

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 229**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 31/41</b>	(2006.01)
<b>A61P 1/02</b>	(2006.01)
<b>A61P 1/04</b>	(2006.01)
<b>A61P 1/16</b>	(2006.01)
<b>A61P 7/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 9/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 9/10</b>	(2006.01)
<b>A61P 11/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 11/06</b>	(2006.01)
<b>C07D 405/06</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2011 PCT/JP2011/055411**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2011 WO11111714**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2011 E 11753372 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2545917**

54 Título: **Nuevo agonista de EP4**

30 Prioridad:

**02.11.2010 JP 2010246208**  
**08.03.2010 JP 2010051127**

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

**07.12.2016**

73 Titular/es:

**KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)**  
**28-8, Honkomagome 2-chome**  
**Bunkyo-ku, Tokyo 113-8650, JP y**  
**ASAHI GLASS COMPANY, LIMITED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MURATA, TAKAHIKO;**  
**AMAKAWA, MASAHIRO;**  
**TERADAIRA, SHIN;**  
**MATSUMURA, YASUSHI y**  
**KONISHI, KATSUHIKO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 593 229 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**

Nuevo agonista de EP4

**Campo técnico de la invención**

5 La presente invención se refiere a un medicamento para uso, que comprende un derivado de la 7,7-difluoroprostaglandina I<sub>2</sub> en donde el grupo carboxi en el C-1 de la prostaglandina (de aquí en adelante denominada PG) está sustituido por un grupo tetrazol, y dos átomos de flúor están unidos en el C-7 de la PG, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, una composición farmacéutica del mismo, y un uso farmacéutico del mismo. Más específicamente, la presente invención se refiere a un medicamento que comprende un derivado de la 10 7,7-difluoroprostaglandina I<sub>2</sub> que es un agonista del receptor EP4 para uso en la profilaxis o tratamiento de enfermedades inmunitarias, enfermedades cardiovasculares, enfermedades cardíacas, enfermedades respiratorias, enfermedades oftalmológicas, enfermedades renales, enfermedades hepáticas, enfermedades óseas, enfermedades del tracto digestivo, enfermedades neurológicas, enfermedades de la piel y similares.

**Antecedentes de la invención**

15 Las PG naturales se unen cada una a sus receptores específicos, y presentan acciones características. Un receptor para cada una de PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>α y tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) se llama IP, EP, DP, FP y TP, respectivamente. Además, EP tiene adicionalmente cuatro subtipos, EP1, EP2, EP3 y EP4. Estos receptores de PG muestran diferentes patrones de expresión en los órganos y células, e incluso si los receptores se expresan en la misma célula, las acciones demostradas son por ello diferentes.

20 Aunque los derivados de las PG naturales están bajo la influencia del esqueleto de carbono original, llegan a unirse a diferentes receptores puesto que las estructuras cambian (documentos de no patente 1 y 2).

Los derivados de PG que tienen un grupo tetrazol en lugar del grupo carboxi en el C-1 de la prostaglandina, han sido descritos en los siguientes documentos de patente 1-4, documento de no patente 2 y similares. Además, han sido descritos los análogos de 7,7-difluoro-PGI<sub>2</sub> y métodos de fabricación de los mismos (documentos de patente 5 y 6). En adición, se ha descrito que los análogos de 7,7-difluoro-PGI<sub>2</sub> son útiles como agentes profilácticos o terapéuticos 25 para las enfermedades cardiovasculares (documento de patente 5). Los documentos de patente 5 y 7 describen análogos de 7,7-difluoro-PGI<sub>2</sub>, como inhibidores de la agregación plaquetaria; los compuestos carecen de un grupo tetrazolilo. Los análogos de 7,7-difluoro-PGI<sub>2</sub> no sólo se unen fuertemente al receptor IP, sino que se unen también débilmente a los receptores EP1-4 (documentos de no patente 4 y 5). El documento de no patente 27 describe un 7,7-difluoro-PGI<sub>2</sub> que carece de un grupo fenilo y de un grupo tetrazolilo, como agonista de IP. El documento de 30 patente D8 describe análogos de 7,7-difluoro-PGI<sub>2</sub> que se supone que son útiles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del tracto digestivo. El documento de patente 9 describe derivados de PGI<sub>2</sub> que se supone que tienen actividad agonista de EP4, pero carecen de la sustitución con 7,7-difluoro. El documento de no patente 28 describe derivados de oxo-pirrolidinilo que se supone que son agonistas selectivos de EP4. Sin embargo, no ha sido descrito un agonista selectivo de EP4, que es uno de los análogos de 7,7-difluoro-PGI<sub>2</sub>, que presenta una 35 débil afinidad de unión a IP, EP1, EP2 y EP3 y que se une fuerte y selectivamente sólo a EP4.

El receptor EP4 se expresa en las células inmunitarias, células inflamatorias, órganos digestivos, vasos sanguíneos, células neuronales, los ojos, los riñones, los huesos y similares, y se han investigado y desarrollado agonistas de EP4 como un medicamento para enfermedades inmunitarias, enfermedades del tracto digestivo, enfermedades 40 cardiovasculares, enfermedades cardíacas, enfermedades neurológicas, enfermedades oftalmológicas, enfermedades renales, enfermedades hepáticas, enfermedades óseas y similares.

Los agonistas de EP4 inhiben la producción de TNF-α, promueven la producción de IL-10, deprimen la inflamación y la inmunorreacción, y se considera que son útiles para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades inmunitarias o enfermedades inflamatorias tales como las enfermedades autoinmunes (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico), el rechazo después de un 45 trasplante y similares, el asma, la muerte celular neuronal, artritis, lesión pulmonar, fibrosis pulmonar, enfisema, bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, hepatopatía, hepatitis aguda, nefritis (nefritis aguda, nefritis crónica), insuficiencia renal, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, septicemia, síndrome hemofagocítico, síndrome de activación de macrófagos, enfermedad de Still, enfermedad de Kawasaki, quemaduras, granuloma sistémico, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, hipercitoquinemia en diálisis, insuficiencia multiorgánica, shock y 50 psoriasis.

Se considera que los agonistas de EP4 son útiles para la profilaxis y/o tratamiento de la arteriosclerosis, ya que deprimen la activación de los macrófagos (documento de no patente 6).

Se considera que los agonistas de EP4 son útiles como un agente para la profilaxis y/o tratamiento de la angina de 55 pecho o infarto de miocardio, ya que tienen una acción protectora frente al daño cardíaco por isquemia-reperusión (documento de no patente 7).

Se considera que los agonistas de EP4 son útiles también como un agente para la profilaxis y/o tratamiento de un trastorno cerebral inducido por hemorragia cerebral, infarto cerebral, hemorragia subaracnoidea y similares, ya que tienen también una acción protectora frente al daño cerebral por isquemia-reperfusión (documento de no patente 8).

5 Se considera que los agonistas de EP4 son útiles también como un agente para la profilaxis y/o tratamiento del daño hepático por isquemia-reperfusión (documento de no patente 9).

Se considera que los agonistas de EP4 son útiles como un agente para la profilaxis y/o tratamiento del glaucoma, ya que tienen una acción de reducción de la presión intraocular (documento de no patente 10).

10 Se considera que los agonistas de EP4 son útiles también para la profilaxis y/o tratamiento de la glomerulonefritis y de la nefritis diabética, puesto que el EP4 se expresa abundantemente en los glomérulos renales (documento de no patente 11).

Se considera que los agonistas de EP4 son útiles también para la profilaxis y/o tratamiento de las calvicies, alopecia y similares, ya que el EP4 está también implicado en el crecimiento del cabello y en la restauración del cabello (documento de no patente 12).

15 Se considera que los agonistas de EP4 son útiles como un agente (promotor) de la maduración del cuello uterino, ya que el EP4 está implicado también en la maduración del cuello uterino (documento de no patente 13).

Se considera que los agonistas de EP4 son útiles como un agente para la profilaxis y/o tratamiento de la osteoporosis, o como promotores de la consolidación de las fracturas óseas, puesto que el EP4 también está implicado en una acción osteogénica (documentos de no patente 14 y 15).

20 Puesto que el EP4 se expresa en los vasos sanguíneos y los agonistas de EP4 relajan los vasos sanguíneos y contribuyen a un aumento del flujo sanguíneo, se considera que son útiles para la profilaxis y/o tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar, obstrucción arterial periférica (arteriosclerosis obliterante y tromboangitis obliterante) y diversos síntomas (claudicación intermitente con estenosis espinal lumbar, entumecimiento de las piernas, síndrome de Raynaud, disfunción eréctil, hemorroides, etc.) atribuidos a alteraciones de la circulación periférica (documentos de no patente 16 -20).

25 El EP4 se expresa en los fibroblastos, y un agonista de EP4 se considera que promueve la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos básico y es útil para promover la curación de las úlceras y heridas por presión (documento de no patente 21).

Se ha publicado que el EP4 se expresa en la cóclea, y un agonista de EP4 es útil también para la profilaxis y/o tratamiento de un trastorno auditivo causado por ruido (documento de no patente 22).

30 La inflamación del tracto digestivo se observa en la cavidad bucal, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso y en el ano, e incluye la inflamación aguda y la inflamación crónica. Cuando los epitelios de las mucosas se ven afectados por estímulos físicos o químicos, o están infectados por bacterias o virus, se induce la inflamación y se producen erosiones o lesiones ulcerosas que dependen del nivel de la inflamación. La secreción excesiva de ácido gástrico debida a estrés provoca gastritis, úlcera gástrica o úlcera duodenal. Además, la ingestión excesiva de alcohol induce la congestión del flujo sanguíneo de la mucosa o el reflujo de ácido gástrico debido a la reducción de la motilidad del estómago, provocando de este modo gastritis, úlcera gástrica, úlcera duodenal o esofagitis. Los pacientes ortopédicos, los pacientes con artritis reumatoide y similares con una administración a largo plazo de un medicamento anti-inflamatorio no esteroideo, sufren de úlcera gástrica o úlcera duodenal inducida por fármacos. Además, los pacientes con cáncer desarrollan enteritis por radiación con la terapia de radiación o enteritis inducida por fármacos con el tratamiento farmacológico anti-cáncer. Por otra parte, los pacientes infectados con tuberculosis, disentería amebiana y similares desarrollan enterogastritis infecciosas tales como tuberculosis intestinal y colitis amebiana. Además de éstas, se desarrollan enteritis isquémica y similares por isquemia debido a la obstrucción del flujo sanguíneo. Si la inmunidad de los pacientes con inflamación del tracto digestivo es anormal, incluso cuando se elimina la causa, se impide la reparación del órgano y las condiciones se vuelven crónicas. De estas enfermedades inflamatorias del tracto digestivo, las enfermedades con inflamación en el intestino se conocen como enfermedad inflamatoria del intestino en un sentido amplio.

50 Por otro lado, hay enfermedades inflamatorias intestinales de causa no identificada. La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son dos enfermedades bien conocidas, que son enfermedad inflamatoria del intestino en un sentido estricto. Además, la enfermedad inflamatoria intestinal incluye también enfermedades similares, tales como la enfermedad intestinal de Behcet y la úlcera simple. Hay enfermedades gastrointestinales crónicas intratables junto con remisiones y recaídas repetidas, en las que la principal etiología de la enfermedad se considera que es una menor protección del epitelio intestinal, o una respuesta inmunitaria intestinal anormal frente a las bacterias entéricas que entran en los tejidos intestinales.

55 La colitis ulcerosa es una enfermedad crónica del colon en la cual se forman erosiones y úlceras en la mucosa del intestino grueso de forma continua desde el recto, y los síntomas de la misma incluyen dolor abdominal, diarrea, heces sanguinolentas, fiebre y similares. Por otro lado, en la enfermedad de Crohn, puede aparecer una lesión en

cualquier parte del tracto digestivo desde la cavidad bucal hasta el intestino grueso y el ano. Esta enfermedad se caracteriza por úlceras longitudinales discontinuas y aspecto de adoquinado en el tracto gastrointestinal, y los síntomas de la misma incluyen dolor abdominal, diarrea, fiebre, desnutrición debida a la mala absorción de nutrientes, anemia, y similares.

- 5 Para la profilaxis y/o tratamiento de la inflamación en las enfermedades inflamatorias del tracto digestivo, en el caso de que tengan una causa conocida, se elimina o se reduce la causa. Por ejemplo, se utilizan antiácidos, agentes anticolinérgicos, antagonistas del receptor de histamina H2, inhibidores de la bomba de protones y similares, contra la inflamación en la gastritis, úlcera gástrica, úlcera duodenal y similares, para reducir la secreción y las acciones del ácido gástrico. En otros casos, se utilizan derivados de PGE y similares para complementar la PGE<sub>2</sub> para la inflamación inducida por un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo, que inhibe la producción de PGE<sub>2</sub>. Sin embargo, no se utilizan derivados de la PGI<sub>2</sub>.

- 15 Por otro lado, la profilaxis o el tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino en un sentido estricto, incluye la terapia con fármacos, la terapia nutricional (dieta) y la terapia quirúrgica. Para la terapia con fármacos, se utilizan preparaciones de ácido 5-aminosalicílico (pentasa, salazopirina), esteroides (prednisolona), inmunodepresores (azatiopurina, mercaptopurina y tacrolimus), anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  (infliximab) y similares. Recientemente se ha informado que un agonista de EP4 es eficaz para la enfermedad inflamatoria del intestino (documentos de no patente 23-25).

- 20 Además, puesto que el EP4 está implicado también en la acción protectora de la mucosa, se considera que un agonista de EP4 es útil para la profilaxis y/o el tratamiento de daños del tracto gastrointestinal tales como úlcera gástrica, úlcera duodenal y similares, y estomatitis (documento de no patente 26).

**Documentos de la técnica anterior**

Documentos de patente

- documento de patente 1: DE 2405255
- documento de patente 2: WO 03/103664
- 25 documento de patente 3: WO 00/24727
- documento de patente 4: USP No.7402605
- documento de patente 5: JP-A-7-330752
- documento de patente 6: JP-A-2004-256547
- documento de patente 7: EP 0 669 329 A1
- 30 documento de patente 8: EP 2 343 292 A1 que corresponde a WO 2010/029925 A1
- documento de patente 8: WO 2008/116670 A1

Documentos de no patente

- documento de no patente 1: Biochim. Biophys. Acta, 1483: 285-293 (2000).
- documento de no patente 2: Br. J. Pharmacol., 122: 217-224 (1997).
- 35 documento de no patente 3: J. Med. Chem., 22: 1340-1346 (1979).
- documento de no patente 4: Prostaglandins, 53: 83-90 (1997).
- documento de no patente 5: Br. J. Pharmacol., 134: 313-324 (2001).
- documento de no patente 6: J. Biol. Chem., 283: 9692-9703 (2008).
- documento de no patente 7: Cardiovasc. Res., 81: 123-132 (2009).
- 40 documento de no patente 8: Neurosci. Lett., 438: 210-215 (2008).
- documento de no patente 9: Trasplant. Proc., 37: 422-424 (2005).
- documento de no patente 10: Exp. Eye Res, 89: 608-617 (2009).
- documento de no patente 11: Kidney Int, 70: 1099-1106 (2006).
- documento de no patente 12: Biochem. Biophys. Res. Commun, 290: 696-700 (2002).

documento de no patente 13: Biol. Reprod., 75: 297-305 (2006).

documento de no patente 14: Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 99: 4580-4585 (2002).

documento de no patente 15: Expert Opin. Investig Drugs., 18: 746-766 (2009).

documento de no patente 16: Hypertension, 50: 525-530 (2007).

5 documento de no patente 17: Br. J. Pharmacol., 154: 1631-1639 (2008)

documento de no patente 18: Am. J. Respir. Crit. Care Med, 178: 188-196 (2008).

documento de no patente 19: Spine, 31: 869-872 (2006).

documento de no patente 20: Br. J. Pharmacol., 136: 23-30 (2002)

documento de no patente 21: Kobe J. Med. Sci., 47: 35-45 (2001).

10 documento de no patente 22: Neuroscience, 160: 813-819 (2009).

documento de no patente 23: J. Clin Invest, 109: 883-893 (2002).

documento de no patente 24: Scand. J. Immunol., 56: 66-75 (2002).

documento de no patente 25: J. Pharmacol. Exp. Ther., 320: 22-28 (2007).

documento de no patente 26: World. J. Gastroenterol., 15: 5149-5156 (2009).

15 documento de no patente 27: Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 72: 289-299 (2005).

documento de no patente 28: Bioorg. Med. Chem, Lett., 13: 1129-1132 (2003).

### Sumario de la invención

Problemas a resolver por la invención

20 La presente invención tiene como objetivo proporcionar un medicamento que comprende un compuesto que es un derivado de la prostaglandina I<sub>2</sub>, superior en estabilidad metabólica, y que se une selectivamente a un receptor específico de prostaglandina.

Medios para resolver los problemas

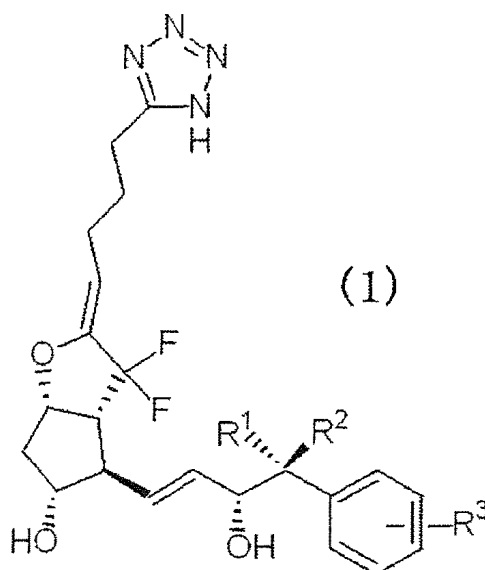
25 En un intento de resolver los problemas mencionados anteriormente, en la presente invención se han sintetizado análogos de PG dotados con las propiedades particulares de los átomos de flúor y se han realizado estudios para aclarar las propiedades y actividad fisiológica de los mismos. Como resultado, se ha encontrado que un derivado de 7,7-difluoro-PGI<sub>2</sub>, en el que el grupo carboxi en el C-1 del esqueleto del ácido prostanoico está sustituido por un grupo tetrazol y que tiene unidos dos átomos de flúor, es excelente en cuanto a propiedades y acción farmacológica, y que inesperadamente, aun cuando se trata de un derivado de la PGI<sub>2</sub>, tiene una actividad agonista selectiva de EP4 y pierde considerablemente la actividad agonista de IP, que se observa en la forma carboxilato en C-1, y que es un excelente compuesto químico para uso como medicamento debido a dichas acciones agonistas, lo que dio como resultado la realización de la presente invención. El agonista selectivo de EP4 puede ser un ingrediente activo de un medicamento con efectos secundarios reducidos a través de otros receptores.

35 Por lo tanto, la presente invención proporciona un medicamento que comprende, como ingrediente activo, un derivado de 7,7-difluoro-PGI<sub>2</sub> representado por la siguiente fórmula (1), que es un agonista selectivo de EP4 (de aquí en adelante abreviado a veces como compuesto (1) de la presente invención), una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y se refiere, de acuerdo con las reivindicaciones, a lo siguiente:

40 [1] Un medicamento para uso en la profilaxis y/o tratamiento de una enfermedad inmunitaria, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad cardíaca, una enfermedad respiratoria, una enfermedad oftalmológica, una enfermedad renal, una enfermedad hepática, una enfermedad ósea, una enfermedad neurológica, una enfermedad de la piel, calvicies, alopecia, insuficiencia de la maduración del cuello uterino o un trastorno auditivo,

en donde la enfermedad inmunitaria es esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, rechazo después de un trasplante, artritis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, septicemia, síndrome hemofagocítico, síndrome de activación de macrófagos, enfermedad de Still, enfermedad de Kawasaki, hipercitoquinemia en diálisis, insuficiencia multiorgánica, shock o psoriasis, y

45 en donde el medicamento comprende como un ingrediente activo, un agonista de EP4 que comprende un compuesto representado por la fórmula (1):



- 5 en la que  $R^1$  y  $R^2$  son cada uno, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de cadena lineal que tiene un número de carbonos de 1 a 3, y  $R^3$  es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo que tiene un número de carbonos de 1 a 4, un grupo alcoxilquilo, un grupo arilo, un átomo de halógeno o un grupo haloalquilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- [2] El medicamento para uso según [1], en donde  $R^1$  es un grupo metilo.
- [3] El medicamento para uso según [1] o [2], en donde  $R^3$  es un grupo metilo.
- [4] El medicamento para uso según cualquiera de [1] a [3], en donde  $R^2$  es un átomo de hidrógeno.
- 10 [5] El medicamento para uso según cualquiera de [1] a [4], en donde  $R^1$  es un grupo metilo, y  $R^2$  es un átomo de hidrógeno.
- [6] El medicamento para uso según cualquiera de [1] a [5], en donde  $R^3$  es un grupo m-metilo.
- [7] El medicamento para uso según [1], en donde  $R^1$  es un grupo metilo,  $R^2$  es un átomo de hidrógeno, y  $R^3$  es un grupo metilo.
- 15 [8] El medicamento para uso según [1], en donde  $R^1$  es un átomo de hidrógeno,  $R^2$  es un grupo metilo, y  $R^3$  es un grupo metilo.
- [9] El medicamento para uso según [1], en donde el agonista de EP4 es 4-[(Z)-(1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4RS)-3-hidroxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-hidroxi-2-oxa-4,4-difluoro-biciclo[3.3.0]octan-3-iliden]-1-(tetrazol-5-il)butano, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 20 [10] El medicamento para uso según [1], en donde el agonista de EP4 es 4-[(Z)-(1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4R)-3-hidroxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-hidroxi-2-oxa-4,4-difluoro-biciclo[3.3.0]octan-3-iliden]-1-(tetrazol-5-il)butano, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- [11] El medicamento para uso según [1], en donde el agonista de EP4 es 4-[(Z)-(1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4S)-3-hidroxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-hidroxi-2-oxa-4,4-difluoro-biciclo[3.3.0]octan-3-iliden]-1-(tetrazol-5-il)butano, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 25 [12] El medicamento para uso según cualquiera de [1] a [11], en donde la enfermedad cardiovascular o enfermedad cardíaca es arterioesclerosis, angina de pecho, infarto de miocardio, trastorno cerebral causado por hemorragia cerebral, trastorno cerebral causado por infarto cerebral, trastorno cerebral causado por hemorragia subaracnoidea, hipertensión arterial pulmonar, obstrucción arterial periférica o un síntoma atribuido a alteraciones de la circulación periférica.
- 30 [13] El medicamento para uso según cualquiera de [1] a [11], en donde la enfermedad respiratoria es asma, lesión pulmonar, fibrosis pulmonar, enfisema, bronquitis o enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
- [14] El medicamento para uso según cualquiera de [1] a [11], en donde la enfermedad oftalmológica es glaucoma o hipertensión ocular.



- [10] 4-[(Z)-(1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4R)-3-hidroxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-hidroxi-2-oxa-4,4-difluorobiciclo[3.3.0]octan-3-iliden]-1-(tetrazol-5-il)butano, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- [11] 4-[(Z)-(1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4S)-3-hidroxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-hidroxi-2-oxa-4,4-difluorobiciclo[3.3.0]octan-3-iliden]-1-(tetrazol-5-il)butano, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 5 [12] Un medicamento que comprende el compuesto de cualquiera de [1] a [11], o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un ingrediente activo.
- [13] Un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad del tracto digestivo, que comprende el compuesto de cualquiera de [1] a [11], o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un ingrediente activo.
- 10 [14] El medicamento de [13], en donde la enfermedad del tracto digestivo es una enfermedad inflamatoria o enfermedad ulcerosa del tracto digestivo.
- [15] El medicamento de [14], en donde la enfermedad inflamatoria del tracto digestivo es una enfermedad inflamatoria del intestino.
- 15 [16] El medicamento de [15], en donde la enfermedad inflamatoria del intestino es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.
- [17] El medicamento de [15], en donde la enfermedad inflamatoria del intestino es la enfermedad intestinal de Behcet o úlcera simple.
- [18] El medicamento de [14], en donde la enfermedad ulcerosa del tracto digestivo es esofagitis, úlcera esofágica, gastritis o úlcera gástrica.
- 20 [19] El medicamento de [18], en donde la gastritis o úlcera gástrica es gastritis o úlcera gástrica inducida por fármacos.
- [20] El medicamento de [19], en donde la gastritis o úlcera gástrica inducida por fármacos es inducida por un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo.
- [21] El medicamento de [18], en donde la gastritis o úlcera gástrica es inducida por alcohol.
- 25 [22] El medicamento de [14], en donde la enfermedad ulcerosa del tracto digestivo es úlcera del intestino delgado.
- [23] El medicamento de [22], en donde la úlcera del intestino delgado es úlcera del intestino delgado inducida por fármacos.
- [24] El medicamento de [23], en donde la úlcera del intestino delgado inducida por fármacos es inducida por un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo.
- 30 [25] El medicamento de [22], en donde la úlcera del intestino delgado es inducida por alcohol.
- [26] Un agonista de EP4 que comprende el compuesto de cualquiera de [1] a [11], o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- [27] Un medicamento que comprende el agonista de EP4 de [26], como ingrediente activo.
- [28] El medicamento de [27], para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad que implica a EP4.
- 35 [29] El medicamento de [28], para la profilaxis o tratamiento de una enfermedad cuyos síntomas pueden ser mitigados por una acción agonista selectiva de EP4.
- [30] El medicamento de [29], en donde la enfermedad cuyos síntomas pueden ser mitigados por una acción agonista selectiva de EP4 es una enfermedad inmunitaria, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad cardíaca, una enfermedad respiratoria, una enfermedad oftalmológica, una enfermedad renal, una enfermedad hepática, una enfermedad ósea, una enfermedad del tracto digestivo, una enfermedad neurológica o una enfermedad de la piel.
- 40 [31] El medicamento de [30], en donde la enfermedad inmunitaria es esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, rechazo después de un trasplante, artritis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, septicemia, síndrome hemofagocítico, síndrome de activación de macrófagos, enfermedad de Still, enfermedad de Kawasaki, hipercitoquinemia en diálisis, insuficiencia multiorgánica, shock o psoriasis.
- 45 [32] El medicamento de [30], en donde la enfermedad cardiovascular o la enfermedad cardíaca es arteriosclerosis, angina de pecho, infarto de miocardio, trastorno cerebral causado por hemorragia cerebral, trastorno cerebral causado por infarto cerebral, trastorno cerebral causado por hemorragia subaracnoidea, hipertensión arterial



pulmonar, obstrucción arterial periférica (arteriosclerosis obliterante y tromboangitis obliterante) o diferentes síntomas atribuidos a alteraciones de la circulación periférica (claudicación intermitente o entumecimiento de las piernas causado por estenosis espinal lumbar, síndrome de Raynaud, disfunción eréctil, hemorroides etc.).

5 [33] El medicamento de [30], en donde la enfermedad respiratoria es asma, lesión pulmonar, fibrosis pulmonar, enfisema, bronquitis o enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

[34] El medicamento de [30], en donde la enfermedad oftalmológica es glaucoma o hipertensión ocular.

[35] El medicamento de [30], en donde la enfermedad renal es glomerulonefritis, nefropatía diabética, nefropatía por IgA o lesión renal por isquemia-reperusión.

10 [36] El medicamento de [30], en donde la enfermedad hepática es hepatitis, hepatopatía o lesión hepática por isquemia-reperusión.

[37] El medicamento de [30], en donde la enfermedad ósea es osteoporosis, fractura ósea o una fase de recuperación postoperatoria después de osteotomía.

[38] El medicamento de [30], en donde la enfermedad neurológica es la muerte celular neuronal.

[39] El medicamento de [30], en donde la enfermedad de la piel es úlcera o herida por presión.

15 [40] El medicamento de [28], en donde la enfermedad que implica a EP4 es una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en calvicies, alopecia, insuficiencia de maduración del cuello uterino y un trastorno auditivo.

Efecto de la invención

20 El derivado 7,7-difluoro-PGI<sub>2</sub> de la fórmula (1) puede proporcionar un medicamento que mantiene la concentración en sangre durante un largo tiempo y presenta una acción farmacológica mediante administración parenteral o administración oral, y que es para la profilaxis o el tratamiento de la inflamación del tracto digestivo o la aparición de diarrea o heces con sangre en la enfermedad inflamatoria del intestino, o para la profilaxis o el tratamiento de gastritis o úlcera en la úlcera gástrica, úlcera del intestino delgado y similares. Además, debido a la acción agonista de EP4, se puede proporcionar un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades inmunitarias, enfermedades cardiovasculares, enfermedades cardíacas, enfermedades respiratorias, enfermedades oftalmológicas, enfermedades renales, enfermedades hepáticas, enfermedades óseas, enfermedades del tracto digestivo, enfermedades neurológicas, enfermedades de la piel y similares. En situaciones clínicas, se espera que el compuesto de la presente invención muestre una eficacia similar en el grupo de enfermedades para las que un agonista de EP4 puede proporcionar efectos, mientras que la preocupación por los efectos secundarios tales como hemorragia, hipotensión, palpitaciones y rubefacción de la cara es más baja debido a que su acción agonista de IP sobre el sistema circulatorio está debilitada. En particular, el compuesto de la presente invención es eficaz, basado en la acción agonista de EP4, para la inflamación del tracto digestivo asociada con la inmunidad, lesiones de la mucosa del tracto digestivo inducidas por fármacos, lesiones del tracto digestivo y retraso en la cicatrización debido a trastornos regenerativos de las mucosas, enfermedades oftalmológicas, enfermedades renales, y enfermedades hepáticas. Específicamente, el compuesto es útil para una enfermedad inflamatoria del intestino tal como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, gastritis alcohólica, úlcera gástrica y úlcera del intestino delgado, nefritis, glaucoma, hipertensión ocular, hepatitis y similares.

#### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1A muestra el efecto sobre la tensión arterial en ratones.

La Fig. 1B muestra el efecto sobre la frecuencia cardíaca en ratones.

40 La Fig. 2A muestra el efecto sobre las heces anormales en el modelo de colitis inducida por DSS (dextrano sulfato de sodio) en ratón (BALB/c)

La Fig. 2B muestra el efecto sobre el acortamiento de colon en el modelo de colitis inducida por DSS en ratón (BALB/c).

45 La Fig. 3A muestra el efecto del BPS (beraprost de sodio) sobre las heces anormales en el modelo de colitis inducida por DSS en ratón (C57BL/6).

La Fig. 3B muestra el efecto sobre las heces anormales en el modelo de colitis inducida por DSS en ratón (C57BL/6).

La Fig. 3C muestra el efecto del BPS sobre el acortamiento de colon en el modelo de colitis inducida por DSS en ratón (C57BL/6).

La Fig. 3D muestra el efecto sobre el acortamiento de colon en el modelo de colitis inducida por DSS en ratón (C57BL/6).

La Fig. 4A muestra el efecto sobre las heces anormales en el modelo de colitis inducida por DSS en rata.

La Fig. 4B muestra el efecto sobre el acortamiento de colon en el modelo de colitis inducida por DSS en rata.

5 La Fig. 4C muestra el efecto sobre la lesión del tejido del colon en el modelo de colitis inducida por DSS en rata.

La Fig. 5 muestra el efecto sobre las heces anormales en el modelo de remisión/recaída de colitis inducida por DSS en ratón.

La Fig. 6A muestra el efecto sobre la puntuación de la consistencia de las heces en el modelo de colitis por transferencia de células T en ratón.

10 La Fig. 6B muestra el efecto sobre la puntuación de sangre oculta en heces en el modelo de colitis por transferencia de células T en ratón.

La Fig. 6C muestra el efecto sobre la puntuación de la disminución de peso corporal en el modelo de colitis por transferencia de células T en ratón.

15 La Fig. 6D muestra el efecto sobre la puntuación DAI (índice de actividad de la enfermedad) en el modelo de colitis por transferencia de células T en ratón.

La Fig. 7 muestra el efecto sobre la úlcera gástrica en el modelo de lesión de la mucosa gástrica inducida por etanol en la rata.

La Fig. 8 muestra el efecto sobre la úlcera del intestino delgado, en el modelo de lesión del intestino delgado inducida por indometacina en la rata.

20 La Fig. 9A muestra el efecto sobre el volumen de orina en el modelo de glomerulonefritis inducida por anticuerpos anti Thy-1 en la rata.

La Fig. 9B muestra el efecto sobre la cantidad de proteína en la orina en el modelo de glomerulonefritis inducida por anticuerpos anti Thy-1 en la rata.

25 La Fig. 9C muestra el efecto sobre el peso relativo del riñón en el modelo de glomerulonefritis inducida por anticuerpos anti Thy-1 en la rata.

La Fig. 9D muestra el efecto sobre la histopatología renal (recuento total de células glomerulares) en el modelo de glomerulonefritis inducida por anticuerpos anti Thy-1 en la rata.

La Fig. 9E muestra el efecto sobre la histopatología renal (región mesangial) en el modelo de glomerulonefritis inducida por anticuerpos anti Thy-1 en la rata.

30 La Fig. 9F muestra el efecto sobre la histopatología renal (recuento de células glomerulares PCNA positivas) en el modelo de glomerulonefritis inducida por anticuerpos anti Thy-1 en la rata.

La Fig. 10 muestra el efecto sobre la presión intraocular del conejo.

La Fig. 11 muestra el efecto profiláctico en el modelo de hepatitis inducida por concanavalina A en el ratón.

### Realizaciones de la invención

35 Definiciones

En la presente memoria descriptiva, el "agonista selectivo de EP4" significa un compuesto que muestra una acción agonista (actividad farmacológica) débil sobre el receptor de PGI<sub>2</sub> (IP) con respecto a la acción agonista generalmente encontrada en los análogos de PGI<sub>2</sub>, y que tiene una acción agonista notablemente superior sobre el receptor de PGE<sub>2</sub> subtipo EP4 en comparación con la acción agonista de IP. La acción agonista de EP4 se puede medir según el método de medida de la actividad agonista descrito en el Ejemplo 19 que se menciona más adelante. La acción agonista de IP se puede medir según el método descrito en el Ejemplo 20. Si un compuesto es o no un agonista selectivo de EP4 se puede evaluar midiendo la relación de los valores de la constante de inhibición de la unión K<sub>i</sub> de EP4 y IP (relación IP/EP4) en la misma especie según el método de medida descrito en el Ejemplo 18. Los ejemplos del agonista selectivo de EP4 incluyen un compuesto que tiene la relación mencionada antes no inferior a 5, preferiblemente no inferior a 10, más preferiblemente no inferior a 50, más preferiblemente no inferior a 100.

45

En la presente memoria descriptiva, el "derivado de prostaglandina I<sub>2</sub>" significa un compuesto con una estructura modificada por una técnica general de la química orgánica, basado en la estructura de la PGI<sub>2</sub> de tipo natural. A continuación, se explica el compuesto de la presente invención.

Definición del compuesto de la presente invención

5 En la nomenclatura de los compuestos en la presente memoria descriptiva, los números que se utilizan para señalar la posición en el esqueleto de la PG corresponden a los números en el esqueleto del ácido prostanoico. En la presente memoria descriptiva, un grupo en el que un átomo de hidrógeno de un grupo alquilo está sustituido, se indica también como un grupo alquilo sustituido. Lo mismo se aplica a otros grupos.

10 Además, un grupo orgánico "inferior" tal como un grupo alquilo y similares significa que el número de carbonos del mismo es de 1 a 6. El número de carbonos del grupo orgánico "inferior" es preferiblemente 1 a 4.

15 El "grupo alquilo" puede ser de cadena lineal o de cadena ramificada. A menos que se indique otra cosa, el grupo alquilo es preferiblemente un grupo alquilo inferior que tiene un número de carbonos de 1 a 6, y es particularmente preferible un grupo alquilo inferior que tiene un número de carbonos de 1 a 4. Los ejemplos del grupo alquilo incluyen un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo propilo, un grupo isopropilo, un grupo butilo, un grupo isobutilo, un grupo sec-butilo, un grupo terc-butilo, un grupo pentilo, un grupo hexilo y similares.

El "grupo alcoxi" es preferiblemente un grupo alcoxi inferior que tiene un número de carbonos de 1 a 6, en particular preferiblemente un grupo alcoxi que tiene un número de carbonos de 1 a 4. El grupo alcoxi puede ser de cadena lineal o de cadena ramificada. Los ejemplos del grupo alcoxi incluyen un grupo metoxi, un grupo etoxi, un grupo propoxi, un grupo butoxi y similares.

20 El "grupo alcoxialquilo" es un grupo alquilo sustituido con un grupo alcoxi. El grupo alcoxi del grupo alcoxialquilo es preferiblemente un grupo alcoxi inferior que tiene un número de carbonos de 1 a 4, y el grupo alquilo del grupo alcoxialquilo es preferiblemente un grupo alquilo inferior que tiene un número de carbonos de 1 a 4. El grupo alcoxialquilo es preferiblemente un grupo alcoxialquilo inferior (es decir, el número de carbonos de todo el grupo alcoxialquilo es 1 a 6), más preferiblemente un grupo alcoxialquilo inferior que tiene un número de carbonos de 1 a 4. Los ejemplos del grupo alcoxialquilo incluyen un grupo metoximetilo, un grupo etoximetilo, un grupo propoximetilo, un grupo etoxietilo y similares.

El "grupo arilo" es un grupo hidrocarburo aromático monovalente opcionalmente con sustituyente o sustituyentes. Como grupo arilo sin sustituyente, es preferible un grupo fenilo.

30 Como el "grupo arilo sustituido" (un grupo arilo con sustituyente o sustituyentes), es preferible un grupo arilo en el que uno o más átomos de hidrógeno del grupo arilo están sustituidos con un grupo alquilo inferior, un átomo de halógeno, un grupo halogenado (alquilo inferior), un grupo alcoxi inferior y similares. Los ejemplos preferibles del grupo arilo sustituido incluyen un grupo fenilo sustituido, y los ejemplos particulares del mismo incluyen un grupo monohalofenilo (por ejemplo, grupo clorofenilo, grupo fluorofenilo, grupo bromofenilo, etc.), un grupo fenilo sustituido con un (alquilo inferior halogenado) (por ejemplo, grupo trifluorometilfenilo etc.) y un grupo fenilo con (alcoxi inferior) (por ejemplo, grupo metoxifenilo, grupo etoxifenilo etc.).

35 El "átomo de halógeno" es un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo o un átomo de yodo.

40 El "grupo haloalquilo" es un grupo alquilo en el que uno o más átomos de hidrógeno del grupo alquilo están sustituidos con un átomo de halógeno, y es preferible un grupo haloalquilo inferior que tiene un número de carbonos de 1 a 6. Los ejemplos del grupo haloalquilo incluyen un grupo fluorometilo, un grupo difluorometilo, un grupo trifluorometilo, un grupo trifluoroetilo, un grupo pentafluoroetilo, un grupo clorometilo, un grupo bromometilo y similares.

Como compuesto (1) de la presente invención, es preferible el siguiente compuesto desde el punto de vista de la actividad farmacológica y propiedades físicas.

45 Esto es, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son cada uno, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de cadena lineal que tiene un número de carbonos de 1 a 3, y cada uno, independientemente, es preferiblemente un átomo de hidrógeno o un grupo metilo. En particular preferiblemente, uno de R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno, y el otro es un grupo metilo.

50 R<sup>3</sup> es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo que tiene un número de carbonos de 1 a 4, un grupo alcoxialquilo, un grupo arilo, un átomo de halógeno o un grupo haloalquilo, y es preferible un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo que tiene un número de carbonos de 1 a 4, un grupo alcoxialquilo inferior tal como un grupo metoximetilo y similares, un átomo de halógeno tal como un átomo de cloro, un átomo de flúor y similares, o un grupo haloalquilo inferior tal como un grupo fluoroalquilo inferior y similares. En particular, es preferible un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo que tiene un número de carbonos de 1 a 4, un átomo de cloro o un haloalquilo que tiene un número de carbonos de 1 a 4. Como el grupo alquilo que tiene un número de carbonos de 1 a 4, son preferibles un grupo metilo y un grupo etilo, y como el grupo haloalquilo que tiene un número de carbonos de 1 a 4, es preferible un grupo trifluorometilo.

55

Como R<sup>3</sup>, un átomo de hidrógeno, un grupo metilo o un grupo trifluorometilo es lo más preferible.

Además, R<sup>3</sup> puede estar sustituido, en cualquiera de las posiciones orto (o), meta (m) y para (p) con respecto a la posición de sustitución de la cadena principal del esqueleto de prostaglandina, por un anillo bencénico. R<sup>3</sup> en particular, está preferiblemente sustituido en la posición meta (m).

5 Realización del compuesto preferible de la presente invención

Además, las combinaciones preferibles de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> en el compuesto (1) de la presente invención son como sigue.

R<sup>1</sup> es un átomo de hidrógeno, R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno, y R<sup>3</sup> es un átomo de hidrógeno.

R<sup>1</sup> es un átomo de hidrógeno, R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno, y R<sup>3</sup> es un grupo metilo.

R<sup>1</sup> es un átomo de hidrógeno, R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno, y R<sup>3</sup> es un átomo de cloro.

10 R<sup>1</sup> es un átomo de hidrógeno, R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno, y R<sup>3</sup> es un grupo trifluorometilo.

R<sup>1</sup> es un grupo metilo, R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno, y R<sup>3</sup> es un átomo de hidrógeno.

R<sup>1</sup> es un grupo metilo, R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno y R<sup>3</sup> es un grupo metilo.

R<sup>1</sup> es un grupo metilo, R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno, y R<sup>3</sup> es un átomo de cloro.

R<sup>1</sup> es un grupo metilo, R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno, y R<sup>3</sup> es un grupo trifluorometilo.

15 R<sup>1</sup> es un átomo de hidrógeno, R<sup>2</sup> es un grupo metilo, y R<sup>3</sup> es un átomo de hidrógeno.

R<sup>1</sup> es un átomo de hidrógeno, R<sup>2</sup> es un grupo metilo, y R<sup>3</sup> es un grupo metilo.

R<sup>1</sup> es un átomo de hidrógeno, R<sup>2</sup> es un grupo metilo, y R<sup>3</sup> es un átomo de cloro.

R<sup>1</sup> es un átomo de hidrógeno, R<sup>2</sup> es un grupo metilo, y R<sup>3</sup> es un grupo trifluorometilo.

R<sup>1</sup> es un grupo metilo, R<sup>2</sup> es un grupo metilo, y R<sup>3</sup> es un átomo de hidrógeno.

20 R<sup>1</sup> es un grupo metilo, R<sup>2</sup> es un grupo metilo, y R<sup>3</sup> es un grupo metilo.

R<sup>1</sup> es un grupo metilo, R<sup>2</sup> es un grupo metilo, y R<sup>3</sup> es un átomo de cloro.

R<sup>1</sup> es un grupo metilo, R<sup>2</sup> es un grupo metilo, y R<sup>3</sup> es un grupo trifluorometilo.

Además, las combinaciones preferibles entre las mencionadas antes, son como sigue, ya que la acción agonista selectiva de EP4 es alta.

25 R<sup>1</sup> es un grupo metilo, R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno, y R<sup>3</sup> es un grupo metilo.

R<sup>1</sup> es un átomo de hidrógeno, R<sup>2</sup> es un grupo metilo, y R<sup>3</sup> es un grupo metilo.

Por otra parte, las combinaciones más preferibles son las siguientes.

R<sup>1</sup> es un grupo metilo, R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno, y R<sup>3</sup> es un grupo m-metilo.

R<sup>1</sup> es un átomo de hidrógeno, R<sup>2</sup> es un grupo metilo, y R<sup>3</sup> es un grupo m-metilo.

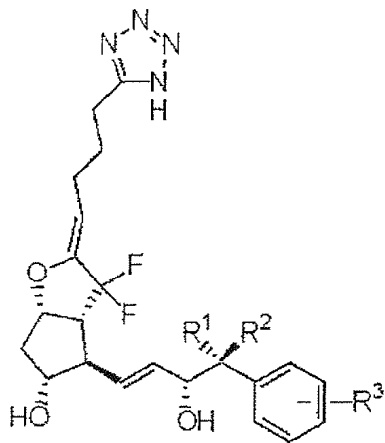
30 Método de producción del compuesto (1) de la presente invención

El compuesto (1) de la presente invención se puede producir, por ejemplo, en base a los métodos descritos en los documentos JP-A-07-324081 y JP-A-08-217772 relativos a las invenciones realizadas por los presentes inventores. Por ejemplo, utilizando lactona de Corey como material de partida, se introduce la cadena  $\omega$  al principio, y la lactona se convierte por fluoración en la lactona de Corey con difluoro que contiene la cadena  $\omega$ . Después, se introduce una unidad de la cadena  $\alpha$  mediante una reacción de adición con un reactivo organometálico que tiene un grupo tetrazol en el terminal y una reacción de deshidratación, o por una reacción de Wittig utilizando una sal de fosfonio que tiene un grupo tetrazol en el terminal, y similares, y el grupo hidroxilo se desprotege si es necesario, con lo que se puede sintetizar el compuesto (1).

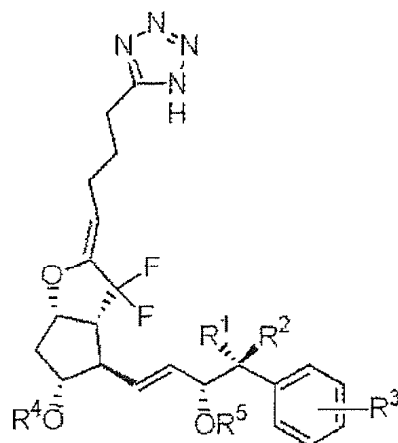
Alternativamente, se obtiene la lactona de Corey con difluoro, por fluoración de la lactona de Corey, como material de partida. Después, se introduce una unidad de la cadena  $\alpha$  mediante una reacción de adición con un reactivo organometálico que tiene un grupo tetrazol en el terminal y una reacción de deshidratación, o por una reacción de Wittig utilizando una sal de fosfonio que tienen un grupo tetrazol en el terminal, y similarmente, se introduce una cadena  $\omega$ , y el grupo hidroxilo se desprotege si es necesario, con lo que se puede sintetizar el compuesto (1).

Alternativamente, se puede sintetizar también el compuesto (1) mediante la conversión de un grupo carboxi del derivado de ácido carboxílico descrito en el documento JP-A-07-324081 en un grupo ciano y la conversión del derivado en un derivado de tetrazol.

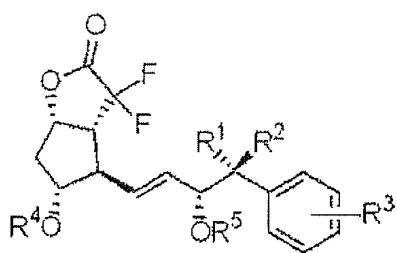
De estos métodos de producción, los métodos representativos se explican específicamente utilizando las siguientes fórmulas químicas.



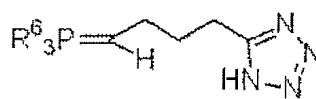
(1)



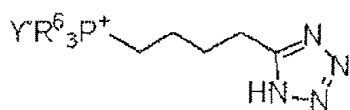
(2)



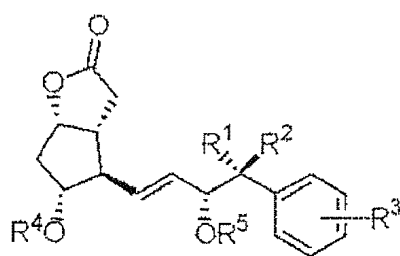
(3)



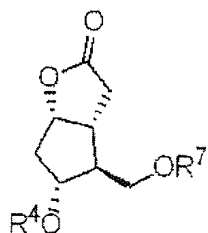
(4)



(5)



(6)



(7)

10 Por ejemplo, utilizando la lactona de Corey (7) como material de partida, se introduce la cadena ω al principio, el derivado de lactona de Corey obtenido (6) que contiene la cadena ω se somete a una reacción de fluoración para

dar un derivado de lactona de Corey con difluoro que contiene la cadena  $\omega$  (3) que tiene dos átomos de flúor en la posición  $\alpha$  del grupo carbonilo. Después, se hace reaccionar el derivado de difluorolactona (3) con el derivado de fosforano (4) para introducir una unidad de cadena  $\alpha$ , con lo que se puede obtener el derivado de  $\text{PGI}_2$  (2) con los grupos hidroxilo protegidos. El grupo protector de hidroxilo se elimina para dar el compuesto (1) de la presente invención.

El derivado de fosforano (4) se puede obtener a partir de un derivado de sal de fosfonio (5).

Excepto cuando  $\text{R}^1$  -  $\text{R}^3$  son sustituyentes particulares, el derivado de lactona (6) mencionado antes, es un compuesto conocido. El nuevo derivado de lactona (6) mencionado antes, en el que  $\text{R}^1$  -  $\text{R}^3$  son sustituyentes particulares puede ser producido por un método similar al de los derivados de lactona (6) conocidos. Por ejemplo, los nuevos derivados de lactona (6) se pueden producir haciendo reaccionar el diéster de ácido 3-aril-2-oxoalquilfosfónico con lactona de Corey que tiene un grupo formilo. Aquí, la cadena de alquilo del ácido alquilfosfónico tiene un número de carbonos no inferior a 3.

$\text{R}^4$ ,  $\text{R}^5$  y  $\text{R}^7$  son cada uno, independientemente, un grupo protector de hidroxilo.  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^5$ , y  $\text{R}^7$  pueden ser grupos protectores iguales. Como grupo protector, se puede utilizar el grupo protector de hidroxilo descrito en "Shin Jikken Kagaku Koza (New Courses in Experimental Chemistry) 14, synthesis and reaction of organic compound (V)" (Maruzen Company, Limited), "Protective Groups in Organic synthesis" (by T.W. Greene, J. Wiley & Sons) y similares. Específicamente, se pueden mencionar un grupo triorganosililo, un grupo alcoialquilo, un grupo monovalente que tiene una estructura de éter cíclico y similares. Como grupo triorganosililo, es preferible un grupo sililo en el que 3 grupos seleccionados de un grupo alquilo, un grupo arilo, un grupo aralquilo y un grupo alcoxi están unidos a un átomo de silicio, y es particularmente preferible un grupo en el que 3 grupos alquilo inferior o grupos arilo están unidos a un átomo de silicio. Como ejemplos específicos del grupo protector, son preferibles un grupo tetrahidropiraniilo, un grupo terc-butildimetilsililo, un grupo terc-butildifenilsililo, un grupo trietilsililo, un grupo trifenilsililo o un grupo triisopropilsililo y similares. En particular, son preferibles un grupo tetrahidropiraniilo, un grupo terc-butildimetilsililo, un grupo terc-butildifenilsililo y similares.

El grupo protector de hidroxilo se puede eliminar fácilmente. El método de desprotección del grupo hidroxilo protegido puede ser un método convencional. Por ejemplo, se pueden emplear los métodos descritos en "Shin Jikken Kagaku Koza (New Courses in Experimental Chemistry) 14, synthesis and reaction of organic compound (I), (II) and (V)" (Maruzen Company, Limited), "Protective Groups in Organic synthesis" (by T.W. Greene, J. Wiley & Sons) y similares.

Para la conversión del derivado de lactona (6) en derivado de difluorolactona (3) por una reacción de fluoración, se pueden aplicar diversos métodos de fluoración conocidos. Por ejemplo, se puede emplear un método que incluye hacer reaccionar con diversos agentes de fluoración electrófilos en un disolvente inerte. La fluoración también se puede realizar por los métodos descritos en los documentos JP-A-07-324081 y JP-A-09-110729 relativos a la invención por los presentes inventores.

En la reacción de fluoración del derivado de lactona (6), se utiliza preferiblemente un agente de fluoración electrófilo. Como agente de fluoración electrófilo, se puede utilizar un agente de fluoración electrófilo conocido o bien conocido. Por ejemplo, se pueden mencionar los agentes de fluoración electrófilos descritos en "Chemistry of fluorine" (Kodansha Scientifics Ltd.) by Tomoya Kitazume, Takashi Ishihara, and Takeo Taguchi y similares. Específicamente, se pueden mencionar N-fluorosulfonil amidas, derivado de N-sulfonil imida, hipofluorito de acetilo, flúor gas y similares.

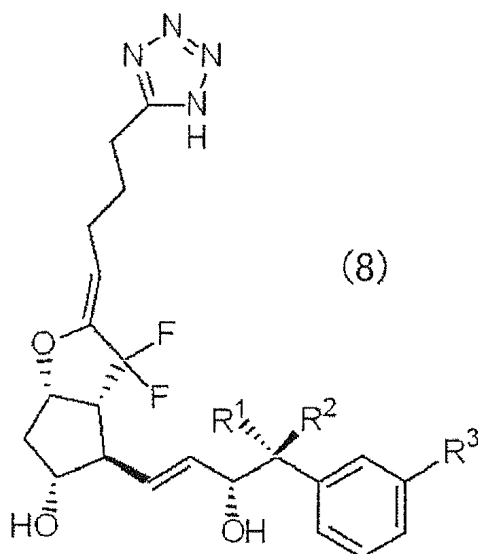
El agente de fluoración electrófilo se utiliza preferiblemente en presencia de un disolvente inerte. Como disolvente inerte, se pueden mencionar disolventes éteres, disolventes hidrocarburos, disolventes polares, disolventes mezclas de los mismos y similares.

El derivado de difluorolactona (3) obtenido por la reacción de fluoración se hace reaccionar entonces con un derivado de fosforano (4) para dar el derivado de  $\text{PGI}_2$  (2) en donde el grupo hidroxilo está protegido. El derivado de fosforano (4) se produce a partir del correspondiente derivado de sal de fosfonio (5), en un disolvente inerte en presencia de una base, y el derivado de fosforano formado (4) se utiliza preferiblemente directamente para la reacción de Wittig con el derivado de difluorolactona (3) sin aislamiento. Como métodos de producción del derivado de fosforano (4) y del derivado de sal de fosfonio (5), se pueden emplear los métodos descritos en los documentos DE2242239, DE2405255 y similares. Como  $\text{R}^6$  para el derivado de fosforano (4) o el derivado de sal de fosfonio (5), es preferible un grupo arilo tal como un grupo fenilo, un grupo toliilo y similares, y es particularmente preferible un grupo fenilo. Como disolvente inerte, se pueden mencionar disolventes éteres, disolventes hidrocarburos, disolventes polares, disolventes acuosos, disolventes alcohólicos, disolventes mezcla de los mismos y similares.

El grupo protector de hidroxilo se elimina del derivado de la  $\text{PGI}_2$  (2) obtenido por el método anterior para dar el compuesto (1).

Puesto que el compuesto (1) de la presente invención tiene un carbono asimétrico en la estructura, se presentan varios estereoisómeros e isómeros ópticos. La presente invención engloba todos estos estereoisómeros, isómeros ópticos y mezclas de los mismos.

Los ejemplos específicos del compuesto (1) de la presente invención, incluyen el compuesto representado por la siguiente fórmula (8).



Ejemplos del compuesto (1) de la presente invención

- 5 Se puede mencionar un compuesto en el cual, en la fórmula (8), R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> tienen las estructuras que se muestran en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1

	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
Compuesto A	H	H	H
Compuesto B	H	H	Me
Compuesto C	H	H	Cl
Compuesto D	H	H	CF <sub>3</sub>
Compuesto E	Me	H	H
Compuesto F	Me	H	Me
Compuesto G	Me	H	Cl
Compuesto H	Me	H	CF <sub>3</sub>
Compuesto I	H	Me	H
Compuesto J	H	Me	Me
Compuesto K	H	Me	Cl
Compuesto L	H	Me	CF <sub>3</sub>
Compuesto M	Me	Me	H
Compuesto N	Me	Me	Me
Compuesto O	Me	Me	Cl
Compuesto P	Me	Me	CF <sub>3</sub>

Características del compuesto (1) de la presente invención

- 10 El compuesto (1) de la presente invención es un derivado de PGI<sub>2</sub> que no se metaboliza fácilmente en el cuerpo y que tiene mejor estabilidad. Puesto que el grupo carboxi del esqueleto de PG se convierte en un grupo tetrazol, el compuesto no se metaboliza fácilmente por la β-oxidación, que es conocida como una vía metabólica común de los ácidos grasos tales como las prostaglandinas. Por lo tanto, tiene una semivida plasmática prolongada y puede mantener una concentración eficaz en plasma durante mucho tiempo, en comparación con un compuesto que tiene un grupo carboxi en el esqueleto de PG.
- 15 Puesto que la estabilidad metabólica se mejora de esta manera, se puede mejorar la biodisponibilidad del fármaco.

El compuesto (1) de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, muestra una acción de agonista selectivo de EP4. Los ejemplos preferibles de compuesto (1) que muestran dicha acción son los mismos que los ejemplos preferibles del compuesto (1) mencionados antes.

5 Medicamento que contiene el compuesto (1) de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como ingrediente activo

El medicamento de la presente invención contiene el compuesto (1) y/o una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto (1), y, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable y, en algunos casos, otros componentes de tratamiento.

10 El medicamento de la presente invención contiene el compuesto (1) y/o una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto (1), o un hidrato del mismo, y, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable y, en algunos casos, otros componentes de tratamiento.

15 Cuando el agente profiláctico o terapéutico de la presente invención se administra a pacientes, la dosis diaria varía dependiendo de la edad y peso corporal de los pacientes, de la patología y su gravedad, y similares. En general, se administran de forma deseable 0,0001-10 mg, preferiblemente 0,01-1 mg, del agente en una a varias porciones. Por ejemplo, para la administración oral, es preferible 0,001-3 mg, y es particularmente preferible 0,001-0,5 mg. Para la administración intravenosa, es preferible 0,0001-1 mg, y es particularmente preferible 0,001-0,1 mg. La dosis se puede cambiar cuando sea apropiado dependiendo de la enfermedad y de su estado. Como régimen de dosificación, se puede administrar de manera deseable un producto inyectable del agente mediante perfusión por goteo continuo.

20 Para su uso como un medicamento, el agente se puede administrar al cuerpo mediante administración oral y administración parenteral (por ejemplo, administración intravascular (intravenosa, intraarterial), administración subcutánea, administración rectal etc.). Los ejemplos de formas farmacéuticas incluyen una forma farmacéutica oral tal como comprimidos, cápsulas y jarabe, una forma farmacéutica parenteral, tal como inyectable líquido (solución, emulsión, suspensión y similares), perfusión, supositorios, preparaciones nasales, parches e inhalaciones. La administración oral es particularmente deseable.

25 Una preparación en las formas farmacéuticas mencionadas antes, se puede producir mezclando el compuesto (1) de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo con los aditivos necesarios para la formulación, tales como vehículos, excipientes, aglutinantes y estabilizantes convencionales, y formulando la mezcla por un método convencional. Por ejemplo, cuando la preparación es un polvo, gránulo, comprimido y similares, se puede producir utilizando cualquier vehículo farmacéutico preferible para producir una forma farmacéutica sólida, por ejemplo, excipientes, lubricantes, disgregantes, aglutinantes y similares.

30 Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio y fosfato de sodio; agentes de granulación y disgregantes, tales como almidón de maíz y ácido algínico; aglutinantes, tales como almidón, gelatina y goma arábiga, y lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico y talco. Los comprimidos pueden ser no recubiertos o recubiertos mediante una técnica conocida para retrasar la disgregación y la absorción en el estómago y en el intestino, asegurando de este modo una liberación sostenida durante un tiempo más largo. Por ejemplo, se puede utilizar un material para retrasar en el tiempo, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

40 El compuesto (1) de la presente invención se puede proporcionar como una cápsula de gelatina dura que contiene una mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín. Alternativamente, se puede proporcionar como una cápsula de gelatina blanda que contiene una mezcla con un disolvente miscible en agua, tal como propilenglicol, polietilenglicol y etanol, o aceites, tales como aceite de cacahuete, parafina líquida y aceite de oliva.

45 Cuando la preparación es un jarabe o un líquido, se pueden ser seleccionar y utilizar apropiadamente para su producción, por ejemplo, estabilizantes, agentes de suspensión, agentes correctivos, sustancias aromáticas y similares. Para la fabricación de inyectables, se disuelve un ingrediente activo en agua destilada para inyección junto con un regulador del pH tal como ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, lactosa, lactato de sodio, ácido acético, hidrogenofosfato de disodio y dihidrogenofosfato de sodio, y un agente isotónico tal como cloruro de sodio y glucosa, y el inyectable se prepara asépticamente. Se puede utilizar un diluyente no acuoso inactivo tal como propilenglicol, polietilenglicol, aceite de oliva, etanol y polisorbato 80 para la formulación de la preparación. Por otra parte, se pueden añadir manitol, dextrina, ciclodextrina, gelatina y similares, y la mezcla se liofiliza a vacío para dar un inyectable a disolver antes de su uso. Para la estabilización y mejora de la administración de un fármaco a una lesión, se puede formular, además, una preparación de liposomas o una emulsión lipídica mediante un método conocido y se puede utilizar como un inyectable.

55 Además, se puede producir una preparación para administración rectal utilizando una base de supositorios, tal como manteca de cacao, triglicéridos de ácidos grasos, diglicéridos de ácidos grasos, monoglicéridos de ácidos grasos y polietilenglicol. Además, se puede ajustar a la viscosidad adecuada una base soluble en agua, tal como polietilenglicol, polipropilenglicol, glicerol y glicerolgelatina, una base oleosa, tal como vaselina blanca, grasa dura,



parafina, parafina líquida, Plastibase, lanolina y lanolina purificada, y similares, y se puede producir también una pomada para administración intrarrectal.

El compuesto (1) de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se puede administrar tópicamente a la piel o a la membrana mucosa, esto es, administración transdérmica o transmucosal. Como formas farmacéuticas generales para este fin, se pueden mencionar gel, hidrogel, loción, solución, crema, pomada, pulverizaciones, apósitos, preparación en espuma, películas, parches para la piel, oblato, implantes, esponjas, fibras, vendas, microemulsiones y similares. Como vehículos comúnmente usados, se pueden mencionar alcohol, agua, aceite mineral, parafina líquida, vaselina blanca, glicerina, polietilenglicol, propilenglicol y similares.

El compuesto (1) de la presente invención se puede mezclar con ciclodextrina o un derivado apropiado de la misma o una unidad polimérica soluble, tal como un polímero que contiene polietilenglicol, con el fin de utilizarlo en cualquiera de las formas farmacéuticas mencionadas antes, y mejorar la solubilidad, velocidad de disolución, biodisponibilidad y estabilidad. Por ejemplo, se ha confirmado que el complejo de fármaco-ciclodextrina y similares son generalmente útiles para la mayoría de las formas farmacéuticas y vías de administración. Se pueden utilizar tanto complejos de inclusión como de no inclusión. Como otro método para la formación directa de complejos con fármacos, se puede utilizar también la ciclodextrina como un aditivo auxiliar, es decir, vehículo, excipiente o solubilizante. Para estos fines, se utilizan generalmente  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -ciclodextrinas y similares.

Sal farmacéuticamente aceptable del compuesto (1) de la presente invención

Una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto (1) de la presente invención es una sal del resto del grupo tetrazol del derivado con una sustancia básica, la cual es un compuesto en el que el átomo de hidrógeno del grupo tetrazol está sustituido por un catión.

Los ejemplos del catión incluyen cationes de metales alcalinos tales como  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , cationes de metales (distintos de los cationes de metales alcalinos), tales como un  $1/2 \text{Ca}^{2+}$ ,  $1/2 \text{Mg}^{2+}$ ,  $1/2 \text{Zn}^{2+}$  y  $1/3 \text{Al}^{3+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ , cationes amonio de amina orgánica y de aminoácidos tales como trietanolamina, dietanolamina, etanolamina, trometamina, lisina y arginina, y similares. El catión preferible es ion de sodio o ion de potasio.

Más particularmente, la sal aceptable es una sal producida a partir de una base no tóxica farmacéuticamente aceptable, tal como una base inorgánica y una base orgánica. Como una sal derivada de una base no tóxica inorgánica farmacéuticamente aceptable, se pueden mencionar sal de litio, sal de cobre, sal férrica, sal ferrosa, sal mangánica, sal de manganeso y similares, además de la sal de sodio, sal de potasio, sal de calcio, sal de magnesio, sal de zinc, sal de aluminio, sal de amonio y similares, mencionadas antes. De estas, son preferibles la sal de sodio, sal de potasio, sal de calcio, sal de magnesio y sal de amonio, y son particularmente preferibles la sal de sodio y la sal de potasio. Una sal derivada de una base orgánica no tóxica farmacéuticamente aceptable incluye las sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas, y resinas de intercambio iónico básicas. Aparte de los ejemplos de aminas orgánicas y aminoácidos mencionados antes, se pueden mencionar isopropilamina, dietilamina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, etilendiamina, N,N'-dibenciletildiamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, morfolina, N-etil-morfolina, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, betaína, cafeína, colina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, metilglucamina, resina de poliamina, procaína, purina, teobromina y similares.

Uso del medicamento que contiene el compuesto (1) de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como un ingrediente activo

Un medicamento que contiene el compuesto (1) de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como un ingrediente activo, se puede aplicar a una enfermedad que implique el EP4, preferiblemente una enfermedad en la que una acción agonista selectiva de EP4 pueda mitigar los síntomas. Específicamente, es útil para las enfermedades inmunitarias, enfermedades del tracto digestivo, enfermedades cardiovasculares, enfermedades cardíacas, enfermedades respiratorias, enfermedades neurológicas, enfermedades oftalmológicas, enfermedades renales, enfermedades hepáticas, enfermedades óseas, enfermedades de la piel y similares.

Las enfermedades inmunitarias en la presente invención incluyen las enfermedades autoinmunes tales como esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren, artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico, rechazo después de un trasplante y similares, y las enfermedades inflamatorias tales como asma, muerte celular neuronal, artritis, lesión pulmonar, fibrosis pulmonar, enfisema, bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, hepatopatía, hepatitis aguda, nefritis (nefritis aguda, nefritis crónica), insuficiencia renal, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, septicemia, síndrome hemofagocítico, síndrome de activación de macrófagos, enfermedad de Still, enfermedad de Kawasaki, quemaduras, granuloma sistémico, hipercitoquinemia en diálisis, insuficiencia multiorgánica, shock y psoriasis.

La enfermedad del tracto digestivo en la presente invención incluye la enfermedad inflamatoria y la enfermedad ulcerosa del tracto digestivo, que es una enfermedad con inflamación o úlcera en los tejidos epiteliales, mucosales o submucosales del tracto digestivo, o proliferación o disfunción anormal del epitelio de la mucosa, y que es causada por estímulos físicos, estímulos químicos tales como por el jugo gástrico, estímulos por fármacos tales como

fármacos anti-inflamatorios no esteroideos y esteroideos, enfermedades inmunitarias y enfermedades autoinmunitarias de etiología desconocida, enfermedades mentales y similares.

5 La enfermedad inflamatoria del tracto digestivo incluye la enfermedad inflamatoria del intestino, particularmente colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, que es una enfermedad inflamatoria granulomatosa inespecífica acompañada por fibrilación o ulceración, enfermedad intestinal de Behçet y úlcera simple. La enfermedad ulcerosa del tracto digestivo de la presente invención incluye estomatitis, estomatitis aftosa, esofagitis, úlcera esofágica, gastritis, úlcera gástrica y úlcera del intestino delgado.

10 Por otra parte, la gastritis y la úlcera gástrica incluyen gastritis y úlcera gástrica inducidas por fármacos, gastritis y úlcera gástrica alcohólicas, y la gastritis y úlcera gástrica inducidas por fármacos incluyen la gastritis y úlcera gástrica inducidas por un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo.

La úlcera del intestino delgado incluye úlcera del intestino delgado inducida por fármacos y úlcera del intestino delgado alcohólica, y la úlcera del intestino delgado inducida por fármacos incluye úlcera del intestino delgado inducida por un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo.

15 En particular, el medicamento de la presente invención es útil como agente profiláctico o terapéutico para la colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, gastritis, úlcera gástrica o úlcera del intestino delgado.

20 La enfermedad cardiovascular y la enfermedad cardíaca incluyen arteriosclerosis, angina de pecho, infarto de miocardio, trastorno cerebral causado por hemorragia cerebral, trastorno cerebral causado por infarto cerebral, trastorno cerebral causado por hemorragia subaracnoidea, hipertensión arterial pulmonar, obstrucción arterial periférica (arteriosclerosis ocliterante, y tromboangitis ocliterante) y diversos síntomas (claudicación intermitente con estenosis espinal lumbar, entumecimiento de piernas, síndrome de Raynaud, disfunción eréctil, hemorroides, etc.) atribuidos a trastornos circulatorios periféricos.

La enfermedad respiratoria incluye asma, lesión pulmonar, fibrosis pulmonar, enfisema, bronquitis y enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

25 La enfermedad neurológica incluye muerte celular neuronal, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple y trastorno cerebral (trastornos cerebrales causados por hemorragia cerebral, infarto cerebral, y hemorragia subaracnoidea).

La enfermedad oftalmológica incluye glaucoma e hipertensión ocular.

La enfermedad renal incluye glomerulonefritis, nefropatía diabética, nefropatía por IgA y lesión renal por isquemia-reperusión.

30 La enfermedad hepática incluye hepatitis, hepatopatía y lesión hepática por isquemia-reperusión.

La enfermedad ósea incluye osteoporosis, fractura ósea, y una fase de recuperación postoperatoria después de osteotomía.

La enfermedad de la piel incluye úlceras y heridas por presión.

35 Además, un medicamento que contiene el compuesto (1) de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como ingrediente activo, es útil también como un agente profiláctico y/o terapéutico para la alopecia, calvicies, o trastorno auditivo (por ejemplo, trastorno auditivo causado por ruido), o como un agente de maduración (promoción) del cuello uterino.

La presente invención se explica en detalle en el texto que sigue, con referencia a ejemplos específicos, que no han de interpretarse como limitativos.

40 Ejemplo 1

Síntesis de (2R)-2-(m-tolil)propionato de metilo

45 A ácido (2R)-2-(m-tolil)propiónico (12,45 g), se añadieron metanol (14,83 g) y ácido sulfúrico concentrado (6,46 g), y se agitó la mezcla a reflujo durante 6 h. Después, se neutralizó la mezcla con solución acuosa de carbonato de sodio al 10 %, y se extrajo con hexano. Después de secar sobre sulfato de magnesio, se concentró el residuo a presión reducida para dar el compuesto del título (12,79 g). Las propiedades estructurales fueron como se describen a continuación.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,49 (d, J = 7,0 Hz, 3H), 2,33 (s, 3H), 3,64 (s, 3H), 3,69 (dd, J = 14,4, 7,3 Hz, 1H), 7,06-7,22 (m, 4H).

## Ejemplo 2

Síntesis de (3R)-2-oxo-3-(m-tolil)butilfosfonato de dimetilo

Se añadió tetrahidrofurano (THF) (25 mL) a metilfosfonato de dimetilo (1,97 g), y se enfrió la mezcla a -78 °C. Se añadió n-butil-litio (solución 1,5 M en hexano) (10 mL), y se agitó la mezcla durante 1 h. Después, se añadió una solución del éster metílico {(2R)-2-(m-tolil)propionato de metilo} sintetizado en el Ejemplo 1 (1,34 g) en THF (3,8 mL) a -78 °C, y se agitó la mezcla durante 2 h. Se sofocó la reacción con 25 mL de hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado, y se extrajo la mezcla con acetato de etilo. Se secó el extracto sobre sulfato de magnesio, y se concentró a presión reducida. Se purificó el residuo por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano/acetato de etilo 5:1 - 1:5) para dar el compuesto del título (1,63 g). Las propiedades estructurales fueron como se describen a continuación.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1,39 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 2,34 (s, 3H), 2,84 (ddd, J = 22,3, 14,1, 0,6 Hz, 1H), 3,18 (dd, J = 22,3, 14,1 Hz, 1H), 3,76 (dd, J = 19,3, 11,1 Hz, 6H), 4,00 (dd, J = 13,8, 7,0 Hz, 1H), 7,01-7,24 (m, 4H).

## Ejemplo 3

Síntesis de (1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,4R)-3-oxo-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-benzoiloxi-2-oxabicyclo[3.3.0]octan-3-ona

Se dispersó hidruro de sodio (al 55 %) (8,75 g) en 1,2-dimetoxietano (DME) (300 mL) y se enfrió la mezcla con hielo. Se añadió una solución de fosfonato {(3R)-2-oxo-3-(m-tolil)butilfosfonato de dimetilo} (54,7 g), sintetizado en el Ejemplo 2, en DME (50 mL), y se agitó la mezcla durante 1 h. Se añadió a la solución anterior, una solución de (1S,5R,6R,7R)-6-formil-7-benzoiloxi-2-oxabicyclo[3.3.0]octan-3-ona (50,0 g) en DME (400 mL), y se agitó la mezcla durante 1 h. Se sofocó la reacción con 350 mL de salmuera al 10 %, y se extrajo la mezcla con acetato de etilo. Se secó el extracto sobre sulfato de magnesio, y se concentró el residuo a presión reducida. El producto crudo concentrado se recristalizó en t-butil-metil-éter para dar el compuesto del título (64,7 g). Las propiedades estructurales fueron como se describen a continuación.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1,39 (d, J = 7,0 Hz, 3H), 2,20-2,28 (m, 1H), 2,30 (s, 3H), 2,34-2,41 (m, 1H), 2,49-2,57 (m, 1H), 2,76-2,85 (m, 3H), 3,80 (q, J = 7,0 Hz, 1H), 5,03 (t, J = 5,3 Hz, 1H), 5,23 (q, J = 5,3 Hz, 1H), 6,19 (d, J = 15,5 Hz, 1H), 6,69 (dd, J = 15,6, 7,6 Hz, 1H), 6,94-7,19 (m, 4H), 7,42-7,95 (m, 5H).

## Ejemplo 4

Síntesis de (1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4R)-3-hidroxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-benzoiloxi-2-oxabicyclo[3.3.0]octan-3-ona

Una solución de la enona {(1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,4R)-3-oxo-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-benzoiloxi-2-oxabicyclo[3.3.0]octan-3-ona} (147,0 g) sintetizada en el Ejemplo 3, en THF (1480 mL), se enfrió a -40 °C, se añadió (-)-B-clorodiisopinocanfeilborano (solución 1,7 M en hexano) (721 mL), y se agitó la mezcla durante 20 h con enfriamiento en hielo. Se añadió acetona (183 mL) y se agitó la mezcla durante 3 h. Se añadió hidrogenocarbonato de sodio acuoso, y se extrajo la mezcla con t-butil-metil-éter. Se secó el extracto sobre sulfato de magnesio, y se concentró a presión reducida para dar el compuesto del título crudo (649,9 g).

## Ejemplo 5

Síntesis de (1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4R)-3-hidroxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-hidroxi-2-oxabicyclo[3.3.0]octan-3-ona

El alcohol crudo, {(1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4R)-3-hidroxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-benzoiloxi-2-oxabicyclo[3.3.0]octan-3-ona} (649,9 g) sintetizado en el Ejemplo 4, se disolvió en metanol (740 mL), se añadió carbonato de potasio (116,3 g), y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 17 h. Se añadió ácido acético para ajustar a pH 7, se evaporó el metanol, se añadió agua, y se extrajo la mezcla con acetato de etilo. Se purificó el extracto por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano/acetato de etilo = 4/1 - 0/1) para dar el compuesto del título (22,3 g). Las propiedades estructurales fueron como se describen a continuación.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1,33 (d, J = 7,0 Hz, 3H), 1,70 (s, 1H (OH)), 1,86 (ddd, J = 11,3, 7,8, 3,2 Hz, 1H), 2,07 (d, J = 4,4 Hz, 1H (OH)), 2,13-2,23 (m, 2H), 2,34 (s, 3H), 2,35-2,44 (m, 3H), 2,47 (d, J = 3,8 Hz, 1H), 2,56 (dd, J = 18,2, 9,7 Hz, 1H), 2,80 (q, J = 7,0 Hz, 1H), 3,79-3,85 (m, 1H), 4,12-4,16 (m, 1H), 4,81 (dt, J = 7,0, 3,2 Hz, 1H), 5,27 (ddd, J = 15,7, 8,5, 0,6 Hz, 1H), 5,50 (dd, J = 15,2, 6,8 Hz, 1H), 6,94-7,20 (m, 4H).

## Ejemplo 6

Síntesis de (1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4R)-3-t-butildimetilsiloxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-t-butildimetilsiloxi-2-oxabicyclo[3.3.0]octan-3-ona

A una solución del diol {(1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4R)-3-hidroxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-hidroxi-2-oxabicyclo[3.3.0]octan-3-ona} (988 mg) sintetizado en el Ejemplo 5, en N,N-dimetilformamida (DMF) (10 mL), se añadieron, a temperatura ambiente, cloruro de t-butildimetilsililo (1,17 g) e imidazol (1,08 g), y se agitó la mezcla durante 2,5 h. Se vertió la mezcla de reacción sobre hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado, y se extrajo la

mezcla con mezcla de hexano/acetato de etilo = 2/1. Se secó el extracto sobre sulfato de magnesio, se concentró a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano/acetato de etilo 20:1 - 10:1) para dar el compuesto del título (1,56 g). Las propiedades estructurales fueron como se describen a continuación.

5  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,09 (d, J = 6,4 Hz, 6H), 0,02 (d, J = 2,4 Hz, 6H), 0,86 (s, 9H), 0,89 (s, 9H), 1,27 (d, J = 7,0 Hz, 3H), 1,86-1,92 (m, 1H), 1,96-2,02 (m, 1H), 2,32 (s, 3H), 2,31-2,47 (m, 3H), 2,62-2,73 (m, 2H), 3,82 (q, J = 4,7 Hz, 1H), 4,05 (t, J = 6,4 Hz, 1H), 4,86 (dt, J = 8,0, 2,4 Hz, 1H), 5,16 (dd, J = 15,5, 7,4 Hz, 1H), 5,30 (dd, J = 15,7, 6,3 Hz, 1H), 6,90-7,16 (m, 4H).

#### Ejemplo 7

10 Síntesis de (1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4R)-3-t-butildimetilsiloxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-t-butildimetilsiloxi-2-oxa-4,4-difluoro-biciclo[3.3.0]octan-3-ona

15 Se añadió tetrahidrofurano (THF) (19 mL) a bromuro de manganeso (1,48 g) y N-fluorobencenosulfonimida (2,48 g), y se agitó la mezcla durante 30 min, y se enfrió a  $-78^\circ\text{C}$ . Se añadió una solución de la lactona {(1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4R)-3-t-butildimetilsiloxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-t-butildimetilsiloxi-2-oxabicyclo[3.3.0]octan-3-ona} (0,5 g) sintetizada en el Ejemplo 6, en THF (5 mL), se añadió una solución (0,5 M, 13 mL) de bis(trimetilsilil)amiduro de potasio en tolueno y se calentó la mezcla a  $0^\circ\text{C}$  durante 3,5 h. La mezcla de reacción se vertió sobre hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado, y se extrajo la mezcla con mezcla de hexano/acetato de etilo = 1/1. Se secó el extracto sobre sulfato de magnesio, se concentró a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano/acetato de etilo 20:1) para dar el compuesto del título (0,32 g). Las propiedades estructurales fueron como se describen a continuación.

20  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,08-0,03 (m, 12H), 0,82 (s, 9H), 0,89 (s, 9H), 1,28 (d, J = 7,0 Hz, 3H), 1,70- 1,77 (m, 1H), 1,96-2,04 (m, 1H), 2,31 (s, 3H), 2,60-2,91 (m, 3H), 3,82-3,87 (m, 1H), 3,99-4,23 (m, 1H), 5,00 (t, J = 6,4 Hz, 1H), 5,06 (dd, J = 15,7, 7,8 Hz, 1H), 5,33 (ddd, J = 15,9, 6,7, 1,2 Hz, 1H), 6,88-7,16 (m, 4H).

$^{19}\text{F-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): -113,1 (d, J = 279,3 Hz), -91,0 (dd, J = 279,3, 25,9 Hz).

#### Ejemplo 8

25 Síntesis de 4-[(Z)-(1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4R)-3-t-butildimetilsiloxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-t-butildimetilsiloxi-2-oxa-4,4-difluoro-biciclo[3.3.0]octan-3-iliden]-1-(tetrazol-5-il)butano

30 A una suspensión de bromuro de 4-(tetrazol-5-il)butiltrifenilfosfonio (14,0 g) en tolueno (390 mL), se añadió una solución (0,5 M, 120 mL) de bis(trimetilsilil)amiduro de potasio en tolueno, y se agitó la mezcla a  $60^\circ\text{C}$  durante 1 h. Se añadió una solución de la difluorolactona {(1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4R)-3-t-butildimetilsiloxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-t-butildimetilsiloxi-2-oxa-4,4-difluoro-biciclo[3.3.0]octan-3-ona} sintetizada en el Ejemplo 7 (4,32 g), en tolueno (130 mL) a  $-10^\circ\text{C}$ , y se agitó la mezcla durante 18 h mientras se templaba la mezcla a temperatura ambiente. Se añadió hidrogenocarbonato de sodio acuoso para sofocar la reacción, y se extrajo la mezcla con mezcla de hexano/acetato de etilo = 1/1. Se secó el extracto sobre sulfato de magnesio, se concentró a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano/acetato de etilo = 5/1 - 0/1) para dar el compuesto del título (4,1 g). Las propiedades estructurales fueron como se describen a continuación.

35  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,14-0,01 (m, 12H), 0,82 (s, 9H), 0,89 (s, 9H), 1,23-1,27 (m, 3H), 1,82-2,09 (m, 5H), 2,21-2,28 (m, 1H), 2,31 (s, 3H), 2,45-2,53 (m, 1H), 2,64-2,73 (m, 2H), 2,93-2,97 (m, 2H), 3,90 (dd, J = 11,7, 5,3 Hz, 1H), 4,08-4,09 (m, 1H), 4,84-4,87 (m, 2H), 5,27 (dd, J = 15,5, 7,8 Hz, 1H), 5,44 (dd, J = 15,6, 6,2 Hz, 1H), 6,92-7,16 (m, 4H).

$^{19}\text{F-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): -112,3 (d, J = 253,4 Hz), -81,4 (dd, J = 253,4, 18,7 Hz).

#### Ejemplo 9

40 Síntesis de 4-[(Z)-(1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4R)-3-hidroxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-hidroxi-2-oxa-4,4-difluoro-biciclo[3.3.0]octan-3-iliden]-1-(tetrazol-5-il)butano

45 Se añadieron THF (81 mL), agua (81 mL) y ácido acético (244 mL) al compuesto (4,1 g) sintetizado en el Ejemplo 8, y se agitó la mezcla a  $35^\circ\text{C}$  durante 46 h. Se añadió agua (500 mL) y se extrajo la mezcla con cloroformo. Se secó el extracto sobre sulfato de magnesio, se concentró a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano/acetato de etilo = 1/5 - 0/1) y se recristalizó en éter dietílico para dar el compuesto del título (1,1 g). Las propiedades estructurales fueron como se describen a continuación.

50  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1,30 (d, J = 7,0 Hz, 3H), 1,69 (dddd, J = 14,6, 7,6, 3,0, 2,6 Hz, 1H), 1,82-1,95 (m, 2H), 2,10-2,16 (m, 2H), 2,29 (s, 3H), 2,31-2,41 (m, 2H), 2,48-2,56 (m, 1H), 2,72 (q, J = 7,0 Hz, 1H), 2,93 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 3,78 (q, J = 7,6 Hz, 1H), 4,04-4,10 (m, 1H), 4,69 (dt, J = 6,48, 2,96 Hz, 1H), 4,79 (dt, J = 7,6, 5,0 Hz, 1H), 5,36-5,46 (m, 2H), 6,95-7,13 (m, 4H).

$^{19}\text{F-NMR}$  ( $\text{CO}_3\text{OD}$ ) -116,6 (d, J = 250,5 Hz), -84,8 (ddd, J = 251,9, 17,3, 14,4 Hz).

## Ejemplo 10

## Síntesis de 2-oxo-3-(m-tolil)butilfosfonato de dimetilo

Utilizando racemato de ácido 2-(m-tolil)propiónico y de la misma manera que en el método de los ejemplos 1 - 2, se sintetizó el compuesto del título. Las propiedades estructurales fueron como se describen a continuación.

- 5  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,39 (d, J = 7,2 Hz, 3H), 2,34 (s, 3H), 2,83 (dd, J = 22,4, 14,4 Hz, 1H), 3,18 (dd, J = 22,4, 14,0 Hz, 1H), 3,76 (dd, J = 19,6, 11,2 Hz, 6H), 3,99 (dd, J = 14,0, 6,8 Hz, 1H), 7,01-7,27 (m, 4H).

## Ejemplo 11

## Síntesis de (1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4RS)-3-t-butildimetilsiloxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-t-butildimetilsiloxi-2-oxabicyclo[3.3.0]octan-3-ona

- 10 Utilizando racemato de 2-oxo-3-(m-tolil)butilfosfonato de dimetilo y de la misma manera que en el método de los ejemplos 3 - 6, se sintetizó el compuesto del título. Las propiedades estructurales fueron como se describen a continuación.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,20-0,10 (m, 12H), 0,80-0,90 (m, 18H), 1,18-1,28 (m, 3H), 1,85-2,20 (m, 2H), 2,31 (s, 3H), 2,30-2,80 (m, 5H), 3,80-4,15 (m, 2H), 4,81-4,95 (m, 1H), 5,12-5,42 (m, 2H), 6,88-7,20 (m, 4H).

- 15 Ejemplo 12

## Síntesis de (1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4RS)-3-t-butildimetilsiloxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-t-butildimetilsiloxi-2-oxa-4,4-difluoro-bicyclo[3.3.0]octan-3-ona

- 20 Utilizando la (1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4RS)-3-t-butildimetilsiloxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-t-butildimetilsiloxi-2-oxabicyclo[3.3.0]octan-3-ona sintetizada en el Ejemplo 11, y de la misma manera que en el método del Ejemplo 7, se sintetizó el compuesto del título. Las propiedades estructurales fueron como se describen a continuación.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,20-0,05 (m, 12H), 0,80-0,90 (m, 18H), 1,19-1,29 (m, 3H), 1,70-2,10 (m, 2H), 2,31 (s, 3H), 2,60-3,05 (m, 3H), 3,84-4,12 (m, 2H), 4,95-5,50 (m, 3H), 6,85-7,20 (m, 4H).

$^{19}\text{F-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): -113,6 a -112,8 (m), -91,7 a -90,6 (m).

## Ejemplo 13

- 25 Síntesis de 4-[(Z)-(1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4RS)-3-t-butildimetilsiloxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-t-butildimetilsiloxi-2-oxa-4,4-difluoro-bicyclo[3.3.0]octan-3-iliden]-1-(tetrazol-5-il)butano

Utilizando la (1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4RS)-3-t-butildimetilsiloxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-t-butildimetilsiloxi-2-oxa-4,4-difluoro-bicyclo[3.3.0]octan-3-ona sintetizada en el Ejemplo 12 y de la misma manera que en el método del Ejemplo 8, se sintetizó el compuesto del título. Las propiedades estructurales fueron como se describen a continuación.

- 30  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,15-0,05 (m, 12H), 0,80-0,89 (m, 18H), 1,20-1,28 (m, 3H), 1,80-3,05 (m, 14H), 3,90-4,15 (m, 2H), 4,85-4,95 (m, 2H), 5,23-5,58 (m, 2H), 6,90-7,20 (m, 4H).

$^1\text{F-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): -113,0 a -111,3 (m), -82,0 a -80,7 (m).

## Ejemplo 14

- 35 Síntesis de 4-[(Z)-(1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4RS)-3-hidroxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-hidroxi-2-oxa-4,4-difluoro-bicyclo[3.3.0]octan-3-iliden]-1-(tetrazol-5-il)butano

Utilizando el 4-[(Z)-(1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4RS)-3-t-butildimetilsiloxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-t-butildimetilsiloxi-2-oxa-4,4-difluoro-bicyclo[3.3.0]octan-3-iliden]-1-(tetrazol-5-il)butano sintetizado en el Ejemplo 13, y de la misma manera que en el método del Ejemplo 9, se sintetizó el compuesto del título. Las propiedades estructurales fueron como se describen a continuación.

- 40  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,15-1,35 (m, 3H), 1,80-3,00 (m, 11H), 2,29 (s, 3H), 4,05-4,20 (m, 2H), 4,75-4,85 (m, 2H), 5,35-5,70 (m, 2H), 6,95-7,25 (m, 4H)

$^{19}\text{F-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): -114,5 a -112,7 (m), -83,5 a -81,8 (m).

## Ejemplo 15

Síntesis de ácido 5-[(Z)-(1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4RS)-3-hidroxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-hidroxi-2-oxa-4,4-difluoro-biciclo[3.3.0]octan-3-iliden]pentanoico (forma carboxilato)

5 Utilizando la (1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4RS)-3-t-butildimetilsiloxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-butildimetilsiloxi-2-oxa-4,4-difluoro-biciclo[3.3.0]octan-3-ona sintetizada en el Ejemplo 12 y bromuro de (4-carboxibutil)trifenilfosfonio, y de la misma manera que en el método de los ejemplos 8 - 9, se sintetizó el compuesto del título. Las propiedades estructurales fueron como se describen a continuación.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1,17-1,30 (m, 3H), 1,63-2,79 (m, 11H), 2,29 (s, 3H), 3,75-4,12 (m, 2H), 4,66-4,85 (m, 2H), 5,40-5,58 (m, 2H), 6,95-7,15 (m, 4H).

10  $^{19}\text{F-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ): -118,3 a -117,7 (d, J = 250,4Hz), -86,1 a - 85,3 (m).

## Ejemplo 16

Estabilidad metabólica *in vitro* del compuesto de la presente invención

15 Se ensayaron una mezcla de compuesto F y compuesto J de la presente invención descrita en la Tabla 1 (F:J = 52:41, sintetizada en el Ejemplo 14), y una mezcla de compuestos en donde los grupos tetrazol en C-1 del compuesto F y del compuesto J están sustituidos respectivamente por ácido carboxílico (denominada como la forma carboxilato, F:J = 54:34, sintetizada en el Ejemplo 15).

20 En primer lugar, se preparó una fracción de mitocondrias a partir del hígado de rata según la siguiente Referencia A. Después, en referencia al método de YAMAGUCHI et al. descrito en las siguientes referencias B y C, se estudió una reacción de  $\beta$ -oxidación independiente de NADPH. Se llevó a cabo la reacción a 37 °C durante 30 min, y se paró con una solución de metanol que contenía una sustancia adecuada como patrón interno. Cada compuesto se cuantificó por el método del patrón interno utilizando un aparato de cromatografía de líquidos de alta resolución con espectrometría de masas (LC-MS/MS). La proporción residual de compuesto después de la reacción metabólica de los compuestos F, J y cada forma carboxilato de los mismos en la fracción de mitocondrias de rata, se muestra en la siguiente Tabla 2 expresada como la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos.

25 Tabla 2. Proporción residual del compuesto parental después de la reacción de  $\beta$ -oxidación

Compuesto	Proporción residual (%)
Compuesto F	91,6 $\pm$ 6,8
Compuesto J	90,1 $\pm$ 6,9
Forma carboxilato del compuesto F	27,8 $\pm$ 2,2
Forma carboxilato del compuesto J	44,1 $\pm$ 2,1

Como se desprende de la Tabla 2 anterior, el compuesto F y el compuesto J representativos de la presente invención no están sujetos a  $\beta$ -oxidación en una fracción de mitocondrias.

## Referencias

30 A) The Japanese Biochemical Society, ed., Biochemical Experiment Course 12 energy metabolism and biological oxidation (vol. 1), Tokyo Kagaku Dojin, p. 217-218, 1st ed. 2nd printing, published on July 11, 1979.

B) Drug Metabolism And Disposition 23 (11): 1195-1201 (1995).

C) Xenobiotica 26(6): 613-626 (1996).

## Ejemplo 17

Farmacocinética en plasma después de administración intravenosa a ratas

35 Para verificar la estabilidad metabólica *in vivo* del compuesto de la presente invención, se evaluó la farmacocinética plasmática después de administración intravenosa a ratas. Se aclimataron ratas macho (6 semanas de edad, peso corporal 160-180 g) durante 1 semana, y se utilizaron los animales diagnosticados como sanos. Una mezcla del compuesto F y del compuesto J de la presente invención descrita en la Tabla 1 (F:J = 52:41), y una mezcla de las formas carboxilato de compuesto F y compuesto J (F:J = 54:34), y el compuesto F (sintetizado en el Ejemplo 9), se disolvieron en una pequeña cantidad de etanol y se añadió solución salina fisiológica para preparar las soluciones del compuesto de ensayo. Las soluciones del compuesto de ensayo se administraron de forma instantánea por vía intravenosa a 1 mL/kg en la vena femoral de ratas que no estaban en ayunas bajo ligera anestesia con éter. Se extrajo sangre venosa de la vena caudal 5, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min después de la administración. Se mezcló la sangre con heparina y se centrifugó (3000 rpm, 4 °C, 15 min) para obtener el plasma. Se determinó la concentración

5 del compuesto en plasma por el método del patrón interno utilizando LC-MS/MS. El intervalo de determinación por este método fue de 0,1 a 100 ng/mL. Las concentraciones de compuesto obtenidas de cada rata se analizaron, de una manera independiente del modelo, utilizando el software de análisis farmacocinético WinNonlin (ver. 3.3), y se obtuvo la media  $\pm$  desviación estándar de 3 animales para cada grupo. La semivida aparente ( $t_{1/2}$ ) en la fase de eliminación se muestra en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3. Semivida aparente de la fase de eliminación de los compuestos después de la administración intravenosa a ratas

compuesto de ensayo	dosis	$t_{1/2}$ (min)
compuesto F administrado como una mezcla con isómeros	50 $\mu$ g/kg (mezcla con isómeros)	115 $\pm$ 31
compuesto J administrado como una mezcla con isómeros	50 $\mu$ g/kg (mezcla con isómeros)	77 $\pm$ 19
compuesto F	300 $\mu$ g/kg	158 $\pm$ 15
forma carboxilato del compuesto F administrada como una mezcla con isómeros	50 $\mu$ g/kg (mezcla con isómeros)	9,6 $\pm$ 1,7
forma carboxilato del compuesto J administrada como una mezcla con isómeros	50 $\mu$ g/kg (mezcla con isómeros)	8,9 $\pm$ 0,3

10 Como se desprende de la Tabla 3 anterior, los valores de  $t_{1/2}$  del compuesto F y del compuesto J de la presente invención fueron aproximadamente 1 - 2 h, que fueron notablemente prolongados en comparación con menos de 10 min de las formas carboxilato. Esto da a entender que el compuesto F y el compuesto J de la presente invención tienen una excelente estabilidad metabólica.

Ejemplo 18

Afinidad para el receptor

15 Se evaluó la afinidad para el receptor de PG, del compuesto F y del compuesto J de la presente invención. El compuesto F utilizado fue uno sintetizado en el Ejemplo 9, y el compuesto J se preparó mediante la separación y purificación del compuesto sintetizado en el Ejemplo 14 con una columna (se utilizaron las mismas preparaciones en los siguientes ejemplos). Se transfectaron células COS-7 con genes de EP4 de ratón, EP1-4 humano o IP humano para sobreexpresar el receptor y después se recogieron las membranas celulares. Como un ligando marcado, para los EP se utilizó PGE<sub>2</sub> marcada con tritio; para el IP, iloprost marcado con tritio. Se obtuvo el valor de la constante de disociación K<sub>d</sub> y se determinó el valor de la constante de inhibición K<sub>i</sub> de cada compuesto de ensayo con un método convencional. Como control de referencia, se utilizó PGE<sub>2</sub> para los EP; y beraprost de sodio (BPS), para IP.

20 Como resultado, la constante de disociación fue casi idéntica a los valores de las publicaciones científicas. Como se muestra en la Tabla 4, PGE<sub>2</sub> se unió de modo equivalente a los EP1-4, y no se observó su selectividad para los subtipos de EP. El BPS se unió selectivamente a IP. Los compuestos F y J se unieron a los EP4 de ratón y humanos. La afinidad del compuesto F para unirse al EP4 humano fue más alta, 60 veces o más, que para unirse a los receptores humanos EP1, EP2 y EP3, y 100 veces o más que para unirse a IP. La afinidad de unión del compuesto J para el EP4 humano fue 40 veces más alta que para el IP humano.

Tabla 4. Afinidad de unión de los compuestos de ensayo para diversos receptores

Compuesto de ensayo	Valor de K <sub>i</sub> (nmol/L)					
	EP4 de ratón	EP1 humano	EP2 humano	EP3 humano	EP4 humano	IP humano
PGE <sub>2</sub>	2,6	2,9	6,0	2,1	1,1	-
BPS	-	942	4989	946	6148	160
Compuesto F	68	610	570	410	6,6	670
Compuesto J	590	4600	5400	1500	83	3400

30

Ejemplo 19

Actividad agonista

35 Se evaluó la actividad agonista de EP4 del compuesto F y del compuesto J de la presente invención con un método convencional. En resumen, el gen EP4 humano y el gen reportero CRE-LUC fueron transfectados a células COS-7. Las células se trataron con un compuesto de ensayo un día más tarde, y se incubaron durante 3 h. Se lavaron las células, se añadió un sustrato de luminiscencia, y se midió la intensidad de luminiscencia para la actividad agonista.

Como control de referencia, se utilizó PGE<sub>2</sub> y la actividad máxima de PGE<sub>2</sub> se tomó como 100 %. Se calculó la concentración eficaz del 50 % (EC<sub>50</sub>) y se comparó la actividad agonista del compuesto de ensayo.

Como resultado, como se muestra en la Tabla 5, los compuestos F y J son agonistas de EP4.

Tabla 5. Actividad agonista de EP4 de los compuestos de ensayo

Compuesto de ensayo	EC <sub>50</sub> (nmol/L)
	EP4
PGE <sub>2</sub>	0,68
BPS	>1000
Compuesto F	3,33
Compuesto J	440

5 Cada valor es la media geométrica de tres determinaciones.

#### Ejemplo 20

##### Efecto inhibitor sobre la agregación plaquetaria

10 Se evaluó el efecto inhibitor de los compuestos F y J, y las formas carboxilato de los mismos sobre la agregación de plaquetas. Las formas carboxilato se prepararon mediante la separación y purificación del compuesto sintetizado en el Ejemplo 15 con una columna. Se extrajo sangre de 3 voluntarios sanos utilizando citrato de sodio como anticoagulante, y se preparó plasma rico en plaquetas. El plasma rico en plaquetas se trató con solución salina fisiológica o con los compuestos de ensayo y, 2 minutos más tarde, se indujo la agregación plaquetaria con difosfato de adenosina (ADP, concentración final de 10 µmol/L) y se registró con un aparato de medida de la agregación plaquetaria (nefelometría). La agregación máxima del grupo tratado con solución salina fisiológica se tomó como 100 %.

15 %, se calculó la concentración requerida para una inhibición del 50 % (IC<sub>50</sub>) de la misma, y se evaluó el efecto inhibitor.

Como resultado, como se muestra en la Tabla 6, los compuestos F y J tuvieron un efecto inhibitor sobre la agregación considerablemente débil en comparación con los agonistas de IP (BPS y formas carboxilato).

Tabla 6. Efecto inhibitor de los compuestos de ensayo sobre la agregación de plaquetas humanas

Compuesto de ensayo	IC <sub>50</sub> (nmol/L)
BPS	36
Compuesto F	917
Compuesto J	2725
Forma carboxilato del compuesto F	120
Forma carboxilato del compuesto J	190

20 Cada valor IC<sub>50</sub> es la media geométrica de tres voluntarios.

#### Ejemplo 21

##### Efecto sobre la presión arterial y la frecuencia cardíaca en ratones

25 Se compraron ratones macho ICR (5 semanas de edad, Japan SLC), se aclimataron durante 6 días y se utilizaron para el ensayo. Los animales se trataron y se midieron bajo anestesia por inhalación de isoflurano (anestesia introducida al 2,5 %, mantenida a 1,8-2,1 %), mientras se mantenía la temperatura corporal a 37 °C con un controlador de calor (ATC-402, Unique Medical Co., Ltd.). Se insertó un catéter para la administración de los compuestos de ensayo en la vena femoral izquierda, y se insertó otro catéter en la arteria femoral derecha y se conectaron a un transductor de presión para registrar cada parámetro hemodinámico.

30 El compuesto F, la forma carboxilato del compuesto F y BPS se administraron por vía intravenosa a una dosis de 0,01 mg/5 mL/kg, y se evaluó el efecto sobre la presión arterial media y la frecuencia cardíaca con un software de ordenador para el análisis hemodinámico (Fluclet, Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.). Al grupo control se le administró por vía intravenosa un disolvente (solución de etanol al 1,2 %) a 5 mL/kg de la misma manera. Los resultados se expresan como una proporción del cambio de cada parámetro antes y después de la administración del fármaco. Se utilizaron 3 a 6 animales para cada grupo, y los resultados se expresaron como la media ± la desviación estándar.

35

Como resultado, el disolvente no afectó a la presión arterial media, pero la forma carboxilato del compuesto F y el BPS disminuyeron notablemente la presión arterial 1 min después de la administración, momento en el que la proporción de disminución máxima fue de 45 % y 38 %, respectivamente (Fig. 1A). La presión arterial disminuida se



recuperó en 10 minutos, pero la frecuencia cardíaca fue en aumento y se mantuvo alta incluso después de 10 min (Fig. 1B). La proporción de disminución máxima por el compuesto F fue de 16,2 %, lo que no fue significativo (Fig. 1A). Además, el compuesto F tuvo poco efecto sobre la frecuencia cardíaca (Fig. 1B). Por lo tanto, el efecto del compuesto F sobre la presión arterial y la frecuencia cardíaca fue extremadamente débil, en comparación con la forma carboxilato y el BPS (agonista de IP).

#### Ejemplo 22

##### Efecto reductor sobre la producción de citocinas inflamatorias

Utilizando sangre periférica humana, se estudió un efecto anti-inflamatorio de los compuestos F y J *in vitro*. Se recogió sangre de 3 voluntarios sanos, y se prepararon células T CD4 positivas. Se añadieron anticuerpo anti-CD3 y anticuerpo anti-CD28, y 24 horas más tarde se midieron las cantidades de IL-2 y TNF $\alpha$  liberadas en el medio, mediante el método ELISA. Además, la sangre entera recogida se diluyó con el medio, se trató con indometacina para inhibir la producción de PGE<sub>2</sub> endógena, y se le añadió lipopolisacárido. La cantidad de IP-10 liberada al medio durante 48 h se midió con ELISA. En ambos casos, se añadió el compuesto de ensayo 30 min antes de la estimulación. La cantidad de producción del grupo control con disolvente, se tomó como el 100 %, y se determinó la concentración requerida para una inhibición del 50 % (IC<sub>50</sub>) de la misma.

Como resultado, como se muestra en la Tabla 7, la PGE<sub>2</sub> y el compuesto F deprimieron fuertemente la producción de las citocinas inflamatorias IL-2, TNF $\alpha$  e IP-10, incluso a una concentración extremadamente baja. Aunque débilmente, en comparación con el compuesto F, el compuesto J también redujo la producción de citocinas. El efecto de cada compuesto refleja su afinidad por EP4 y su actividad agonista de EP4.

Como se ha mencionado antes, aunque los compuestos de la presente invención, incluyendo el compuesto F, son derivados de PGI<sub>2</sub>, ellos son agonistas selectivos de EP4 con una actividad agonista de IP extremadamente reducida en comparación con la actividad observada en las formas carboxilato en C-1. Se espera que el compuesto de la presente invención muestre una eficacia clínica similar en el grupo de enfermedades para el que un agonista de EP4 es eficaz. En contraste, el compuesto provoca menos preocupación en cuanto a los efectos secundarios tales como hemorragia, hipotensión, palpitación cardíaca y rubefacción de la cara, ya que el efecto del mismo sobre el sistema circulatorio debido a la acción agonista de IP también está debilitado. Por ejemplo, es importante atenuar tales acciones agonistas de IP en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino con hemorragia intestinal. Utilizando el compuesto F, se determinó la eficacia del compuesto de la presente invención en diversos modelos animales, tales como la enfermedad inflamatoria intestinal.

Tabla 7. Efecto reductor de los compuestos de ensayo sobre la producción de citocinas

Compuesto de Ensayo	IC <sub>50</sub> (nmol/L)		
	IL-2	TNF- $\alpha$	IP-10
PGE <sub>2</sub>	0,062	0,447	0,168
Compuesto F	0,509	1,254	1,144
Compuesto J	64,0	89,5	102

Cada valor es la media geométrica de tres voluntarios

#### Ejemplo 23

##### Efecto profiláctico sobre el modelo de colitis inducida por dextrano sulfato de sodio en ratones

Se examinó el efecto profiláctico del compuesto F sobre la colitis ulcerosa en el modelo de colitis inducida por dextrano sulfato de sodio. El modelo animal presenta inflamación localizada en el intestino grueso, que da como resultado diarrea y heces con sangre, lo que se parece mucho a las condiciones patológicas de la colitis ulcerosa clínica (véase: Referencias D y E).

Se compraron ratones hembra BALB/c (6 semanas de edad, Japan SLC), se aclimataron durante 1 semana y se utilizaron para el estudio. Excepto el grupo normal, se dejó que los ratones bebieran libremente una solución de dextrano sulfato de sodio (abreviado como DSS, MP Biochemicals, peso molecular 36.000 – 50.000, Lote No. 3439J) preparada a 2,2 % p/v, durante 9 días para inducir la colitis. El compuesto F se administró por vía oral a dosis de 0,1, 0,3 y 1 mg/kg, una vez al día, todos los días, desde el día de inicio de la bebida de DSS (día 0) hasta un día antes de la autopsia (día 9). Al grupo control se le administró por vía oral un disolvente (solución de etanol al 1 % en volumen) a 10 mL/kg, de la misma manera.

Un estudio preliminar había revelado que las heces de ratón muestran una correlación entre el contenido en agua y la forma de las mismas. Por lo tanto, para determinar el nivel de diarrea, se clasificaron las heces en 6 niveles; normales (puntuación 0), no menos del 50 % de heces esféricas (puntuación 1), menos del 50 % de heces en forma de plátano (puntuación 2), no menos del 50 % de heces en forma de plátano (puntuación 3), heces fangosas (puntuación 4), heces acuosas (puntuación 6) (puntuación de consistencia de las heces). La sangre oculta en heces

(incluyendo la proctorragia) se clasificó, utilizando 5 extensiones de sangre oculta fecal de Shionogi II (Shionogi & Co., Ltd.), en 6 niveles; negativa (ningún cambio de color de la extensión desde el amarillo, puntuación 0), débilmente positiva (ligeramente verde azulado, puntuación 1), positiva (verde azulado, puntuación 2), moderadamente positiva (verde azulado claro, puntuación 3), fuertemente positiva (cambio instantáneo de color a azul oscuro con desarrollador de color, puntuación 4), y proctorragia (puntuación 5). La suma de la puntuación de consistencia de las heces y la puntuación de sangre oculta se definió como la puntuación de las heces. Se utilizaron de 8 a 10 animales para cada grupo, y los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar. El día de la autopsia, después de laparotomía bajo anestesia con éter y recogida de sangre, se desangraron los ratones hasta la muerte. Después, se disecaron los intestinos gruesos desde justo debajo del ciego hasta el ano y se midió la longitud de los mismos.

Como resultado, el peso corporal aumentó gradualmente durante el período de estudio sin ninguna diferencia entre los grupos. El grupo control mostró heces sueltas evidentes y sangre oculta en las heces desde el día 4 de la bebida de DSS. El día de la autopsia (día 9), la longitud del intestino grueso de este grupo fue claramente más corta que la del grupo normal. El compuesto F redujo, de manera dependiente de la dosis, el aumento en la puntuación de las heces, lo que fue una tendencia reductora a 0,1 mg/kg y significativa a 0,3 y 1 mg/kg (Fig. 2A). Del mismo modo, el compuesto F mostró un efecto reductor, dependiente de la dosis, sobre el acortamiento del intestino grueso (Fig. 2B). Por lo tanto, el compuesto F impidió claramente la aparición de la colitis ulcerosa.

#### Referencias

- D) Lab. Invest. 69 (2): 238-249 (1993).  
 E) Inflamm. Res. 45(4): 181-191 (1996).

#### Ejemplo 24

Efecto del agonista de IP sobre el modelo de colitis inducida por dextrano sulfato de sodio en ratones

Se determinó si un agonista de IP tenía o no un efecto sobre dicho modelo de colitis, utilizando un agonista selectivo de IP, el BPS.

Se compraron ratones hembra C57BL/6 (6 semanas de edad, Japan SLC), se aclimataron durante 1 semana y se utilizaron para el estudio. Excepto el grupo normal, se dejó que los ratones bebieran libremente solución de DSS al 3 o 2 % p/v (MP Biochemicals, Lote No. 5653H y 5464H, respectivamente) durante 1 semana para inducir la colitis. Se administraron por vía oral una vez al día, BPS a una dosis de 0,3 mg/kg y el compuesto F a dosis de 0,3 y 1 mg/kg, todos los días, desde el día de inicio de la bebida de DSS (día 0) hasta un día antes de la autopsia (día 9). Se administró al grupo control por vía oral un disolvente (solución de etanol al 1 % en volumen) a 10 mL/kg de la misma manera. La consistencia de las heces se calificó con puntuación de 0 a 4, siendo heces normales (0), heces parcialmente sueltas (1), heces sueltas (2) y diarrea (4). Las heces con sangre se calificaron también con puntuación de 0 a 4, siendo las heces normales (0), heces parcialmente sanguinolentas (1), heces sanguinolentas (2) y heces sanguinolentas más proctorragia (4). La suma de ambas calificaciones se definió como la puntuación de las heces (máximo 8). Además, se midió la longitud del intestino grueso de la misma manera que en el Ejemplo 23. Se utilizaron 6 a 10 animales para cada grupo, y los resultados se muestran como la media  $\pm$  desviación estándar.

Como resultado, el agonista de IP, BPS, no fue eficaz, sino que mostró más bien una tendencia al agravamiento de la puntuación de las heces. Tampoco mostró ningún efecto sobre el acortamiento del intestino grueso (Figs. 3A y 3C). Sin embargo, el compuesto F demostró un efecto profiláctico superior sobre la aparición de la colitis de la misma manera que se ve en el Ejemplo 23 (Figs. 3B y 3D). Así, el efecto del tratamiento corresponde a una acción agonista de EP4, y algunas veces se debilita por una acción agonista de IP. Por lo tanto, el ser un agonista selectivo de EP4 es importante.

#### Ejemplo 25

Efecto profiláctico sobre la colitis inducida por dextrano sulfato de sodio en ratas

El efecto profiláctico del compuesto F sobre la colitis se estudió también en ratas. Se compraron ratas macho SD, de 7 semanas de edad, con un peso corporal alrededor de 210 g - 240 g (Charles River), se aclimataron durante 1 semana y se utilizaron para el estudio. Excepto el grupo normal, se dejó que las ratas bebieran libremente una solución de DSS (MP Biochemicals, peso molecular 36.000-50.000, Lote No. 4556J) preparada a 5,5 % p/v, durante 8 días para inducir la colitis. Se administró el compuesto F a dosis de 0,3, 1 y 3 mg/kg por vía oral una vez al día, diariamente, desde un día antes del día de inicio de la bebida de DSS hasta un día antes de la autopsia (día 7). Se administró al grupo control por vía oral un disolvente (solución de etanol al 1 % en volumen) a 5 mL/kg.

El día 8 desde el inicio de la bebida de DSS, se administró solución de azul de Evans al 1,25 % p/v a 0,2 mL/100 g en la vena caudal. Después de 30 min, se sometieron las ratas a laparotomía bajo anestesia con éter y se desangraron hasta la muerte. A continuación, se disecó el intestino grueso desde justo debajo del ciego hasta el ano, y se midió la longitud con una escala. Después, se separó el contenido del intestino grueso, se lavó el tejido

colónico de 7 cm de largo desde el ano, 3 veces con solución salina fisiológica y se secó durante la noche con una bomba de vacío. El día siguiente, se determinó el peso seco, se añadió formamida (2 mL), se extrajo el colorante a 50 °C durante la noche, y se midió el nivel del mismo a 620 nm. Se preparó una curva estándar utilizando una solución estándar de azul de Evans, y se calculó la cantidad (mg) de azul de Evans en 1 g de tejido colónico para estimar el grado de la lesión del tejido colónico.

Para mostrar el nivel de diarrea, se clasificó la forma de las heces en 6 niveles, heces normales (puntuación 0), menos del 50 % de heces en forma de barra (puntuación 1), no menos del 50 % de heces en forma de barra (puntuación 2), heces en forma de barra y heces parcialmente fangosas (puntuación 3), heces fangosas (puntuación 4) y heces acuosas (puntuación 6) (puntuación de consistencia de las heces). La puntuación de la sangre oculta se realizó por el mismo método descrito en el Ejemplo 23. La suma de la puntuación de consistencia de las heces y la puntuación de sangre oculta se definió como la puntuación de las heces. Se utilizaron 7 a 10 animales para cada grupo, y los resultados se muestran como la media  $\pm$  desviación estándar.

Como resultado, el peso corporal del grupo control aumentó gradualmente de forma consistente, pero el aumento fue significativamente menor que el del grupo normal. La puntuación de las heces del grupo control aumentó significativamente a partir el día 1 de la bebida de DSS. El día de la autopsia (día 8), el intestino grueso de este grupo mostró una lesión evidente del tejido y un acortamiento significativo. En contraste, la administración del compuesto F a 1 mg/kg y 3 mg/kg mostró una tendencia reductora o un efecto reductor significativo sobre estos sucesos (Figuras. 4A, 4B, 4C). Es decir, el compuesto F evita el desarrollo de úlcera en el intestino grueso y normaliza la función orgánica, lo que lleva a la reducción de los síntomas de diarrea y heces con sangre.

#### Ejemplo 26

Efecto terapéutico sobre el modelo de remisión/recaída de la colitis inducida por dextrano sulfato de sodio en ratones

A continuación, se estudió el efecto terapéutico del compuesto F sobre la colitis en un modelo crónico. Se compraron ratones hembra BALB/c, de 6 semanas de edad, con peso corporal de aproximadamente 20 g (Japan SLC), se aclimataron durante 1 semana y se utilizaron para el estudio. Los ratones se dividieron en un grupo de inducción de la colitis y un grupo normal. Se dejó que el grupo de inducción de la colitis bebiera libremente una solución de DSS al 2,6 % p/v (MP Biochemicals, peso molecular 36.000-50.000, Lote No. 4556J) para inducir la colitis. El día 8 cuando la puntuación de las heces (definida en el Ejemplo 23) del grupo de inducción de la colitis alcanzó aproximadamente 4,5, se subdividieron los ratones en un grupo control, un grupo de administración de 1 mg/kg del compuesto F y un grupo de administración de 100 mg/kg de salazosulfapiridina (SIGMA, lote N° 085K1930 de aquí en adelante abreviada como SASP). Después, se dejó que los ratones bebieran libremente agua destilada en lugar de la solución de DSS durante 9 días (período de remisión). Después de la formación de los grupos, se evaluó la puntuación de las heces cada 3 - 4 días. Cuando la puntuación del grupo control alcanzó aproximadamente 1, se dejó que los ratones volvieran a beber la solución de DSS para provocar una recaída (período de recaída). Los períodos de remisión y recaída se tomaron como 1 ciclo y se repitió el ciclo 5 veces. En cuanto al quinto ciclo, sin embargo, se realizó sólo el período de remisión.

El compuesto F a una dosis de 1 mg/kg y la SASP a una dosis de 100 mg/kg se administraron por vía oral una vez al día, diariamente, durante 50 días a partir del periodo de remisión inicial (el día 8 desde el inicio de la bebida de DSS al 2,6 % p/v) hasta el quinto período de remisión (el día 57 desde el inicio de la bebida de DSS al 2,6 % p/v). Al grupo control se le administró por vía oral un disolvente (solución de etanol al 1 % en volumen) a 10 mL/kg. Si un ratón tenía puntuación 0 tanto en la puntuación de la consistencia de las heces como en la puntuación de sangre oculta, el último día de cada período de remisión, el ratón era considerado como "en remisión". La proporción de la remisión (%) se calculó como la proporción de ratones en remisión en cada grupo. Se utilizaron de 8 a 10 ratones para cada grupo y los resultados se muestran como el valor medio.

Como resultado, la puntuación de las heces del grupo control aumentó en el período de recaída, y disminuyó en el período de remisión. La puntuación fue significativamente más alta que la del grupo normal durante casi todo el período de estudio (Fig. 5). La proporción de remisión del grupo control fue de 35,5 %, como media de 5 períodos de remisión (Tabla 8). El compuesto F disminuyó la puntuación de las heces al principio del período de remisión, y deprimió un aumento en la puntuación en el período de recaída. La proporción de remisión del grupo del compuesto F no fue menos de 60 % en cualquier periodo de remisión, y la media fue de 66,0 %, que era evidentemente más alta que la del grupo control. Por otro lado, la SASP no demostró un claro efecto sobre la puntuación de las heces, ni en el período de remisión ni en el período de recaída. La proporción de remisión del grupo de SASP fue ligeramente más alta en el 1°, 3° y 4° ciclos que la del grupo control, por el contrario, fue más baja en el 2° y 5° ciclos, y el valor medio fue equivalente al del grupo control.

Como se ha mostrado antes, el compuesto F no sólo proporciona un efecto profiláctico, sino también un efecto terapéutico, así como un efecto de mantenimiento de la remisión. Además, los efectos del mismo se considera que son muy superiores a los de SASP en el uso clínico.

Tabla 8. Proporción de remisión del modelo de remisión/recaída de la colitis inducida por DSS en ratones

Tratamiento	Número de animales	Proporción de remisión (%)					
		Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4	Ciclo 5	Media
Control	9	33,3	66,7	11,1	33,3	33,3	35,5
Compuesto F 1 mg/kg	10	60,0	80,0	70,0	60,0	60,0	66,0
SASP 100 mg/kg	8	50,0	50,0	37,5	50,0	12,5	40,0

## Ejemplo 27

Efecto profiláctico sobre el modelo de colitis por transferencia de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> en ratones

- 5 Se estudió el efecto sobre la enfermedad de Crohn, otro tipo de enfermedad inflamatoria intestinal. El modelo de transferencia de células T es bien conocido como modelo de la enfermedad de Crohn, que desarrolla gastritis o enteritis crónica (véase: Referencias F, G, H). Además, se puede considerar también como un modelo animal de enfermedad intestinal de Behcet o úlcera simple, que sufre de úlcera intestinal similar acompañada por la activación de las células T (véase: Referencias I, J).
- 10 Se compraron ratones hembra BALB/cA Jcl, de 6 semanas de edad, peso corporal 19-23 g (CLEA Japón, Inc.) y ratones hembra C.B-17/lcr-scid (6 semanas de edad, CLEA Japón, Inc.), se aclimataron durante 1 semana y se utilizaron para el estudio

15 Después de laparotomía bajo anestesia con éter, los ratones BALB/cA Jcl se desangraron hasta la muerte a través de la aorta abdominal y la vena cava caudal, y se aisló el bazo. Se prepararon los esplenocitos a partir del bazo y después se prepararon células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> con un Kit de aislamiento de células T CD4<sup>+</sup> (No. 130-090-860, Milky Biotech Co., Ltd.) y el anticuerpo CD25-Biotina (No. 130-092-569, Milky Biotech Co., Ltd.). Se separaron las células utilizando el separador autoMACS (Milky Biotech Co., Ltd.). Las células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> separadas, se suspendieron en una solución tampón fisiológica de fosfato, y se administraron  $2,5 \times 10^5$  células por animal intraperitonealmente, a ratones C.B-17/lcr-scid para inducir la colitis.

20 Se administró inicialmente 1 mg/kg del compuesto F o de prednisolona 5 horas antes de la transferencia de las células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>, y después se administró por vía oral una vez al día, diariamente, durante 20 días. Se administró al grupo control por vía oral un disolvente (solución de etanol al 1 % en volumen) a 10 mL/kg. Un criterio de valoración clínica fue la suma de la puntuación de la consistencia de las heces (0 - 5), la puntuación de sangre oculta en heces (0 - 4) y la puntuación de la disminución del peso corporal (0 - 5), denominada la puntuación del Índice de Actividad de la Enfermedad (en adelante abreviada como puntuación DAI: puntuación más alta 14). La puntuación de consistencia de las heces se calificó en cuanto a la dureza de las heces como normal (0), ligeramente suelta (1), algo suelta (2), suelta (3), considerablemente suelta (4) y diarrea (5). La puntuación de sangre oculta fecal se evaluó de la misma manera que en el Ejemplo 23. La puntuación de la disminución del peso corporal se clasificó para los cambios del peso corporal como aumento (0), disminución de menos del 3 % (1), disminución de no menos del 3 % y menos del 6 % (2), disminución de no menos del 6 % y menos del 9 % (3), disminución de no menos del 9 % y menos del 12 % (4), y disminución de no menos del 12 % (5). Se utilizaron 8 a 10 ratones para cada grupo y los resultados se expresaron como la media.

35 Como resultado, la puntuación de la consistencia de las heces y la puntuación de sangre oculta en heces del grupo control mostró un aumento claro a partir de 12 días después de la transferencia de células T y la puntuación de la disminución del peso corporal mostró un claro aumento el día 19, alcanzando todas casi el máximo, 21 días más tarde. El compuesto F redujo los aumentos tanto de la puntuación de la consistencia de las heces como de la puntuación de sangre oculta en heces hasta casi la mitad como se muestra en la Fig. 6A y 6B, respectivamente, y evitó el aumento en la puntuación de la disminución del peso corporal casi por completo como se muestra en la Fig. 6C. Por otra parte, aunque la prednisolona redujo un aumento en la puntuación de sangre oculta en heces casi hasta el mismo nivel que la administración del compuesto F como se muestra en la Fig. 6B, no pudo demostrar un efecto claro sobre la puntuación de la consistencia de las heces el día 21 como se muestra en la Fig. 6A. Además, la puntuación de la disminución de peso corporal se mantuvo en valores más altos que los del grupo control durante el periodo de estudio como se muestra en la Fig. 6C, y la prednisolona empeoró claramente la puntuación. Como se muestra en la Fig. 6D, la puntuación DAI indicó que el compuesto F es ampliamente superior a la prednisolona.

45 Por lo tanto, el compuesto F puede reprimir el estado de la enfermedad de Crohn, enfermedad intestinal de Behcet y úlcera simple, así como la colitis ulcerosa con más eficacia que los fármacos existentes.

## Referencias

F) Immunol Rev. 182: 190-200 (2001).

G) Int. Immunopharmacol. 6 (8): 1341-1354 (2006).

H) J. Immunol. 160 (3): 1212-1218 (1998).

I) Clin. Exp. Immunol. 139 (2): 371-378, (2005).

J) Histopathology. 45 (4): 377-383 (2004).

## 5 Ejemplo 28

Efecto sobre el modelo de lesión de la mucosa gástrica inducida por etanol en ratas

Se investigó el efecto depresor del compuesto F sobre la lesión de la mucosa gástrica en el modelo de lesión de la mucosa gástrica inducida por etanol en ratas. Este modelo se utiliza con frecuencia como un modelo animal de la gastritis aguda humana asociada con lesión mucosal congestiva (Referencia K).

10 Se compraron ratas macho SD (7 semanas de edad, Charles River) a través de Oriental BioService Inc., se aclimataron durante 1 semana y se utilizaron para el estudio. Las ratas se agruparon en base al peso corporal, se pusieron en un conjunto de jaulas limpias con un suelo de malla de alambre, un día antes del estudio, se mantuvieron en ayunas durante 19 horas (sin agua durante las 3 últimas horas), y se administró por vía oral etanol (grado especial, Nacalai Tesque, Lote No. V8A5862, 1,5 mL) a todos los grupos para inducir la lesión de la mucosa gástrica. Se administró el compuesto F por vía oral a dosis de 0,01, 0,1 y 1 mg/kg 30 minutos antes de la inducción de la lesión de la mucosa gástrica a un volumen de 5 mL/kg. Al grupo control se le administró por vía oral un disolvente (solución de etanol al 1 % en volumen) a 5 mL/kg de la misma manera. Se utilizaron ocho animales para cada grupo.

20 Se desangraron las ratas hasta la muerte desde la aorta abdominal y la vena cava caudal bajo anestesia con éter 1 hora después de la administración de etanol, y se aisló el estómago. El estómago aislado se llenó inmediatamente con una solución de formalina neutra al 2 % en volumen (6 mL) y se fijó durante 15 min. Se realizó una incisión en el estómago a lo largo de la línea media de la curvatura mayor desde la parte cardíaca hasta la parte pilórica, y se extendió sobre una placa de cloruro de vinilo. Se midieron la longitud y la anchura de cada úlcera bajo un estereomicroscopio, se calculó el área, y la suma de las mismas se tomó como el área total de la úlcera.

25 Como resultado, el área total de la úlcera del grupo control dio una media de 103 mm<sup>2</sup>. El compuesto F redujo significativamente el área total de la úlcera de una manera dependiente de la dosis a partir de 0,01 mg/kg, y redujo casi por completo el área a una dosis de 1 mg/kg (Fig. 7). Por lo tanto, el compuesto F reduce la lesión de la mucosa gástrica.

Referencia

30 K) Dig Dis Sci. 31 (2 Suppl), 81S-85S (1986).

## Ejemplo 29

Efecto sobre el modelo de lesión del intestino delgado inducida por indometacina en ratas

35 Se investigó el efecto depresor del compuesto F sobre la lesión del intestino delgado utilizando un modelo de lesión del intestino delgado inducida por indometacina en ratas. Es conocido que la administración de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (los AINE) induce la lesión hemorrágica en el intestino delgado del ser humano. Este modelo se caracteriza por lesión de la mucosa del intestino delgado inducida por la administración de un AINE, indometacina, a las ratas, y muestra una patología similar a la de la lesión del intestino delgado inducida por los AINE en pacientes o enfermedad de Crohn (Referencias L y M).

40 Se compraron ratas macho SD, de 7 semanas de edad (Charles River), se aclimataron durante 1 semana y se utilizaron para el estudio. Se agruparon las ratas en base al peso corporal y se administró por vía subcutánea indometacina (Sigma, N° de lote 19F0018) a 15 mg/5 mL/kg a todos los grupos para inducir una lesión del intestino delgado. Se administró el compuesto F en dosis de 0,01, 0,1 y 1 mg/kg por vía oral a un volumen de 5 mL/kg 30 minutos antes y 6 horas después de la administración subcutánea de indometacina. Al grupo control se le administró por vía oral un disolvente (solución de etanol al 1 % en volumen) a 5 mL/kg de la misma manera. Se utilizaron ocho animales para cada grupo

45 Se administraron a las ratas por vía intravenosa 2 mL de solución de azul de Evans a 10 mg/mL bajo anestesia con éter 23,5 horas después de la administración de la indometacina. Después de 30 minutos, se desangraron las ratas hasta la muerte desde la aorta abdominal y la vena cava caudal bajo anestesia con éter y se aisló el intestino delgado. El intestino delgado aislado se llenó con una cantidad adecuada (aproximadamente 35 mL) de solución de formalina neutra al 2 % en volumen, y se fijó durante aproximadamente 15 min. A continuación, se realizó una incisión total en el intestino delgado a lo largo del sitio de unión mesentérico, y se extendió sobre una placa de cloruro de vinilo. Se midieron la longitud y la anchura de cada úlcera bajo un estereomicroscopio, se calculó el área, y la suma de las mismas se tomó como el área total de la úlcera.

50

Como resultado, el área total de la úlcera en el intestino delgado fue de aproximadamente 730 mm<sup>2</sup> en el grupo control. En contraste, el grupo con administración del compuesto F redujo significativamente el área de la úlcera de una manera dependiente de la dosis, a partir de la administración de una dosis de 0,1 mg/kg, y redujo completamente el área a una dosis de 1 mg/kg (Fig. 8). Por lo tanto, el compuesto F redujo fuertemente la lesión del intestino delgado.

#### Referencias

L) Aliment Pharmacol Ther. 7 (1), 29-39 (1993).

M) Acta Gastroenterol Belg. 57(5-6), 306-309 (1994).

Se deduce de lo anterior, que el compuesto F mostró una acción depresora superior sobre el daño directo a la mucosa del tracto gastrointestinal debido al alcohol y similares y sobre la falta de regeneración de la mucosa debida a los AINE y similares. Por lo tanto, se espera que el compuesto F muestre un efecto protector y un efecto de reparación del tejido sobre las lesiones de la mucosa del tracto gastrointestinal.

Como se muestra en los ejemplos mencionados anteriormente y como se encontró con el compuesto F, el compuesto de la presente invención es eficaz para las lesiones del tracto gastrointestinal y el retraso en la curación debido a la inflamación del tracto digestivo relacionada con el sistema inmunitario, las lesiones de la mucosa del tracto gastrointestinal inducidas por fármacos y la falta de regeneración mucosal inducida por fármacos. Específicamente, es útil para la enfermedad inflamatoria del intestino tal como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, gastritis alcohólica o úlcera gástrica, úlcera del intestino delgado y similares. Estas acciones se basan en una acción agonista de EP4, y no se limitan a las enfermedades citadas.

#### Ejemplo 30

Efecto sobre el modelo de glomerulonefritis inducida por anticuerpo anti-Thy-1 en ratas

Se compraron ratas macho Wistar Slc (6 semanas de edad, Japan SLC), se aclimataron durante 1 semana y se utilizaron para el estudio. Excepto al grupo normal, se administró a los animales anticuerpo anti-Thy-1 (anticuerpo anti-CD90 de ratón (UK-Serotech Ltd. Código: MCA47XZ, clon N°: MRC OX-7, Lot N° 0303)) una vez por vía intravenosa. Se administró una mezcla de compuesto F y compuesto J (F:J = 52:41, indicada como compuesto F/J) por vía oral desde el día de la administración del anticuerpo (día 0) hasta el día 6, diariamente, dos veces al día (mañana y tarde, cada vez 0,3 mg/kg). Después de 3 días de la administración del anticuerpo, se recogió la orina durante un día. El día 7 de la administración del anticuerpo, se realizó la autopsia del animal. Se aisló el riñón derecho, se pesó y se fijó con formalina. Se utilizaron de 5 a 8 animales para cada grupo y los resultados se expresaron como la media ± desviación estándar.

Como resultado, el aumento de peso corporal fue reducido en el grupo control en comparación con el grupo normal después de 1 día de la administración del anticuerpo. Sin embargo, el peso corporal aumentó igual que en el grupo normal después de 3 días. El peso corporal del grupo tratado con compuesto J/F mostró un cambio similar al del grupo control. El volumen de orina de 24 horas del grupo control aumentó en comparación con el grupo normal. Sin embargo, el del grupo tratado con el compuesto J/F fue del mismo nivel que el grupo normal (Fig. 9A). Las proteínas de la orina de 24 horas aumentaron notablemente en el grupo control, mientras que se encontró un valor más bajo que el control en el grupo tratado con el compuesto F/J (Fig. 9B). El peso relativo del riñón aumentó notablemente en el grupo control, pero se observó un valor más bajo que el control y casi el normal en el grupo tratado con el compuesto F/J (Fig. 9C). La evaluación histopatológica renal reveló que el grupo control aumentó notablemente las células glomerulares totales, la región mesangial y las células PCNA-positivas en los glomérulos. El grupo tratado con el compuesto J/F reprimió significativamente el aumento en todas estas medidas (Figs. 9D, 9E, 9F).

Por lo tanto, el compuesto de la presente invención normaliza el volumen de orina, disminuye la proteinuria y reprime la reacción inmunitaria y la reacción de crecimiento de los glomérulos, lo que indica que es eficaz para la nefritis.

#### Ejemplo 31

Efecto sobre la presión intraocular en conejos

Se compraron conejos japoneses blancos (machos, 10 semanas de edad, BIOTEC Co., Ltd.), se aclimataron durante 1 semana y se utilizaron para el estudio. Se instiló una solución del compuesto F (0,01 % p/v) una vez en la córnea de ambos ojos a un volumen de 50 µL/ ojo con una micropipeta. Se midió la presión intraocular del ojo derecho y se evaluó el efecto irritante local sobre el ojo utilizando el ojo izquierdo. Después de anestesia superficial con oxibupranol (Benoxil 0,4 %, solución de instilación), se midió la presión intraocular antes de la instilación ocular y 1, 2, 3, 4, 6 y 8 horas después de la instilación utilizando un neumotonómetro (Alcon Ltd.). Además, se evaluó el efecto irritante local sobre el ojo, puntuando la congestión conjuntival, edema conjuntival, opacidad de la córnea, congestión del iris, excreción y el funcionamiento del cierre de ojos. Para la evaluación, se utilizó tampón de fosfato para el grupo control con disolvente y para comparación se utilizó isopropil unoprostona (Rescula gotas oftálmicas,

Santen Pharmaceutical Co., Ltd.). Se utilizaron seis animales para cada grupo y los resultados se expresaron como la media.

5 Como resultado, la presión intraocular del grupo control con disolvente cambió dentro del intervalo de  $\pm 2$  mm Hg desde el momento 0 a 8 horas después de la instilación. El grupo del compuesto F mostró una disminución de 6,9 mm Hg en la presión intraocular 1 hora después de la instilación, de 9,3 mm Hg 2 horas después, y de 6,6 mm Hg 6 horas después, manteniendo así una disminución significativa en la presión intraocular. Por otro lado, el grupo de Rescula gotas oftálmicas, mostró un perfil de disminución de la presión intraocular casi similar al del grupo del compuesto F (Fig. 10).

10 En cuanto al efecto irritante local sobre el ojo, se observaron edema conjuntival y cierre de los ojos 1 hora después de la instilación en algunos animales del grupo del compuesto F, pero los animales se recuperaron más tarde. En el grupo de Rescula gotas oftálmicas, se observó edema conjuntival y cierre de los ojos en algunos animales 1 hora después de la instilación y duró hasta 2 horas después de la administración. Los animales se recuperaron más tarde.

15 Por lo tanto, el compuesto F de la presente invención muestra un efecto reductor de la presión intraocular y un efecto irritante local en el ojo, equivalente a los de la Rescula gotas oftálmicas, y es útil como un agente terapéutico para el glaucoma y la presión intraocular elevada.

#### Ejemplo 32

Efecto profiláctico sobre el modelo de hepatitis inducida por concanavalina A en ratones

20 Se investigó el efecto profiláctico del compuesto F sobre la hepatitis utilizando el modelo de hepatitis inducida por concanavalina A (de aquí en adelante Con A). Este modelo es un modelo de hepatitis en el que los hepatocitos del parénquima se lesionan de una manera dependiente de las células T, y presenta una patología clínica similar a la hepatitis autoinmune o hepatitis fulminante (véase: Referencias N, O y P).

25 Se compraron ratones BALB/c (hembras, 7 semanas de edad, Japan SLC), se aclimataron durante 1 semana y se utilizaron para el estudio. Excepto en el grupo sin inducción, se administró Con A (tipo IV, Sigma-Aldrich) disuelta en solución salina, en la vena caudal de los ratones a una dosis de 12,5 mg/10 mL/kg para inducir la hepatitis. Veinte horas más tarde, los ratones se sometieron a laparotomía bajo anestesia con éter. Se recogió una muestra de sangre de 0,5 mL de la vena cava caudal y se obtuvo plasma heparinizado para medir las actividades plasmáticas de ALT y AST. Las sustancias de ensayo fueron el compuesto F (solución a 1 mg/10 mL), prednisolona (Nacalai Tesque, suspensión a 5 mg/10 mL (con metilcelulosa al 0,5 % p/v)) y agua para inyección (administrada al grupo control), que fueron administradas oralmente en un volumen de 10 mL/kg 1 hora antes de la inyección de Con A. Se utilizaron 7 a 9 animales para cada grupo. Después de la transformación logarítmica de los datos, se realizó un análisis de varianza de una vía para la evaluación estadística.

35 Como resultado, las actividades de ALT en plasma y de AST en plasma del grupo control aumentaron notablemente en comparación con las del grupo sin inducción. El compuesto F y la prednisolona redujeron significativa y fuertemente el aumento. La Fig. 11 muestra los datos de ALT en plasma.

Por lo tanto, el compuesto F es eficaz para la lesión hepática asociada con la activación de las células T.

#### Referencias

N) Eur. J. Immunol. 28 (12): 4105-4113 (1998).

O) Proc. Natl. Acad. Sci. 97(10): 5498-5503 (2000).

40 P) J. Exp. Med. 191(1): 105-114 (2000).

#### Aplicabilidad industrial

45 El compuesto (1) de la presente invención es útil como ingrediente activo de medicamentos. Un medicamento que contiene el compuesto (1) de la presente invención como ingrediente activo es útil para enfermedades inmunitarias, enfermedades del tracto digestivo, enfermedades cardiovasculares, enfermedades cardíacas, enfermedades respiratorias, enfermedades neurológicas, enfermedades oftalmológicas, enfermedades renales, enfermedades hepáticas, enfermedades óseas, enfermedades de la piel y similares, que implican cada una al EP4. En particular, es útil como medicamento para la profilaxis o el tratamiento de la colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, gastritis o úlcera gástrica, úlcera del intestino delgado, nefritis, glaucoma o hepatitis.

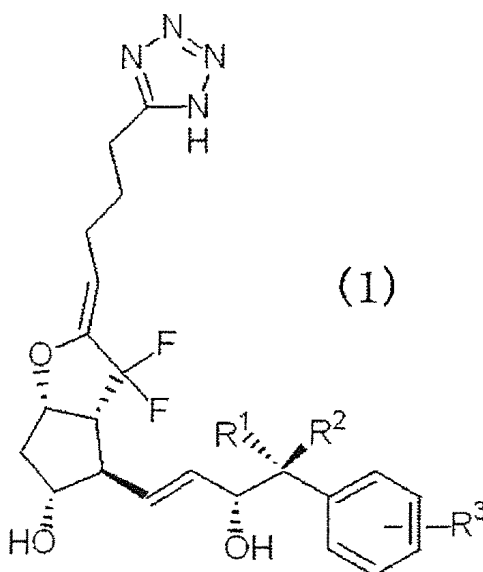
50 Aunque algunas de las realizaciones de la presente invención se han descrito con detalle en el texto anterior, es posible, sin embargo, para los expertos en la técnica, hacer diferentes modificaciones y cambios a las realizaciones particulares mostradas, sin separarse sustancialmente de las enseñanzas y ventajas de la presente invención.

## REIVINDICACIONES

1. Un medicamento para uso en la profilaxis o tratamiento de una enfermedad inmunitaria, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad cardíaca, una enfermedad respiratoria, una enfermedad oftalmológica, una enfermedad renal, una enfermedad hepática, una enfermedad ósea, una enfermedad neurológica, una enfermedad de la piel, calvicies, alopecia, insuficiencia de maduración del cuello uterino o un trastorno auditivo,

5 en donde la enfermedad inmunitaria es esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, rechazo después de un trasplante, artritis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, septicemia, síndrome hemofagocítico, síndrome de activación de macrófagos, enfermedad de Still, enfermedad de Kawasaki, hipercitoquinemia en diálisis, insuficiencia multiorgánica, shock o psoriasis, y

10 en donde el medicamento comprende como un ingrediente activo, un agonista de EP4 que comprende un compuesto representado por la fórmula (1):



15 en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son cada uno, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de cadena lineal que tiene un número de carbonos de 1 a 3, y R<sup>3</sup> es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo que tiene un número de carbonos de 1 a 4, un grupo alcoxilquilo, un grupo arilo, un átomo de halógeno o un grupo haloalquilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El medicamento para uso según la reivindicación 1, en donde R<sup>1</sup> es un grupo metilo.

3. El medicamento para uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde R<sup>3</sup> es un grupo metilo.

4. El medicamento para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno.

20 5. El medicamento para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde R<sup>1</sup> es un grupo metilo, y R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno.

6. El medicamento para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde R<sup>3</sup> es un grupo m-metilo.

7. El medicamento para uso según la reivindicación 1, en donde R<sup>1</sup> es un grupo metilo, R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno, y R<sup>3</sup> es un grupo metilo.

25 8. El medicamento para uso según la reivindicación 1, en donde R<sup>1</sup> es un átomo de hidrógeno, R<sup>2</sup> es un grupo metilo, y R<sup>3</sup> es un grupo metilo.

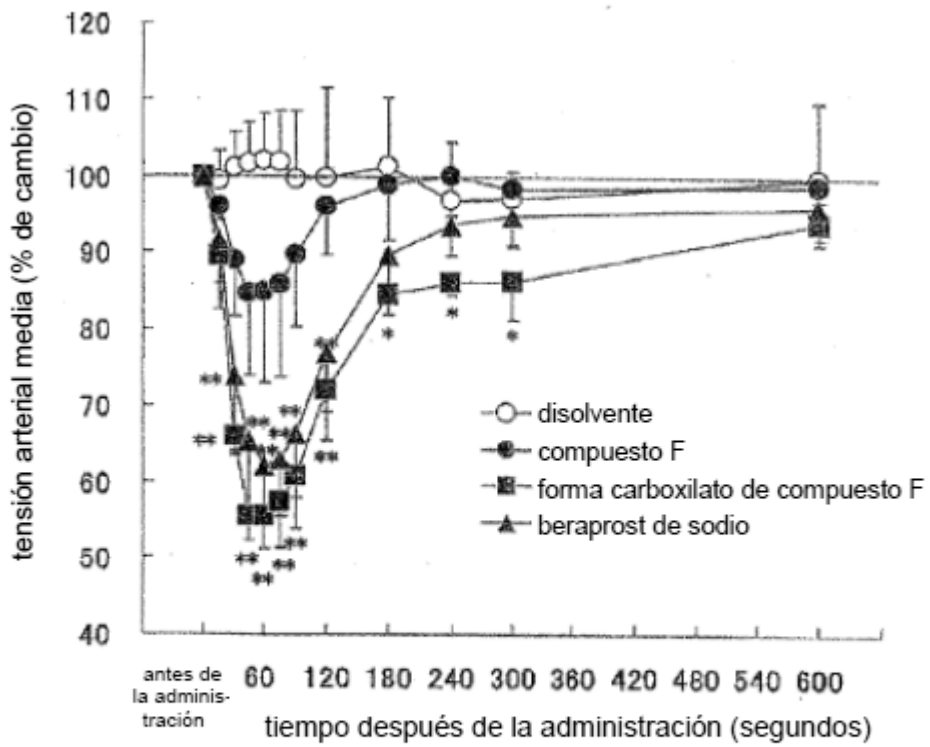
9. El medicamento para uso según la reivindicación 1, en donde el agonista de EP4 es 4-[(Z)-(1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4R)-3-hidroxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-hidroxi-2-oxa-4,4-difluoro-biciclo[3.3.0]octan-3-iliden]-1-(tetrazol-5-il)butano, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 10. El medicamento para uso según la reivindicación 1, en donde el agonista de EP4 es 4-[(Z)-(1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4R)-3-hidroxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-hidroxi-2-oxa-4,4-difluoro-biciclo[3.3.0]octan-3-iliden]-1-(tetrazol-5-il)butano, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.



11. El medicamento para uso según la reivindicación 1, en donde el agonista de EP4 es 4-[(Z)-(1S,5R,6R,7R)-6-[(1E,3R,4S)-3-hidroxi-4-(m-tolil)-1-pentenil]-7-hidroxi-2-oxa-4,4-difluoro-biciclo[3.3.0]octan-3-iliden]-1-(tetrazol-5-il)butano, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 5 12. El medicamento para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la enfermedad cardiovascular o enfermedad cardíaca es arterioesclerosis, angina de pecho, infarto de miocardio, trastorno cerebral causado por hemorragia cerebral, trastorno cerebral causado por infarto cerebral, trastorno cerebral causado por hemorragia subaracnoidea, hipertensión arterial pulmonar, obstrucción arterial periférica o un síntoma atribuido a alteraciones de la circulación periférica.
- 10 13. El medicamento para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la enfermedad respiratoria es asma, lesión pulmonar, fibrosis pulmonar, enfisema, bronquitis o enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
14. El medicamento para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la enfermedad oftalmológica es glaucoma o hipertensión ocular.
15. El medicamento para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la enfermedad renal es glomerulonefritis, nefropatía diabética, nefropatía por IgA o lesión renal por isquemia-reperfusión.
- 15 16. El medicamento para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la enfermedad hepática es hepatitis, hepatopatía o lesión hepática por isquemia-reperfusión.
17. El medicamento para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la enfermedad ósea es osteoporosis, fractura ósea o una fase de recuperación postoperatoria después de osteotomía.
- 20 18. El medicamento para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la enfermedad neurológica es la muerte celular neuronal.
19. El medicamento para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la enfermedad de la piel es úlcera o herida por presión.

FIG. 1A



análisis de varianza de una vía y prueba de Dunett de dos colas en cada punto de tiempo

\*, \*\* p<0,05, p<0,01 frente al grupo de disolvente

FIG. 1B

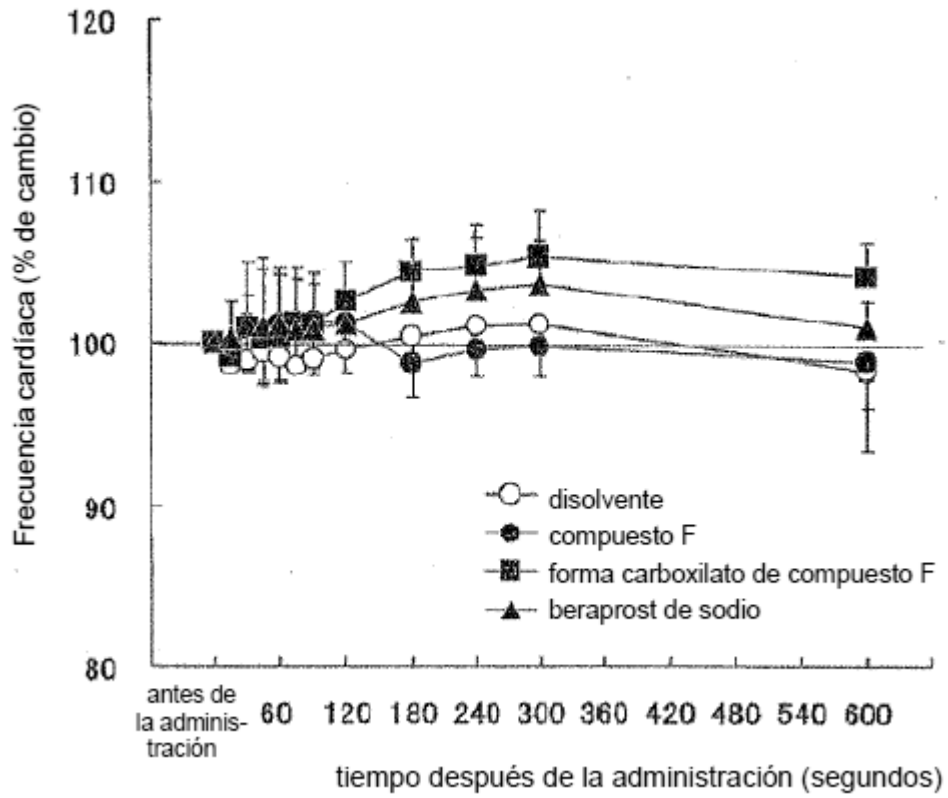
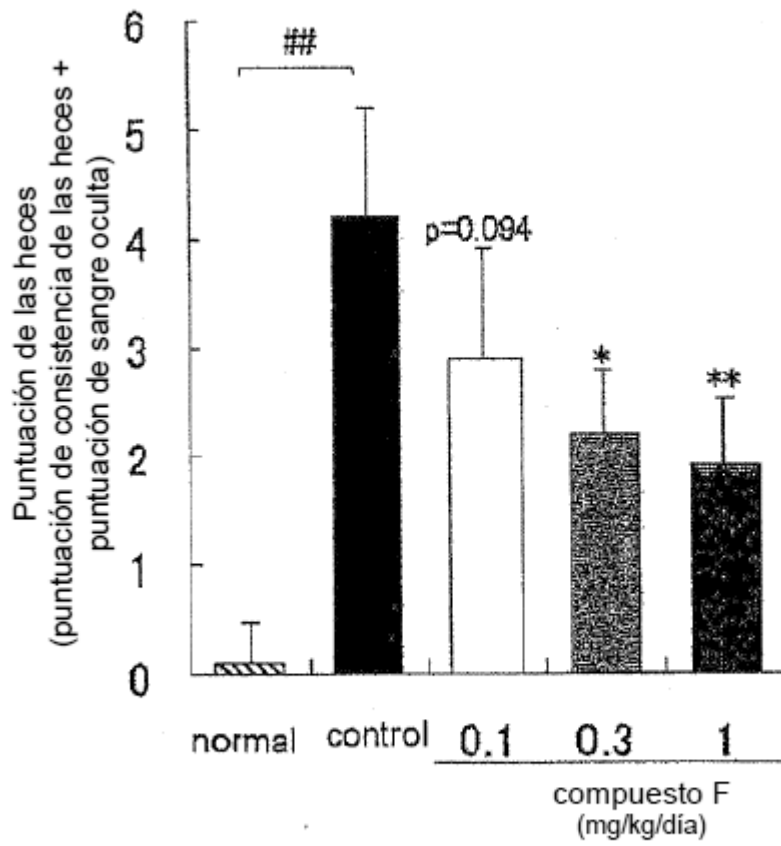


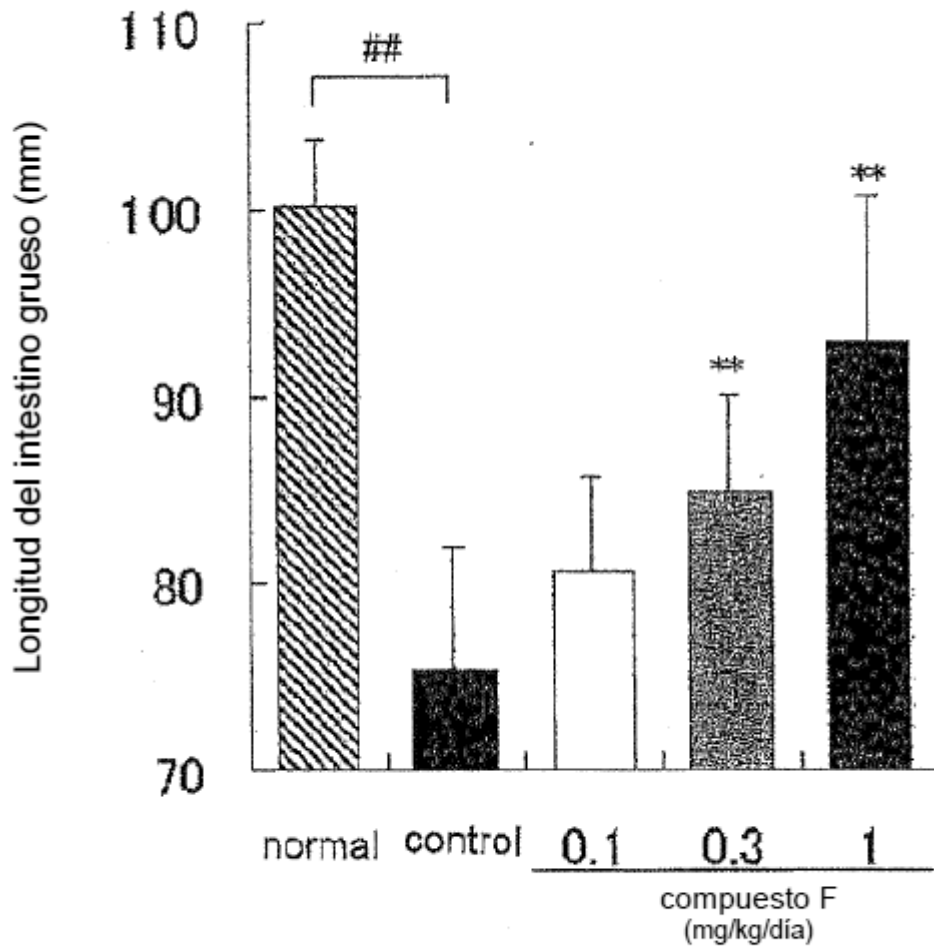
FIG. 2A



## p<0,01

\*, \*\* p<0,05, p<0,01 frente al control, respectivamente

FIG. 2B



## p<0,01

\* \* p<0,01 frente al control

**FIG. 3A**

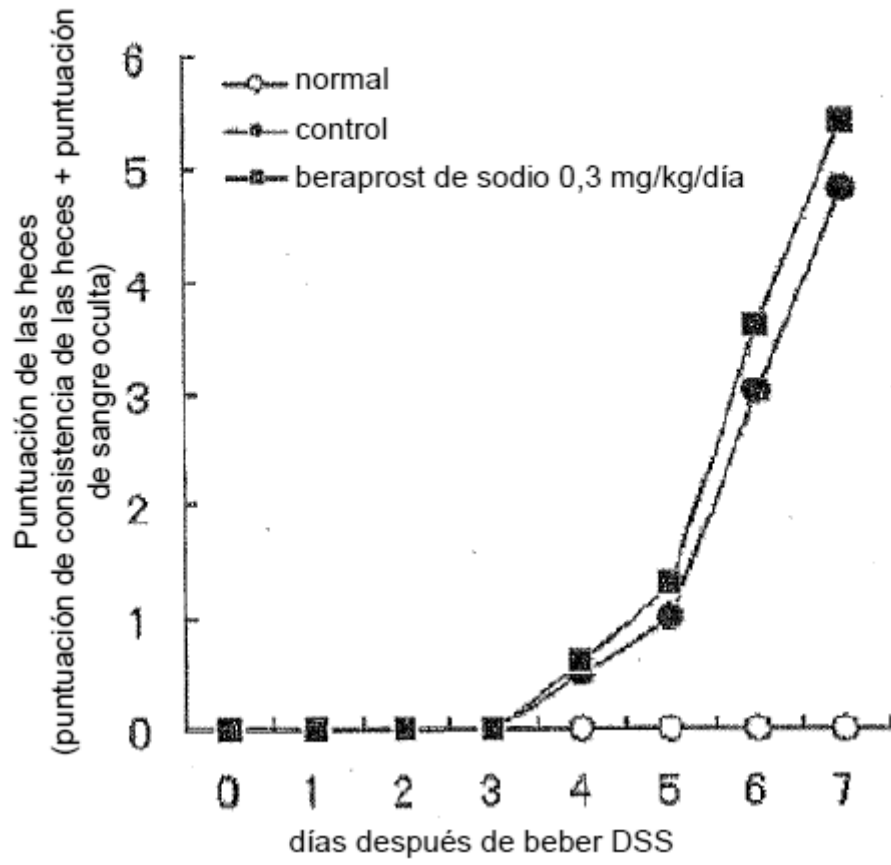
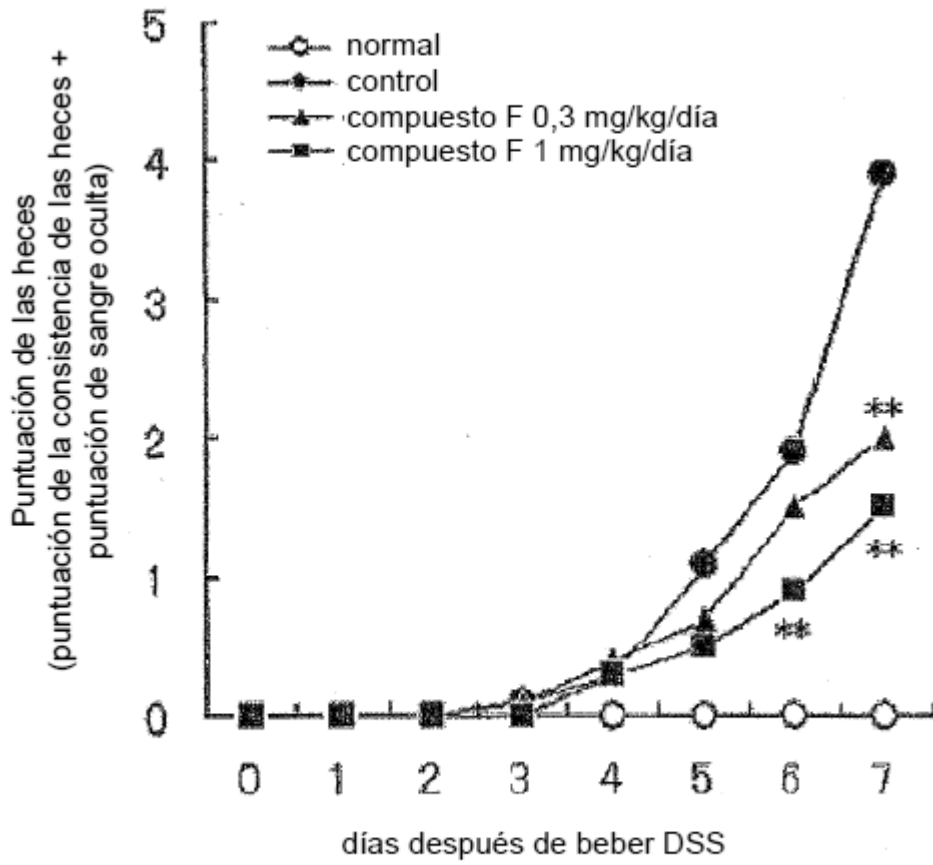


FIG. 3B



\*\* p<0,01 frente al control

FIG. 3C

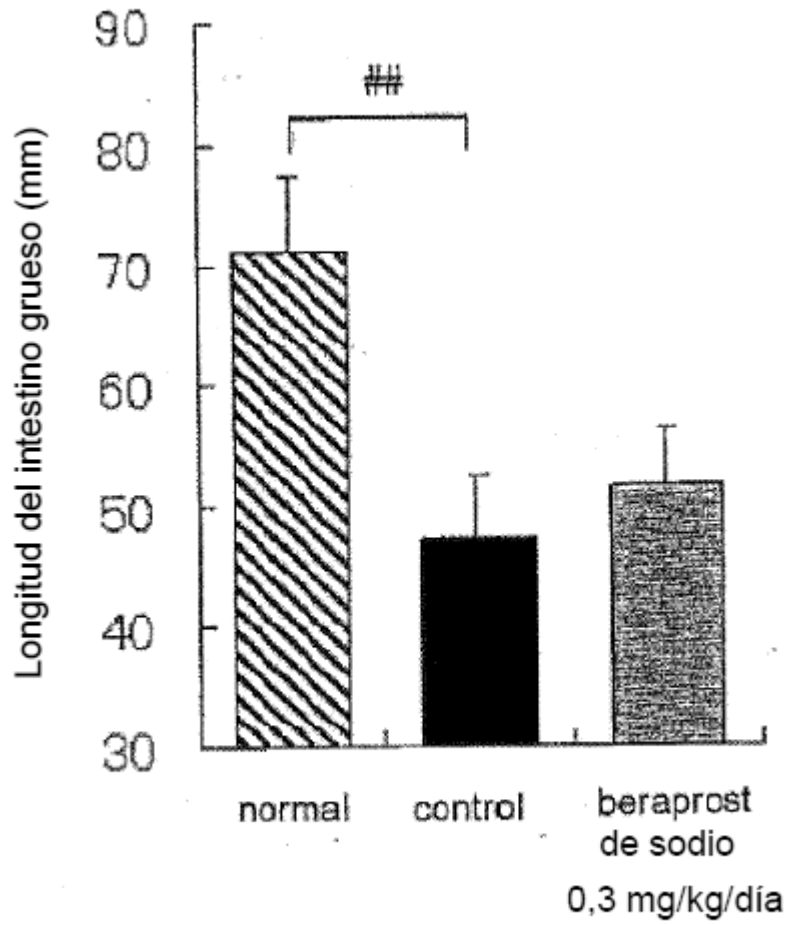
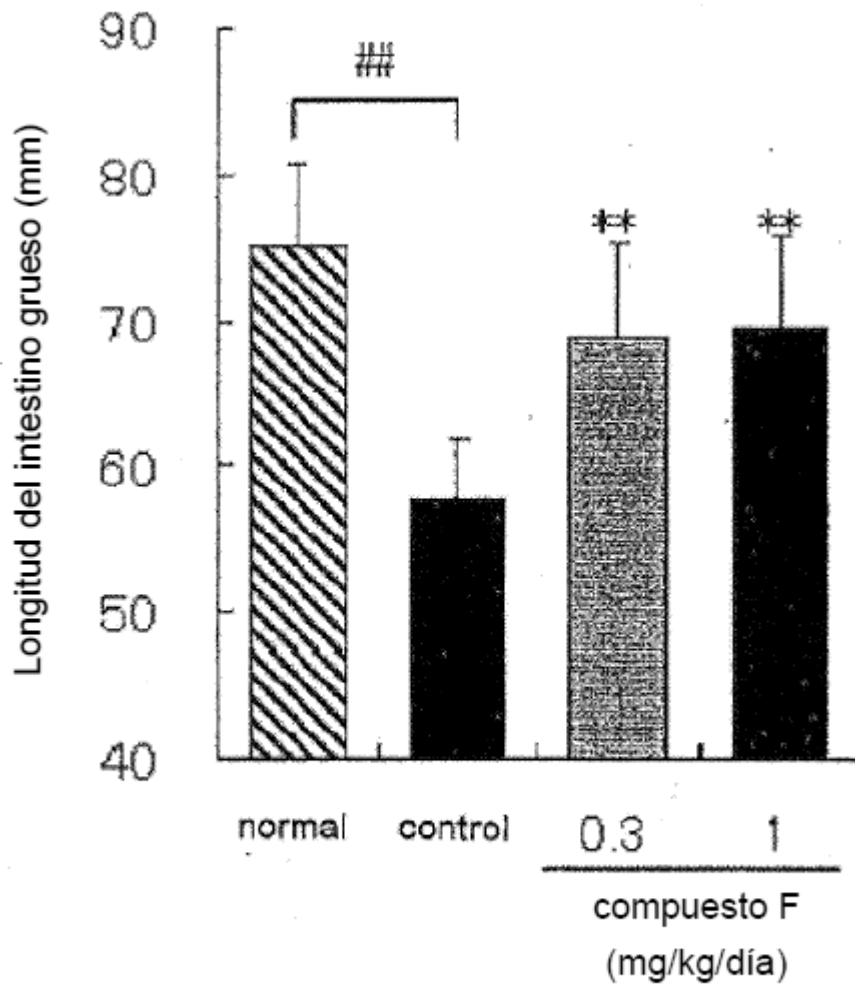




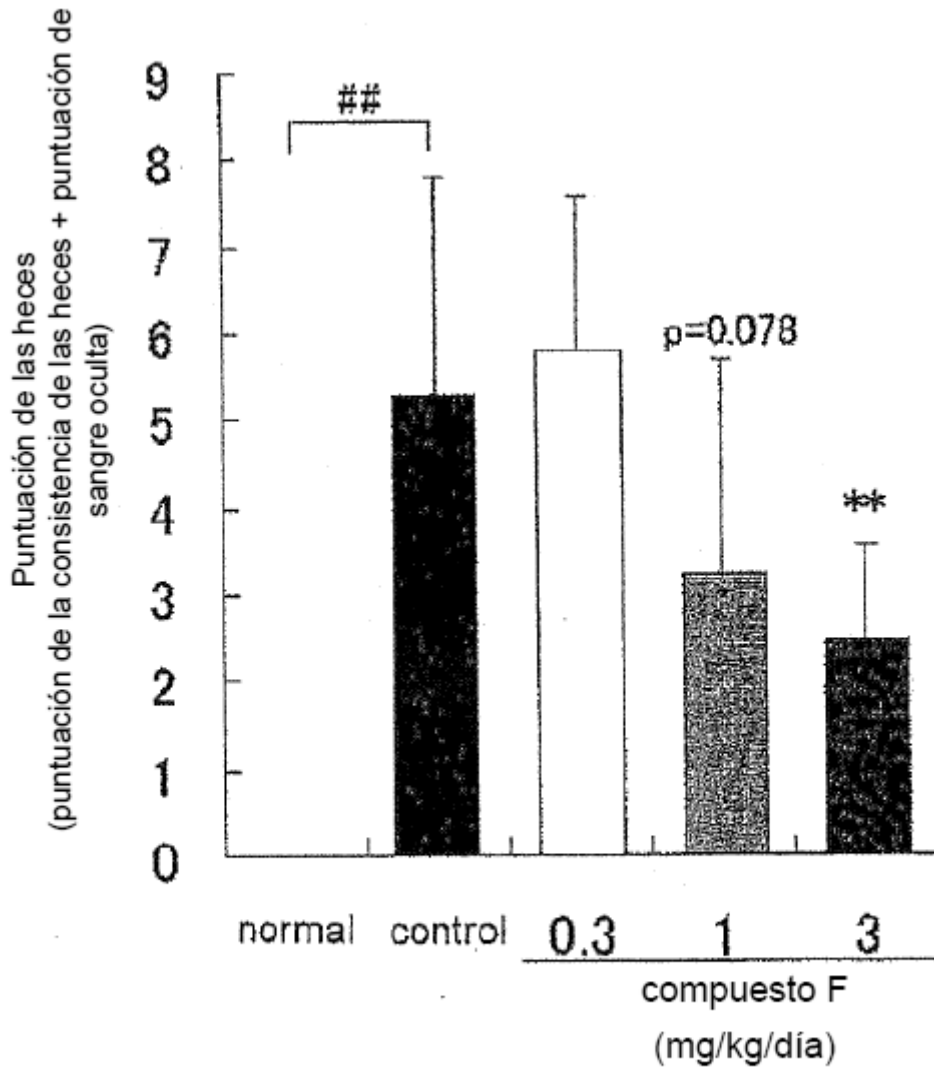
FIG. 3D



##  $p < 0,01$

\* \*  $p < 0,01$  frente al control

FIG. 4A



## p<0,01

\* \* p<0,01 frente al control

**FIG. 4B**

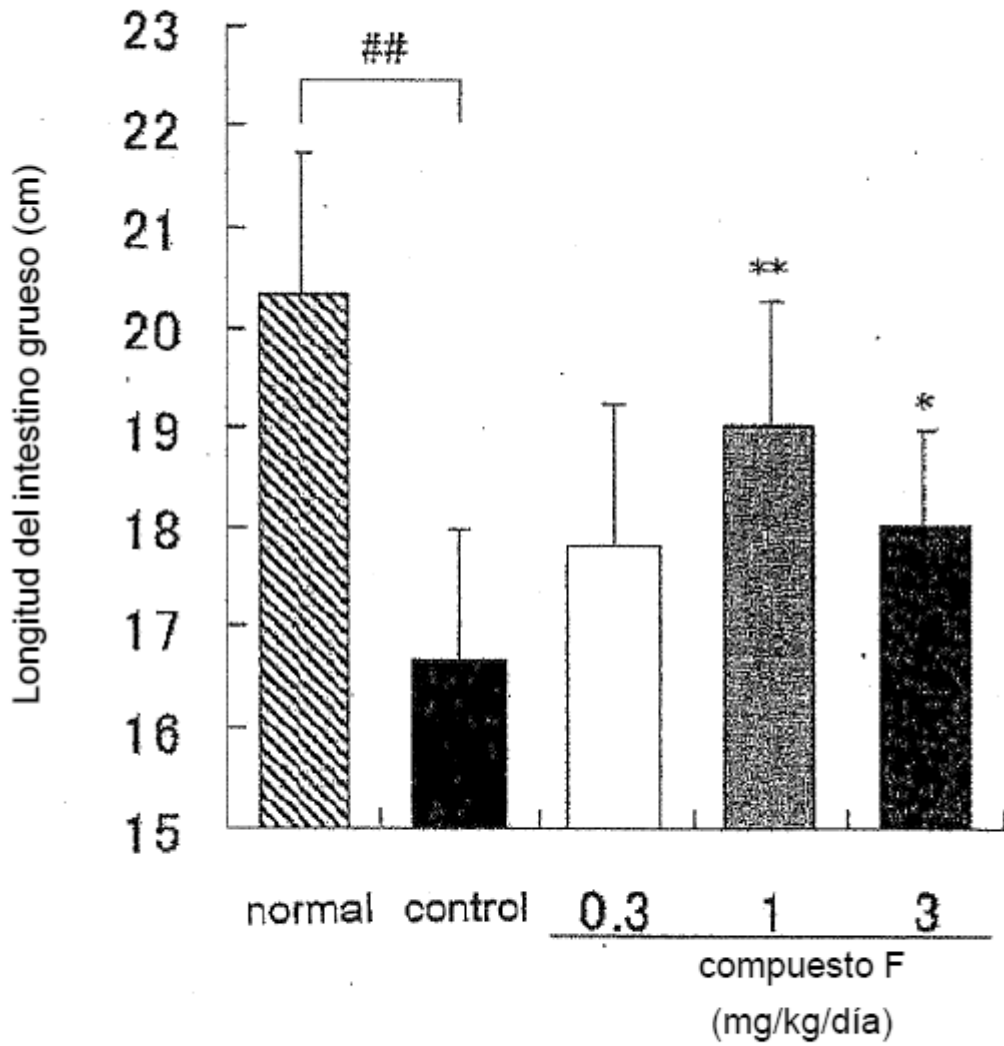
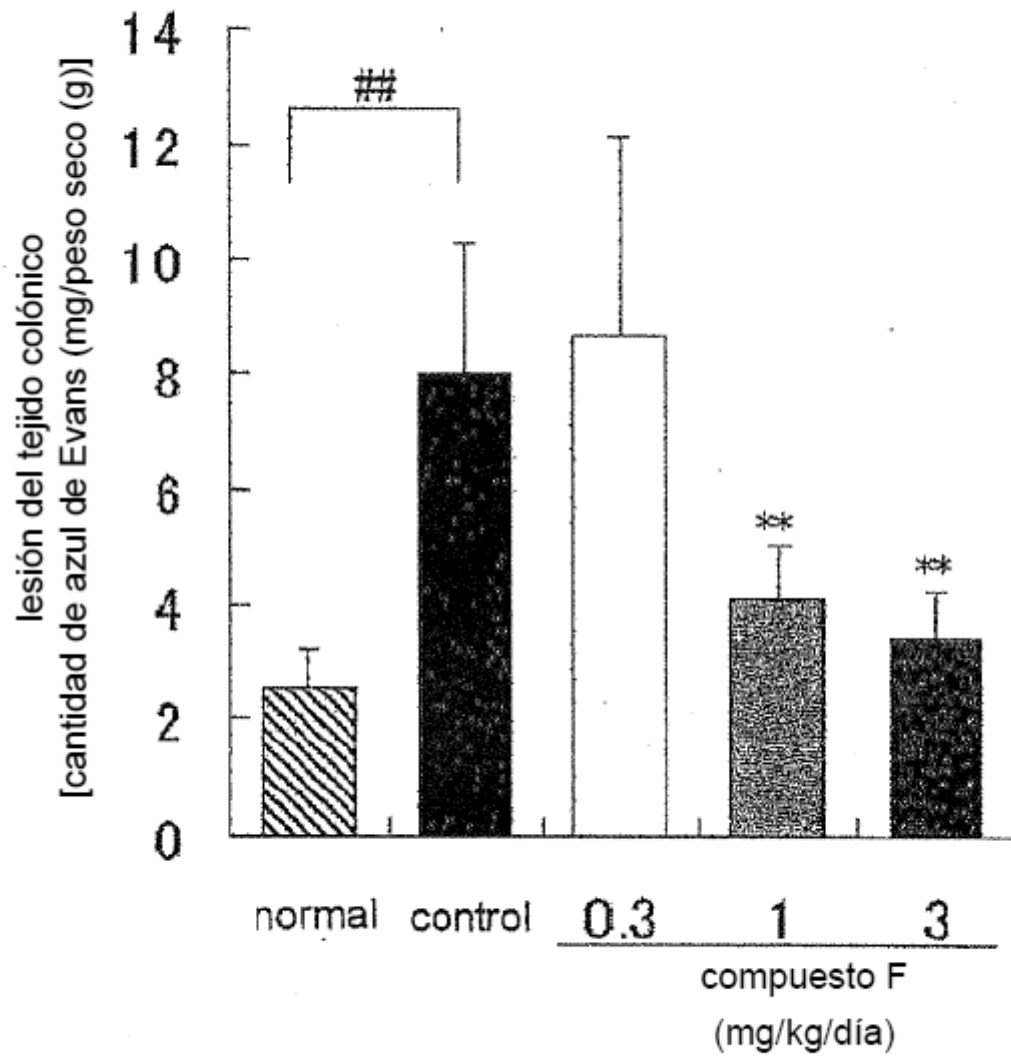


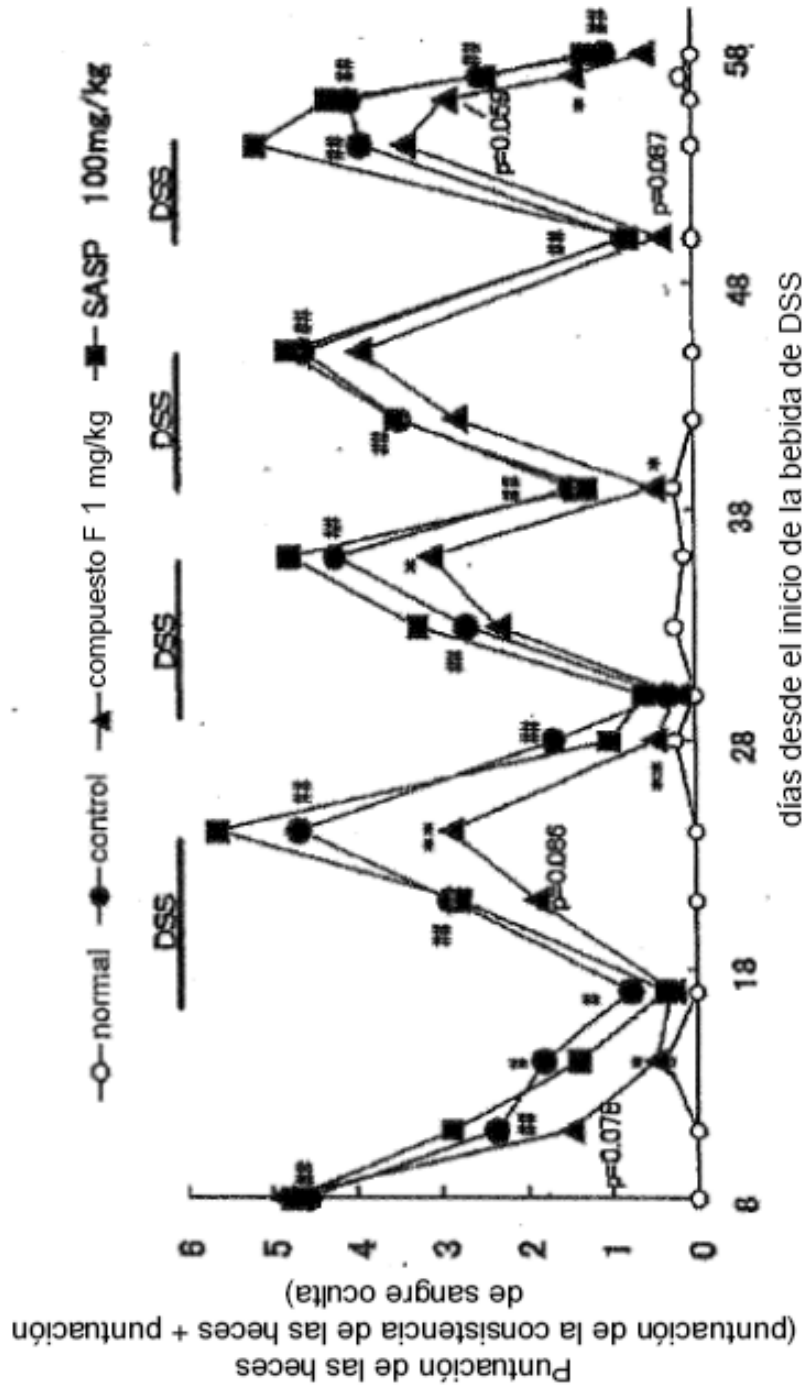
FIG. 4C



## p<0,01

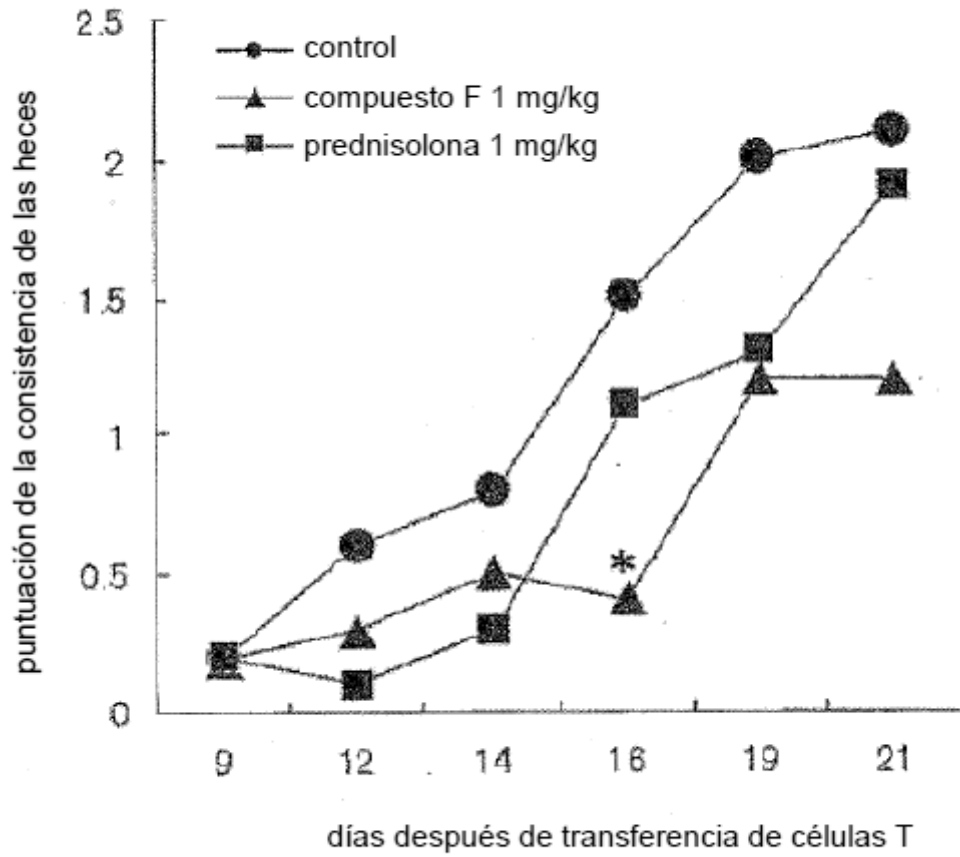
\* \* p<0,01 frente al control

**FIG. 5**



#, ## p<0,05, p<0,01 para el control frente a normal, respectivamente   
 \*, \*\* p<0,05, p<0,01 frente al control, respectivamente

FIG. 6A



\*  $p < 0,05$  frente al control

FIG. 6B

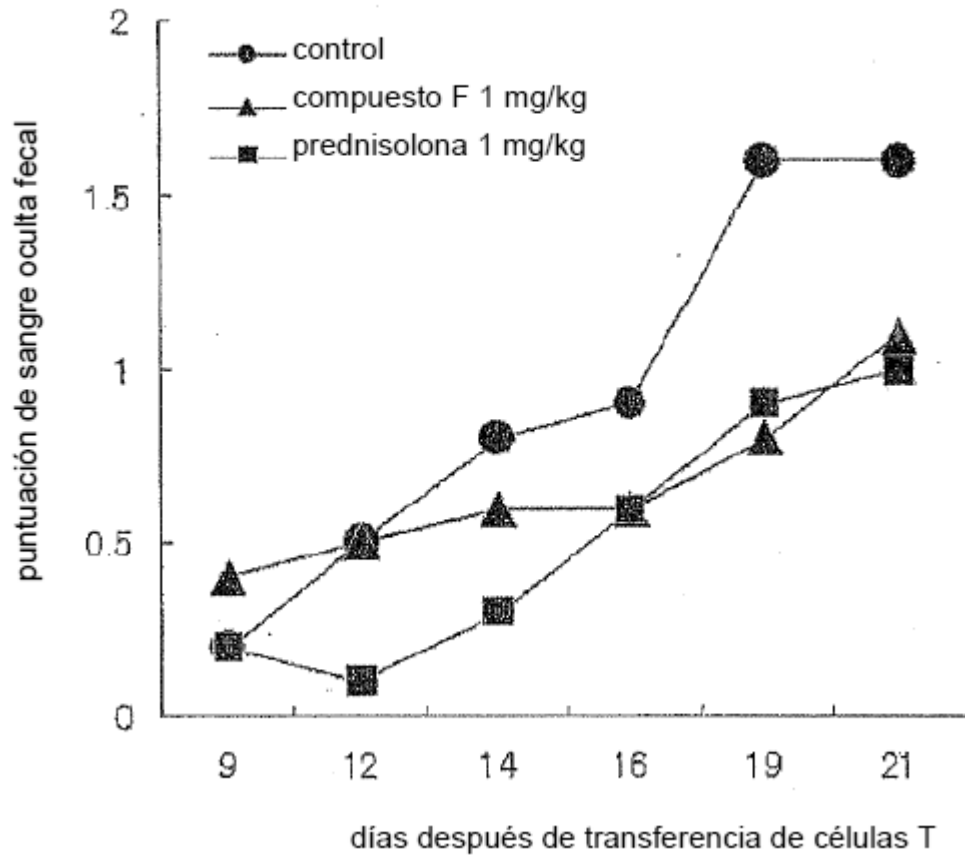


FIG. 6C

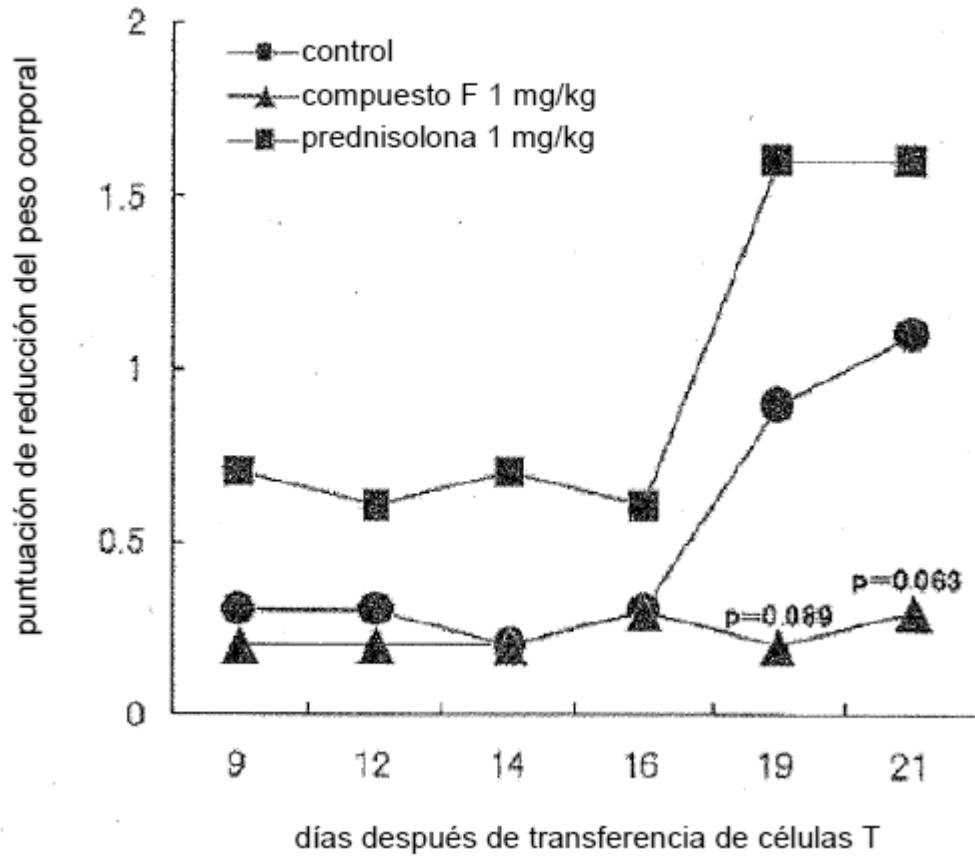
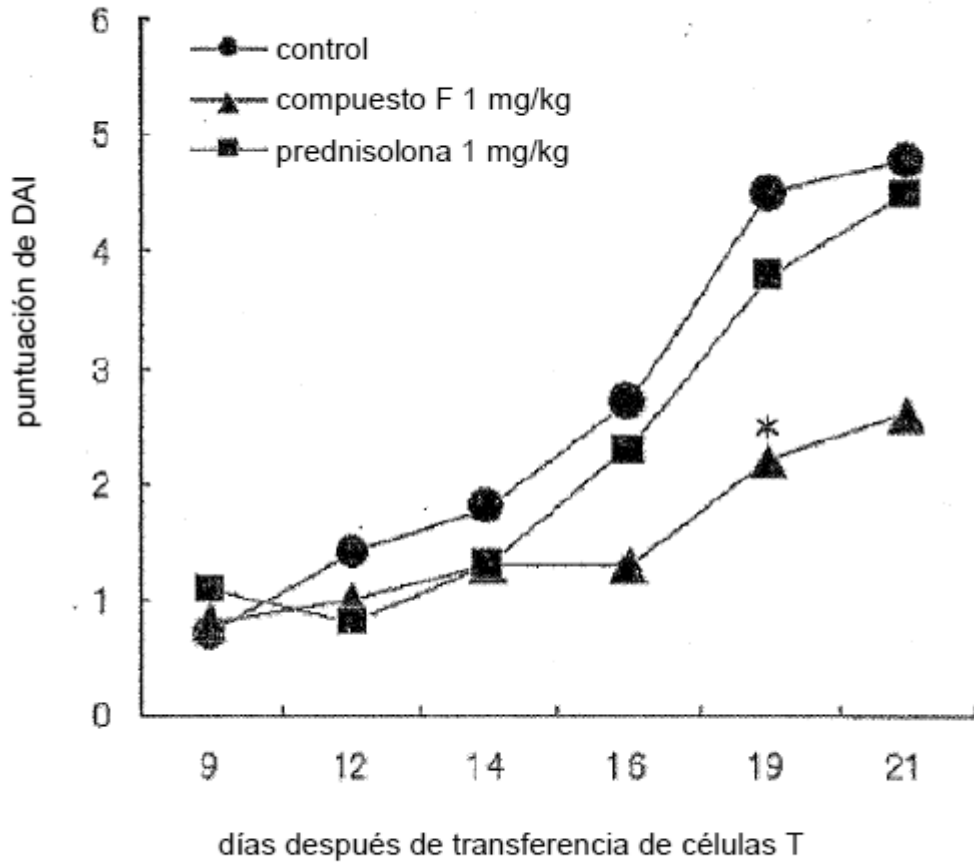


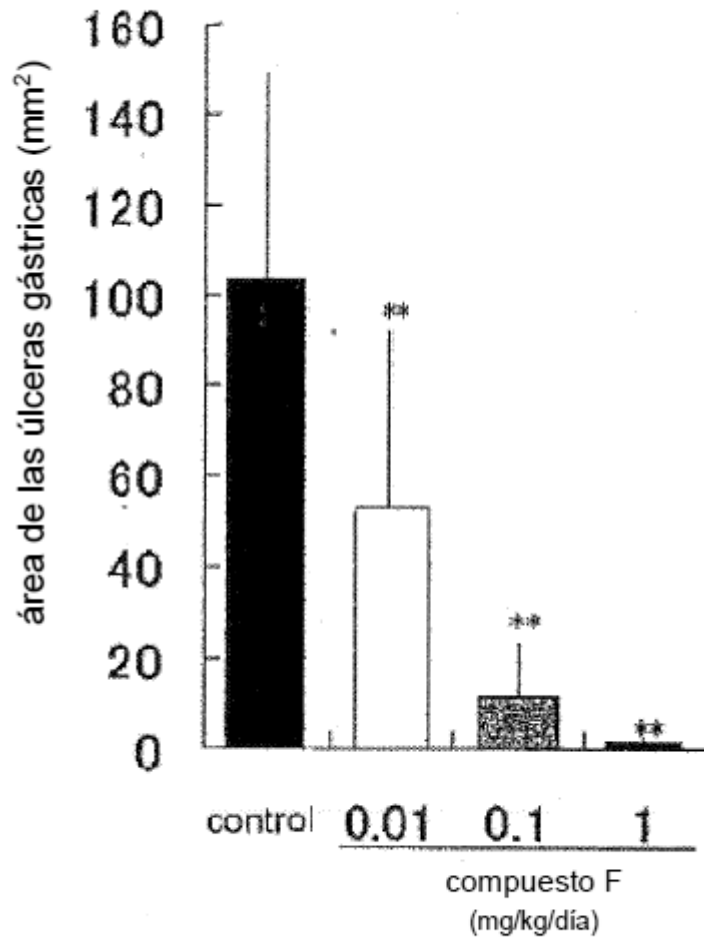


FIG. 6D



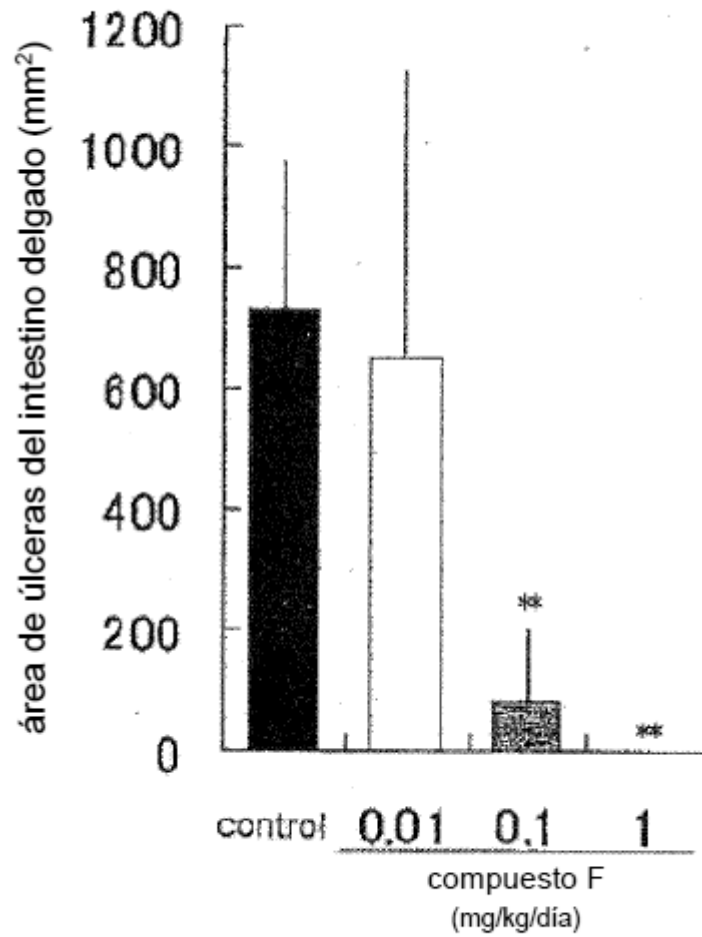
\*  $p < 0,05$  frente al control

FIG. 7



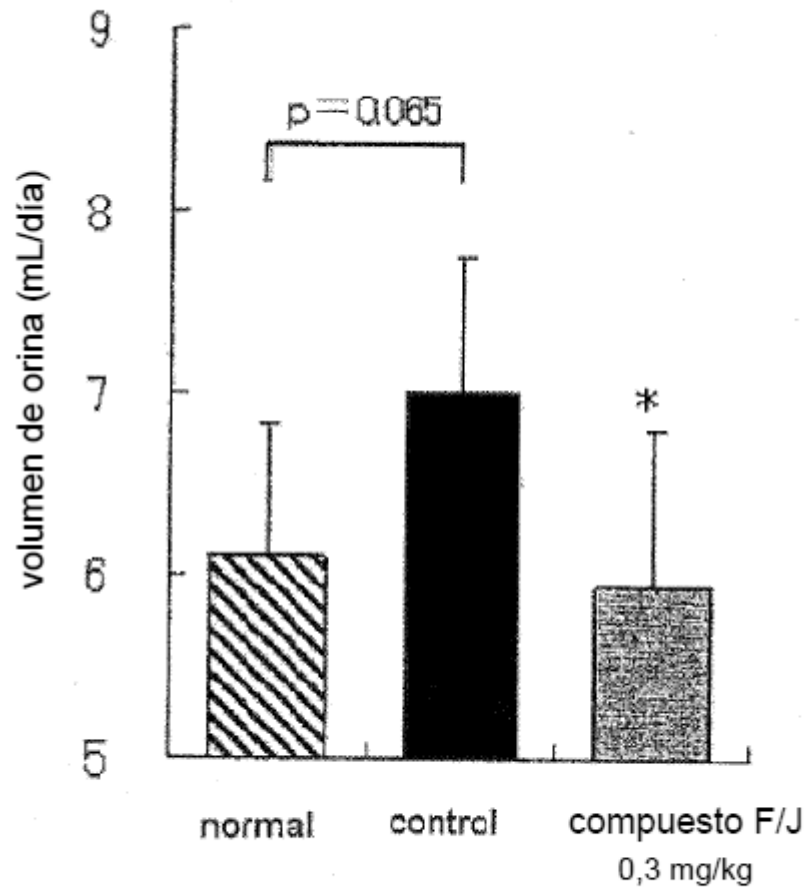
\*\* p<0,01 frente al control

FIG. 8



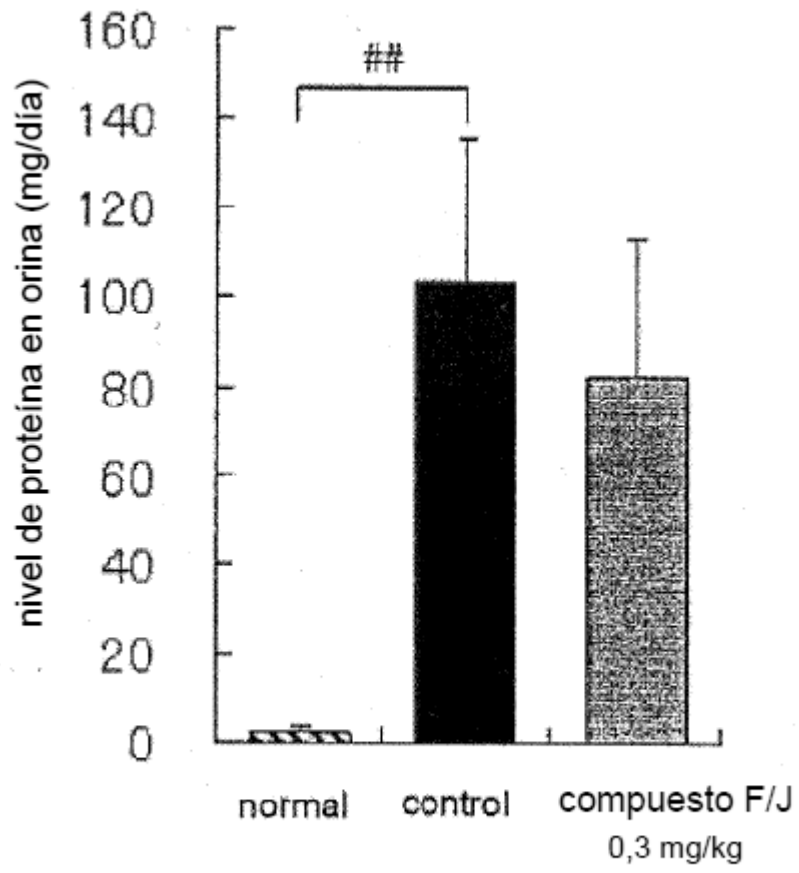
\*\* p<0,01 frente al control

FIG. 9A



\*  $p < 0,05$  frente al control

FIG. 9B



## p<0,01

**FIG. 9C**

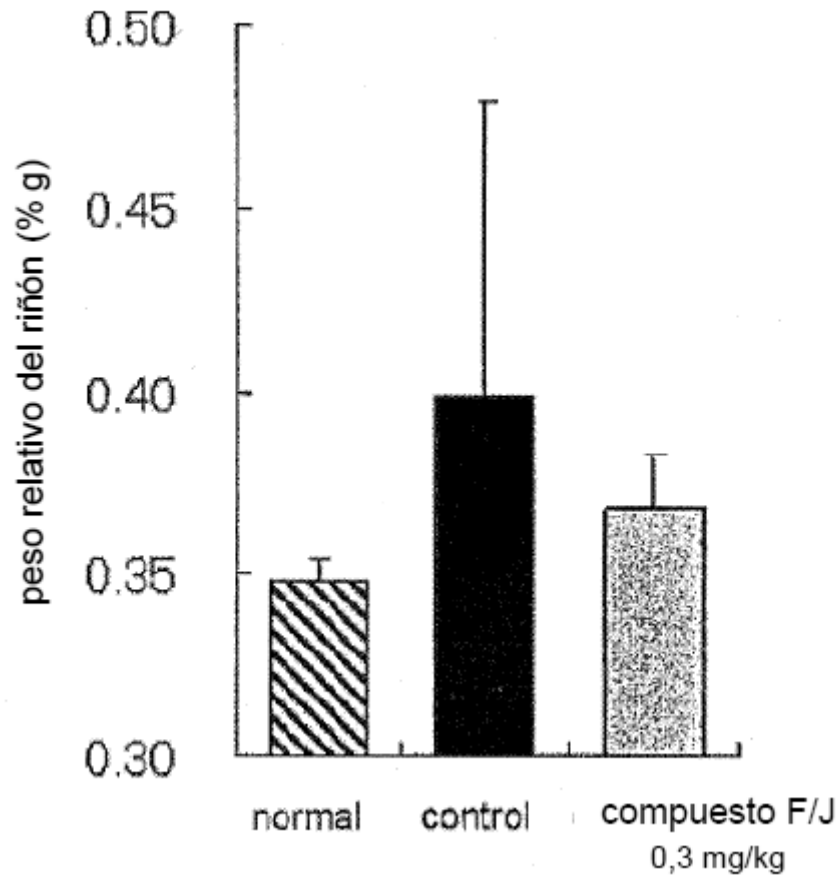
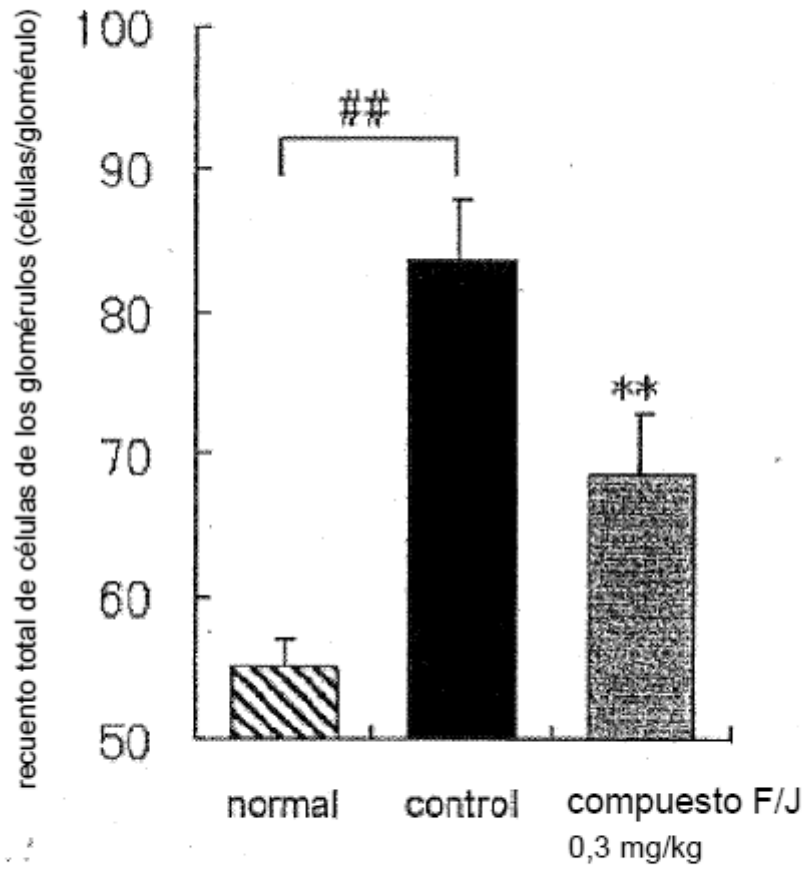


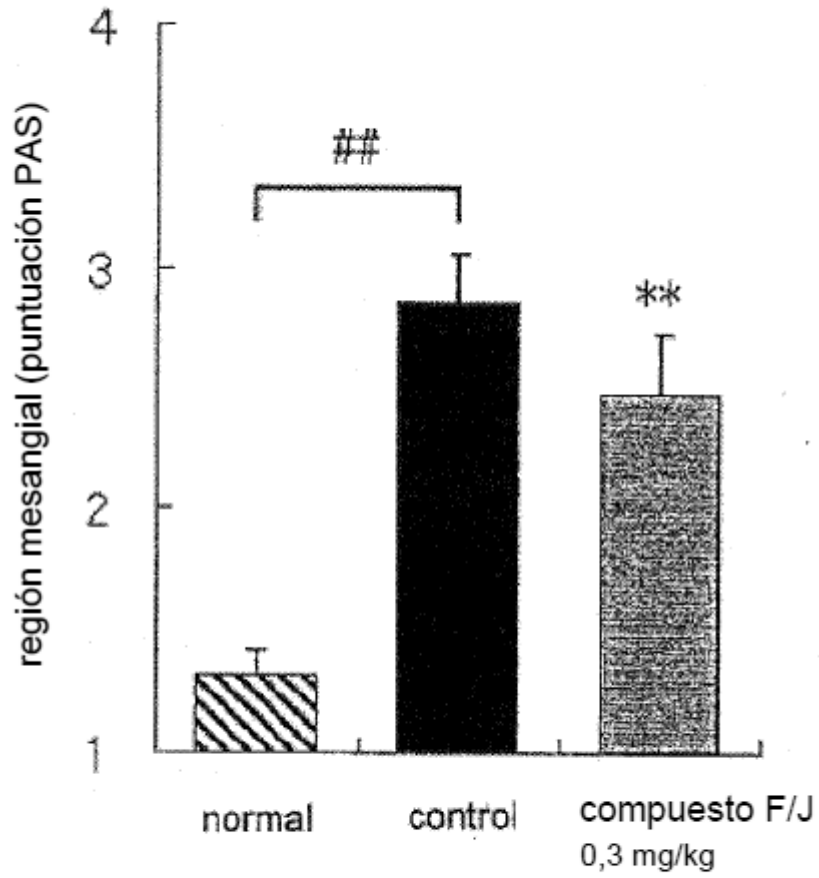
FIG. 9D



## p<0,01

\*\* p<0,01 frente al control

FIG. 9E

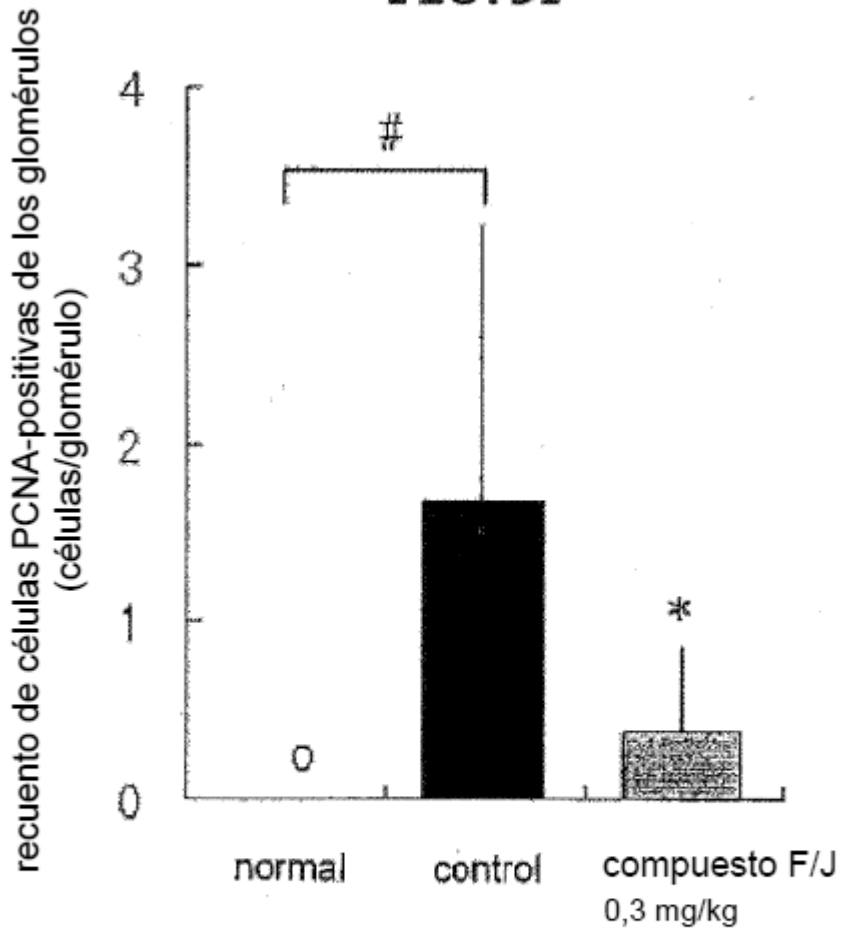


## p<0,01

\*\* p<0,01 frente al control



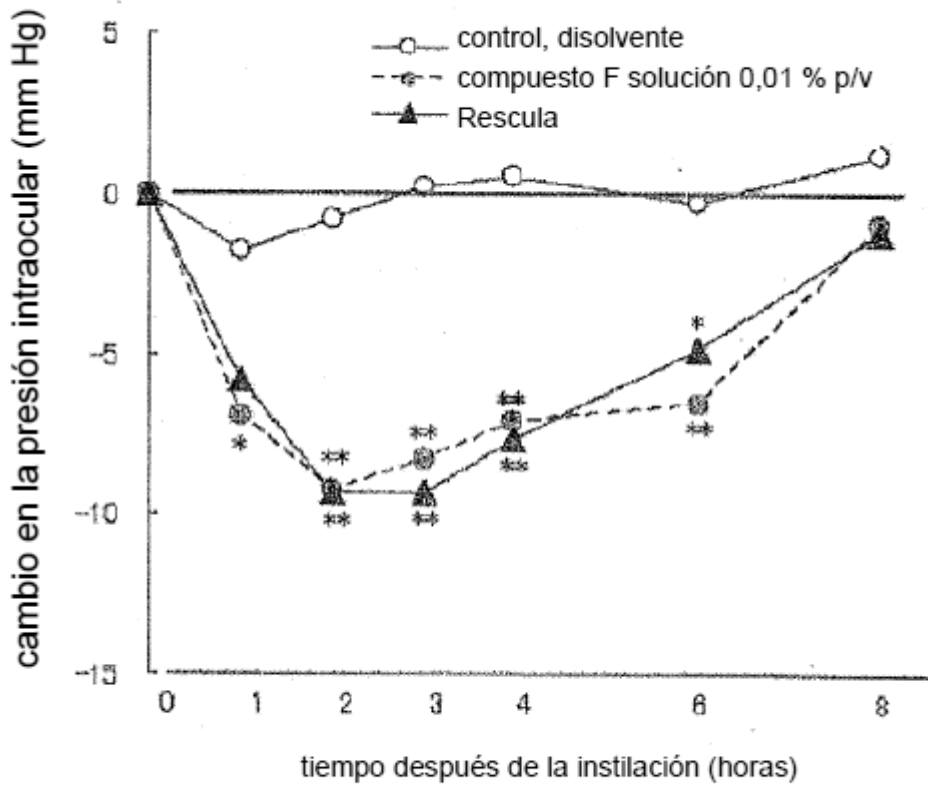
FIG. 9F



#  $p < 0,05$

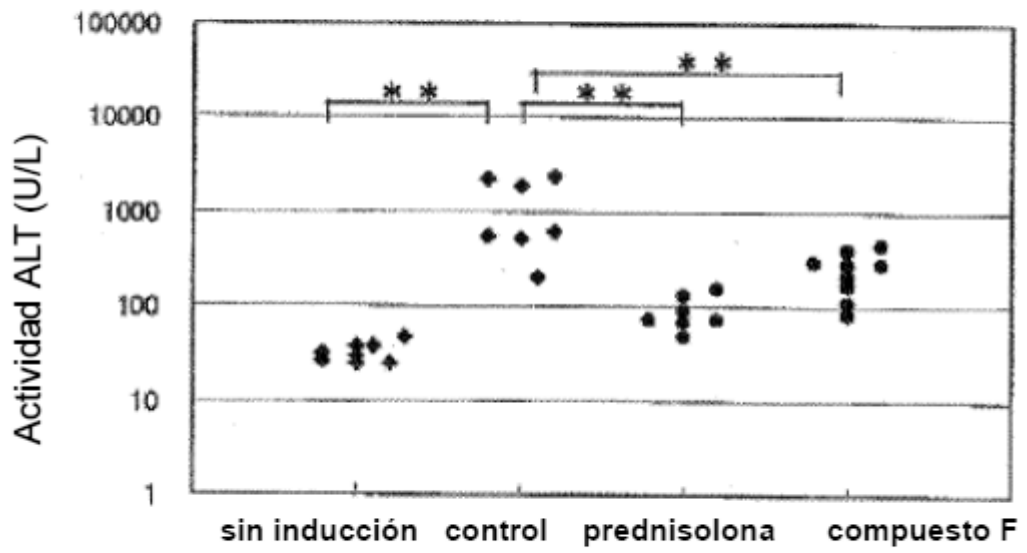
\*  $p < 0,05$  frente al control

**FIG. 10**



\*, \*\*  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  frente al control de disolvente, respectivamente

FIG. 11



\*\* p<0,01 frente al control