

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 515 217**

51 Int. Cl.:

A61K 31/557 (2006.01)

A61P 27/06 (2006.01)

A61K 31/5575 (2006.01)

C07C 405/00 (2006.01)

C07D 333/56 (2006.01)

C07D 333/62 (2006.01)

C07D 409/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2004 E 10178294 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 2263674**

54 Título: **Derivados del ácido 10,10-dialquil-prostanoico como agentes para disminuir la presión intraocular**

30 Prioridad:

11.02.2003 US 365369

04.02.2004 US 772720

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

29.10.2014

73 Titular/es:

ALLERGAN, INC. (100.0%)

**2525 Dupont Drive
Irvine, CA 92612, US**

72 Inventor/es:

**DONDE, YARIV y
NGUYEN, JEREMIAH H.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 515 217 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 del ácido 10,10-dialquil-prostanoico como agentes para disminuir la presión intraocular

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a un método para fabricar ciertos derivados del ácido prostanoico, como se define en la reivindicación 1. Estos son hipotensores oculares potentes que son particularmente adecuados para la gestión del glaucoma.

Antecedentes de la Invención**Descripción de la Técnica Relacionada**

10 Los agentes hipotensores oculares son útiles en el tratamiento de un número de varias afecciones hipertensoras oculares, tales como episodios de hipertensión ocular de trabeculectomía post-quirúrgica y post-láser, glaucoma y como adyuvantes pre-quirúrgicos.

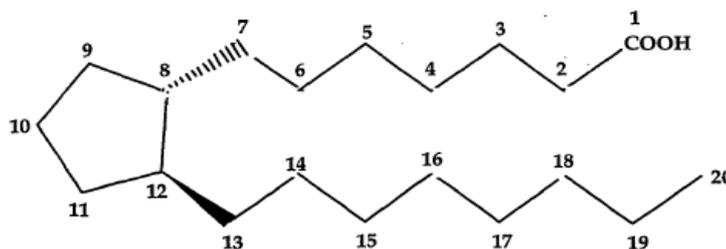
15 El glaucoma es una enfermedad del ojo caracterizada por una presión intraocular incrementada. Tomando como base su etiología, el glaucoma se ha clasificado como primario o secundario. Por ejemplo, el glaucoma primario en adultos (glaucoma congénito) puede ser o de ángulo abierto o de ángulo cerrado agudo o crónico. El glaucoma secundario resulta de enfermedades oculares pre-existentes tales como uveítis, tumor intraocular o una catarata dilatada.

20 Las causas subyacentes del glaucoma primario no se conocen todavía. La tensión intraocular incrementada se debe a la obstrucción del flujo de salida del humor acuoso. En el glaucoma de ángulo abierto crónico, la cámara anterior y sus estructuras anatómicas parecen normales, pero el drenaje del humor acuoso está obstaculizado. En el glaucoma de ángulo cerrado agudo o crónico, la cámara anterior es poco profunda, el ángulo de filtración es estrecho, y el iris puede obstruir la red trabecular en la entrada del canal de Schlemm. La dilatación de la pupila puede empujar la raíz del iris hacia delante contra el ángulo y puede producir bloqueo pupilar y así precipitar un ataque agudo. Los ojos con ángulos de la cámara anterior estrechos están predispuestos a ataques de glaucoma de ángulo cerrado agudo de varios grados de gravedad.

25 El glaucoma secundario está causado por cualquier interferencia con el flujo del humor acuoso desde la cámara posterior a la cámara anterior y posteriormente, en el canal de Schlemm. La enfermedad inflamatoria del segmento anterior puede prevenir el escape acuoso causando una sinequia posterior completa en iris bombé y puede taponar el canal de drenaje con exudados. Otras causas comunes son tumores intraoculares, cataratas dilatadas, oclusión de la vena retiniana central, traumatismo en el ojo, procedimientos operatorios y hemorragia intraocular.

30 Considerando todos los tipos conjuntamente, el glaucoma ocurre en aproximadamente el 2% de todas las personas mayores de 40 años y puede ser asintomático durante años antes de progresar a la pérdida rápida de la visión. En los casos en los que la cirugía no está indicada, los antagonistas tópicos del adrenergico han sido tradicionalmente los fármacos de elección para tratar el glaucoma.

35 Se ha indicado que determinados eicosanoides y sus derivados poseen actividad hipotensora ocular y se han recomendado para usarse en la gestión del glaucoma. Los eicosanoides y derivados incluyen numerosos compuestos biológicamente importantes tales como prostaglandinas y sus derivados. Las prostaglandinas pueden describirse como derivados del ácido prostanoico que tienen la fórmula estructural siguiente:



40 Se conocen varios tipos de prostaglandinas, dependiendo de la estructura y sustituyentes portados en el anillo alicíclico del esqueleto del ácido prostanoico. La clasificación adicional se basa en el número de enlaces insaturados en la cadena lateral indicado por los subíndices numéricos después del tipo genérico de prostaglandina [por ejemplo, prostaglandina E₁ (PGE₁), prostaglandina E₂ (PGE₂)], y en la configuración de los sustituyentes en el anillo alicíclico indicada por α o β [por ejemplo, prostaglandina F_{2 α} (PGF_{2 β})].

Las prostaglandinas se consideraron en principio como hipertensores oculares potentes, sin embargo, la evidencia acumulada en la última década muestra que algunas prostaglandinas son agentes hipotensores oculares altamente eficaces y que son idealmente adecuados para la gestión médica a largo plazo del glaucoma (véase, por ejemplo, Bito, L.Z. Biological Protection with Prostaglandins, Cohen, M.M., ed., Boca Ratón, Fla, CRC Press Inc., 1985, p. 231-252; y Bito, L.Z., Applied Pharmacology in the Medical Treatment of Glaucomas Drance, S.M., y Neufeld, A.H., eds., Nueva York, Grune y Stratton, 1984, p. 477-505. Dichas prostaglandinas incluyen $\text{PGF}_{2\alpha}$, $\text{PGF}_{1\alpha}$, PGE_2 y determinados ésteres solubles en lípidos, tales como ésteres de alquilo C_1 a C_2 , por ejemplo, éster 1-isopropílico, de dichos compuestos.

Aunque el mecanismo preciso todavía no se conoce los resultados experimentales indican que la reducción inducida por las prostaglandinas de la presión intraocular resulta del flujo de salida uveoescleral incrementado [Nilsson et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (supl.), 284 (1987)].

Se ha mostrado que el éster isopropílico de $\text{PGF}_{2\alpha}$ tiene una potencia hipotensora significativamente mayor que el compuesto parental, presumiblemente como resultado de su penetración más eficaz a través de la córnea. En 1987, este compuesto se describió como "el agente hipotensor ocular más potente jamás descrito" [véase, por ejemplo, Bito, L.Z., Arch. Ophthalmol. 105, 1036 (1987), y Siebold et al., Prodrug 5 3 (1989)].

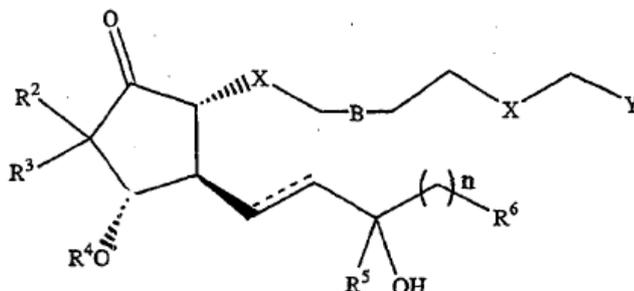
Mientras que las prostaglandinas parecen carecer de efectos secundarios intraoculares significativos, la hiperemia de la superficie ocular (conjuntiva) y la sensación de cuerpo extraño se han asociado de manera consistente con el uso ocular tópico de dichos compuestos, en particular $\text{PGF}_{2\alpha}$ y sus profármacos, por ejemplo, su éster 1-isopropílico, en los seres humanos. Los potenciales clínicos de las prostaglandinas en la gestión de las afecciones asociadas con la presión ocular incrementada, por ejemplo el glaucoma, están muy limitados por estos efectos secundarios.

En una serie de solicitudes de patente de los Estados Unidos en tramitación con la presente asignadas a Allergan, Inc., se describen ésteres de prostaglandinas con actividad hipotensora ocular incrementada acompañada de ausencia de o reducción sustancial de efectos secundarios. USSN 596.430 en tramitación con la presente (presentada el 10 de octubre de 1990, ahora Patente U.S. 5.446.041), se refiere a determinadas 11-acil-prostaglandinas, tales como 11-pivaloil, 11-acetil, 11-isobutiril, 11-valeril y 11-isovaleril $\text{PGF}_{2\alpha}$. Las 15-acil prostaglandinas que reducen la presión intraocular se describen en la solicitud en tramitación con la presente USSN 175.476 (presentada el 29 de diciembre de 1993). De manera similar, se sabe que los 11,15-, 9,15- y 9-11-diésteres de prostaglandinas, por ejemplo, 11,15-dipivaloil $\text{PGF}_{2\alpha}$ tienen actividad hipotensora ocular. Véanse las solicitudes de patente USSN en tramitación con la presente Nos. 385.645 (presentada el 07 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). Recientemente, también se ha mostrado que los compuestos 17-naftil y benzotienil prostaglandina también tienen actividad hipotensora ocular (USSN 859.770, presentada el 17 de mayo de 2001). Las descripciones de todas estas solicitudes de patente se incorporan por lo tanto expresamente por referencia.

Se sabe que determinadas 15,15-dimetil prostaglandinas con propiedades antihipertensoras, de inhibición de la secreción de ácido gástrico y estimulantes del músculo liso, tienen una estabilidad metabólica mejorada. Éstas se describen por Pernet et al en la Patente U.S. 4.117.014 (presentada el 23 de diciembre de 1976), cuya descripción se incorpora por lo tanto expresamente por referencia.

Compendio de la Invención

La presente invención se refiere a un método para hacer un compuesto de Fórmula V, como se define en la reivindicación 1.



Fórmula V

40

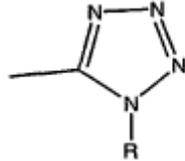
en la que la línea discontinua indica la presencia o ausencia de un enlace, la cuña rayada indica la configuración α (abajo) y el triángulo lleno indica la configuración β (arriba);

B es un enlace covalente simple, doble o triple;

n es 0-6;

5 X es CH₂, S o O;

Y es cualquier sal farmacéuticamente aceptable de CO₂H o CO₂R, CONR₂, CONHCH₂CH₂OH, CON(CH₂CH₂OH)₂, CH₂OR, P(O)(OR)₂, CONRSO₂R, SONR₂, o



R es H, alquilo C₁₋₆ o alqueno C₂₋₆;

10 R² y R³ son alquilo C₁₋₆ lineal que pueden ser el mismo o diferente y pueden estar unidos entre sí de manera que forman un anillo que incorpora el carbono al que están unidos comúnmente;

R⁴ es hidrógeno;

R⁵ es hidrógeno o R;

R⁶ es

15 i) hidrógeno;

ii) un hidrocarburo lineal o ramificado que contiene entre 1 y 8 átomos de carbono, que puede contener uno o más enlaces dobles o triples, o derivados de oxígeno o de halógeno de dicho hidrocarburo, en el que 1-3 átomos de carbono o de hidrógeno pueden estar sustituidos por O o un halógeno; o

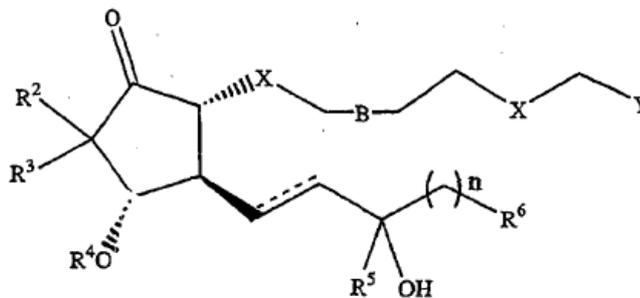
20 iii) ariloxi, heteroariloxi, cicloalquilo C₃₋₈, cicloalquilo C₃₋₈, arilo C₆₋₁₀ o heteroarilo C₃₋₁₀, en el que uno o más carbonos está sustituido con N, O o S; y que puede contener uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, trihalometilo, ciano, nitro, amino, hidroxilo, arilo C₆₋₁₀, heteroarilo C₃₋₁₀, ariloxi, heteroariloxi, alquilo C₁₋₆, OR, SR y SO₂R.

Descripción breve de las figuras de los dibujos

Los esquemas 1-8 ilustran posibles maneras para preparar los compuestos de la invención.

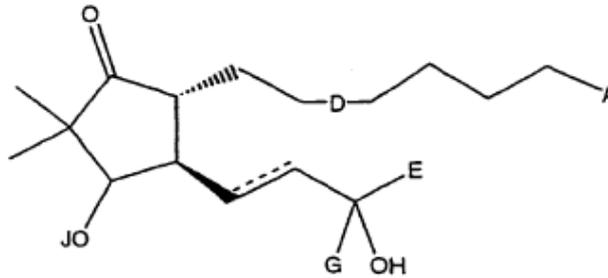
25 Descripción Detallada de la Invención

La presente invención se refiere a un método para hacer determinados derivados del ácido prostanico. Los compuestos que pueden hacerse están englobados por la fórmula estructural V siguiente:



Fórmula V

Un grupo preferido de los compuestos de la presente invención incluyen compuestos que no tienen la fórmula estructural II siguiente:



Fórmula II

5 en la que A es CO₂H, CO₂Me o CO₂Et;

D es un enlace covalente simple, doble o triple;

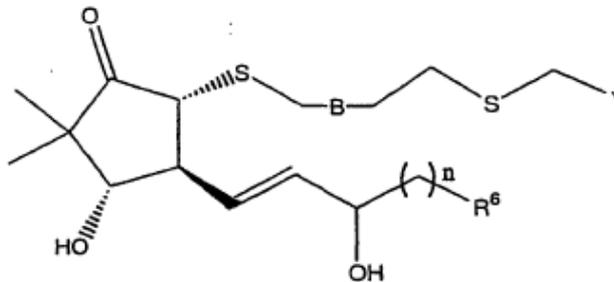
E es una cadena lineal, ramificada o cicloalquilo de 3 a 7 carbonos, trifluorometilbutilo, hidroxialquilo, o CH₂R⁷, en el que R⁷ es fenilo, ciclopentilo, fenoxi, clorofenoxi, propoxi o -CH₂SCH₂CH₃;

10 J es hidrógeno, R, C(=O)R, o cualquier grupo que se elimine fácilmente bajo condiciones fisiológicas de manera que R⁴ es efectivamente hidrógeno; y G es H o CH₃.

Tal y como se usan en la presente memoria, los símbolos "Me" y "Et" se refieren a los restos referidos comúnmente como "metilo" y "etilo" por los expertos en la técnica.

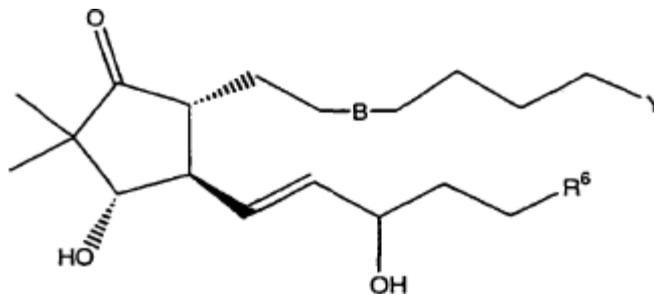
En otros compuestos relacionados con la Fórmula V y la Fórmula II, A es CO₂R⁸, en el que R⁸ es cualquier grupo alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 carbonos.

15 Otro grupo preferido incluye los compuestos que tienen la fórmula III:



Fórmula III

Otro grupo preferido incluye los compuestos que tienen la fórmula IV:



Fórmula IV

Preferiblemente, al menos uno de R^2 y R^3 no es metilo.

En las fórmulas anteriores los sustituyentes y símbolos son como se han definido anteriormente en la presente memoria.

En las formulas anteriores:

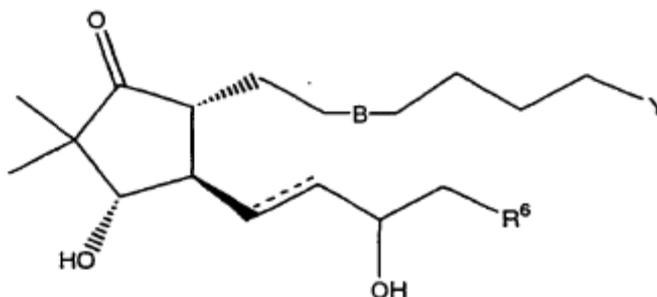
Preferiblemente Y es cualquier sal farmacéuticamente aceptable de CO_2H o CO_2R .

5 Más preferiblemente, Y es CO_2H o CO_2Me .

Preferiblemente n es 2.

10 Preferiblemente, R^6 es arilo C_{6-10} o heteroarilo C_{3-10} , que puede contener uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, trihalometilo, ciano, nitro, amino, hidroxilo, alquilo C_{1-6} , OR, SR y SO_2R . Más preferiblemente, R^6 es fenilo, naftilo, benzofuranilo o benzotienilo, que puede contener uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, trihalometilo, ciano, nitro, amino, hidroxilo, alquilo C_{1-6} , OR, SR y SO_2R . Lo más preferido es 3-clorobenzotien-2-ilo.

Otro grupo preferido incluye los compuestos que tienen la fórmula XIII:

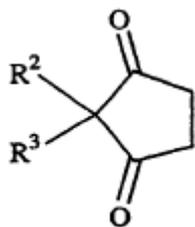


Fórmula XIII

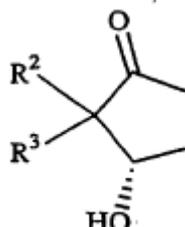
15 en la que B representa un enlace simple o doble;

y R^6 es naftilo, benzofuranilo o benzotienilo, que puede contener uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, trihalometilo, ciano, nitro, amino, hidroxilo, alquilo C_{1-6} , OR, SR y SO_2R .

20 En otro aspecto de esta invención, determinados elementos del método para preparar los compuestos de la invención son nuevos y no evidentes. Uno de dichos elementos nuevos y no evidentes es la aplicación del uso de la levadura de panadero como un agente reductor como indican Brooks y colaboradores (Brooks, et al., "Asymmetric Microbial Reduction of Prochiral 2,2-Disubstituted Cycloalkanediones", J. Org. Chem., 1987, 52, 3223-3232) en la síntesis de los compuestos de esta invención. En esta nueva y no evidente aplicación de esta reacción, la levadura de panadero se usa para llevar a cabo una reducción asimétrica de un compuesto de fórmula VI, que es una 2,2-dialquilociclopentano-1,3-diona, a un compuesto de fórmula VII, que es una 2,2-dialquil-3(S)-hidroxilociclopentano-1,3-diona. Un compuesto de fórmula VII se usa entonces para preparar los compuestos según el método de esta invención.



Fórmula VI



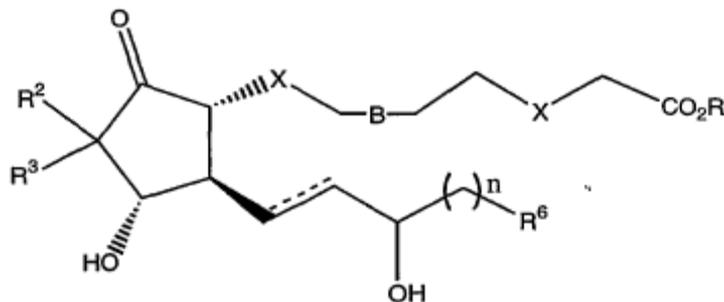
Fórmula VII

Los dos grupos alquilo, R^2 y R^3 de los compuestos de fórmula VI y VII, en esta reacción son los mismos que los definidos para los compuestos de Fórmula I anterior. En el caso en el que los dos grupos alquilo sean diferentes, se forma una

mezcla de diastereómeros, que puede separarse por métodos de separación convencionales para obtener los productos enantioméricamente puros.

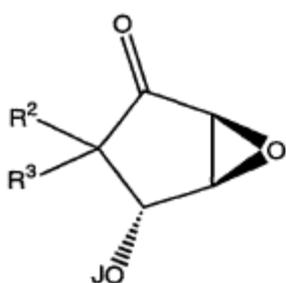
La preparación de las 2,2-dialquilociclopentan-1,3-dionas es muy conocida en la técnica. Una manera conveniente por la que puede prepararse una amplia variedad de estos compuestos es por alquilación mediada por base del carbono 2 de la ciclopentano-1,3-diona usando un haluro de alquilo o compuesto equivalente. Este tipo de reacción es muy conocida en la técnica. La preparación de los tres tipos generales de 2,2-dialquilociclopentan-1,3-dionas usando esta reacción de alquilación se ilustra en el Esquema 1. Los compuestos en los que uno de los grupos alquilo es metilo pueden prepararse por una reacción simple de alquilación a partir de 2-metilciclopentan-1,3-diona 1 disponible comercialmente (Ecuación 1). En el caso en el que ninguno de los grupos alquilo en la 2,2-dialquilociclopentan-1,3-diona sea metilo (compuesto 2b), estos compuestos pueden prepararse a partir de la ciclopentan-1,3-diona por dos reacciones de alquilación consecutivas (Ecuación 2). En el caso en el que los dos grupos alquilo en la 2,2-dialquilociclopentan-1,3-diona sean el mismo, estas reacciones de alquilación pueden llevarse a cabo en un procedimiento en un único recipiente. En el caso en el que los dos grupos alquilo formen un compuesto cíclico que incorpora C₂ de la ciclopentanona en el anillo, conocido de otra forma como espirocetona, estos compuestos pueden prepararse usando un dihaloalcano o compuesto equivalente para llevar a cabo una alquilación intermolecular seguido de una alquilación intramolecular (Ecuación 3), que podría llevarse a cabo en un proceso de un único recipiente o dos. Los expertos en la técnica reconocerán que hay muchas maneras de preparar 2,2-dialquilociclopentan-1,3-dionas y las reacciones del Esquema 1 se incluyen para ilustrar que estos compuestos pueden prepararse u obtenerse fácilmente por los expertos en la técnica, y no pretenden limitar el alcance de la invención de ninguna manera.

Los compuestos representados por la Fórmula VIII se preparan por un proceso que comprende las etapas siguientes:

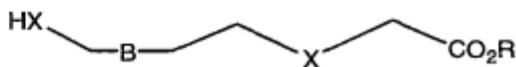


Fórmula VIII

i) hacer reaccionar un compuesto de Fórmula IX con un compuesto de Fórmula X en presencia de una base adecuada para formar un compuesto de Fórmula XI;

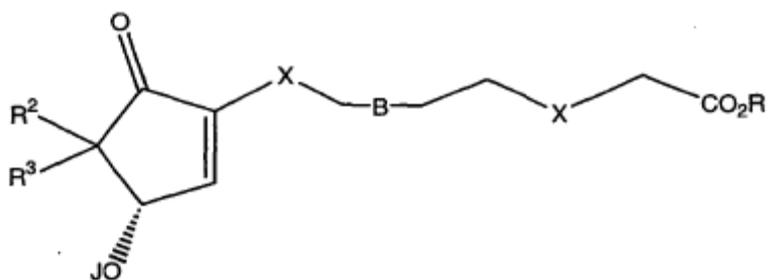


Fórmula IX



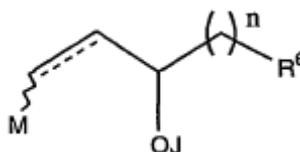
Fórmula X

25



Fórmula XI

ii) acoplar un compuesto de Fórmula XI con un compuesto de Fórmula XII; y



Fórmula XII

5

iii) eliminar los grupos protectores y separar los diastereómeros para obtener los productos deseados;

en la que las cuñas rayadas indican la configuración α (abajo), los triángulos llenos indican la configuración β (arriba) y las líneas onduladas indican la conformación cis (Z) o trans (E);

n es 0-6;

10 B es un enlace covalente simple, doble o triple;

J es un grupo protector que puede eliminarse fácilmente para formar el grupo hidróxido respectivo sin afectar al resto de la molécula;

R es alquilo C_{1-6} o alqueniilo C_{2-6} ;

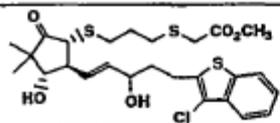
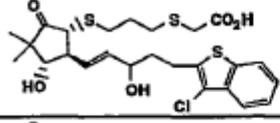
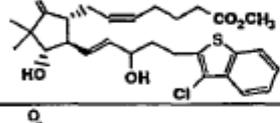
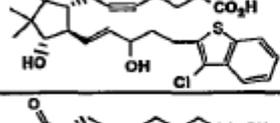
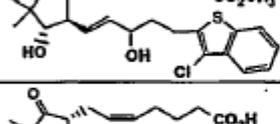
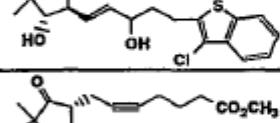
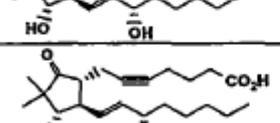
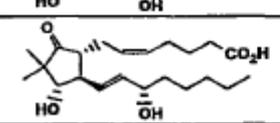
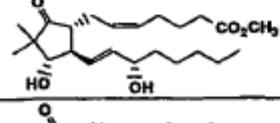
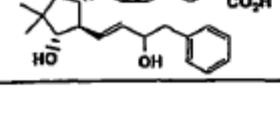
15 R^2 y R^3 son alquilo C_{1-6} lineal que puede ser el mismo o diferente y pueden estar unidos entre sí de manera que formen un anillo que incorpora el carbono al que están unidos comúnmente;

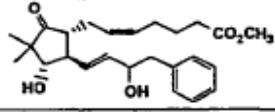
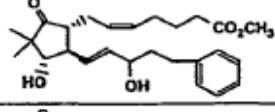
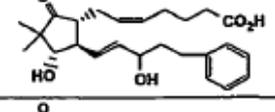
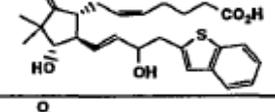
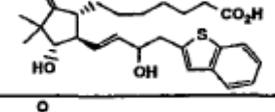
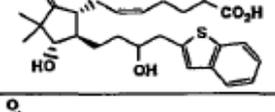
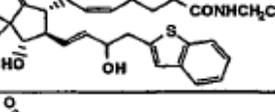
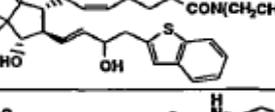
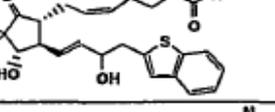
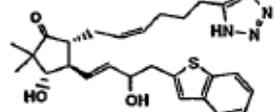
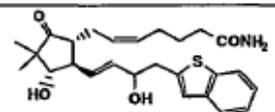
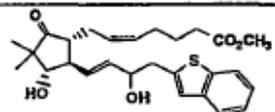
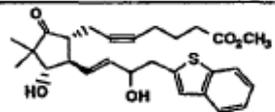
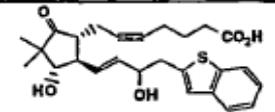
X es S u O; y

M es un grupo que comprende uno o más átomos de metales.

20 Todos los compuestos descritos en la presente memoria pueden prepararse usando los métodos descritos anteriormente suplementados por métodos conocidos por los expertos en la técnica. La síntesis de varios compuestos de la invención se ilustra en los Esquemas 2-7. Estos Esquemas que están incluidos en la presente memoria son meramente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención de ninguna manera. Aunque hay varias maneras por las que la reducción de los compuestos de Fórmula VI a Fórmula VII podría incorporarse en la síntesis de estos compuestos, una manera conveniente para esto se muestra en el Esquema 2. En este Esquema, el compuesto 2 es un compuesto de Fórmula VI y el compuesto 3 es un compuesto de Fórmula VII. Sin embargo, los expertos en la técnica reconocerán que
25 hay muchas maneras por las que la reducción podría usarse para preparar estos compuestos.

Tabla 1

Estructura	Diastereómero de bajo Rf	Diastereómero de alto Rf
	21	22
	23	24
	34	35
	36	37
	38	39
	40	41
		42
		43
		44
		45
	46	47

	48	49
	50	51
	52	53
	54	55
	56	57
	58	59
	60	61
	62	63
	64	65
	66	67
	68	69
	70	71
	72	73
	74	75

Los compuestos nombrados a continuación, e ilustrados en la Tabla 1, son representantes especialmente preferidos de los compuestos que puede fabricarse usando el método de la presente invención:

éster metílico del ácido (3-(((1*R*,4*S*,5*S*)-5-(3-cloro-benzo[*b*]tiofen-2-il)-3-hidroxi-pent-1-enil]-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentilsulfanil)-propilsulfanil)-acético (21, 22);

5 ácido (3-(((1*R*,4*S*,5*S*)-5-(3-cloro-benzo[*b*]tiofen-2-il)-3-hidroxi-pent-1-enil]-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentilsulfanil)-propilsulfanil)-acético (23, 24);

éster metílico del ácido (Z)-7-((1*R*,4*S*,5*R*)-5-[(*E*)-S-(3-cloro-benzo[*b*]tiofen-2-il)-3-hidroxi-pent-1-enil]-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-inoico (34, 35);

10 ácido (Z)-7-((1*R*,4*S*,5*R*)-5-[(*E*)-5-(3-cloro-benzo[*b*]tiofen-2-il)-3-hidroxi-pent-1-enil]-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-inoico (36, 37);

éster metílico del ácido (Z)-7-((1*R*,4*S*,5*R*)-5-[(*E*)-5-(3-cloro-benzo[*b*]tiofen-2-il)-3-hidroxi-pent-1-enil]-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-enoico (38, 39);

ácido (Z)-7-((1*R*,4*S*,5*R*)-5-[(*E*)-5-(3-cloro-benzo[*b*]tiofen-2-il)-3-hidroxi-pent-1-enil]-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-enoico (40, 41);

15 éster metílico del ácido 7-(((1*R*,4*S*,5*R*)-4-Hidroxi-5-((*E*)-S)-3-hidroxi-oct-1-enil)-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-inoico (42)

ácido 7-(((1*R*,4*S*,5*R*)-4-Hidroxi-5-((*E*)-S)-3-hidroxi-oct-1-enil)-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-inoico (43)

ácido (Z)-7-((1*R*,4*S*,5*R*)-4-Hidroxi-5-((*E*)-S)-3-hidroxi-oct-1-enil)-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-enoico (44)

20 éster metílico del ácido (Z)-7-((1*R*,4*S*,5*R*)-4-Hidroxi-5-((*E*)-S)-3-hidroxi-oct-1-enil)-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-enoico (45)

ácido (Z)-7-((1*R*,4*S*,5*R*)-4-Hidroxi-5-((*E*)-3-hidroxi-4-fenil-but-1-enil)-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-enoico (46, 47)

éster metílico del ácido (Z)-7-((1*R*,4*S*,5*R*)-4-Hidroxi-5-((*E*)-3-hidroxi-4-fenil-but-1-enil)-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-enoico (48, 49)

25 éster metílico del ácido (Z)-7-((1*R*,4*S*,5*R*)-4-Hidroxi-5-((*E*)-3-hidroxi-5-fenil-pent-1-enil)-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-enoico (50, 51)

ácido (Z)-7-((1*R*,4*S*,5*R*)-4-Hidroxi-5-((*E*)-3-hidroxi-5-fenil-pent-1-enil)-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-enoico (52, 53)

ácido (Z)-7-((1*R*,4*S*,5*R*)-5-((*E*)-4-Benzo[*b*]tiofen-2-il-3-hidroxi-but-1-enil)-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-enoico (54, 55)

30 ácido 7-(((1*R*,4*S*,5*R*)-5-((*E*)-4-Benzo[*b*]tiofen-2-il-3-hidroxi-but-1-enil)-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-heptanoico (56, 57)

ácido (Z)-7-((1*R*,4*S*,5*R*)-5-(4-Benzo[*b*]tiofen-2-il-3-hidroxi-but-1-enil)-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-enoico (58, 59)

etilamida del ácido (Z)-7-((1*R*,4*S*,5*R*)-5-((*E*)-4-Benzo[*b*]tiofen-2-il-3-hidroxi-but-1-enil)-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-enoico (60, 61)

35 dietilamida del ácido (Z)-7-((1*R*,4*S*,5*R*)-5-((*E*)-4-Benzo[*b*]tiofen-2-il-3-hidroxi-but-1-enil)-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-enoico (62, 63)

(2-hidroxi-etil)-amida del ácido (Z)-7-((1*R*,4*S*,5*R*)-5-((*E*)-4-Benzo[*b*]tiofen-2-il-3-hidroxi-but-1-enil)-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-enoico (64, 65)

40 (3*S*,4*R*,5*R*)-4-((*E*)-4-Benzo[*b*]tiofen-2-il-3-hidroxi-but-1-enil)-3-hidroxi-2,2-dimetil-5-[(Z)-6-(1-*H*-tetrazol-5-il)-hex-2-enil]-ciclopentanona (66, 67)

amida del ácido (Z)-7-((1*R*,4*S*,5*R*)-5-((*E*)-4-Benzo[*b*]tiofen-2-il-3-hidroxi-but-1-enil)-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-enoico (68, 69)

éster metílico del ácido (Z)-7-[(1*R*,4*S*,5*R*)-5-((*E*)-4-Benzo[*b*]tiofen-2-il-3-hidroxi-but-1-enil)-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-enoico (70, 71)

éster metílico del ácido 7-[(1*R*,4*S*,5*R*)-5-((*E*)-4-Benzo[*b*]tiofen-2-il-3-hidroxi-but-1-enil)-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-inoico (72, 73)

5 ácido 7-[(1*R*,4*S*,5*R*)-5-((*E*)-4-Benzo[*b*]tiofen-2-il-3-hidroxi-but-1-enil)-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-inoico (74, 75)

10 Pueden prepararse composiciones farmacéuticas combinando una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto según la presente invención, o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de éste, como un ingrediente activo, con excipientes farmacéuticos oftálmicamente aceptables convencionales y por preparación de formas de dosificación unitaria adecuadas para uso ocular tópico. La cantidad terapéuticamente eficaz es típicamente entre aproximadamente 0,0001 y aproximadamente 5% (p/v), preferiblemente aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1,0% (p/v) en formulaciones líquidas.

15 Para aplicación oftálmica, preferiblemente se preparan disoluciones usando una disolución salina fisiológica como un vehículo principal. El pH de dichas disoluciones oftálmicas debe mantenerse preferiblemente entre 6,5 y 7,2 con un sistema de tampón apropiado. Las formulaciones también pueden contener conservantes, estabilizadores y tensioactivos farmacéuticamente aceptables convencionales.

20 Los conservantes preferidos que pueden usarse en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, cloruro de benzalconio, clorobutanol, timerosal, acetato fenilmercuríco y nitrato fenilmercuríco. Un tensioactivo preferido es, por ejemplo, Tween 80. Asimismo, pueden usarse varios vehículos preferidos en las preparaciones oftálmicas de la presente invención. Estos vehículos incluyen, pero no están limitados a, alcohol de polivinilo, povidona, hidroxipropil metil celulosa, poloxámeros, carboximetil celulosa, hidroxietil celulosa y agua purificada.

Pueden añadirse ajustadores de la tonicidad según se necesite o sea conveniente. Éstos incluyen, pero no están limitados a, sales, particularmente cloruro de sodio, cloruro de potasio, manitol y glicerina, o cualquier otro ajustador de la tonicidad oftálmicamente aceptable adecuado.

25 Pueden usarse varios tampones y medios para ajustar el pH siempre que la preparación resultante sea oftálmicamente aceptable. Según esto, los tampones incluyen tampones acetato, tampones citrato, tampones fosfato y tampones borato. Pueden usarse ácidos o bases para ajustar el pH de estas formulaciones según se necesite.

De manera similar, un antioxidante oftálmicamente aceptable para uso en la presente invención incluye, pero no está limitado a, metabisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, acetilcisteína, hidroxianisol butilado e hidroxitolueno butilado.

30 Otros componentes excipientes que pueden incluirse en las preparaciones oftálmicas son agentes quelantes. El agente quelante preferido es edentato disodio, aunque también pueden usarse otros agentes quelantes en lugar de o conjuntamente con éste.

Los ingredientes se usan habitualmente en las cantidades siguientes:

	<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad (% p/v)</u>
35	ingrediente activo	aproximadamente 0,001-5
	conservante	0-0,10
	vehículo	0-40
	ajustador de la tonicidad	1-10
	tampón	0,01-10
40	ajustador del pH	c.s. pH 4,5-7,5
	antioxidante	según se necesite
	tensioactivo	según se necesite
	agua purificada	según se necesite para hacer 100%

La dosis real de los compuestos activos de la presente invención depende del compuesto específico y de la afección que se va a tratar; la selección de la dosis apropiada se encuentra dentro del conocimiento del experto en la técnica.

Las formulaciones oftálmicas de la presente invención se envasan convenientemente en formas adecuadas para aplicación medida, tales como en contenedores equipados con un gotero, para facilitar la aplicación en el ojo. Los contenedores adecuados para la aplicación en gotas están hechos habitualmente de material plástico adecuado inerte, no tóxico y generalmente contienen entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 15 ml de disolución.

Ejemplos Sintéticos

Los métodos para preparar los compuestos de esta invención se ilustran adicionalmente por los Ejemplos no limitativos siguientes, que se resumen en los esquemas de reacción de las Figuras 1-7 en las que los compuestos se identifican por el mismo designador tanto en los Ejemplos como en la Figuras.

2-Alquil-ciclopentano-1,3-diona (1a). Una mezcla de 1,3-ciclopentanodiona (89,4 mmoles, Aldrich), I-R² (96,4 mmoles, Aldrich) y KOH (5,097 g, 90,8 mmoles) en H₂O (25 mL)/dioxano (75 mL) se calienta a reflujo. Después de 5 h, se añade una disolución de KOH (2 g) y I-R² (2 mmoles) en H₂O (5 mL)/dioxano (15 mL) y después de otras 3 h a reflujo, la disolución se deja con agitación a temperatura ambiente toda la noche. Por la mañana, la reacción se continúa por adición de una disolución de KOH (2 g) y I-R² (2,4 mmoles) en H₂O (5 mL)/dioxano (15 mL) y se calienta a reflujo. Después de 4 h, la mezcla se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se extrae con éter (1 x 100 mL, 3 x 75 mL). Los extractos de éter combinados se evaporan, el residuo se combina con HCl (50 mL, 10%) y la mezcla resultante se pone en un baño de aceite a 120°C hasta que se observa la ebullición (aprox. 15 min). La mezcla se deja enfriar hasta temperatura ambiente, se neutraliza por adición de disolución de NaHCO₃ (150 mL, saturada) y la mezcla resultante se extrae entonces con CH₂Cl₂ (4 x 75 mL). La disolución de CH₂Cl₂ combinada se seca (MgSO₄), se filtra y se evapora para dejar un aceite marrón que se usa directamente en la etapa siguiente.

2-Alquil-2-metil-ciclopentano-1,3-diona (2a). Una mezcla de 2-metil-1,3-ciclopentanodiona (10,025 g, 89,4 mmoles, Aldrich), I-R² (96,4 mmoles, Aldrich) y KOH (5,097 g, 90,8 mmoles) en H₂O (25 mL)/dioxano (75 mL) se calienta a reflujo. Después de 5 h, se añade una disolución de KOH (2 g) y I-R² (2 mmoles) en H₂O (5 mL)/dioxano (15 mL) y después de otras 3 h a reflujo, la disolución se deja con agitación a temperatura ambiente toda la noche. Por la mañana, la reacción se continúa por adición de una disolución de KOH (2 g) y I-R² (2,4 mmoles) en H₂O (5 mL)/dioxano (15 mL) y se calienta a reflujo. Después de 4 h, la mezcla se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se extrae con éter (1 x 100 mL, 3 x 75 mL). Los extractos de éter combinados se evaporan, el residuo se combina con HCl (50 mL, 10%) y la mezcla resultante se pone en un baño de aceite a 120°C hasta que se observa la ebullición (aprox. 15 min). La mezcla se deja enfriar entonces hasta temperatura ambiente, se neutraliza por adición de disolución de NaHCO₃ (150 mL, saturada) y la mezcla resultante se extrae entonces con CH₂Cl₂ (4 x 75 mL). La disolución de CH₂Cl₂ combinada se seca (MgSO₄), se filtra y se evapora para dejar un aceite marrón que se usa directamente en la etapa siguiente.

2,2-Dialquil-metil-ciclopentano-1,3-diona (2b). Una mezcla de 2-alkuil-1,3-ciclopentanodiona 1a (89,4 mmoles, Aldrich), I-R² (96,4 mmoles, Aldrich) y KOH (5,097 g, 90,8 mmoles) en H₂O (25 mL)/dioxano (75 mL) se calienta a reflujo. Después de 5 h, se añade una disolución de KOH (2 g) y I-R³ (2 mmoles) en H₂O (5 mL)/dioxano (15 mL) y después de otras 3 h a reflujo, la disolución se deja con agitación a temperatura ambiente toda la noche. Por la mañana, la reacción se continúa por adición de una disolución de KOH (2 g) y I-R³ (2,4 mmoles) en H₂O (5 mL)/dioxano (15 mL) y se calienta a reflujo. Después de 4 h, la mezcla se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se extrae con éter (1 x 100 mL, 3 x 75 mL). Los extractos de éter combinados se evaporan, el residuo se combina con HCl (50 mL, 10%) y la mezcla resultante se pone en un baño de aceite a 120°C hasta que se observa la ebullición (aprox. 15 min). La mezcla se deja enfriar hasta temperatura ambiente, se neutraliza por adición de disolución de NaHCO₃ (150 mL, saturada) y la mezcla resultante se extrae entonces con CH₂Cl₂ (4 x 75 mL). La disolución de CH₂Cl₂ combinada se seca (MgSO₄), se filtra y se evapora para dejar un aceite marrón que se usa directamente en la etapa siguiente.

Espiro[2.4]heptano-4,7-diona (2c). Una mezcla de 2-alkuil-1,3-ciclopentanodiona 1a (89,4 mmoles, Aldrich), 1,2-dibromoetano (120 mmoles, Aldrich) y KOH (5,097 g, 90,8 mmoles) en H₂O (25 mL)/dioxano (75 mL) se calienta a reflujo durante 24 horas. La mezcla se deja enfriar y el producto crudo se extrae con éter (1 x 100 mL, 3 x 75 mL). Los extractos de éter combinados se evaporan, el residuo se combina con HCl (50 mL, 10%) y la mezcla resultante se pone en un baño de aceite a 120°C hasta que se observa la ebullición (aprox. 15 min). La mezcla se deja entonces enfriar hasta temperatura ambiente, se neutraliza por adición de disolución de NaHCO₃ (150 mL, saturada) y la mezcla resultante se extrae entonces con CH₂Cl₂ (4 x 75 mL). La disolución de CH₂Cl₂ combinada se seca (MgSO₄), se filtra y se evapora para dejar un aceite marrón que se usa directamente en la etapa siguiente.

2,2-Dimetil-ciclopentano-1,3-diona (2). Se siguió el procedimiento publicado. (Agosta, W.C.; Smith, A.B., J. Org. Chem. 1970, 35, 3856). Una mezcla de 2-metil-1,3-ciclopentanodiona (10,025 g, 89,4 mmoles, Aldrich), yoduro de metilo (6,0 mL, 96,4 mmoles, Aldrich) y KOH (5,097 g, 90,8 mmoles) en H₂O (25 mL)/dioxano (75 mL) se calentó a reflujo. Después

de 5 h, se añadió una disolución de KOH (2 g) y MeI (2,4 mL) en H₂O (5 mL)/dioxano (15 mL) y después de otras 3 h a reflujo la disolución se dejó con agitación a temperatura ambiente toda la noche. Por la mañana, la reacción se continuó por adición de una disolución de KOH (2 g) y MeI (2,4 mL) en H₂O (5 mL)/dioxano (15 mL) y se calentó a reflujo. Después de 4 h, la mezcla se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se extrajo con éter (1 x 100 mL, 3 x 75 mL). Los extractos de éter combinados se evaporaron, el residuo se combinó con HCl (50 mL, 10%) y la mezcla resultante se puso en un baño de aceite a 120°C hasta que se observó la ebullición (aprox. 15 min). La mezcla se dejó enfriar entonces hasta temperatura ambiente, se neutralizó por adición de disolución de NaHCO₃ (150 mL, saturada) y la mezcla resultante se extrajo entonces con CH₂Cl₂ (4 x 75 mL). La disolución de CH₂Cl₂ combinada se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó para dejar un aceite marrón (10,474 g, 83 mmoles, 93%) que se usó directamente en la etapa siguiente. (S)-3-Hidroxi-2,2-dimetil-ciclopentanona (3). Se siguió el procedimiento publicado. (Brooks, D.W.; Hormoz, M.; Grothaus, P.G. J. Org. Chem. 1987, 52, 3223). Una disolución a 35°C (temperatura interna) de D-glucosa (106,73 g, 592 mmoles, Aldrich) en H₂O (690 mL) en un Erlenmeyer de 4 L se trató con levadura de panadero (71,065 g, Fleischmann). La mezcla se dejó fermentar durante 2 h, después se añadió 2,2-dimetil-ciclopentano-1,3-diona (2) (7,316 g, 58 mmoles).

La mezcla se agitó durante 48 h y después se filtró a través de celite, lavando con aproximadamente 1 L de CH₂Cl₂. La filtración fue difícil debido a la consistencia espesa de la levadura y ayudó el añadir continuamente CH₂Cl₂ a la mezcla y raspar la parte superior de la capa de celite con una espátula. El filtrado se transfirió a un embudo de separación y se añadieron 100 mL de salmuera y las capas se separaron. Se añadió salmuera (400 mL) a la capa acuosa y la disolución resultante se extrajo adicionalmente con CH₂Cl₂ (3 x 500 mL). La disolución de CH₂Cl₂ combinada se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó para dejar un aceite amarillo. La cromatografía flash (11 x 5 cm, 20% de EtOAc/hexs→25%→30%→40%→50%) proporcionó el alcohol 3 (2,435 g, 19 mmoles, 33%).

El exceso enantiomérico de 3 se ensayó por ¹H RMN del éster de Mosher correspondiente que se preparó por tratamiento del alcohol 3 (11 mg, 0,09 mmoles) en dicloroetano (0,3 mL, Aldrich) con piridina (27 µL, 0,33 mmoles, Aldrich) y cloruro del ácido (R)-α-metoxi-α-trifluorometilfenilacético (58 µL, 0,31 mmoles, Fluka). La mezcla se agitó toda la noche y se repartió entre agua (10 mL) y éter (10 mL). La capa de éter se lavó con HCl 1 M (10 mL) y disolución de NaHCO₃ saturada y entonces se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó. El análisis de ¹H RMN se hizo en el éster crudo.

(S)-3-(*terc*)-Butil-dimetil-silaniloxi-2,2-dimetil-ciclopentanona (4). Una disolución de alcohol 3 (520 mg, 4,1 mmoles) y 2,6-lutidina (0,56 mL, 4,8 mmoles, Aldrich) en CH₂Cl₂ (8,0 mL, Aldrich) se trató con TBSOTf (1,0 mL, 4,3 mmoles, Aldrich). Después de 5,5 h, se añadió disolución de NaHCO₃ saturada (20 mL) y la mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (20 mL). La disolución de CH₂Cl₂ se lavó con 20 mL cada uno de HCl 1M, disolución de NaHCO₃ saturada y salmuera y después se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó. La cromatografía flash (5 x 5 cm, 10% de Et₂O/pentano) proporcionó el éster TBS 4 (698 mg, 2,9 mmoles, 70%).

(S)-3-(*terc*)-Butil-dimetil-silaniloxi-2,2-dimetil-5-fenilselanil-ciclopentanona (5). Una disolución del éster TBS 4 (1,496 g, 6,2 mmoles) en THF (2 mL, Aldrich) se añadió gota a gota a una disolución a -78°C de LDA (4,9 mL, 7,3 mmoles, 1,5 M/ciclohexano, Aldrich) en THF (22 mL, Aldrich), lavando con 2 mL de THF. Después de 15 min, se añadió rápidamente una disolución de PhSeCl (1,424 g, 7,4 mmoles, Aldrich) en THF (2 mL) con una cánula, lavando con 2 mL de THF. La disolución se agitó durante 10 min y después se repartió entre 50 mL de HCl 0,5 M y 75 mL de éter. La capa de éter se lavó con 30 mL cada uno de agua, disolución de NaHCO₃ saturada y salmuera y después se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó. La cromatografía flash (2% de EtOAc/hexs→4%) proporcionó seleniuro de fenilo 5 (1,641 g, 4,1 mmoles, 67%) junto con 476 mg de fracciones mixtas que contenían una impureza con R_f menor.

(S)-4-(*terc*)-Butil-dimetil-silaniloxi-5,5-dimetil-ciclopent-2-enona (6). Una disolución del seleniuro 5 (1,641 g, 4,1 mmoles) y piridina (0,62 mL, 7,7 mmoles, Aldrich) en CH₂Cl₂ (13 mL, Aldrich) se trató con H₂O (1 mL) y H₂O₂ al 30% (1,1 mL, Aldrich). La mezcla se agitó durante 30 min y se repartió entre 25 mL de CH₂Cl₂ y 25 mL de disolución de NaHCO₃ saturada. La capa acuosa se extrajo con 25 mL de CH₂Cl₂ y la disolución de CH₂Cl₂ combinada se lavó con HCl 1 M (2 x 25 mL) y salmuera (50 mL). La disolución se secó entonces (MgSO₄), se filtró y se evaporó para dejar un aceite naranja. La cromatografía flash (6 x 4 cm, 10% de éter/pentano) proporcionó la enona 6 (572 mg, 2,4 mmoles, 5,9%).

Éster metílico del ácido (3-mercapto-propilsulfanil)-acético (8). Una disolución enfriada en hielo de 1,3-ditiano (2,0 mL, 19,9 mmoles) en THF (40 mL) se trató con NaH (819 mg, 20,5 mmoles). Después de 30 min, se añadió bromoacetato de metilo (1,9 mL, 20,0 mmoles) y la mezcla se agitó durante 3,5 h a temperatura ambiente. La reacción se paró por adición de MeOH y después 50 mL de HCl 1 M. La mezcla se extrajo con éter (2 x 50 mL) y la disolución de éter combinada se lavó con disolución de bicarbonato de sodio saturada (50 mL) y salmuera (50 mL) y después se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó. La purificación por cromatografía flash en gel de sílice (10-15% de acetato de etilo/hexanos) proporcionó 971 mg (5,38 mmoles, 27%) del tiol.

Éster metílico del ácido {3-[(S)-3-(*terc*)-butil-dimetil-silaniloxi]-4,4-dimetil-5-oxo-ciclopent-1-enilsulfanil]-propilsulfanil}-acético (10). Una disolución de la enona 6 (156 mg, 0,65 mmoles) en MeOH (4,3 mL) se trató con H₂O₂ al 30% (0,21 mL) y NaOH 1 M (32 µL). Después de 4 h, se añadieron 20 mL de disolución de cloruro de amonio saturada y la mezcla se

- extraído con diclorometano (3 x 10 mL). La disolución de diclorometano combinada se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó en vacío.
- 5 Una disolución del tiol 8 (110 mg, 0,61 mmoles) en diclorometano (3 mL) se añadió al epóxido crudo (9) con cánula, lavando con 1,2 mL. Se añadió alúmina básica (628 mg) y la mezcla se agitó durante 16 h. El disolvente se evaporó y la purificación del residuo por cromatografía flash en gel de sílice (15% de acetato de etilo/hexano) proporcionó 129 mg (0,31 mmoles, 48%) de la enona acoplada (10).
- 10 (3-Cloro-benzo[b]tiofen-2-il)-metanol (12). A una disolución enhiada en hielo de 10,0 g (47,0 mmoles) de ácido 3-cloro-benzo[b]tiofen-2-carboxílico (11) en 200 mL de THF se añadieron 47 mL de LiAlH_4 (47 mmoles, 1 M/THF). Después de 3 h, la reacción se paró por adición de MeOH (aprox. 40 mL). Los volátiles se evaporaron y el residuo se trató con 50 mL de HCl 1 M. Después de agitar durante 10 min, la mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 150 mL). La disolución de CH_2Cl_2 combinada se secó (MgSO_4), se filtró y se evaporó. La purificación por cromatografía flash en gel de sílice (10-20% de acetato de etilo/hexano) proporcionó 4,32 g (21,6 mmoles, 46%) del alcohol (12).
- 15 3-Cloro-benzo[b]tiofen-2-carbaldehído (13). Una disolución del alcohol 12 (4,32 g, 21,6 mmoles) en 40 mL de CH_2Cl_2 se trató con tamicos moleculares de 4A, NMO (3,81 g, 32,5 mmoles) y TPAP (381 mg, 1,08 mmoles). La reacción se agitó durante 10 min y después se evaporó a sequedad. La purificación por cromatografía flash en gel de sílice (2% de acetato de etilo/hexano) proporcionó 3,52 g (18,3 mmoles, 84%) del aldehído (13).
- 20 Éster metílico del ácido (*E*)-3-(3-cloro-benzo[b]tiofen-2-il)-acrílico (14). Una disolución de 3,52 g (18,3 mmoles) de 13 en 50 mL de tolueno se trató con metil(trifenilfosfoaniliden)acetato (7,48 g, 21,9 mmoles). Después de 4 h, se añadió disolución de NaHCO_3 saturada (50 mL) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 x 75 mL). La disolución de acetato de etilo combinada se lavó con salmuera (50 mL), se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó. La purificación por cromatografía flash en gel de sílice (5% de acetato de etilo/hexano) proporcionó 3,60 g (14,6 mmoles, 80%) del enoato (14).
- 25 Éster metílico del ácido 3-(3-cloro-benzo[b]tiofen-2-il)-propiónico (15). Una disolución de 3,60 g (14,6 mmoles) de 14 en 50 mL de THF se trató con catalizador de Wilkinson (3,35 g, 3,62 mmoles). La mezcla se agitó bajo 1 atm de H_2 durante 18 h y después se filtró a través de celite. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía flash en gel de sílice (0-2% de acetato de etilo/hexano) para proporcionar 3,63 g (14,3 mmoles, 99%) del éster saturado (15).
- 30 3-(3-Cloro-benzo[b]tiofen-2-il)-propan-1-ol (16). Una disolución enhiada en hielo de 3,63 g (14,3 mmoles) de 15 en 60 mL de éter se trató con LiBH_4 (621 mg, 28,5 mmoles) y metanol (2 mL). Después de 30 min, se añadieron 30 mL de disolución de NaOH 0,5 M. La mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 x 25 mL) y la disolución de acetato de etilo combinada se lavó con salmuera (50 mL), se secó (MgSO_4), se filtró y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía flash en gel de sílice (5-20% de acetato de etilo/hexano) para proporcionar 2,57 g (11,3 mmoles, 79%) del alcohol (16).
- 35 3-(3-Cloro-benzo[b]tiofen-2-il)-propionaldehído (17). Una disolución a -78°C de cloruro de oxalilo (1,73 g, 13,6 mmoles) en diclorometano (20 mL) se trató con DMSO (20 mL). Después de 5 min, se añadió una disolución del alcohol 16 (2,57 g, 11,3 mmoles) en diclorometano (20 mL). Después de otros 15 min, se añadió trietilamina (7,1 mL, 50,6 mmoles). La reacción se agitó a -78°C durante 5 min y se dejó calentar hasta temperatura ambiente. Después de 30 min, se añadieron 100 mL de agua y la mezcla se extrajo con diclorometano (3 x 60 mL). La disolución de diclorometano combinada se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó. La purificación por cromatografía flash en gel de sílice (10% de acetato de etilo/hexano) proporcionó 2,11 g (9,4 mmoles, 83%) del aldehído (17).
- 40 5-(3-Cloro-benzo[b]tiofen-2-il)-pent-1-in-3-ol (18). Una disolución del aldehído 17 (2,11 g, 9,4 mmoles) en 15 mL de THF se añadió a una disolución de bromuro de etinilmagnesio (28,2 mL, 14,1 mmoles, THF 0,5 M) a 0°C . Después de 1,5 h, se añadió disolución de NH_4Cl saturada (75 mL) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 mL). La disolución de acetato de etilo combinada se lavó con salmuera (50 mL) y después se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó. La purificación por cromatografía flash (5-20% de acetato de etilo/hexano) proporcionó 2,20 g (8,78 mmoles, 93%) del alcohol (18).
- 45 *tert*-Butil-{1-[2-(3-cloro-benzo[b]tiofen-2-il)-etil]-prop-2-iniloxi}-dimetil-silano (19). Una disolución del alcohol 18 (2,20 g, 8,78 mmoles) en diclorometano (15 mL) se trató con DMAP (215 mg, 1,8 mmoles), TBSCI (1,59 g, 10,5 mmoles) y trietilamina (1,8 mL, 13,2 mmoles). La reacción se agitó durante 24 h y después se añadió disolución de bicarbonato de sodio saturada (50 mL). La mezcla se extrajo con diclorometano (2 x 50 mL) y la disolución de diclorometano combinada se secó (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó. La purificación por cromatografía flash (4% de acetato de etilo/hexano) proporcionó 3,06 g (6,4 mmoles, 73%) del alcohol protegido (19).
- 50 Éster metílico del ácido (3-((1*R*,4*S*,5*S*)-4-(*tert*-butil-dimetil-silaniloxi)-5-[(*E*)-3-(*tert*-butildimetil-silaniloxi)-5-(3-cloro-benzo[b]tiofen-2-il)-pent-1-enil]-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentilsulfanil]-propilsulfanil)-acético (20). Una disolución del alcohol 19 (105 mg, 0,28 mmoles) en THF (1,2 mL) se trató con hidruro del cloruro de bis(ciclopentadienil)circonio (91 mg, 0,35 mmoles). La reacción se agitó durante 30 min, después se enfrió hasta -78°C y se trató con metil-litio (0,46 mL, 0,64 mmoles, 1,4 M en éter). Después de 10 min, se añadió con cánula una disolución pre-enfriada (-78°C) de 2-

5 tienilcianocuprato de litio (1,3 mL, 0,33 mmoles, 0,25 M en THF). La reacción se agitó durante 45 minutos y después se añadió con cánula la enona 10 (61 mg, 0,15 mmoles) en 0,2 mL de THF, lavando con 0,2 mL de THF. Después de 1 h, la reacción se paró por adición de 20 mL de disolución de cloruro de amonio saturada/hidróxido de amonio concentrado 1:1. La mezcla se agitó durante 45 min y después se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 mL). La disolución de acetato de etilo combinada se secó (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó. La purificación por cromatografía flash en gel de sílice (10% de acetato de etilo/hexanos) proporcionó 51 mg (0,064 mmoles, 43%) del producto acoplado (20).

10 Éster metílico del ácido (3-((1*R*,4*S*,5*S*)-5-(3-cloro-benzo[*b*]tiofen-2-il)-3-hidroxi-pent-1-enil)-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentilsulfanil)-propilsulfanil)-acético (21, 22). Una disolución de 20 (51 mg, 0,064 mmoles) en CH₃CN (1,6 mL) se trató con HF-piridina (0,26 mL). La reacción se agitó durante 24 h y después se paró por adición de 15 mL de disolución de bicarbonato de sodio saturada. La mezcla se extrajo con diclorometano (3 x 10 mL) y la disolución de diclorometano combinada se secó (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó. La purificación por cromatografía en capa fina preparativa en gel de sílice (40% de acetato de etilo/hexanos) proporcionó 12 mg (0,023 mmoles, 71%) de cada diastereómero.

15 Ácido (3-((1*R*,4*S*,5*S*)-5-(3-cloro-benzo[*b*]tiofen-2-il)-3-hidroxi-pent-1-enil)-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentilsulfanil)-propilsulfanil)-acético (23, 24). Se añadió esterasa de hígado de conejo (9 mg) a una disolución del éster de menor R_f 21 (11 mg, 0,021 mmoles) en tampón fosfato pH 7,2 (0,5 mL)/CH₃CN (0,1 mL). La mezcla se agitó toda la noche y después se añadieron 10 mL de HCl 0,5 M junto con unos pocos mL de salmuera. La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 mL) y la disolución de acetato de etilo combinada se secó (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó. La purificación por cromatografía flash en gel de sílice (3-5% de MeOH/CH₂Cl₂) proporcionó 4 mg (0,0078 mmoles, 37%) del ácido (23). 300 MHz ¹H RMN (CDCl₃, ppm) δ 7,73 (2 H, d, J = 8,4 Hz) 7,4-7,3 (2 H, m) 5,9-5,8 (1 H, m) 5,8-5,7 (1 H, m) 4,4-4,3 (1 H, m) 20 3,63 (1 H, d, J = 9,7 Hz) 3,21 (2 H, s) 3,1-2,4 (11 H, m superpuesto) 2,1-1,7 (4 H, m superpuesto) 1,12 (3 H, s) 1,03 (3 H, s).

25 El éster de mayor R_f se hidrolizó de manera similar excepto en que se añadió una disolución de esterasa de hígado de conejo (10 mg) en 0,5 mL de tampón fosfato pH 7,2 a una disolución del éster (10 mg, 0,019 mmoles) en CH₃CN (0,2 mL). La reacción se agitó durante 22 h y después se preparó y purificó como anteriormente. Esto proporcionó 7 mg (0,013 mmoles, 71%) del ácido (24). 300 MHz ¹H RMN (CDCl₃, ppm) δ 7,73 (2 H, d, J = 8,8 Hz) 7,44-7,31 (2 H, m) 5,9-5,8 (1 H, m) 5,8-5,7 (1 H, m) 4,4-4,3 (1 H, m) 3,64 (1 H, d, J = 9,7 Hz) 3,3-2,3 (13 H, m superpuesto) 2,1-1,7 (4 H, m superpuesto) 1,12 (3 H, s) 1,03 (3 H, s).

tert-Butil-hex-5-iniloxi-dimetil-silano (26).

7-(*tert*-Butil-dimetil-silaniloxi)-hept-2-in-1-ol (27).

30 Éster 7-(*tert*-butil-dimetil-silaniloxi)-hept-2-inílico del ácido acético (28). Una disolución de 7-(*tert*-Butil-dimetil-silaniloxi)-hept-2-in-1-ol 27 (4,507 g, 21 mmoles) en piridina (20 mL) se trató con anhídrido acético (3,0 mL, 31,8 mmoles). Después de 18 h, el disolvente se evaporó y el residuo se co-evaporó con tolueno. El residuo se usó directamente en la etapa siguiente.

35 Ácido 7-acetoxi-hept-5-inoico (29). Una disolución de 28 crudo en acetona (100 mL) se trató con Reactivo de Jones (18,0 mL, 41,4 mmoles, 2,3 M). La mezcla se calentó y por lo tanto se enfrió con un baño de hielo. Después de 1 h a temperatura ambiente, se añadieron 10 mL de alcohol isopropílico y la mezcla se agitó adicionalmente durante 15 min. La mezcla todavía tenía un color marrón de manera que se añadieron otros 10 mL de alcohol isopropílico. Después de otros 15 min, el color no había cambiado de manera que la mezcla se filtró a través de celite y el filtrado se evaporó en vacío. El residuo se repartió entre 100 mL de éter y 100 mL de disolución de cloruro de amonio saturada. La capa acuosa se extrajo con 100 mL de éter y la disolución de éter combinada se lavó con salmuera y entonces se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó para dejar un aceite amarillo (6,333 g) que se usó directamente en la etapa siguiente.

45 Éster metílico del ácido 7-hidroxi-hept-5-inoico (30). El ácido crudo 29 (6,333 g) se trató con una disolución al 1% de cloruro de acetilo en metanol (60 mL). Después de 16 h, se añadió bicarbonato de sodio (1,966 g, 23,4 mmoles). La mezcla se secó (MgSO₄), se filtró a través de celite y se evaporó en vacío. La purificación por cromatografía flash en gel de sílice (30-40% de acetato de etilo/hexanos) proporcionó éster metílico del ácido 7-hidroxi-hept-5-inoico 30 (3,022 g, 19,3 mmoles, 92% de 7-(*tert*-Butil-dimetil-silaniloxi)-hept-2-in-1-ol 27).

50 Éster metílico del ácido 7-yodo-hept-5-inoico (31). Una disolución de 30 (1,347 g, 8,6 mmoles) en 5 mL de diclorometano se añadió a una mezcla de trifenilfosfina (2,725 g, 10,4 mmoles), imidazol (726 mg, 10,7 mmoles) y yodo (2,602 g, 10,3 mmoles) en 34 mL de diclorometano, lavando con 5 mL de diclorometano. Después de 40 min, el diclorometano se evaporó en vacío hasta unos pocos mL y la mezcla resultante se filtró a través de alúmina básica, lavando con 10% de acetato de etilo/hexanos. La purificación por cromatografía flash en gel de sílice (10% de acetato de etilo/hexanos) proporcionó 1,878 g (7,1 mmoles, 83%) del yoduro de propargilo.

5 *tert*-Butil-[(*E*)-1-[2-(3-cloro-benzo[*b*]tiofen-2-il)-etil]-3-yodo-aliloxi]-dimetil-silano (32). Una disolución del alquino 19 (5,547 g, 15,2 mmoles) en diclorometano (50 mL) se trató con Cp₂ZrHCl (5,794 g, 22,5 mmoles). La reacción se agitó durante 45 min y después se añadió *N*-yodosuccinimida (4,966 g, 22,1 mmoles). Después de 15 min, se añadió disolución de bicarbonato de sodio saturada (200 mL) y la mezcla se extrajo con diclorometano (2 x 100 mL). La disolución de diclorometano combinada se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó. La purificación por cromatografía flash en gel de sílice (0-5% de acetato de etilo/hexanos) proporcionó 6,608 g (13,1 mmoles, 86%) del yoduro de vinilo (32).

10 Éster metílico del ácido 7-[(1*R*,4*S*,5*R*)-4-(*tert*-butil-dimetil-silaniloxi)-5-[(*E*)-3-(*tert*-butildimetil-silaniloxi)-5-(3-cloro-benzo[*b*]tiofen-2-il)-pent-1-enil]-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-inoico (33). Una disolución a -78°C del yoduro 32 (675 mL, 1,34 mmoles) en THF (2,0 mL) se trató con *tert*-butil-litio (1,73 mL, 2,94 mmoles, 1,7 M/pentano). La mezcla roja oscura se agitó durante 25 min y se añadió dimetilzinc (0,80 mL, 1,6 mmoles, 2 M/tolueno). La disolución se agitó a 0°C durante 15 min y se volvió a enfriar hasta -78°C. En este momento, se añadió una disolución de la enona 6 (208 mg, 0,87 mmoles) en THF (1,0 mL) durante 2 h con bomba de jeringa, lavando con 0,5 mL de THF. Después de 30 min, se añadió HMPA (1,34 mL, destilado de CaH₂) seguido de una disolución del yoduro de propargilo 31 (1,286 g, 4,83 mmoles) en THF (1,0 mL). La disolución se agitó en un baño a -40°C toda la noche y después se añadieron 20 mL de disolución de cloruro de amonio saturada y 10 mL de agua. La mezcla se extrajo con diclorometano (20 mL) y acetato de etilo (2 x 20 mL). Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron. La purificación por cromatografía flash en gel de sílice (5-10% de acetato de etilo/hexanos) proporcionó 198 mg (0,27 mmoles, 31%) de 33.

20 Éster metílico del ácido (Z)-7-[(1*R*,4*S*,5*R*)-5-[(*E*)-5-(3-cloro-benzo[*b*]tiofen-2-il)-3-hidroxi-pent-1-enil]-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-inoico (34, 35). Una disolución de 33 (198 mg, 0,27 mmoles) en CH₃CN (6,5 mL) se trató con HF-piridina (1,2 mL). La reacción se agitó durante 3 h y se añadió una disolución de bicarbonato de sodio saturada (120 mL). La mezcla se extrajo con diclorometano (3 x 50 mL) y la disolución de diclorometano combinada se secó (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó. La purificación por cromatografía flash (50% de acetato de etilo/hexano) seguida de TLC preparativa (55% de acetato de etilo/hexano) proporcionó 55 mg (0,11 mmoles, 41%) del diastereómero menos polar (34) y 51 mg (0,10 mmoles, 37%) del diastereómero más polar (35).

30 Ácido (Z)-7-[(1*R*,4*S*,5*R*)-5-[(*E*)-5-(3-cloro-benzo[*b*]tiofen-2-il)-3-hidroxi-pent-1-enil]-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-inoico (diastereómero con bajo R_f, 36). Una disolución de 34 (9 mg, 0,017 mmoles) y esterasa de hígado de conejo (1 mg) en tampón fosfato pH 7,2 (2 mL)/CH₃CN (0,1 mL) se agitó durante 17 h. La mezcla se coevaporó entonces con CH₃CN para eliminar el agua y el residuo se purificó por cromatografía flash en gel de sílice (3-7% de MeOH/CH₂Cl₂) para proporcionar 8 mg (0,016 mmoles, 93%) del ácido (36).

35 Ácido (Z)-7-[(1*R*,4*S*,5*R*)-5-[(*E*)-5-(3-cloro-benzo[*b*]tiofen-2-il)-3-hidroxi-pent-1-enil]-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-inoico (diastereómero con alto R_f, 37). Una disolución de 35 (12 mg, 0,023 mmoles) y esterasa de hígado de conejo (1 mg) en tampón fosfato pH 7,2 (2 mL)/CH₃CN (0,1 mL) se agitó durante 17 h. La TLC mostró la presencia de material de partida, de manera que se añadieron otros 2 mg de la esterasa. Después de agitar durante otras 24 h, la reacción se completó. El tratamiento y purificación como anteriormente para 36 proporcionó 8 mg (0,016 mmoles, 69%) del ácido (37).

40 Éster metílico del ácido (Z)-7-[(1*R*,4*S*,5*R*)-5-[(*E*)-5-(3-cloro-benzo[*b*]tiofen-2-il)-3-hidroxi-pent-1-enil]-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-enoico (diastereómero con bajo R_f, 38). Se añadió etanol (95%, 2,5 mL) a NiCl₂ (50 mg, 0,39 mmoles) y NaBH₄ (7 mg, 0,19 mmoles). La mezcla negra resultante se agitó durante 5 min y después se añadió etilendiamina (41 µL, 0,61 mmoles). Después de 15 min, se añadió una disolución del alquino 34 (40 mg, 0,07 mmoles) en 0,5 mL de etanol al 95%, lavando con 0,5 mL de etanol. El matraz se purgó con H₂ y se dejó con agitación bajo 1 atm de H₂ durante 22 h. La mezcla se filtró entonces a través de celite y se purificó por cromatografía flash en gel de sílice (55% de acetato de etilo/hexanos) para proporcionar 17 mg (0,032 mmoles, 43% del alqueno (38).

45 Éster metílico del ácido (Z)-7-[(1*R*,4*S*,5*R*)-5-[(*E*)-5-(3-cloro-benzo[*b*]tiofen-2-il)-3-hidroxi-pent-1-enil]-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-enoico (diastereómero con alto R_f 39). Se siguió el mismo procedimiento que para 36 para proporcionar 17 mg (0,032 mmoles, 41%) de 39.

50 Ácido (Z)-7-[(1*R*,4*S*,5*R*)-5-[(*E*)-5-(3-cloro-benzo[*b*]tiofen-2-il)-3-hidroxi-pent-1-enil]-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-enoico (diastereómero con bajo R_f, 40). Se usó el mismo procedimiento que antes para 36 para proporcionar 9 mg (0,018 mmoles, 85%) del ácido 40. 300 MHz ¹H RMN (CDCl₃, ppm) δ 7,73 (2 H, d, J = 8,4 Hz) 7,45-7,30 (2 H, m) 5,8-5,6 (2 H, m) 5,4-5,3 (2 H, m) 4,3-4,1 (1 H, m) 3,57 (1 H, d, J = 9,7 Hz) 3,1-2,9 (2 H, m) 2,5-1,9 (10 H, m) 1,7-1,6 (2 H, m) 1,09 (3 H, s) 0,89 (3 H, s).

Ácido (Z)-7-[(1*R*,4*S*,5*R*)-5-[(*E*)-5-(3-cloro-benzo[*b*]tiofen-2-il)-3-hidroxi-pent-1-enil]-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-enoico (diastereómero con alto R_f, 41). Se usó el mismo procedimiento que antes para 36 para proporcionar 9 mg (0,018 mmoles, 85%) del ácido 41. 300 MHz ¹H RMN (CDCl₃, ppm) δ 7,73 (2 H, d, J = 8,8 Hz) 7,45-7,30 (2 H, m) 5,8-5,6

(2 H, m) 5,45-5,30 (2 H, m) 4,3-4,2 (1 H, m) 3,61 (1 H, d, J = 9,7 Hz) 3,1-3,0 (2 H, m) 2,5-1,9 (10 H, m) 1,7-1,6 (2 H, m) 1,10 (3 H, s) 0,90 (3 H, s).

(2-Hidroxi-etil)-amida del ácido (Z)-7-[(1*R*,4*S*,5*R*)-5-((*E*)-4-benzo[b]tiofen-2-il-3-hidroxi-but-1-enil)-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-enoico (65). Una disolución del ácido 55 (preparado de manera similar al ácido 41, 7 mg, 0,015 mmoles) en DMF (0,5 mL) se trató con N-hidroxisuccinimida (6,9 mg, 0,056 mmoles). La mezcla se agitó durante 5 minutos y se añadió hidrocloreuro de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDCI, 20,7 mg, 0,11 mmoles). Después de agitar durante 7 h, se añadió 2-aminoetanol (5 μ L, 0,083 mmoles) y la mezcla se agitó adicionalmente durante 16 h. Se añadió acetato de etilo (50 mL) y la mezcla se lavó con agua (3 x 50 mL) y salmuera (50 mL). La capa orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó. La purificación por cromatografía flash en gel de sílice (5% de metanol/diclorometano) seguida de cromatografía en capa fina preparativa (10% de metanol/diclorometano) proporcionó la amida 65 (5 mg, 0,010 mmoles, 65%).

Amida del ácido (Z)-7-[(1*R*,4*S*,5*R*)-5-((*E*)-4-benzo[b]tiofen-2-il-3-hidroxi-but-1-enil)-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-enoico (69). Una disolución del ácido 55 (9 mg, 0,02 mmoles) en diclorometano (0,2 mL) se trató con trietilamina (15 μ L, 0,11 mmoles). La disolución se enfrió hasta 0°C y después de 10 minutos, se añadió cloroformiato de etilo (7 μ L, 0,073 mmoles). La disolución se agitó adicionalmente durante 1 h a 0°C y después se añadió disolución de hidróxido de amonio acuosa concentrada (10 μ L, 0,26 mmoles). La reacción se dejó con agitación a temperatura ambiente toda la noche y entonces se paró por adición de HCl 0,5 M (7 mL). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 mL) y la disolución de acetato de etilo combinada se lavó con disolución de NaHCO₃ saturada (20 mL) y salmuera (20 mL) y entonces se secó (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó. La purificación por cromatografía flash en gel de sílice (2%-6% de metanol/diclorometano) proporcionó la amida del título (2,6 mg, 28%).

Los métodos para cribar los compuestos producidos por el método de esta invención para la actividad biológica deseada se ilustran en los ejemplos no limitativos siguientes. Los resultados para los compuestos ejemplo de esta invención se incluyen en la Tabla 2. Estos resultados se presentan puramente para propósitos ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la invención de ninguna forma.

25 Unión de radioligando

Células que expresan de manera estable los receptores EP₁, EP₂, EP₄ y FP

Las células HEK-293 que expresan de manera estable el receptor FP humano o felino, o los receptores EP₁, EP₂ o EP₄ se lavaron con tampón TME, se rasparon del fondo de los matraces y se homogeneizaron durante 30 seg. usando politrón Brinkman PT 10/35. El tampón TME se añadió para conseguir un volumen final de 40 ml en los tubos de centrífuga (la composición de TME es base TRIS 100 mM, MgCl₂ 20 mM, EDTA 2 mM; se añade HCl 10N para conseguir un pH de 7,4).

El homogeneizado celular se centrifugó a 19000 r.p.m. durante 20 min a 4°C usando un rotor Beckman Ti-60. El sedimento resultante se resuspendió en tampón TME para proporcionar una concentración final de proteínas de 1 mg/ml, según se determina por el ensayo de Biorad. Los ensayos de competición de unión de radioligando frente a [³H]-17-fenil PGF_{2 α} (5 nM) se realizaron en un volumen de 100 μ l durante 60 min. Las reacciones de unión comenzaron por la adición de la fracción de membrana plasmática. La reacción se terminó por la adición de 4 ml de tampón TRIS-HCl enfriado en hielo y filtración rápida a través de filtros de fibra de vidrio GF/B usando un recolector de células Brandel. Los filtros se lavaron 3 veces con tampón enfriado en hielo y se secaron en horno durante una hora.

Se usó [³H]-PGE₂ (actividad específica 180 Ci mmol) como el radioligando para los receptores EP. Se empleó [³H] 17-fenil PGF_{2 α} para los estudios de unión al receptor FP. Los estudios de unión empleando los receptores EP₁, EP₂, EP₄ y FP se realizaron en duplicado en al menos tres experimentos separados. Se usó un volumen de ensayo de 200 μ l. Las incubaciones fueron durante 60 min a 25°C y se terminaron por la adición de 4 ml de TRIS-HCl 50 mM enfriado en hielo, seguido de filtración rápida a través de filtros Whatman GF/B y tres lavados adicionales de 4 ml en un recolector de células (Brandel). Los estudios de competición se realizaron usando una concentración final de [³H]-PGE₂ 5 nM o [³H] 17-fenil PGF_{2 α} 5 nM y la unión no específica se determinó con 10⁻⁵ M de PGE₂, o 17-fenil PGF_{2 α} , no marcado según el subtipo de receptor estudiado.

Métodos para los estudios FLIPR™

(a) Cultivo celular

Las células HEK-293(EBNA), que expresan de manera estable un tipo o subtipo de receptores de prostaglandina humana recombinante (receptores de prostaglandina expresados: hDP/Gqs5; hEP₁; hEP₂/Gqs5; hEP_{3A}/Gqi5; hEP₄/Gqs5; hFP; hIP; hTP), se cultivaron en placas de cultivo de 100 mm en medio DMEM con alto contenido en

ES 2 515 217 T3

glucosa que contiene 10% de suero fetal bovino, 1-glutamina 2 mM, 250 µg/ml de geneticina (G418) y 200 µg/ml de higromicina B como marcadores de selección y 100 unidades/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B.

(b) Estudios de señal de calcio en el FLIPR™

5 Las células se sembraron a una densidad de 5×10^4 células por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo transparente, de pared negra recubiertas con poli-D-lisina Biocoat® (Becton-Dickinson) y se dejó que se adhirieran toda la noche en una incubadora a 37°C. Las células se lavaron entonces dos veces con tampón HBSS-HEPES (Disolución de Sal Equilibrada de Hanks sin bicarbonato ni rojo de fenol, HEPES 20 mM, pH 7,4) usando un lavador de placas Denley Cellwash (Labsystems). Después de 45 minutos de carga de agente de tinción en la oscuridad usando el agente de tinción
10 sensible al calcio Fluo-4 AM a una concentración final de 2 µM, las placas se lavaron cuatro veces con tampón HBSS-HEPES para eliminar el exceso de agente de tinción dejando 100 µl en cada pocillo. Las placas se re-equilibraron a 37°C durante unos pocos minutos.

15 Las células se excitaron con un láser de Argón a 488 nm y la emisión se midió mediante un filtro de emisión con un ancho de banda de 510-570 nm (FLIPR™, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La disolución de fármaco se añadió en un volumen de 50 µl a cada pocillo para proporcionar la concentración final deseada. El incremento en el pico de la intensidad de fluorescencia se registró para cada pocillo. En cada placa, cuatro pocillos sirvieron como controles negativos (tampón HBSS-HEPES) y positivos (agonistas estándar: BW245C (hDP); PGE₂ (hEP₁; hEP₂/Gqs5; hEP_{3A}/Gqi5; hEP₄/Gqs5); PGF_{2α} (hFP); carbaciclina (hIP); U-46619 (hTP), dependiendo del receptor). El cambio en el pico de fluorescencia en cada pocillo que contiene fármaco se expresó entonces respecto a los controles.

20 Los compuestos se ensayaron en un formato de alto rendimiento (HTS) o de respuesta a la concentración (CoRe). En el formato HTS, cuarenta y cuatro compuestos por placa se examinaron en duplicados a una concentración de 10^{-5} M. Para generar curvas de respuesta a la concentración, cuatro compuestos por placa se ensayaron en duplicados en un intervalo de concentración entre 10^{-5} y 10^{-11} M. Los valores en duplicado se promediaron. En los formatos HTS o CoRe cada compuesto se ensayó en al menos 3 placas separadas usando células de diferentes pasajes para proporcionar un
25 $n \geq 3$.

Tabla 2

Compuesto	hFP	hEP ₁	hEP ₂	hEP _{3D} hEP _{3A}	hEP ₄	hDP	hIP	hTP
21	NA	NA	>10K	NA	98	NA	NA	NA
22	NA	NA	NA	NA	300	NA	NA	NA
23	NA	NA	NA	>10K	44	NA	NA	>10K
24	NA	NA	NA	>>10K	26	NA	NA	NA
34	NA		NA	NA	>10K		NA	NA
35	NA			NA	2455		NA	NA
36	NA		NA	NA	200		>10K	NA
37	NA		NA	NA	100		>10K	NA
38			NA		2700		NA	NA

ES 2 515 217 T3

	NA			NA	269			
39	NA		NA	NA	2300 141		NA	NA
40	NA		NA	NA	200 0,3		NA	>10K
41	NA		>10K	NA	20		NA	>10K
42	NA	NA	NA	>10 ⁴ 559	>10 ⁴ NA	NA	NA	NA
43	NA	>10 ⁴	NA	1700 11	400 63		3981	18
44	NA	782	1500 944	300 4,6	5,5 0,2	>10K	284	18
45	NA	NA	NA	>10 ⁴ 531	400 51	NA	NA	631 NA
46	NA	290	>10K	>10K 589	4 0,4	NA	NA	
47	NA	963	NA	>10K	76		NA	
48			NA		45			
49			NA		1400			
50	NA	638	NA	6607 >10K	2400 3162		NA	>10K
51	NA		NA	NA	700		NA	
52	NA	27	NA	60	72 18		NA	
53	NA	1020	NA	1862	59 6,4		NA	
54	NA	308	NA NA	4700	20 0,3	NA	NA	
55	NA	758	NA NA	>10K	310 38	NA	NA	
60	NA	NA	NA	NA	>10K	NA	NA	NA
61	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
62	NA	NA	NA	NA	832	NA	NA	NA

ES 2 515 217 T3

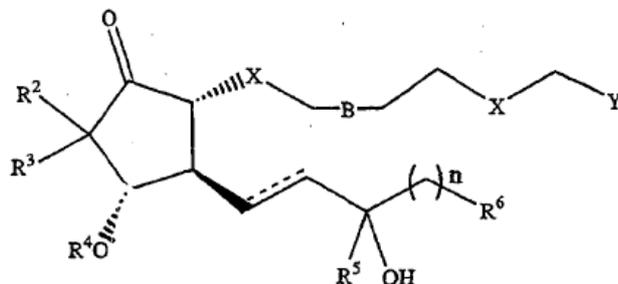
63	NA	>10K	NA	NA	478	NA	NA	NA
64	NA	NA	NA	NA	4154	NA	NA	NA
65	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
68	NA	NA	NA	NA	678	NA	NA	>10K
69	NA	NA	NA	NA	5000	NA	NA	>10K
70	NA	NA	NA	>10K	219	NA	NA	
71	NA	NA	NA	NA	10000	NA	NA	
72	NA	NA	NA	NA	>10K	NA	NA	NA
73	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
74	NA	2376	NA		256	NA	NA	
75	NA	2050	NA		>10K	NA	NA	>10K
<p>Los números en la parte superior son los valores de unión del radioligando (nm)</p> <p>Los números en la parte inferior son los datos funcionales (nm)</p>								

5 La descripción precedente detalla métodos y composiciones específicas que pueden emplearse para practicar la presente invención, y representa el mejor modo contemplado. Sin embargo, es evidente para un experto en la técnica que compuestos adicionales con las propiedades farmacológicas deseadas pueden prepararse de una manera análoga, y que los compuestos descritos pueden obtenerse también a partir de diferentes compuestos de partida por medio de diferentes reacciones químicas. De forma similar, pueden prepararse diferentes composiciones farmacéuticas y usarse con esencialmente el mismo resultado. Así, sin embargo detallado lo precedente puede aparecer en texto, no podría construirse como limitante del alcance total aquí; más bien, el ámbito de la presente invención se va a controlar solo mediante la construcción legal de las reivindicaciones anexas.

10

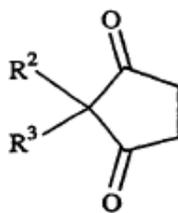
REIVINDICACIONES

1. Un método para hacer compuestos de Fórmula V:

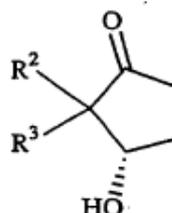


Fórmula V

5 en la que la parte de la síntesis comprende reducir un compuesto de Fórmula VI a un compuesto de Fórmula VII en presencia de levadura de panadero



Fórmula VI



Fórmula VII

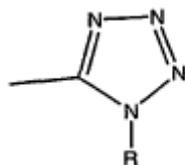
10 en la que las líneas discontinuas indican la presencia o ausencia de un enlace, las cuñas rayadas indican la configuración α (abajo) y los triángulos llenos indican la configuración β (arriba);

B es un enlace covalente simple, doble o triple;

n es 0-6;

X es CH₂, S o O;

15 Y es cualquier sal farmacéuticamente aceptable de CO₂H, CO₂R, CONR₂, CONHCH₂CH₂OH, CON(CH₂CH₂OH)₂, CH₂OR, P(O)(OR)₂, CONRSO₂R, SONR₂, o



R es H, alquilo C₁₋₆ o alqueno C₂₋₆;

R² y R³ son alquilo C₁₋₆ lineal que pueden ser el mismo o diferente y pueden estar unidos entre sí de manera que forman un anillo que incorpora el carbono al que están unidos comúnmente;

20 R⁵ es hidrógeno o R; y

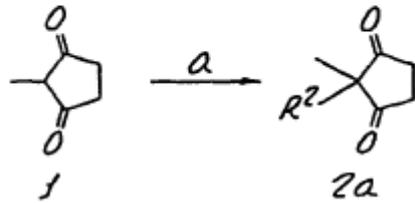
R⁶ es

i) hidrógeno;

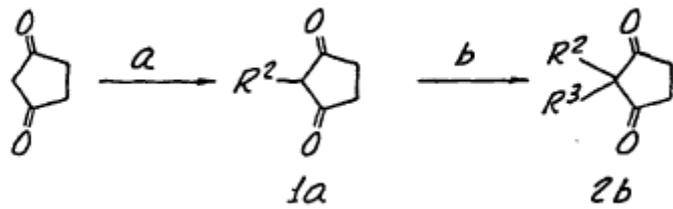
- ii) un hidrocarburo lineal o ramificado que contiene entre 1 y 8 átomos de carbono, que puede contener uno o más enlaces dobles o triples, o derivados de oxígeno o de halógeno de dicho hidrocarburo, en el que 1-3 átomos de carbono o de hidrógeno pueden estar sustituidos por O o un halógeno; o
- 5 iii) ariloxi, heteroariloxi, cicloalquiloxi C₃₋₈, cicloalquilo C₃₋₈, arilo C₆₋₁₀ o heteroarilo C₃₋₁₀, en el que uno o más carbonos está sustituido con N, O o S; y que puede contener uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, trihalometilo, ciano, nitro, amino, hidroxilo, arilo C₆₋₁₀, heteroarilo C₃₋₁₀, ariloxi, heteroariloxi, alquilo C₁₋₆, OR, SR y SO₂R.

Fig. 1.
(ESQUEMA 1)

ECUACIÓN 1



ECUACIÓN 2



ECUACIÓN 3

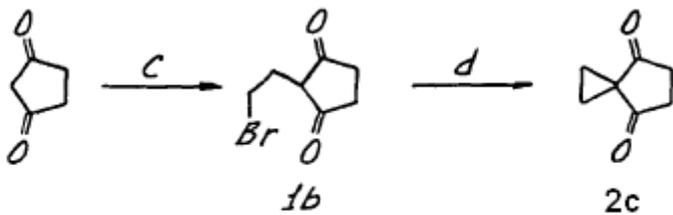


Fig. 2.
(ESQUEMA 2)

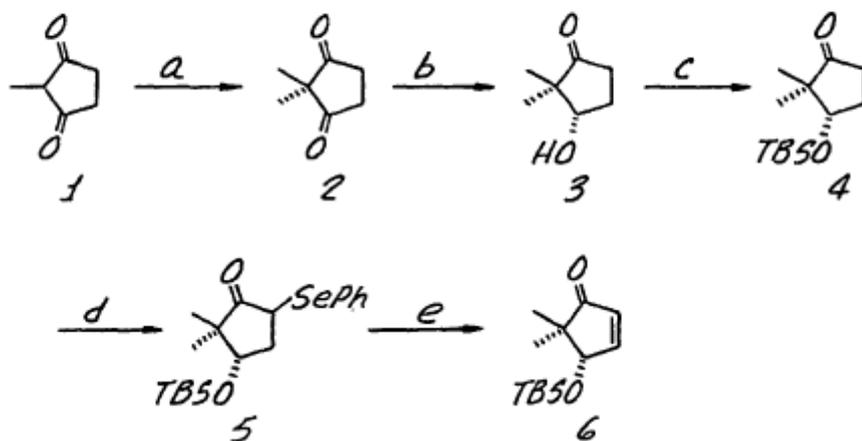


FIG. 3.
(ESQUEMA 3)

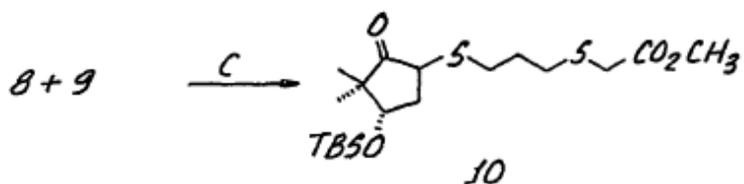
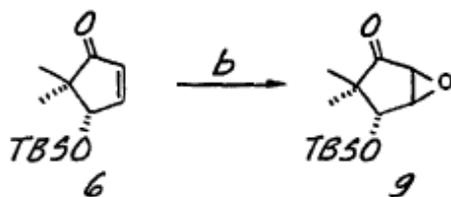
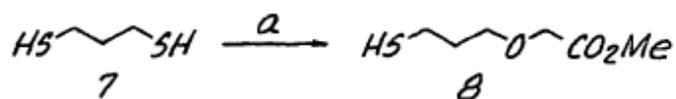


FIG. 5.
(ESQUEMA 5)

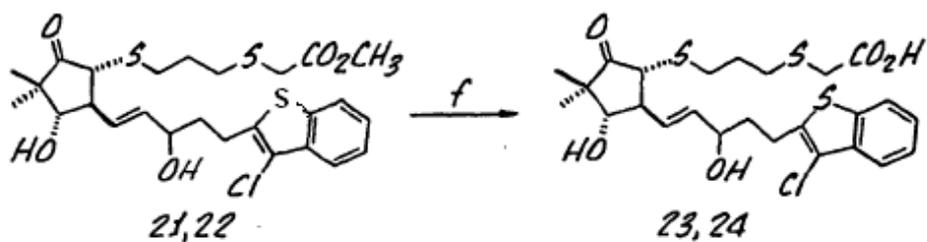
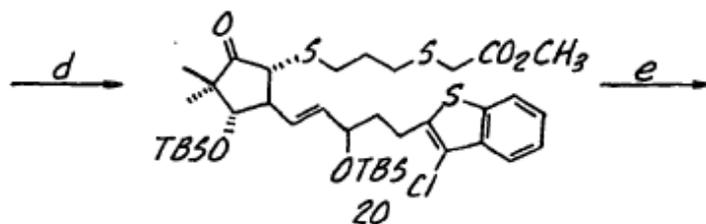
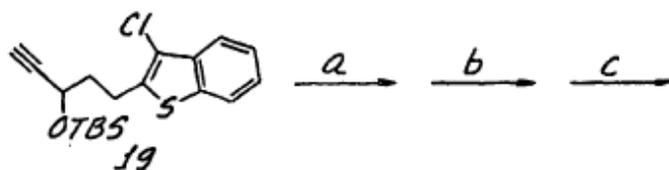


Fig. 4.
(ESQUEMA 4)

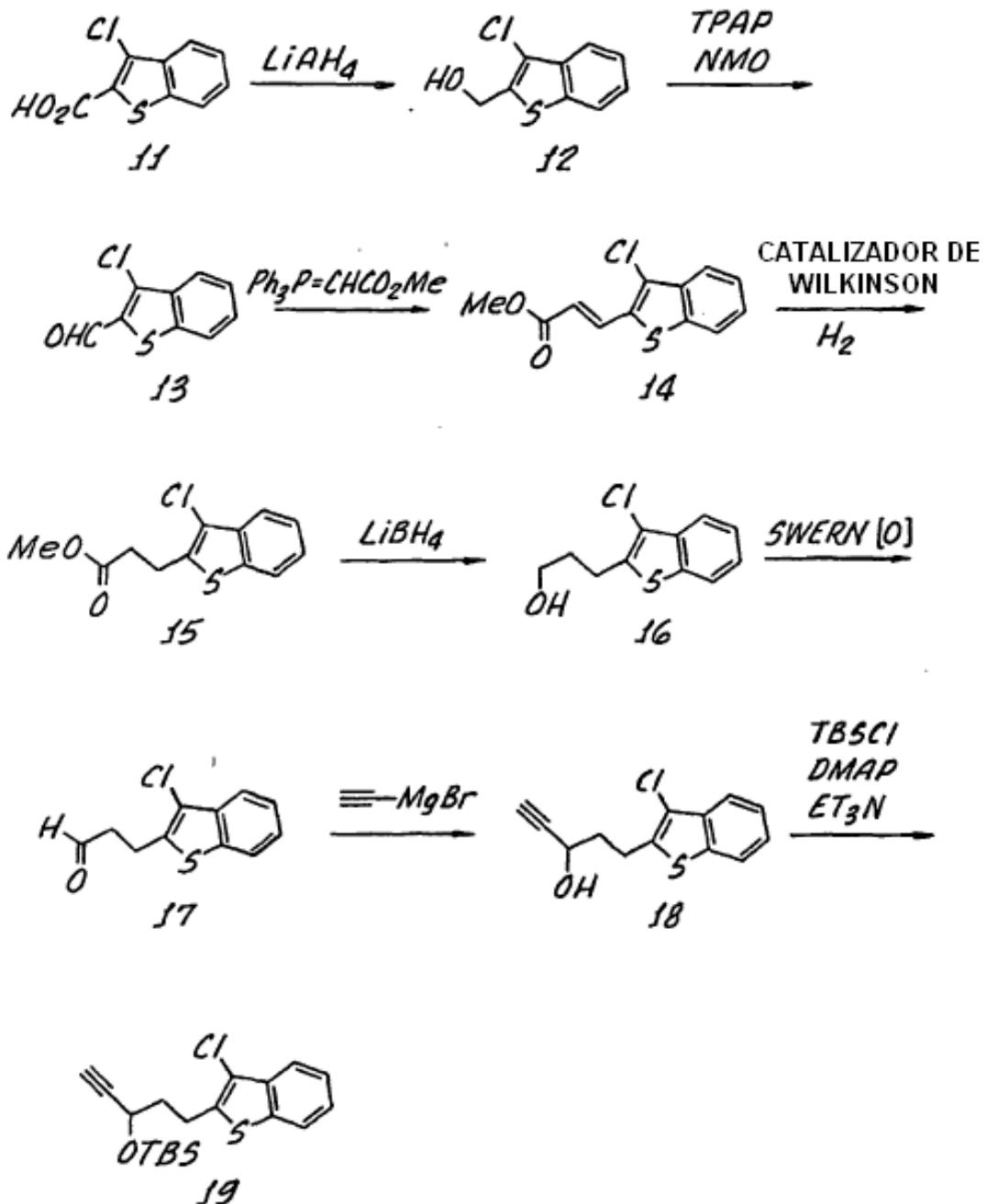


FIG. 6.
(ESQUEMA 6)

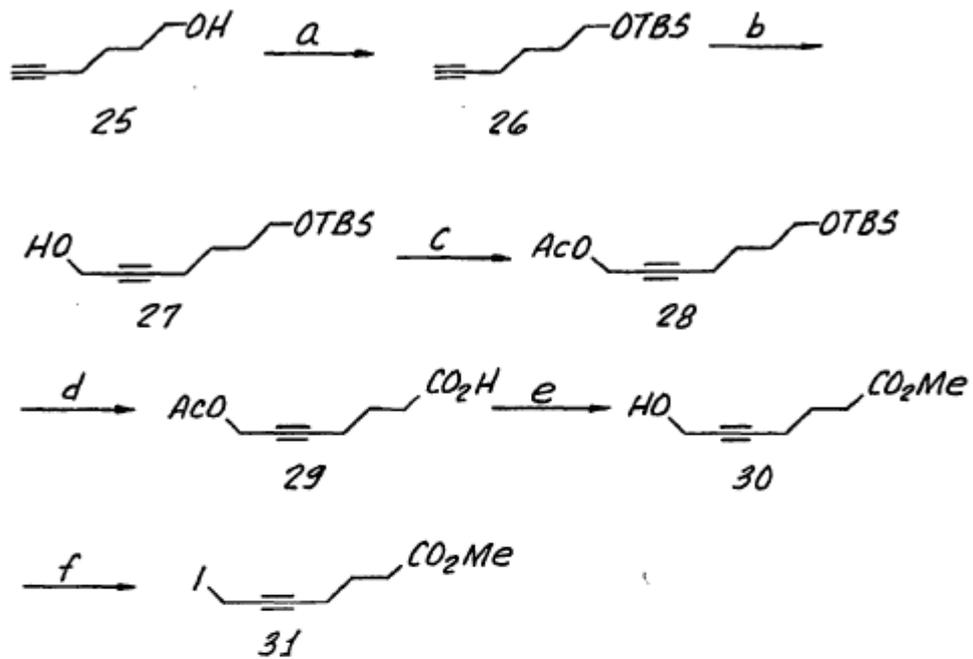


FIG. 8.
(ESQUEMA 8)

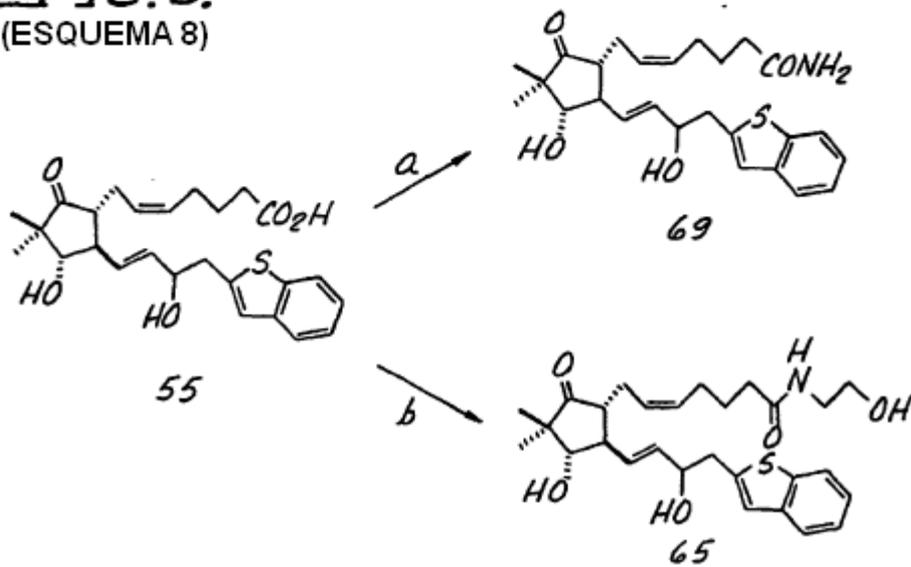
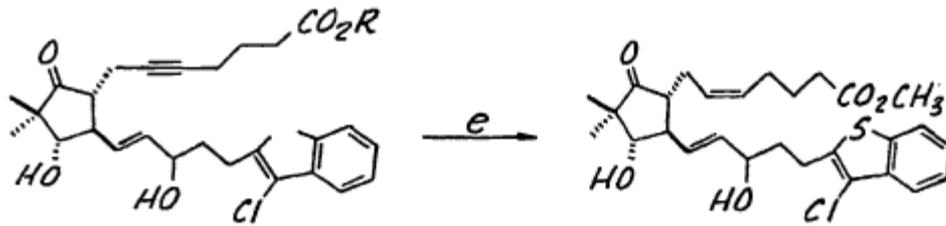
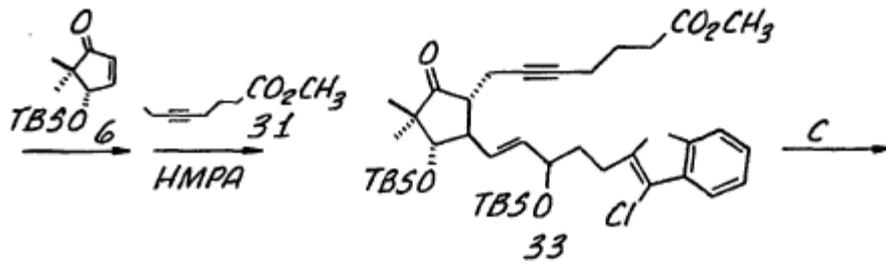
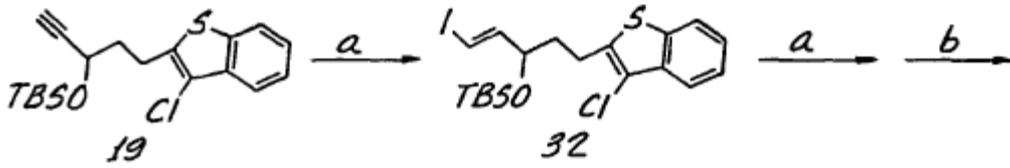


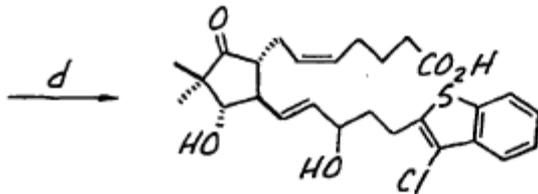
Fig. 7
(ESQUEMA 7)



DIASTEREÓMEROS CON BAJO Ri + ALTO Ri DIASTEREÓMEROS CON BAJO Ri + ALTO Ri

34,35 R=CH₃
36,37 R=H) d

38,39



DIASTEREÓMEROS CON BAJO Ri + ALTO Ri

40,41