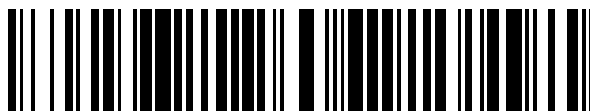


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 628**

51 Int. Cl.:
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05808627 .3**
96 Fecha de presentación: **21.10.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1888074**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.02.2008**

54 Título: **AGENTE PARA LA PREVENCIÓN Y EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES
HEPÁTICAS QUE CONTIENE UN DIRIVADO PIRAZOLOPIRIMIDINA.**

30 Prioridad:
10.06.2005 KR 20050050033

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.03.2012

73 Titular/es:
**DONG-A PHARMACEUTICAL CO., LTD.
252 YONGDU-DONG DONGDAEMUN-KU
SEOUL 130-072, KR**

72 Inventor/es:
**CHOI, Seul Min;
AHN, Byoung Ok y
YOO, Moohi**

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 376 628 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

Agente para la prevención y el tratamiento de las enfermedades hepáticas que contiene un derivado pirazolopirimidina

5

Área técnica

10

La presente invención está relacionada con una composición farmacéutica para la prevención y tratamiento de una enfermedad hepática, que contiene un derivado de pirazolopirimidinona como ingrediente activo, de forma más precisa, una composición farmacéutica para la prevención y tratamiento de la fibrosis hepática, la cirrosis hepática causada por la fibrosis hepática, la hipertensión portal y varias complicaciones derivadas de la hipertensión portal, que contiene un derivado de pirazolopirimidinona como ingrediente activo.

15

Antecedentes de la materia

20

El hígado posee más funciones bioquímicas que cualquier otro órgano. Es un órgano esencial a través del cual se hacen pasar los alimentos absorbidos, los fármacos y otros materiales foráneos, y el hígado tiene la función de eliminar los materiales tóxicos adquiridos o innatos tras la transformación de esos materiales tóxicos en una forma soluble en agua. Y además, en general está involucrado en las funciones metabólicas de varios órganos. Los tejidos del hígado sintetizan y suministran proteínas esenciales para el cuerpo humano como la albúmina, y al mismo tiempo, generan y secretan materiales activos *in vivo*. Como se ha explicado anteriormente, el hígado es un órgano crucial que controla las funciones metabólicas humanas, en las que tienen lugar numerosos procesos químicos. Se han confirmado hasta el momento que ocurren en el hígado aproximadamente 500 procesos químicos en un corto periodo de tiempo. Los hepatocitos son las principales células funcionales del hígado, y cada hepatocito individual mide 15-30 micras de diámetro. El hígado humano contiene aproximadamente 250 billones de hepatocitos.

25

30

El daño en los hepatocitos resulta en una necrosis de las células. Tras la necrosis, sin embargo, los hepatocitos se regeneran debido a su excelente capacidad de regeneración innata. A pesar de ello, una repetición del ciclo de necrosis y regeneración genera una fibrosis hepática, y como resultado, aparecen la cirrosis hepática, hipertensión portal y complicaciones de las mismas.

35

Tras la fibrosis hepática se desarrollan toda una serie de enfermedades relacionadas. La fibrosis hepática está causada por la acumulación de colágeno, una sustancia fibrogénica, en el hígado. Las diferentes células del hígado son los hepatocitos, las células endoteliales sinusoidales (SEC), las células de Kupper y las células estrelladas hepáticas (HSC), y de entre estos 4 tipos de células, las células estrelladas hepáticas son las que tienen un papel más importante en la fibrosis hepática (American Journal of Physiology. Gastrointestinal & Liver Physiology, 279(1), G7, 2000). Las células estrelladas hepáticas comprenden un 15% del total de células del hígado y normalmente tienen la función de almacenar retinoide, que es un precursor de la vitamina A. Sin embargo, una vez que los hepatocitos están dañados, las células de Kupper empiezan a consumir los hepatocitos dañados y secretan citoquinas (TGF-beta, PDGF, FGF, HGF, PAF y ET-1) que hacen que las células estrelladas hepáticas proliferen. Las células estrelladas hepáticas se diferencian en miofibroblastos. Los miofibroblastos sintetizan colágeno, que se acumula en la matriz extracelular y conduce a la fibrosis hepática. Esto significa que la activación de las células estrelladas hepáticas tiene un papel esencial en el desarrollo de la fibrosis hepática.

40

45

Más concretamente, la activación de las células estrelladas hepáticas se consigue en las tres etapas siguientes: etapa pre-inflamatoria, etapa inflamatoria y etapa post-inflamatoria.

50

En la etapa pre-inflamatoria, el daño a los hepatocitos induce la secreción de la hormona de las heridas, un estimulante de la proliferación de las células estrelladas hepáticas, o directamente la proliferación de células estrelladas hepáticas al reducir la arginasa, un inhibidor de la proliferación celular. En la mayoría de casos, el alcohol causa la generación de acetaldehído o peróxidos de lípidos, lo que resulta en la promoción de la expresión de genes de la matriz.

55

En la fase inflamatoria, las células estrelladas hepáticas proliferan a causa de las citoquinas (TGF-beta, PDGF, FGF, HGF, PAF y ET-1) secretadas por las células de Kupper y las plaquetas activadas, que a continuación se diferencian a miofibroblastos capaces de generar fibrocitos (Seminars in Hepatic Disease, 16(4), 357, 1996; Journal of Hepatology, 26(6), 1220, 1997).

60

En la fase post-inflamatoria, las citoquinas y los factores de crecimiento son secretados por los miofibroblastos completamente diferenciados para activar las células estrelladas hepáticas no diferenciadas y para secretar matriz extracelular. Los miofibroblastos activados y diferenciados a partir de las células estrelladas hepáticas sintetizan colágeno, que entonces se acumula en la matriz extracelular. El monómero de colágeno es muy inestable, se descompone fácilmente a la temperatura corporal, y los monómeros descompuestos polimerizan induciendo la fibrosis hepática (American Journal of Physiology, 264(4 Pt 1), G589, 1993).

65

- 5 La cirrosis hepática se atribuye a la fibrosis hepática, que se desarrolla por la polimerización del colágeno acumulado de forma contigua, transformando el colágeno acumulado en una fibra insoluble. La cirrosis hepática también puede inducirse por una inflamación continua del hígado que va acompañada de destrucción de hepatocitos, regeneración y cicatrización, y es causada por un abuso del alcohol durante un largo periodo de tiempo, hepatitis, exposición a sustancias tóxicas, etc. Como resultado, el tamaño del hígado se reduce y la superficie del mismo se vuelve abultada. La cirrosis hepática grave es una enfermedad seria que causa complicaciones letales como la hipertensión portal, hemorragias (especialmente en el esófago y estómago), hepatoma, intoxicación por acumulación de residuos, coma, etc (N. Engl. J. Med. 350:1646-1654).
- 10 La hipertensión portal está relacionada muy de cerca con la activación de las células estrelladas hepáticas, la fibrosis hepática y la cirrosis hepática. Los miofibroblastos diferenciados por la activación de las células estrelladas hepáticas reducen la elasticidad de los hepatocitos, y de ese modo aumenta la resistencia intrahepática y se desarrolla hipertensión portal (Semin Liver Dis 2001; 21:337-349).
- 15 A diferencia de otros órganos, y de forma característica, los tejidos del hígado poseen una doble vía de flujo sanguíneo, que consta de la sangre arterial con la que una gran cantidad de oxígeno fluye hacia los tejidos del hígado a través de la arteria hepática, y la sangre venosa que contiene nutrientes absorbidos en el estómago o los intestinos y que fluye hacia el interior a través de la vena portal hepática. La cantidad de sangre que fluye hacia el interior del hígado a través de la arteria hepática es de alrededor de 400 ml por minuto, y cantidad de sangre que fluye hacia el hígado a través de la vena portal hepática es de alrededor de 1300 ml por minuto, lo que significa que 1/4 del total de sangre que fluye hacia el hígado toma la vía de la arteria hepática, mientras los 3/4 restantes toman la vía de la vena portal hepática.
- 20 La presión sanguínea portal, similar a otras presiones venosas, es sólo alrededor de 1/10 de la presión arterial, y esto puede conducir fácilmente a trastornos de la circulación sanguínea. El daño repetido y la regeneración de hepatocitos causados por una continua inflamación resultan en la acumulación de materiales fibrosos y el desarrollo de nódulos de regeneración. Los nódulos de regeneración añaden presión en el camino de la sangre a través de los tejidos del hígado o constriñe el vaso sanguíneo en sí mismo, causando una alteración de la circulación de la sangre. Mientras el flujo sanguíneo a través de la vena portal no se ve alterado, se disminuye el flujo sanguíneo a través de los tejidos del hígado a causa de la alteración de la circulación sanguínea. Como resultado, la presión sanguínea portal aumenta, causando hipertensión portal. La vena portal es un tipo de vena sin válvula antireflujo, de forma que puede ocurrir un reflujo sanguíneo en el momento en el la presión sanguínea portal aumenta a causa de una alteración de la circulación, y entonces la sangre busca un desvío en su circulación. Como resultado, se desarrollan los vasos secundarios del tracto digestivo (en particular del esófago y del estómago), causando así hiperesplenismo. Los vasos secundarios generalmente se desarrollan en áreas de baja presión como la submucosa del esófago, la pared abdominal anterolateral, el recto, etc., con los consecuentes síntomas de varices esofágicas, fluido ascítico, hemorroides y agrandamiento esplénico.
- 25 La complicación más común de la hipertensión portal son las varices esofágicas, que necesitan una presión de al menos 12 mm de Hg para formarse. Aproximadamente un tercio de los pacientes con cirrosis hepática muestran varices en el esófago y el estómago, que son responsables de alrededor de un 30% de las muertes (American Family Physician, 55(5), 1851, 1997). Hasta el momento, los factores involucrados en el sangrado de las varices esofágicas y las varices gástricas no se conocen completamente, pero se cree que el tamaño de las varices está asociado con la gravedad de la hipertensión portal (Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach, 1996).
- 30 Para tratar la hipertensión portal, se han realizado operaciones quirúrgicas como la esplenectomía o derivación portacaval para reducir el flujo del lecho portal. Los fármacos para la hipertensión portal se ejemplifican mediante la vasopresina que se utiliza generalmente para la hemorragia aguda de las varices, la somatostatina, un bloqueador no específico beta-adrenérgico, un bloqueador alfa-adrenérgico, y preparaciones de nitrato. Estos fármacos reducen la presión venosa portal reduciendo el flujo arterial hacia el hígado. Como resultado, el flujo sanguíneo portal total hacia el hígado, que ya está afectado, se deteriora aún más. Por lo tanto, durante muchos años ha existido la necesidad de desarrollar sustancias que disminuyan la presión venosa portal de forma selectiva.
- 35 Se ha demostrado que un inhibidor de la fosfodiesterasa tipo 5 (a partir de este momento denominada "PDE 5"), conocido como ingrediente activo en un medicamento para la disfunción eréctil, también es efectivo en el tratamiento de la hipertensión portal y las enfermedades relacionadas con la misma.
- 40 Por ejemplo, la utilización de inhibidores de la PDE 5 para la prevención y tratamiento de la hipertensión portal se describe en las patentes PCT/ EP2004/ 006014, WO-A-2004/037183 y Kang et al, Archives of Pharmacal Research, vol. 26, nº 8, 2003, págs. 612-619. Concretamente, los inhibidores de la PDE 5 sildenafil y vardenafil, poseen efectos preventivos y terapéuticos sobre la hipertensión portal y sus complicaciones al reducir la presión sanguínea portal mediante el aumento del diámetro del vaso sanguíneo portal y del flujo sanguíneo portal.
- 45 Sin embargo, la relajación de la vena portal no significa que automáticamente aumente el flujo sanguíneo a través del hígado y disminuya la presión sanguínea portal, y de hecho, el efecto de un inhibidor específico de la PDE 5 sobre el flujo sanguíneo a través del hígado y la presión sanguínea portal es impredecible.
- 50
- 55
- 60
- 65

La patente WO-A-2006/074872 describe la utilización de los inhibidores de la PDE-5 para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la actividad de la PDE-5. No existe una descripción de la utilización del compuesto de la presente invención para el tratamiento de la cirrosis hepática o la inhibición de la hipertensión portal.

De acuerdo con un informe anterior que investigaba el efecto del sildenafil sobre la hemodinámica sistémica y visceral en modelos de cirrosis experimental, el sildenafil reduce la presión arterial promedio, causando una hipotensión sistémica, y un aumento del flujo sanguíneo a través de la mesentérica y presión sanguínea portal dependiente de dosis (Liver International, 24(1), 63, 2004; Digestive Disease Week, Abs S1553, 2003). Así, los investigadores que realizaron los experimentos anteriores concluyeron que eran necesarios estudios adicionales para prescribir sildenafil a un paciente de cirrosis, ya que el aumento de la presión sanguínea portal por el sildenafil puede conllevar complicaciones de sangrado.

En el caso de la cirrosis hepática, se observa relajación vascular esplácnica por sobreproducción de NO local. De acuerdo con un informe, el sildenafil aumenta el efecto del NO, lo que resulta en la disminución de la tonicidad angiomesentérica y el aumento del flujo sanguíneo portal (Liver International, 24(1):63, 2004; Digestive Disease Week, Abs S1553, 2003). La patente EP-A-1336602 describe los compuestos de fórmula " F(X)q" que pueden liberar NO *in vivo*. Se dice que son de utilidad en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, isquémicas, degenerativas y proliferativas, lo que incluye el sistema gastrointestinal. F puede ser DA-8159 (udenafilo). Sin embargo, es un requisito esencial de esta descripción que la porción F debe estar unida a entre uno y cinco sustituyentes X como se definen en las reivindicaciones. Por lo tanto, el compuesto al que se refiere este documento no es el mismo compuesto de la Figura 1 en la presente invención.

En mayor o menor grado, la función metabólica del hígado se encuentra reducida en los pacientes con una enfermedad hepática como la cirrosis hepática, hipertensión portal, etc, de forma que aumenta el área bajo la curva de concentración-tiempo (AUC) y la vida media del medicamento (Alimentary Pharmacology Therapeutics, 20(1), 29, 2004; Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 25(8), 625, 2003).

A pesar de ello, un paciente con una enfermedad hepática crónica necesita una administración a largo plazo y múltiples prescripciones. Si se prescribe al paciente una medicación con una vida media corta, esto reduce la tasa de cumplimiento del paciente y dificulta la efectividad del tratamiento.

Por lo tanto, se han realizado estudios para obtener un fármaco para el tratamiento de una enfermedad hepática crónica que mantenga su efecto farmacéutico de forma continua, y que aumente la tasa de cumplimiento del paciente. Se ha descrito que cuando se administra Octreotide, similar a la somatostatina sintética, una vez al día como una preparación de liberación sostenida, el efecto reductor de la presión sanguínea portal era de mayor duración (Hepatology Research, 19(2), 108, 2001). Además, cuando se administra Lanreotide en una forma de liberación sostenida una vez al día mediante inyección intramuscular a un ratón con hipertensión portal inducida por esclerosis hepatoporal, la vasodilatación periférica y la circulación sanguínea excesiva se retardaron y se evitaron la hipertensión portal y la congestión visceral, además de la derivación portal-sistémica (Journal of Hepatology, 31(3), 482, 999).

Considerando los anteriores problemas, existe la necesidad de desarrollar un nuevo fármaco que pueda aumentar el flujo sanguíneo hepático sin causar efectos colaterales, reducir la presión sanguínea portal, y aumentar el cumplimiento con una mayor vida media.

Los presentes inventores sintetizaron un nuevo compuesto, un derivado de pirazolopirimidinona 5-[2-propiloxi-5-(1-metil-2-pirrolidiniletilamidossulfonil)fenil]-1-metil-propil-1,6-dihidro-7H-pirazolo(4,3-d)pirimidin-7-ona, e informaron de su efecto inhibidor de la PDE 5 en un estudio previo (Patente coreana N° 377.782). Luego, los presentes inventores siguieron estudiando los derivados de pirazolopirimidinona, como inhibidores de la PDE 5, y completaron esta invención al confirmarse que un derivado de pirazolopirimidinona posee un excelente efecto inhibidor de la síntesis de colágeno, y puede aumentar el cumplimiento del régimen farmacológico de los pacientes con una enfermedad hepática crónica ya que un derivado de pirazolopirimidinona posee una vida media prolongada y reduce la presión sanguínea.

Problemas técnicos

Es objeto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica para la prevención y tratamiento de una enfermedad hepática que contiene un derivado de pirazolopirimidinona como ingrediente activo.

También es objeto de la presente invención proporcionar un inhibidor de la fibrosis hepática.

También es objeto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica para la prevención y tratamiento de la cirrosis hepática mediante la inhibición de la fibrosis hepática.

También es objeto de la presente invención proporcionar un inhibidor de la hipertensión portal.

También es objeto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica para la prevención y tratamiento de las complicaciones originadas por el progreso de la hipertensión portal.

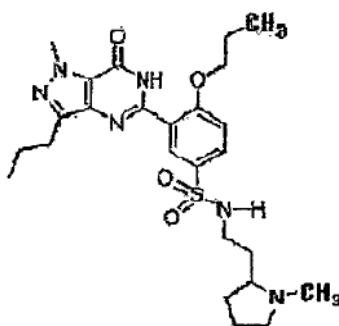
5 Soluciones técnicas

Para alcanzar los anteriores objetos, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para la prevención y el tratamiento de la fibrosis hepática, cirrosis hepática, hipertensión portal, y las complicaciones causadas por las mismas, que contienen un derivado de pirazolopirimidinona como ingrediente activo.

10 A partir de este momento, la presente invención se describe en detalle.

La presente invención proporciona un derivado de pirazolopirimidinona (5-[2-propiloxi-5(1-metil-2-pirrolidiniletilamido-sulfonil)fenil]-1-metil-propil-1,6-dihidro-7H-pirazolo(4,3-d)pirimidin-7-ona) representado por la siguiente estructura química 1, para su utilización en la inhibición, prevención o tratamiento de la fibrosis hepática, cirrosis hepática, hipertensión portal, y las complicaciones causadas por las mismas.

Estructura química 1



20 Un derivado de pirazolopirimidinona es un tipo de inhibidor de la PDE 5. Posee una actividad inhibitoria y una selectividad excelente de la PDE 5. Un derivado de pirazolopirimidinona se absorbe rápidamente debido a su solubilidad mejorada, y posee una elevada biodisponibilidad y una elevada biodistribución. Además, se caracteriza por mostrar una vida media al menos tres veces más larga que la del sildenafil y el vardenafilo.

25 Las propiedades fisicoquímicas de un derivado de pirazolopirimidinona son las siguientes: es insoluble en agua pero soluble en ácido acético, metanol y cloroformo. Su punto de fusión es de 158-161 °C y muestra valores de pKa1 y pKa2 de 6,5 y 12,5 respectivamente. Es un polvo blanco o amarillo pálido que no es un hidrato o solvato.

Un derivado de pirazolopirimidinona puede sintetizarse siguiendo tres pasos, como se detalla a continuación:

30 En el paso 1, se obtiene 4-[2-propiloxi-5-(clorosulfonil)benzamidol-1-metil-3-propil-5-carbamoilpirazol. Concretamente, se añade la cantidad adecuada de 4-[2-propil-oxi benzamidol-1-metil-3-propil-5-carbamoilpirazol a la solución con una cantidad adecuada de ácido clorosulfónico enfriada a 0 °C. La mezcla se agita, filtra, lava y seca para proporcionar 4-[2-propiloxi-5-(clorosulfonil)benzamidol-1-metil-3-propil-5-carbamoilpirazol. En el paso 2, se prepara 4-[2-propiloxi-5-(1-metil-2-pirrolidiniletil)amidosulfonil]benzamido]-1-metil-3-propil-5-carbamoilpirazol a partir del compuesto pirazol producido en el paso anterior 1. Concretamente, se añade la cantidad adecuada de 2-(2-aminoetil)-1-metilpirrolidina a 0 °C a una solución de diclorometano que contiene la cantidad adecuada de 4-[2-propiloxi-5-(clorosulfonil)-benzamido]-1-metil-3-propil-5-carbamoilpirazol del paso 1, seguido de agitación. Tras completarse la reacción, se diluye la solución de reacción con diclorometano. La capa orgánica se lava, se seca, se concentra y se filtra para proporcionar 4-[2-propiloxi-5-(1-metil-2-pirrolidiniletilamidosulfonil)benzamido]-1-metil-3-propil-5-carbamoilpirazol. En el paso 3, 5-[2-propiloxi-5-(1-metil-2-pirrolidiniletilamidosulfonil)fenil]-1-metil-3-propil-1,6-dihidro-7H-pirazolo(4,3-d)-pirimidin-7-ona, que es un derivado de pirazolopirimidinona de la presente invención, se prepara a partir del compuesto obtenido en el paso 2. Concretamente, la cantidad adecuada de compuesto pirazol sintetizado en el paso 2 se disuelve en t-butanol, a la que se añade la cantidad adecuada de t-butoxido de potasio, seguido de reflujo durante el tiempo necesario. Tras completarse la reacción, la solución de reacción se enfría, se diluye, se lava y se seca. Luego, se realiza una destilación a presión reducida, una eliminación del solvente y una cromatografía en columna con gel de sílice para proporcionar el nuevo derivado de pirazolopirimidinona de la invención.

50 La presente invención está relacionada con una composición farmacéutica para la prevención y tratamiento de una enfermedad hepática, y se describe como sigue.

1) La presente invención proporciona un inhibidor de la fibrosis hepática. 2) La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para la prevención y tratamiento de la cirrosis hepática mediante la inhibición de la fibrosis hepática. 3) La presente invención además proporciona un inhibidor de la hipertensión portal. 4) La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para la prevención y tratamiento de las complicaciones causadas por la hipertensión portal.

Con el aumento de los depósitos de colágeno en las células estrelladas hepáticas del hígado, se desarrolla la fibrosis hepática. Luego, las células del hígado restantes entre las fibras empiezan a proliferar para mantener las funciones del hígado, mediante lo cual se forman nódulos de regeneración. La vena central del lóbulo hepático se ve presionada por esta fibrosis y los nódulos de regeneración, lo que resulta en el bloqueo del flujo sanguíneo a través de la vena portal hacia el hígado, lo que causa la hipertensión portal.

Por lo tanto, la presión sanguínea portal puede reducirse con la inhibición de la fibrosis hepática. El flujo sanguíneo a través del hígado puede aumentarse con el descenso de la presión sanguínea portal y el aumento del flujo sanguíneo portal, lo que conduce a la protección del hígado.

Como se ha mencionado anteriormente, el control de la fibrosis hepática y la presión sanguínea portal está muy relacionada con la protección del hígado. La presente invención utiliza dicho derivado de pirazolopirimidinona como ingrediente activo para prevenir el progreso de la fibrosis hepática, mediante la inhibición de la síntesis de colágeno en las células estrelladas hepáticas, lo que posee un efecto protector sobre el hígado, y puede reducir la presión sanguínea portal al actuar directamente sobre la vena portal, y aumenta el flujo sanguíneo a través de la vena portal, sugiriendo todo ello que la presente invención posee un excelente terapéutico sobre la enfermedad hepática crónica relacionada con la fibrosis hepática y la hipertensión portal.

Un derivado de pirazolopirimidinona de la presente invención muestra un efecto inhibitorio sobre la síntesis de colágeno excelente, que es 10-16 veces superior al de otros inhibidores convencionales de la PDE 5. Mediante este excelente efecto se confirmó que un derivado de pirazolopirimidinona de la invención podía inhibir la fibrosis hepática causada por los depósitos de colágeno en las células estrelladas hepáticas del hígado, y proteger el hígado (véase la Tabla 1). Además, un derivado de pirazolopirimidinona de la invención reduce la presión sanguínea portal de forma dependiente de la dosis, y aumenta el diámetro portal y el flujo sanguíneo portal. Al contrario que el sildenafil, que se ha descrito que aumenta ligeramente la presión sanguínea portal, un derivado de pirazolopirimidinona de la invención puede utilizarse de forma efectiva para el tratamiento de la hipertensión portal y varias de las complicaciones inducidas por ésta (véase la Tabla 2).

Una enfermedad hepática crónica incluye varias complicaciones causadas por la cirrosis hepática, lo que resulta de la fibrosis hepática y la hipertensión portal (Rubin Farber Pathology, 1999). Tales complicaciones se ejemplifican con las varices esofágicas (American Family Physician, 55(5), 1851, 1997), agrandamiento esplénico y el hiperesplenismo, ascites, síndrome hepatorenal (Gastroenterology Vol. 120, Nº 3), peritonitis bacteriana espontánea (Curr Opinion In Gastroenterology 2004, 20 : 254-263), síndrome hepatopulmonar (Dig Dis Sci. 2003, 48: 556-560), encefalopatía hepática (Neuroreport 2003, 14:2379-2382), etc. Tales complicaciones se describen en detalle a continuación.

Las varices esofágicas se refieren a la generación de venas anormales en el esófago o el estómago. Cuando el trastorno empeora se agrava, y estas venas se rompen y sangran. La elevada presión sanguínea portal causa un trastorno del flujo sanguíneo, lo que aumenta el tamaño de las células del bazo, tras lo que se desarrolla un agrandamiento esplénico, otra causa de sangrado interno. Ascites indica hidropesía abdominal. La presión portal elevada aumenta la presión hidrostática del plasma sanguíneo y la linfa, lo que resulta en estasis linfática que induce un flujo de salida de humedad hacia la cavidad abdominal. El ascites presiona el pulmón, lo que causa trabajo respiratorio, y una presión a largo plazo en el pulmón incluso puede causar una sepsis fatal. La peritonitis bacteriana idiopática (autógena), también causada por la presión sanguínea portal elevada, a menudo se observa en pacientes con ascites, a diferencia de otras peritonitis (peritonitis secundaria) que tienen una causa anterior como una enterorrexia interna y gastrorrexia o un traumatismo. El síndrome hepatorenal indica la depresión severa del riñón por la cirrosis hepática, causada por un desequilibrio de los fluidos corporales. El síndrome hepatopulmonar es una enfermedad de hipoxia, observada en pacientes con una enfermedad hepática crónica, aunque esos pacientes no sufran una enfermedad específica cardíaca o pulmonar. Como la cirrosis hepática, la encefalopatía hepática es otra complicación grave, que se desarrolla por un mal funcionamiento en la conversión del amonio, un material tóxico interno, a urea, que es una de las funciones del hígado, afectando así al sistema nervioso e incluso conduciendo a un coma fatal. Como se ha explicado aquí anteriormente, el trastorno de la circulación sanguínea presiona las venas portales y a continuación ocurre un reflujo de sangre en las venas portales, de forma que el flujo sanguíneo encuentra un desvío sin pasar a través del hígado. Como resultado, se generan vasos colaterales, en particular en las áreas de baja presión del tracto digestivo como bajo la capa mucosa del esófago, sobre las paredes abdominales anterolaterales y en el recto, etc. Por lo tanto, un derivado de pirazolopirimidinona de la presente invención puede utilizarse de forma efectiva como una composición farmacéutica para la prevención y tratamiento de las complicaciones anteriormente mencionadas fundamentalmente mediante la supresión del aumento de la presión portal.

5 Una composición farmacéutica para la prevención y tratamiento de una enfermedad hepática, que contiene un derivado de pirazolopirimidinona como ingrediente activo de la presente invención, puede administrarse por vía oral o parenteral y puede utilizarse en formas generales de formulación farmacéutica. En esta invención, la administración oral es preferible. La composición farmacéutica de la presente invención puede prepararse para su administración oral o parenteral mezclándola con agentes de relleno, agentes de extensión, agentes de unión, agentes humectantes, agentes de desintegración, diluyentes como surfactantes, o excipientes generalmente utilizados

10 Las formulaciones sólidas para su administración oral son los comprimidos, píldoras, polvos, granulados y cápsulas. Estas formulaciones sólidas se preparan mezclando uno o más excipientes adecuados como el almidón, carbonato cálcico, sacarosa, lactosa, gelatina, etc. Excepto para los excipientes simples, pueden utilizarse lubricantes, por ejemplo estearato magnésico, talco, etc.

15 Las formulaciones líquidas para las administraciones orales son suspensiones, soluciones, emulsiones y jarabes, y las formulaciones anteriormente mencionadas pueden contener varios excipientes como agentes humectantes, edulcorantes, aromatizantes y conservantes además de los diluyentes de uso común como es el agua y la parafina líquida. Las formulaciones para la administración parenteral son soluciones acuosas estériles, excipientes insolubles en agua, suspensiones, emulsiones, y supositorios. Los excipientes insolubles en agua y las suspensiones pueden contener, además del compuesto o compuestos activos, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como aceite de oliva, éster inyectable como etilato, etc. Los supositorios pueden contener, además del compuesto o compuestos activos, witepsol, macrogol, tween 61, manteca de cacao, manteca de laurel, glicerogelatina, etc.

20 La dosis efectiva de la composición que contiene un derivado de pirazolopirimidinona como ingrediente activo de la presente invención puede determinarse de acuerdo con el peso, edad, género, estado de salud, dieta, frecuencia de administración, forma de administración, excreción y gravedad de una enfermedad. La dosis preferible y frecuencia de administración para un adulto es de 50 - 200 mg por día y de una a tres o cuatro veces por día.

Breve descripción de las figuras

30 Las Figuras 1-4 son un grupo de fotomicrografías que muestran los efectos inhibidores de la síntesis de colágeno, de acuerdo con el Ejemplo 2 de la invención, del control de tipo salvaje (Fig. 1), control de solvente (Fig. 2), grupo tratado con sildenafil (Fig. 3) y grupo tratado con un derivado de pirazolopirimidinona (Fig. 4).

Mejor forma de llevar a cabo la invención

35 Las presentes realizaciones prácticas y preferibles de la presente invención son ilustrativas tal como se muestra en los siguientes Ejemplos.

40 No obstante, un experto en la materia apreciará, considerando esta descripción, que se pueden hacer modificaciones y mejoras dentro del espíritu y alcance de la presente invención.

<Ejemplo 1> Investigación del efecto inhibitor de los derivados de pirazilopirimidinona sobre la síntesis de colágeno utilizando células estrelladas hepáticas

45 Los siguientes experimentos se realizaron para investigar el efecto inhibitorio de un derivado de pirazolopirimidinona de la presente invención sobre la síntesis de colágeno.

50 Las células estrelladas hepáticas se aislaron a partir de ratas macho blancas Sprague Dawley (alrededor de 300 g de peso, n=10). En primer lugar, se inyectó ketamina en la cavidad abdominal para anestesiarse a las ratas. Se abrió el abdomen y se inyectó heparina en la vena portal. Entonces, se perfundió una solución de tampón de Hank que contiene pronasa al 0,02% y colagenasa al 0,015% a través del hígado por un tiempo necesario para preparar el hígado en secciones. El hígado extraído se troceó en una placa de petri esterilizada, después se colocó en una solución tamponada que contiene pronasa y DNasa, y el hígado troceado se homogeneizó entonces sobre una placa de petri esterilizada.

55 La muestra preparada se filtró con una malla de nylon de 100 μm en un tubo de 50 ml. Se realizó la centrifugación con 50 g durante 2 minutos para separar las células no parenquimáticas en el sobrenadante. Se realizó la centrifugación de nuevo con 450 g a 4°C durante 10 minutos. El precipitado se hizo flotar en una solución tamponada que contiene 25 $\mu\text{g/ml}$ de DNasa, seguido por centrifugación con 450 g a 4 °C durante 10 minutos, que se repitió dos veces. El precipitado final se reflotó en 21 ml de solución tamponada, que se mezcló entonces con 17 ml de OptiPrep 25% para preparar la solución final de OptiPrep 11,2% (1058 g/cm³). La solución de suspensión celular se distribuyó con cuidado con OptiPrep en cuatro tubos de 15 ml que contenían 3 ml de OptiPrep al 17%, a los que se añadió 1 ml de solución tamponada. Se realizó la centrifugación con 1400 g a 4 °C durante 17 minutos, y como resultado, se obtuvieron las células estrelladas hepáticas puras a partir de la fase opaca entre la solución tamponada y OptiPrep al 11,8%.

Las células estrelladas hepáticas separadas se resuspendieron en DMEM (Medio Eagle modificado de Dulbecco), seguido de un lavado. Las células se resuspendieron de nuevo en DMEM suplementado con FBS al 10 % (suero fetal bovino) y antibióticos, después se inocularon en un recipiente de cultivo, que se cultivó en un incubador a 37°C y CO₂ al 5%. El medio de cultivo se sustituyó primero 24 horas después, y después se sustituyó cada 48 horas para el subcultivo.

Las células estrelladas hepáticas subcultivadas 8 veces se agruparon en un número de 2×10^5 , que se pretrataron con 25 ng/ml de PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas) durante 24 horas. Tras este tiempo, se añadieron el derivado de pirazolopirimidinona, sildenafilo y vardenafilo a diferentes concentraciones de 0, 3, 5, y 10 ng/ml para la reacción. El RNA total se extrajo y se realizó una RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa) para el colágeno.

Basado en la concentración relativa respecto a beta-actina, se comparó un material diana con otras muestras de prueba. Para poder determinar el efecto inhibidor de una muestra diana sobre la síntesis de colágeno, se analizó la concentración inhibidora al 50% (CI₅₀), y el resultado se muestra en la Tabla 1.

[Tabla 1] Efecto inhibidor de los inhibidores de la PDE 5 sobre la síntesis de colágeno.

Pirazolopirimidinona	derivado de pirazolopirimidinona	Sildenafil	Vardenafilo
CI ₅₀ (nM)	$0,8 \pm 0,2^a$	$13,1 \pm 2,3$	$7,8 \pm 1,7$
^a Media \pm Desviación estándar			

Tal como se muestra en la Tabla 1, la CI₅₀ de un derivado de pirazolopirimidinona fue de $0,8 \pm 0,2$ nM, que fue 16 veces y 10 veces mayor que el efecto inhibidor en la síntesis de colágeno que el de sildenafilo y vardenafilo, respectivamente. Por lo tanto, se confirmó que un derivado de pirazolopirimidinona de la presente invención posee un efecto inhibidor en la síntesis de colágeno más excelente que otros inhibidores de PDE 5, sildenafilo y vardenafilo, y de acuerdo con esto también posee un excelente efecto inhibidor sobre la fibrosis hepática que resulta de un excesivo depósito de colágeno, y por lo tanto un excelente efecto protector del hígado.

<Ejemplo 2> Investigación del efecto protector del hígado de un derivado de pirazolopirimidinona utilizando un modelo animal de fibrosis hepática

Los siguientes experimentos se realizaron para investigar el efecto inhibidor in vivo de la síntesis de colágeno de un derivado de pirazolopirimidinona de la presente invención.

Se dividieron en 4 grupos (5 ratas por grupo) las ratas blancas hembras Sprague Dawley (de aproximadamente 300 g de peso), y se indujo fibrosis hepática en grupos experimentales excepto al grupo control de tipo salvaje (Toxicology, 2001). Se inyectó DMN (dimetilnitrosamina) en la cavidad abdominal en una dosis de 10 mg/kg de forma seriada durante 2 semanas con una frecuencia de dosis de tres veces por semana. Un derivado de pirazolopirimidinona y sildenafilo en tampón triazol (Merck) se administraron por vía oral a 10 mg/kg/día durante 2 semanas (periodo de inducción de DMN). Solo el tampón triazol se administró al grupo solvente control. Dos semanas más tarde, se extrajo el hígado, se fijó en formalina neutral 10 %, se embebió en parafina y se laminó en 4 m. Cada sección se trató con xileno para eliminar la parafina, seguido del tratamiento con alcohol y peróxido de hidrógeno al 0,1% (H₂O₂). Tras el tratamiento con PBS, las secciones se trataron con antisuero policlonal (Chemicon) frente a colágeno de tipo I diluido 1:500 y antisuero policlonal (BioGenesis) frente a colágeno de tipo III diluido 1: 100, a 37 °C durante una hora. Tras el lavado, las muestras se trataron con anticuerpo de cabra anti- IgG de conejo conjugado con biotina diluido 1:200. La tinción inmunohistológica se realizó al reaccionar las muestras con complejo avidina-biotina (Vector Laboratories), después se marcó el complejo antígeno-anticuerpo con 3-amino-9-etilcarbazol (AEC), cuya imagen se tomó mediante microscopio óptico mostrado en la Fig. 1-4. El grupo control se trató con suero de caballo no inmunizado en lugar de anticuerpo primario.

Tal como se muestra en las Fig. 1-4, se observó un alto nivel de síntesis de colágeno en las venas portal hepáticas y alrededor de las venas portal del grupo solvente control, en comparación con los animales de tipo salvaje, lo que indica que la síntesis de colágeno está remarcadamente inhibida por un derivado de pirazolopirimidinona y sildenafilo. La inhibición de la síntesis de colágeno en un grupo tratado con un derivado de pirazolopirimidinona fue superior que en el grupo tratado con sildenafilo.

<Ejemplo 3> Investigación del efecto de un derivado de pirazolopirimidinona con un modelo animal de hipertensión portal

Los siguientes experimentos se realizaron para investigar el efecto de un derivado de pirazolopirimidinona sobre la hipertensión portal.

12 perros de la raza beagle de un peso aproximado de 10 kg se dividieron en cuatro grupos (se escogieron 3 perros por grupo al azar), y se les realizó la ligación del conducto biliar. A las dos semanas de la operación, se administró

por vía oral un derivado de pirazolopirimidinona, sildenafilo y vardenafilo en dosis de 10 mg/kg/día y a 3 de ellos se les administró solvente solo. Los animales se dejaron en ayunas durante 4 horas, después se les inyectó pentobarbital por vía intravenosa para anestesiarnos. Se insertó un tubo a través de la vena mesentérica hacia la vena portal para medir la presión sanguínea portal.

También se realizó un ultrasonografía Doppler para medir el diámetro de la vena portal. El flujo sanguíneo a través de la vena portal se midió utilizando la siguiente fórmula química matemática 1, y el resultado se muestra en la Tabla 2.

Fórmula matemática 1

Tasa de flujo sanguíneo = $\pi R^2 \times V \times 60$ (R: diámetro de la vena portal/2, V: velocidad media del flujo sanguíneo)

[Tabla 2] Efecto de un derivado de pirazolopirimidinona sobre la hipertensión portal

	Grupo tratado con solvente	Grupo tratado con un derivado de pirazolopirimidinona	Grupo tratado con Sildenafil	Grupo tratado con Vardenafilo
Presión sanguínea Portal (kPa)	3,13±0,31 ^a	2,50±0,20*	2,93±0,25	2,87±0,25
Diámetro de la vena portal (mm)	7,07±0,15	7,70±0,26	7,47±0,21	7,43±0,21
Tasa de flujo sanguíneo (ml/min)	584,26±159,97	932,31±89,83*	754,47±80,24	729,29±83,23

^aMedia ± Desviación estándar, *estadísticamente significativo (p<0,05)

Tal como se muestra en la Tabla 2, la presión sanguínea portal disminuyó un 21% en el un grupo tratado con un derivado de pirazolopirimidinona, disminuyó un 7% en el grupo tratado con sildenafilo y disminuyó un 9% en el grupo tratado con vardenafilo, en comparación con el grupo control tratado con solvente. De la comparación del diámetro de la vena portal, se confirmó que los diámetros de las venas portal de cada uno de los grupos tratados con un derivado de pirazolopirimidinona, sildenafilo y vardenafilo se aumentó en un 6-9%, que se cree que no es estadísticamente significativo. También se compararon las tasas de flujo sanguíneo a través de las venas portal. Como resultado, la tasa de flujo sanguíneo en el grupo tratado con derivado de pirazolopirimidinona aumentó un 59,9%, en comparación con el grupo tratado con solvente, y las tasas de flujo sanguíneo en los grupos tratados con sildenafilo y vardenafilo aumentaron un 29,1% y un 24,8% respectivamente.

De los resultados anteriores, se confirmó que un derivado de pirazolopirimidinona de la presente invención, a diferencia de sildenafilo que se sabe que en lugar de aumentar la presión sanguínea portal, reduce de forma marcada la presión sanguínea portal pero aumenta significativamente el flujo sanguíneo a través de la vena portal, haciendo de este un candidato muy efectivo para una composición farmacéutica terapéutica para la hipertensión portal y complicaciones de la misma, sin efectos secundarios que incluye hemorragia de variz esofágica, etc.

<Ejemplo 4> Investigación de la farmacocinética in vivo de un derivado de pirazolopirimidinona

Nueve voluntarios entre los pacientes con hipertensión portal con el criterio de edad entre 19 y 45 años y un peso superior a 45 kg (dentro del 15% de desviación del peso corporal ideal) participaron en los experimentos. Todos los voluntarios aceptaron participar por escrito para unirse a los experimentos y fueron dignos de confianza, cooperativos y con intención de seguir las reglas. Se dividieron en tres grupos de forma aleatoria; a tres de ellos se les administró un derivado de pirazolopirimidinona, tres con sildenafilo y los tres restantes se les administró vardenafilo a diferentes concentraciones de 100, 50, y 10 mg, respectivamente.

Se utilizó un método de doble ciego para los experimentos. A las 8-9 a.m. del día del ensayo, los fármacos experimentales se administraron con 240 ml de agua a los voluntarios. Estuvieron en ayunas las 4 horas siguientes a la administración, y se les proporcionó la comida 4 horas después y la cena 9 horas más tarde. Se tomaron muestras de sangre antes de la administración del día del ensayo y a las 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24 y 32 horas tras la administración. Se aisló el plasma sanguíneo, seguido por una HPLC. Se añadieron 100 µl de carbonato sódico 0,1 M y éter etílico 1,0 N a 0,5 ml de plasma sanguíneo, después se mezclaron durante 1 minuto, seguido por la centrifugación a 12.000 rpm durante 3 minutos. Se obtuvo un sobrenadante y el solvente orgánico se volatilizó utilizando un Speed vac. Después se añadió 100 µl de fase móvil, seguido de agitación. El producto resultante se inyectó en un inyector de HPLC, y el resultado se muestra en la Tabla 3.

[Tabla 3] Comparación de las vidas media del derivado de pirazolopirimidinona, sildenafilo y vardenafilo en pacientes con hipertensión portal

	Derivado de pirazolopirimidinona (100 mg)	Sildenafil (50 mg)	Vardenafilo (10 mg)
Vida media (hora)	15,1±3,5 ^a	4,5±1,2	6,3 ±2,1
^a Media ± Desviación estándar			

5 Tal como se muestra en la Tabla 3, la vida media de un derivado de pirazolopirimidinona fue de 15,1±3,5 horas, que fue tres veces y dos veces superior que aquellas de sildenafilo (4,5±1,2) y vardenafilo (6,3±2,1), respectivamente.

10 Así, un derivado de pirazolopirimidinona de la presente invención no solo posee un efecto terapéutico excelente sobre la fibrosis hepática y la hipertensión portal, sino que también reduce la frecuencia de administración debido a su mayor vida media comparada con los otros inhibidores de PDE-5, sugiriendo que un derivado de pirazolopirimidinona puede aumentar el cumplimiento en pacientes con una enfermedad hepática crónica.

15 Se describen a continuación ejemplos preparativos de la composición de la presente invención.

<Ejemplo preparativo> Preparación de composiciones farmacéuticas para la administración oral

1. Preparación de polvos

20 Derivado de pirazolopirimidinona 2g
Lactosa 1g

Los ingredientes anteriores se mezclan juntos, y una bolsa hermética se rellenó con la mezcla para preparar los polvos.

2. Preparación de comprimidos

30 Derivado de pirazolopirimidinona 100mg
Almidón de maíz 100mg
Lactosa 100mg
Estearato de magnesio 2mg

Los ingredientes anteriores se mezclan juntos, y los comprimidos se prepararon comprimiendo de acuerdo con el método convencional de producción de comprimidos.

3. Preparación de cápsulas

40 Derivado de pirazolopirimidinona 100mg
Almidón de maíz 100mg
Lactosa 100mg
Estearato de magnesio 2mg

Los ingredientes anteriores se mezclan juntos, y las cápsulas de gelatina se rellenaron con la mezcla para preparar cápsulas de acuerdo con el método convencional de producción de cápsulas.

45 Aplicabilidad industrial

50 Tal como se ha explicado hasta aquí en este documento, un derivado de pirazolopirimidinona de la presente invención posee un excelente efecto inhibidor sobre la síntesis de colágeno en células estrelladas hepáticas, aumenta el flujo sanguíneo a través de la vena portal y expande el diámetro de la vena portal afectando de forma directa a la vena portal, y reduce la presión sanguínea portal. Así, un derivado de pirazolopirimidinona puede utilizarse de forma efectiva para la prevención y tratamiento de la fibrosis hepática, la cirrosis hepática que resulta de una fibrosis hepática de larga duración, hipertensión portal y varias complicaciones provocadas por ello. Además, un derivado de pirazolopirimidinona de la presente invención posee una vida media superior in vivo, lo que sugiere que puede aumentar el cumplimiento en los pacientes con una enfermedad hepática crónica acortando la frecuencia de administración.

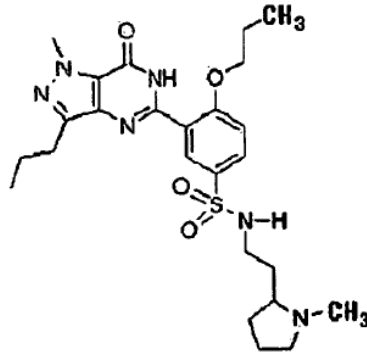
55

REIVINDICACIONES

1. Un derivado de pirazolopirimidinona para su utilización en la inhibición de la fibrosis hepática, en el que un derivado de pirazolopirimidinona posee la siguiente estructura química I.

5

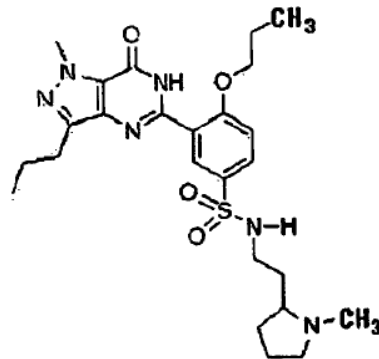
Estructura química 1



2. La utilización de un derivado de pirazolopirimidinona para la elaboración de un fármaco para la inhibición de la fibrosis hepática, en el que un derivado de pirazolopirimidinona posee la siguiente estructura química I.

10

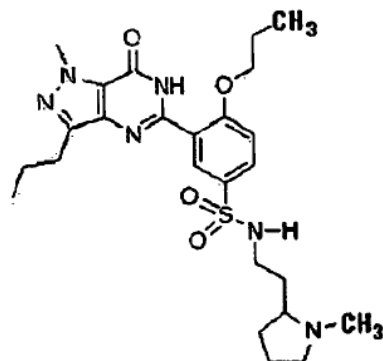
Estructura química 1



3. Un derivado de pirazolopirimidinona para su utilización en la prevención o tratamiento de la cirrosis hepática, en el que el derivado de pirazolopirimidinona posee la siguiente estructura química I.

15

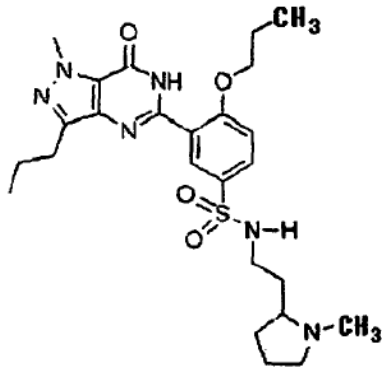
Estructura química 1



4. La utilización de un derivado de pirazolopirimidinona para la elaboración de un fármaco para la prevención y tratamiento de la cirrosis hepática, en el que el derivado de pirazolopirimidinona posee la siguiente estructura química I.

20

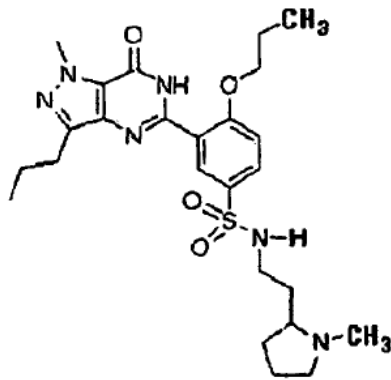
Estructura química 1



5. Un derivado de pirazolopirimidinona para su utilización en la inhibición de la hipertensión portal, en el que el derivado de pirazolopirimidinona posee la siguiente estructura química I.

5

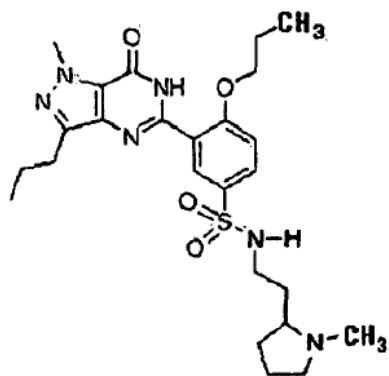
Estructura química 1



6. La utilización de un derivado de pirazolopirimidinona para la elaboración de un fármaco para la inhibición de la hipertensión portal, en el que el derivado de pirazolopirimidinona posee la siguiente estructura química I.

10

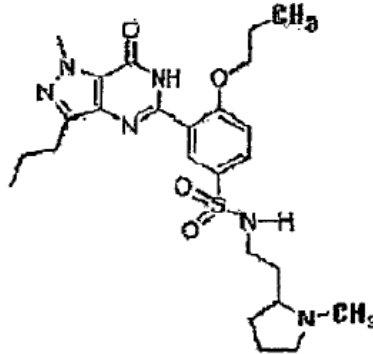
Estructura química 1



7. Un derivado de pirazolopirimidinona para la prevención o tratamiento de las complicaciones causadas por la hipertensión portal, en el que el derivado de pirazolopirimidinona posee la siguiente estructura química I y en el que la complicación se selecciona de entre el grupo que consiste en varices esofágicas, agrandamiento esplénico, hiperesplenismo, ascites, peritonitis bacteriana espontánea, síndrome hepatorenal, síndrome hepatopulmonar y encefalopatía hepática.

15

Estructura química 1



5 8. La utilización de un derivado de pirazolopirimidinona en la elaboración de un fármaco para la prevención o tratamiento de complicaciones causadas por la hipertensión portal, en el que el derivado de pirazolopirimidinona posee la siguiente estructura química I y en el que la complicación se selecciona de entre el grupo que consiste en varices esofágicas, agrandamiento esplénico, hiperesplenismo, ascites, peritonitis bacteriana espontánea, síndrome hepatorenal, síndrome hepatopulmonar y encefalopatía hepática.

Estructura química 1

10

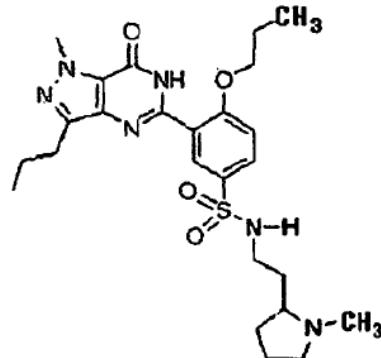


Figura 1

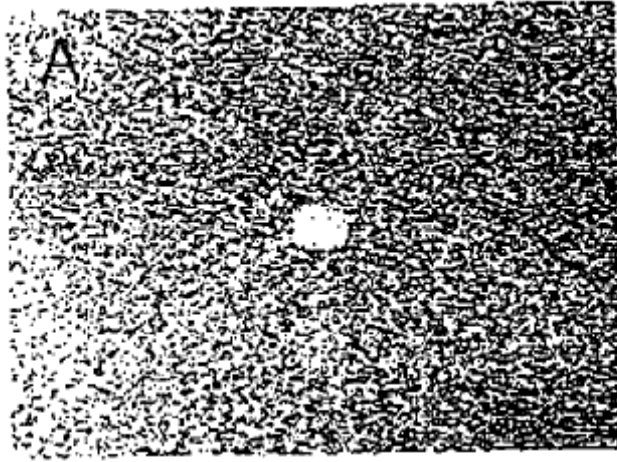


Figura 2



Figura 3

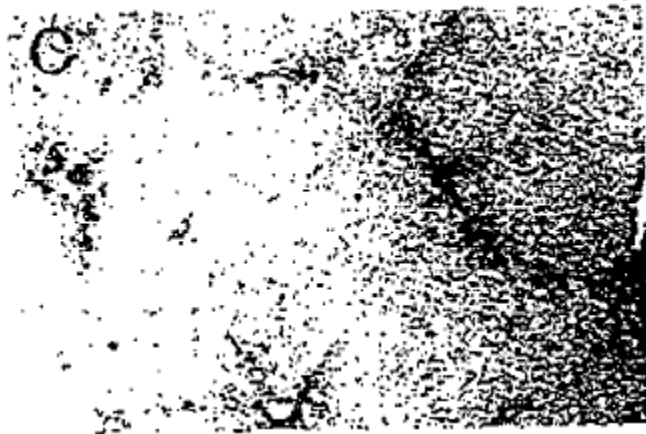


Figura 4

