

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 731**

51 Int. Cl.:

A61K 31/58 (2006.01)

A61P 9/14 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2008 E 08760508 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 2160190**

54 Título: **Derivados 5beta,14beta-androstano útiles para el tratamiento de enfermedades debidas a la fibrosis de órganos**

30 Prioridad:

07.06.2007 EP 07109779

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

19.01.2016

73 Titular/es:

**SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE
RIUNITE S.P.A. (100.0%)
VIALE SHAKESPEARE, 47
00144 ROME, IT**

72 Inventor/es:

**BERRINO, LIBERATO;
CASCINO, ANTONIO;
CIPOLLARO, MARILENA;
FORTE, AMALIA;
ROSSI, FRANCESCO;
BIANCHI, GIUSEPPE y
FERRARI, PATRIZIA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 556 731 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).

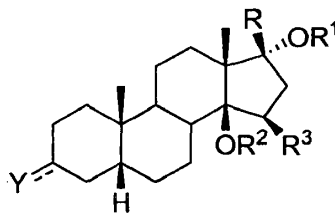
DESCRIPCIÓN

Derivados 5beta, 14beta-androstano útiles para el tratamiento de enfermedades debidas a la fibrosis de órganos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a derivados 17beta-(3-furil) y (4-piridazinil)-5beta, 14beta-androstano, como agentes útiles para la preparación de un medicamento para la prevención y tratamiento de enfermedades debidas a la fibrosis de órganos.

Más específicamente la invención se refiere a compuestos de fórmula (I):



(I)

donde:

10 el símbolo --- representa un enlace sencillo o un enlace doble;

Y es oxígeno o guanidinoimino, donde --- en la posición 3 es un doble enlace;

Y es hidroxilo, OR^4 ó SR^4 , donde --- en la posición 3 es un enlace sencillo y puede presentar una configuración alfa o beta;

R es un grupo 3-furilo o 4-piridazinilo sustituido o no sustituido;

15 R^1 es hidrógeno; metilo; etilo o n-propilo sustituido con OH ó NR^5R^6 ;

R^2 es hidrógeno o junto con R^3 es un enlace de un anillo de oxirano;

R^3 es hidrógeno o junto con R^2 es un enlace de un anillo de oxirano;

20 R^4 es hidrógeno; metilo; alquilo C2-C6 ó alqueno C3-C6 ó acilo C2-C6, estando dichos grupos alquilo, alqueno o acilo no sustituidos o sustituidos con un grupo de amonio cuaternario o uno o más OR^7 , NR^8R^9 , formilo, amidino, guanidinoimino ó NR^8R^9 e hidroxilo;

R^5 , R^6 son de forma independiente hidrógeno; metilo; alquilo C2-C6 no sustituido o sustituido con $\text{NR}^{10}\text{R}^{11}$, ó $\text{NR}^{10}\text{R}^{11}$ e hidroxilo, ó R^5 y R^6 tomados junto al átomo de nitrógeno forman un anillo penta- o hexa-monoheterocíclico saturado o insaturado, sustituido o no sustituido, que contiene opcionalmente otro heteroátomo seleccionado entre oxígeno o azufre o nitrógeno;

25 R^7 es hidrógeno, metilo o alquilo C2-C4, estando dicho alquilo no sustituido o sustituido con uno o más $\text{NR}^{10}\text{R}^{11}$ ó con $\text{NR}^{10}\text{R}^{11}$ e hidroxilo;

30 R^8 , R^9 son de forma independiente hidrógeno; metilo; alquilo C2-C6 ó alqueno C3-C6, estando dichos grupos alquilo y alqueno no sustituidos o sustituidos con uno o más $\text{NR}^{10}\text{R}^{11}$, ó $\text{NR}^{10}\text{R}^{11}$ e hidroxilo, ó R^8 y R^9 tomados junto con el átomo de nitrógeno forman un anillo penta- o hexa-monoheterocíclico saturado o insaturado, sustituido o no sustituido, que contiene opcionalmente otro heteroátomo seleccionado entre oxígeno o azufre o nitrógeno, o R^8 es hidrógeno y R^9 es amidino; ó NR^8R^9 representa propargilamino,

R^{10} , R^{11} son de forma independiente hidrógeno, alquilo C1-C6, ó R^{10} y R^{11} , tomados junto con el átomo de nitrógeno forman un anillo penta- o hexa-monoheterocíclico saturado o insaturado.

35 También están incluidas en esta invención las sales farmacéuticamente aceptables de (I), que mantienen la actividad biológica de la base y son derivados de tales ácidos farmacéuticamente aceptables conocidos como ácido hidrocórico, sulfúrico, fosfórico, málico, tartárico, maelico, cítrico, metanosulfónico o benzoico.

Los grupos alquilo y alqueno pueden ser grupos de cadena ramificada o lineal.

El grupo alquilo C1-C6 es preferiblemente un grupo alquilo C1-C4, p.ej. metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo.

El grupo alquilo C2-C6 es preferiblemente un grupo alquilo C2-C4, p.ej. etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo.

El grupo alqueno C3-C6 es preferiblemente un grupo alqueno C3-C4, p.ej. 2-propeno, 2-butenilo.

El acilo C2-C6 es preferiblemente un grupo acilo C2-C4, p.ej. acetilo, propionilo, butirilo.

- 5 El grupo amonio cuaternario es preferiblemente un grupo trimetilamonio- o un N-metilpirrolidinio- o un N-metilpiperidinio- .

El grupo OR⁷ es preferiblemente hidroxilo, 2-aminoetoxi, 3-aminopropoxi, 2-dimetilaminoetoxi, 2-dietilaminoetoxi, 3-dimetilaminopropoxi, 3-amino-2-hidroxipropoxi, 2,3-diaminopropoxi, 2-(1-pirrolidinil)etoxi, 3-(1-pirrolidinil)propoxi.

- 10 El grupo NR⁵R⁶ es preferiblemente amino, metilamino, etilamino, n-propilamino, dimetilamino, dietilamino, pirrolidinilo, morfolino, piperazina, 1-imidazolilo, 2-aminoetilamino, 3-aminopropilamino.

El grupo NR⁸R⁹ es preferiblemente amino, metilamino, etilamino, n-propilamino, iso-propilamino, alilamino, propargilamino, dimetilamino, dietilamino, pirrolidinilo, morfolino, piperazinilo, 1-imidazolilo, 1-guanidino, 2-aminoetilamino, 3-aminopropilamino, 2-(1-pirrolidinil)etilamino, 3-(1-pirrolidinil)propilamino, 3-amino-2-hidroxipropilamino, 3-(1-pirrolidinil)2-hidroxipropilamino, 2,3-diaminopropilamino, (2-(1-pirrolidinil)etil)metilamino.

- 15 Los ejemplos preferidos de compuestos específicos según la presente invención son:

17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-3 beta, 14 beta, 17 alfa -trioi;

3 beta -(2-Hidroxietoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa-dioi;

3 beta -(2-Aminoetoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -dioi;

3 beta -(3-Aminopropoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa -dioi;

- 20 3 beta -(2-Metilaminoetoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta-androstano-14 beta ,17 alfa -dioi;

3 beta -(2-(1-Pirrolidinil)etoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa -dioi;

3 beta -(2-(3-(1-Pirrolidinil)propoxi)etoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -dioi;

3 beta -(3-(1-Pirrolidinil)propoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa-dioi;

3 beta -(2-(1-Imidazolil)etoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa -dioi;

- 25 3 beta -(2-(2-Imidazolil-2-il)etoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa -dioi;

3 beta -(2-(2-Amidino)etoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa -dioi;

3 beta -(2-(2-(1-Pirrolidinil)etoxi)etoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -dioi;

3 beta -(2-Guanidinoetoxi)-17 beta -(3-furil) 5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa -dioi;

3 beta -(3-Guanidinopropoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa -dioi;

- 30 3 beta -(3-Amino-2-hidroxipropoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa -dioi;

3 beta -(2,3-Diaminopropoxi)-17 beta -(3-furil)5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa -dioi;

17 beta -(3-furil)-17 alfa -metoxi-5 beta -androstano-3 beta, 14 beta -dioi;

17 beta -(3-furil)-17 alfa -(2-(1-pirrolidinil)etoxi)-5 beta-androstano-3 beta, 14 beta -dioi;

17 beta -(3-furil)-17 alfa -(3-aminopropoxi)-5 beta-androstano-3 beta, 14 beta -dioi;

- 35 3 beta -(2-(1-Pirrolidinil)etoxi)-17 beta -(3-furil)-17 alfa-metoxi-5 beta -androstano-14beta -ol;

3 beta, 17 alfa -Bis(2-(1-pirrolidinil)etoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-14 beta -ol;

3 beta, 17 alfa -Bis(3-aminopropoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-14 beta -ol;

14 beta, 17 alfa -Dihidroxi-17 beta -(3-furil)-5 beta-androstano-3-ona;

3-Guanidinoimino-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -dioi;

- 40 17 beta -(4-piridazinil)-5 beta -androstano-3 beta, 14 beta, 17 alfa -trioi;

- 3 beta -(2-hidroxietoxi)-17 beta -(4-piridazinil)-5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(3-Aminopropoxi)-17 beta -(4-piridazinil)-5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(2-(1-Pirrolidinil)etoxi)-17 beta -(4-piridazinil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(3-(1-Pirrolidinil)propoxi)-17 beta -(4-piridazinil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 5 17 beta -(4-Piridazinil)-17 alfa -(3-aminopropoxi)-5 beta-androstano-3 beta, 14 beta -diol;
- 3 beta -(2-(1-Pirrolidinil)etoxi)-17 beta -(4-piridazinil)-17 alfa -metoxi-5 beta -androstano-14 beta -ol;
- 3 beta -(2-(1-Pirrolidinil)etoxi)-17 beta -(4-piridazinil)-17 alfa -(3-amino-propoxi)-5 beta -androstano-14 beta -ol;
- 14 beta, 17 alfa -Dihidroxi-17 beta -(4-piridazinil)-5 beta-androstano-3-ona;
- 3-Guanidinoimino-17 beta -(4-piridazinil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 10 14 beta, 15 beta -Epoxi-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-3 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(2-Hidroxietoxi)-14 beta, 15 beta -epoxi-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-17 alfa -ol;
- 3 beta -(3-Aminopropoxi)-14 beta, 15 beta -epoxi-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-17 alfa -ol;
- 3 beta -(2-(1-Pirrolidinil)etoxi)-14 beta, 15 beta -epoxi-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-17 alfa -ol;
- 3 beta -(3-(1-Pirrolidinil)propoxi)-14 beta, 15 beta -epoxi-17 beta -(3-fury)-5 beta -androstano-17 alfa -ol;
- 15 3 beta -(2-(1-Pirrolidinil)etoxi)-17 beta -(3-furil)-17 alfa -metoxi-14 beta, 15 beta -epoxi-5 beta -androstano;
- 17 alfa -hidroxi-17 beta -(3-furil)-14 beta, 15 beta -epoxi-5 beta -androstano-3-ona;
- 3-Guanidinoimino-17 beta -(3-furil)-14 beta, 15 beta -epoxi-5 beta -androstano-17 alfa -ol;
- 14 beta, 15 beta -Epoxi-17 beta -(4-piridazinil)-5 beta -androstano-3 beta, 17 alfa -diol;
- y los derivados 3 alfa de los derivados anteriormente identificados 3 beta y también los tioderivados correspondientes 3 alfa y 3 beta donde Y = S.
- 20

Antecedentes de la invención

- La reestenosis es una lesión obstructiva de los vasos que ocurre frecuentemente tras una operación con balón de angioplastia mecánica (PTCA) o después de una endarterectomía, llevada a cabo para una enfermedad arterial o trasplante de órgano.
- 25 Este procedimiento ha sido considerado como resultado de una sucesión de eventos: a) daño celular endotelial b) retroceso elástico después del estrechamiento de la arteria c) hiperplasia neointimal debido a la proliferación y migración de las células del músculo liso vascular (SMC por sus siglas en inglés) d) remodelado y constricción de la arteria (Austin GE et al. J. Am. Coll. Cardiol. 6: 369-75, 1985).
- 30 En particular la hiperplasia neointimal conduce al re-obstrucción de la arteria dañada y es el resultado de la activación de las plaquetas y leucocitos además de la proliferación de las SMC. La inhibición farmacológica de la reestenosis falla con frecuencia cuando los fármacos se administran por administración sistémica (Karthikeyan G y Bhargava B Curr. Opin. Cardiol. 19: 500-9. 2004).
- Además, la reestenosis después de la angioplastia o endarterectomía son debidas a células dañadas de la íntima; la angioplastia o endarterectomía inicia un número de respuestas en la pared del vaso que incluye la migración celular, proliferación, y acumulación de matriz, contribuyendo todas a la formación neointimal y reestenosis (Malik N et al; Circulation 1998 Oct 20; 98 (16): 1657-65). La inducción de la apoptosis puede ser beneficioso también para revertir la enfermedad vascular, como la enfermedad vascular pulmonar (Cowan K. N, et al. Circ. Res. 1999 May 28; 84 (10): 1223-33).
- 35 Una mejora significativa en la prevención de la reestenosis se ha conseguido con la implantación de una endoprótesis vascular (stent en inglés) polimérica en el sitio de la intervención (Sigwart U et al. N. Engl. J. Med. 316: 701-716, 1987). Además, la implantación de una endoprótesis vascular ofrece la oportunidad de conducir fármacos localmente mediante una liberación controlada (Laroia ST y Laroia AT Cardiol. Rev. 12: 37-43, 2004).
- 40 La presente invención también se refiere a derivados 17beta-(3-furil) y (4-piridazinil)-5beta, 14beta-androstano como inhibidores de la fibrosis de órganos, incluida la fibrosis de riñón, fibrosis de corazón, fibrosis de páncreas, fibrosis de pulmón, fibrosis vascular de los vasos, fibrosis de médula espinal y fibrosis de hígado.
- 45

La lesión aguda o crónica de los órganos puede desarrollarse debido una variedad de factores que incluye agentes nocivos como un virus, compuestos químicos y desnutrición.

5 El etanol es una hepatotóxina extremadamente potente y puede conducir a la cirrosis del hígado bajo una exposición prolongada. De hecho el 20% de los alcohólicos crónicos experimentarán eventualmente cirrosis. El proceso de la cirrosis del hígado implica una serie de etapas que empiezan con la infiltración de grasa que conduce a la necrosis o muerte celular, luego la fibrosis que a su vez conducirá a la cirrosis.

10 La cirrosis no es solamente el estadio terminal de las enfermedades crónicas del hígado tal como una hepatitis vírica o alcohólica, sino que también progresa con alta frecuencia hacia un carcinoma hepatocelular. Se piensa que la fibrosis de hígado es el resultado de una deposición excesiva de matrices extracelulares como colágeno durante la reparación del tejido del hígado cuando se pierde el equilibrio entre la necrosis hepatocítica encadenado por un factor externo, como un virus y alcohol, o un factor interno que implica una anomalía autoinmune, y la regeneración del hígado para mantener las funciones del hígado. A nivel celular, los desórdenes y necrosis hepatocíticas activan las células de Kupffer, células endoteliales y similares, de modo que TNF-.alfa., TGF-.beta., y PDGF se liberan de las células de Kupffer y células endoteliales activadas. Se considera que estos factores activan luego las células hepáticas como el principal factor de la fibrosis del hígado, de modo que el crecimiento celular y la síntesis de colágeno se activan.

15 Incluso en órganos como los pulmones, riñones, corazón, páncreas, y piel, de manera similar al hígado, se cree que los fibroblastos que existen en los órganos individuales y las células estromales específicas de los órganos individuales (células mesangiales de riñón, células estelares pancreáticas, etc.) incurrir en un crecimiento anormal y síntesis de matriz extracelular debido a la estimulación por varias citoquinas, que conduce a la aparición de la fibrosis de órganos.

Los derivados 17-(3-furil) y (4-piridazinil)-5 beta, 14 beta-androstano son compuestos conocidos.

25 El documento EP0583578B1 describe los derivados beta-androstano reivindicados en la presente invención, un procedimiento para su preparación y su uso para el tratamiento de desórdenes cardiovasculares como insuficiencia cardíaca e hipertensión.

El documento EP0590271B1 describe derivados 17-aril y 17-heterocicliil-5 alfa, 14 beta -androstano, androsteno y androstadieno, un procedimiento para su preparación y su uso para el tratamiento de desórdenes cardiovasculares como insuficiencia cardíaca e hipertensión.

30 El documento EP O590272B1 describe derivados 17-aril and 17-heterocicliil-5 beta, 14 beta-androstano y su uso para el tratamiento de desórdenes cardiovasculares como insuficiencia cardíaca e hipertensión.

Ninguna de las publicaciones mencionadas anteriormente describe el uso de derivados 5beta, 14beta-androstano para la prevención y/o tratamiento de la reestenosis después de angioplastia o endarterectomía y fibrosis de órganos.

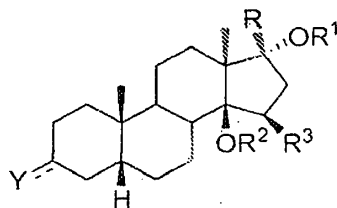
35 Forte et al. ("PST 2238 treatment affects gene expression in arteriotomy-injured Milan hypertensive rat strain carotids" JOURNAL OF HYPERTENSION, vol. 23, no. Suppl. 2, Junio 2005 (2005-06), página S244) describe que el tratamiento con 17beta-(3-furil)-5beta-androstano-3beta,14beta,17alfa-triol afecta la expresión génica en carótidas de raza de ratas Milan hipertensivas dañadas con arteriotomía e induce una activación reducida de la proliferación celular vascular estimulada por la arteriotomía

40 El documento WO 2006/044916 A describe el uso de 17beta-(3-furil)-5beta-androstano-3beta, 14beta, 17alfa-triol para el tratamiento de reestenosis aórtica, reestenosis vascular, cicatrices hipertróficas (queloides), sinovitis, úlceras bacterianas, curación anormal de heridas, hipertrofia que sigue a una operación.

Hasta la fecha, no se ha vendido ningún agente farmacéutico eficaz como un inhibidor de fibrosis de órganos en el mercado.

45 Por lo tanto, se necesita el desarrollo de un agente farmacéutico con una eficacia directa significativa sobre la fibrosis de órganos.

Por lo tanto es un objetivo de la presente invención un compuesto de fórmula (I),



(I)

5 donde el significado de los sustituyentes se ha mencionado anteriormente, para la prevención o el tratamiento de una enfermedad debida a fibrosis de órganos seleccionados entre el grupo que consiste en: fibrosis de riñón; fibrosis de corazón; fibrosis de páncreas; fibrosis de pulmón; fibrosis vascular de los vasos; fibrosis de médula espinal, fibrosis de hígado; o fibrosis de órganos debida a la esclerosis sistémica.

Los ejemplos preferidos de los compuestos específicos de fórmula (I) se seleccionan entre el grupo que consiste en:

- 17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-3 beta, 14 beta, 17 alfa -triol;
- 3 beta -(2-Hidroxietoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa-diol;
- 10 3 beta -(2-Aminoetoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(3-Aminopropoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(2-Metiloaminoetoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta-androstano-14 beta ,17 alfa -diol;
- 3 beta -(2-(1-Pirrolidinil)etoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(2-(3-(1-Pirrolidinil)propoxi)etoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 15 3 beta -(3-(1-Pirrolidinil)propoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa-diol;
- 3 beta -(2-(1-Imidazolil)etoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(2-(2-Imidazolin-2-il)etoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(2-(2-Amidino)etoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(2-(2-(1-Pirrolidinil)etoxi)etoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 20 3 beta -(2-Guanidinoetoxi)-17 beta -(3-furil) 5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(3-Guanidinopropoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(3-Amino-2-hidroxi)propoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(2,3-Diaminopropoxi)-17 beta -(3-furil)5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 17 beta -(3-furil)-17 alfa -metoxi-5 beta -androstano-3 beta, 14 beta -diol;
- 25 17 beta -(3-furil)-17 alfa -(2-(1-pirrolidinil)etoxi)-5 beta-androstano-3 beta, 14 beta -diol;
- 17 beta -(3-furil)-17 alfa -(3-aminopropoxi)-5 beta-androstano-3 beta, 14 beta -diol;
- 3 beta -(2-(1-Pirrolidinil)etoxi)-17 beta -(3-furil)-17 alfa-metoxi-5 beta -androstano-14beta -ol;
- 3 beta, 17 alfa -Bis(2-(1-pirrolidinil)etoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-14 beta -ol;
- 3 beta, 17 alfa -Bis(3-aminopropoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-14 beta -ol;
- 30 14 beta, 17 alfa -Dihidroxi-17 beta -(3-furil)-5 beta-androstano-3-ona;
- 3-Guanidinoimino-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 17 beta -(4-piridazinil)-5 beta -androstano-3 beta, 14 beta, 17 alfa -triol;

- 3 beta -(2-hidroxi-etoxi)-17 beta -(4-piridazinil)-5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(3-Aminopropoxi)-17 beta -(4-piridazinil)-5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(2-(1-Pirrolidinil)etoxi)-17 beta -(4-piridazinil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(3-(1-Pirrolidinil)propoxi)-17 beta -(4-piridazinil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 5 17 beta -(4-Piridazinil)-17 alfa -(3-aminopropoxi)-5 beta-androstano-3 beta, 14 beta -diol;
- 3 beta -(2-(1-Pirrolidinil)etoxi)-17 beta -(4-piridazinil)-17 alfa -metoxi-5 beta -androstano-14 beta -ol;
- 3 beta -(2-(1-Pirrolidinil)etoxi)-17 beta -(4-piridazinil)-17 alfa -(3-amino-propoxi)-5 beta -androstano-14 beta -ol;
- 14 beta, 17 alfa -Dihidroxi-17 beta -(4-piridazinil)-5 beta-androstano-3-ona;
- 3-Guanidinoimino-17 beta -(4-piridazinil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 10 14 beta, 15 beta -Epoxi-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-3 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(2-Hidroxi-etoxi)-14 beta, 15 beta -epoxi-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-17 alfa -ol;
- 3 beta -(3-Aminopropoxi)-14 beta, 15 beta -epoxi-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-17 alfa -ol;
- 3 beta -(2-(1-Pirrolidinil)etoxi)-14 beta, 15 beta -epoxi-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-17 alfa -ol;
- 3 beta -(3-(1-Pirrolidinil)propoxi)-14 beta, 15 beta -epoxi-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-17 alfa -ol;
- 15 3 beta -(2-(1-Pirrolidinil)etoxi)-17 beta -(3-furil)-17 alfa-metoxi-14 beta, 15 beta -epoxi-5 beta -androstano;
- 17 alfa -hidroxi-17 beta -(3-furil)-14 beta, 15 beta -epoxi-5 beta -androstano-3-ona;
- 3-Guanidinoimino-17 beta -(3-furil)-14 beta, 15 beta -epoxi-5 beta -androstano-17 alfa -ol;
- 14 beta, 15 beta -Epoxi-17 beta -(4-piridazinil)-5 beta - androstano-3 beta, 17 alfa -diol; o los derivados 3 alfa de los derivados anteriores identificados como 3 beta derivados y también los correspondientes tioderivados 3 alfa y 3 beta donde Y = S.
- 20 El ejemplo más preferido del compuesto específico según la presente invención es 17 beta -(3-furil)-5 beta - androstano-3 beta, 14 beta, 17 alfa -triol, de ahora en adelante denominado como "rostafuroxin".
- Otro objetivo de la presente invención es el uso de un compuesto de fórmula (I) donde el significado de los sustituyentes se ha mencionado anteriormente para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o
- 25 tratamiento de una enfermedad debida a la fibrosis de órganos seleccionada entre el grupo que consiste en: fibrosis de riñón debido a nefropatía diabética, glomerulonefritis, o nefroesclerosis; fibrosis de corazón debida a insuficiencia coronaria crónica o la edad; fibrosis de páncreas debido a las enfermedades del páncreas; fibrosis de pulmón debido a las enfermedades del pulmón; fibrosis vascular de los vasos debido a las enfermedades degenerativas vasculares
- 30 como la arterioesclerosis o reestenosis después de una desobstrucción vascular seguida de una operación de puente (by-pass en inglés) coronario y angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA por sus siglas en inglés) o inserción de una derivación (shunt en inglés); fibrosis de la médula espinal; fibrosis de hígado debido a virus y hepatitis crónica alcohólica, esteatohepatitis no alcohólica (NASH por sus siglas en inglés), cirrosis y cáncer de hígado; y otras fibrosis de órganos debido a la esclerosis sistémica.
- El término "cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se usa en la presente memoria se refiere a una cantidad de
- 35 un agente terapéutico necesaria para tratar, aliviar una enfermedad o afección objetivo, o para exhibir un efecto terapéutico detectable.
- La cantidad eficaz precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del sujeto, la dieta, el momento y la frecuencia de la administración, la combinación
- 40 de fármacos, las sensibilidades de reacción, y la tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad puede determinarse mediante experimentación rutinaria y está dentro del criterio del médico. En general, una dosis eficaz por día será de 0,05 mg a 20 mg, preferiblemente 0,5 mg a 15 mg, más preferiblemente 5 mg a 10 mg de un compuesto de fórmula (1), preferido es rostafuroxin.
- La dosis de tratamiento puede ser un calendario de dosis única o un calendario de dosis múltiple, según el juicio del médico.
- 45 Las composiciones se pueden administrar individualmente a un paciente, o pueden administrarse en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas.

El medicamento puede contener también un vehículo farmacéuticamente aceptable, para la administración de un agente terapéutico. Dichos vehículos incluyen anticuerpos y otros polipéptidos, genes y otros agentes terapéuticos tales como liposomas, siempre que el vehículo no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición, y que puedan administrarse sin ninguna toxicidad indebida.

- 5 Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes de metabolismo lento tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivas.

Se puede encontrar una extensa discusión sobre vehículos farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N. J. 1991).

- 10 Los vehículos farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, disolución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, en dichas composiciones pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes de pH, y otras similares. Dichos vehículos permiten que las composiciones farmacéuticas sean formuladas como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones, y similares, para la
15 ingestión por parte del paciente.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales; en particular, se pueden tratar sujetos humanos.

- 20 El medicamento de esta invención puede administrarse a través de una serie de rutas que incluyen, aunque sin limitación, oral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, intraventricular, aplicaciones transdérmicas o transcutáneas, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, medios rectales, o localmente sobre el tejido enfermo tras una operación quirúrgica. El compuesto de la invención también se puede aplicar (recubriendo) sobre la endoprótesis vascular, incluso incorporado en una matriz de liberación controlada.

Discusión de las Figuras

- 25 Los dibujos muestran el efecto de rostafuloxin (1) en la prevención de la reestenosis después de una endarterectomía en ratas MHS y MNS (tinción hematoxilina-orceína, aumento 10x); y (2) en la prevención de fibrosis de hígado en ratas (tinción Trichrome, aumento 200X).

Figura 1(A) sección transversal de carótida de MHS no dañada de una rata no tratada.

Figura 1 (B) sección transversal de carótida de MHS dañada, tomada 30 días después de la operación, de una rata tratada oralmente con Methocel 0,5%.

- 30 **Figura 1 (C)** sección transversal de carótida de MHS dañada, tomada 30 días después de la operación, de una rata tratada oralmente con Rostafuloxin 100 µg/kg.

Figura 2(A) sección transversal de carótida de MNS no dañada de una rata no tratada.

Figura 2 (B) sección transversal de carótida de MNS dañada, tomada 30 días después de la operación, de una rata tratada oralmente con Methocel 0,5%.

- 35 **Figura 2 (C)** sección transversal de carótida de MNS dañada, tomada 30 días después de la operación, de una rata tratada oralmente con Rostafuloxin 100 µg/kg.

Figura 3 muestra modelos de tinción normales del hígado de rata control (grupo Ctr.).

Figura 4 muestra que la lesión del hígado por CCl₄ induce un significativo daño hepatocelular que a su vez estimula la aparición de un proceso de curación de la herida complejo, que conduce a la fibrosis hepática (grupo Ctr. LF).

- 40 **Figura 5** muestra que en animales tratados con Rostafuloxin (grupo RLF), se asocia menos daño del tejido extendido a un menor grado de fibrosis de hígado.

Figura 6 muestra modelos de tinción normales del hígado en rata control (grupo Ctr.). puntuación 0.

Figura 7 muestra la aparición histológica del hígado de dos ratas tratadas con CCl₄ (grupo Ctr. LF) con lesiones fibróticas de grado moderado: puntuación 2.

- 45 **Figura 8** muestra la aparición histológica del hígado de dos ratas tratadas con CCl₄ con Rostafuloxin a 1mg/kg vía oral (grupo RLF) con lesiones fibróticas de grado medio: puntuación 1.

Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran adicionalmente la invención.

Ejemplo 1 (Ejemplo de Referencia)

5 Para ensayar la actividad del compuesto de la invención para la prevención de la reestenosis después de endarterectomía, se usaron ratas MHS hipertensas espontáneas con hipertensión arterial genética (Bianchi G., Barber B. R., Torielli L., Ferrari P. The Milan hypertensive strain of rats. Genetic Model of Hypertension. 1994; 22: 457-460). Las ratas MHS están disponibles en Prassis Research Institute, Sigmatau, Italia.

10 Se trataron oralmente dos grupos de ratas MHS de 25 días mediante sonda con vehículo (Methocel 05.%) o Rostafuroxin (100 g/kg) durante 6 semanas. Después de este periodo las ratas se sometieron a una lesión quirúrgica vascular según el protocolo descrito a continuación. Después de la lesión quirúrgica, las ratas se mantuvieron bajo tratamiento bien con vehículo o Rostafuroxin durante 30 días adicionales y luego se sacrificaron para tomar muestra de la arteria carótida. Se observó alguna mortalidad post-operatoria en las dos razas de ratas. El número final de ratas usado para el análisis histológico de la carótida fue; MHS vehículo=7, MHS Rostafuroxin= 9.

Lesión Vascular

El modelo de lesión quirúrgica de la carótida usado en ratas MHS y MNS se describe en J. Cell. Physiol. 2001; 186:307-313.

15 De forma resumida, se situó una pinza de plástico Scanlon para una derivación arteri coronario con injerto durante 10 segundos en la arteria coronaria con el fin de causar una lesión por aplastamiento del vaso. En el mismo punto en el que se aplicó la pinza, se llevó a cabo una incisión longitudinal de 0,5 mm en todo el grosor de la arteria coronaria. La incisión no cruzó el otro lado del vaso. La hemostasia se obtuvo con una simple sutura de polipropileno de calibre 8,0 adventicial. Una vez que se paró el sangrado, la arteria carótida se examinó cuidadosamente y se midió el pulso en el extremo distal de la incisión.

Análisis histológico

25 Las arterias carótidas se extrajeron 30 días después de la lesión. Las ratas se anestesiaron y se diseccionaron las carótidas libres de los tejidos circundantes. Mediante toracotomía, el ventrículo izquierdo del corazón latiente se canuló con una jeringa roma . La jeringa se mantuvo en el sitio mediante una ligadura en la aorta ascendente. Se llevó a cabo una perfusión de los vasos a la presión fisiológica primero con suero salino hasta que el efluente fue claro, y luego la perfusión se fijó con formaldehído tamponado (pH 7) al 4%. Una incisión en la aurícula derecha sirvió de tracto de salida. Antes del cambio con formaldehído, se pinzó la aorta torácica descendente. Las muestras de tejido se tomaron 20 min después de perfusión. Las muestras se fijaron posteriormente en formaldehído al 4% o.n., se deshidrataron y finalmente se embebieron en parafina. Las secciones transversales (5µm) se tiñeron con hematoxilina-orceina para el análisis de las fibras elásticas.

Por cada carótida dañada, al menos se observaron 60 secciones transversales bajo un microscopio óptico a 20 x aumentos; la observación y la fotografía de la imagen se llevaron a cabo usando un sistema Leica IM 1000 (Leica, Wetzlar, Alemania). Las secciones de las carótidas dañadas que mostraron un remodelado máximo y fenómenos de proliferación se identificaron y posteriormente se analizaron.

35 Las áreas luminal y medial se midieron usando un programa informático Leica IM 1000 (Leica, Heerbrugg, Suiza). El primero se definió como el área bajo la lámina elástica interna, mientras el segundo se definió como el área entre las láminas elásticas externa e interna. Con el fin de reducir la variabilidad individual de las ratas, las áreas luminal y medial de cada carótida tratada se normalizaron con respecto a la carótida no dañada contralateral. Por cada carótida no dañada contralateral, se analizaron al menos 10 secciones y se calcularon las áreas medial y luminal medias.

Las medidas se llevaron a cabo por dos observadores independientes.

Los resultados obtenidos se detallan en la siguiente Tabla 1 y Figura 1(A-C)

Tabla 1

Las medidas morfométricas del área del lumen de la carótida de las ratas MHS hipertensas espontáneas.

Animal n°	Relación de carótida Dañada/No dañada	
	0,5% de Methocel	Rostafuroxin 100 µg/kg
1	0,65	0,90
2	0,48	0,89
3	0,41	0,86
4	0,35	0,83

Animal n°	Relación de carótida Dañada/No dañada	
	0,5% de Methocel	Rostafuroxin 100 µg/kg
5	0,31	0,81
6	0,23	0,66
7	0,22	0,54
8	-	0,36
9	-	0,25
Media	0,379	0,680
±DE	0,057	0,081
Prueba t de Student.		p< 0,0094

Los resultados detallados en la Tabla 1/Figura 1 (A-C) muestran que el compuesto de la invención redujo de manera significativa estadísticamente (-45%) la reestenosis arterial en ratas MHS con hipertensión arterial.

Ejemplo 2 (Ejemplo de Referencia)

- 5 Los resultados detallados en el Ejemplo 1 se confirmaron usando ratas MNS sin hipertensión arterial. El método usado fue el mismo que el descrito en el Ejemplo 1.

Los resultados obtenidos se detallan en la siguiente Tabla 2 y Figura 2(A-C)

Tabla 2

Las medidas morfométricas del área del lumen de la carótida de ratas MNS sin hipertensión arterial.

Animal n°	Relación de carótida Dañada/No dañada	
	0,5% de Methocel	Rostafuroxin 100 µg/kg
1	0,94	1,00
2	0,80	0,95
3	0,65	0,93
4	0,60	0,83
5	0,58	0,80
6	0,56	0,76
7	0,53	0,75
8	0,51	0,68
9	0,49	0,59
10	0,47	0,36
11	0,45	-
12	0,38	-
13	0,36	-
14	0,24	-
Media	0,540	0,765
±DE	0,047	0,060
Prueba t de Student.		p< 0,0084

Los resultados detallados en la Tabla 2, que son significantes estadísticamente, confirmaron los resultados obtenidos en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3

5 Para ensayar la actividad del compuesto de la invención para la prevención y el tratamiento de la fibrosis de órganos, ratas MHS hipertensas espontáneas con hipertensión arterial genética (Bianchi G., Barber B. R., Torielli L., Ferrari P. The Milan hypertensive strain of rats. Genetic Model of Hypertension. 1994; 22: 457-460) se usaron. Las ratas MHS están disponibles en Prassis Research Institute, Sigma-tau, Italia.

10 La fibrosis de hígado se indujo mediante administración oral de CCl₄ oral tal como se describe en J. Hepatol. 1999; 30: 621-631, con modificaciones menores: 0,375 ml/kg de CCl₄ disuelto en aceite de oliva se administró tres veces por semana durante tres semanas mediante sonda oral a ratas empezando a partir de la 7ª semana del destete. Las ratas control recibieron solamente el vehículo (aceite de oliva). El tratamiento con Rostafuroxin empezó 7 semanas antes de la inducción de la fibrosis del hígado mediante la administración de CCl₄ (pretratamiento) y se continuó durante el tratamiento con CCl₄ durante tres semanas. El Rostafuroxin se administró oralmente a 1mg/kg/día, suspendido en Methocel (0,5%). Un total de veinticuatro ratas MHS de 25 días (destete) se dividieron en tres grupos de 8 ratas cada uno: el primer grupo, considerado como control negativo para la inducción de la fibrosis de hígado (Ctr.), se trató oralmente con el vehículo de Rostafuroxin (Methocel 0,5%) durante todo el período (10 semanas) y recibió el aceite de oliva como vehículo de CCl₄ en la 7ª semana después del destete durante tres semanas; el segundo grupo, considerado como control positivo para la inducción de la fibrosis de hígado (Ctr. LF), se trató oralmente con el vehículo de Rostafuroxin (Methocel 0,5%) durante todo el período (10 semanas) y recibió CCl₄ en la 7ª semana después del destete durante tres semanas; el tercer grupo, tratado con Rostafuroxin con fibrosis de hígado (RLF), recibió Rostafuroxin a 1 mg/kg durante todo el período (10 semanas) y recibió CCl₄ en la 7ª semana después del destete durante tres semanas. Al final del tratamiento (10ª semana), las ratas se pesaron y se anestesiaron con pentobarbital para muestrear la sangre y la retirada de órganos. La sangre se dejó coagular y el suero se separó después de centrifugación y guardó para medir la albuminemia y transaminasas en suero (ALT y AST) en un Analizador Hematológico Automático Pentra 400 (ABX). Se retiraron el bazo y el hígado y se pesaron. Las muestras del lóbulo hepático medio se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80° para su medida bioquímica posterior del contenido de 4-Hidroxi prolina en hígado, tomado como un índice de la deposición de colágeno (Biochem. J. 1961; 80 (1): 148-154). El resto del hígado se conservó en una solución de formalina tamponada al 10% para el análisis histológico.

30 Medida de hidroxiprolina

El contenido de hidroxiprolina en el hígado se determinó tal como se describe en Anal. Biochem. 1981; 112: 70-75, con ligeras modificaciones.

35 El tejido hepático (0,4 g) se homogeneizó en 3 ml de HCl 6 N y se hidrolizó a 110 °C durante 24 h. Después de centrifugación a 14000 rpm durante 10 min, se neutralizaron 100 µl de líquido sobrenadante con 50 µl de NaOH 10N y 150 µl de NaHCO₃ 1N. Después de centrifugación a 14000 durante 5 min, se mezclaron 100 µl de líquido sobrenadante con 200 µl de tampón acetato citrato más Cloramina T pH 6,0, después de incubación durante 10 min a TA, se añadió 1,3 ml de reactivo Ehrlich y la mezcla se incubó a 60 °C durante 25 min. Después de enfriar, se midió la absorbancia a 558 nm (Jasco V-530).

Histopatología y morfometría

40 Para cada caso, los lóbulos medio e izquierdo del hígado se sometieron a procedimientos de cortes y fijación estándares; los portas se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (H&E) (Laboratory Methods in Histotechnology; Armed Forces Institute of Pathology Publicado por the American Registry of Pathology Washington, D.C. 1992). También se aplicaron técnicas especiales con el fin de permitir la detección de tejido conectivo propio (tinción Trichrome de Masson - Laboratory Methods in Histotechnology; Armed Forces Institute of Pathology Publicado por the American Registry of Pathology Washington, D.C. 1992) al igual que la detección de colágeno específico y la evaluación de la fibrosis hepática (método de tinción de sirio rojo tal como se describe en The Journal of Histochemistry and Citochemistry 1985; vol 33, No. 8, pp. 737-743).

La fibrosis del hígado se puntuó cualitativamente en portas teñidos con rojo sirio como sigue:

0 = Ausencia de fibrosis del hígado, solamente patrón de tinción normal;

50 1 = Grado medio, correspondiente a fibrosis centrolobulillar/periportal, con expansión septal predominantemente incompleta- fibrosis intersticial focal media;

2 = Grado moderado, correspondiente a fibrosis en puente difusa, con apariencia nodular focal- fibrosis intersticial multifocal;

3 = Grado severo, correspondiente a fibrosis confluyente,

con apariencia nodular difusa- fibrosis intersticial difusa severa.

Los hallazgos histopatológicos se detectaron mediante el microscopio óptico "ECLIPSE E800M" (Nikon Instruments S.p.A.), equipado con un vídeo de color 3CCD - cámara JVC "KY F55BE", conectado a un ordenador personal.

5 Las imágenes relevantes se almacenaron mediante el uso de un programa informático de análisis adecuado para el procesamiento y grabación de imágenes (ARKON, A&P Software, Genos - Ark).

Un análisis cuantitativo del grado de fibrosis, seguido de un análisis cualitativo histológico, se llevó a cabo por conversión de la imagen digital de las imágenes histológicas mediante un método previamente descrito (J. Gastroenterol. 2004, Oct 1; 10(19)2894-2897).

10 De forma resumida, después de teñir con rojo sirio, el contenido de colágeno del hígado se midió mediante un método histomorfométrico. Se tomaron una serie de imágenes en toda el área de la sección (Leica DM-IRE2). Cada imagen se analizó mediante un programa informático ImageJ versión 1.39 para análisis de imagen digital. Los límites de detección se ajustaron para el color rojo y colágeno teñido. El área fibrótica con tinción positiva se seleccionó automáticamente, se perfiló y se evaluó. El contenido relativo de colágeno se calculó como porcentaje de píxeles teñidos positivos sobre el número de píxeles totales de la imagen.

15 Resultados

Los resultados obtenidos se indican en las siguientes tablas 3-6

La Tabla 3 muestra los pesos del cuerpo y órganos, expresados como un índice de masa corporal, en los tres grupos.

Tabla 3

Rata	Ctr. Methocel 0,5%		Ctr. LF Methocel 0,5%		RLF 1 mg/kg vía oral	
	PC g.	Bazo/pc (%)	PC g.	Bazo/pc (%)	PC g.	Bazo/pc (%)
1	472	0,168	360	0,295	344	0,262
2	472	0,180	395	0,269	333	0,247
3	445	0,175	327	0,281	381	0,302
4	460	0,183	329	0,495	345	0,348
5	460	0,185	344	0,351	344	0,288
6	458	0,180	353	0,403	347	0,251
7	425	0,189	338	0,389	364	0,316
8	muerte	-	muerte	-	366	0,261
Media	456	0,180	349,4	0,355	353	0,284
eem	5,8	0,0024	8,3	0,029	5,6	0,013
p			<0,01 Vs. Ctr.	<0,01 Vs. Ctr.	<0,01 Vs. Ctr.	< 0,05 vs Ctr LF

20 Los resultados detallados en la Tabla 3 muestran que el compuesto de la invención redujo de manera estadísticamente significativa en un 20% el peso del bazo en ratas con fibrosis del hígado inducida por CCl₄.

El peso del hígado y las transaminasas no se modificaron después del tratamiento del compuesto de la invención.

La Tabla 4 muestra la albuminemia en plasma en los tres grupos.

25

Tabla 4

Rata	Ctr. Methocel 0,5%	Ctr. LF Methocel 0,5%	RLF 1 mg/kg vía oral
N°	Albúmina g/dl	Albúmina g/dl	Albúmina g/dl
1	3,50	2,51	2,95
2	3,57	2,93	3,19
3	3,46	3,28	3,07
4	3,52	3,09	3,82
5	3,63	2,93	4,04
6	3,40	3,39	3,65
7	3,62	3,02	3,36
8	muerte	muerte	4,15
Media	3,53	3,02	3,53
eem	0,032	0,107	0,16
p		<0,05 Vs Ctr	< 0,05 vs Ctr LF

Los resultados detallados en la Tabla 4 muestran que el compuesto de la invención aumentó de manera estadísticamente significativa un 16,8% los niveles plasmáticos de albúmina en ratas con fibrosis del hígado inducida por CCl₄.

5

La Tabla 5 muestra el contenido de hidroxiprolina en hígado en los tres grupos.

Tabla 5

Rata	Ctr. Methocel 0,5%	Ctr. LF Methocel 0,5%	RLF 1 mg/kg vía oral
N°	hidroxiprolina µg/g prot	hidroxiprolina µg/g prot	hidroxiprolina µg/g prot
1	391,8	1353,3	799,8
2	574,0	2254,6	2762,3
3	538,5	1568,7	750,0
4	427,2	1564,2	1460,7
5	512,7	1195,4	886,5
6	467,6	2393,4	791,6
7	656,3	845,6	1217,4
8	muerte	muerte	811,0
Media	509,72	1596,45	1184,9
eem	34,13	210,09	242,2

Los resultados detallados en la Tabla 5 muestran que el compuesto de la invención redujo de manera significativa (25,8 %) el contenido en el hígado de hidroxiprolina, que es un índice de la deposición de colágeno, por lo tanto fibrosis, en ratas con fibrosis de hígado inducida por CCl₄.

10

Histopatología y morfometría

La principal patología en animales tratados con CCl₄ (grupo Ctr.LF) fue representada por un significativo daño hepatocelular (degeneración en "balón" y apoptosis, cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos, modificación en la grasa), reacción inflamatoria crónica, deposición de matriz extracelular y cambios regenerativos (proliferación e hiperplasia de células parenquimales y no-parenquimales).

15

En ratas tratadas con Rostafuroxin se mostró una extensión menor del daño tisular.

Las imágenes de los resultados obtenidos se indican en las Figuras 3-5

La Tabla 6 muestra la evaluación cualitativa de la fibrosis del hígado, en base al sistema de puntuación adoptado en portos teñidos con sirio rojo.

Tabla 6

Fibrosis del hígado	Puntuación	Ctr. Methocel 0,5%		Ctr. LF Methocel 0,5%		RLF 1 mg/kg vía oral	
		N.º	%	N.º	%	N.º	%
Ausencia	0	7/7	100	0/7	0	0/8	0
Medio	1	0/7	0	0/7	0	6/8	75
Moderado	2	0/7	0	6/7	85,7	2/8	25
Severo	3	0/7	0	1/7	14,3	0/8	0

5

Los resultados detallados en la Tabla 6 y figuras 6-8 indican que todos los animales tratados con CCl₄ solamente (grupo Ctr. LF) mostraron valores altos en la puntuación de la fibrosis de hígado, oscilando de grado moderado (85,7% de casos) a severo (un caso, correspondiente a 14,3%).

10 En cambio, el grado medio de la fibrosis del hígado se detectó solamente en CCl₄ + Rostafuroxin, el compuesto de la invención, animales tratados (grupo RLF), y se observó en la gran mayoría de los casos (75%). En el mismo grupo, se observó un grado moderado de fibrosis del hígado en dos animales solamente (25%, comparado con el 85,7% del grupo CCl₄). Finalmente, ninguna rata tratada con CCl₄ + Rostafuroxin mostró fibrosis del hígado.

La Tabla 7 muestra el análisis cuantitativo del grado de fibrosis del hígado observado mediante el análisis en los tres grupos.

15 **Tabla 7**

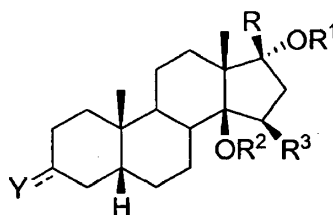
Rata nº	% AREA FIBRÓTICA		
	Ctr. Methocel 0,5%	Ctr. LF Methocel 0,5%	RLF 1 mg/kg vía oral
1	1,43	11,55	6,63
2	0,57	10,40	6,89
3	1,74	8,42	5,08
4	0,61	17,18	11,80
5	0,28	10,26	2,01
6	0,52	6,97	4,64
7	1,47	8,57	5,50
8			1,44
Media	0,95	10,48	5,50
eem	0,22	1,26	1,14
p		<0,01 Vs Ctr	< 0,05 vs Ctr LF

Los resultados detallados en la Tabla 7 muestran que el compuesto de la invención redujo de manera estadísticamente significativa un 47,5% el área fibrótica del hígado en ratas con fibrosis del hígado inducida por CCl₄.

20

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



(I)

donde:

- 5 el símbolo --- representa un enlace sencillo o un enlace doble;
- Y es oxígeno o guanidinoimino, donde --- en la posición 3 es un doble enlace;
- Y es hidroxilo, OR⁴ ó SR⁴, donde --- en la posición 3 es un enlace sencillo y puede presentar una configuración alfa o beta;
- R es un grupo 3-furilo o 4-piridazinilo sustituido o no sustituido;
- 10 R¹ es hidrógeno; metilo; etilo o n-propilo sustituido con OH ó NR⁵R⁶;
- R² es hidrógeno o junto con R³ es un enlace de un anillo de oxirano;
- R³ es hidrógeno o junto con R² es un enlace de un anillo de oxirano;
- R⁴ es hidrógeno; metilo; alquilo C2-C6 ó alqueno C3-C6 ó acilo C2-C6, estando dichos grupos alquilo, alqueno o acilo no sustituidos o sustituidos con un grupo de amonio cuaternario o uno o más OR⁷, NR⁸R⁹, formilo, amidino, guanidinoimino ó NR⁸R⁹ e hidroxilo;
- 15 R⁵, R⁶ son de forma independiente hidrógeno; metilo; alquilo C2-C6 no sustituido o sustituido con NR¹⁰R¹¹, ó NR¹⁰R¹¹ e hidroxilo, ó R⁵ y R⁶ tomados junto al átomo de nitrógeno forman un anillo penta- o hexa-monoheterocíclico saturado o insaturado, sustituido o no sustituido, que opcionalmente contiene otro heteroátomo seleccionado entre oxígeno o azufre o nitrógeno;
- 20 R⁷ es hidrógeno, metilo o alquilo C2-C4, estando dicho alquilo no sustituido o sustituido con uno o más NR¹⁰R¹¹ ó con NR¹⁰R¹¹ e hidroxilo;
- R⁸, R⁹ son de forma independiente hidrógeno; metilo; alquilo C2-C6 ó alqueno C3-C6, estando dichos grupos alquilo y alqueno no sustituidos o sustituidos con uno o más NR¹⁰R¹¹, ó NR¹⁰R¹¹ e hidroxilo, ó R⁸ y R⁹ tomados junto con el átomo de nitrógeno forman un anillo penta- o hexa-monoheterocíclico saturado o insaturado, sustituido o no sustituido, que contiene opcionalmente otro heteroátomo seleccionado entre oxígeno o azufre o nitrógeno, o R⁸ es hidrógeno y R⁹ es amidino; o NR⁸R⁹ representa propargilamino,
- 25 R¹⁰, R¹¹ son de forma independiente hidrógeno, alquilo C1-C6, o R¹⁰ y R¹¹, tomados junto con el átomo de nitrógeno forman un anillo penta- o hexa-monoheterocíclico saturado o insaturado; para la prevención o tratamiento de una enfermedad debida a la fibrosis de un órgano seleccionado del grupo que consiste en: fibrosis de riñón; fibrosis de corazón; fibrosis de páncreas; fibrosis de pulmón; fibrosis vascular de los vasos; fibrosis de médula espinal, fibrosis de hígado; o fibrosis de órganos debido a la esclerosis sistémica.
- 30
2. compuesto para uso según la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en:
- 17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-3 beta, 14 beta, 17 alfa -trioi;
- 3 beta -(2-hidroxi-etoxi)- 17 beta -(3-furil)-5 beta - androstano- 14 beta, 17 alfa -diol;
- 35 3 beta -(2-Aminoetoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(3-Aminopropoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta-androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(2-Metiloaminoetoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta-androstano-14 beta ,17 alfa -diol;
- 3 beta -(2-(1-Pirrolidinil)etoxi)- 17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano- 14 beta, 17 alfa -diol;

ES 2 556 731 T3

- 3 beta -(2-(3-(1-Pirrolidinil)propoxi)etoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(3-(1-Pirrolidinil)propoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(2-(1-Imidazolil)etoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(2-(2-Imidazolin-2-il)etoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 5 3 beta -(2-(2-Amidino)etoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(2-(2-(1-Pirrolidinil)etoxi)etoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(2-Guanidinoetoxi)-17 beta -(3-furil) 5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(3-Guanidinopropoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(3-Amino-2-hidroxi)propoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 10 3 beta -(2,3-Diaminopropoxi)-17 beta -(3-furil)5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 17 beta -(3-furil)-17 alfa -metoxi-5 beta -androstano-3 beta, 14 beta -diol;
- 17 beta -(3-furil)17 alfa -(2-(1-pirrolidinil)etoxi)-5 beta -androstano-3 beta, 14 beta -diol;
- 17 beta -(3-furil)- 17 alfa -(3-aminopropoxi)-5 beta - androstano-3 beta, 14 beta -diol;
- 3 beta -(2-(1-Pirrolidinil)etoxi)-17 beta -(3-furil)-17 alfa-metoxi-5 beta -androstano-14 beta -ol;
- 15 3 beta, 17 alfa -Bis(2-(1-pirrolidinil)etoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-14 beta -ol;
- 3 beta, 17 alfa -Bis(3-aminopropoxi)-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-14 beta -ol;
- 14 beta, 17 alfa -Dihidroxi-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-3-ona; 3-Guanidinoimino-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 17 beta -(4-piridazinil)-5 beta -androstano-3 beta, 14 beta, 17 alfa -trioil;
- 20 3 beta -(2-hidroxi)etoxi)-17 beta -(4-piridazinil)5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(3-Aminopropoxi)-17 beta -(4-piridazinil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(2-(1-Pirrolidinil)etoxi)-17 beta -(4-piridazinil)5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 3 beta -(3-(1-Pirrolidinil)propoxi)-17 beta -(4-piridazinil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 17 beta -(4-piridazinil)- 17 alfa -(3-aminopropoxi)-5 beta -androstano-3 beta, 14 beta -diol;
- 25 3 beta -(2-(1-Pirrolidinil)etoxi)-17 beta -(4-piridazinil)-17 alfa -metoxi-5 beta -androstano-14 beta -ol;
- 3 beta -(2-(1-Pirrolidinil)etoxi)-17 beta -(4-piridazinil)-17 alfa -(3-amino-propoxi)-5 beta -androstano-14 beta -ol;
- 14 beta, 17 alfa -Dihidroxi-17 beta -(4-piridazinil)-5 beta -androstano-3-ona;
- 3-Guanidinoimino-17 beta -(4-piridazinil)-5 beta -androstano-14 beta, 17 alfa -diol;
- 14 beta, 15 beta -Epoxi-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-3 beta, 17 alfa -diol;
- 30 3 beta -(2-Hidroxi)etoxi)-14 beta, 15 beta -epoxi-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-17 alfa -ol;
- 3 beta -(3-Aminopropoxi)-14 beta, 15 beta -epoxi-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-17 alfa -ol;
- 3 beta -(2-(1-Pirrolidinil)etoxi)-14 beta, 15 beta -epoxi-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-17 alfa -ol;
- 3 beta -(3-(1-Pirrolidinil)propoxi)-14 beta, 15 beta -epoxi-17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-17 alfa -ol;
- 3 beta -(2-(1-Pirrolidinil)etoxi)- 17 beta -(3-furil)- 17 alfa -metoxi-14 beta, 15 beta -epoxi-5 beta -androstano;
- 35 17 alfa -hidroxi-17 beta -(3-furil)-14 beta, 15 beta -epoxi-5 beta -androstano-3-ona;
- 3-Guanidinoimino-17 beta -(3-furil)-14 beta, 15 beta -epoxi-5 beta -androstano-17 alfa -ol;
- 14 beta, 15 beta -Epoxi-17 beta -(4-piridazinil)-5 beta - androstano-3 beta, 17 alfa -diol;

y los derivados 3 alfa de los derivados anteriormente identificados 3 beta y también los tioderivados correspondientes 3 alfa y 3 beta donde Y = S.

- 5 **3.** Uso de un compuesto tal como se ha descrito en la reivindicación 1, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad debida a la fibrosis de un órgano seleccionado entre el grupo que consiste en: fibrosis de riñón; fibrosis de corazón; fibrosis de páncreas; fibrosis de pulmón; fibrosis vascular de los vasos; fibrosis de médula espinal, fibrosis de hígado; o fibrosis de órganos debido a la esclerosis sistémica.
- 4.** Uso según la reivindicación 3, donde el compuesto preferido es 17 beta -(3-furil)-5 beta -androstano-3 beta, 14 beta, 17 alfa - triol.
- 10 **5.** Uso según la reivindicación 3, donde la fibrosis del hígado es debida a una enfermedad por virus, hepatitis alcohólica, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis o cáncer de hígado.
- 6.** Uso según la reivindicación 3, donde el compuesto se administra en una dosis de 0,05 mg a 20 mg por día.
- 7.** Uso según la reivindicación 3, donde el compuesto se administra en una dosis de 0,5 mg a 15 mg. 12.
- 8.** Uso según la reivindicación 3, donde el compuesto se administra en una dosis de 5 mg a 10 mg.
- 9.** Uso según la reivindicación 3, donde el compuesto se administra en un programa de dosis única.
- 15 **10.** Uso según la reivindicación 3, donde el compuesto se administra en un programa de dosis múltiple.
- 11.** Uso según la reivindicación 3, donde la composición es para administración oral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdermal, transcutánea, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual o rectal.
- 20 **12.** Uso según la reivindicación 3, donde la composición se administra localmente sobre el tejido enfermo después de una operación quirúrgica.
- 13.** Uso según la reivindicación 3, donde la composición está recubierta sobre la endoprótesis vascular (stent); incorporada en una matriz de liberación controlada; o incorporada en liposomas.

FIGURA 1 (A) Carótida MHS no dañada

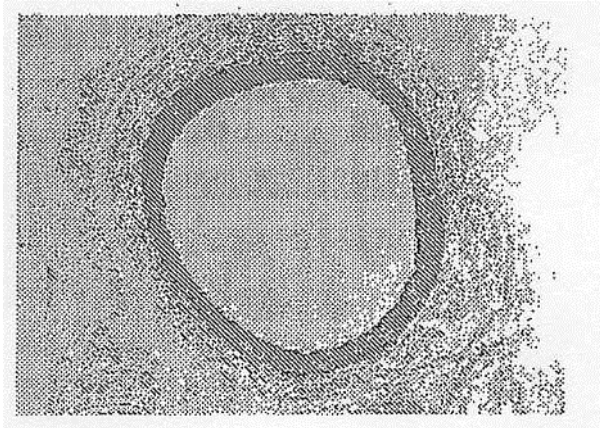


FIGURA 1 (B) Carótida MHS dañada tomada 30 días después de la cirugía: tratamiento oral con vehículo (Methocel 0,5%)

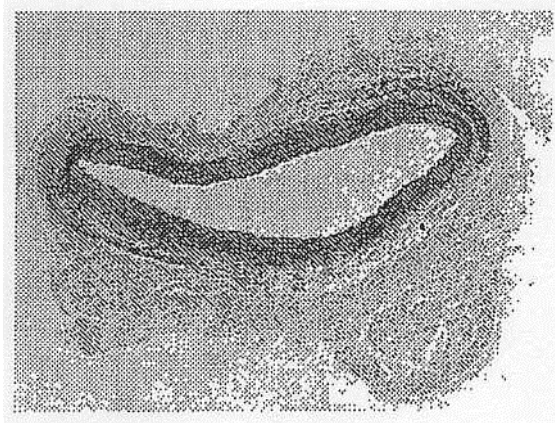


FIGURA 1 (C) Carótida MHS dañada tomada 30 días después de la cirugía: tratamiento oral con Rostafuroxin (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

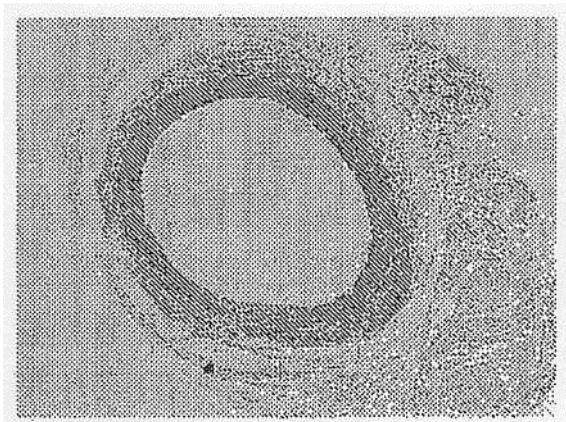


FIGURA 2 (A) Carótida MNS no dañada

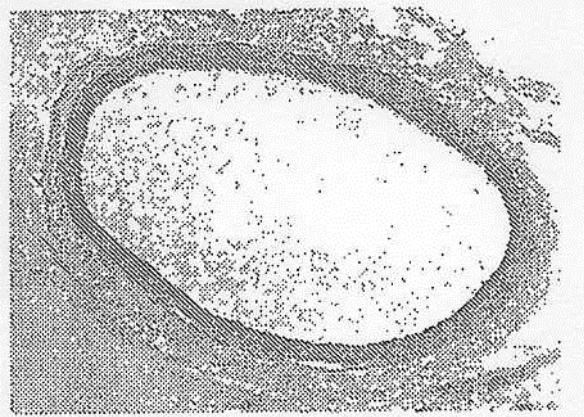


FIGURA 2 (B) Carótida MNS dañada tomada 30 días después de la cirugía: tratamiento oral con vehículo (Methocel 0,5%)

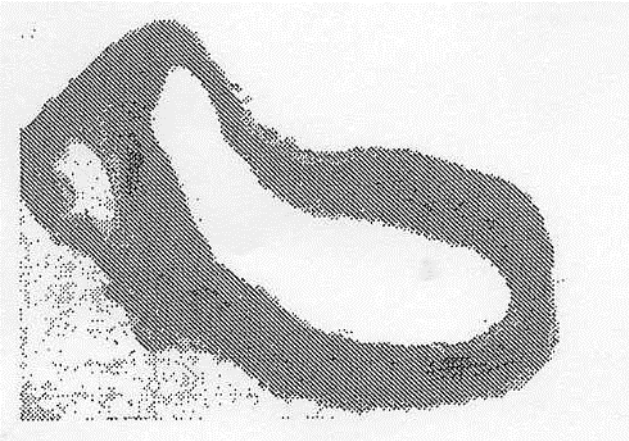
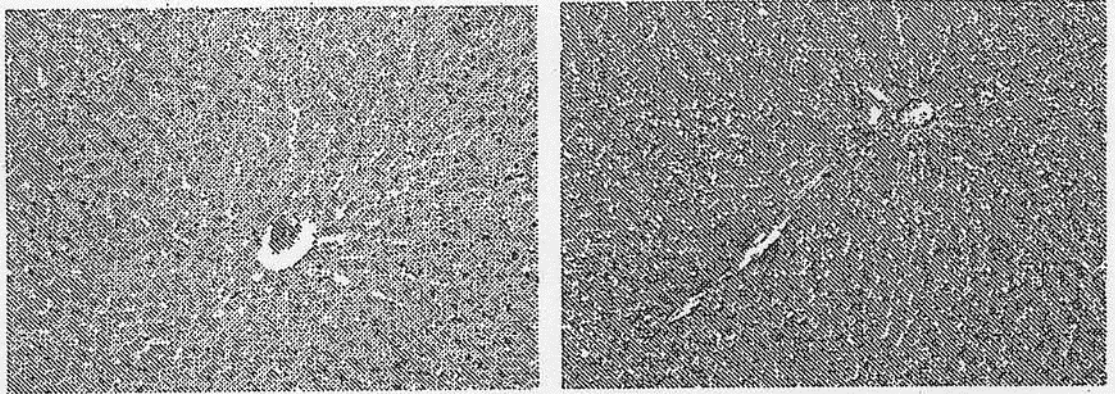


FIGURA 2 (C) Carótida MNS dañada tomada 30 días después de la cirugía: tratamiento oral con Rostafuroxin (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)



FIGURA 3 Muestra modelos de tinción normales del hígado en rata control (grupo Ctr.)



H&E; aumento finla 200x; tinción Trichrome

FIGURA 4 Muestra que el daño del hígado debido a CCl4 induce un significativo daño hepatocelular que a su vez estimula la aparición de un proceso de curación de la herida complejo, que conduce a la fibrosis hepática (grupo Ctr. LF)

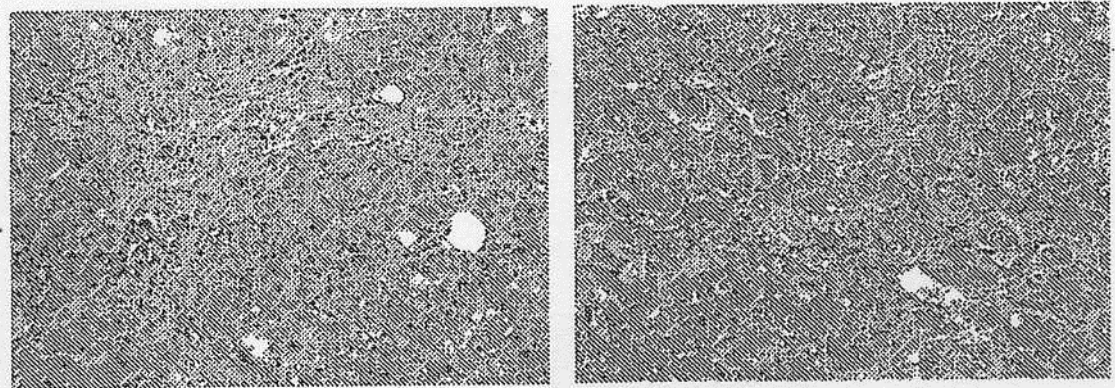


FIGURA 5 Muestra que los animales tratados con Rostafuroxin (grupo RLF), el menor daño tisular extendido está asociado a un menor grado de fibrosis del hígado.

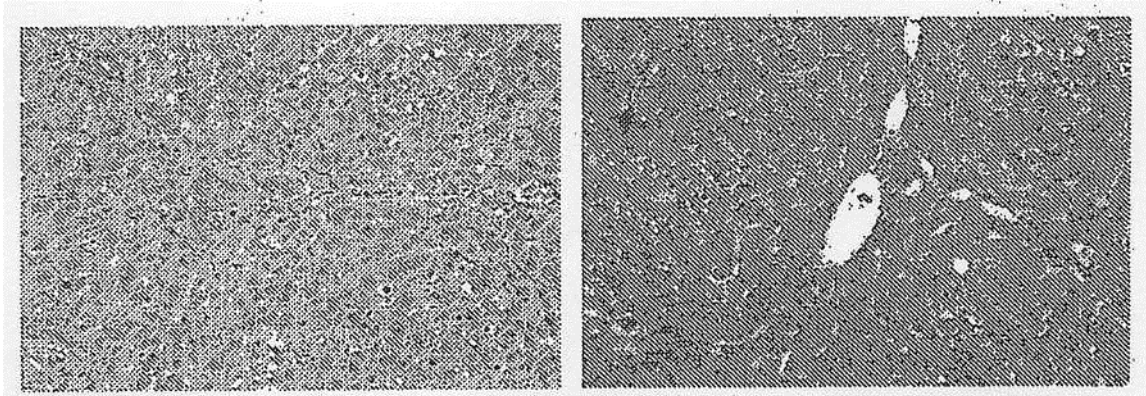


FIGURA 6 Muestra un modelo de tinción normal para el hígado en rata control (grupo Crt.): puntuación 0

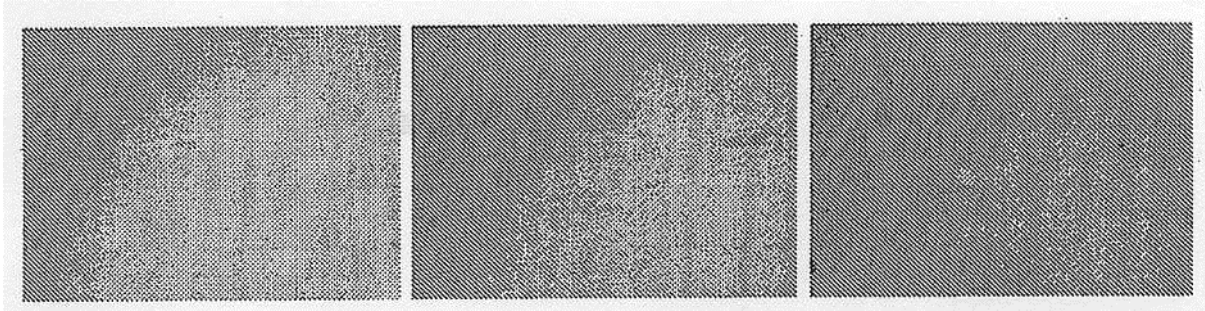


FIGURA 7 Muestra la aparición histológica de hígado de dos ratas tratadas con CCl4 (grupo Cr. LF) con lesiones fibróticas de grado moderado: puntuación 2

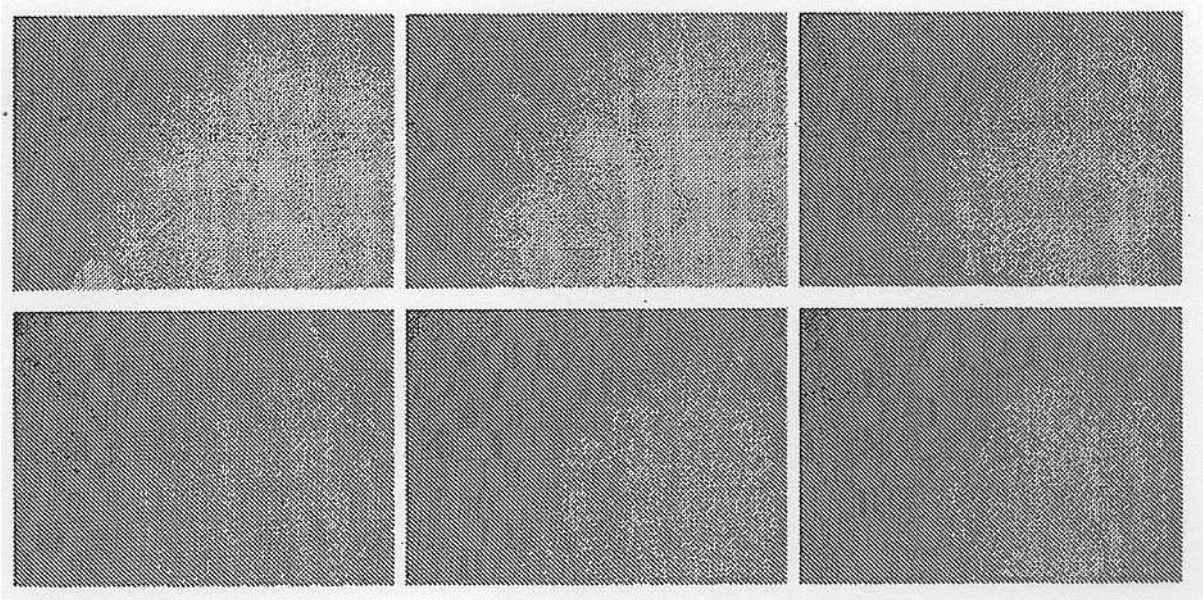


FIGURA 8 Muestra la aparición histológica de hígado de dos ratas tratadas con Rostafuroxin a 1 mg/kg vía oral (grupo RLF) con lesiones fibróticas de grado medio: puntuación 1

