

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 063**

51 Int. Cl.:

C07D 498/04 (2006.01)

A61K 31/4985 (2006.01)

A61P 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2015 PCT/BR2015/000023**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2015 WO15123748**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2015 E 15752140 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 3133072**

54 Título: **Nuevos compuestos derivados de 6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]piracina-5,8-diona**

30 Prioridad:

24.02.2014 US 201461943825 P

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

04.12.2019

73 Titular/es:

**BIOLAB SANUS FARMACÉUTICA LTDA (100.0%)
Av. Paulo Ayres, 280, Vila Iasi, Taboão da Serra
04071-900 São Paulo - SP, BR**

72 Inventor/es:

**SACURAI, SÉRGIO LUIZ;
TOUZARIM, CARLOS EDUARDO DA COSTA;
TOLEDO, FABIANO TRAVANCA y
SOUSA, BRUNO ARTUR DE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 734 063 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

Nuevos compuestos derivados de 6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]piracina-5,8-diona

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevos derivados de 6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona, incluyendo sales farmacéuticamente aceptables; enantiómeros y/o diastereoisómeros de los compuestos separados en sus formas individuales y/o en las formas de mezclas racémicas o no racémicas con exceso enantiomérico en cualquier proporción; los procesos de preparación de dichos compuestos y/o derivados de los mismos.

10 La presente invención también abarca las composiciones farmacéuticas que comprenden dichos nuevos compuestos derivados de 6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona, incluyendo sales farmacéuticamente aceptables; enantiómeros y/o diastereoisómeros de los compuestos separados en sus formas individuales y/o en las formas de mezclas racémicas o no racémicas con exceso enantiomérico en cualquier proporción; medicamentos que comprenden dichos compuestos y/o derivados, así como el uso de los compuestos y/o derivados como un inhibidor de la enzima fosfodiesterasa, más particularmente como un inhibidor de la fosfodiesterasa tipo 5 (PDE-5); y el uso de los compuestos y/o derivados en el tratamiento de la disfunción eréctil, trastornos y/o afecciones tratables con relajación de tejidos y trastornos tratables con inhibidores de la fosfodiesterasa, más particularmente inhibidores de la PDE-5.

20 La presente invención también describe el uso de nuevos compuestos derivados de 6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona en un método para tratar la disfunción eréctil, trastornos y/o afecciones tratables con relajación de los tejidos y trastornos tratables con inhibidores de la fosfodiesterasa, específicamente como inhibidores de la PDE-5, utilizando los nuevos compuestos derivados de 6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona, incluyendo sales farmacéuticamente aceptables; enantiómeros y/o diastereoisómeros de los compuestos separados en sus formas individuales y/o en las formas de mezclas racémicas o no racémicas con exceso enantiomérico en cualquier proporción.

25 En particular, la presente invención describe los compuestos denominados 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5il)-7-(2-hidroxi-etilo)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-230); y 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5il)-7-((S)-1-hidroxipropan-2il)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-236).

Antecedentes de la invención

30 Los compuestos inhibidores de la fosfodiesterasa son los principales agentes utilizados en la medicina clínica para el tratamiento y/o prevención de la disfunción eréctil, trastornos y/o afecciones tratables con relajación de tejidos y otras enfermedades tratables con inhibidores de la fosfodiesterasa. En el caso de la disfunción eréctil, los inhibidores de la PDE-5 son los más utilizados en medicina clínica.

La disfunción eréctil, más comúnmente conocida como impotencia sexual, es una de las enfermedades que más afecta la calidad de vida de un hombre. Durante mucho tiempo, la disfunción eréctil ha atormentado a los hombres sin posibilidades considerables de tratamiento efectivo.

35 Antes de la década de 1970, casi todos los casos de disfunción eréctil se consideraban por causas psicológicas, y los tratamientos consistían en la administración empírica de testosterona o la derivación a un psiquiatra. El desarrollo de nuevos tratamientos como las prótesis de pene inflables, desarrolladas en 1973 y la aparición de inyecciones intracavernosas, a principios de 1980, fueron hitos importantes en la historia de los tratamientos modernos para la disfunción eréctil. El primer tratamiento de uso oral, basado en citrato de sildenafil (el ingrediente activo de Viagra) se lanzó en 1998 y fue un hito importante para los tratamientos de la disfunción eréctil.

40 El tratamiento oral es más aceptado por los hombres, desarrollado a través de la investigación clínica sobre el uso de inhibidores de la GMPc-PDE, más particularmente los inhibidores de la PDE-5. El precursor de estos compuestos fue 5-{2-etoxi-5-[(4-metil-1-piperazinil)sulfonil]fenil}-1-metil-3-propil-1,4-dihidro-7H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona, o sildenafil, con propiedades vasodilatadoras y que aumenta los efectos del óxido nítrico. La molécula de sildenafil se describió originalmente en la patente de EE.UU. US5250534.

45 Más tarde, otros compuestos inhibidores de la enzima PDE-5 se desarrollaron y se citan en varias publicaciones de literatura técnica, así como en publicaciones de patentes. Entre los compuestos conocidos se incluyen: la molécula de vardenafil, el ingrediente activo de Levitra, descrito por primera vez en la patente US3635178; tadalafil, ingrediente activo de Cialis, descrito por primera vez en la patente de EE.UU. US5859006; y el compuesto BL-106, aún no comercializado, descrito por primera vez en la patente de EE.UU. US8338432 y desarrollado por el mismo equipo de investigadores de la presente invención.

50 Los estudios disponibles informan que alguna forma de disfunción sexual afecta al 10-52% de los hombres. El estudio de Feldman y sus colegas ha demostrado que el 52% de los hombres entre las edades de 40 y 70 años tienen grados leves, moderados y graves de disfunción eréctil. Entre las edades de 40 y 70, la prevalencia de la disfunción eréctil leve permanece relativamente constante, pero la prevalencia de la disfunción eréctil moderada a grave aumenta con

cada década, y el aumento total combinado progresa desde el 40% a los 40 años hasta casi el 70% a los 70 años. Años (Feldman HA, Goldstein I, Hatziquistou DG, et al. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol* 1994; 151: 54-61).

5 Además, los investigadores descubrieron que los compuestos relajantes de tejidos se han utilizado para promover la relajación de varios tejidos con un enfoque en el tratamiento o la actuación como ayuda en el tratamiento, el procedimiento o la cirugía relacionada de cálculos biliares (Korkes, F. et al, *J Bras Nefrol.* (2009) 31 (1): 55), aumento de próstata (por ejemplo, hiperplasia prostática benigna, prostatitis) (documento WO 9911279) y constricción uretral (Van der Werf et al. *BJU International* (2002) 90: 588). Otros trastornos y/o afecciones tratables con relajación de tejidos son conocidos y descritos en la técnica.

10 Los inhibidores de la PDE-5 se han utilizado para bloquear la degradación del GMPc para prolongar los efectos del óxido nítrico (NO) en varios tejidos, por ejemplo, para mantener la relajación inducida por el NO en las vías respiratorias y los vasos sanguíneos (Barnes, PJ, et al., (1995) y para mantener la protección inducida por NO en tejidos (Duffin, R., et al., *Br J Pharmacol.* (2008) 153 (4): 623. Se ha demostrado que tales acciones en los tejidos son beneficiosas para el tratamiento de varios trastornos - trastornos que pueden tratarse con inhibidores de las fosfodiesterasas, en particular la PDE-5, que incluyen la hipertensión pulmonar (tratada comercialmente con citrato de sildenafil); bronquitis; asma crónica; hipertensión (documentos EP758653, US 7,569,572); enfermedad de Raynaud (Ghofrani HA et al, *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 689); el inicio de la insuficiencia cardíaca del lado derecho (Ghofrani et al. (2003) *AJRCCM* 167 (8): 1139); neurogénesis y recuperación funcional después del accidente cerebrovascular (Zhang et al. (2002) *Stroke* 33: 2675-2680); relajación de la arteria coronaria (Halcox et al. (2002) *J Am Coll Cardiol* 40: 1232); trastornos de la excitación sexual femenina (Nehra et al. (2001) *World J Urol.* 19 (1): 115); angina e insuficiencia cardíaca congestiva (Reffelmann et al., *Circ.* (2003) 108 (2): 239). Otros trastornos tratables con inhibidores de la PDE-5 son conocidos y descritos en la técnica.

25 En este marco y buscando nuevas alternativas de compuestos inhibidores de la fosfodiesterasa, más específicamente como inhibidores de la PDE-5, nuevos tratamientos para la disfunción eréctil, trastornos y/o afecciones tratables con relajación de tejidos y otras enfermedades tratables con inhibidores de la fosfodiesterasa, los investigadores de la presente invención han desarrollado nuevos compuestos derivados de 6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona, objeto de la presente invención, que presentan actividad inhibidora de la enzima fosfodiesterasa, incluyendo la inhibición de la PDE-5.

Compendio de la invención

30 La presente invención pretende proporcionar nuevos compuestos derivados de 6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona, incluyendo sales farmacéuticamente aceptables; enantiómeros y/o diastereoisómeros de los compuestos separados en sus formas individuales y/o en sus formas de mezclas racémicas o no racémicas con exceso enantiomérico en cualquier proporción. Más específicamente, los compuestos a los que se hace referencia como 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-(2-hidroxietil)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-230); y 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-((S)-1-hidroxiopropan-2-il)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-236).

40 Otro aspecto de la presente invención son los compuestos 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-(2-hidroxietil)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-230) o 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-((S)-1-hidroxiopropan-2-il)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-236) para uso en el tratamiento curativo y/o profiláctico de la disfunción eréctil, trastornos y/o afecciones tratables con relajación de los tejidos y alteraciones tratables con inhibidores de las fosfodiesterasas, específicamente con inhibidores de la PDE-5.

También es el objetivo de esta invención es proporcionar procedimientos para la preparación de los compuestos 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-(2-hidroxietil)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-230); y 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-((S)-1-hidroxiopropan-2-il)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-236).

50 Además, la presente invención también tiene como objetivo proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad efectiva de un compuesto de nuevos derivados de 6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona, incluyendo sales farmacéuticamente aceptables; enantiómeros y/o diastereoisómeros de los compuestos separados en sus formas individuales y/o en las formas de mezclas racémicas o no racémicas con exceso enantiomérico en cualquier proporción.

55 En particular, composiciones farmacéuticas que comprenden al menos uno de los nuevos compuestos derivados de 6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona, seleccionados de: 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-(2-hidroxietil)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-230); y 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-((S)-1-hidroxiopropan-2-il)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-236); incluyendo sales farmacéuticamente aceptables; enantiómeros y/o diastereoisómeros de los compuestos separados en sus formas individuales y/o en las formas de mezclas racémicas o no racémicas con exceso enantiomérico en cualquier proporción.

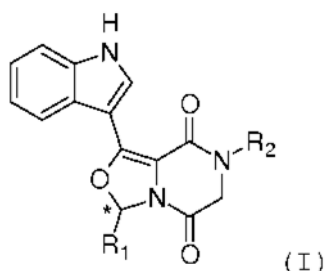
Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un medicamento que comprenda una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de nuevos derivados de 6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona, incluyendo sales farmacéuticamente aceptables; enantiómeros y/o diastereoisómeros de los compuestos separados en sus formas individuales y/o en las formas de mezclas racémicas o no racémicas con exceso enantiomérico en cualquier proporción. En particular, los medicamentos que comprenden al menos uno de los nuevos compuestos derivados de 6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona, seleccionados de: 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-(2-hidroxi-etil)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-230); y 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-((S)-1-hidroxipropan-2-il)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-236).

Breve descripción de las figuras

- 10 La Figura 1 muestra el espectro de ^1H RMN para la caracterización del compuesto obtenido en el Ejemplo 1 (BL-230).
La Figura 2 muestra el espectro de ^{13}C RMN para la caracterización del compuesto obtenido en el Ejemplo 1 (BL-230).
La Figura 3 muestra el espectro de HRMS para la caracterización del compuesto obtenido en el Ejemplo 1 (BL-230).
La Figura 4 muestra el espectro de ^1H RMN para la caracterización del compuesto obtenido en el Ejemplo 2 (BL-236).
La Figura 5 muestra el espectro de ^{13}C NMR para la caracterización del compuesto obtenido en el Ejemplo 2 (BL-236).
- 15 La Figura 6 muestra el espectro HRMS para la caracterización del compuesto obtenido en el Ejemplo 2 (BL-236).
La Figura 7 muestra un gráfico de la contracción inducida por la fenilefrina (PE) y el efecto del DMSO (vehículo - control negativo) en el cuerpo cavernoso de conejo.
La Figura 8 muestra un gráfico de la contracción inducida por la fenilefrina (PE) y el efecto relajante del tadalafil en el cuerpo cavernoso de conejo.
- 20 La Figura 9 muestra un gráfico de la contracción inducida por la fenilefrina (PE) y el efecto relajante del compuesto BL-230 en el cuerpo cavernoso de conejo.
La Figura 10 muestra un gráfico de la contracción inducida por la fenilefrina (PE) y el efecto relajante del compuesto BL-236 en el cuerpo cavernoso de conejo.
- 25 La Figura 11 muestra un gráfico de curva de dosis-respuesta, con el porcentaje de relajación en el cuerpo cavernoso de conejo después de la administración del compuesto BL-230 y tadalafil.
La Figura 12 muestra un gráfico de barras del porcentaje de relajación en el cuerpo cavernoso de conejo cuando se administraron BL-230, tadalafil y DMSO (vehículo).
La Figura 13 muestra un gráfico de barras con el porcentaje de relajación en el cuerpo cavernoso de conejo cuando se administraron BL-236, tadalafil y DMSO (disolvente).
- 30 La Figura 14 muestra el porcentaje de inhibición de la enzima fosfodiesterasa observada en presencia del compuesto BL-230 .
La Figura 15 muestra el porcentaje de inhibición de la enzima fosfodiesterasa observada en presencia del compuesto BL-236.

Descripción detallada de la invención

- 35 La presente invención describe nuevos compuestos para uso en el tratamiento de enfermedades tratables con inhibidores de la fosfodiesterasa, especialmente para la inhibición de la PDE-5, por ejemplo, disfunción eréctil, trastornos y/o afecciones tratables con relajación de tejidos y otras enfermedades tratables con inhibidores de fosfodiesterasa. Los compuestos de la presente invención se refieren a nuevos compuestos derivados de 6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona representados por la fórmula (I):



40

donde:

- R¹ es metileno-3,4-dioxifenilo;
- R² es CH₂(CH₂)_nR³ o CHR⁶CH₂OH;
- R³ es OH;
- 5 - R⁶ es (S)-Me; y
- n es 1;

incluyendo sales farmacéuticamente aceptables.

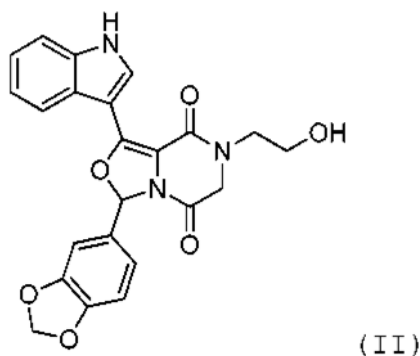
Los compuestos de fórmula (I) pueden contener uno o más centros quirales y, por lo tanto, pueden existir enantiómeros y/o diastereómeros. En particular, un centro quiral se resalta con un asterisco (*) en la descripción de la fórmula (I).
 10 Por lo tanto, la presente invención también abarca los enantiómeros y/o diastereómeros de los compuestos de fórmula (I) separados en sus formas individuales y/o en las formas de mezclas racémicas o no racémicas con exceso enantiomérico en cualquier proporción.

Los compuestos de fórmula (I) pueden existir en dos formas tautoméricas, y la invención incluye una o más formas tautoméricas y mezclas de estas formas (en cualquier proporción).

15 Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (I) se forman añadiendo ácidos farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de sales incluyen, pero no se limitan a sales de: nitrato, clorhidrato, bromhidrato, sulfato o bisulfato, fosfato, fosfato de hidrógeno, acetato, benzoato, succinato, fumarato, maleato, lactato, citrato, tartrato, gluconato, metanosulfonato, bencenosulfonato y p-toluenosulfonato. Los compuestos de fórmula (I) se
 20 pueden usar en sales metálicas farmacéuticamente aceptables, en particular sales de metales alcalinos, con bases tales como sales de sodio y potasio.

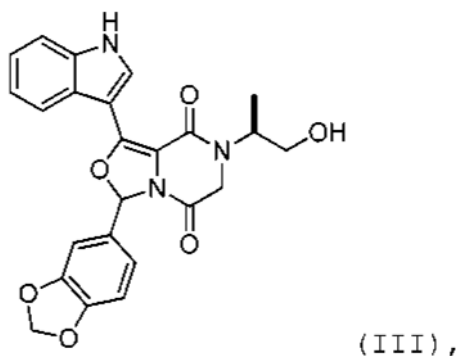
En una realización más específica, los nuevos compuestos derivados de 6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona, están representados por las siguientes fórmulas:

Fórmula (II):



25 Referido como 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5il)-7-(2-hidroxietil)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-230); y

Fórmula (III):

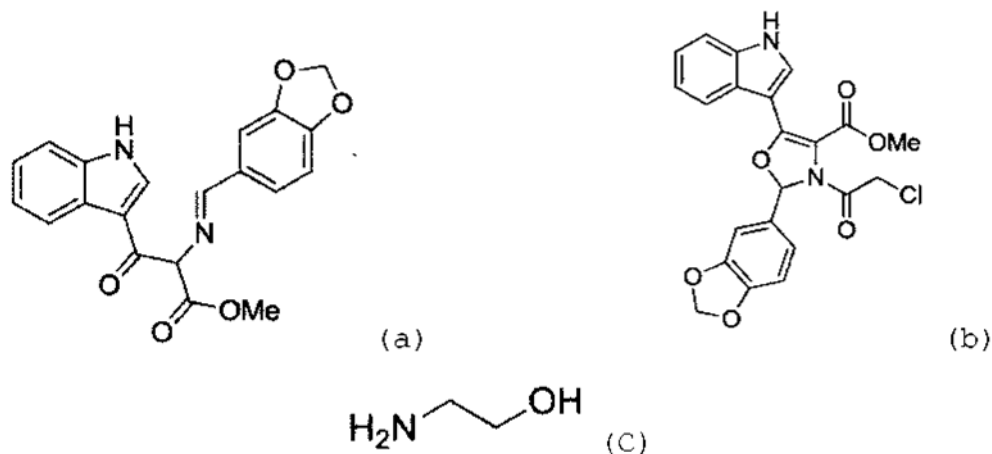


Referido como 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5il)-7-((S)1-hidroxiopropan-2il)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazo-lo[3,4-

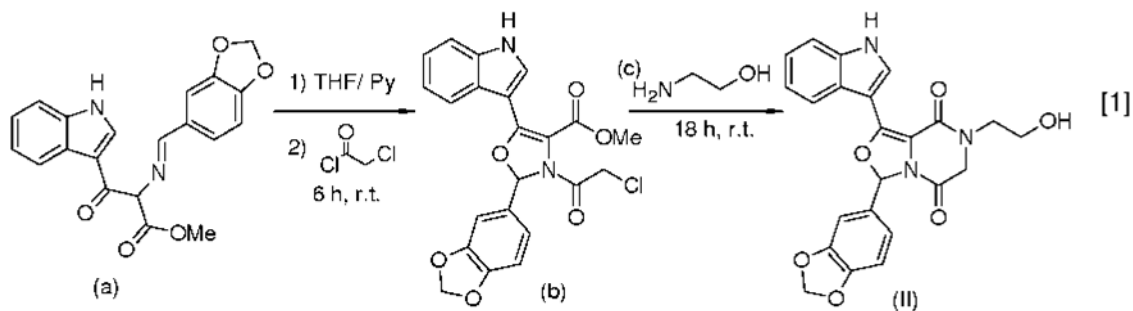
a]pirazina-5,8-diona (BL-236);

que incluye sales farmacéuticamente aceptables; enantiómeros y/o diastereoisómeros de los compuestos separados en sus formas individuales y/o en las formas de mezclas racémicas o no racémicas con exceso enantiomérico en cualquier proporción.

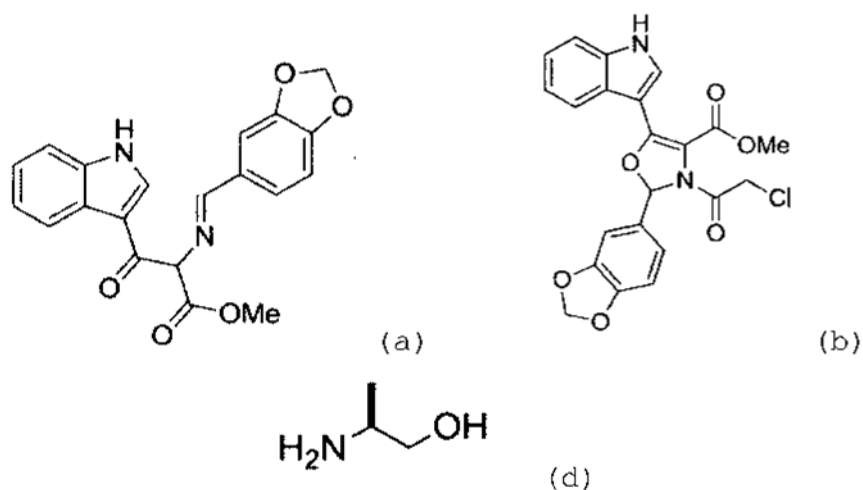
- 5 En otra realización de la presente invención, se refiere al proceso sintético del compuesto de fórmula (II) denominado 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-(2-hidroxi-etil)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-230), que puede obtenerse utilizando los compuestos (E)-2-((benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetileno)amino)-3-(1H-indol-3-il)-3-oxopropanoato de metilo descrito por la estructura química (a); 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-(2-cloroacetil)-5-(1H-indol-3-il)-2,3-dihidrooxazol-carboxilato de metilo descrito por la estructura química (b) y la amina 2-aminoetanol descrita por la estructura química (c).



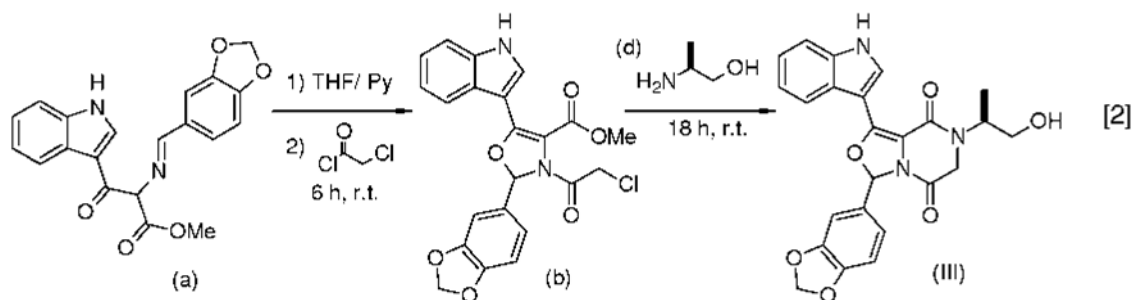
- 15 Para la síntesis del compuesto de fórmula (II), el compuesto (b) se prepara haciendo reaccionar el compuesto (a) en presencia de una disolución seca de piridina (Py) en tetrahidrofurano (THF) y disolución de cloruro de cloroacetilo. Una vez completada la reacción para formar el intermedio (b), este se añade al medio con etanol y 2-aminoetanol (c) al final de la reacción, se añaden etanol y agua, dando como resultado la obtención del compuesto de fórmula (II) como se ilustra en el Esquema [1]:



- 20 Dado que el compuesto de fórmula (III), referido como 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-((S)-1-hidroxipropan-2-il)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-236), según la presente invención, puede obtenerse utilizando los compuestos (E)-2-((benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetileno)amino)-3-(1H-indol-3-il)-3-oxopropanoato de metilo descrito por la estructura química (a) 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-(2-cloroacetil)-5-(1H-indol-3-il)-2,3-dihidrooxazol-4-carboxilato de metilo descrito por la estructura química (b) y la amina (S)-2-aminopropan-1-ol como se describe por la estructura química (d) .



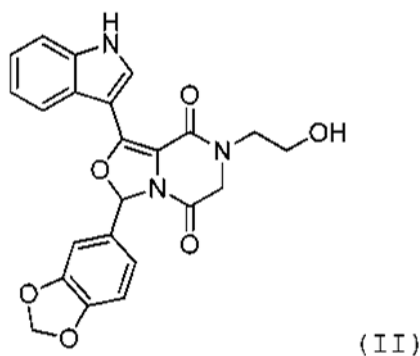
- 5 Para la síntesis del compuesto de fórmula (III), el compuesto (b) se prepara haciendo reaccionar el compuesto (a) en presencia de una disolución seca de piridina (Py) en tetrahidrofurano (THF) y disolución de cloruro de cloroacetilo. Una vez completada la reacción para formar el intermedio (b), este se añade al medio con el alcohol etílico y (S)-2-aminopropan-1-ol (d) al final de la reacción, se añaden etanol y agua, dando como resultado la obtención del compuesto de Fórmula (III) como se muestra en el Esquema [2]:



- 10 La presente invención también contempla composiciones farmacéuticas, es decir, una forma de dosificación apropiada en la que dicha composición comprende como ingrediente activo una cantidad efectiva de uno o más compuestos de fórmula (I), sales farmacéuticamente aceptables; enantiómeros y/o diastereoisómeros de los compuestos separados en sus formas individuales y/o en forma de mezclas racémicas o no racémicas con exceso enantiomérico en cualquier proporción.

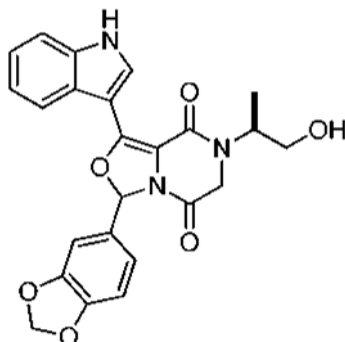
- 15 Preferiblemente, las composiciones de la invención comprenden como un ingrediente activo los nuevos compuestos que están representados por las siguientes fórmulas:

Fórmula (II):



Referido como 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-7-(2-hidroxietil)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-230); y

Fórmula (III):



(III)

5 referido como 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-((S)1-hydroxypropan-2-il)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-236); que incluye sales farmacéuticamente aceptables; enantiómeros y/o diastereoisómeros de los compuestos separados en sus formas individuales y/o en las formas de mezclas racémicas o no racémicas con exceso enantiomérico en cualquier proporción.

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar por métodos bien conocidos en la técnica. Adecuadamente, Remington's Pharmaceutical Sciences o fuentes de información similares pueden usarse para preparar una formulación farmacéutica adecuada para un compuesto portador de la invención.

10 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por vía oral, tópica, inyectable, nasal y rectal. El modo particular seleccionado dependerá de los compuestos presentes en la composición.

Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden presentarse, pero no se limitan a: polvos, gránulos, cápsulas, comprimidos, comprimidos efervescentes, comprimidos masticables, comprimidos recubiertos, píldoras, geles, gomas masticables, películas, disoluciones, jarabes, elixires, suspensiones, emulsiones, y similares.

15 La presente invención también contempla composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos de fórmula (I) y/o sales farmacéuticamente aceptables; enantiómeros y/o diastereoisómeros de los compuestos separados en sus formas individuales y/o en las formas de mezclas racémicas o no racémicas con exceso enantiomérico en cualquier proporción; y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

20 En particular, las composiciones farmacéuticas comprenden como ingrediente activo al menos uno de los siguientes compuestos seleccionados del grupo que consiste en:

(a) 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-(2-hidroxietil)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-230) descrita en la fórmula (II)

25 (b) 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-((S) 1-hidroxiopropan-2il)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4a]pirazina-5,8-diona (BL-236) descrita en la fórmula (III);

incluyendo sales farmacéuticamente aceptables; enantiómeros y/o diastereoisómeros de los compuestos separados en sus formas individuales y/o en las formas de mezclas racémicas o no racémicas con exceso enantiomérico en cualquier proporción; y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

30 Los compuestos descritos en el presente documento, incluyendo sales farmacéuticamente aceptables; enantiómeros y/o diastereoisómeros de los compuestos separados en sus formas individuales y/o en las formas de mezclas racémicas o no racémicas con exceso enantiomérico en cualquier proporción; se emplean para el tratamiento y/o la profilaxis de la disfunción eréctil, trastornos y/o afecciones tratables con relajación de tejidos y trastornos tratables con inhibidores de la fosfodiesterasa, como la PDE-5. Los trastornos que pueden tratarse con inhibidores de la PDE pueden ser litiasis, hiperplasia prostática, hipertensión pulmonar, constricción uretral, disfunción sexual femenina y/o disfunción sexual masculina, pero no solo se limitan a estos ejemplos.

35 Además, la presente invención contempla composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos descritos en el presente documento, incluyendo sales farmacéuticamente aceptables; enantiómeros y/o diastereoisómeros de los compuestos separados en sus formas individuales y/o en las formas de mezclas racémicas o no racémicas con exceso enantiomérico en cualquier proporción; se emplean para su uso en el tratamiento y/o profilaxis de la disfunción eréctil, trastornos y/o afecciones tratables con relajación de los tejidos y alteraciones tratables con inhibidores de la fosfodiesterasa como la PDE-5. Los trastornos que pueden tratarse con inhibidores de la PDE pueden ser litiasis, hiperplasia prostática, hipertensión pulmonar, constricción uretral, disfunción sexual femenina y/o disfunción sexual masculina, pero no solo se limitan a estos ejemplos.

En particular, los compuestos 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-(2-hidroxietil)-1-(1H -indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-

a]pirazina-5,8-diona (BL-230) descrita en la fórmula (II), y 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5il)-7-((S)1-hidroxiopropan-2-il)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-236) descrito en la fórmula (III); incluyen sales farmacéuticamente aceptables; enantiómeros y/o diastereoisómeros de los compuestos separados en sus formas individuales y/o en las formas de mezclas racémicas o no racémicas con exceso enantiomérico en cualquier proporción.

En el presente documento también se describe un método de tratamiento y/o prevención de trastornos asociados con la actividad de las fosfodiesterasas, administrando una dosis efectiva de al menos uno de los nuevos compuestos derivados de 6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona, una mezcla de estos derivados (en cualquier proporción), incluyendo sales farmacéuticamente aceptables; enantiómeros y/o diastereoisómeros de los compuestos separados en sus formas individuales y/o en las formas de mezclas racémicas o no racémicas con exceso enantiomérico en cualquier proporción. Los trastornos tratables por los inhibidores de la PDE pueden ser disfunción eréctil, cálculos biliares, hiperplasia prostática, hipertensión pulmonar, constricción uretral, disfunción sexual femenina y/o disfunción sexual masculina, pero no se limitan solo a estos ejemplos.

En el presente documento también se describe un método de tratamiento y/o prevención de la disfunción eréctil, trastornos y/o afecciones tratables con relajación de los tejidos y alteraciones tratables con inhibidores de la fosfodiesterasa, como la PDE-5, mediante la administración de una dosis efectiva de al menos uno de los nuevos compuestos derivados de 6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona, una mezcla de estos derivados (en cualquier proporción), incluyendo sales farmacéuticamente aceptables; enantiómeros y/o diastereoisómeros de los compuestos separados en sus formas individuales y/o en las formas de mezclas racémicas o no racémicas con exceso enantiomérico en cualquier proporción.

En particular, los compuestos 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5il)-7-(2-hidroxietyl)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-230-fórmula II) y: 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-((S)1-hidroxiopropan-2-il)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-236 - Fórmula III); o una mezcla de estos derivados (en cualquier proporción), incluyendo sales farmacéuticamente aceptables; enantiómeros y/o diastereoisómeros de los compuestos separados en sus formas individuales y/o en las formas de mezclas racémicas o no racémicas con exceso enantiomérico en cualquier proporción.

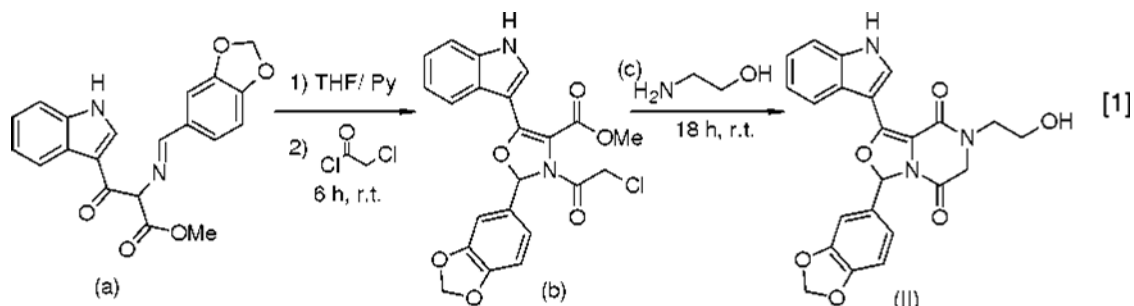
Ejemplos

Los siguientes ejemplos descritos en detalle ilustran la invención. Se deben incluir varias modificaciones dentro del alcance y alcance de las reivindicaciones adjuntas.

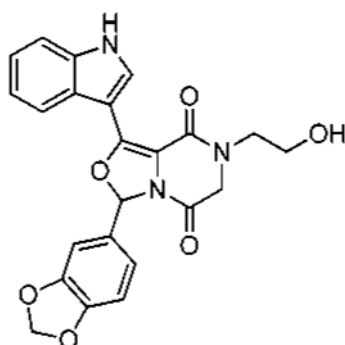
Ejemplo 1: Preparación del compuesto de fórmula II denominado 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5il)-7-(2-hidroxietyl)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-230).

En un matraz de 500 mL equipado con un agitador mecánico, un embudo de adición y un tubo de secado que contiene CaCl_2 , se añadieron el compuesto (a) (10,20 g, 28,0 mmol) y una disolución de piridina seca (11,3 mL) a 102 mL de tetrahidrofurano seco (THF), que se agitó durante 30 minutos. A esta suspensión se añadió lentamente, durante aproximadamente 2 horas, una disolución de cloruro de cloroacetyl (2,9 mL, 36,4 mmol) (reactivo 2) en 30 mL de THF seco. Después de la adición, la mezcla de reacción se hizo reaccionar durante 4 horas a temperatura ambiente, dando como resultado la formación del compuesto intermedio (b). Al final de este período, se añadieron al medio etanol (42 mL) y el compuesto (c) conocido como 2-aminoetanol (39,3 g, 644,0 mmol) y la mezcla se agitó durante un período de 16 horas. Al final de este tiempo, se añadieron al medio 250 mL de etanol y 100 mL de agua. El sistema se sometió a destilación a vacío y se eliminó el exceso de disolvente hasta la precipitación del producto. El matraz se enfrió a temperatura ambiente y después se enfrió a una temperatura entre 0 y 5 °C. El sistema enfriado se mantuvo bajo agitación durante 2 horas a una temperatura entre 0 y 5 °C. La suspensión resultante se filtró a vacío y el precipitado se lavó con 100 mL de etanol. El sólido se colocó en un matraz de 250 mL y se añadieron 60 mL de etanol y la mezcla se agitó durante 30 minutos. Después de este período, el sólido se filtró y se secó a vacío, dando como resultado la formación del producto de fórmula (II) según el esquema [1] a continuación.

Esquema [1]: Síntesis del compuesto 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5il)-7-(2-hidroxietyl)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-230).



El compuesto obtenido por este proceso tiene el nombre IUPAC 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5il)-7-(2-hidroxietyl)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-230), estructura química descrita por la fórmula (II):

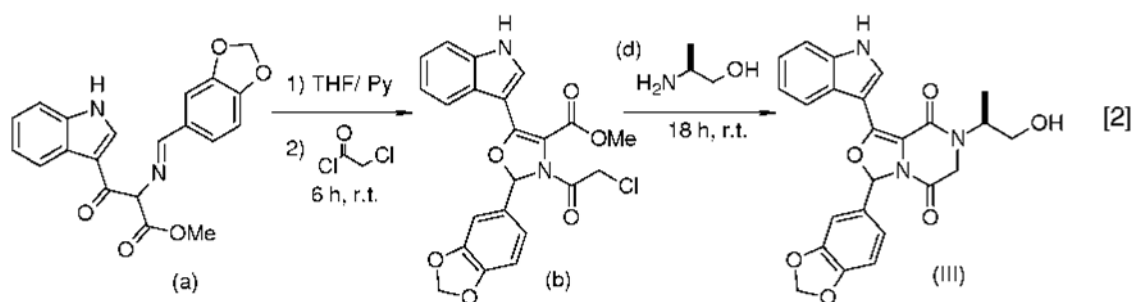


(II);

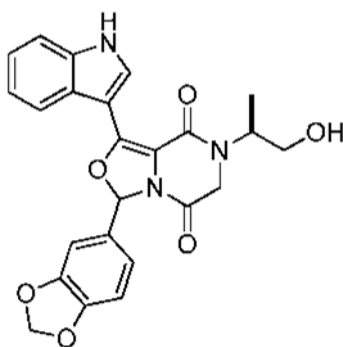
- y tiene las siguientes características: fórmula molecular: $C_{23}H_{19}N_3O_6$; sólido amarillo; Punto de fusión 254-258 °C, 1H RMN (500 MHz, $(CD_3)_2SO$): δ 11,87 (1s, 1H), 8,96 (1s, 1H), 7,85 (d, J = 10,0 Hz, 1H), 7,47 (d, J = 10,0 Hz, 1H), 7,18 a 7,05 (m, 5H), 6,98 (d, J = 10,0 Hz, 1H), 6,05 (s, 2H), 4,84-4,32 (m, 1H); 4,28 (dd, J = 30,0 Hz, J = 15,0 Hz, 2H), 3,65-3,61 (m, 2H), 3,50 a 3,45 (m, 2H) (Figura 1); ^{13}C RMN (125 MHz, $(CD_3)_2SO$): δ 159,1, 157,2, 148,8, 148,1, 148,0, 136,3, 131,5, 131,3, 125,7, 122,7, 121,8, 121,1, 120,9, 112,7, 108,8, 107,0, 105,4, 102,8, 101,9, 90,8, 58,9, 52,9, 48,2 (Figura 2); HRMS (EI) m/z calculado para $C_{23}H_{19}N_3O_6$: [433,1274]⁺ encontrado: 434,1336 [M+H]⁺ (Figura 3).
- 10 EJEMPLO 2: Preparación del compuesto de fórmula (III) denominado 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5il)-7-((S)-1-hidroxiopropan-2il)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo [3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-236).

En un matraz de 500 mL equipado con un agitador mecánico, un embudo de adición y un tubo de secado que contiene $CaCl_2$, se añadieron el compuesto (a) (10,20 g, 28,0 mmol) y una disolución de piridina seca (11,3 mL) a 102 mL de tetrahidrofurano seco (THF), que se agitó durante 30 minutos. A esta suspensión se añadió lentamente, durante aproximadamente 2 horas, una disolución de cloruro de cloroacetilo (2,9 mL, 36,4 mmol) (reactivo 2) en 30 mL de THF seco. Después de la adición, la mezcla de reacción se hizo reaccionar durante 4 horas a temperatura ambiente, dando como resultado la formación del compuesto intermedio (b). Al final de este período, se añadieron al medio etanol (42 mL) y el compuesto (d) denominado (S)-2-aminopropan-1-ol (48,4 g, 644,0 mmol) al medio y la mezcla se agitó durante un periodo de 16 horas. Al final de este tiempo, se añadieron al medio 250 ml de etanol y 100 mL de agua. El sistema se sometió a destilación a vacío y el exceso de disolvente se eliminó hasta la precipitación del producto. El matraz se enfrió a temperatura ambiente y después se enfrió a una temperatura entre 0 y 5 °C. El sistema enfriado se mantuvo bajo agitación durante 2 horas a temperatura entre 0 y 5 °C. La suspensión resultante se filtró a vacío y el precipitado se lavó con 100 mL de etanol. El sólido se colocó en un matraz de 250 mL, se añadieron 60 mL de etanol y la mezcla se agitó durante 30 minutos. Después de este período, el sólido se filtró y se secó a vacío, dando como resultado la formación del producto de fórmula (III) según el esquema [2] a continuación.

Esquema [2]: Síntesis del compuesto 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5il)-7-((S)-1-hidroxiopropan-2il)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo [3,4-a]pirazina-5,8-diona (BL-236).



- El compuesto obtenido por este proceso tiene el nombre IUPAC 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5il)-7-((S)-1-hidroxiopropan-2il)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona, (BL-236), estructura química descrita por la fórmula (III):



(III) ;

y tiene las siguientes características: fórmula molecular: $C_{24}H_{21}N_3O_6$; sólido amarillo; Punto de fusión 235-239 °C, 1H RMN (300 MHz, $(CD_3)_2SO$): δ 11,87 (d, $J = 3,0$ Hz, 1H), 8,98 (d, $J = 3,0$ Hz, 1H), 7,87 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,47 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,14 a 7,06 (m, 5H), 6,98 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 6,4 (s, 2H), 4,85 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H), 4,67 a 4,60 (m, 1H), 4,07 (dd, $J = 21,0$ Hz, $J = 18,0$ Hz, 2H), 3,59 a 3,52 (m, 1H), 3,51 a 3,40 (m, 1H), 1,07 (d, $J = 6,0$ Hz, 3H) (Figura 4); ^{13}C RMN, 75 MHz, $(CD_3)_2SO$, δ 159,5, 157,5, 148,8, 148,1, 148,0, 136,3, 131,6, 131,3, 125,7, 122,6, 121,8, 121,0, 120,9, 112,8, 108,8, 107,0, 105,7, 102,8, 101,9, 90,7, 61,9, 49,9, 46,5, 13,7 (Figura 5); HRMS (EI) m/z calculado para $[C_{24}H_{21}N_3O_6]^+$: 447,1430, encontrado: 470,1325 $[M+Na]^+$ (Figura 6).

Ejemplo 3: Evaluación del efecto relajante de los compuestos BL-230 y BL-236 en el cuerpo cavernoso de conejo aislado

Tejido

Para este estudio, se utilizaron conejos blancos de Nueva Zelanda (de 2 a 3,5 kg) para obtener tejido del pene que se escindió y se transfirió a una disolución de Krebs refrigerada. Para este estudio, utilizamos 4 tiras cavernosas (CC) del tejido del pene de conejos blancos de Nueva Zelanda.

Registro de Tensión Isométrica

Las tiras se montaron en cámaras de incubación de tejidos de 10 mL que contenían disolución de Krebs a 37 °C, con un pH entre 7,3 y 7,5; burbujeada continuamente con una mezcla de 95% de oxígeno (O_2) y 5% de dióxido de carbono (CO_2). Se aplicó una tensión inicial de 10 mN sobre los tejidos, seguida de un período de estabilización de 60 minutos. Los cambios en la tensión (fuerza isométrica) se obtuvieron utilizando transductores isométricos (ADInstruments, Australia) y se registraron en un sistema de adquisición de datos PowerLab 4/30 (Chart Software, versión 7.3.7, ADInstruments, MA, EE.UU. para BL-230 y versión 7.0 ADInstruments, MA para el BL-236).

Al analizar los datos, se puede observar que: (a) 1 μM de fenilefrina (PE) fue capaz de inducir una contracción sostenida en el tejido del cuerpo cavernoso de los conejos, como se puede ver en las Figuras 7 a 10; (b) la administración de dimetilsulfóxido (DMSO), el portador utilizado para solubilizar los compuestos, no indujo la relajación del tejido (Figura 7); (C) la administración de 1 μM de tadalafil dio lugar a la relajación del tejido (Figura 8); (D) y los compuestos BL-230 y BL-236 en una concentración de 1 μM produjeron una forma de relajación del tejido similar a la del tadalafil en la misma concentración (Figuras 9 y 10, respectivamente).

Las respuestas de la curva cumulativa a la concentración de los compuestos BL-230 y tadalafil (0,001 a 10 μM) se obtuvieron en las tiras de cuerpos cavernosos de conejo pre-contráidas con 1 μM de PE. Como se puede ver en la Figura 11, el compuesto BL-230 produjo una relajación dependiente de la dosis similar a la observada para tadalafil (0,001 a 10 μM) causada por la contracción de fenilefrina. Además, las Figuras 12 y 13 también ilustran la relajación observada con los compuestos BL-230, BL-236 y tadalafil, donde es posible observar (Figura 12 y 13), que BL-230 fue capaz de inducir una relajación del 78,47% del cuerpo cavernoso del conejo, mientras que BL-236 indujo un 93,05%, y el tadalafil indujo una relajación en el cuerpo cavernoso de alrededor del 100%. Por otro lado, el DMSO mostró una relajación insignificante de aproximadamente 20.

Los resultados muestran que los compuestos BL-230 y BL-236 producen relajación en el tejido del cuerpo cavernoso de conejos.

EJEMPLO 4: Estudio preclínico in vitro para evaluar el perfil de inhibición de las fosfodiesterasas (PDE) para los compuestos BL-230 de fórmula (II) y BL-236 de fórmula (III).

Estos estudios se realizaron para evaluar el perfil de inhibición de 13 tipos de fosfodiesterasas humanas (PDE) para los compuestos BL-230 y BL-236. Más específicamente, el perfil de inhibición de PDE1B, PDE2A₁, PDE3A, PDE3B, PDE4A_{1A}, PDE4B₁, PDE4D₂, PDE5, PDE6, PDE7A₁, PDE8A₁, PDE10A₂ y PDE11A₄. Para estos estudios, se realizaron ensayos enzimáticos que ya eran conocidos y estandarizados por la técnica anterior.

4.1: Actividad de los efectos de los compuestos BL-230 y BL-236 sobre la actividad de la enzima PDE1B.

Los efectos de los compuestos BL-230 y BL-236 sobre la actividad de las enzimas humanas PDE1B se cuantificaron midiendo la producción de guanosina 5'-monofosfato (5'GMP) a partir de monofosfato de guanosina cíclica (GMPc), utilizando una enzima recombinante humana expresada en células Sf9, y el método de detección fue utilizando HTRF® (Tecnología de Fluorescencia Homogénea Resuelta en el Tiempo).

El compuesto de ensayo, el compuesto de referencia o el agua (control) se mezclaron con 0,07 U de la enzima PDE1B en un tampón que contiene clorhidrato de Tris-hidroximetil aminometano 44,4 mM (Tris-HCl), cloruro de magnesio 5,28 mM (MgCl₂), Cloruro de calcio (CaCl₂) 0,88 mM, ditiotreitól (DTT) 2,64 mM y 0,198 U de calmodulina y polisorbato 20 0,044%(Tween® 20) (pH 7,8). Después, la reacción se inició mediante la adición de sustrato de GMPc 240 nM, y la mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para las mediciones de control basal, se omitió la enzima de la mezcla de reacción. Se añadieron el aceptor de fluorescencia (GMPc marcado con Dye2) y el donante de fluorescencia (anticuerpo anti-GMPc marcado con criptato de europio) en presencia de 3-isobutil-1-metilxantina 1 mM (IBMX). Después de 60 minutos, la transferencia de fluorescencia correspondiente a la cantidad de GMPc residual se midió a $\lambda_{ex} = 337$ nm, $\lambda_{em} = 620$ nm y $\lambda_{em} = 665$ nm utilizando un lector de microplacas (RubyStar, BMG). La actividad de la enzima se determinó por la división de señal medida a 665 nm, por la señal medida a 620 nm (derecha). Los resultados se expresaron como un porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de control. Se usó el compuesto inhibitorio estándar de referencia calmidazolol, que se ensayó en cada experimento a varias concentraciones para obtener una curva de inhibición a partir de la cual se calculó su valor IC₅₀.

Para este ensayo, los investigadores utilizaron como base las enseñanzas descritas por Bender (BENDER, AT y Beavo, JA (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Molecular regulation to clinical, Pharmacol.Rev., 58: 488).

Según los resultados, observamos (Figuras 14 y 15) que los compuestos BL-230 y BL-236, respectivamente, no inhibían la actividad de las enzimas PDE1B.

4.2: Actividad de los efectos de los compuestos BL-230 y BL-236 sobre la actividad de las enzimas PDE2A₁, PDE3A, PDE4A_{1A}, PDE4B₁, PDE7A, PDE8A₁, PDE10A₂ y PDE11A₄.

Los efectos de los compuestos BL-230 y BL-236 sobre la actividad de las enzimas humanas PDE2A₁, PDE3A, PDE4A_{1A}, PDE4B₁, PDE7A, PDE8A₁ y PDE10A₂ y PDE11A₄ se cuantificaron midiendo la producción de adenosina 5'-monofosfato (5'AMP) a partir de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), con una enzima recombinante humana expresada en células Sf9 y el método de detección fue utilizando HTRF®.

El compuesto de ensayo, el compuesto de referencia o agua (control) se mezclaron con la enzima (las enzimas y sus cantidades utilizadas se describen en la Tabla 1) en un tampón que contiene Tris-HCl 44,4 mM, MgCl₂ 5,28 mM, DTT 2,64 mM y Tween® 20 0,044 % (pH 7,8). Después, la reacción se inició mediante la adición de 40 nM de sustrato de AMPc y la mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para las mediciones de control basal, se omitió la enzima de la mezcla de reacción. Se añadieron el aceptor de fluorescencia (AMPc marcado con Dye2) y el donante de fluorescencia (anticuerpo anti-cAMP marcado con criptato de europio) en presencia de IBMX 1 mM. Después de 60 minutos, la fluorescencia correspondiente a la cantidad de AMPc residual de transferencia se midió a $\lambda_{ex} = 337$ nm, $\lambda_{em} = 620$ nm y $\lambda_{em} = 665$ nm utilizando un lector de microplacas (RubyStar, BMG). La actividad de la enzima se determinó por la división de señal medida a 665 nm, por la señal medida a 620 nm (derecha). Los resultados se expresaron como un porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de control. Los compuestos de referencia inhibitorios estándar utilizados para cada una de las enzimas utilizadas se describen en la Tabla 1, que se ensayó en cada experimento a varias concentraciones para obtener una curva de inhibición a partir del cual se calculó su valor IC₅₀.

Para este ensayo, los investigadores utilizaron como base las enseñanzas descritas por: Bender (BENDER, AT y Beavo, JA (2006), Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Molecular regulation to clinical use, Pharmacol. Rev., 58: 488 [PDE3A₁ y PDE2A]); Saldou (SALDOU, N., et al. (1998) Comparison of recombinant human PDE4 isoforms: interaction with substrate and inhibitors, Cell Signal., 10: 427. [PDE4A_{1A} y PDE4B₁]; Smith (SMITH, SJ, et al. (2004) Discovery of BRL 50481 [N,N-dimethylsulfonamido]-4-methyl-nitrobenzene], a selective inhibitor of phosphodiesterase 7: in vitro studies in human monocytes, lung macrophages, and CD8 + T-lymphocytes, Mol Pharm., 66: 1679. [PDE7A]); Fisher (FISHER, DA, et al. (1998), Isolation and characterization of PDE8A, a novel human cAMP-specific phosphodiesterase Biochem, 246: 570. [PDE8A₁]); Soderling (SODERLING SH, et al. (1999), Isolation and characterization of a dualsubstrate phosphodiesterase gene family: PDE10A, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 7071 [PDE10A₂]); y Fawcett (FAWCETT L., et al. (2000), Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A, Proc. Natl. Acad. Sci., 97: 3702. [PDE11A₄]).

Tabla 1:

Lista de enzimas y sus respectivos compuestos estándar de referencia inhibidores de PDE		
Enzimas (s)	Cantidad (s)	Compuesto de referencia inhibidores estándar
PDE2A ₁	8U de PDE2A ₁	EHNA
PDE3A	1U de PDE3A	Milrinona
PDE4A _{1A}	5U de PDE4A _{1A}	Rolipram
PDE4B ₁	4,8U de PDE4B ₁	Rolipram
PDE7A	0,1U de PDE7A	BRL 50481
PDE8A ₁	1,2U de PDE8A ₁	Dipiridamol
PDE10A ₂	0,25U de PDE10A ₂	Papaverina
PDE11A ₄	1U de PDE11A ₄	Papaverina

Según con los resultados obtenidos, observamos (Figuras 14 y 15) que los compuestos BL230 y BL-236, respectivamente, no inhibían la actividad de las enzimas PDE2A₁, PDE3A, PDE4A_{1A}, PDE4B₁, PDE7A y PDE8A₁. Mientras que los compuestos BL230 y BL-236 inhibieron el 75% y el 80%, respectivamente, de la actividad enzimática de PDE11A₄. Y, además, es posible observar que el compuesto BL-230 fue capaz de inhibir la actividad enzimática de PDE10A₂ en un 35%.

4.3: Actividad de los efectos de los compuestos BL-230 y BL-236 sobre la actividad de la enzima PDE3B.

Los efectos de los compuestos BL-230 y BL-236 sobre la actividad de la enzima PDE3B humana se cuantificaron midiendo la producción de 5'AMP a partir de AMPc usando una enzima recombinante humana expresada en células Sf9 y el método de detección fue utilizando HTRF®. El compuesto de ensayo, el compuesto de referencia o agua (control) se mezclaron con 0,7 U de la enzima PDE3B en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 6 mM, DTT 3 mM y Tween® 20 0,05% (pH 7,8). Después, la reacción se inició mediante la adición de 40 nM de sustrato de AMPc y la mezcla se incubó durante 30 minutos a 22 °C. Para las mediciones de control basal, se omitió la enzima de la mezcla de reacción. Se añadieron el aceptor de fluorescencia (AMPc marcado con Dye2) y el donante de fluorescencia (anticuerpo anti-AMPc marcado con criptato de europio) en presencia de IBMX 1 mM. Después de 60 minutos, la transferencia de fluorescencia correspondiente a la cantidad de AMPc residual se midió a $\lambda_{ex} = 337$ nm, $\lambda_{em} = 620$ nm y $\lambda_{em} = 665$ nm utilizando un lector de microplacas (RubyStar, BMG). La actividad de la enzima se determinó mediante la división de señal medida a 665 nm, por la señal medida a 620 nm (derecha). Los resultados se expresaron como un porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de control. Se usó el compuesto de referencia inhibitorio estándar milrinona, que se ensayó en cada experimento a varias concentraciones para obtener una curva de inhibición a partir de la cual se calculó su valor de IC₅₀.

Para este ensayo, los investigadores utilizaron como base las enseñanzas descritas por Bender (BENDER, AT y Beavo, JA (2006), Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Molecular regulation to clinical use, Pharmacol. Rev., 58: 488).

Según los resultados obtenidos, observamos (Figuras 14 y 15) que los compuestos BL-230 y BL-236, respectivamente, no inhibían la actividad de las enzimas PDE3B.

4.4: Actividad de los efectos de los compuestos BL-230 y BL-236 sobre la actividad de la enzima PDE4D₂.

Los efectos de los compuestos BL-230 y BL-236 sobre la actividad de la enzima PDE4D₂ humana se cuantificaron midiendo la producción de 5'AMP AMPc usando una enzima recombinante humana expresada en células Sf9 y el método de detección utilizado fue el HTRF®.

El compuesto de ensayo, el compuesto de referencia o agua (control) se mezclaron con 0,75 U de PDE4D₂ en una solución salina tamponada equilibrada con Hanks (HBSS) (Invitrogen) suplementada, y MgCl₂ 1,5 mM, albúmina sérica bovina 0,1% (BSA). Después, la reacción se inició mediante la adición de 40 nM de sustrato de AMPc y la mezcla se incubó durante 15 minutos a 37 °C. Para las mediciones de control basal, se omitió la enzima de la mezcla de reacción. El aceptor de fluorescencia (AMPc marcado con Dye2) y el donante de fluorescencia (anticuerpo anti-AMPc marcado con criptato de europio) se añaden en presencia de IBMX 1 mM. Después de 60 minutos a temperatura ambiente, la fluorescencia correspondiente a la cantidad de cAMP residual de transferencia se midió a $\lambda_{ex} = 337$ nm, $\lambda_{em} = 620$ nm y $\lambda_{em} = 665$ nm utilizando un lector de microplacas (Envision, Perkin Elmer). La actividad de la enzima se determinó mediante la división de señal medida a 665 nm, por la señal medida a 620 nm (relación). Los resultados se expresaron como un porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de control. Se utilizó el compuesto inhibitorio estándar de referencia rolipram, que se ensayó en cada experimento a varias concentraciones para obtener una curva de inhibición

a partir de la cual se calculó su valor de IC₅₀.

Para este ensayo, los investigadores utilizaron como base las enseñanzas descritas por Saldou (SALDOU, N., et al. (1998) Comparison of recombinant human PDE4 isoforms: interaction with substrate and inhibitors, *Cell Signal.*, 10: 427).

- 5 Según los resultados obtenidos, se puede ver (Figuras 14 y 15) que el compuesto BL-230 inhibió el 55% de la actividad enzimática de PDE4D₂, mientras que el compuesto BL-236 no mostró efecto inhibitorio sobre esta enzima.

4.5: Actividad de los efectos de los compuestos BL-230 y BL-236 sobre la actividad de las enzimas PDE5.

- 10 Los efectos de los compuestos BL-230 y BL-236 en la actividad de la enzima PDE5 humana se cuantificaron midiendo la producción de 5'GMP a partir de GMPc utilizando una enzima aislada de plaquetas humanas Cerep y el método de detección utilizado fue el ensayo de proximidad de centelleo (SPA).

- 15 El compuesto de ensayo, el compuesto de referencia o el agua (control) se añadieron a un tampón que contenía Tris-HCl 40 mM (pH 7,8), MgCl₂ 3 mM, DTT 1,4 mM, BSA 0,21%, cloruro de amonio 200 mM (NH₄Cl), GMPc 1 μM y 0,1 μCi de [³H] GMPc. Después, la reacción se inició añadiendo la enzima (cantidad final dependiendo de la eficiencia del aislamiento) y la mezcla se incubó durante 60 minutos a 22 °C. Para las mediciones de control basal, se omitió la enzima de la mezcla de reacción. A continuación, se añadieron las perlas de incubación de SPA. Después de 20 min a 22 °C bajo agitación, la cantidad de [³H] 5'GMP se cuantificó con un contador de centelleo (Topcount, Packard). Los resultados se expresaron como un porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de control. Se usó el compuesto inhibitorio estándar de referencia dipiridamol, que se ensayó en cada experimento a varias concentraciones para obtener una curva de inhibición a partir del cual se calculó su valor de IC₅₀.

- 20 Para este ensayo, los investigadores utilizaron como base las enseñanzas descritas por Weishaar, (Weishaar, RE, et al. (1986), Multiple molecular forms of cyclic nucleotide phosphodiesterase in cardiac and smooth muscle and platelets en *Biochem. Pharmacol.*, 35: 787).

- 25 Según los resultados obtenidos, los investigadores encontraron que los compuestos BL-230 y BL-236 son potentes inhibidores de la PDE5, y que BL-230 mostró una inhibición del 90% y BL-236 mostró una inhibición del 86% (Figuras 14 y 15, respectivamente).

4.6: Actividad de los efectos de los compuestos BL-230 y BL-236 sobre la actividad de la enzima PDE6.

Los efectos de los compuestos BL-230 y BL-236 sobre la actividad de la enzima humana PDE6 se cuantificaron midiendo la producción de 5'GMP a partir de GMPc, utilizando una enzima aislada de la retina bovina Cerep y el método de detección utilizado fue el ensayo de proximidad de centelleo (SPA).

- 30 El compuesto de ensayo, el compuesto de referencia o agua (control) se añadieron a un tampón que contenía Tris-HCl 40 mM (pH 7,8), MgCl₂ 3 mM, DTT 1,4 mM, BSA 0,21%, NH₄Cl 200 mM, GMPc 2 uM y 0,05. μCi de [³H] GMPc. Después, la reacción se inició añadiendo la enzima (cantidad final dependiendo de la eficiencia del aislamiento) y la mezcla se incubó durante 60 minutos a 22 °C. Para las mediciones de control basal, se omitió la enzima de la mezcla de reacción. A continuación, se añadieron las perlas de incubación de SPA. Después de 20 minutos a 22 °C bajo agitación, la cantidad de [³H] 5'GMP se cuantificó con un contador de centelleo (Topcount, Packard). Los resultados se expresaron como un porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de control. Se usó el compuesto inhibitorio estándar de referencia zaprinast, que se ensayó en cada experimento a varias concentraciones para obtener una curva de inhibición a partir de la cual se calculó su valor de IC₅₀.

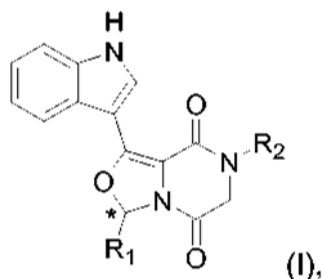
- 40 Para este ensayo, los investigadores utilizaron como base las enseñanzas descritas por Ballard (Ballard, AS, et al. (1998) Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the Activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes, *J Urol.*, 159. 2164).

Según los resultados obtenidos, los investigadores encontraron que los compuestos BL-230 y BL-236 son potentes inhibidores de PDE6, y que BL-230 mostró una inhibición del 85% y BL-236 mostró una inhibición del 90% (Figuras 14 y 15 respectivamente).

- 45 Independientemente de los ensayos utilizados, los resultados que muestran una inhibición (o estimulación) superior al 50% son indicativos de un fuerte efecto. Los resultados muestran que la inhibición (o estimulación) entre el 25% y el 50% es indicativa de un efecto bajo o moderado. Los resultados de la inhibición (o estimulación) por debajo del 25% no se consideran significativos y, principalmente, se asignan a la variabilidad de la señal alrededor del control.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto derivado de 6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona, en donde tiene la fórmula (I)

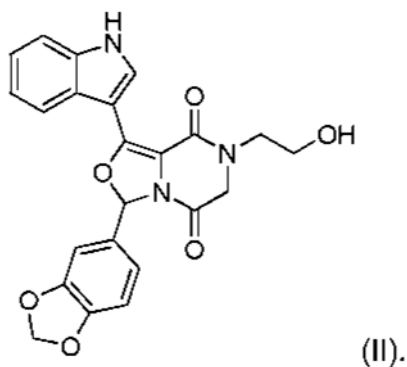


en donde:

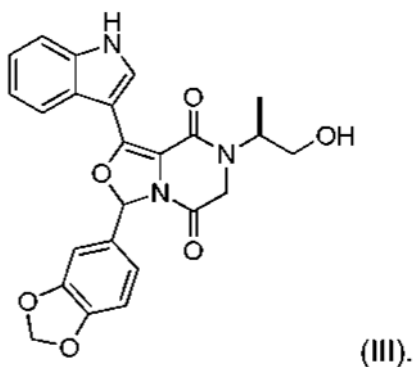
- 5
- R¹ es metileno-3,4-dioxfenilo;
 - R² es CH₂(CH₂)_nR³ o CHR⁶CH₂OH;
 - R³ es OH;
 - R⁶ es (S)-Me; y
 - n es 1;

10 o sus sales farmacéuticamente aceptables; y sus enantiómeros y/o diastereoisómeros separados en sus formas individuales y/o en las formas de mezclas racémicas o no racémicas con exceso enantiomérico en cualquier proporción.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, en donde es 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5il)-7-(2-hidroxietyl)-1-(1H-indol-3il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4 -a]pirazina-5,8-diona, representada por la fórmula (II):



15 3. Un compuesto según la reivindicación 1, en donde es 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5il)-7-((S) 1-hidroxiopropan-2il)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a] irazina-5,8-diona representado por la fórmula (III):



20 4. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde presenta actividad inhibitoria de las enzimas fosfodiesterasas.

5. Composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos definidos en la reivindicación 1 y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
6. Composiciones farmacéuticas según la reivindicación 5, comprendiendo como ingrediente activo al menos uno de los siguientes compuestos seleccionados del grupo que consiste en:
- 5 (a) 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-(2-hidroxi-etil)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona de fórmula (II),
- (b) 3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-((S)-1-hidroxi-propan-2-il)-1-(1H-indol-3-il)-6,7-dihidro-3H-oxazolo[3,4-a]pirazina-5,8-diona, de fórmula (III), o
- 10 sales farmacéuticamente aceptables, enantiómeros y/o diastereoisómeros de los compuestos separados en sus formas individuales y/o en las formas de mezclas racémicas o no racémicas con exceso enantiomérico en cualquier proporción; y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
7. Composiciones farmacéuticas según las reivindicaciones 5 a 6 para uso en administración oral, tópica, inyectable, nasal y rectal.
8. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso como un inhibidor de las enzimas fosfodiesterasas en el tratamiento de la disfunción eréctil y/o afecciones tratables mediante la relajación del tejido.
- 15 9. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en el tratamiento y/o profilaxis de la disfunción eréctil, cálculos biliares, hiperplasia prostática, hipertensión pulmonar, constricción uretral, disfunción sexual femenina y/o masculina, trastornos y/o afecciones tratables con relajación de tejidos y trastornos tratables con inhibidores de la fosfodiesterasa.
- 20 10. La composición farmacéutica según las reivindicaciones 5 o 6, o la composición farmacéutica para uso de la reivindicación 7, para uso en el tratamiento de disfunción eréctil, cálculos biliares, hiperplasia prostática, hipertensión pulmonar, constricción uretral, disfunción sexual femenina y/o masculina, trastornos y/o afecciones tratables con relajación de tejidos y trastornos tratables con inhibidores de la fosfodiesterasa.
- 25 11. Procedimiento de síntesis de los compuestos de fórmula (II) y (III), como se define en las reivindicaciones 2 y 3, en donde comprende la formación de 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-(2-cloroacetil)-5-(1H-indol-3-il)2,3-dihidrooxazol-4-carboxilato de metilo (b), preparado por reacción del compuesto ((E)-2-((benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil-eno)amino)-3-(1H-indol-3-il)-3-oxopropanoato de metilo (a) en presencia de una disolución de piridina (Py) seca en tetrahidrofurano (THF) y disolución de cloruro de cloroacetilo.
- 30 12. Procedimiento de síntesis, según la reivindicación 11, en donde la formación del compuesto (II) se produce mediante la adición de alcohol etílico y 2-aminoetanol (c) a través de la reacción del intermedio (b).
13. Procedimiento de síntesis según la reivindicación 11, en donde la formación del compuesto (III) se produce mediante la adición de alcohol etílico y (S)-2-aminopropan-1-ol (d) al medio de reacción del intermedio (b).

Figura 2

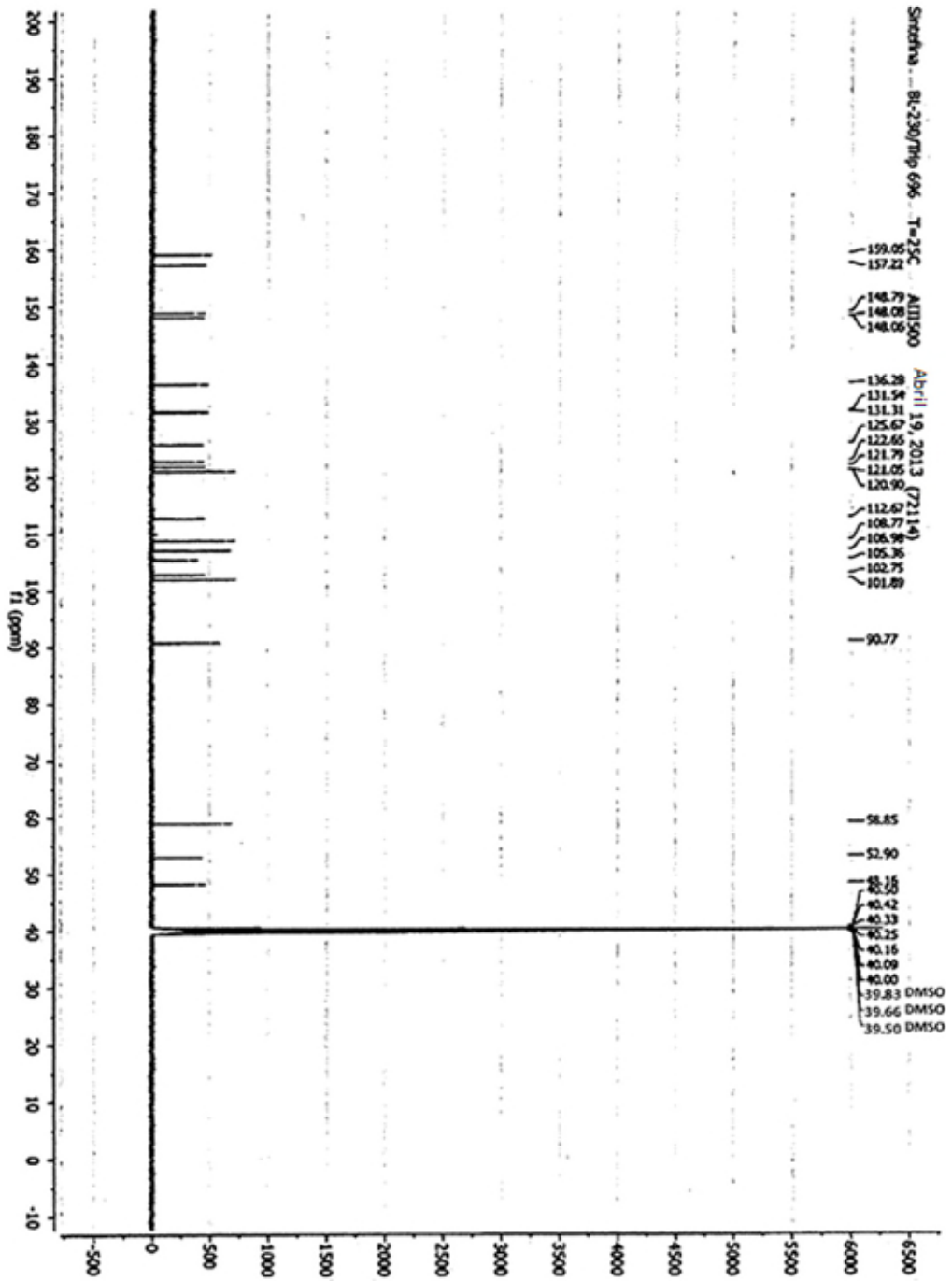


Figura 3

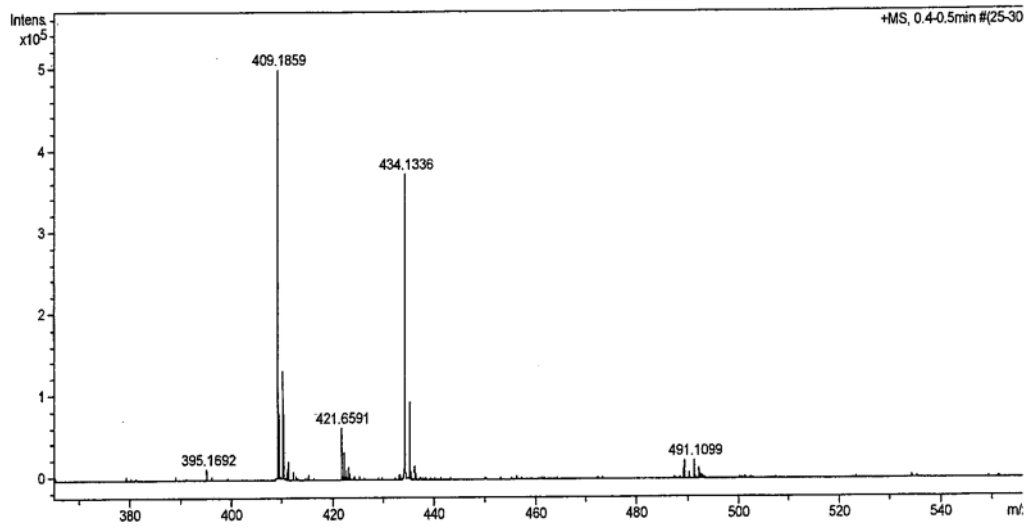


Figura 5

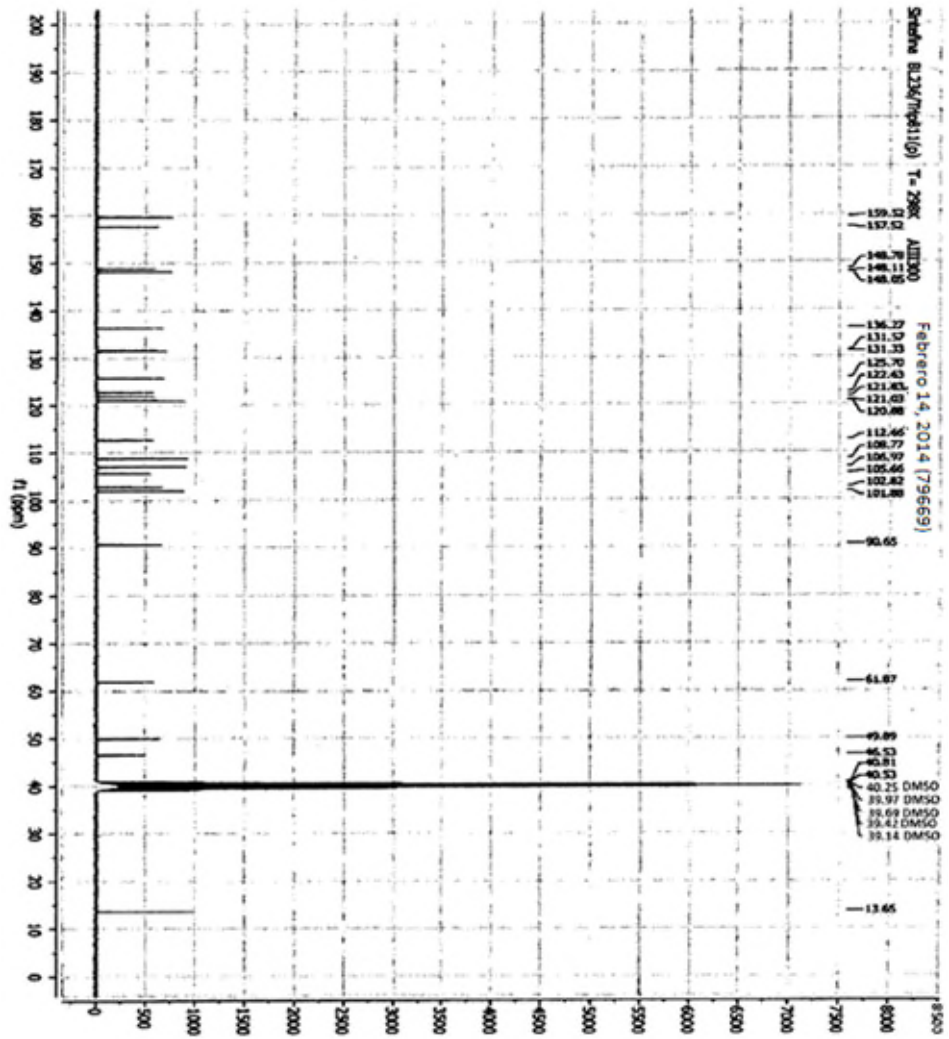


Figura 6

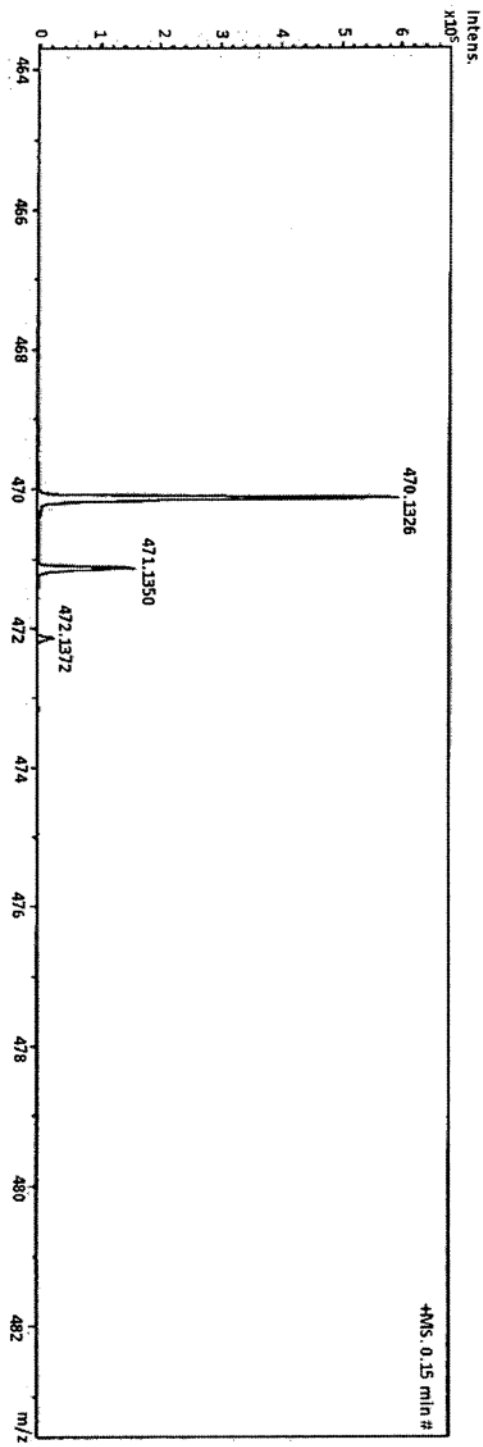


Figura 7

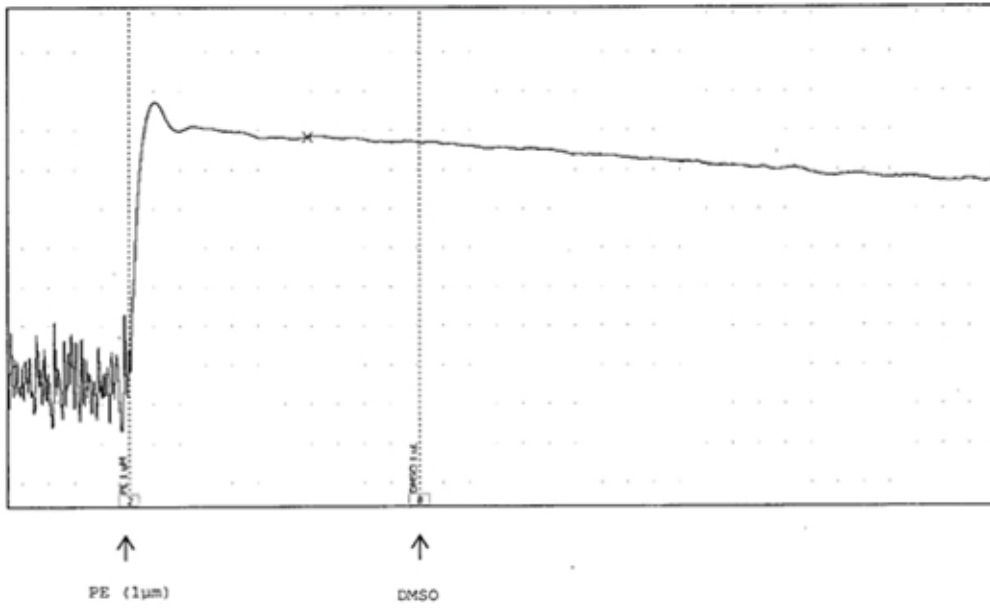


Figura 8

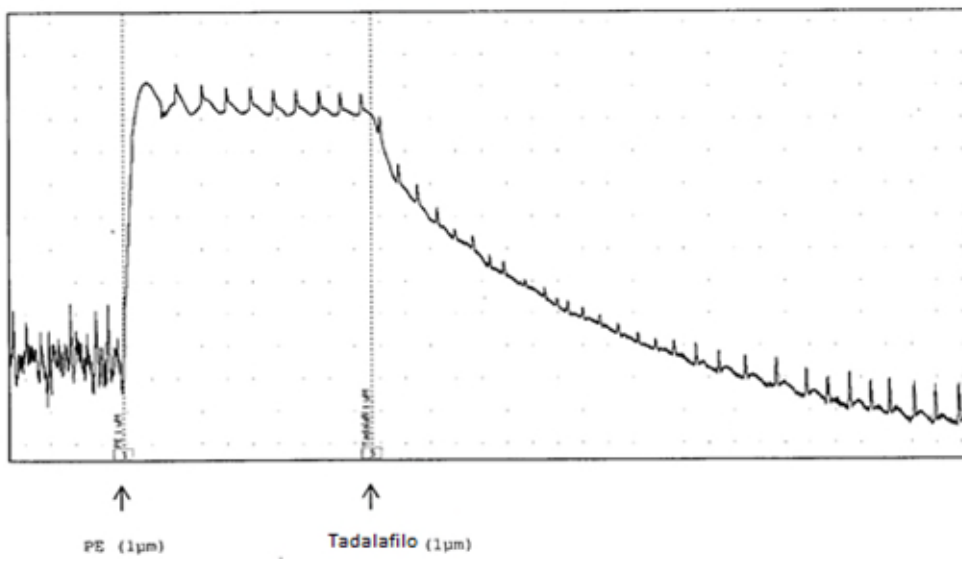


Figura 9

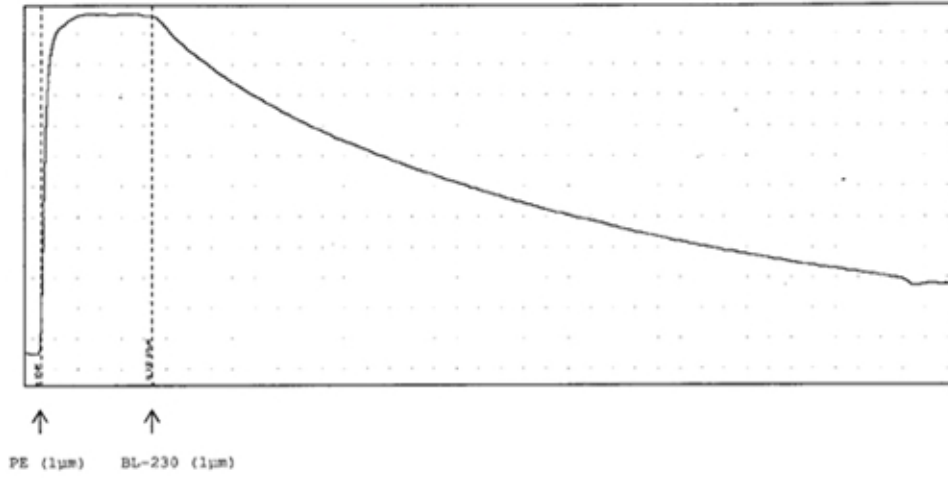


Figura 10

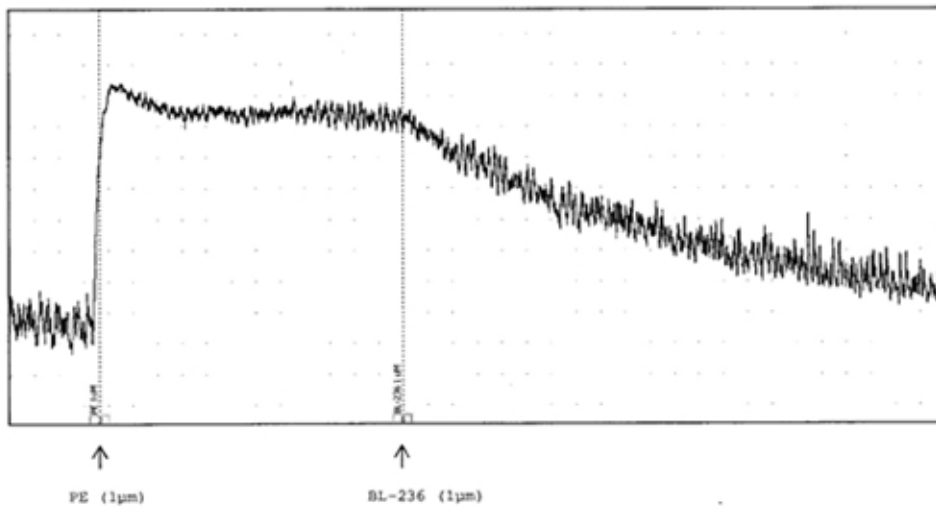


Figura 11

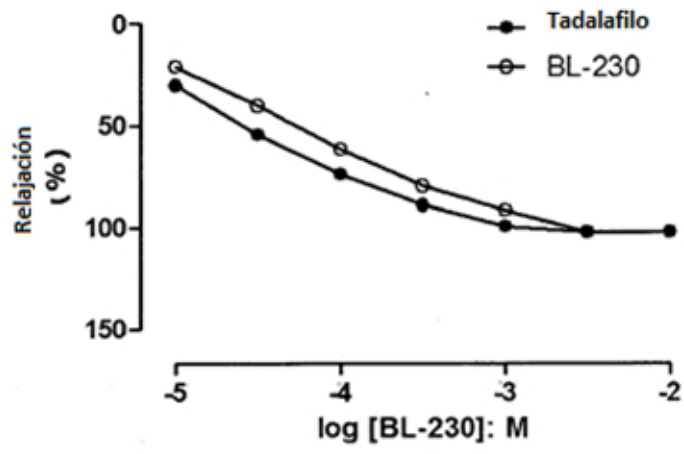


Figura 12

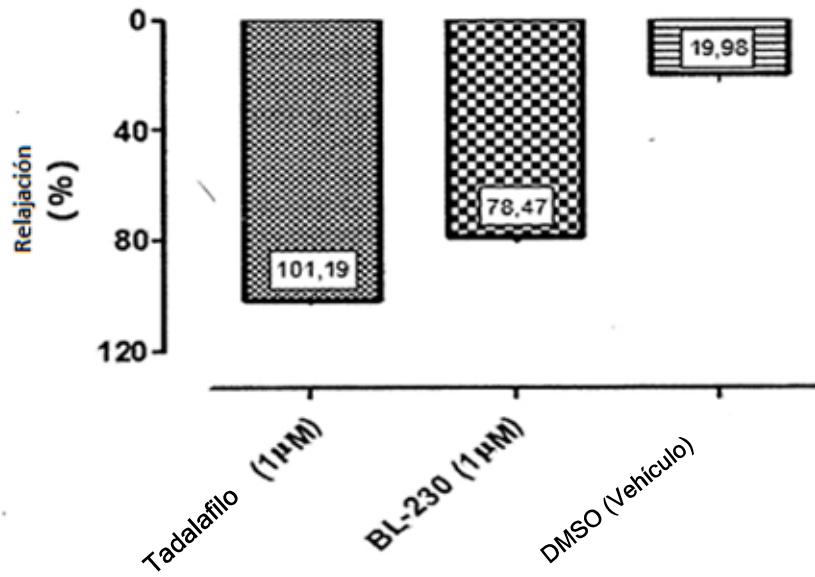


Figura 13

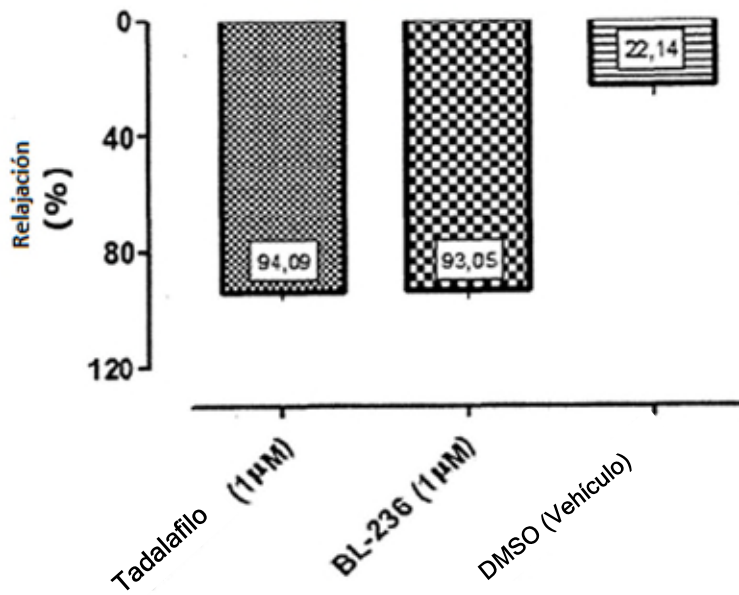


Figura 14

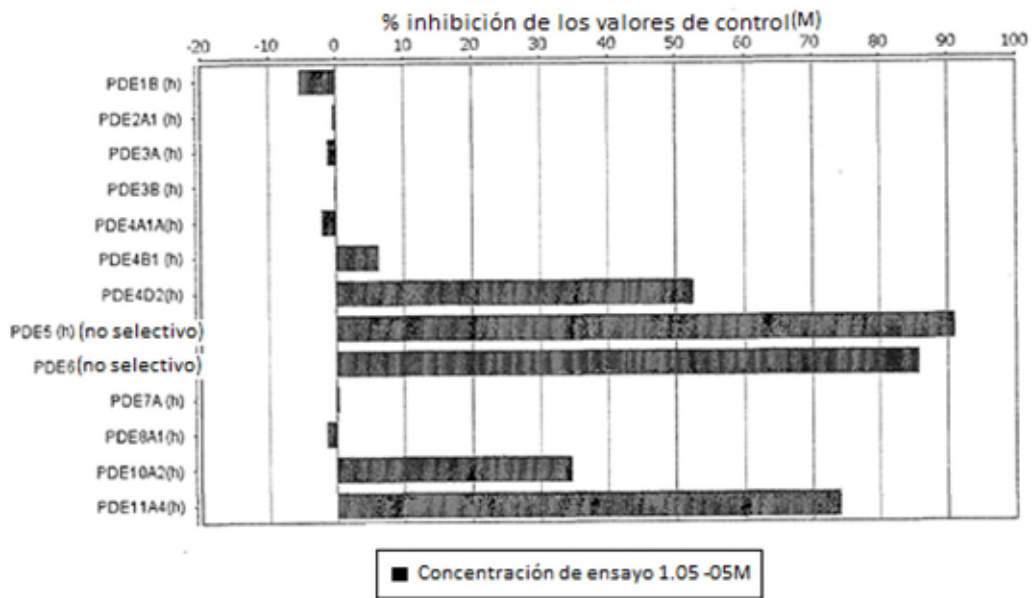


Figura 15

