

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 527**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/352** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)  
**C07D 311/22** (2006.01)  
**C07D 311/24** (2006.01)  
**C07D 311/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.07.2014 PCT/JP2014/069026**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2015 WO15008827**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2014 E 14826811 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2929880**

54 Título: **Agente terapéutico para enfermedades basado en el efecto inhibidor del factor inhibidor de la migración de macrófagos**

30 Prioridad:

**18.07.2013 JP 2013149690**

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

**09.12.2016**

73 Titular/es:

**TOYAMA CHEMICAL CO., LTD. (100.0%)  
2-5 Nishishinjuku 3-Chome, Shinjuku-ku  
Tokyo 160-0023, JP**

72 Inventor/es:

**TANAKA, KEIICHI y  
MORIMOTO, KIMIKO**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 593 527 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 terapéutico para enfermedades basado en el efecto inhibidor del factor inhibidor de la migración de macrófagos**

5

**Campo técnico**

La presente invención se refiere a un derivado de benzopirano como se define en la reivindicación 1 que tiene actividad inhibidora del factor inhibidor de la migración de macrófagos (denominado en lo sucesivo como MIF) para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple con recaídas y remisiones o progresiva secundaria en el momento de recaída.

10

**Técnica anterior**

La esclerosis múltiple (en lo sucesivo, EM) es una enfermedad que tiene un foco generado en el sistema nervioso central tal como el cerebro o la médula espinal, y causa diversos síntomas neurológicos (tales como trastornos visuales, discinesia, hiperestesia, disestesia, dolor, desequilibrio, temblores, disuria, disfunción sexual, fatiga, y trastornos emocionales). La EM se divide, dependiendo del modo progresivo del estado del paciente, en un "tipo de recaída-remisión" en donde se repiten recaída y remisión, y un "tipo crónico progresivo" en el que el síntoma se agrava gradualmente. El tipo progresivo crónico se divide adicionalmente en un "tipo progresivo secundario" en el que la EM con recaídas y remisiones muestra con posterioridad progresión crónica, y un "tipo progresivo primario" en el que la no se produce recaída obvia sino que el síntoma se agrava gradualmente a partir de la etapa inicial del comienzo.

15

20

La causa de la EM no se ha aclarado todavía. Hay un informe acerca de la causa de la EM en la que las células T o macrófagos se infiltran a los tejidos nerviosos y atacan la mielina propia que cubre el axón de las células nerviosas del cerebro o de la médula espinal del paciente, y como resultado, se causa inflamación en la mielina y por lo tanto se causa desmielinización, los que conduce a EM (Documento No de Patente 2)

25

Un método terapéutico para la EM se divide en tres categorías, es decir, inhibición de la inflamación en un período agudo, inhibición de la recaída o progresión, y alivio de los síntomas.

30

En un tratamiento en un período agudo, se utilizan glucocorticoides (un fármaco anti-inflamatorio esteroideo) para inhibir la inflamación de un sitio en el que se daña la mielina. La EM es una enfermedad difícil de recuperar por completo debido a que se producen repetidamente la recaída y la remisión. Se han estudiado diversos tratamientos inmunológicos basado en el mecanismo patogénico de la EM (Documento No de Patente 2), y se presume que el interferón  $\beta$  y agentes inmunosupresores son eficaces. Sin embargo, no se ha establecido un método terapéutico suficientemente eficaz y seguro. En particular, se desea un método terapéutico excelente para la EM en el momento de la recaída.

35

40

El MIF es una citoquina secretada por los linfocitos activados y que tiene diversas actividades biológicas. Se sabe que presenta actividades para, por ejemplo, el sistema inmunológico, el sistema endocrino, y la proliferación y diferenciación de células. En particular, el MIF juega un papel importante en la inflamación sistémica y la respuesta inmunológica, y es un factor que pertenece también a una reacción de hipersensibilidad retardada para inhibir la migración aleatoria de macrófagos. Además, el MIF tiene actividad dopacromo tautomerasa (Documento No de Patente 3).

45

Por otro lado, se sabe que el MIF tiene homología con la glutatión S-transferasa, para mostrar desintoxicación, que va a ser secretada desde la adenohipófisis en el momento del choque endotóxico, que va a ser inducido por un bajo nivel de glucocorticoides, y para oponerse a su efecto inmunosupresor (Documento No de Patente 4). En otras palabras, el MIF inhibe la actividad de los glucocorticoides, suscita antagonismo sobre el efecto anti-inflamatorio de los glucocorticoides endógenos o administrados terapéuticamente, y funciona también como una causa o un factor agravante de una enfermedad inflamatoria y un estado inflamatorio.

50

Además, el MIF es indispensable para la activación de las células T, se expresa en diversas células, y se expresa fuertemente en particular en el sistema nervioso.

55

En la relación entre el MIF y las enfermedades, por ejemplo, un inhibidor de MIF alivia un síntoma de alodinia de un modelo animal para NP. Por otra parte, se puede producir un modelo de ratón que muestra una reacción de sensibilidad a un estímulo agravado por el estrés mediante la inyección de MIF recombinante a un ratón normal (Documento No de Patente 5). Además, en un modelo animal para NP, específicamente, en un modelo para la alodinia inducida por la ligadura del nervio ciático, el MIF es altamente expresado en el asta dorsal ipsilateral de la médula espinal, y se activan moléculas de señalización en el lado aguas abajo del MIF (Documento No de Patente 6). Además, en un ratón con el gen de MIF desactivado, se elimina la alodinia inducida por la ligadura del nervio

60

ciático (Documentos No de Patente 5 y 6). En consecuencia, se presume que el MIF es indispensable para la expresión de los síntomas de la NP.

5 Por otro lado, en un paciente con EM, la concentración de MIF en el fluido cefalorraquídeo es significativamente mayor en el momento de la recaída, en comparación con el momento de la remisión (Documento No de Patente 7). Además, la encefalomiелitis autoinmune experimental (denominada en lo sucesivo EAE) de un ratón, es decir, un animal modelo para la EM, se puede prevenir la recaída mediante la desactivación de genes MIF (Documento No de Patente 8). Es obvio a partir de estos hechos que el MIF juega un papel muy importante en la formación de NP y EM.

10 La EAE, es decir, el modelo animal para la EM, incluye un modelo para reproducir el comienzo principal de un período agudo (monofásico) y un modelo para reproducir la afección de recaída/remisión crónica y, en general, se utilizan ratas para la primera y se utilizan ratones para la última para construir el modelo.

15 Se ha informado, por ejemplo, de que la ciclofosfamida de un agente inmunosupresor inhibe el inicio de la EAE aguda en ratas, pero no es eficaz para el tipo de recaída o el tipo crónico progresivo de la EAE en ratones (Documento 9 No de Patente).

20 También se informa de que un anticuerpo anti-integrina  $\alpha 4$  de rata o de ratón equivalente a un agente terapéutico para la EM, natalizumab, retrasó la aparición y redujo la gravedad de la enfermedad con respecto a la EAE aguda en ratas, y inhibieron el inicio de la EAE en ratones mediante administración para la prevención de la EAE, pero los síntomas se agravaron mediante la administración terapéutica (Documentos No de Patente 10 y 11).

25 Un derivado de benzopirano exhibe un efecto antiartrítico (Documento de Patente 1), un efecto inhibidor de la producción de citoquinas inflamatorias, tales como interleuquina- $1\beta$  e interleuquina-6, y un efecto inmunomodulador (Documentos No de Patente 12, 13 y 14), y se conoce que son útiles para un tratamiento de la artritis reumatoide y otras artritis y enfermedades autoinmunes (Documento de Patente 2). Además, se sabe que la N-[7-[(metilsulfonil)amino]-4-oxo-6-fenoxi-4H-1-benzopiran-3-il]formamida es eficaz para la EAE aguda en ratas (Documento No de Patente 15 y Documento de Patente 2).

30 Sin embargo, no se conoce en absoluto que el derivado de benzopirano se una a MIF para inhibir sus actividades biológicas, como se mencionó anteriormente.

35 Además, la eficacia del derivado de benzopirano para NP como se mencionó anteriormente no se conoce en absoluto, y la eficacia del mismo para la EM de recaída-remisión o progresiva secundaria en el momento de la recaída tampoco se conoce en absoluto.

**Documentos de la técnica anterior**

Documento de Patente

40

Documento de Patente 1: JP 02-049778 A

Documento de Patente 2: Folleto de la Publicación Internacional Núm. WO 94/23714

Documento No de Patente

45

Documento no de Patente 2: N. Engl. J. Med., 2000, vol. 343, págs. 938-952

Documento no de Patente 3: Nat. Rev. Drug Discov., 2006, vol. 5, págs. 399-410

Documento no de Patente 4: Molecular Medicine, 1996, vol. 2, págs. 143-149

Documento no de Patente 5: Exp. Neurol., 2012, vol. 236, págs. 351-362

50

Documento no de Patente 6: Anesthesiology, 2011, vol. 114, págs. 643-659

Documento no de Patente 7: J. Neurol. Sci., 2000, vol. 179, págs. 127-131

Documento no de Patente 8: J. Immunol., 2005, vol. 175, págs. 5611-5614

Documento no de Patente 9: Clin. Exp. Immunol., 2009, vol. 159, págs. 159-168

Documento no de Patente 10: J. Pharmacol. Exp. Ther., 2003, vol. 305, págs. 1150-62

55

Documento no de Patente 11: J. Clin. Invest., 2001, vol. 107, págs. 995-1006

Documento no de Patente 12: Chem. Pharm. Bull., 2000, vol. 48, págs. 131-139

Documento no de Patente 13: J. Pharmacobiodyn., 1992, vol. 15, págs. 649-655

Documento no de Patente 14: Int. J. Immunotherapy, 1993, vol. 9, págs. 69-78

Documento no de Patente 15: J. Neuroimmunol., 1998, vol. 89, págs. 35-42

60

**Compendio de la invención**

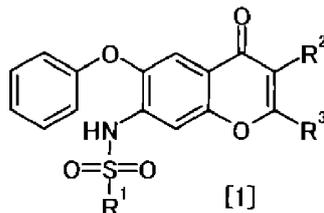
**Problema técnico**

Se desea un producto médico útil para la EM con recaída.

**Solución al Problema**

5 En estas circunstancias, los autores de la presente invención encontraron que el derivado de benzopirano definido en la reivindicación 1 o una de sus sales se une a MIF, exhibe un efecto inhibidor de MIF, y por lo tanto es útil para un tratamiento terapéutico o preventivo de una enfermedad para la que es eficaz la inhibición de MIF, lo que da como resultado la realización de la presente invención.

10 N-[7-[(metilsulfonyl)amino]-4-oxo-6-fenoxi-4H-1-benzopiran-3-il]formamina es el derivado preferido de los compuestos de [Fórmula 1]



15 en donde R<sup>1</sup> representa un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido; uno de R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> representa un átomo de hidrógeno; y el otro de R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> representa un átomo de hidrógeno, un grupo amino opcionalmente sustituido, un grupo acilamino opcionalmente sustituido, un grupo carbamoilo opcionalmente sustituido o un grupo arilo opcionalmente sustituido.

20 **Efectos ventajosos de la invención**

El derivado de benzopirano anteriormente mencionado corresponde a la fórmula general [1] y exhibe un efecto inhibidor de MIF y es útil para un tratamiento terapéutico o preventivo de enfermedades para las que es eficaz la inhibición de MIF, tal como la EM con recaídas y remisiones y progresiva secundaria en el momento de recaída.

25 **Descripción de las realizaciones**

La presente invención se describirá a continuación en detalle.

30 Los términos utilizados en la presente memoria tienen los siguientes significados a menos que se indique lo contrario.

Un átomo de halógeno significa un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo o un átomo de yodo.

35 Un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> significa un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> lineal o ramificado tal como un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo propilo, un grupo isopropilo, un grupo butilo, un grupo sec-butilo, un grupo isobutilo, un grupo terc-butilo, un grupo pentilo, un grupo isopentilo y un grupo hexilo.

40 Un grupo alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> significa un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> lineal o ramificado tal como un grupo metoxi, un grupo etoxi, un grupo propoxi, un grupo isopropoxi, un grupo butoxi, un grupo isobutoxi, un grupo sec-butoxi, un grupo terc-butoxi, un grupo pentiloxi y un grupo hexiloxi.

45 Un grupo alcanilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> significa un grupo alcanilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> lineal o ramificado tal como un grupo acetilo, un grupo propionilo, un grupo valerilo, un grupo isovalerilo y un grupo pivaloilo.

Un grupo aroilo significa un grupo benzoilo o un grupo naftoilo.

50 Un grupo carbonilo heterocíclico significa un grupo nicotinoilo, un grupo tenoilo, un grupo pirrolizincarbonilo o un grupo furoilo.

Un grupo aminoacetilo (α-sustituido) significa un grupo aminoacetilo (α-sustituido) que deriva de un aminoácido (tal como glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, cisteína, metionina, ácido aspártico, ácido glutámico, asparragina, glutamina, arginina, lisina, histidina, hidroxilisina, fenilalanina, tirosina, triptófano, prolina e hidroxiprolina) y que pueden tener un N-terminal protegido.

55 Un grupo acilo significa un grupo formilo, un grupo succinilo, un grupo glutarilo, un grupo maleoilo, un grupo ftaloilo, un grupo alcanilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, un grupo aroilo, un grupo carbonilo heterocíclico o un grupo aminoacetilo (α-sustituido).

Un grupo acilamino significa un grupo amino sustituido con un grupo acilo.

Un grupo arilo significa un grupo fenilo, un grupo naftilo, un grupo indanilo, un grupo indenilo, un grupo tetrahidronaftilo o similar.

5

El grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> de R<sup>1</sup> puede estar sustituido con uno o más átomos de halógeno.

El grupo amino o el grupo carbamoilo de R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> pueden estar sustituidos con uno o más grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

10

El grupo acilamino de R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> puede estar sustituido con uno o más átomos de halógeno

El grupo arilo de R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> puede estar sustituido con uno o más grupos seleccionados entre un átomo de halógeno, un grupo amino, un grupo hidroxilo, un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> que puede estar sustituido con uno o más átomos de halógeno, y un grupo alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> que puede estar sustituido con uno o más átomos de halógeno.

15

Específicamente, se prefiere N-[7-[(metilsulfonyl)amino]-4-oxo-6-fenoxi-4H-1-benzopirano-3-il]formamida.

El derivado de benzopirano de la fórmula general [1] utilizado en la presente invención se produce mediante la combinación de los métodos reconocidos públicamente, y se puede producir mediante, por ejemplo, un método descrito en el Documento de Patente 1.

20

Ejemplos de la sal del derivado de benzopirano incluyen una sal con un metal alcalino tal como sodio o potasio; una sal con un metal alcalinotérreo tal como calcio y magnesio; una sal de amonio; y una sal con una base orgánica que contiene nitrógeno tal como trimetilamina, trietilamina, tributilamina, piridina, N, N-dimetilanilina, N-metilpiperidina, N-metilmorfolina, dietilamina, diciclohexilamina, procaína, dibencilamina, N-bencil-β-fenetilamina, 1-efenamina y N,N'-dibenciletildiamina.

25

Entre las sales antes mencionadas, se prefieren las sales farmacológicamente aceptables.

30

MIF tiene alta homología con una tautomerasa bacteriana, y cataliza una reacción de la dopacromo tautomerasa (Molecular Medicine, 1996, vol. 2, págs. 143-149). Por lo tanto, la actividad biológica de MIF se puede evaluar mediante el uso de una reacción con tautomerasa con un dopacromo como sustrato.

35

El derivado de benzopirano de la fórmula general [1] o la sal del mismo de la presente invención tiene un efecto para inhibir la actividad tautomerasa de MIF (a saber, un efecto inhibidor de MIF), y un fármaco que contiene el derivado de benzopirano de la fórmula general [1] o la sal del mismo es útil para un tratamiento terapéutico o preventivo de enfermedades para las es eficaz que la inhibición MIF.

40

Los ejemplos de la enfermedad para la que es eficaz la inhibición de MIF incluyen la EM con recaídas y remisiones y la progresiva secundaria en el momento de la recaída.

45

La EM con recaídas y remisiones tiene una característica que se mejora lo largo de varias semanas o varios meses después de que un síntoma neurológico que ha aparecido de forma aguda alcanza el fastigium, y a continuación reincide para reproducir o agravar los síntomas neurológicos. Un periodo de remisión sigue a la recaída. Se repiten una recaída producida cada varios meses o años y una remisión lenta o gradual.

50

La EM progresiva secundaria tiene la característica de que se agrava gradualmente el estado de remisión de un paciente que tiene la EM con recaídas y remisiones desarrollada inicialmente mientras se repiten la recaída y la remisión.

55

Los ejemplos de los síntomas de la EM con remisiones y recaídas y la EM progresiva secundaria en el momento de la recaída incluyen reducción de la visión, parálisis motora, trastornos sensoriales, visión múltiple, disuria y disartria.

60

El compuesto de la presente invención se puede formar en formulaciones farmacéuticas tales como una preparación oral (incluyendo un comprimido, una cápsula, un polvo, un gránulo, un gránulo fino, una píldora, una suspensión, una emulsión, un líquido y un jarabe), un inyectable y una gota ocular mezclando con diversos aditivos farmacéuticos tales como un excipiente, un aglutinante, un disgregante, un inhibidor de la disgregación, un agente antiapelmazante, un lubricante, un excipiente, un disolvente, un expansor, un agente de ajuste de la tonicidad, un agente solubilizante, un emulsionante, un agente de suspensión, un espesante, un agente de recubrimiento, un promotor de absorción, un promotor de la gelificación, un acelerador de la coagulación, un estabilizador de luz, un conservante, un agente desecante, un estabilizador de la emulsión, un estabilizador de la suspensión, un estabilizador de la dispersión, un inhibidor de la coloración, un absorbente de oxígeno, un antioxidante, un agente de enmascaramiento del sabor, un agente de enmascaramiento del olor, un agente colorante, un agente espumante, un agente antiespumante, un agente calmante, un agente antiestático, un diluyente, un tampón de pH, y un agente de

ajuste del pH.

Las diferentes formulaciones descritas anteriormente se formulan por medio de métodos habituales.

5 Una formulación sólida oral tal como un comprimido, un polvo y un gránulo se puede formular mediante un método habitual utilizando un aditivo farmacéutico de, por ejemplo, un excipiente tal como lactosa, sacarosa, cloruro de sodio, glucosa, almidón, carbonato de calcio, caolín, celulosa cristalina, fosfato de calcio dibásico anhidro, almidón parcialmente pregelatinizado, almidón de maíz y ácido algínico; un aglutinante tal como un jarabe simple, una solución de glucosa, una solución de almidón, una solución de gelatina, poli(alcohol vinílico), poli(éter vinílico), polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, goma laca, metilcelulosa, etilcelulosa, alginato de sodio, goma arábiga, hidroxipropil metil celulosa e hidroxipropil celulosa; un disgregante tal como almidón seco, ácido algínico, agar en polvo, almidón, polivinilpirrolidona entrecruzada, carboximetilcelulosa sódica entrecruzada, sal de potasio de carboximetilcelulosa y glicolato de almidón sódico; un inhibidor de la disgregación tal como alcohol estearílico, ácido esteárico, manteca de cacao y aceite hidrogenado; un agente antiaglomerante, tal como silicato de aluminio, hidrogenofosfato de calcio, óxido de magnesio, talco y anhídrido silícico; un lubricante tal como cera de carnauba, ácido silícico anhidro ligero, silicato de aluminio, silicato de magnesio, un aceite hidrogenado, un derivado de aceite vegetal hidrogenado, aceite de sésamo, cera de abejas blanca, óxido de titanio, gel seco de hidróxido de aluminio, ácido esteárico, estearato de calcio, estearato de magnesio, talco, hidrogenofosfato de calcio, laurilsulfato de sodio y polietilenglicol; un promotor de la absorción tal como una sal cuaternaria de amonio, lauril sulfato de sodio, urea y una enzima; y un vehículo tal como almidón, lactosa, caolín, bentonita, anhídrido silícico, dióxido de silicio hidratado, aluminometasilicato de magnesio y ácido silícico coloidal.

El comprimido se puede formar, en caso necesario, en un comprimido recubierto general, tal como un comprimido recubierto con azúcar, un comprimido recubierto con gelatina, un comprimido con recubrimiento gástrico soluble, un comprimido con recubrimiento entérico y un comprimido recubierto con película soluble en agua.

La cápsula se prepara cargando una cápsula de gelatina dura, una cápsula blanda y similares con cualquiera de los diversos aditivos farmacéuticos anteriormente mencionados.

30 Alternativamente, se pueden utilizar para la preparación un aditivo farmacéutico tal como un disolvente, un expansor, un agente de ajuste de la tonicidad, un agente solubilizante, un emulsionante, un agente de suspensión y un agente espesante por medio de un método habitual para obtener una suspensión acuosa u oleosa, una solución, un jarabe y un elixir.

35 La inyección se puede preparar mediante un método habitual utilizando un aditivo farmacéutico de, por ejemplo, un diluyente tal como agua, alcohol etílico, macrogol, propilenglicol, ácido cítrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido láctico, lactato de sodio, ácido sulfúrico e hidróxido de sodio; un tampon de pH y un agente de ajuste del pH, tal como citrato de sodio, acetato de sodio y fosfato de sodio; un estabilizador de la emulsión, un estabilizador de la suspensión y un estabilizador de dispersión tal como piro-sulfito de sodio, ácido etilendiaminotetraacético, ácido tioglicólico y ácido tioláctico; un agente de ajuste de la tonicidad tal como sal común, glucosa, manitol y glicerina; un agente solubilizante tal como carboximetilcelulosa sódica, propilenglicol, benzoato de sodio, benzoato de bencilo, uretano, etanolamina y glicerina; un agente calmante tal como gluconato de calcio, clorobutanol, glucosa y alcohol bencílico; y un anestésico local.

45 Las gotas oftálmicas se pueden preparar mediante un método habitual mezclando adecuadamente con un conservante tal como clorobutanol, deshidroacetato de sodio, cloruro de benzalconio, cloruro de cetilpiridinio, alcohol fenílico, paraoxibenzoato de metilo y cloruro de bencetonio; un tampón de pH y un ajustador de pH, tales como bórax, ácido bórico y dihidrogenofosfato de potasio; un espesante tal como metil celulosa, hidroxietil celulosa, carboximetil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, poli(alcohol vinílico), carboximetilcelulosa sódica y sulfato de condroitina; un agente solubilizante tal como polisorbato 80 y aceite de ricino endurecido con polioxietileno 60; un estabilizador de la emulsión, un estabilizador de la suspensión y un estabilizador de dispersión tal como edetato de sodio y e hidrogenosulfito de sodio; y un agente de ajuste de la tonicidad tal como cloruro de sodio, cloruro de potasio y glicerina.

55 Un método de administración de la formulación no está especialmente limitado, y se determina apropiadamente de acuerdo con la forma de la formulación, la edad, el sexo y otras condiciones del paciente, y el grado de los síntomas del paciente.

60 Una dosis de un ingrediente activo de la presente formulación se selecciona apropiadamente de acuerdo con el uso, la edad y el sexo del paciente, la forma de la enfermedad y las otras condiciones, y en general, se puede administrar a una dosis de 0,1 a 500 mg, preferiblemente de 10 a 200 mg por día de una vez o de forma dividida varias veces al día para un adulto.

## Ejemplos

A continuación, la presente invención se describirá con referencia a ejemplos de ensayo, y se observa que la presente invención no se limita a estos ejemplos.

Las abreviaturas utilizadas en los ejemplos de ensayo respectivos tienen los siguientes significados.

5

MES: ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico

DMF: N,N-dimetilformamida

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

10

NHS: N-hidroxisuccinimida

PLP: Proteína proteolípida

TBST: Solución salina tamponada con Tris que contiene Tween 20

Los siguientes compuestos se utilizan como sustancias de ensayo.

15

[Tabla 1]

Compuesto	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
Compuesto A	CH <sub>3</sub>	NHCHO	H
compuesto B	CH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>	H
Compuesto C	CH <sub>3</sub>	NHCOCH <sub>3</sub>	H
Compuesto D	CH <sub>3</sub>	H	H
Compuesto E	CH <sub>3</sub>	H	CONH <sub>2</sub>
Compuesto F	CH <sub>3</sub>	H	NHCOCH <sub>3</sub>
Compuesto G	CH <sub>3</sub>	CONH <sub>2</sub>	H
Compuesto H	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	NHCHO	H
Compuesto I	CH <sub>3</sub>	H	

Ejemplo de ensayo 1 (Confirmación de la unión del Compuesto A y MIF)

20 Como sustancia de ensayo, se utilizó el Compuesto A (N-[7-[(metilsulfonyl)amino]-4-oxo-6-fenoxi-4H-1-benzopiran-3-il]formamida).

(1) Preparación del producto lisado celular

25 Se cultivaron células THP-1 durante aproximadamente 6 horas en PRMI 1640 que contenía 1% de suero bovino fetal y 50 µmoles/L de 2-mercaptoetanol. A continuación, se añadió lipopolisacárido (E. coli 0127:B8, Sigma Aldrich) a la placa de cultivo a una concentración final de 1 µg/ml, y las células se cultivaron durante aproximadamente 30 minutos. Las células se recogieron y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato, y se mezclaron con un volumen de aproximadamente 2 veces de tampón de lisis celular (20 mmoles/L de Tris, 150 mmoles/L de cloruro de sodio, 1 mmol/L de cloruro de magnesio, NP-40 al 0,1%, 1 mmol/L de ditioneitol, Triton X-100 al 0,1%, pH 7,4). La mezcla resultante se colocó en hielo con agitación ocasional durante aproximadamente 30 minutos, y se centrifugó (20.000 x g, 4°C, 8 minutos). El sobrenadante separado y obtenido se utilizó como producto lisado celular. La concentración de proteína del producto lisado celular se midió con reactivo de análisis de proteína BCA (Thermo Fisher Scientific K.K.) de acuerdo con su manual.

35

(2) Síntesis de 4-amino-N-[7-[(metilsulfonyl)amino]-4-oxo-6-fenoxi-4H-1-benzopiran-3-il]butanamida

A una solución de 500 mg de N-(3-amino 4-oxo-6-fenoxi-4H-1-benzopiran-7-il)metanosulfonamida en 5,0 mL de DMF, se le añadieron 293 mg de ácido 4-(terc-butoxicarbonilamino)butírico y 304 mg de EDC, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 1 hora y 30 minutos. A la mezcla de reacción obtenida de este modo, se le añadieron 111 mg de EDC, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 3 horas y 30 minutos. Se añadieron acetato de etilo y una solución acuosa de ácido cítrico al 10% a la mezcla de reacción resultante, el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, y se filtró un sólido. Al sólido obtenido de este modo, se le añadieron DMF, acetato de etilo y una solución acuosa de ácido cítrico al 10%, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, el sólido se filtró para obtener 397 mg de [4-[[7-[(metilsulfonil)amino]-4-oxo-6-fenoxi-4H-1-benzopiran-3-il]amino]-4-oxobutil]carbamato de terc-butilo en forma de un sólido de color amarillo pálido. Se suspendieron 300 mg del [4-[[7-[(metilsulfonil)amino]-4-oxo-6-fenoxi-4H-1-benzopiran-3-il]amino]-4-oxobutil]carbamato de terc-butilo obtenido de este modo en 3,0 mL de cloruro de metileno, se añadieron 0,60 mL de ácido trifluoroacético enfriando con hielo, el producto resultante se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos, y después el disolvente se separó por destilación a presión reducida. Al residuo obtenido de este modo, se le añadieron 3 mL de acetato de etilo y 0,25 mL de una solución de cloruro de hidrógeno/acetato de etilo de 4 moles/L, y el disolvente se separó mediante destilación a presión reducida. Al residuo obtenido de este modo, se le añadieron 5,0 mL de acetato de etilo y 0,50 mL de una solución de cloruro de hidrógeno/acetato de etilo de 4 moles/L, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, se filtró un sólido para obtener 232 mg de 4-amino-N-[7-[(metilsulfonil)amino]-4-oxo-6-fenoxi-4H-1-benzopiran-3-il]butanamida en forma de un sólido de color amarillo pálido.

### (3) Preparación de esferas

La inmovilización de hidrocloreto de 4-amino-N-[7-[(metilsulfonil)amino]-4-oxo-6-fenoxi-4H-1-benzopiran-3-il]butanamida en Dynabeads M-270 Carboxylic Acid (Life Technologies Corporation) se llevó a cabo por medio de un método general.

En pocas palabras, después de esterificación con NHS de los extremos COOH de aproximadamente 30 mg de las esferas (Dynabeads M-270 Carboxylic Acid, Life Technologies Corporation), se añadieron a esto 0,010 mL de DMF, 0,90 mL de una solución de 0,01 mol/L de hidrocloreto de 4-amino-N-[7-[(metilsulfonil)amino]-4-oxo-6-fenoxi-4H-1-benzopiran-3-il]butanamida/DMF, y 0,090 mL de una solución de 1 mol/L de N,N-diisopropiletilamina/DMF, y el resultante se sacudió a temperatura ambiente durante 70 minutos. Las esferas se lavaron con 0,5 mL de DMF dos veces y, a continuación, se añadieron 0,94 mL de DMF y 0,060 mL de 2-aminoetanol, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Las esferas se lavaron con 0,5 mL de DMF dos veces, y después se lavaron con 1 mL de tampón de fosfato de 0,05 mol/L (pH 6) cuatro veces, y de este modo, se obtuvieron las esferas a las que se había unido el Compuesto A a través de un conector (referidas en lo sucesivo como esferas de compuestos). Además, las esferas obtenidas por medio de una reacción similar sin la adición de hidrocloreto de 4-amino-N-[7-[(metilsulfonil)amino]-4-oxo-6-fenoxi-4H-1-benzopiran-3-il]butanamida se utilizaron como esferas de control. Cada tipo de estas esferas se suspendió en 1 mL de tampón de fosfato de 0,05 moles/L (pH 6) para almacenarlas en un refrigerador hasta su uso. Inmediatamente antes de su uso, una parte de las esferas se separó y se lavó con tampón de lisis celular tres veces.

### (4) La reacción entre el extracto celular y las esferas

Se mezclaron minuciosamente 0,1 mL de producto lisado celular (2 mg/ml de proteína) y aproximadamente 0,9 mg de las esferas de compuestos o esferas de control durante la noche a 4°C. Los sobrenadantes se separaron de las esferas utilizando un imán, y se recogieron como la Fracción de flujo continuo. Además, las esferas se lavaron con tampón de lisis celular, y a continuación se hicieron reaccionar con 40 µL de tampón de lisis celular que contenía 0,5 mmol/L de Compuesto A a 4°C durante aproximadamente 8 horas con agitación vigorosa. Los sobrenadantes se separaron de las esferas utilizando un imán, y se recogieron como el Eluato de Compuesto A. Por otra parte, las esferas se enjuagaron ligeramente con tampón de lisis celular, se mezclaron con 15 µL de tampón de muestra SDS-PAGE (2ME+) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), que había sido diluido hasta 4 veces, y se calentaron a aproximadamente 95°C durante 5 minutos. Después de eso, los sobrenadantes separados de las esferas utilizando un imán se recogieron como la Fracción eluida con calor.

### (5) Detección de MIF mediante transferencia Western

Se llevó a cabo una transferencia Western por medio de un método general. Tanto de una parte de la Fracción de flujo continuo como una parte del eluato de Compuesto A obtenido como se ha descrito anteriormente en el apartado (4) se mezclaron, respectivamente, con el tampón de muestra SDS-PAGE (2ME+), y se calentaron. Estas muestras tratadas con calor y la Fracción eluida con calor se sometieron a electroforesis en gel de SDS-PAGE (SuperSep Ace al 15%, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a 30 a 50 mA durante aproximadamente 80 minutos, y a continuación se transfirieron electroforéticamente a una membrana PVDF (Hybond-P, GE Healthcare Japan Corporation) a 100 mA durante aproximadamente 60 minutos. La membrana de la

5 proteína transferida se sumergió y se agitó suavemente en una solución de TBST (Tris de 10 mmol/L, cloruro de sodio de 100 mmol/L, Tween-20 al 0,1%, pH 7,5) que contenía 5% de leche desnatada a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. Después de eso, la membrana se sumergió en una solución de TBST que contenía 1/50000 volúmenes de anticuerpos anti-MIF (Abcam Plc.) y 5% de leche desnatada, y se hizo reaccionar durante la noche a 4°C con agitación suave. Después de enjuagar ligeramente la membrana con la solución de TBST tres veces, la membrana resultante se sumergió en una solución de TBST que contenía un volumen 1/5000 de anticuerpo anti-IgG de cabra modificado con HRP (Santa Cruz Biotechnology Inc.) y 5% de leche desnatada, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación suave. Después de enjuagar ligeramente la membrana con una solución de TBST tres veces, el MIF se detectó utilizando ECL Prime Reagent (GE Healthcare Japan Corporation) de acuerdo con su manual.

10 La Fig. 1 muestra una fotografía de la membrana en la que se detectan mediante quimioluminiscencia los reaccionantes de unión a MIF y el anticuerpo.

15 Las fracciones sometidas a electroforesis en las respectivas calles del gel fueron las siguientes:

20 Calle 1: Fracción de flujo continuo de las esferas de compuesto  
 Calle 2: Eluato de Compuesto A de las esferas de compuesto  
 Calle 3: Fracción eluida con calor de las esferas de compuesto  
 Calle 4: MIF recombinante (Abcam Plc.)  
 Calle 5: Fracción de flujo continuo de las esferas de control  
 Calle 6: Eluato de Compuesto A de las esferas de control  
 Calle 7: Fracción eluida con calor de las esferas de control

25 El eluato de Compuesto A de las esferas de compuesto contiene proteínas que tienen una capacidad de unión a las esferas de compuesto y se libera de las esferas de compuesto en presencia de una cantidad excesiva del Compuesto A. Se demostró que una banda detectada en el eluato de Compuesto A (es decir, Calle 2) era MIF debido a que se unía al anticuerpo anti-MIF y estaba en una posición correspondiente al mismo peso molecular que MIF recombinante.

30 En otras palabras, se reveló que MIF tenía capacidad de unión a las esferas de compuesto.

35 Por otra parte, tanto el eluato de Compuesto A de las esferas de control como la fracción eluida con calor de las esferas de control contienen proteínas que tienen capacidad de unión a las esferas de control. Puesto que no se detectó MIF en estas fracciones (es decir, calles 6 y 7), se demostró que MIF no tenía ninguna capacidad de unión a las esferas de control.

En consecuencia, se demostró que MIF se une específicamente al Compuesto A.

40 Ejemplo de ensayo 2 (Confirmación de inhibición de la actividad MIF)

Los compuestos A a I se utilizaron como sustancias de ensayo.

45 El efecto inhibitorio de las sustancias de ensayo de la actividad tautomerasa de MIF se evaluó remitiéndose a un método de Healy et al. (Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention, 2011, vol. 20, págs. 1516-1523).

50 En este método, se mide la reacción tautomérica del éster metílico de L-3,4-dihidroxifenilalanina (éster metílico de L-dopacromo, coloreado) a éster metílico de ácido 5,6-hidroxiindol-2-carboxílico (sin color) como un cambio en la absorbancia a 475 nm.

Como fuente de enzima, se utilizó MIF recombinante fabricada por Abcam Plc. o MIF producido y purificado remitiéndose a un método de Lubetsky et al. (El Journal of Biological Chemistry, 2002, vol. 277, págs. 24976-24982). A continuación se describe un método de purificación para MIF.

55 El vector pET15b (Merck) en el que se había insertado la secuencia del gen completo de MIF se transfectó a la cepa BL21 Star (DE3) de E. coli (Life Technologies Corporation). La E. coli se cultivó hasta que el medio de cultivo exhibió absorbancia (a 600 nm) de 0,5 a 0,8, se añadió a esto isopropil- $\beta$ -tiogalactopiranosido (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a una concentración final de 0,1 mmol/L, y se indujo la expresión de la proteína durante 4 horas. Las E. coli se resuspendieron en tampón (pH 7,5) que contenía 20 mmol/L de Tris (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 20 mmol/L de cloruro de sodio (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y 1 mmol/L de ditiotreitól (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), y el resultante se sometió a lisis mediante ultrasonidos y centrifugación a 15.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante así obtenido se filtró utilizando un filtro de 0,20 micras, y se dejó pasar a través de columnas HiTrap Q HP e HiTrap SP HP (GE Healthcare Japan Corporation), para separar las fracciones de flujo continuo, cada una de 5 mL. Cada 10  $\mu$ l de las fracciones separadas se sometieron a electroforesis utilizando gel de

poliacrilamida de 5 al 20% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), y todas las proteínas se tiñeron con reactivo azul brillante de Coomassie (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Basándose en los resultados obtenidos de este modo, se seleccionó una fracción que contenía una gran cantidad de MIF y que contenía menos cantidad de otras proteínas como MIF purificado. La concentración de la proteína MIF se midió mediante el uso de reactivo de análisis de proteína BCA (Thermo Fisher Scientific K. K.).

El efecto inhibitorio de cada sustancia de ensayo de la actividad tautomerasa de MIF se midió de la siguiente manera.

Una concentración final de 10 a 50 nmoles/L de MIF y una concentración final de 30 mmoles/L de cada sustancia de ensayo o dimetilsulfóxido al 0,5% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) como control se añadieron al tampón (pH 6,2) que contenía 50 mmoles/L Bis-Tris (Dojindo Laboratories) y 1 mmol/L de EDTA (Dojindo Laboratories), y la reacción se realizó a temperatura ambiente durante 15 minutos para proporcionar una solución de reacción 1.

Por otro lado, se añadieron 1/20 de volumen/L de éster metílico de L-3,4-dihidroxifenilalanina 12 mmoles (Sigma Aldrich) y 1/20 volumen de 24 mmoles/L de peryodato de sodio (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) al tampón que tenía la misma composición que la utilizada para la obtención de la solución de reacción 1, para proporcionar una solución de reacción 2.

A continuación, la solución de reacción 1 y la solución de reacción 2, se mezclaron, y se midió inmediatamente el cambio temporal de absorbancia a 475 nm de la mezcla obtenida.

Se obtuvo la diferencia de las absorbancias entre aproximadamente 1 minuto después del inicio de medición y aproximadamente 5 minutos después. Suponiendo que el cambio de absorbancia del control es 100%, se calculó la tasa de inhibición de la reacción de tautomerasa en presencia de cada sustancia de ensayo.

Los resultados se muestran en la Tabla 2. En la Tabla 2, la tasa de inhibición de la reacción tautomerasa se muestra como sigue. "-"; menos de 50%, "+"; 50% o más y menos de 75%, "++"; 75% o más.

[Tabla 2]

Sustancia de ensayo	Tasa de Inhibición de la reacción de la tautomerasa
Compuesto A	+
compuesto B	+
Compuesto C	+
Compuesto D	+
Compuesto E	++
Compuesto F	++
Compuesto G	+
Compuesto H	++
Compuesto I	++

Todas las sustancias de ensayo inhiben la actividad tautomerasa de MIF.

Los resultados descritos anteriormente muestran que el compuesto de fórmula general [1] o la sal del mismo muestran el efecto inhibitorio MIF y es útil como un inhibidor de MIF.

Ejemplo de ensayo 4 (Efecto sobre el modelo EAE con recaída crónica de ratón)

El compuesto A se seleccionó como una sustancia de ensayo, y la salazosulfapiridina (en lo sucesivo, SASP) se seleccionó como un agente de control comparativo. El Compuesto A se administró a una dosis de 30 mg/kg (grupo de compuesto A). La SASP se administró a una dosis de 300 mg/kg (grupo de SASP). En el grupo control y el grupo normal (grupo sin tratamiento de inducción), se administró solución acuosa de metilcelulosa al 0,5%, utilizada como vehículo del líquido de administración.

La EAE con recaída crónica se indujo en ratones hembra SJL/J mediante inmunización con el péptido PLP parcial. En resumen, se preparó una emulsión mezclando volúmenes equivalentes de solución salina de tampón fosfato que contenía 1 mg/ml del péptido correspondiente a los residuos 139-151 de la PLP y coadyuvante incompleto de Freund que contenía 4 mg/ml de M. tuberculosis H37Ra muertos. La emulsión se inyectó intradérmicamente (50 µg de PLP por ratón) en cuatro posiciones en el dorso para la inmunización, y, adicionalmente, el día de la inmunización y dos días después, se inyectó la toxina pertussis por vía intraperitoneal a cada cantidad de 150 ng por ratón, dos

veces en total. El vehículo, la sustancia de ensayo o el artículo de referencia se administraron por vía oral de forma continua durante 44 días una vez al día desde el día de la inmunización.

5 En el presente experimento, la parálisis se desarrolló hasta alcanzar un máximo el día 14 a 16 después de la inmunización, y el síntoma remitió una vez, pero hubo recaída hasta alcanzar un máximo el día 38.

10 El síntoma se evaluó de acuerdo con un informe de Weaver et al. (FASEB Journal, 2005, vol. 19, pág. 1668). En pocas palabras, la parálisis de las cuatro extremidades y la cola se evaluó mediante la puntuación en 4 rangos de puntuaciones de 0 a 3 y de 3 rangos de puntuaciones de 0 a 2, respectivamente, y se determinó la suma de las puntuaciones como puntuación de EAE (puntuación máxima de 14).

15 Las tasas de incidencia (el número de ratones que habían desarrollado la enfermedad/número de ratones utilizados) y el promedio de la puntuación de EAE de cada grupo se midieron en el periodo de aparición inicial (el día 15 después de la inmunización) y en el período de recaída (en el día 38º después de la inmunización). Los resultados se muestran en la Tabla 4.

[Tabla 4]

Grupo de ensayo	Número de animales	Período de aparición inicial		Período de recaída	
		Tasa de incidencia	Puntuación de EAE	Tasa de incidencia	Puntuación de EAE
Grupo normal	2	0/2	0,0	0/2	0,0
Grupo de control	8	6/8	6,8	6/8	1,9
Grupo de Compuesto A	8	1/8	1,4	2/8	0,3
grupo SASP	8	7/7	5,5	6/6	2,0
		(murió 1 animal)		(murieron 2 animales)	

20 En el compuesto A del grupo, la tasa de incidencia fue baja tanto en el período de aparición inicial como en el periodo de recaída, y la puntuación de EAE fue obviamente también baja.

Por otro lado, en el grupo de SASP, no disminuyeron ni la tasa de incidencia ni la puntuación de EAE.

25 Los resultados descritos anteriormente muestran que el Compuesto A suprime la aparición de la parálisis de EAE con recaída crónica. Los efectos del compuesto A son obviamente diferentes de los de SASP, aunque ambos fármacos se clasifican como inmunomoduladores.

30 Los resultados descritos anteriormente muestran que el compuesto de fórmula general [1] o la sal del mismo son útiles como inhibidor de MIF, y también son útiles para un tratamiento terapéutico o preventivo de una enfermedad para la que es eficaz la inhibición de la MIF, tal como NP y un período de recaída de la EM con recaídas y remisiones y progresiva secundaria.

**Breve descripción del dibujo**

35 [Fig. 1] La Fig. 1 es una fotografía de una membrana sobre la que se detectan los reactivos que resultan de la unión entre MIF y el anticuerpo por quimioluminiscencia.

**Aplicabilidad Industrial**

40 El derivado de benzopirano como se define en la reivindicación 1 o una de sus sales se une a MIF, exhibe un efecto inhibidor de MIF, y es útil para el tratamiento de la esclerosis múltiple con recaídas y remisiones o progresiva secundaria en el momento de recaída.

**REIVINDICACIONES**

1. Un agente de tratamiento para uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple con recaídas y remisiones o progresiva secundaria en el momento de la recaída, que comprende N-[7-[(metilsulfonyl)amino]-4-oxo-6-fenoxi-4H-1-benzopiran-3-yl]formamida o una de sus sales.
- 5

**FIG. 1**

