciendo que el presente derivado heterocíclico (1) tenga un tamaño fino apropiado.

25 El polvo diluido puede fabricarse de tal manera que el presente derivado heterocíclico (1) se convierte en un tamaño fino apropiado y luego se mezcla con un portador farmacéutico que se convierte de manera similar en el tamaño fino, tal como hidrato de carbono comestible (por ejemplo, almidón y manitol). Pueden añadirse agente aromatizante, conservante, agente dispersante, agente colorante, perfume, etc. opcionalmente al mismo.

30 Las cápsulas pueden fabricarse de tal manera que el polvo o el polvo diluido que se produce en polvo tal como se mencionó anteriormente o los gránulos que se mencionarán en el artículo para comprimidos se carga(n) en una cubierta de cápsula, tal como una cápsula de gelatina. También es posible fabricar de tal manera que el artículo en polvo se mezcle con un lubricante o un agente fluidificante tal como sílice coloidal, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio o polietilenglicol sólido seguido por someterlo a una operación de relleno. Cuando se añade un agente disgregante o agente solubilizante tal como carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de calcio, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución, croscarmelosa sódica, carboximetilalmidón sódico, carbonato de calcio o carbonato de sodio, la eficacia del producto farmacéutico cuando se ingieren las cápsulas puede mejorarse. También es posible que el polvo fino del presente derivado heterocíclico (1) se suspenda/disperse en aceite vegetal, polietilenglicol, glicerol o tensioactivo y se envuelva con una lámina de gelatina para dar una preparación de cápsula blanda.

40 Los comprimidos pueden fabricarse de tal manera que se prepara una mezcla en polvo mediante la adición de un relleno y se convierte en gránulos o trozos y luego se añade un agente disgregante o un lubricante a lo mismo, seguido por la conversión en comprimidos.

45 La mezcla en polvo puede fabricarse mezclando una sustancia en polvo apropiadamente con el diluyente o base anterior. Si es necesario, es posible añadir un aglutinante (tal como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, gelatina, polivinilpirrolidona o poli (alcohol vinílico)), un agente retardante de la disolución (tal como parafina), un agente reabsorbente (tal como una sal cuaternaria), un adsorbente (tal como bentonita o caolín), etc. al mismo.

50 La mezcla en polvo puede convertirse en gránulos de tal manera que se humedece en primer lugar usando, por ejemplo, jarabe, pasta de almidón, goma arábica, disolución de celulosa o disolución de polímero, se mezcla con agitación y se seca seguido por trituración. En lugar de convertir el polvo en gránulos como tal, también es posible que el polvo se aplique a una máquina de preparación de comprimidos y el trozo resultante en una forma incompleta se triture para dar gránulos. Cuando se añade un lubricante tal como ácido esteárico, estearato, talco o aceite mineral a los gránulos preparados como tales, puede impedirse la adherencia de los gránulos entre sí.

60 Los comprimidos también pueden fabricarse de tal manera que el presente derivado heterocíclico (1) se mezcla con un portador inerte fluido y luego se convierte directamente en comprimidos sin realizar las etapas anteriores de conversión en gránulos o trozos.

65 Los comprimidos preparados como tales pueden someterse a recubrimiento con película o recubrimiento con azúcar. También es posible aplicar una capa protectora transparente o semitransparente que comprende una película de laca bien cerrada, una capa que comprende azúcar o material de polímero o una capa pulida que comprende cera.

En otras preparaciones orales tales como líquido, jarabe, troscisco o elixir, también es posible preparar una forma

unitaria de dosis donde una cantidad predeterminada de la misma contiene una cantidad predeterminada del presente derivado heterocíclico (1).

5 El jarabe puede fabricarse disolviendo el presente derivado heterocíclico (1) en una disolución acuosa apropiada de sabor. El elixir puede fabricarse usando un portador alcohólico no tóxico.

10 La suspensión puede fabricarse dispersando el presente derivado heterocíclico (1) en un portador no tóxico. Si es necesario, es posible añadir un agente solubilizante o un emulsionante (tal como alcohol isoestearílico etoxilado o éster de polioxietilensorbitol), un conservante o un agente que aporta sabor (tal como aceite de menta o sacarina) al mismo.

15 Si es necesario, la formulación unitaria de dosis para administración oral puede convertirse en microcápsulas. La formulación anterior también puede recubrirse o incrustarse en polímero o cera para obtener una acción prolongada o liberación sostenida del principio activo.

20 La preparación parenteral puede estar en forma de unidad de dosis líquida para inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa, tal como en forma de disolución o suspensión. La preparación parenteral puede fabricarse de tal manera que una cantidad predeterminada del presente derivado heterocíclico (1) se suspende o disuelve en un portador líquido no tóxico que cumple con el propósito de la inyección tal como medio acuoso u oleoso y luego se esteriliza la suspensión o disolución. Puede añadirse a la misma una sal no tóxica o una disolución de la misma para hacer que la disolución inyectable sea isotónica. También es posible añadir un estabilizador, un conservante, un emulsionante y similares.

25 El supositorio puede fabricarse disolviendo o suspendiendo el presente derivado heterocíclico (1) en un sólido de baja fusión y soluble o insoluble en agua tal como polietilenglicol, grasa de cacao, grasa/aceite semisintético (tal como Witepsol (marca comercial registrada)), éster superior (tal como palmitato de miristilo)) o una mezcla de los mismos.

30 Aunque la dosis del inhibidor de fibrosis de la presente invención puede variar dependiendo del estado de un paciente, tal como el peso corporal o la edad, la vía de administración o el grado de síntoma, un intervalo de 0,01 mg a 1000 mg/día como cantidad del presente derivado heterocíclico (1) es generalmente adecuado para un adulto y un intervalo de 0,1 mg a 100 mg es más preferible. En algunos casos, una dosis inferior a la anterior puede ser suficiente o, por otro lado, puede ser necesaria una dosis superior a la anterior. También es posible administrar de una a varias veces al día o administrar con un intervalo de uno a varios días.

### 35 [Ejemplos]

La presente invención se ilustrará ahora con más detalle por medio de los siguientes ejemplos de prueba, aunque la presente invención no se limita al alcance mencionado en los ejemplos.

#### 40 Ejemplo de prueba 1

##### (1) Métodos

45 Se cultivaron fibroblastos de pulmón humano (fabricados por Lonza Walkersville; a continuación en el presente documento, se usará el mismo producto) en medio de crecimiento, que consistía en medio basal para fibroblastos de pulmón humano (fabricados por Lonza Walkersville; a continuación en el presente documento, se usará el mismo producto y se denominará "medio basal") con un conjunto de factores adicionales FGM-2 (fabricado por Lonza Walkersville; a continuación en el presente documento, se usará el mismo producto) en la condición de 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub>. Se sembraron los fibroblastos de pulmón humano en una placa de 96 pocillos a 1 x 10<sup>3</sup> célula/pocillo y se incubaron durante la noche en medio de crecimiento.

50 Se lavaron los fibroblastos una vez con 100 µl de solución salina tamponada con fosfato (fabricada por Nissui Seiyaku; a continuación en el presente documento, se usará el mismo producto) y se añadieron 100 µl de medio basal seguido por incubación durante 24 horas. Se lavaron además con 100 µl de solución salina tamponada con fosfato una vez y luego se añadió medio basal en una cantidad de 80 µl/pocillo. Se añadieron diez µl de una disolución 100 µM del compuesto A o el compuesto B a cada pocillo y se incubaron durante 2 horas. La disolución añadida a la misma se preparó de tal manera que el compuesto A o B se disolvió previamente en dimetilsulfóxido (DMSO) y la disolución 10 mM resultante se diluyó 100 veces con medio basal. Para el grupo de control no estimulado y el grupo de control, se usó DMSO que se diluyó 100 veces con medio basal.

60 Luego se añadió una disolución de 100 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) (fabricado por Pepro Tech) en una cantidad de 10 µl a cada pocillo y se incubó durante 48 horas. Para un grupo de control no estimulado, se usó el medio basal.

65 Después de incubar durante 48 horas, se midió la absorbancia a 490 nm usando el ensayo Cell Titter 96, AQueous

(fabricado por Promega) para el análisis de la actividad de proliferación celular. Para la medición de la absorbancia, se usó un lector de microplacas (Benchmark, fabricado por Bio-Rad; a continuación en el presente documento, se usará el mismo).

## 5 (2) Resultados

Tal como se muestra en figura 1, la actividad de proliferación celular de los fibroblastos de pulmón humano aumentó significativamente por estimulación con EGF. Por el contrario, en las células tratadas con los compuestos A o B, la actividad de proliferación celular disminuyó significativamente en comparación con el grupo de control.

10

### Ejemplo de prueba 2

#### (1) Métodos

15 Se incubaron fibroblastos de pulmón humano en medio de crecimiento en la condición de 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub>. Se sembraron los fibroblastos de pulmón humano en una placa de 96 pocillos a 3 x 10<sup>3</sup> célula/pocillo y se incubaron durante la noche en medio de crecimiento.

20 Se lavaron los fibroblastos una vez con 100 µl de solución salina tamponada con fosfato. Luego se añadió a la misma medio basal y se realizó la incubación durante 24 horas. Se lavaron además con 100 µl de solución salina tamponada con fosfato una vez y luego se añadió medio basal en una cantidad de 80 µl/pocillo. Se añadieron diez µl de una disolución 1 µM del compuesto A a cada pocillo y se incubaron durante 2 horas. La disolución usada para lo mismo se preparó de tal manera que el compuesto A se disolvió previamente en DMSO y la disolución 1 mM resultante se diluyó 100 veces con medio basal. Para el grupo de control no estimulado y el grupo de control, se usó DMSO que se diluyó 100 veces con el medio basal.

25

Luego se añadió una disolución de 100 ng/ml de factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) (fabricado por Chemicon) en una cantidad de 10 µl a cada pocillo y se incubó durante 48 horas. Para un grupo de control no estimulado, se usó el medio basal.

30

Después de incubar durante 48 horas, se midió la absorbancia a 490 nm, de la misma manera que en el ejemplo de prueba 1, usando un reactivo para el análisis de la actividad de proliferación celular. Para la medición de la absorbancia, se usó un lector de microplacas.

## 35 (2) Resultados

Tal como se muestra en la figura 2, la actividad de proliferación celular de los fibroblastos de pulmón humano aumentó significativamente por estimulación con TGF- $\alpha$ . Por el contrario, en las células tratadas con el compuesto A, la actividad de proliferación celular disminuyó significativamente en comparación con la del grupo de control.

40

### Ejemplo de prueba 3

#### (1) Métodos

45 Se sembraron fibroblastos de pulmón humano en una placa de 96 pocillos a 5 x 10<sup>3</sup> células/pocillo y se incubaron en el medio de crecimiento de la misma forma que en el ejemplo de prueba 1 durante la noche. Se lavaron los fibroblastos una vez con 100 µl de medio basal y se añadieron 100 µl de medio basal al mismo, seguido por incubación durante 24 horas. Se lavaron además una vez con 100 µl de medio basal y luego se añadieron 80 µl/pocillo de medio basal. Se añadió una disolución 0,1, 1, 10 o 100 µM del compuesto A en una cantidad de 10 µl a cada pocillo. La disolución usada para el mismo se preparó de tal manera que el compuesto A se disolvió previamente en DMSO y se ajustó a una concentración de 10 µM, 100 µM, 1 mM o 10 mM, seguido por una dilución de 100 veces con el medio basal. Para el grupo de control no estimulado y el grupo de control, se añadió DMSO que se diluyó 100 veces con medio basal en una cantidad de 10 µl. Después de incubar durante 2 horas, se añadieron 10 µl de factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 100 ng/ml (TGF $\beta$ 1) (fabricado por Pepro Tech; a continuación en el presente documento, se usará el mismo producto) y, para el grupo de control no estimulado, se añadieron 10 µl de medio basal. Después de incubar durante 48 horas, se recuperó el medio para medir la concentración del péptido C-terminal de pro-colágeno de tipo I (PIP) en el medio, y después de añadir 100 µl del medio basal, se midió la actividad de proliferación celular usando bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolilo)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT) (fabricado por Nacalai Tesque). La medición de la actividad de proliferación celular se realizó de tal manera que se añadieron 10 µl de una disolución madre de MTT 5 mg/ml a cada pocillo, y después de la incubación durante 4 horas, se añadieron 100 µl de una disolución en isopropanol 0,04 M de ácido clorhídrico a cada pocillo, seguido por la medición de la absorbancia a 595 nm (longitud de onda de referencia: 655 nm) usando un lector de microplacas. La concentración de PIP después de la incubación durante 48 horas se midió usando un kit de EIA de péptido C de pro-colágeno de tipo I (PIP) (fabricado por Takara; a continuación en el presente documento, se usará el mismo) según el manual adjunto al mismo. La evaluación de esta prueba se llevó a cabo usando el valor (índice para la producción de colágeno) calculado como valor relativo, donde un valor

65

medio del grupo de control no estimulado se definió como 1 después de corregir el valor medido de la concentración de PIP para el valor de actividad de proliferación celular (absorbancia).

## (2) Resultados

5 Tal como se muestra en figura 3, la producción de colágeno aumentó significativamente en los fibroblastos de pulmón humano mediante estimulación con TGF  $\beta$ 1. Por el contrario, en las células tratadas con el compuesto A, la producción de colágeno disminuyó significativamente en comparación con la del grupo de control.

## 10 Ejemplo de prueba 4

### (1) Métodos

15 Se sembraron fibroblastos de pulmón humano en una placa de 24 pocillos a  $1 \times 10^5$  células/pocillo y se incubaron en medio de crecimiento de la misma forma que en el ejemplo de prueba 1 durante la noche. Se lavaron fibroblastos una vez con 500  $\mu$ l de medio basal, y se les añadieron 500  $\mu$ l de medio basal seguido por incubación durante 24 horas. Se lavaron además una vez con 500  $\mu$ l de medio basal y luego se añadieron 400  $\mu$ l/pocillo de medio basal. Se añadió una disolución 1, 10 o 100  $\mu$ M del compuesto A preparada de la misma manera que en el ejemplo de prueba 3 en una cantidad de 50  $\mu$ l a cada pocillo. Para el grupo de control no estimulado y el grupo de control, se añadió DMSO que se diluyó 100 veces con medio basal en una cantidad de 50  $\mu$ l. Después de incubar durante 2 horas, se añadieron 20 50  $\mu$ l de una disolución de TGF  $\beta$ 1 100 ng/ml a cada pocillo y, para el grupo de control no estimulado, se añadieron 50  $\mu$ l de medio basal. Después de incubar durante 24 horas, se extrajo el ARN usando un sistema de aislamiento de ARN total SV (fabricado por Invitrogen) y se sintetizó ADNc de primera hebra partir del ARN usando una SuperScript III (fabricada por Invitrogen). Usando el ADNc preparado como anteriormente como molde, se midió la cantidad expresada de ARNm para la cadena  $\alpha$ 1 de colágeno de tipo I (COL 1 $\alpha$ 1), la cadena  $\alpha$ 2 de colágeno de tipo I (COL 1 $\alpha$ 2), actina de músculo liso  $\alpha$  (ACTA), TGF  $\beta$ 1 y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) mediante un método de PCR cuantitativa en tiempo real. La PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo usando Platinum SYBR Green QPCR Super-mix-UDG con ROX (fabricado por Invitrogen) y un cebador específico para cada gen según el manual adjunto al Platinum SYBR Green QPCR Super-mix-UDG con ROX usando un instrumento ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). La evaluación de esta prueba se llevó a cabo usando el valor (nivel de expresión de ARNm) calculado como un valor relativo donde un valor medio del grupo de control no estimulado se definió como 1 después de corregir el valor expresado de mRNA de cada gen para la cantidad expresada de ARNm de GAPDH.

### (2) Resultados

35 Tal como se muestra en las figuras 4 a 7, en los fibroblastos de pulmón humano, el nivel de expresión de cada ARNm aumentó por estimulación con TGF  $\beta$ 1. Por el contrario, en las células tratadas con el compuesto A, el nivel de cada ARNm disminuyó en comparación con el del grupo de control.

## 40 Ejemplo de prueba 5

### (1) Métodos

45 Se sembraron células intersticiales renales de rata (células NRF 49F) en una placa de 96 pocillos a  $1 \times 10^4$  células/pocillo y se incubaron en un medio esencial mínimo (medio MEM; fabricado por Nippon Seiyaku; a continuación en el presente documento, se usará el mismo producto) que contenía el 10% de suero fetal bovino (fabricado por JRH Bioscience; a continuación en el presente documento, se usará el mismo producto) en la condición de 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub> durante la noche. Se lavaron las células una vez con un medio MEM que no contenía suero fetal bovino (a continuación en el presente documento, denominado "medio MEM libre de suero"), y se añadieron al mismo 100  $\mu$ l del medio MEM libre de suero seguido por incubación durante 24 horas. Después de lavar con medio MEM libre de suero una vez, se añadió medio MEM libre de suero en una cantidad de 80  $\mu$ l/pocillo. Se añadió una disolución 100  $\mu$ M del compuesto A preparada por el mismo método que en el ejemplo de prueba 1 en una cantidad de 10  $\mu$ l a cada pocillo. Para el grupo de control no estimulado y el grupo de control, se añadió DMSO que se diluyó 100 veces con medio MEM libre de suero en una cantidad de 10  $\mu$ l. Después de incubar durante 2 horas, se añadieron 10  $\mu$ l de un factor de crecimiento derivado de las plaquetas BB 100 ng/ml (PDGF BB; fabricado por Sigma) a cada pocillo y, para el grupo de control no estimulado, se añadieron 10  $\mu$ l de medio MEM libre de suero seguido por incubación. Después de incubar durante 48 horas, se midió la actividad de proliferación celular (absorbancia) mediante el método de MTT de la misma forma que en el ejemplo de prueba 3. La evaluación de esta prueba se llevó a cabo usando el valor (nivel de proliferación celular) expresado como un valor relativo donde un valor medio de absorción del grupo de control no estimulado se definió como 1.

### (2) Resultados

65 Tal como se muestra en la figura 8, en las células intersticiales renales de rata, el nivel de proliferación celular aumentó significativamente por estimulación con PDGF BB. Por el contrario, en las células tratadas con el compuesto A, el nivel

de proliferación celular disminuyó significativamente en comparación con el grupo de control.

#### Ejemplo de prueba 6

##### 5 (1) Métodos

Se sembraron fibroblastos de piel humana (fabricados por Kurabo; a continuación en el presente documento, se usará el mismo producto) en una placa de 96 pocillos a  $5 \times 10^3$  células/pocillo y se incubaron en un medio de Eagle modificado por Dulbecco (medio DMEM; fabricado por Nippon Seiyaku; a continuación en el presente documento, se usará el mismo producto) que contenía el 10% de suero fetal bovino en la condición de 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub> durante la noche. Se lavaron los fibroblastos de piel humana una vez con un medio DMEM que no contenía suero fetal bovino (a continuación en el presente documento, denominado "medio DMEM libre de suero"), y se añadieron 100 µl de medio DMEM libre de suero seguido por incubación durante 24 horas. Después de lavar con medio DMEM libre de suero una vez más, se añadió medio DMEM libre de suero en una cantidad de 80 µl/pocillo. Se añadieron 10 µl de la disolución 0,1, 1, 10 o 100 µM del compuesto A preparada por el mismo método que en el ejemplo de prueba 3 a cada pocillo. Para el grupo de control no estimulado y el grupo de control, se añadió DMSO que se diluyó 100 veces con medio DMEM libre de suero en una cantidad de 10 µl cada una seguido por incubación. Después de incubar durante 2 horas, se añadieron 10 µl de una disolución de TGF β1 100 ng/ml a cada pocillo y, para el grupo de control no estimulado, se añadieron 10 µl de medio MEM libre de suero. Después de incubar durante 48 horas, se midió la actividad de proliferación celular (absorbancia) por el método de MTT, y se midió la concentración de PIP en el medio de la misma forma que en el ejemplo de prueba 3. La evaluación de esta prueba se llevó a cabo usando el valor (índice para la producción de colágeno) calculado como un valor relativo donde un valor medio en el grupo de control no estimulado se definió como 1 después de corregir el valor medido de la concentración de PIP usando el valor de actividad de proliferación celular (absorbancia).

##### 25 (2) Resultados

Tal como se muestra en la figura 9, en los fibroblastos de piel humana, la producción de colágeno aumentó significativamente por estimulación con TGF β1. Por el contrario, en las células tratadas con el compuesto A, la producción de colágeno disminuyó significativamente en comparación con la del grupo de control.

[Breve descripción de los dibujos]

##### 35 [Figura 1]

La figura 1 muestra los efectos inhibidores del compuesto A y el compuesto B sobre la proliferación de fibroblastos de pulmón humano estimulados por EGF. Una ordenada muestra la absorbancia.

##### 40 [Figura 2]

La figura 2 muestra los efectos inhibidores del compuesto A y el compuesto B sobre la proliferación de fibroblastos de pulmón humano estimulados por TGFα. Una ordenada muestra la absorbancia.

##### 45 [Figura 3]

La figura 3 muestra el efecto inhibidor del compuesto A sobre la producción de colágeno en fibroblastos de pulmón humano estimulados por TGF β1. Una ordenada muestra el valor calculado como un valor relativo donde un valor medio en el grupo de control no estimulado se definió como 1 después de corregir el valor medido para la concentración de PIP por el valor de actividad de proliferación celular (absorbancia).

##### 50 [Figura 4]

La figura 4 muestra el efecto inhibidor del compuesto A sobre la expresión de ARNm de COL 1α1 en fibroblastos de pulmón humano estimulados por TGF β1. Una ordenada muestra un valor relativo donde un valor medio en el grupo de control no estimulado se definió como 1 después de corregir la cantidad expresada de ARNm por COL 1α1 usando la cantidad expresada de ARNm por GAPDH.

##### [Figura 5]

60 La figura 5 muestra el efecto inhibidor del compuesto A sobre la expresión de ARNm de COL 1α2 en fibroblastos de pulmón humano estimulados por TGF β1. Una ordenada muestra un valor relativo donde un valor medio en el grupo de control no estimulado se definió como 1 después de corregir la cantidad expresada de ARNm por COL 1α2 usando la cantidad expresada de ARNm por GAPDH.

##### 65 [Figura 6]

5 La figura 6 muestra el efecto inhibitor del compuesto A sobre la expresión de ARNm de ACTA en fibroblastos de pulmón humano estimulados por TGF  $\beta$ 1. Una ordenada muestra un valor relativo donde un valor medio en el grupo de control no estimulado se definió como 1 después de corregir la cantidad expresada de ARNm por ACTA usando la cantidad expresada de ARNm por GAPDH.

[Figura 7]

10 La figura 7 muestra el efecto inhibitor del compuesto A sobre la expresión de ARNm de TGF  $\beta$ 1 en fibroblastos de pulmón humano estimulados por TGF  $\beta$ 1. Una ordenada muestra un valor relativo donde un valor medio en el grupo de control no estimulado se definió como 1 después de corregir la cantidad expresada de ARNm por TGF  $\beta$ 1 usando la cantidad expresada de ARNm por GAPDH.

[Figura 8]

15 La figura 8 muestra el efecto inhibitor del compuesto A sobre la proliferación de células intersticiales renales de rata estimuladas por PDGF BB. Una ordenada muestra un valor relativo donde un valor medio de absorbancia en el grupo de control no estimulado se definió como 1.

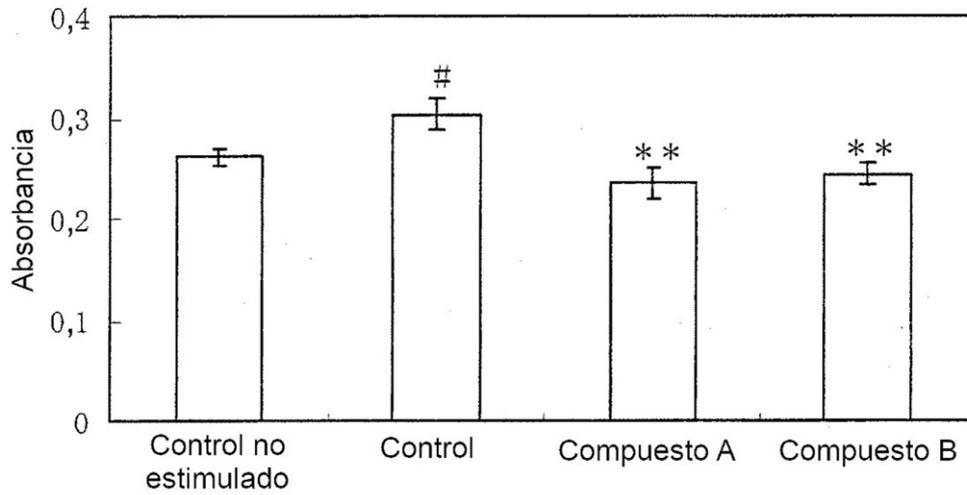
20 [Figura 9]

25 La figura 9 muestra el efecto inhibitor del compuesto A sobre la producción de colágeno en fibroblastos de piel humana estimulados por TGF  $\beta$ 1. Una ordenada muestra un valor calculado como un valor relativo donde un valor medio en el grupo de control no estimulado se definió como 1 después de corregir el valor medido de la concentración de PIP por el valor de la actividad de proliferación celular (absorbancia).

**REIVINDICACIONES**

1. Composición farmacéutica que comprende un derivado heterocíclico seleccionado de ácido 2-{4-[N-(5,6-  
5 difenilpirazin-2-il)-N-isopropilamino]butiloxi}acético y 2-{4-[N-(5,6-difenilpirazin-2-il)-N-  
isopropilamino]butiloxi}-N-(metilsulfonil)acetamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como  
principio activo para su uso como un inhibidor de fibrosis.
  
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de una enfermedad  
10 seleccionada del grupo que consiste en neumonía intersticial (fibrosis pulmonar), hepatocirrosis y  
esclerodermia.

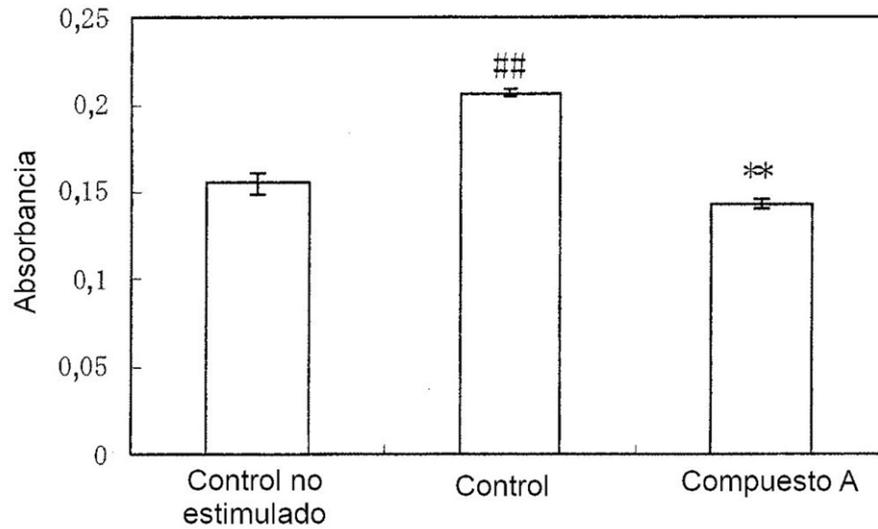
[Fig. 1]



#:  $p < 0,05$  frente a control no estimulado mediante prueba de la t (n = 5)

\*\* :  $p < 0,01$  frente a control mediante prueba de Dunnett (n = 5)

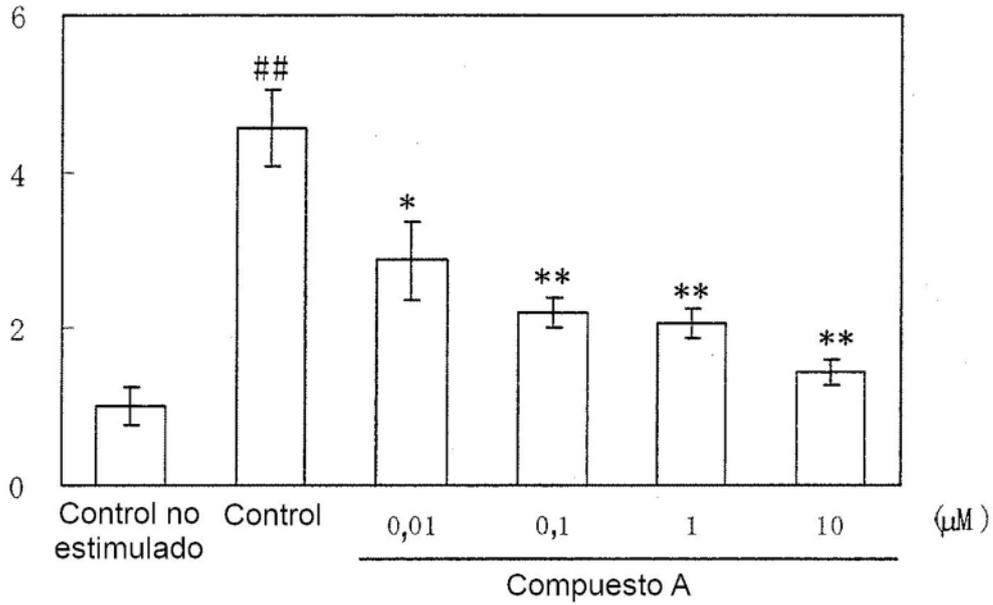
[Fig. 2]



##:  $p < 0,01$  frente a control no estimulado mediante prueba de la t (n = 3)

\*\* :  $p < 0,01$  frente a control mediante prueba de la t (n = 3)

[Fig. 3]

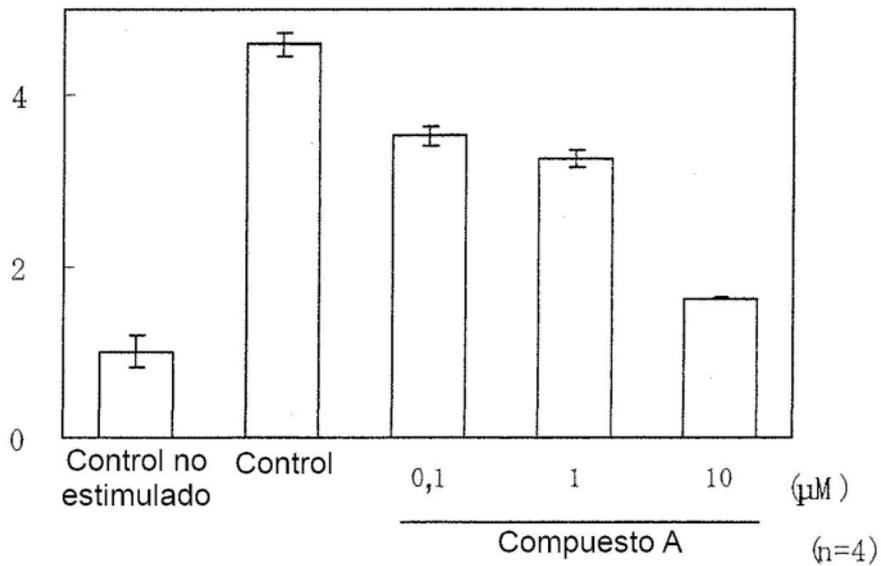


##:  $p < 0,01$  frente a control no estimulado mediante prueba de la t (n = 4)

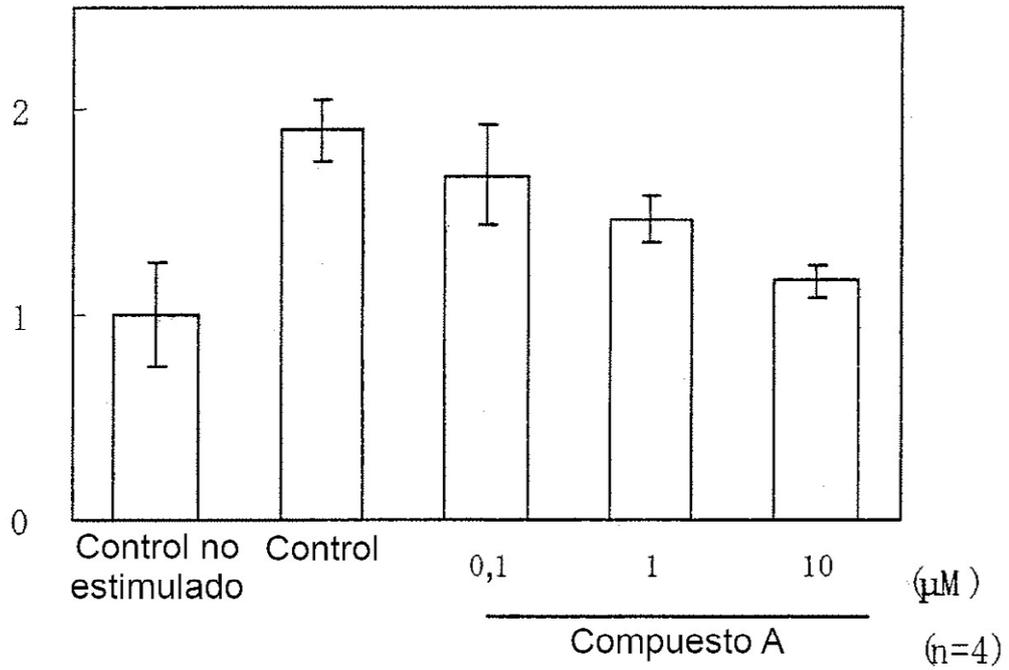
\*:  $p < 0,05$  frente a control mediante prueba de Dunnett

\*\* :  $p < 0,01$  frente a control mediante prueba de Dunnett (n = 4)

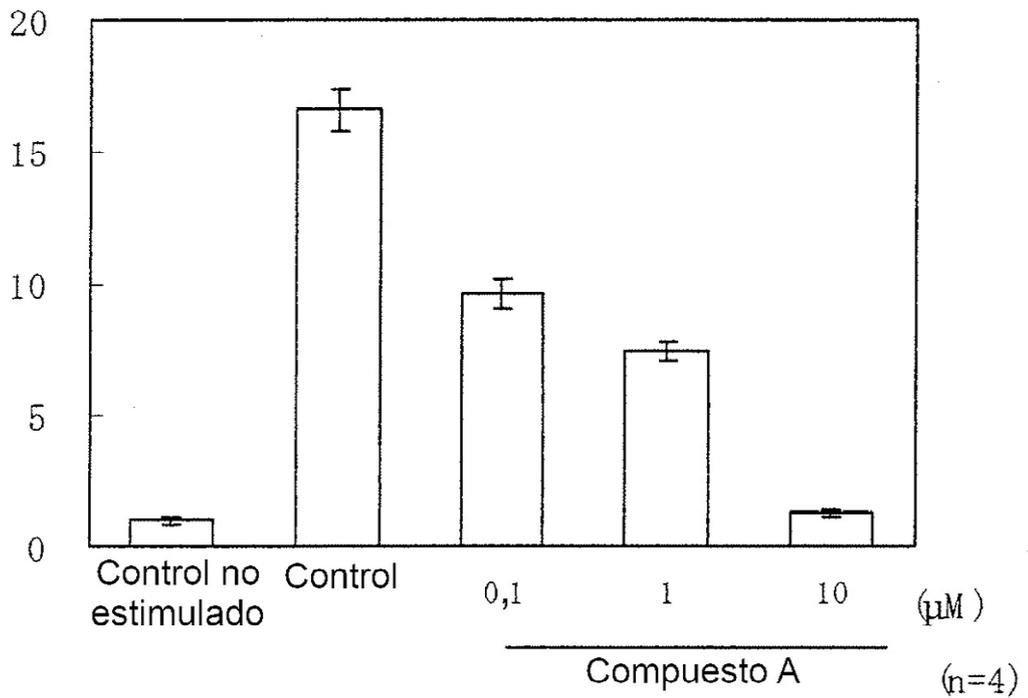
[Fig. 4]



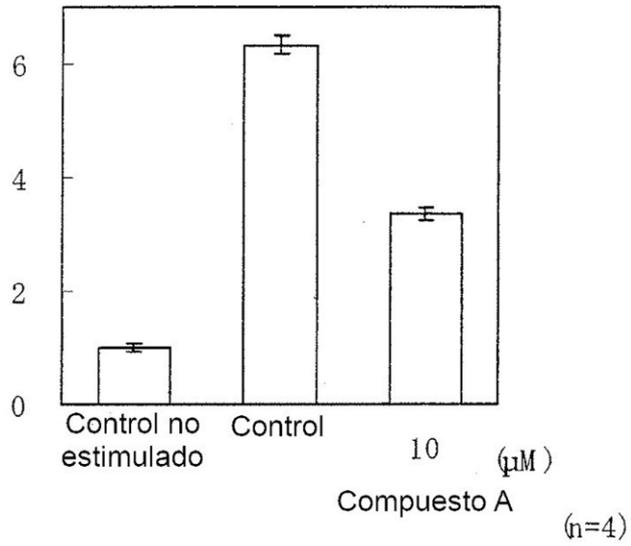
[Fig. 5]



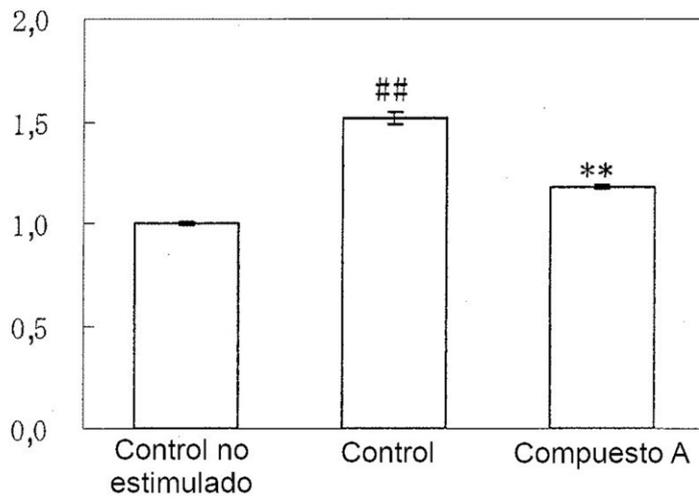
[Fig. 6]



[Fig. 7]



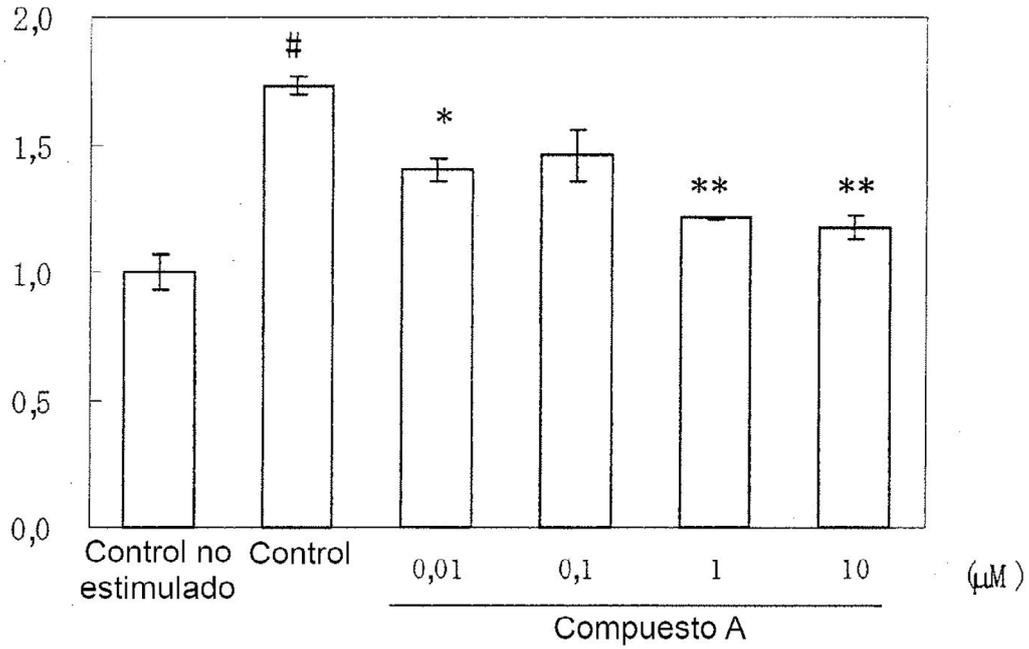
[Fig. 8]



##:  $p < 0,01$  frente a control no estimulado mediante prueba de la t (n = 3)

\*\* :  $p < 0,01$  frente a control mediante prueba de Dunnett (n = 3)

[Fig. 9]



#:  $p < 0,05$  frente a control no estimulado mediante prueba de la t ( $n = 2$ )

\*:  $p < 0,05$  frente a control mediante prueba de Dunnett

\*\* :  $p < 0,01$  frente a control mediante prueba de Dunnett ( $n = 2$ )