



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 513**

51 Int. Cl.:
C07D 207/26 (2006.01)
C07D 403/12 (2006.01)
A61K 31/4015 (2006.01)
A61P 27/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04753359 .1**
96 Fecha de presentación : **25.05.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1638936**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.03.2006**

54 Título: **Análogos de 3-oxa-5-azaprostaglandina como agentes para rebajar la presión intraocular.**

30 Prioridad: **02.06.2003 US 453207**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.05.2011

73 Titular/es: **ALLERGAN, Inc.**
2525 Dupont Drive
Irvine, California 92612, US

72 Inventor/es: **Old, David, W.;**
Dinh, Thang, D. y
Burk, Robert, M.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 358 513 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

Campo de la invención

La presente invención se refiere a análogos de 3-oxa-8-azaprostaglandina útiles como potentes hipotensivos oculares que son particularmente adecuados para el tratamiento del glaucoma.

Antecedentes de la invención

Descripción de la técnica relacionada

Los agentes hipotensivos oculares son útiles en el tratamiento de diversas afecciones hipertensivas oculares tales como episodios hipertensivos oculares después de trabeculectomía quirúrgica o con láser, glaucoma, y como coadyuvantes prequirúrgicos.

El glaucoma es una enfermedad de los ojos caracterizada por una presión intraocular alta. Sobre la base de su etiología, el glaucoma se ha clasificado como primario o secundario. Por ejemplo, el glaucoma primario en adultos (glaucoma congénito) puede ser de ángulo abierto, o agudo o crónico de ángulo cerrado. El glaucoma secundario es resultado de enfermedades oculares preexistentes tales como uveitis, tumor intraocular o catarata de larga evolución.

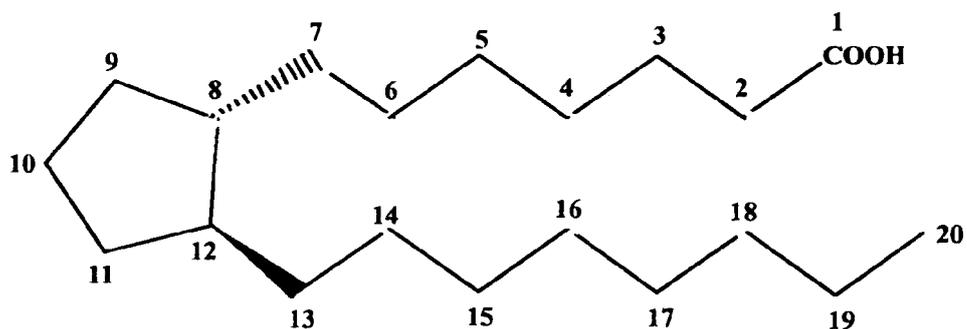
Todavía no se conocen las causas subyacentes del glaucoma primario. La tensión intraocular aumentada es debida a la obstrucción del sistema de drenaje del humor acuoso. En el glaucoma crónico de ángulo abierto, la cámara anterior y sus estructuras anatómicas parecen normales, pero está impedido el drenaje del humor acuoso. En el glaucoma agudo o crónico de ángulo cerrado, la cámara anterior es poco profunda, el ángulo de filtración está estrechado y el iris puede obstruir la red trabecular a la entrada del canal de Schlemm. La dilatación de la pupila puede empujar la raíz del frente del iris contra el ángulo y puede producir el bloqueo pupilar y producir así un ataque agudo. Los ojos con ángulos de la cámara anterior estrechos están predispuestos a ataques de glaucoma de ángulo de cierre agudo de varios grados de gravedad.

El glaucoma secundario está causado por cualquier interferencia con la corriente de humor acuoso desde la cámara posterior a la cámara anterior y, posteriormente, al canal de Schlemm. La enfermedad inflamatoria del segmento anterior puede impedir el escape acuoso y causar una sinequia posterior completa en el iris abombado, y puede taponar el canal de drenaje con exudados. Otras causas comunes son tumores intraoculares, cataratas de larga evolución, oclusión de vena retiniana central, traumatismo del ojo, procedimientos operativos y hemorragia intraocular.

Considerando en conjunto todos los tipos, el glaucoma se presenta en aproximadamente 2% de todas las personas de más de 40 años y puede ser asintótico durante

años antes de que progrese a una pérdida rápida de la visión. En los casos en que no esté indicada la cirugía, los antagonistas tópicos de β -adrenorreceptores han sido los fármacos escogidos para el tratamiento del glaucoma.

Hoy en día se dispone comercialmente de ciertos eicosanoides y sus derivados para uso en el tratamiento del glaucoma. El grupo de eicosanoides y derivados incluye numerosos compuestos biológicamente importantes tales como prostaglandinas y sus derivados. Las prostaglandinas se pueden describir como derivados del ácido prostanoico que tienen la fórmula estructural siguiente:



Se conocen varios tipos de prostaglandinas, dependiendo de la estructura y sustituyentes presentes en el anillo alicíclico del esqueleto del ácido prostanoico. Una clasificación adicional está basada en el número de enlaces insaturados en la cadena lateral indicado por subíndices numéricos después del tipo genérico de la prostaglandina [por ejemplo, prostaglandina E_1 (PGE_1), prostaglandina E_2 (PGE_2)], y en la configuración de los sustituyentes en el anillo alicíclico, indicada por α o β [por ejemplo prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\beta}$)].

Las prostaglandinas se consideraron antes como potentes hipotensivos oculares, aunque la evidencia acumulada en la última década demuestra que algunas prostaglandinas son agentes hipotensivos oculares muy eficaces y que son idealmente adecuadas para el tratamiento médico a largo plazo del glaucoma (véase, por ejemplo, Bito, L.Z. Biological Protection with Prostaglandins, Cohen, M.M. , ed., Boca Raton, Fla, CRC Press Inc., 1985, págs. 231-252; y Bito, L.Z., Applied Pharmacology in the Medical Treatment of Glaucomas, Drance, S.M. y Neufel, A.H. eds. New York, Grune & Stratton, 1984, págs. 477-505. Entre tales prostaglandinas figuran $PGF_{2\alpha}$, $PGF_{1\alpha}$, PGE_2 , y ciertos ésteres liposolubles tales como ésteres de alquilo C_{1-2} , por ejemplo, éster de isopropilo, de tales compuestos.

Aunque todavía no se conoce el mecanismo preciso, los resultados experimentales indican que la reducción de la presión intraocular inducida por las prostaglandinas es resultado de un drenaje uveoescleral aumentado [Nilsson y otros, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (supl.), 284 (1987)].

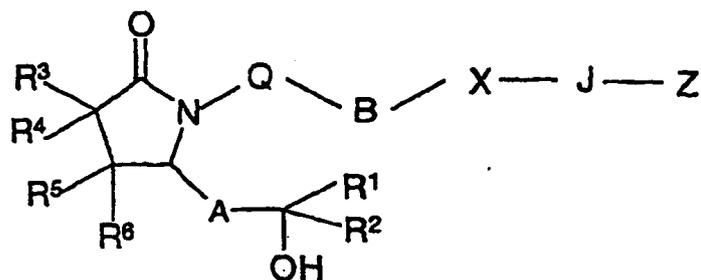
El éster isopropílico de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ha demostrado tener una potencia hipotensiva significativamente mayor que el compuesto madre, presumiblemente como resultado de su penetración más efectiva a través de la córnea. En 1987, este compuesto se describió como “el agente hipotensivo ocular más potente de los que se ha dado cuenta” [véase, por ejemplo, Bito, L.Z., Arch. Ophthalmol. 105, 1036 (1987) y Siebold y otros, Prodrug 53 (1989)].

Si bien las prostaglandinas parece que están exentas de efectos intraoculares secundarios significativos, la hiperemia de la superficie ocular (conjuntiva) y la sensación de cuerpos extraños se han asociado invariablemente con el uso ocular tópico de tales compuestos, en particular $\text{PGF}_{2\alpha}$ y sus fármacos, por ejemplo, su éster 1-isopropílico, en seres humanos. Los potenciales clínicos de las prostaglandinas en el tratamiento de afecciones asociadas con una presión ocular alta, por ejemplo, glaucoma, están notablemente limitados por estos efectos secundarios.

En una serie de solicitudes de patentes U.S. en tramitación con la presente cedidas a Allergan, Inc., se da cuenta de ésteres de prostaglandinas con una acrecentada actividad hipotensiva ocular no acompañada de efectos secundarios o con sólo efectos secundarios reducidos. El documento en tramitación con la presente USSN 596.430 (presentado el 10 de octubre de 1990, ahora patente U.S. 5.446.041) se refiere a ciertas 11-acil-prostaglandinas, tales como 11-pivaloilo, 11-acetilo, 11-isobutirilo, 11-valerilo y 11-isovalerilo. En la solicitud en tramitación con la presente USSN 175.476 (presentada el 29 de diciembre de 1993) se da cuenta de 15-acil-prostaglandinas que reducen la presión intraocular. Análogamente, se sabe que los diésteres 11, 15-9,15 y 9,11 de prostaglandinas, por ejemplo, 11,15-dipivaloil $\text{PGF}_{2\alpha}$, tienen actividad hipotensiva ocular. Véanse las solicitudes de patente en tramitación con la presente USSN n^{os}. 385.645 (presentada el 7 de julio de 1989, ahora patente U.S. 4.994.274), 584.370 (presentada el 18 de septiembre de 1990, ahora patente U.S. 5.028.624) y 585.284 (presentada el 18 de septiembre de 1990, ahora patente U.S. 5.034.413) El contenido de todas estas solicitudes de patente se incorpora aquí expresamente por referencia.

Los análogos de 8-azaprostaglandina se discuten en las solicitudes de patente PCT WO 01/46140 A1, WO 02/042268 A2, WO 02/24647 A1, WO 03/007941 A1, en EP 1 121 939 A2 y en la patente japonesa 2001-233792.

El documento WO 03/007941 A1 da a conocer un compuesto de fórmula I:



I

en la que:

Q es CH_2 u oxígeno,

B es $-\text{CH}_2-$, $-(\text{CH}_2)_2-$, $-(\text{CH}_2)_3-$, $-(\text{CH}_2)_4-$, $(\text{CH}_2)_5-$, $-\text{CH}=\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$,
 5 o $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$, con tal que, cuando B es $-\text{CH}=\text{CH}-$ o $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$, Q sea $-\text{CH}_2-$,

X es $-\text{NR}^8$, siendo R^8 hidrógeno, halógeno, alquilo C_{1-6} o acilo C_{1-6} ,

$-\text{O}-$,

$-\text{S}-$,

$-\text{SO}-$,

10 $-\text{SO}_2-$ o

un enlace simple, con tal que, cuando X es un enlace simple, Q sea oxígeno,

J es $-(\text{CR}^b\text{R}^c)_n-$ (en el que n es un número entero de 1 a 4, y R^b y R^c , ambos, son hidrógeno, o uno o dos de R^b y R^c son alquilo inferior y el resto hidrógeno, o R^b y R^c , si están unidos al mismo átomo de carbono, forman un grupo polimetileno C_{2-5} o $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$,

15 A es $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ o $-\text{C}\equiv\text{C}-$,

Z es CH_2OH , $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{C}(\text{O})\text{NSO}_2\text{R}'$, $-\text{P}$ alquilo C_{1-6} $(\text{O})(\text{OR}')$, $-\text{PO}(\text{OR}')_2$, o tetrazol-5-ilo, siendo R' y R'' , independientemente entre sí, hidrógeno o alquilo C_{1-6} ,

n es 1, 2, 3 o 4,

20 R^1 es $-(\text{CH}_2)_p\text{R}^7$ o $-(\text{CH}_2)_q\text{OR}^8$, siendo R^7 y R^8 , independientemente entre sí, alquilo C_{1-6} , haloalquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-8} , heterociclilo, arilo o heteroarilo,

p y q son, independientemente entre sí, 0, 1, 2, 3, 4 o 5,

R^2 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquenilo C_{1-6} o alquinilo C_{1-6} , y

R^3 , R^4 , R^5 y R^6 son, independientemente entre sí, hidrógeno o alquilo C_{1-6} ,

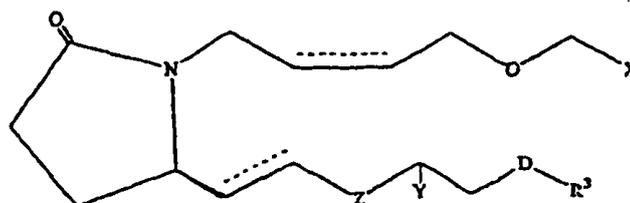
25 o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable, un profármaco, un isómero individual, una mezcla racémica o no racémica de isómeros del mismo.

Adicionalmente, este documento describe el compuesto específico ácido (4-(R)-2-[(S)-(E)-3-hidroxi-4-(3-trifluorometilfenil)-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il]-butoxi-acético.

Los documentos WO 00/38667, WO 02/102389 y WO 01/46140 describen derivados de prostaglandina que son útiles en el tratamiento del glaucoma.

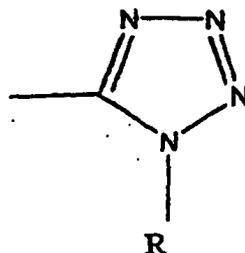
Sumario de la invención

5 La presente invención concierne a un compuesto de fórmula I para uso en un procedimiento para tratar la hipertensión ocular o glaucoma



10 en la que las líneas sombreadas con trazos paralelos representan la configuración α , un triángulo representa la configuración β , una línea ondulada representa la configuración α o la configuración β y una línea punteada representa la presencia o ausencia de un doble enlace, D representa un enlace covalente o CH_2 , O, S o NH,

X es CO_2R , CONR_2 , CH_2OR , P(O)(OR)_2 , CONRSO_2R , SONR_2 o



Y es



15

Z es CH_2 o un enlace covalente,

R es H o R^2 ,

R^1 es H, R^2 , fenilo o COR^2 ,

R^2 es alquilo o alquenilo inferior C_{1-5} y R^3 es clorofenilo.

20

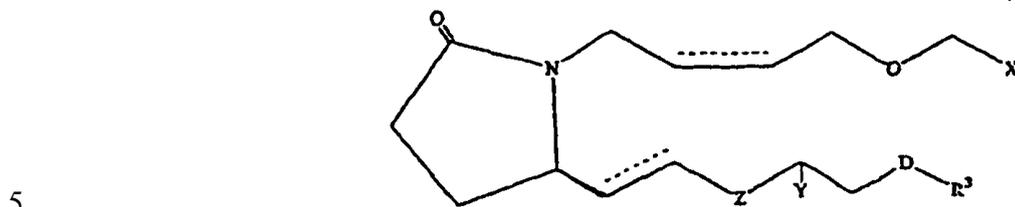
La presente invención también se refiere a compuestos de la fórmula I anterior.

Un producto farmacéutico puede comprender :

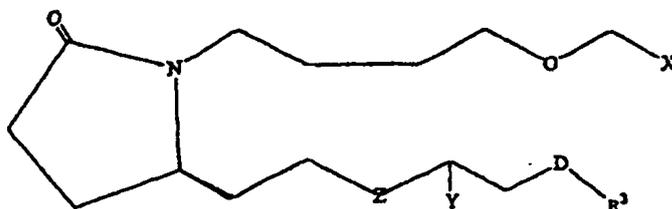
un recipiente adaptado para dispensar su contenido de forma medida y una solución oftálmica definida antes contenida en el recipiente.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al uso de análogos de 8-azaprostaglandina como agentes hipotensivos oculares. Los compuestos usados de acuerdo con la presente invención corresponden a la siguiente fórmula estructural:



El grupo preferido de los compuestos de la presente invención incluye compuestos que tienen la fórmula estructural II siguiente



En las fórmulas anteriores los sustituyentes y símbolos representan lo definido antes.

- 10 En las fórmulas anteriores:
preferiblemente, D representa un enlace covalente o es CH₂, más preferiblemente D es CH₂,
preferiblemente Z representa un enlace covalente,
preferiblemente, R es H o alquilo inferior C₁₋₅,
15 preferiblemente, R¹ es H,
preferiblemente, R³ es m-clorofenilo,
preferiblemente, X es CO₂R y, más preferiblemente, R se selecciona entre el grupo
constituido por H y metilo.

20 Los compuestos anteriores de la presente invención pueden prepararse por procedimientos conocidos en la técnica o de acuerdo con ejemplos de trabajo expuestos más adelante. Los compuestos siguientes son compuestos especialmente representativos de la presente invención.

Éster metílico del ácido (4-{(R)-2-}[(E)-4-(3-clorofenil)-3-oxo-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il)-butoxi)-acético,

- 25 Ácido (4-{(R)-2-}[(E)-4-(3-clorofenil)-3-oxo-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il)-butoxi)-acético,
Éster metílico del ácido (4-{(R)-2-[4-(3-clorofenil)-3-oxo-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il)-butoxi)-acético,

Ácido (4-{{R}}-2-[4-(3-clorofenil)-3-oxo-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-butoxi)-acético,
 Éster metílico del ácido (4-{{R}}-2-[4-(3-clorofenil)-3-hidroxi-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-
 butoxi)-acético,

5 Ácido (4-{{R}}-2-[4-(3-clorofenil)-3-hidroxi-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-butoxi)-acético,
 Éster metílico del ácido (4-{{R}}-2-[(E)-4-(3-clorofenil)-3-hidroxi-but-1-enil]-5-oxo-
 pirrolidin-1-il}-butoxi)-acético,

Ácido (4-{{R}}-2-[(E)-4-(3-clorofenil)-3-hidroxi-but1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-butoxi)-
 acético.

10 Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar combinando una cantidad
 terapéuticamente eficaz de como mínimo un compuesto de acuerdo con la presente invención,
 o una sal de adición de ácido del mismo farmacéuticamente aceptable, como ingrediente
 activo, con excipientes farmacéuticos convencionales oftálmicamente aceptables, y por
 preparación de formas farmacéuticas unitarias adecuadas para uso tópico ocular. La cantidad
 15 terapéuticamente eficaz típicamente está entre aproximadamente 0,0001 y aproximadamente
 5% (p/v), preferiblemente es de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1,0% (p/v) en
 formulaciones líquidas.

Para aplicación oftálmica, las soluciones se preparan preferiblemente usando una
 solución salina fisiológica como vehículo principal. Preferiblemente, el pH de tales soluciones
 oftálmicas se debe mantener entre 6,5 y 7,2 con un sistema tampón apropiado. Las soluciones
 20 pueden contener también conservantes, estabilizadores y tensioactivos farmacéuticamente
 aceptables.

Entre los conservantes preferidos que se pueden usar en las composiciones
 farmacéuticas de la presente invención figuran, no limitativamente, cloruro de benzalconio,
 clorobutanol, timerosal, acetato fenilmercúrico y nitrato fenilmercúrico. Un tensioactivo útil es,
 25 por ejemplo, Tween 80. Análogamente, en los preparados oftálmicos de la presente invención
 se pueden usar diversos vehículos útiles. Entre estos vehículos útiles figuran, no
 limitativamente, poli(alcohol vinílico), povidona, hidroxipropilmetilcelulosa, poloxámeros,
 carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa y agua purificada.

Si es necesario o conveniente, se pueden añadir agentes de ajuste de la tonicidad.
 30 Entre ellos figuran, no limitativamente, sales, en particular cloruro sódico, cloruro potásico;
 manitol y glicerina, o cualquier otro agente de ajuste de la tonicidad oftálmicamente adecuado.

Para ajustar el pH oftálmicamente aceptable se pueden usar varios tampones y medios
 siempre que el preparado resultante sea oftálmicamente aceptable. Consecuentemente, entre
 los tampones figuran tampones acetato, tampones citrato, tampones fosfato y tampones

borato. Si es necesario, se pueden usar ácidos o bases para ajustar el pH de estas formulaciones.

En una cuestión similar, entre un antioxidante oftálmicamente aceptable para uso en la presente invención figura, no limitativamente, metabisulfito sódico, tiosulfato sódico, acetilcisteína, hidroxianisol butilado e hidroxitolueno butilado.

Otros componentes excipientes que se pueden incluir en los preparados oftálmicos son agentes quelantes. Un agente quelante útil es edentato disódico, aunque también se pueden usar junto con él o sustituyéndolo otros agentes quelatantes.

Usualmente, los ingredientes se usan en las cantidades siguientes:

	<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad % p/v</u>
10	Ingrediente activo	aprox. 0,001-5
	Conservante	0-0,10
	Vehículo	0-40
	Agente de ajuste de la tonicidad	1-10
15	Tampón	0,01-10
	Agente de ajuste del pH	c.s.p. pH 4,5-7,5
	Antioxidante	según sea necesario
	Tensioactivo	según sea necesario
	Agua purificada	la necesaria para 100%

La dosis real de los compuestos activos depende del compuesto específico, y de la afección a tratar; la selección de la dosis apropiada corresponde al saber del especialista experto.

Las formulaciones oftálmicas de la presente invención se envasan convenientemente en formas adecuadas para aplicación en cantidades medidas, tales como recipientes equipado con un cuentagotas para facilitar la aplicación en el ojo. Los recipientes adecuados para aplicación por goteo usualmente se hacen de material plástico inerte adecuado, no tóxico, y generalmente contienen entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 15 ml de solución.

La invención se ilustra más con los siguientes Ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1

Éster metílico del ácido (4-((R)-2-[[E)-4-(3-clorofenil)-3-oxo-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il]-butoxi)-acético

Se añade hidruro sódico (20 mg, dispersión al 60% en aceite, 0,73 mmol) a una solución de éster dimetílico del ácido [3-(clorofenil)-2-oxopropil]-fosfónico (180 mg, 0,65 mmol) en THF (5 ml) a 0°C. La mezcla se envejece a t. a. durante 40 min y luego se vuelve a enfriar a

0°C. Se añade mediante una cánula una solución de éster metílico del ácido [4-(R)-(2-formil-5-oxo-pirrolidin-1-il)-butoxi]-acético (aprox. 0,72 mmol, en bruto, del procedimiento 1) en THF (2 ml). Se deja que la mezcla de reacción se caliente a t. a. y se deja envejecer durante 20 horas. Se añade luego ácido acético y agua (1:1, 20 ml) y la mezcla se somete a extracción con EtOAc (3 x 20 ml). Se combinan las fases orgánicas y la combinación se lava con solución acuosa saturada de NaHCO₃ (3 x 15 ml) y salmuera (30 ml), luego se seca (Na₂SO₄), se filtra y se concentra en vacío. El residuo se purifica por cromatografía rápida en columna (0% → 2% de MeOH/CH₂Cl₂) y luego por cromatografía preparativa en capa fina (5% de MeOH/CH₂Cl₂), obteniéndose 106 mg (40%) de éster metílico del ácido (4-{{(R)-2-}}[(E)-4-(3-clorofenil)-3-oxo-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-butoxi)-acético.

Ejemplo 2

Ácido (4-{{(R)-2-}}[(E)-4-(3-clorofenil)-3-oxo-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-butoxi)-acético,

Se agitó a t. a. durante 18 h una mezcla de éster metílico del ácido (4-{{(R)-2-}}[(E)-4-(3-clorofenil)-3-oxo-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-butoxi)-acético (2,4 mg, 0,006 mmol), esterasa de hígado de conejo (1 mg, 134 unidades/mg), tampón fosfato de pH 7,2 (2,5 ml) y acetonitrilo (0,1 ml). Luego se añadió acetonitrilo (5 ml) y la mezcla se concentró en vacío a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (0% → 10% de MeOH/CH₂Cl₂), obteniéndose 1,1 mg (47%) de ácido (4-{{(R)-2-}}[(E)-4-(3-clorofenil)-3-oxo-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-butoxi)-acético.

Ejemplo 3

Éster metílico del ácido (4-{{(R)-2-}}[4-(3-clorofenil)-3-oxo-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-butoxi)-acético

Se añadió Pd/C (6 mg, 10% en peso) a una solución de éster metílico del ácido (4-{{(R)-2-}}[(E)-4-(3-clorofenil)-3-oxo-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-butoxi)-acético (59 mg, 0,14 mmol) en metanol (2 ml). La mezcla de reacción se sometió a vacío y se volvió a llenar con hidrógeno (3 x) y luego se agitó a t. a. bajo un globo de hidrógeno durante 3,5 h. La mezcla de reacción se filtró a través de celita y se lavó con metanol (5 ml). Se concentró el filtrado en vacío, obteniéndose 59 mg (99%) de éster metílico del ácido (4-{{(R)-2-}}[4-(3-clorofenil)-3-oxo-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-butoxi)-acético.

Ejemplo 4

Ácido (4-{{(R)-2-}}[4-(3-clorofenil)-3-oxo-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-butoxi)-acético

Se agitó a t. a. durante 16,5 h una mezcla de éster metílico del ácido (4-{{(R)-2-}}[4-(3-clorofenil)-3-oxo-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-butoxi)-acético (8,1 mg, 0,02 mmol), esterasa de hígado de conejo (1 mg, 134 unidades/mg), tampón fosfato de pH 7,2 (3 ml) y acetonitrilo (0,1 ml). Se añadió HCl acuoso (0,5 M, 5 ml) y la mezcla se sometió a extracción con CH₂Cl₂ (3 x 5

ml). Se combinaron las fases orgánicas y la combinación se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró en vacío, obteniéndose 1,6 mg (20%) de ácido (4-((R)-2-[4-(3-clorofenil)-3-oxo-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il)-butoxi)-acético.

Ejemplo 5

5 Éster metílico del ácido (4-((R)-2-[4-(3-clorofenil)-3-hidroxi-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il)-butoxi)-acético

Se añadió borohidruro sódico (4,1 mg, 0,11 mmol) a una solución de éster metílico del ácido (4-((R)-2-[4-(3-clorofenil)-3-oxo-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il)-butoxi)-acético (44 mg, 0,11 mmol) en CH_2Cl_2 (1 ml) a t. a. Se añadió metanol (3 gotas) y la mezcla de reacción se agitó a t. a. durante 4,5 h. Se añadió HCl acuoso (0,5 M, 5 ml) y la mezcla se sometió a extracción con CH_2Cl_2 (2 x 8 ml). Se combinaron las fases orgánicas y la combinación se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró en vacío. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (0% → 3% de $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$), obteniéndose 0,1 mg (21%) de éster metílico del ácido (4-((R)-2-[4-(3-clorofenil)-3-hidroxi-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il)-butoxi)-acético.

15 Ejemplo 6

Ácido (4-((R)-2-[4-(3-clorofenil)-3-hidroxi-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il)-butoxi)-acético.

Se añadió hidróxido de litio acuoso (1,0 N, 0,04 ml) a una solución de éster metílico del ácido (4-((R)-2-[4-(3-clorofenil)-3-hidroxi-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il)-butoxi)-acético (15 mg, 0,036 mmol) en THF (0,5 ml) a t. a. Después de 1 h se añadió HCl (1,0 N, 3 ml) y la mezcla se sometió a extracción con CH_2Cl_2 (3 x 5 ml). Se combinaron las fases orgánicas y la combinación se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró en vacío. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (0% → 3% de $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$), obteniéndose 6,3 mg (43%) de ácido (4-((R)-2-[4-(3-clorofenil)-3-hidroxi-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il)-butoxi)-acético.

Ejemplo 7

25 Éster metílico del ácido (4-((R)-2-[(E)-4-(3-clorofenil)-3-hidroxi-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il)-butoxi)-acético

Se añadió borohidruro sódico (4,3 mg, 0,11 mmol) a una solución de éster metílico del ácido (4-((R)-2-[(E)-4-(3-clorofenil)-3-oxo-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il)-butoxi)-acético (42 mg, 0,10 mmol) en CH_2Cl_2 (1 ml) a 0°C. Se añadió metanol (3 gotas) y la mezcla de reacción se agitó a t. a. durante 3 h. Se añadió HCl acuoso (0,5 M, 5 ml) y la mezcla se sometió a extracción con CH_2Cl_2 (3 x 5 ml). Se combinaron las fases orgánicas y la combinación se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró en vacío. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (0% → 5% de $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$), obteniéndose 31 mg (73%) de éster metílico del ácido (4-((R)-2-[(E)-4-(3-clorofenil)-3-hidroxi-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il)-butoxi)-acético.

Ejemplo 8

Ácido (4-{(R)-2-[(E)-4-(3-clorofenil)-3-hidroxi-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-butoxi)-acético

Se añadió hidróxido de litio acuoso (1,0 N, 0,04 ml) a una solución de éster metílico del ácido (4-{(R)-2-[(E)-4-(3-clorofenil)-3-hidroxi-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-butoxi)-acético (16 mg, 0,039 mmol) en THF (0,25 ml) a t. a. Después de 1 h se añadió HCl (0,5 N, 3 ml) y la mezcla se sometió a extracción con EtOAc (2 x 5 ml). Se combinaron las fases orgánicas y la combinación se lavó con salmuera (10 ml), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró en vacío, obteniéndose 15 mg (97%) de ácido (4-{(R)-2-[(E)-4-(3-clorofenil)-3-hidroxi-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-butoxi)-acético.

10 Procedimiento 1

Éster metílico del ácido [4-(R)-(2-formil-5-oxo-pirrolidin-1-il)-butoxi]-acético

Etapa 1: Éster metílico del ácido (4-hidroxi-butoxi)-acético

Se añadió hidruro sódico (4,44 g, dispersión al 60% en aceite, 111 mmol) a una solución de 1,4-butanodiol (10,0 g, 111 mmol) en THF (200 ml). Después de agitar durante 1 h a t. a.,m la mezcla se enfrió a 0°C y se añadió bromometilacetato de metilo (10,82 ml, 114 mmol) y se dejó que la mezcla de reacción se calentara a temperatura ambiente. Después de 16 horas se añadió agua (100 ml) y la mezcla se sometió a extracción con EtOAc (3 x 100 ml). La combinación de las fases orgánicas se lavó con salmuera (2 x 100 ml), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró en vacío. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (10% → 30% de EtOAc/hexano), obteniéndose 2,88 g (16%) de éster metílico del ácido (4-hidroxi-butoxi)-acético como un aceite incoloro.

Etapa 2: Éster metílico del ácido (4-bromo-butoxi)-acético

A una solución de éster metílico del ácido (4-hidroxi-butoxi)-acético (2,88 g, 17,8 mmol) en CH₂Cl₂ (15 ml) a 0°C bajo nitrógeno se añadieron sucesivamente trifenilfosfina (5,59 g, 21,3 mmol), bromo (1,1 ml, 21,5 mmol) e imidazol (1,41 g, 20,7 mmol). Después de 1 h la mezcla se filtró a través de alúmina básica, se enjuagó con 5% de EtOAc/hexano (40 ml). Se concentró el filtrado y el residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (0% → 20% de EtOAc/hexano), obteniéndose 2,02 g (51%) de éster metílico del ácido (4-bromo-butoxi)-acético como un aceite incoloro.

30 *Etapa 3:* Éster metílico del ácido {4-[(R)-2-(t-butildimetilsilaniloximetil)-5-oxo-pirrolidin-1-il]-butoxi}-acético

Se añadió hidruro sódico (192 mg, dispersión al 60% en aceite, 4,8 mmol) a una solución de 5-(t-butildimetilsilaniloximetil)-pirrolidin-2-ona (1,0 g, 4,4 mmol) en DMF (8 ml). Después de agitar durante 1 h a t. a., se añadió una solución de éster metílico del ácido (4-bromobutoxi)-acético (1,08 mg, 4,8 mmol) en DMF (4 ml). La mezcla resultante se calentó a

90°C durante 18 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y luego se añadió agua, y la mezcla se sometió a extracción con EtOAc (3 x 50 ml). La combinación de las fases orgánicas se lavó con salmuera (100 ml), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró en vacío. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (0% → 20% de EtOAc/CH₂Cl₂), obteniéndose 758 mg de una mezcla de material de partida y éster metílico del ácido {4-[(R)-2-(t-butildimetilsilaniloximetil)-5-oxo-pirrolidin-1-il]-butoxi}-acético, que se usó en la etapa siguiente sin purificarlo más.

Etapa 4: Éster metílico del ácido [4-(R)-2-hidroximetil-5-oxo-pirrolidin-1-il]-butoxi}-acético

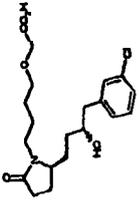
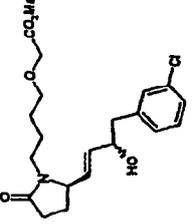
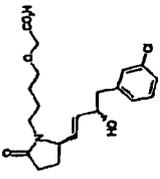
Se añadió fluoruro de tetrabutilamonio (3,0 ml, 1,0 M en THF, 3,0 mmol) a una solución de éster metílico del ácido {4-[(R)-2-(t-butildimetilsilaniloximetil)-5-oxo-pirrolidin-1-il]-butoxi}-acético impuro (758 mg, aprox. 1,98 mmol) en THF (3 ml) a 0°C bajo nitrógeno. Se dejó que la mezcla de reacción se calentara a t.a. y se envejeció durante 18 h. Se eliminó en vacío el THF, se añadió solución acuosa saturada de NaHCO₃ (50 ml) y la mezcla se sometió a extracción con CHCl₃ (2 x 30 ml). Se combinaron las fases orgánicas y la combinación se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró en vacío. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (0% → 3% de MeOH/CH₂Cl₂), obteniéndose 188 mg (17% en dos etapas) de éster metílico del ácido [4-(R)-2-hidroximetil-5-oxo-pirrolidin-1-il]-butoxi}-acético.

Etapa 5: Éster metílico del ácido [4-(R)-(2-formil-5-oxo-pirrolidin-1-il)-butoxi]-acético

Se añadió hidrocloreuro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (412 mg, 2,15 mmol) y DMSO (0,20 ml, 2,42 mmol) a una solución de éster metílico del ácido [4-(R)-2-hidroximetil-5-oxo-pirrolidin-1-il]-butoxi}-acético (185 mg, 0,72 mmol) en benceno (5 ml). La mezcla se enfrió a 0°C y luego se añadió trifluoroacetato de piridinio (153 mg, 0,79 mmol). La mezcla de reacción se envejeció a 0°C durante 3 min y luego a t. a. durante 2 h. Se decantó la solución del aceite y el residuo oleoso se lavó con benceno (3 x 4 ml). La fase combinada de benceno se concentró en vacío, obteniéndose el compuesto del título que se usó sin purificarlo más.

Se ensayaron estos compuestos en cuanto a su actividad in vitro como se describe más adelante y los resultados se dan en las Tablas.

Ejemplo nº.	Estructura	Datos de unión (Cl ₅₀ en nM)			Datos funcionales (CE ₅₀ en nM)							
		hEP2	hEP3D	hEP4	hFP	hEP1	hEP2	hEP3A	hEP4	hTP	hIP	hDP
1		NT	NT	NT	NA	721	NA	NA	61	NA	NA	NT
2		NA	NT	>10000	NA	NA	>10000	NA	<10000	NA	NA	NT
3		NT	NT	NT	NA	NA	NA	>10000	>10000	NA	NA	NT
4		NA	NT	3100	NA	NA	NA	1722	>10000	NA	NA	NT
5		NT	NT	NT	NA	>10000	NA	1778	NA	NA	NA	NT

Ejemplo nº	Estructura	Datos de unión (C ₁₅₀ en nM)				Datos funcionales (C _{E50} en nM)						
		hEP2	hEP3D	hEP4	hFP	hEP1	hEP2	hEP3A	hEP4	hTP	hIP	hDP
6		NA	NT	562	NA	3808	NA	192	>10000	NA	NT	
7		NT	NT	NT	NA	NA	<10000	NA	NA	NA	NT	
8		NA	NA	30	NA	NA	11	>10000	NA	NA	NT	
	NA = no activo											
	NT = no ensayado											

RECEPTORES RECOMBINANTES HUMANOS EP₁, EP₂, EP₃, EP₄, FP, TP, IP Y DP: TRANSFECTANTES ESTABLES.

Se prepararon plásmidos que codifican los receptores humanos EP₁, EP₂, EP₃, EP₄, FP, TP, IP y DP por clonación de las secuencias de codificación respectivas en el vector de expresión eucariótica pCEP4 (Invitrogen). El vector pCEP4 contiene un virus Epstein Barr (EBV) origen de replicación que permite la replicación episomal en líneas de células de primate que expresan antígeno nuclear de EBV (EBNA-1). También contiene un gen de resistencia a higromicina que se usa para selección eucariótica. Las células empleadas para transfección estable fueron células de riñón embrionicas humanas (HEK-293) que se transfectaron con y expresan la proteína EBNA-1. Estas células HEK-293-EBNA (Invitrogen) se hicieron crecer en un medio que contenía Genaticin (G418) para mantener la expresión de la proteína EBNA-1. Las células HEK-293 crecieron en DMEM con 10% de suero fetal bovino (FBS), 250 µg/ml de G418 (Life Technologies) y 200 µg/ml de gentamicina o penicilina/estreptomicina. La selección de transfectantes estables se realizó con 200 µg/ml de higromicina, determinándose la concentración óptima por estudios previos de curvas de higromicina letal.

Para la transfección, las células se hicieron crecer a 50-60% de confluencia en placas de 10 cm. Se añadió a 500 µl de CaCl₂ 250 mM el plásmido pCEP4 que incorpora insertos de ADNc para el respectivo receptor prostanoide humano. Luego se añadió a gotas hasta un total de 500 µl solución salina tampón de HEPES x 2 (2 x HBS, NaCl 280 mM, ácido HEPES 20 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM, pH 7,05-7,12) agitando con vórtex continuamente a temperatura ambiente. Después de 30 min se añadieron a la mezcla 9 ml de DMEM. Se añadió luego la mezcla de ADN/DMEM/fosfato cálcico a las células, que previamente se habían enjuagado con 10 ml de PBS. Luego se incubaron las células durante 5 h a 37°C en 95% de aire humidificado/5% de CO₂. Se eliminó la solución de fosfato cálcico y las células se trataron con glicerol al 10% en DMEM durante 2 min. La solución de glicerol se reemplazó luego con DMEM con 10% de FBS. Se incubaron las células durante la noche y se reemplazó el medio con DMEM/10% de FBS que contenía 250 µg/ml de G418 y penicilina/estreptomicina. Al día siguiente se añadió higromicina B a una concentración final de 200 µg/ml.

Diez días después de la transfección, se seleccionaron individualmente clones resistentes a higromicina B y se transfirieron a un pocillo separado en una placa de 24 pocillos. A la confluencia, cada clon se pasó a un pocillo de una placa de 6 pocillos y luego se expandió en una placa de 10 cm. Las placas se mantuvieron hasta su uso bajo selección continua de higromicina.

UNIÓN DE RADIOLIGANDO

Se realizaron como sigue estudios de unión de radioligando en fracciones de membrana de plasma preparadas para células transfectadas establemente con un receptor humano o de gato. Se extrajeron del fondo de los matraces células lavadas con tampón TME y se
5 homogeneizaron durante 30 s usando un instrumento Brinkman PT 10/35 polytron. Se añadió tampón TME según era necesario para conseguir un volumen de 40 ml en los tubos de centrifugación. El TME comprende una base de TRIS 50 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM; el pH 7,4 se logra añadiendo HCl 1N. El homogeneizado de células se centrifugó a 19.000 rpm durante 20-25 min usando un rotor Beckman Ti-60 o un rotor T τ -70. La pella se vuelve a poner
10 en suspensión en tampón TME obteniéndose una concentración final de proteína de 1 mg/ml, según determinación efectuada por ensayo de Bio-Rad. Los ensayos de unión de radioligando se realizaron en un volumen de 100 o 200 μ l.

La unión de [³H](N)PGE₂ (actividad específica 165 Ci/mmol) se determinó por duplicado y en al menos 3 experimentos separados. Las incubaciones fueron durante 60 min a 25°C y se
15 terminaron añadiendo 4 ml de TRIS-HCl 50 mM enfriado con hielo y filtrando seguidamente, rápidamente, a través de filtros Whatman GF/B y con tres lavados adicionales de 4 ml en un cosechador de células (Brandel). Se realizaron estudios de competición usando una concentración final de 2,5 o 5 nM de [³H](N)PGE₂ y la unión no específica se determinó con PGE₂ 10⁻⁵ M no marcado.

Para la unión de radioligando en transfectantes transitorios, la preparación de la fracción de membrana de plasma fue como sigue: se lavaron con tampón TME células COS-7, se
20 sacaron del fondo de los matraces y se homogeneizaron durante 30 s usando un Brinkman PT 10/35 polytron. Se añadió tampón TME para conseguir un volumen final de 40 ml en los tubos de la centrifugadora. La composición de TME es TRIS 100 mM de base, MgCl₂ 20 mM, EDTA 2 M; se añade HCl 10 N para conseguir un pH de 7,4.

Los homogeneizados de células se centrifugaron a 19000 rpm durante 20 min a 4°C usando un rotor Beckman Ti-60. La pella resultante se volvió a poner en suspensión en tampón TME, obteniéndose una concentración final de proteína de 1 mg/ml, según determinación por
ensayo Biorad. Los ensayos de unión de radioligando se realizaron en un volumen de 200 μ l.

La unión de [³H]PGE₂ (actividad específica 165 Ci 0 mmol⁻¹) a EP_{3D}, receptores y [³H]-SQ29548 (actividad específica 41,5 Ci mmol⁻¹) en receptores TP se determinaron por duplicado en al menos tres experimentos separados. El PGE₂ radiomarcado se compró a Amersham, SQ29548 se compró a New England Nuclear. Las incubaciones se realizaron durante 60 min a
25°C y se terminaron añadiendo 4 ml de TRIS-HCl 50 mM enfriado con hielo, filtrando
35 seguidamente, rápidamente, a través de filtros Whatman GF/B, con tres lavados adicionales

de 4 ml en un cosechador de células (Brandel). Los estudios de competición se realizaron usando una concentración final de 2,5 o 5 nM de [³H]PGE₂ o [³H]-SQ29548 10 nM y la unión no específica se determinó usando una concentración final de 10 μM del respectivo prostanoides no marcado. Para todos los estudios de unión de radioligando, los criterios de inclusión fueron > 50% de unión específica y entre 500 y 1000 de recuentos específicos desplazables o mejor.

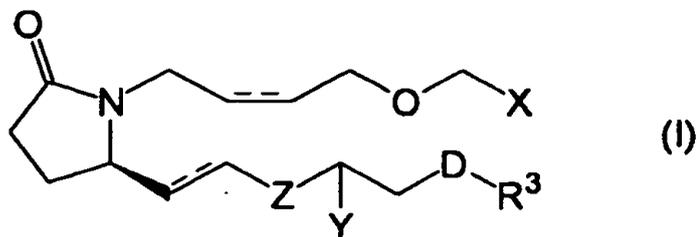
Los efectos de los compuestos de esta invención sobre la presión intraocular se pueden medir como sigue. Los compuestos se preparan a las concentraciones deseadas en un vehículo que comprende 0,1% de polisorbato 80 y base TRIS 10 mM. Los perros se tratan administrando 25 μl a la superficie ocular, el ojo del otro lado recibe vehículo como control. La presión intraocular se mide por pneumatonometría por aplanamiento. Una dosis típica de una vez al día de ácido (4-((R)-2-((E)-4-(3-clorofenil)-3-hidroxi-but-1-enil)-5-oxo-pirrolidin-1-il)-butoxi)-acético [Ejemplo 8] dio una disminución de IOP máxima de la línea de base de 4,9 mm de Hg (26,6%) a las 52 h en perros normotensivos (n=8). La puntuación de la hiperemia de la superficie ocular máxima fue de 1,5 (1,5 a 26, 50 y 52 h).

Algunos de los compuestos de esta invención son útiles para rebajar una tensión intraocular elevada en mamíferos, por ejemplo seres humanos, y en el tratamiento de otras enfermedades y afecciones que responden a análogos de prostaglandina, por ejemplo, glaucoma, accidente cardiovascular, por ejemplo, infarto agudo de miocardio, trombosis vascular, hipertensión, hipertensión pulmonar, enfermedad cardíaca isquémica, fallo cardíaco congestivo y angina de pecho; enfermedades pulmonar-respiratorias, gastrointestinales; enfermedades de la reproducción y alérgicas, osteoporosis y colapso.

La descripción anterior detalla procedimientos específicos y composiciones que se pueden emplear en la práctica de la presente invención y representa el mejor modo contemplado. Si embargo, es evidente para un experto de cualificación normal en la técnica que se pueden preparar de manera análoga otros compuestos con las propiedades farmacológicas deseadas y que los compuestos descritos también se pueden obtener a partir de materiales diferentes mediante reacciones químicas diferentes. Análogamente, se pueden preparar y usar composiciones farmacéuticas diferentes con sustancialmente el mismo resultado.

REIVINDICACIONES

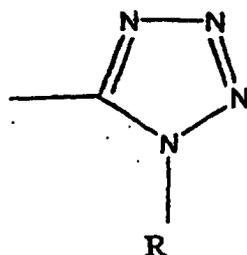
1. Un compuesto representado por la fórmula general (I) para uso en un procedimiento para tratar la hipertensión ocular o el glaucoma:



5 (I)

en la que las líneas sombreadas con trazos paralelos representan la configuración α , un triángulo representa la configuración β , una línea ondulada representa la configuración α o la configuración β y una línea a trazos separados representa la presencia o ausencia de un doble enlace,

10 D representa un enlace covalente o CH₂, O, S o NH,
X es CO₂R, CONR₂, CH₂OR, P(O)(OR)₂, CONRSO₂R, SONR₂ o

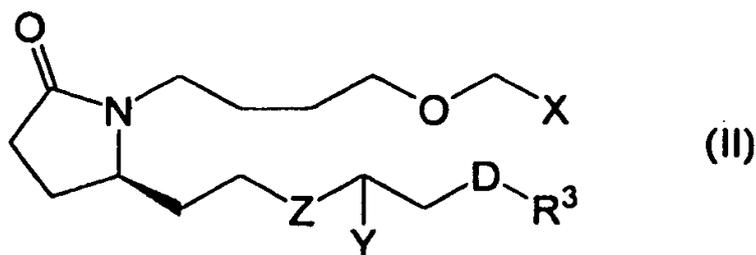


Y es



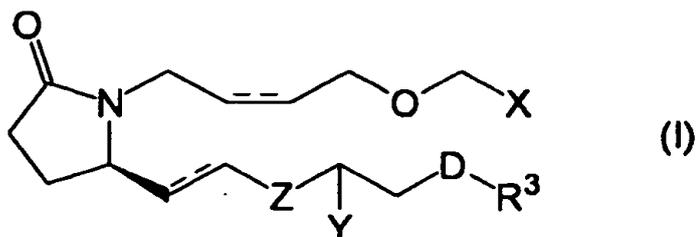
15 Z es CH₂ o un enlace covalente,
R es H o R²,
R¹ es H, R², fenilo o COR²,
R² es alquilo o alqueniilo inferior C₁₋₅ y R³ es clorofenilo.

20 2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que está representado por la fórmula general II:



3. El compuesto de la reivindicación 1 en el que Z representa un enlace covalente.
4. El compuesto de la reivindicación 1 en el que D es CH₂.
5. El compuesto de la reivindicación 1 en el que X es CO₂R.
- 5 6. El compuesto de la reivindicación 5 en el que R se selecciona entre el grupo constituido por H y etilo.

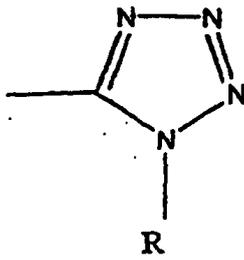
7. El compuesto de la reivindicación 5 en el que R es H o alquilo C₁₋₅.
8. El compuesto de la reivindicación 1 en el que R₁ es H.
- 10 9. El compuesto de la reivindicación 1 compuesto que se selecciona entre
 Ácido (4-{(R)-2-[4-(3-clorofenil)-3-hidroxi-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-butoxi)-acético y
 Ácido (4-{(R)-2-[(E)-4-(3-clorofenil)-3-hidroxi-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-butoxi)-
 acético.
10. El compuesto de la reivindicación 5 en el que R se selecciona entre el grupo constituido
 15 por H y etilo.
11. El compuesto de la reivindicación 5 en el que R es H o alquilo C₁₋₅.
12. Un compuesto representado por la fórmula general (I):



20 en la que las líneas sombreadas con trazos paralelos representan la configuración α , un triángulo representa la configuración β , una línea ondulada representa la configuración α o la configuración β y una línea a trazos separados representa la presencia o ausencia de un doble enlace,

D representa un enlace covalente o CH₂, O, S o NH,

X es CO₂R, CONR₂, CH₂OR, P(O)(OR)₂, CONRSO₂R, SONR₂ o



Y es



5

Z es CH₂ o un enlace covalente,

R es H o R²,

R¹ es H, R², fenilo o COR²,

R² es alquilo o alquenilo inferior C₁₋₅ y R³ es clorofenilo.