

AGENTE TERAPÉUTICO PARA ENFERMEDADES DEL HÍGADO

Campo Técnico

- [1] La presente invención se relaciona con un agente terapéutico para enfermedades del hígado que contiene, como un ingrediente activo, un compuesto a base de pirazol o su sal farmacéuticamente aceptable.

Estado Actual de la Tecnología

- [2] Las enfermedades de hígado graso no alcohólico (NAFLDs, por sus siglas en inglés), que son las enfermedades crónicas del hígado más comunes, se conocen por estar estrechamente asociadas con la diabetes tipo 2, la obesidad y el síndrome metabólico [Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Science 2011; 332:1519-23.].
- [3] Las enfermedades de hígado graso no alcohólico se refieren a afecciones del hígado graso en las cuales grasa neutra en exceso se deposita en el hígado y, en un sentido amplio, incluyen esteatosis simple, esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés) y cirrosis [Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Science 2011; 332:1519-23.].
- [4] Además de la obesidad, la diabetes y la dislipidemia, se considera que las enfermedades de hígado graso no alcohólico son factores importantes del síndrome metabólico, y la mayoría de los pacientes con síndrome metabólico sufren enfermedades de hígado graso no alcohólico [Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, Hobbs HH, Dobbins RL. Am J Physiol Endocrinol Metab 2005; 288: E462-8.]. En general, las enfermedades de hígado graso no alcohólico ocurren cuando la síntesis de grasa neutra supera la digestión de grasa neutra en el hígado, por ejemplo, cuando se aumenta la absorción de ácido graso libre en el hígado o se incrementa la biosíntesis de grasa neutra por el metabolismo de carbohidratos [Birkenfeld AL, Shulman GI. Hepatology 2014; 59:713-23.]. El ácido graso libre, que es un ingrediente para la síntesis de grasa neutra que ocurre en el hígado, se incorpora en el hígado por la biosíntesis dietética o *in*

vivo y se libera de los tejidos adiposos [Musso G, Gambino R, Cassader M. *Prog Lipid Res* 2009; 48:1-26.].

- [5] La inflamación crónica en adipocitos que ocurre debido a la hipernutrición prolongada puede causar lipólisis facilitada, ácido graso y grasa neutra cada vez mayores en la sangre, e infiltración de macrófagos en adipocitos, lo cual tiene como resultado la secreción de TNF- α que es una citocina inflamatoria típica. Esto acarrea una incorporación creciente de ácido graso en el músculo esquelético, lo cual tiene como resultado un incremento en la cantidad de grasa acumulada en los músculos esqueléticos y resistencia a la insulina en los músculos [Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:367-77.].
- [6] En general, las causas de las enfermedades de hígado graso no alcohólico se han explicado con base en una hipótesis de doble evento.
- [7] El primer evento es la deposición de grasas neutras en el hígado debido a la resistencia a la insulina y a un ácido graso libre aumentado. El segundo evento es que el estrés oxidativo causa la peroxidación de la grasa y, por consiguiente, cambios en la inflamación necrótica, que se ha descubierto que induce cambios histológicos conocidos como "esteatohepatitis no alcohólica" [Day CP, James OF. *Gastroenterology* 1998; 114:842-5.].
- [8] Los mecanismos representativos, en los cuales metabolitos lipídicos muestran lesión y toxicidad de los hepatocitos, incluyen estrés del retículo endoplasmático y estrés oxidativo. Cuando las proteínas que no cambian apropiadamente sus estructuras (proteínas desplegadas) se acumulan en el retículo endoplasmático, se induce la respuesta a proteínas desplegadas (UPR, por sus siglas en inglés), activando IRE1, ATF6, y PERK. Se ha demostrado que estas reacciones activan NF- κ B, cinasa N-terminal c-Jun, y rutas de estrés oxidativo, que contribuyen a la evolución de la esteatosis simple a la esteatohepatitis [Birkenfeld AL, Shulman GI. *Hepatology* 2014; 59:713-23.].

[9] Por ahora, no existe investigación que divulgue que el compuesto a base de pirazol de la presente invención tenga efectos de prevenir y tratar enfermedades de hígado graso.

[10] **[Evidencias Anteriores]**

[11] [Documento de Patente]

[12] (Documento de Patente 1) Patente Coreana N.º 10-1280160

[13] (Documento de Patente 2) Patente Coreana N.º 10-1633957

[14] [Documento no relacionado con la Patente]

[15] (Documento no relacionado con la Patente 1) Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Science 2011; 332:1519-23.

[16] (Documento no relacionado con la Patente 2) Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, Hobbs HH, Dobbins RL. Am J Physiol Endocrinol Metab 2005; 288: E462-8.

[17] (Documento no relacionado con la Patente 3) Birkenfeld AL, Shulman GI. Hepatology 2014; 59:713-23.

[18] (Documento no relacionado con la Patente 4) Musso G, Gambino R, Cassader M. Prog Lipid Res 2009; 48:1-26.

[19] (Documento no relacionado con la Patente 5) Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Nat Rev Mol Cell Biol 2008; 9:367-77.

[20] (Documento no relacionado con la Patente 6) Day CP, James OF. Gastroenterology 1998; 114:842-5.

[21]

Divulgación de la Invención

Problema Técnico

[22] En vista de los problemas ya mencionados, los presentes inventores llevaron a cabo la presente invención basándose en el hallazgo de que, en una variedad de modelos animales de enfermedad de hígado graso, el hígado graso, la inflamación hepática y la fibrosis hepática, las cuales son las principales patologías de enfermedades de hígado graso, pueden curarse

efectivamente por el tratamiento con el compuesto a base de pirazol de la presente invención.

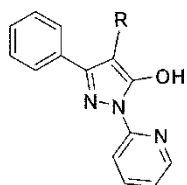
- [23] Durante una investigación continua sobre agentes terapéuticos efectivos para tratar enfermedades del hígado, los presentes inventores descubrieron que un compuesto que tiene la estructura central (*core structure*) del 3-fenil-4-alquil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol inhibe la citocina inflamatoria derivada del hígado graso y, por consiguiente, tiene un efecto de inhibir la inflamación hepática y la fibrosis hepática. La presente invención se ha llevado a su culminación basándose en estos hallazgos.
- [24] En consecuencia, es un objeto de la presente invención proveer una composición farmacéutica para prevenir, aliviar o tratar enfermedades del hígado la cual contiene, como un ingrediente activo, un compuesto a base de pirazol que tiene una estructura central del 3-fenil-4-alquil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol o su sal farmacéuticamente aceptable.

Solución al Problema

- [25] De acuerdo con la presente invención, los objetos ya mencionados y otros objetos pueden lograrse por la provisión de una composición farmacéutica para prevenir, aliviar o tratar enfermedades del hígado, la cual contiene, como un ingrediente activo, por lo menos un compuesto seleccionado de un compuesto a base de pirazol representado por la siguiente Fórmula 1 y su sal farmacéuticamente aceptable:

[26] [Fórmula 1]

[27]



- [28] en donde R es un grupo alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado.
- [29] De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se provee un método para prevenir, aliviar o tratar una enfermedad del hígado de un paciente

aquejado con una enfermedad del hígado, método que incluye administrar una cantidad efectiva de por lo menos un compuesto seleccionado del compuesto a base de pirazol representado por la Fórmula 1 y su sal farmacéuticamente aceptable, a un sujeto necesitado de él.

[30] De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se provee por lo menos un compuesto seleccionado del compuesto a base de pirazol representado por la Fórmula 1 y su sal farmacéuticamente aceptable para prevenir, aliviar o tratar una enfermedad del hígado de un paciente aquejado con una enfermedad del hígado.

[31] De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se provee el uso de por lo menos un compuesto seleccionado del compuesto a base de pirazol representado por la Fórmula 1 y su sal farmacéuticamente aceptable para preparar un agente para prevenir, aliviar o tratar una enfermedad del hígado de un paciente con aquejado con una enfermedad del hígado.

Efectos Ventajosos de la Invención

[32] El compuesto a base de pirazol o su sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la presente invención está en capacidad de inhibir efectivamente el hígado graso, la inflamación hepática y la fibrosis hepática, y es útil para la prevención o el tratamiento de NAFLD, en particular, NASH.

[33] El término "enfermedad de hígado graso", utilizado aquí, se refiere ampliamente a enfermedades en las cuales se acumula grasa en las células del hígado, causando hepatopatía, e incluye hepatopatía alcohólica y enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD o NASH).

Breve Descripción de los Dibujos

[34] Los objetos ya mencionados y otros objetos, características y demás ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada, tomada en conjunto con los dibujos acompañantes, en los cuales:

- [35] FIG. 1 es un gráfico que muestra una disminución de la alanina transaminasa (ALT) en la sangre en una prueba que utiliza un modelo animal de hígado graso inducido por una dieta deficiente en metionina/colina (MCD, por sus siglas en inglés);
- [36] FIG. 2 es una imagen que muestra un efecto de inhibición de la inflamación en los tejidos del hígado en una prueba que utiliza un modelo animal de hígado graso inducido por una dieta deficiente en metionina/colina (MCD);
- [37] FIG. 3 es una imagen que muestra un efecto de inhibición de fibrosis en los tejidos del hígado en una prueba que utiliza un modelo animal de hígado graso inducido por una dieta deficiente en metionina/colina (MCD);
- [38] FIG. 4 muestra los efectos de la reducción del peso relativo del hígado y los niveles de ALT, ALP y AST en la sangre en una prueba que utiliza un modelo animal de hígado graso inducido por una dieta alta en grasas;
- [39] FIG. 5 es una imagen que muestra un efecto de inhibición de la fibrosis hepática en los tejidos del hígado en una prueba que utiliza un modelo animal de hígado graso inducido por un ratón db/db diabético; y
- [40] FIG. 6 muestra los efectos de disminuir los niveles de TG y LDL en los tejidos del hígado, inhibiendo la inflamación hepática y la fibrosis hepática, y reduciendo los niveles de TG y LDL en la sangre en una prueba que utiliza un modelo animal de hígado graso inducido por un ratón db/db diabético.
- [41]

Mejor Modo de Llevar a Cabo la Invención

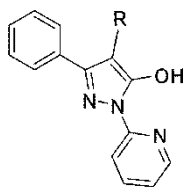
- [42] Se hará ahora referencia en detalle a las modalidades preferidas de la presente invención, ejemplos de las cuales se ilustran en los dibujos acompañantes. Cuando sea posible, los mismos numerales de referencia se emplearán de principio a fin de los dibujos para referirse a las mismas partes o partes similares.
- [43] En una modalidad de la presente invención, la enfermedad del hígado puede ser una enfermedad de hígado graso, la enfermedad del hígado graso puede ser hígado graso no alcohólico o hígado graso simple, y la composición de

acuerdo con una modalidad de la presente invención tiene los efectos de inhibir la acumulación de grasa en el hígado, suprimir la citocina inflamatoria derivada del hígado graso y, en esa forma, inhibir la inflamación hepática y la fibrosis hepática.

- [44] Debe entenderse que, en el capítulo descriptivo, cuando el intervalo se menciona con respecto a un parámetro, el parámetro engloba todos los números incluyendo los valores extremos divulgados dentro del intervalo. Por ejemplo, el intervalo de "5 a 10" incluye los números de 5, 6, 7, 8, 9, y 10, así como subintervalos arbitrarios tales como los intervalos de 6 a 10, 7 a 10, 6 a 9, y 7 a 9, y cualesquiera números, tales como 5,5, 6,5, 7,5, 5,5 a 8,5 y 6,5 a 9, entre enteros apropiados que caen dentro del intervalo. Además, por ejemplo, el intervalo de "10% a 30%" engloba todos los enteros que incluyen valores tales como 10%, 11%, 12% y 13%, así como 30%, y cualesquiera subintervalos de 10% a 15%, 12% a 18%, o 20% a 30%, así como cualesquiera números, tales como 10,5%, 15,5% y 25,5%, entre enteros apropiados que caen dentro del intervalo.
- [45] A partir de ahora, la presente invención se describirá en detalle.
- [46] La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para prevenir, aliviar o tratar enfermedades del hígado, la cual contiene, como un ingrediente activo, por lo menos un compuesto seleccionado de un compuesto a base de pirazol representado por la siguiente Fórmula 1 y su sal farmacéuticamente aceptable:

[47] [Fórmula 1]

[48]



- [49] en donde R es un grupo alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado.
- [50] El término "enfermedad de hígado graso", tal como se emplea aquí, se refiere ampliamente a una enfermedad en la cual se acumula grasa en las células

del hígado, causando hepatopatía, e incluye hepatopatía alcohólica e hígado graso no alcohólico (NAFLD o NASH). La esteatohepatitis no alcohólica (NAFLD o NASH) se clasifica en cuatro tipos dependiendo del grado de evolución. El tipo 1 es hígado graso simple, el tipo 2 es hepatitis grasa, el tipo 3 es necrosis de hígado graso, y el tipo 4 incluye necrosis hepática que involucra fibrosis. Basados en la reseña de pronóstico a largo plazo, los tipos 3 y 4, que tienen una evolución significativamente más alta a cirrosis o mortalidad relacionada con el hígado, se definen como etapas NASH. [Matteoni, C.A., et al 1999, Gastroenterology, 116: 1413-1419]. En la Conferencia de Tema Único en 2002 de la Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades del hígado, etapas 3 y 4 de NAFLD se consideran como NASH en vista de esteatosis, inflamación lobular y abombamiento hepatocelular como las condiciones de NASH [Single Topic Conference 2002, Neuschwander-Tetri, B.A., et al, 2003, Hepatology, 37: 1202-1219].

- [51] La enfermedad de hígado graso, a la cual se aplica el agente profiláctico o terapéutico de acuerdo con la presente invención, es preferiblemente hígado graso no alcohólico (NAFLD), en particular, preferiblemente hígado graso simple, o esteatohepatitis no alcohólica (NASH).
- [52] La sal farmacéuticamente aceptable del compuesto a base de pirazol contenido en la composición farmacéutica de la presente invención significa una sal usada comúnmente en la industria farmacéutica y sus ejemplos incluyen: sales de ácidos inorgánicos preparadas con ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido brómico, ácido yódico, ácido perclórico, ácido sulfúrico y similares; sales de ácidos orgánicos preparadas con ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido maleico, ácido succínico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido mandélico, ácido propiónico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido glicólico, ácido glucónico, ácido galacturónico, ácido glutámico, ácido glutárico, ácido glucurónico, ácido aspártico, ácido ascórbico, ácido carbónico, ácido vanílico, ácido yodhídrico y similares; sales de ácidos sulfónicos preparadas con ácido

metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenosulfónico y similares; y el tipo de sal de acuerdo con la presente invención no se limita a ellos. Preferiblemente, la sal farmacéuticamente aceptable es clorhidrato.

[53] Específicamente, ejemplos del compuesto a base de pirazol representado por la Fórmula 1 contenido en la composición farmacéutica de la presente invención se indican a continuación:

[54] 3-fenil-4-metil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol o su clorhidrato;

[55] 3-fenil-4-etil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol o su clorhidrato;

[56] 3-fenil-4-normalpropil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol o su clorhidrato;

[57] 3-fenil-4-isopropil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol o su clorhidrato;

[58] 3-fenil-4-normalbutil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol o su clorhidrato;

[59] 3-fenil-4- *terc*-butil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol o su clorhidrato;

[60] 3-fenil-4-normalpentil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol o su clorhidrato; y

[61] 3-fenil-4-normalhexil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol o su clorhidrato.

[62] Más específicamente, el compuesto a base de pirazol representado por la Fórmula 1 contenido en la composición farmacéutica de la presente invención puede ser 3-fenil-4-normalpropil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol o su clorhidrato.

[63] La composición de la presente invención puede incluir además un aditivo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente, un aglutinante, un disgregante, un lubricante, un ajustador de pH, un antioxidante o un agente solubilizante, siempre y cuando no menoscabe los efectos de la presente invención.

[64] El diluyente puede ser azúcar, almidón, celulosa microcristalina, lactosa (lactosa hidratada), glucosa, di-mannitol, alginato, sales de metales alcalinotérreos, arcilla, polietilén glicol, fosfato dicálcico anhidro, una mezcla de los anteriores o similares, y el aglutinante puede ser almidón, celulosa microcristalina, sílice altamente dispersable, mannitol, di-mannitol, sacarosa, lactosa hidratada, polietilén glicol, polivinil pirrolidona (povidona), copolímeros de polivinil pirrolidona (copovidona), hipromelosa, hidroxipropil

celulosa, goma natural, goma sintética, gelatina, una mezcla de los anteriores o similares.

- [65] El disgregante puede ser: almidón o almidón modificado tal como glicolato de almidón sódico, almidón de maíz, almidón de papa o almidón pregelatinizado; arcilla tal como bentonita, montmorillonita o Veegum; celulosa tal como celulosa microcristalina, hidroxipropil celulosa o carboxi metil celulosa; alginato tal como alginato de sodio o ácido algínico; celulosa entrecruzada tal como croscarmelosa sódica; goma tal como goma de guar o goma de xantana; un polímero entrecruzado tal como polivinil pirrolidona entrecruzada (crospovidona); un agente efervescente tal como bicarbonato de sodio o ácido cítrico; o una mezcla de los anteriores.
- [66] El lubricante puede ser talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, estearato de calcio, lauril sulfato de sodio, un aceite vegetal hidrogenado, benzoato de sodio, estearil fumarato de sodio, behenato de glicerilo, monooleato de glicerilo, monoestearato de glicerilo, palmitoestearato de glicerilo, dióxido de silicio coloidal, una mezcla de los anteriores o similares.
- [67] El ajustador de pH puede ser un ajustador de pH ácido tal como ácido acético, ácido adípico, ácido ascórbico, ascorbato de sodio, estearato de sodio, ácido málico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido fumárico o ácido cítrico, o un ajustador de pH básico tal como carbonato de calcio precipitado, agua amoniacal, meglumina, carbonato de sodio, óxido de magnesio, carbonato de magnesio, citrato de sodio, fosfato de calcio tribásico o similares.
- [68] El antioxidante puede ser hidroxitolueno de dibutilo, hidroxianisol butilado, acetato de tocoferilo, tocoferol, galato de propilo, bisulfito sódico, piro-sulfito sódico o similares. En el compartimiento de liberación temprana de la presente invención, el agente solubilizante puede ser un éster de ácido graso de polioxietilén sorbitana tal como lauril sulfato de sodio o polisorbato, docusato de sodio, un poloxámero o similares.
- [69] Adicionalmente, con el fin de preparar una formulación de liberación sostenida, puede incorporarse un polímero entérico, un polímero insoluble en agua, un compuesto hidrófobo y un polímero hidrófilo.

- [70] El polímero entérico se refiere a un polímero que es insoluble o estable bajo condiciones ácidas de menos de pH 5, es decir, un polímero que se disuelve o degrada a un determinado pH de 5 o más y sus ejemplos incluyen: derivados de celulosa entéricos tales como succinato de acetato de hipromelosa, ftalato de hipromelosa (ftalato de hidroxipropil metilcelulosa), ftalato de hidroximetil etilcelulosa, ftalato de acetato de celulosa, succinato de acetato de celulosa, maleato de acetato de celulosa, ftalato de benzoato de celulosa, ftalato de propionato de celulosa, ftalato de metilcelulosa, carboximetil etilcelulosa, ftalato de etil hidroxietil celulosa, y metil hidroxietil celulosa; copolímeros entéricos a base de ácido acrílico tales como copolímeros de ácido acrílico – estireno, copolímeros de ácido acrílico - metil acrilato, copolímeros de ácido metacrílico - metil acrilato (por ejemplo, Acryl-EZE[®]), copolímeros de ácido acrílico – estireno –butil acrilato, y copolímeros de octil acrilato – ácido metacrílico – metil acrilato; copolímeros entéricos de polimetacrilato tales como copolímeros de poli(metil metacrilato de ácido metacrílico) (por ejemplo, Eudragit L, Eudragit S, Evonik Industries AG, Alemania), y copolímeros de poli(etil acrilato de ácido metacrílico) (por ejemplo, Eudragit L100-55); copolímeros entéricos a base de ácido maleico tales como copolímeros de anhídrido maleico – vinil acetato, copolímeros de anhídrido maleico – estireno, copolímeros de monoéster de ácido maleico – estireno, copolímeros de anhídrido maleico – vinilmetil éter, copolímeros de anhídrido maleico – etileno, copolímeros de anhídrido maleico – vinil butil éter, copolímeros de anhídrido maleico – acrilato de metilo - acrilonitrilo, y copolímeros de anhídrido maleico – estireno – acrilato de butilo; y derivados entéricos de polivinilo tales como ftalato de alcohol polivinílico, ftalato de acetato de polivinilo, ftalato de butilato de polivinilo y acetal ftalato acetato de polivinilo.
- [71] El polímero insoluble en agua se refiere a un polímero farmacéuticamente aceptable para controlar la liberación de fármacos, que no se disuelven en agua. Ejemplos de polímero insoluble en agua incluyen acetato de polivinilo (por ejemplo, Kollicoat SR30D), copolímeros de polimetacrilato insoluble en

agua [por ejemplo, copolímeros de poli(etilacrilato-metil metacrilato) (por ejemplo, Eudragit NE30D, copolímeros de poli(etilacrilato-metil metacrilato-trimetilaminoetilmetacrilato) (por ejemplo, Eudragit RSPO) o similares], etil celulosa, éster de celulosa, éter de celulosa, acilato de celulosa, diacilato de celulosa, triacilato de celulosa, acetato de celulosa, diacetato de celulosa, triacetato de celulosa y similares.

- [72] El compuesto hidrófobo se refiere a una sustancia insoluble en agua, farmacéuticamente aceptable, para controlar la liberación de fármacos. Ejemplos del compuesto hidrófobo incluyen ácido graso y ésteres de ácidos grasos tales como palmitoestearato de glicerilo, estearato de glicerilo, behenato de glicerilo, palmitato de cetilo, monooleato de glicerilo y ácido esteárico; alcoholes de ácidos grasos tales como alcohol cetioestearílico, alcohol cetílico y alcohol estearílico; ceras tales como cera de carnaúba, cera de abejas y cera microcristalina; y sustancias inorgánicas tales como talco, carbonato de calcio precipitado, fosfato monohidrogenado de calcio, óxido de cinc, óxido de titanio, caolín, bentonita, montmorillonita y Veegum.
- [73] El polímero hidrófilo se refiere a un polímero soluble en agua, farmacéuticamente aceptable, para controlar la liberación de fármacos. Ejemplos del polímero hidrófilo incluyen: azúcares tales como dextrina, povidexina, dextrano, pectina y derivados de pectina, alginato, ácido poligalacturónico, xilana, arabinosilana, arabinogalactana, almidón, almidón hidroxipropílico, amilosa y amilopectina; derivados de celulosa tales como hipromelosa, hidroxipropil celulosa, hidroximetil celulosa, hidroxietil celulosa, metilcelulosa y carboximetil celulosa sódica; gomas tales como goma de guar, goma de granos de algarrobo, tragacanto, carragenina, goma de acacia, goma arábiga, goma de gelana y goma de xantana; proteínas tales como gelatina, caseína y zeína; derivados de polivinilo tales como alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, y polivinilacetato dietilaminoacetato; copolímeros de polimetacrilato hidrófilo tales como copolímero de poli(butil metacrilato-(2-dimetilaminoetil)metacrilato-metil metacrilato) (por ejemplo, Eudragit E100, Evonik Industries AG, Alemania), y copolímeros de poli(etil

acrilato-metil metacrilato-trietilaminoetil-cloruro de metacrilato) (por ejemplo, Eudragit RL, RS, Evonik Industries AG, Alemania); derivados de polietileno tales como polietilén glicol y óxido de polietileno; carbómeros y similares.

- [74] Por lo demás, la formulación de la presente invención puede prepararse usando una variedad de aditivos farmacéuticamente aceptables seleccionados de agentes colorantes y agentes saborizantes.
- [75] El ámbito del aditivo no se limita por los aditivos mencionados y la preparación puede llevarse a cabo utilizando el aditivo seleccionado en un intervalo ordinario de dosis.
- [76] La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede prepararse en la forma de una formulación oral tal como un polvo, un gránulo, un comprimido, una píldora, una cápsula, una suspensión, una emulsión, un jarabe o un aerosol, o una preparación externa, un supositorio o una solución estéril para inyección.
- [77] En una modalidad, la presente invención provee una composición farmacéutica para prevenir, aliviar o tratar enfermedades del hígado, la cual contiene el ingrediente activo en una cantidad de 0,01 a 90% en peso, basado en el peso total de la composición farmacéutica.
- [78] La dosis del compuesto a base de pirazol representado por la Fórmula 1 o su sal farmacéuticamente aceptable en el agente para prevenir o tratar enfermedades de hígado graso de acuerdo con la presente invención puede variarse apropiadamente dependiendo de la edad, el peso corporal y los síntomas de los pacientes, las vías de administración y similares. Por ejemplo, una dosis diaria sobre la base de un adulto (60 kg) puede ser alrededor de 1 mg a alrededor de 1.000 mg, preferiblemente alrededor de 10 mg a alrededor de 750 mg, para administración oral, y puede ser alrededor de 0,3 mg a alrededor de 200 mg para administración con inyección, y puede administrarse únicamente una vez o en porciones varias veces al día.
- [79] Otra modalidad de la presente invención provee un agente para prevenir o tratar esteatosis simple el cual contiene, como un ingrediente activo, por lo

menos uno seleccionado de 3-fenil-4-normalpropil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol y su sal farmacéuticamente aceptable.

- [80] Otra modalidad de la presente invención provee un agente profiláctico o terapéutico para esteatohepatitis no alcohólica el cual contiene, como un ingrediente activo, por lo menos uno seleccionado de 3-fenil-4-normalpropil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol su sal farmacéuticamente aceptable.
- [81] Otra modalidad de la presente invención provee un agente profiláctico o terapéutico para cirrosis el cual contiene, como un ingrediente activo, por lo menos uno seleccionado de 3-fenil-4-normalpropil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol y su sal farmacéuticamente aceptable.
- [82] El término "administración", utilizado aquí, significa que la composición de acuerdo con la presente invención para prevenir o tratar a enfermedad de hígado graso se inyecta a un paciente por cualquier método apropiado. La vía de administración de la composición de acuerdo con la presente invención para prevenir o tratar una enfermedad de hígado graso puede ser cualquier vía general que permita que la composición llegue al tejido objetivo. Ejemplos de la vía de administración incluyen, pero sin limitarse a, administraciones oral, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intranasal, intrapulmonar, rectal, en el espacio dentro de una cavidad, intraperitoneal e intratecal.

[83]

Modo para la Invención

- [84] A partir de este momento, se darán ejemplos preferidos para una mejor comprensión de la presente invención. No obstante, estos ejemplos se proveen únicamente para una mejor comprensión de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes del ámbito de la presente invención.

[85]

[Ejemplo de Síntesis]

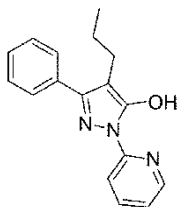
- [87] En el presente Ejemplo de Síntesis se describirá un ejemplo representativo de un método para sintetizar un compuesto a base de pirazol contenido como

un ingrediente activo en una composición farmacéutica para tratar enfermedades del hígado.

[88]

[89] Ejemplo de Síntesis 1. Síntesis de 3-fenil-4-n-propil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol

[90]



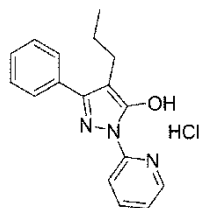
[91] Etil éster de ácido 2-propil-3-oxo-3-fenilpropiónico (2,52 g, 10,7 mmol) y 10 mL de etanol se cargaron en un matraz de base redonda y, a continuación, se le agregó lentamente gota a gota una solución de 2-hidrazinopiridina (1,29 g, 1,18 mmol) diluida en 3 mL de etanol a 0°C. La mezcla resultante se hizo refluir bajo calentamiento a 100°C durante 3 días. Se retiró el solvente por destilación bajo presión reducida y los sólidos resultantes se lavaron con hexano y acetato de etilo y, en seguida, se secaron bajo vacío para obtener el compuesto objetivo en un rendimiento de 82%.

[92] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 12,50 (1H, s), 8,27-8,25 (1H, m), 8,01 (1H, d, *J* = 8,5 Hz), 7,81 (1H, m), 7,69 (2H, m), 7,48-7,34 (3H, m), 7,12-7,10 (1H, m), 2,54 (2H, d, *J* = 7,5 Hz), 1,64 (2H, m), 0,93 (3H, t, *J* = 7,3 Hz); EIMS (70 eV) *m/z* (intensidad relativa) 279 (*M*⁺, 37), 250 (100).

[93]

[94] Ejemplo de Síntesis 2. Síntesis de clorhidrato de 3-fenil-4-n-propil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol (compuesto 1)

[95]



- [96] El 3-fenil-4-n-propil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol (280 mg, 1,0 mmol) preparado en el Ejemplo de Síntesis 1 se disolvió en 4 mL de éter etílico en un matraz de base redonda y se le agregó lentamente gota a gota una solución de 2M HCl en 0,55 mL de éter etílico a 0°C. Los sólidos resultantes se filtraron bajo presión reducida de la solución de reacción, se retiró el solvente, y el residuo se lavó con hexano y acetato de etilo y se secó bajo vacío para obtener el compuesto objetivo (270 mg, 0,85 mmol).
- [97] ¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ 8,44 (1H, d, *J* = 4,2 Hz), 8,0-8,03 (2H, m), 7,66-7,64 (2H, m), 7,48-7,42 (3H, m), 7,34-7,30 (1H, m), 2,49 (2H, brs), 2,43 (2H, t, *J* = 7,5 Hz), 1,48 (2H, m), 0,48 (3H, t, *J* = 7,3 Hz).
- [98]
- [99] **[Ejemplo]**
- [100] En el presente Ejemplo, se identificarán en detalle las acciones farmacéuticas del derivado a base de pirazol, contenido como un ingrediente activo en la composición farmacéutica para tratar enfermedades del hígado.
- [101]
- [102] Ejemplo 1: Actividad del clorhidrato de 3-fenil-4-n-propil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol en la inhibición de hígado graso [prueba que utiliza el modelo animal de hígado graso inducido por una dieta deficiente en metionina/colina (MCD)]
- [103] Como animales sujetos se adquirieron ratas Sprague Dawley (SD), machos, de 6 semanas de edad. Todas las ratas se mantuvieron bajo condiciones estándar. Cuando las ratas alcanzaron las 12 semanas de edad después de haberse criado durante alrededor de 6 semanas, se administraron a las ratas sustancias de prueba. Los grupos de prueba se establecieron con base en un nivel de ALT en la sangre recogida a las 5 semanas.
- [104] Durante 5 semanas después de que las ratas alcanzaron las 12 semanas de edad, las sustancias de prueba se administraron separadamente a un grupo de administración de vehículo y un grupo de administración de clorhidrato de 3-fenil-4-n-propil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol.
- [105] Como control negativo se utilizó un grupo de control normal.

- [106] Se recogió sangre un día antes del inicio del experimento (de la vena yugular), y se recolectaron muestras de sangre a las 3 semanas, 5 semanas, 7 semanas, 9 semanas y el día de la autopsia (24 horas después del ayuno, un total de seis veces). Adicionalmente, se analizó el plasma de cada muestra de sangre recogida a las 5 semanas, 7 semanas, 9 semanas y el día de la autopsia.
- [107] Una vez concluida la prueba, los animales se anestesiaron, se extrajeron tejidos del hígado de los animales respectivos y se recolectó sangre para inspección. Los tejidos del hígado se pesaron y se procesaron gráficamente (*were imaged*). Los tejidos del hígado se inmovilizaron en formalina neutra amortiguada al 10%. Los tejidos inmovilizados se cortaron a un espesor predeterminado, se sometieron a un proceso general de tratamiento de tejidos, se embebieron en parafina y se produjeron secciones de tejido con un tamaño de 4 a 5 μm , y las secciones de tejido se sometieron a tinción con Hematoxilina & Eosina (H&E) como un método general de tinción y se observaron histopatológicamente.
- [108] Adicional a la tinción con H&E, se condujo tinción con Oil red-O, con el fin de observar los lípidos inducidos por la formación de hígado graso, se cuantificaron los niveles de lípidos producidos y se predijo un efecto de la administración del fármaco en la reducción de lípidos. Los tejidos del hígado se tiñeron con una solución de trabajo Oil red O, con el fin de evaluar los niveles de lípidos producidos. Se recogió sangre y se centrifugó a 3000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Se tomó el suero de la capa superior y se cuantificó el nivel de alanina transaminasa (ALT) usando un analizador bioquímico automático de sangre (AU480, Beckman 30-18 Coulter, USA) y se analizaron los resultados.
- [109] Se midió una razón del peso del hígado al peso corporal y se midió la cantidad de triglicéridos en los tejidos del hígado con respecto a los efectos esperados de la administración del fármaco en la reducción del peso relativo del hígado y los triglicéridos. Los tejidos del hígado se trituraron con un homogeneizador, se les agregaron cloroformo y metanol (2:1), la mezcla resultante se

centrifugó a 3,000 rpm y a 4°C durante 10 minutos y se separó la capa de solvente orgánico que contenía los lípidos. El solvente orgánico en la capa de lípidos separados se retiró en el secador a 50°C durante 12 horas. Los tubos que contenían únicamente lípidos se sumergieron en EtOH al 100%, y luego se suspendieron en un tubo libre de lípidos y, posteriormente, se analizaron con un reactivo de un kit para medir los triglicéridos (AM157S-K, Asan, Corea).

- [110] Con el fin de observar los cambios inmunohistoquímicos de los tejidos del hígado, se produjeron secciones finas de los tejidos inmovilizados en formalina neutra amortiguada al 10%, se adhirieron a un portaobjetos de recubrimiento (*coating slide*), se desparafinaron y tiñeron y, a continuación, se hicieron reaccionar con anticuerpos TNF- α (factor- α de necrosis tumoral ab1793, Abcam), TGF- β (factor- β de crecimiento transformante ab66043, Abcam), α -SMA (α -actina de músculo liso, ab7817, Abcam) e IL-1 β (Interleucina-1 β , ab9722, Abcam) sobre portaobjetos respectivos. Se analizan los resultados.
- [111] FIGS. 1, 2 y 3 son imágenes que muestran que, en una prueba que utiliza un modelo animal de hígado graso inducido por una dieta deficiente en metionina/colina (MCD), un grupo, al cual se administra clorhidrato de 3-fenil-4-n-propil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol como un fármaco en una dosis diaria única de 60 mg/kg, tiene los efectos de reducir el nivel de ALT en la sangre, e inhibir la inflamación de los tejidos del hígado e inhibir la fibrosis de los tejidos del hígado. Como se muestra en FIGS. 1, 2 y 3, en FIG. 1, el nivel de ALT en la sangre se reduce significativamente en el grupo administrado con fármaco, comparado con el grupo de administración de vehículo, luego de la administración del fármaco. FIG. 2 muestra los resultados de la tinción de α -SMA, IL-1 β y TNF- α , como factores de inflamación en los tejidos del hígado, lo cual indica que la inflamación se disminuyó considerablemente en el grupo administrado con fármaco, comparado con el grupo de administración de vehículo. FIG. 3 muestra los resultados de tinción de TGF- β con H&E, y tinción con Oil red O de los tejidos del hígado, con el fin de identificar el daño

del tejido del hígado y la fibrosis hepática, lo cual indica que el daño del tejido del hígado y la fibrosis hepática se reducen en el grupo administrado con fármaco, comparado con el grupo de administración de vehículo.

[112]

[113] Ejemplo 2: Actividad del clorhidrato de 3-fenil-4-normal-propil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol en la inhibición de hígado graso [prueba que utiliza un modelo animal de hígado graso inducido por una dieta alta en grasa]

[114] Como animales sujetos se adquirieron ratas de 6 semanas de edad. Todas las ratas se mantuvieron bajo condiciones estándar. Cuando las ratas alcanzaron las 12 semanas de edad después de haberse criado durante alrededor de 6 semanas, se administraron a las ratas las sustancias de prueba. Los grupos de prueba se establecieron con base en un nivel de ALT en sangre recogida a las 5 semanas. Durante 5 semanas después de que las ratas alcanzaron las 12 semanas de edad, las sustancias de prueba se administraron separadamente a un grupo de administración de vehículo, un grupo de administración de ácido obeticoico como un grupo de control positivo y un grupo de administración de clorhidrato de 3-fenil-4-normalpropil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol.

[115] Se recogió sangre un día antes del inicio del experimento (de la vena yugular), y se recolectaron muestras de sangre a las 5 semanas, 8 semanas, y el día de la autopsia (24 horas después del ayuno, un total de 4 veces). Adicionalmente, se analizó el plasma de cada muestra de sangre recolectada en la 5.^a semana, la 8.^a semana y el día de la autopsia.

[116] Una vez concluida la prueba, los animales se anestesiaron, se extrajeron los tejidos del hígado de los animales respectivos y se recolectó sangre para inspección. Los tejidos del hígado se pesaron y se procesaron gráficamente. Los tejidos del hígado se inmovilizaron en formalina neutra amortiguada al 10%. Los tejidos inmovilizados se cortaron a un espesor predeterminado, se sometieron a un proceso general de tratamiento de tejidos, se embebieron en parafina y se produjeron secciones de tejido con un tamaño de 4 a 5 μm , y las secciones de tejido se sometieron tinción con Hematoxilina & Eosina

(H&E) como un método general de tinción y se observaron histopatológicamente.

- [117] Adicional a la tinción con H&E, se condujo tinción con Oil red-O, con el fin de observar los lípidos inducidos por la formación de hígado graso, se cuantificaron los niveles de los lípidos producidos y se predijo un efecto de la administración del fármaco en la reducción de los lípidos. Los tejidos del hígado se tiñeron con una solución de trabajo Oil red O, con el fin de evaluar los niveles de los lípidos producidos.
- [118] Se recogió sangre y se centrifugó a 3000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Se tomó el suero de la capa superior y se cuantificaron los niveles de fosfatasa alcalina (ASP), aspartato transaminasa (AST) y alanina transaminasa (ALT) usando un analizador bioquímico automático de sangre (AU480, Beckman 30-18 Coulter, USA) y se analizaron los resultados.
- [119] Se midió una razón del peso del hígado al peso corporal y se midió la cantidad de triglicéridos en los tejidos del hígado con respecto a los efectos esperados de la administración del fármaco en la reducción del peso relativo del hígado y los triglicéridos. Los tejidos del hígado se trituraron con un homogeneizador, se les agregaron cloroformo y metanol (2:1), la mezcla resultante se centrifugó a 3,000 rpm y a 4°C durante 10 minutos y se separó la capa de solvente orgánico que contenía los lípidos. El solvente orgánico en la capa de los lípidos separados se retiró en el secador a 50°C durante 12 horas. Los tubos que contenían únicamente lípidos se sumergieron en EtOH al 100% y, a continuación, se suspendieron en un tubo libre de lípidos y luego se analizaron con un reactivo de un kit para medir los triglicéridos (AM157S-K, Asan, Corea).
- [120] FIG. 4 muestra que, en una prueba que utiliza un modelo animal de hígado graso inducido por una dieta alta en grasas, un grupo, al cual se administra clorhidrato de 3-fenil-4-normalpropil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol como un fármaco en una dosis única diaria de 60 mg/kg, tiene los efectos de reducir el peso relativo del hígado y los niveles de ALT, ALP y AST en la sangre. Como puede apreciarse de FIG. 4A, el peso relativo del hígado se reduce

significativamente en el grupo administrado con el fármaco, comparado con el grupo de administración de vehículo y el grupo de administración de ácido obeticólico como el grupo de control positivo, después de la administración del fármaco. FIGs. 4B, 4C y 4D muestran que los niveles de ALT, ALP y AST en la sangre se disminuyen considerablemente en el grupo administrado con el fármaco, comparado con el grupo de administración de vehículo y el grupo de administración de ácido obeticólico, como el grupo de control positivo, después de la administración del fármaco.

[121]

[122] Ejemplo 3: Actividad del clorhidrato de 3-fenil-4-normal-propil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol en la inhibición del hígado graso [prueba que utiliza el modelo animal de hígado graso inducido por ratones diabéticos db/db]

[123] Como animales sujetos se adquirieron ratones diabéticos db/db, machos, de 6 semanas de edad (C57BLKS/J-leprdb/leprdb) de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Los ratones se mantuvieron bajo condiciones estándar. Cuando los ratones alcanzaron las 8 semanas de edad después de haberse criado durante alrededor de 2 semanas, se administraron a los ratones las sustancias de prueba. Durante 12 semanas después de que los ratones alcanzaron la edad de 8 semanas, se administraron separadamente las sustancias de prueba a un grupo de administración de vehículo y a un grupo de administración de clorhidrato de 3-fenil-4-normalpropil-1-(piridin-2-il)-1 *H*-pirazol-5-ol.

[124] Como control negativo se utilizó un grupo de control normal.

[125] Una vez concluida la prueba, los animales se anestesiaron, se extrajeron los tejidos del hígado de los animales respectivos y se recolectó sangre para inspección. Los tejidos del hígado se pesaron y se procesaron gráficamente. Los tejidos del hígado se inmovilizaron en formalina neutra amortiguada al 10%. Los tejidos inmovilizados se cortaron a un espesor predeterminado, se sometieron a un proceso general de tratamiento de tejidos, se embebieron en parafina y se produjeron secciones de tejido con un tamaño de 4 a 5 μ m, y las secciones de tejido se sometieron a tinción con Hematoxilina & Eosina

(H&E) como un método general de tinción y se observaron histopatológicamente.

- [126] Adicional a la tinción con H&E, se condujo tinción con Oil red-O, con el fin de observar los lípidos inducidos por la formación de hígado graso, se cuantificaron los niveles de los lípidos producidos y se predijo un efecto de la administración del fármaco en la reducción de los lípidos. Los tejidos del hígado se tiñeron con una solución de trabajo Oil red O, con el fin de evaluar los niveles de los lípidos producidos.
- [127] Se recogió sangre y se centrifugó a 3000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Se tomó el suero de la capa superior y se cuantificaron los niveles de triglicéridos (TG) y colesterol LDL (LDL-C) usando un analizador bioquímico automático de sangre (AU480, Beckman 30-18 Coulter, USA) y se analizaron los resultados.
- [128] Se midió una razón del peso del hígado al peso corporal y se midió la cantidad de triglicéridos en los tejidos del hígado con respecto a los efectos esperados de la administración del fármaco en la reducción del peso relativo del hígado y los triglicéridos. Los tejidos del hígado se trituraron con un homogeneizador, se les agregaron cloroformo y metanol (2:1), la mezcla resultante se centrifugó a 3,000 rpm y a 4°C durante 10 minutos y se separó la capa de solvente orgánico que contenía los lípidos. El solvente orgánico en la capa de lípidos separados se retiró en el secador a 50°C durante 12 horas. Los tubos que contenían únicamente lípidos se sumergieron en EtOH al 100%, y luego se suspendieron en un tubo libre de lípidos y, posteriormente, se analizaron con un reactivo de un kit para medir los triglicéridos (AM157S-K, Asan, Corea).
- [129] FIGs. 5 y 6 son imágenes y gráficos que muestran que, en una prueba que utiliza modelos animales de hígado graso inducido por ratones diabéticos db/db, un grupo, al cual se administra clorhidrato de 3-fenil-4-normalpropil-1-(piridin-2-il)-1H-pirazol-5-ol como un fármaco en una dosis diaria única de 60 mg/kg, tiene los efectos de suprimir la inflamación de los tejidos del hígado, inhibir la fibrosis de los tejidos del hígado, y disminuir los niveles de TG y LDL

en la sangre y los tejidos del hígado. Como puede observarse de FIGs. 5 y 6, FIG. 5 muestra los resultados de la tinción de TGF- β y colágeno tipo IV en los tejidos del hígado, para analizar el daño de los tejidos del hígado y la fibrosis hepática, lo cual indica que el daño de los tejidos del hígado y la fibrosis hepática se disminuyen significativamente en el grupo administrado con fármaco, comparado con el grupo administrado con vehículo. FIGs. 6A y 6B muestran los cambios en TG y colesterol en los tejidos del hígado y los cambios en TG y colesterol en la sangre, lo cual indica que el daño de los tejidos del hígado y la fibrosis hepática se disminuyen significativamente en el grupo de administración con fármaco, comparado con el grupo administrado con vehículo. FIG. 6C muestra que la expresión mRNA de colágeno I, colágeno IV, MCP-1, PAI-1 y TGF- β , que son factores de inflamación y fibrosis en los tejidos del hígado, se reducen considerablemente en el grupo de administración con fármaco, comparado con el grupo de administración con vehículo.

- [130] Aunque se han divulgado las modalidades preferidas de la presente invención para efectos ilustrativos, las personas expertas en la materia entenderán que son posibles diferentes modificaciones, adiciones y sustituciones, sin apartarse del ámbito y el espíritu de la invención como se divulga en las reivindicaciones acompañantes.