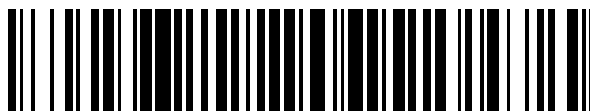


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 850**

51 Int. Cl.:

A61K 31/137 (2006.01)

A61K 31/222 (2006.01)

A61K 31/36 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2008 PCT/CA2008/000191**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2008 WO08092257**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2008 E 08706338 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 2117524**

54 Título: **Uso de catecolaminas y compuestos relacionados como agentes antiangiogénicos**

30 Prioridad:

29.01.2007 US 89781407 P

25.05.2007 US 92467407 P

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

14.04.2020

73 Titular/es:

**NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA
(100.0%)**

**1200 Montreal Road
Ottawa, ON K1A 0R6 , CA**

72 Inventor/es:

**KONISHI, YASUO;
MAGOON, JOANNE y
JARUSSOPHON, SUWATCHAI**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 753 850 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

Uso de catecolaminas y compuestos relacionados como agentes antiangiogénicos

5 Referencia cruzada a las Solicitudes Relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de las Solicitudes de Patentes Provisionales de los Estados Unidos USSN 60/897,814 presentada el 29 de enero de 2007 y USSN 60/924,674 presentada el 25 de mayo de 2007.

10 Campo de la Invención

Esta invención se refiere al uso de catecolaminas y compuestos relacionados como agentes antiangiogénicos para prevenir y/o tratar la angiogénesis y enfermedades relacionadas.

15 Antecedentes de la Invención

20 La angiogénesis es un proceso fisiológico que involucra el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes a través de la proliferación y migración de células endoteliales con la remodelación de la matriz extracelular. Es un proceso normal en el desarrollo y diferenciación de los órganos durante la embriogénesis, en la cicatrización de heridas y en el útero y el ovario. Además, está involucrada en trastornos patogénicos tales como la retinopatía diabética, el edema macular diabético, la degeneración macular relacionada con la edad, los trastornos cardíacos isquémicos, la artritis reumatoide, la psoriasis, la tumorigénesis y el crecimiento tumoral. Pandya N. M. y otros es una revisión general sobre angiogénesis.

25 De acuerdo con la Fundación de Angiogénesis, al menos 184 millones de pacientes en las naciones occidentales podrían beneficiarse de alguna forma de terapia antiangiogénica, y al menos 314 millones de alguna forma de terapia proangiogénica. Por ejemplo, la terapia antiangiogénica se aplica a todos los tumores sólidos (pulmón, mama, próstata, cáncer de colon, etc.). El mercado de las terapias antiangiogénicas es enorme, tal como lo implican los informes financieros del primer trimestre de 2007 de Ranibizumab™, que trata la degeneración macular relacionada con la edad. Ya ha sido un éxito farmacéutico de ventas en 2007 con ingresos anuales estimados de más de mil millones de dólares.

35 El mecanismo de la angiogénesis no se entiende bien; sin embargo, se han identificado varios factores que están involucrados en la angiogénesis, tales como estimuladores e inhibidores de la angiogénesis. Algunos de los factores angiogénicos son el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento transformante α , el factor de crecimiento transformante β , la angiogenina, la interleucina 8, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Entre ellos, se considera que VEGF es la citocina más importante en la angiogénesis patológica.

40 Se han desarrollado e investigado varios agentes antiangiogénicos potencialmente efectivos en estudios en animales, epidemiológicos y clínicos (Kyselova y otros, 2004). Podrían clasificarse como inhibidores del VEGF, antagonistas de los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) e inhibidores de tirosina quinasa del VEGFR. Los inhibidores de VEGF podrían ser anticuerpos monoclonales humanizados de VEGF y trampa de VEGF, la forma truncada soluble de VEGFR. Los antagonistas de VEGFR podrían ser anticuerpos monoclonales humanizados o inhibidores de molécula pequeña. Se han desarrollado varios inhibidores de molécula pequeña de los inhibidores de la tirosina quinasa VEGFR, algunos de los cuales son selectivos para VEGFR2 y/u otros VEGFR y otros se dirigen de manera menos selectiva al crecimiento del cáncer. Además, se reportó que los agonistas del receptor D2 de dopamina son agentes antiangiogénicos con mecanismo sugerido de internalización del VEGFR-2 de superficie (Basu y otros, 2001). El desarrollo de inhibidores de molécula pequeña para la angiogénesis se considera un área terapéutica importante ya que potencialmente ofrece un tratamiento a largo plazo, con significativamente menos efectos secundarios que los regímenes tradicionales de tratamiento quimioterapéutico.

55 Hay tres inhibidores específicos de VEGF en el mercado: Bevacizumab™ (Genentech & Roche), Ranibizumab™ (Genentech & Novartis) y Pegaptanib™ (Pfizer). Sin embargo, todos ellos están asociados con un alto costo, de esa manera, el desarrollo de fármacos antiangiogénicos de bajo costo es muy deseado.

60 Anteriormente nosotros informamos sobre la potente actividad antiglicosilación de catecoles, dopaminas y adrenalinas (Yeboah y otros, 2005), y su aplicación para prevenir la catarata (Mullick & Konishi, 2007). El reposicionamiento farmacológico de las adrenalinas tiene ventajas para las aplicaciones oculares tópicas, ya que la dipivefrina, un profármaco de (R,S)-adrenalina, es un fármaco comercial en colirio para tratar el glaucoma. Así, nosotros desarrollamos colirios para prevenir la retinopatía diabética basados en adrenalinas Yeboah F. y otros. El documento núm. (WO 03/032969) describe el uso de S-isoproterenol y D-isoformas de epinefrina para prevenir y tratar complicaciones oculares relacionadas con la edad y la diabetes, entre otras cosas, la retinopatía. Mullick y otros El documento núm. (WO 2007/109882) describe el S-isoproterenol, sus derivados o análogos del mismo como agente antiglicosilación para el tratamiento de la catarata diabética.

65

Uno de los compuestos principales es (S)-isoproterenol. El (S)-Isoproterenol sistémico es 200 a 1600 veces menos efectivo que el (R)-isoproterenol sobre la presión sanguínea, la frecuencia del corazón perfundido y la relajación uterina, lo que demuestra una actividad débil como agonista del adrenoceptor β (Lands y otros, 1954). El (S)-isoproterenol es un antagonista de los receptores α -adrenérgicos, ya que muestra una acción antinociceptiva, donde la acción nociceptiva es causada típicamente por agonistas del receptor α 2-adrenérgico (Bentley y Starr, 1986).

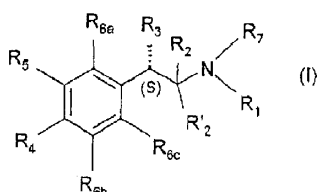
El (S)-isoproterenol se considera seguro para los humanos. La toxicidad intravenosa aguda del (S)-isoproterenol en ratones es aproximadamente la mitad de la del (R)-isoproterenol, es decir, los valores de LD₅₀ del (S)-isoproterenol y del (R)-isoproterenol fueron 113 \pm 5 mg/kg y 57 \pm 2 mg/kg. respectivamente (Lands, y otros, 1954). Además, el (S)-isoproterenol es un ingrediente inactivo del broncodilatador comercial y de los fármacos antialérgicos tópicos de (R,S)-isoproterenol. Se ha informado algunos efectos secundarios del (S)-isoproterenol solo a concentraciones extremadamente altas. El (S)-isoproterenol al 10% aplicado tópicamente en humanos causó hiperemia e irritación conjuntival leve breve y el colirio (S)-isoproterenol al 20% produjo hiperemia conjuntival marcada y miosis leve que persistió durante varias horas (Kass y otros, 1976). Sin embargo, no se observaron efectos sistémicos en la frecuencia cardíaca, la presión arterial ni en los valores químicos hematológicos o séricos, así como tampoco se observaron cambios en la necropsia en conejos, incluso con un colirio de (S)-isoproterenol al 17,6 % (Seidehamel y otros, 1975). Además, una dosis intravenosa grande de (S)-isoproterenol parecía tener solo efectos leves y transitorios sobre la presión arterial y la frecuencia del pulso (Kass y otros, 1976) Akaike A., Honda K. El documento núm. (JP09-136830) describe el uso de (\pm)-isoproterenol en el tratamiento de la retinopatía inducida por la diabetes y como agente protector de la retina para su uso en la supresión de enfermedades que causan lesiones en el tejido retiniano, entre otras cosas, la degeneración macular. Sebti S.M. en el documento núm. (US 2007/021512) describe el uso de isoproterenol racémico como agonista de B2AR para su uso en el tratamiento del cáncer y el cáncer metastásico.

Una de las formas del profármaco de (S)-isoproterenol es (S)-isoproterenol dipivalato. Aunque no se ha reportado un estudio sistémico de (S)-isoproterenol dipivalato, la mezcla racémica (R,S)-isoproterenol dipivalato (58 μ g/kg) se inyectó por vía intravenosa en perros. Produjo las mismas respuestas que las de (R,S)-isoproterenol, es decir, un gran aumento en la frecuencia cardíaca y en el gasto cardíaco, disminución marcada en la resistencia periférica total, disminución en la presión aórtica, en la presión venosa central y en la presión auricular izquierda, y sin cambios significativos en la resistencia vascular pulmonar. Estas respuestas comenzaron más lentamente y duraron más que las del (R,S)-isoproterenol. Los resultados sugieren que el (R,S)-isoproterenol dipivalato es inerte y ejerce los efectos después de que se hidroliza a (R,S)-isoproterenol (Wang, y otros, 1977).

Resumen de la invención

Sorprendentemente, ahora se ha encontrado que las catecolaminas de las isoformas (S) y compuestos relacionados que tienen configuración S en el carbono β y tienen una lipofilia mayor que (S)-noradrenalina, son antiangiogénicas. Además, también se ha encontrado que las catecolaminas, de la isoforma (S) o (R), en las que se ha modificado un grupo β -hidroxi, también son antiangiogénicas.

Así, se proporciona un compuesto de fórmula (I)



una sal fisiológicamente tolerada del mismo o cualquier mezcla del mismo, que tenga una pureza óptica del 97 % o mayor, para usar como agente antiangiogénico para tratar o prevenir el edema macular diabético, la degeneración macular relacionada con la edad o la metástasis, en donde

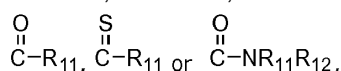
R₁ representa un C₁₋₁₀ grupo alquilo,

R₇ representa H, un C₁₋₁₀ grupo alquilo, un C₃₋₁₀ grupo cicloalquilo o un C₁₋₁₀ grupo acilo derivado de un ácido alifático o ácido aromático,

R₂ y R'₂ ambos representan H,

R₃ representa OH,

R₄ y R₅ cada uno representa independientemente OY, NHY o SY, en donde Y representa H,



en donde R₁₁ y R₁₂ cada uno representa independientemente H, un C₁₋₁₀ grupo alquilo o un C₃₋₁₀ grupo cicloalquilo,

R_{6a}, R_{6b} y R_{6c} cada uno representa H,

(S) representa un centro quiral que define una configuración (S) del compuesto,

cada C₁₋₁₀ grupo alquilo, C₃₋₁₀ grupo cicloalquilo, C₁₋₁₀ grupo acilo, C₃₋₈ el grupo heterocíclico que contiene nitrógeno incluye independientemente o no incluye uno o más heteroátomos N, O S, y está independientemente no sustituido o sustituido con uno o más C₆₋₁₀ grupos arilo, C₆₋₁₈ grupos alcarilo o C₆₋₁₈ grupos aralquilo.

R₇ preferentemente representa H. R₁ representa un C₁₋₁₀ grupo alquilo. R₂ y R'₂ ambos representan H. R₄ y R₅ preferentemente cada uno representa independientemente OY, y cada Y preferentemente representa independientemente H, pivaloilo, acetilo, propionilo, butanoilo, isobutanoilo, pentanoilo, 2-butenilo, ciclopropanoilo, ciclohexanoilo, benzoilo, 4-metilbenzoilo, 4-nitrobenzoilo, fenacetilo, 4-metilfenacetilo, metoxiacetilo, o *N,N*-dimetilamida. Con mayor preferencia R₄ y R₅ cada uno representa OY, y cada Y representa H o pivaloilo. Y es con la máxima preferencia H. Los grupos alquilo que se mencionan en la presente descripción pueden ser lineales o ramificados.

Para los compuestos de fórmula (I), el compuesto es preferentemente (S)-isoproterenol, (S)-*N*-etilnoradrenalina, (S)-*N*-*terc*-butilnoradrenalina, (S)-*N*-*n*-butilnoradrenalina, (S)-*N*-*n*-propilnoradrenalina, 1-(3,4-dihidroxifenil)-2-(isopropilamino)-1(S)-butanol. Aún más preferentemente, el compuesto es (S)-isoproterenol.

Para los agentes antiangiogénicos basados en compuestos de fórmula (I), la pureza óptica del compuesto depende del compuesto específico. La contaminación del isómero (R) debe ser lo suficientemente baja de manera que la actividad antiangiogénica del isómero (S) exceda cualquier actividad angiogénica del correspondiente isómero (R). El agente antiangiogénico tiene una pureza óptica del 97 % o más, preferentemente del 99 % o más, con mayor preferencia del 99,9 % o más, y aún más preferentemente del 99,99 % o más. Para aplicaciones tópicas, la pureza óptica es 97 % peso/peso o mayor, preferentemente 99,9 % o mayor, mientras que para aplicaciones sistémicas, la pureza óptica es preferentemente 99,9 % peso/peso o mayor, con mayor preferencia 99,99 % o mayor. La alta pureza aumenta el efecto antiangiogénico del agente antiangiogénico y reduce los posibles efectos agonistas del receptor β₂-adrenérgico de la impureza de la isoforma (R) en usos a corto y/o largo plazo. Además, los agonistas de los receptores β₂-adrenérgicos son generalmente angiogénicos (Thaker y otros, 2006), lo que sería contraproducente para los efectos antiangiogénicos del isómero (S) usado en la presente invención.

Los ejemplos de sales toleradas fisiológicamente incluyen, pero no se limitan a, hidrocloreuro, bitartrato, acetato, carbonato, tanato, sulfato, estearato y citrato. Se prefiere la forma de hidrocloreuro.

Los agentes antiangiogénicos activos pueden formularse en composiciones aceptables farmacológicamente. Además del agente antiangiogénico activo descrito en la presente descripción, las composiciones pueden comprender, además, uno o más ingredientes tolerados farmacológicamente, por ejemplo, vehículos (por ejemplo, solventes), tampones, agentes de ajuste de la viscosidad, surfactantes, antioxidantes, conservantes, lubricantes, agentes de ajuste de osmolaridad, aglutinantes, deslizantes, antiadherentes, diluyentes, agentes edulcorantes, colorantes, saborizantes, otros agentes activos farmacológicamente o mezclas de los mismos.

Las composiciones para la administración ocular tópica pueden formularse en cualquier forma de dosificación adecuada para administración oftálmica tópica, tales como soluciones, suspensiones o emulsiones. De ellas, se prefieren las soluciones oftálmicas acuosas. Además del agente antiangiogénico, las composiciones pueden contener aditivos y excipientes oftálmicos habituales, tales como conservantes antimicrobianos, agentes que aumentan la viscosidad, con el fin de aumentar la retención de los fármacos y profármacos, agentes amortiguadores, agentes de ajuste de la osmolaridad, surfactantes, antioxidantes o mezclas de los mismos, si es necesario o apropiado. El tratamiento ocular tópico puede ser, pero no se limita a, colirio o inyección intravítrea. Además puede aplicarse por otros métodos, tales como inmersión de lentes de contacto blandas, lo que puede reducir la concentración efectiva de los fármacos o profármacos con larga duración.

Las composiciones para administración sistémica pueden ser, pero no se limitan a, administración oral, inhalación, administración sublingual, inyección intradérmica, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intravenosa, infusiones intraóseas o inyecciones de depósito. Además del agente antiangiogénico activo, los ingredientes aceptables farmacológicamente incluyen, pero no se limitan a, medios de dispersión, aglutinantes, diluyentes, lubricantes, antiadherentes, deslizantes, desintegrantes, conservantes, sabores, antioxidantes, edulcorantes, colorantes, saborizantes o mezclas de los mismos.

La actividad antiangiogénica in vitro se demuestra a una concentración inferior a aproximadamente 100 μM, especialmente inferior a aproximadamente 50 μM, más especialmente inferior a aproximadamente 30 μM. Una dosis con eficacia terapéutica para prevenir/retrasar/tratar la angiogénesis y la invasión celular, es preferentemente de aproximadamente 0,01 a 10 % peso/volumen, especialmente preferentemente de 0,01 a 5 % peso/volumen, particularmente de 0,01 a 1 % peso/volumen, y especialmente de 0,1 a 0,5 % peso/volumen para aplicación tópica. El agente antiangiogénico activo puede formularse en forma de dosificación unitaria. Por ejemplo, en las formulaciones de colirios, la dosis unitaria es preferentemente de 5-200 μL, más particularmente de 10-100 μL, especialmente de 30-50 μL, en donde aproximadamente 50 μL es un volumen típico de cada gota, es decir, 200 μL y 100 μL corresponden a 4 y 2 gotas para los ojos en cada dosis. Algunos colirios comerciales recomiendan 2 a 3 gotas en cada dosis. Para aplicaciones de tratamiento sistémico, la cantidad que se administra puede estar en un intervalo de aproximadamente 0,1 a 500 mg/kg/día, por ejemplo 1 a 200 mg/kg/día, particularmente 50 a 100 mg/kg/día. Los expertos en la técnica determinan fácilmente la dosis más efectiva para un régimen particular.

El uso de un agente antiangiogénico de acuerdo con la presente invención permite el tratamiento y/o la prevención de varios estados patológicos, es decir, retinopatía diabética, edema macular diabético, degeneración macular relacionada

con la edad y/o metástasis. Se prefieren los mamíferos, por ejemplo, humanos, ratas, conejos, perros, gatos, caballos, vacas, cobayos y ratones.

5 Se describirán características adicionales de la invención o serán evidentes en el curso de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

10 Para que la invención se entienda más claramente, las modalidades de la misma se describirán ahora en detalle a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales:

15 Figura 1. Inhibición *in vitro* de la formación de tubos capilares de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) por (S)-isoproterenol. Las HUVEC se cultivaron en medio EBM-2 durante 22 horas a 37 °C en Matrigel en presencia de las concentraciones indicadas (1-50 µM) de (S)-isoproterenol. El control representa la condición sin (S)-isoproterenol agregado al medio.

20 Figura 2A y 2B. La actividad antiangiogénica del (S)-isoproterenol y sus análogos se midió mediante ensayo en Matrigel *in vitro* de formación de tubo capilar de células endoteliales. Las HUVEC se cultivaron en Matrigel™ en ausencia (control) y en presencia de dopamina, (S)-noradrenalina, (S)-N-etilnoradrenalina, (R,S)-isoproterenol, (S)-isoproterenol, (R)-isoproterenol, (S)-N-propilnoradrenalina, (S)-N-n-butilnoradrenalina, (R,S)-N-terc-butilnoradrenalina, isoetarina, (S)-O-metilisoproterenol, y (R)-O-metilisoproterenol cuyas concentraciones se ajustaron a 20 µM. Después de 22 horas de incubación, se fotografiaron dos campos microscópicos seleccionados al azar para cada cultivo celular. Mediante el uso del software gratuito ImageJ™ se midió la longitud total de las estructuras tubulares de las HUVEC en cada fotografía y se normalizó con la del cultivo control. Los datos del total de seis fotografías de tres experimentos independientes se promediaron con desviación estándar. Figura 2A Los datos del total de seis fotografías de tres experimentos independientes se promediaron con desviación estándar. Figura 2B Se muestran algunas de las fotografías usadas en el análisis.

30 Figura 3. Competencia de (S)-isoproterenol con (R)-isoproterenol en la formación de tubo capilar *in vitro*. Las HUVEC se cultivaron en Matrigel™ en presencia de varias proporciones de (S)-isoproterenol y (R)-isoproterenol, donde la concentración total de isoproterenol se mantuvo a 20 µM. Después de 22 horas de incubación, se fotografiaron dos campos microscópicos seleccionados al azar para cada cultivo celular. Mediante el uso del software gratuito ImageJ™ se midió la longitud total de las estructuras tubulares en cada fotografía y se normalizó con la del cultivo de control, que no contiene isoproterenol. Los datos del total de seis fotografías de tres experimentos independientes se promediaron con desviación estándar.

40 Figura 4. La actividad antiinvasión de (S)-isoproterenol y sus análogos, así como el antagonista del receptor β-adrenérgico propranolol, se midió por la invasión de HUVEC a través de un filtro recubierto con Matrigel y se normalizó con el valor control de HUVEC sin ningún compuesto de prueba agregado. Los valores son el promedio y la desviación estándar de un total de cuatro fotografías de dos experimentos independientes.

45 Figura 5. Peso corporal promedio de las ratas durante el período del experimento. Se pesaron semanalmente ratas normales (diamante relleno) o diabéticas (cuadrados rellenos) que recibieron vehículo (A) o colirio de (S)-isoproterenol dipivalato (B).

50 Figura 6. La glicosilación cuantitativa de los capilares retinianos como las densidades de los capilares glicosilados en fluorescencia roja se normalizan por la densidad capilar retiniana total en ratas no diabéticas, ratas diabéticas con vehículo y ratas diabéticas con tratamiento de colirio de (S)-isoproterenol dipivalato al 0,1 %. Los valores de P son 0,052 y 0,068 para las ratas no diabéticas versus ratas diabéticas con vehículo y ratas diabéticas con tratamiento de (S)-isoproterenol dipivalato frente a ratas diabéticas con vehículo, respectivamente. Cabe señalar que los capilares acelulares, que están enriquecidos en la retina diabética sin tratamiento de (S)-isoproterenol dipivalato, es probable que estén altamente glicosilados y reducirían aún más los valores anteriores de P. "n" es el número de ojos usados en el análisis.

55 Figura 7. Estructuras químicas de algunos compuestos útiles en la presente invención.

Figura 8. Estructuras químicas de algunos grupos protectores de los grupos dihidroxilo aromáticos de los compuestos de la presente invención.

60 Figura 9. Estructuras químicas de algunos profármacos útiles en la presente invención.

Figura 10. La actividad antiangiogénica de (S)-isoproterenol y algunos de sus profármacos se midió mediante el ensayo en Matrigel de formación de tubos capilares de células endoteliales *in vitro*. Las HUVEC se cultivaron en Matrigel™ en ausencia (control) y en presencia de (S)-isoproterenol, (S)-isoproterenol dipivalato, (S)-isoproterenol diisobutirato, (S)-isoproterenol dibenzoilato y (S)-isoproterenol ditoluoilato, cuyas concentraciones se ajustaron a 20 µM. Después de 22 h de incubación, se fotografiaron dos campos microscópicos seleccionados al azar para cada cultivo celular. Mediante el

uso del software gratuito ImageJ™ se midió la longitud total de las estructuras tubulares de las HUVEC en cada fotografía y se normalizó con la del cultivo control. Se muestran los datos promediados con desviación estándar.

Descripción de las modalidades preferidas

5

Materiales y Métodos:

10

15

20

Compuestos químicos: (S)-isoproterenol L-bitartrato, (S)-noradrenalina L-bitartrato, D-manitol, cloruro de benzalconio, cloruro de pivaloilo (cloruro de trimetilacetilo), yodoetano, 1-yodopropano, 1-yodobutano, borohidruro de sodio, trifluorometanosulfonato de metilo, 2-cloro-3,4-dihidroxiacetofenona 1,4-dioxano, cloruro de p-toluilo, sulfato disódico, clorobutanol, ácido aminocaproico, perclorato de sodio, [Glu¹]-fibrinopéptido B, (R)-isoproterenol hidrocloreto, mesilato de isoetarina, di-*terc*-butil dicarbonato, trietilamina, cloruro de acetilo, 2-propanol, dimetilformamida, *terc*-butilamina, cloruro de isobutirilo, cloruro de benzoilo, cloruro de cetilpiridinio y povidona (K30) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canadá). La acetona, el cloruro de metileno, el acetato de etilo, el ácido acético glacial, el carbonato disódico, el cloruro de sodio y el NaOH fueron de EMD Science (Gibbstown, Nueva Jersey, EE. UU.). El edetato disódico, el ácido trifluoroacético (TFA) y el agua se compraron de J. T. Baker (Phillipsburg, Nueva Jersey, EE. UU.). Se obtuvo HCl 1,0 M de VWR (Montreal, Quebec, Canadá). El agua para espectrometría de masa se adquirió de Anachemia (Lachine, QC, Canadá). El ácido fórmico se adquirió de Riedel de Haën (Oakville, Ontario, Canadá). El acetonitrilo y el hexano eran de Fisher Scientific (Nepean, Ontario, Canadá). La resina AG® 4-X4, la malla 100-200, forma de base libre se adquirió de BIO-RAD Laboratories, Inc (Hercules, CA, EE. UU.). Todos los solventes se usaron sin purificación adicional.

25

El trifluoroacetato de cetilpiridinio se preparó a partir de cloruro de cetilpiridinio. A una solución de trifluoroacetato de sodio en metanol se le añadió ácido trifluoroacético. La solución metanólica resultante de TFA-Na se añadió luego gota a gota a la solución de cloruro de cetilpiridinio en etanol con agitación. Después de 30 minutos, el NaCl precipitado se eliminó por filtración y se evaporó con un evaporador rotativo (< 40 °C). El residuo se disolvió en diclorometano y los componentes insolubles se eliminaron por filtración. Después de la evaporación, se añadió *terc*-butanol y se liofilizó para obtener un cristal blanco.

30

El acetato de cetilpiridinio se preparó a partir de cloruro de cetilpiridinio. El cloruro de cetilpiridinio se disolvió en metanol y se añadieron ácido acético y acetato de sodio. Después de evaporar el solvente, el residuo se disolvió en cloruro de metileno, el acetato de cetilpiridinio fue soluble en cloruro de metileno, mientras que el cloruro de sodio se precipitó y se eliminó por filtración. El solvente se evaporó y la ausencia de iones cloruro se confirmó ya que no se formó precipitado cuando se añadió solución de nitrato de plata al producto.

35

Síntesis de (S)-noradrenalina dipivalato hidrocloreto:

Este compuesto se usa en la síntesis de (S)-*N*-etilnoradrenalina hidrocloreto, (S)-*N*-propilnoradrenalina hidrocloreto, y (S)-*N*-butilnoradrenalina hidrocloreto.

40

(S)-*N*-Boc-noradrenalina

45

A una solución de (S)-noradrenalina bitartrato (3,83 g, 12 mmol) en 100 mL de tetrahidrofurano (THF)-agua (1: 1 volumen/volumen) se añadió bicarbonato de sodio (3,3 g, 40 mmol) y se agitó vigorosamente. Luego se añadió Di-*terc*-dicarbonato de butilo (2,9 g, 13,2 mmol) en THF (10 mL) gota a gota a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas. El producto (S)-*N*-Boc-noradrenalina se extrajo tres veces con 50 mL de diclorometano (DCM). El extracto combinado se lavó con agua (50 mL) y salmuera (50 mL). La solución producto se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y luego se evaporó hasta sequedad, lo que rindió el producto deseado. El producto mostró más del 95 % de pureza basado en el perfil de HPLC (una HPLC analítica Waters (Waters SymmetryShield™ 3,5 µm; columna de fase inversa C18 4,6 × 50 mm). Se usó un gradiente de acetonitrilo al 10-90 % en agua, ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 %, durante 9 minutos a una velocidad de flujo de 2 mL/min (sistema A). El producto se usó en lo adelante sin purificación.

50

C₁₃H₁₉NO₅; sólido blanco; Rt = 4,9 min (sistema A). HRMS: calculado para [M + H]⁺ = 270,1341, encontrado = 270,1342. ESI-MS/MS (energía de colisión (CE) = 2): m/z (% de intensidad relativa): 270 (M+H⁺, 94), 252 (100), 214 (1,3), 196 (51). NMR: ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 6,80 (s, 1H), 6,73 (d, J=8 Hz, 1H), 6,67 (d, J=7 Hz, 1H), 4,54 (dd(br), J=5, 7 Hz, 1H), 3,24 (dd, J=5, 13 Hz, 1H), 3,16 (dd, J=7, 14 Hz, 1H), 1,43 (s, 9H).

55

(S)-*N*-Boc-noradrenalina dipivalato

60

A una mezcla de (S)-*N*-Boc-noradrenalina (3,0 g, 11 mmol) y trietilamina (5 mL, 36 mmol) en DCM (100 mL) se añadió lentamente cloruro de pivaloilo (2,9 mL, 24 mmol) a 0 °C bajo nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a 0 °C y después durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla se lavó con agua (50 mL), se secó sobre sulfato sódico, y se concentró. La cromatografía en columna de silicagel (mediante el uso de un gradiente de 20-40 % de acetato de etilo/hexano) proporcionó un producto puro (2,40 g, 46 % de rendimiento de (S)-noradrenalina bitartrato) como un líquido viscoso.

65

C₂₃H₃₅NO₇; líquido viscoso; Rt = 9,0 min (sistema A). HRMS: calculado para [M+H]⁺ = 438,2492, encontrado = 438,2482. ESI-MS/MS (CE = 2): m/z (% de intensidad relativa): 438 (M+H⁺, 100), 420 (2,3), 382 (86). NMR: ¹H NMR (500 MHz,

CD₃OD): δ 7,29 (d, J=7 Hz, 1H), 7,17 (s, 1H), 7,14 (d, J=9 Hz, 1H), 4,74 (t(br), J=8 Hz, 1H), 3,28 (dd, 1H), 3,22 (dd, J=8, 15 Hz, 1H), 1,44 (s, 9H), 1,36 (s, 9H), 1,34 (s, 9H).

(S)-noradrenalina dipivalato hidrocloreuro

5

A una solución de (S)-N-Boc-noradrenalina dipivalato (2,4 g, 5,5 mmol) en metanol seco (100 mL) se añadió gota a gota cloruro de acetilo (8 mL, 110 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a 0 °C y luego a temperatura ambiente. La reacción se monitoreó mediante TLC. Después de completar la reacción (3 horas), el solvente se evaporó bajo presión reducida y el producto se purificó por cromatografía de desplazamiento de alto rendimiento (HPDC) (TFA/agua al 0,1%, 4 g/L de trifluoroacetato de cetilpiridinio como eluyente). El producto se utilizó, además, en las preparaciones de (S)-N-etilnoradrenalina dipivalato hidrocloreuro, (S)-N-propilnoradrenalina dipivalato hidrocloreuro, y (S)-N-butilnoradrenalina dipivalato hidrocloreuro, como se describe a continuación.

10

C₁₈H₂₈NO₅Cl; sólido blanco; Rt = 6,0 min (sistema A). HRMS: calculado para [C₁₈H₂₇NO₅+H⁺] = 338,1967, encontrado = 338,1983. ESI-MS/MS (CE = 13): m/z (% de intensidad relativa): 338 (M+H⁺, 5,9), 320 (100), 236 (26). NMR: ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7,36 (dd, J=2, 8 Hz, 1H), 7,27 (d, J=2 Hz, 1H), 7,20 (d, J=8 Hz, 1H), 4,94 (dd, J=4, 9 Hz, 1H), 3,20 (dd, J=4, 13 Hz, 1H), 3,04 (dd, J=9, 13 Hz, 1H), 1,36 (s, 9H), 1,35 (s, 9H).

15

Síntesis de (S)-N-etilnoradrenalina hidrocloreuro:

20

(S)-N-etilnoradrenalina dipivalato hidrocloreuro (Profármaco)

A una solución de (S)-noradrenalina dipivalato hidrocloreuro (0,37 g, 1,0 mmol) y trietilamina (0,4 mL, 3,0 mmol) en 10 mL de dimetilformamida (DMF) seca, se le añadió yodoetano (0,12 mL, 1,5 mmol). La mezcla de reacción se agitó por 24 horas a temperatura ambiente bajo nitrógeno y se liofilizó. La mezcla se recogió en acetato de etilo (30 mL) y se extrajo con tampón NaH₂PO₃ (4 x 20 mL, pH 3). La capa orgánica se extrajo nuevamente con agua (3 x 20 mL). Los extractos de tampón combinados y los extractos de agua se ajustaron a pH 11 mediante el uso de NaOH 1,0 N y se extrajeron con acetato de etilo (3 x 20 mL). La capa orgánica separada se lavó, además, con agua (20 mL) y salmuera (20 mL), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. La mezcla bruta se purificó por HPDC (TFA/agua al 0,1 %, trifluoroacetato de cetilpiridinio 4 g/L como eluyente). El compuesto aislado se trató con un exceso de HCl 1,0 N y se liofilizó para dar un producto sólido de monoetilación (0,11 g, rendimiento del 27 %).

25

30

C₂₀H₃₂NO₅Cl (mono-etilación); sólido blanco; Rt = 6,2 min (sistema A). HRMS: calculado para [C₂₀H₃₁NO₅+H⁺] = 366,2280, encontrado = 366,2268. ESI-MS/MS (CE = 15): m/z (% de intensidad relativa): 366 (M+H⁺, 55), 348 (100), 264 (24). NMR: ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7,37 (dd, J=2, 8 Hz, 1H), 7,27 (d, J=2 Hz, 1H), 7,20 (d, J=8 Hz, 1H), 4,98 (dd, J=3,10 Hz, 1H), 3,24 (dd, J=3, 13 Hz, 1H), 3,12 (m, 3H), 1,36 (s, 9H), 1,35 (s, 9H), 1,34 (t, J=7Hz, 3H).
(S)-N-etilnoradrenalina hidrocloreuro

35

A una solución de (S)-N-etilnoradrenalina dipivalato hidrocloreuro (50 mg, 125 μmol) en metanol seco (3 mL) se añadió un exceso de borohidruro de sodio sólido y la mezcla de reacción se controló por HPLC hasta que no quedó material de partida sin reaccionar. El solvente se evaporó hasta la sequedad para dar un sólido blanco. La mezcla cruda se purificó por HPLC preparativa mediante el uso de TFA/agua al 0,1 % como eluyente. El residuo se trató con exceso de HCl 1,0 N y se liofilizó para dar el producto deseado como un sólido blanco (22 mg, 76 % de rendimiento).

40

C₁₀H₁₆NO₃Cl: sólido blanco; Rt = 0,53 min (sistema A). HRMS: calculado para [C₁₀H₁₅NO₃+H⁺] = 198,1130, encontrado = 198,1128. ESI-MS/MS (CE = 8): m/z (% relative intensity): 198 (M+H⁺, 48), 180 (100). NMR: ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 8,99 (s(br), 1H), 8,96 (s(br), 1H), 6,79 (s, 1H), 6,72 (d, J=8 Hz, 1H), 6,61 (d, J=9 Hz, 1H), 5,92 (s(br), 1H), 4,77 (d, J=10 Hz, 1H), 2,94 (m(br), 3H), 2,87 (t, J=12 Hz, 1H), 1,21 (t, J=7 Hz, 3H).

45

Síntesis de (S)-N-propilnoredrenalina hidrocloreuro:

50

(S)-N-propilnoradrenalina dipivalato hidrocloreuro (Profármaco)

A una mezcla de (S)-noradrenalina dipivalato hidrocloreuro (0,37 g, 1,0 mmol) y trietilamina (0,4 mL, 3,0 mmol) en DMF seco (10 mL) se añadió yodopropano (0,15 mL, 1,5 mmol) y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente bajo nitrógeno. La mezcla resultante se liofilizó. La mezcla se recogió en acetato de etilo (30 mL) y se extrajo con tampón NaH₂PO₃ (4 x 20 mL, pH 3). La capa orgánica se extrajo nuevamente con agua (3 x 20 mL). Los extractos de tampón combinados y los extractos de agua se ajustaron a pH 11 mediante el uso de NaOH 1,0 N y se extrajeron con acetato de etilo (3 x 20 mL). La capa orgánica separada se lavó, además, con agua (20 mL) y salmuera (20 mL), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. La mezcla bruta se purificó por HPDC (TFA/agua al 0,1 %, trifluoroacetato de cetilpiridinio 4 g/L como eluyente). El compuesto aislado se trató con un exceso de HCl 1,0 N y se liofilizó para dar un producto sólido (0,09 g, 22 % de rendimiento)

55

60

C₂₁H₃₄NO₅Cl; sólido blanco; Rt = 6,4 min (sistema A). HRMS: calculado para [C₂₁H₃₃NO₅+H⁺] = 380,2437, encontrado = 380,2421. ESI-MS/MS (CE = 15): m/z (% de intensidad relativa): 380 (M+H⁺, 78), 362 (100), 278 (20), 250 (0,9). NMR: ¹H

65

NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7,38 (d, J=8 Hz, 1H), 7,28 (s, 1H), 7,20 (d, J=8 Hz, 1H), 5,01 (dd, J=3,10 Hz, 1H), 3,26 (d, J=13 Hz, 1H), 3,14 (t, J=10 Hz, 1H), 3,03 (t, J=8 Hz, 2H), 1,76 (m(br), 2H), 1,36 (s, 9H), 1,35 (s, 9H), 1,04 (t, J=7 Hz, 3H).
(S)-N-propilnoradrenalina hidrocloreuro

5 A una solución de (S)-N-propilnoradrenalina dipivalato hidrocloreuro (40 mg, 96 μmol) en metanol seco (3 mL) se añadió un exceso de borohidruro de sodio sólido y la mezcla de reacción se controló por HPLC hasta que no quedó material de partida sin reaccionar. El solvente se evaporó hasta la sequedad para dar un sólido blanco. La mezcla cruda se purificó por HPLC preparativa mediante el uso de TFA/agua al 0,1% como eluyente. El residuo se trató con un exceso de HCl 1,0 N y se liofilizó para dar el producto deseado como un sólido blanco (15 mg, rendimiento del 63 %).

10 C₁₁H₁₈NO₃Cl; sólido blanco; Rt = 0,57 min (sistema A). HRMS: calculado para [C₁₁H₁₇NO₃+H⁺] = 212,1286, encontrado = 212,1280. ESI-MS/MS (CE = 8): m/z (% de intensidad relativa): 212 (M+H⁺, 63), 194 (100). NMR: 1H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 8,96 (s(br), 1H), 8,93 (s(br), 1H), 6,78 (s, 1H), 6,72 (d, J=8 Hz, 1H), 6,62 (d, J=9 Hz, 1H), 5,93 (d(br), J=3 Hz, 1H), 4,76 (d, J=9 Hz, 1H), 2,99 (m(br), 1H), 2,87 (m(br), 2H), 2,72 (m(br), 1H), 1,65 (m, 2H), 0,89 (m, 3H).

15 Síntesis de (S)-N-butilnoradrenalina hidrocloreuro:

(S)-N-butilnoradrenalina dipivalato (Profármaco)

20 A una mezcla de (S)-noradrenalina dipivalato hidrocloreuro (0,56 g, 1,5 mmol) y trietilamina (0,6 mL, 4,5 mmol) en DMF seco (15 mL) se añadió yodobutano (0,26 mL, 2,25 mmol) y se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 24 horas. La mezcla resultante se liofilizó. La mezcla se recogió en acetato de etilo (40 mL) y se extrajo con tampón NaH₂PO₃ (4 x 20 mL, pH 3). La capa orgánica se extrajo nuevamente con agua (3 x 20 mL). Los extractos combinados de tampón y los extractos de agua se ajustaron a pH 11 mediante el uso de NaOH 1,0 N y se extrajeron con acetato de etilo (3 x 20 mL). La capa orgánica separada se lavó, además, con agua (20 mL) y salmuera (20 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró. La mezcla bruta se purificó por HPDC (TFA/agua al 0,1 %, trifluoroacetato de cetilpiridinio 4 g/L como eluyente). El compuesto aislado se trató con un exceso de HCl 1,0 N y se liofilizó para dar un producto sólido (0,22 g, 34 % de rendimiento).

30 C₂₂H₃₆NO₅Cl; sólido blanco; Rt = 6,7 min (sistema A). HRMS: calculado para [C₂₂H₃₅NO₅+H⁺] = 394,2593, encontrado = 394,2582. ESI-MS/MS (CE = 15): m/z (% de intensidad relativa): 394 (M+H⁺, 100), 376 (34), 292 (4). NMR: 1H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7,37 (dd, J=2, 8 Hz, 1H), 7,28 (d, J=2 Hz, 1H), 7,21 (d, J=8 Hz, 1H), 5,00 (dd, J=3,10 Hz, 1H), 3,25 (dd, J=3, 12 Hz, 1H), 3,14 (dd, J=10, 12 Hz, 1H), 3,06 (t, J=8 Hz, 2H), 1,71 (m(br), 2H), 1,46 (m, 2H), 1,36 (s, 9H), 1,35 (s, 9H), 1,01 (t, J=7 Hz, 3H).

35 (S)-N-butilnoradrenalina hidrocloreuro

40 A una solución de (S)-N-butilnoradrenalina dipivalato hidrocloreuro (50 mg, 120 μmol) en metanol seco (3 mL) se añadió un exceso de borohidruro de sodio sólido y la mezcla de reacción se controló por HPLC hasta que no quedó material de partida sin reaccionar. El solvente se evaporó hasta la sequedad para dar un sólido blanco. Al sólido se le añadieron THF (10 mL) y solución saturada de NaCl (10 mL) y se extrajeron con THF (4 x 15 mL). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron, y se secaron *al vacío*. El residuo se trató con exceso de HCl 1,0 N y se liofilizó para dar el producto deseado como un sólido blanco (25 mg, 80 % de rendimiento).

45 C₁₂H₂₀NO₃Cl; sólido blanco; Rt = 0,84 min (sistema A). HRMS: calculado para [C₁₂H₁₉NO₃+H⁺] = 226,1443, encontrado = 226,1437. ESI-MS/MS (CE = 8): m/z (% de intensidad relativa): 226 (M+H⁺, 78), 208 (100). NMR: 1H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 8,95 (s(br), 1H), 8,93 (s(br), 1H), 6,78 (d, J=2 Hz, 1H), 6,72 (d, J=9 Hz, 1H), 6,62 (dd, J=2, 9 Hz, 1H), 5,93 (d(br), J=3 Hz, 1H), 4,75 (d, J=9 Hz, 1H), 2,99 (dd, J=3, 13 Hz, 1H), 2,89 (m, 3H), 1,61 (m, 2H), 1,31 (m, 2H), 0,89 (t, J=8 Hz, 3H).

50 Síntesis de (R)-O-metilisoproterenol hidrocloreuro:

55 A una solución de (R)-isoproterenol hidrocloreuro (123,6 mg, 0,5 mmol) en metanol (5 mL) se le añadió trifluorometanosulfonato de metilo (220 μl, 2,0 mmol) a temperatura ambiente y se agitó durante toda la noche. Después de agregar otro trifluorometanosulfonato de metilo (220 μl, 2,0 mmol), la solución se agitó nuevamente durante toda la noche. El solvente se eliminó mediante el uso de un evaporador. Luego, el residuo se purificó por HPLC preparativa (Vydac C18, columna de 5 x 25 cm, solvente isocrático (TFA al 0,1 % en acetónitrilo/agua al 5 %), velocidad de flujo 20 mL/min). El producto purificado se trató con HCl 0,05 N (10 mL) y se liofilizó para dar (R)-O-metilisoproterenol hidrocloreuro (62,3 mg 0,24 mmol, 48 % de rendimiento) como un sólido marrón pálido.

60 C₁₂H₂₀NO₃Cl; sólido marrón pálido; Rt = 4,6 min (sistema B). HRMS: calculado para [C₁₂H₁₉NO₃+H⁺] = 226,1443, encontrado = 226,1440. ESI-MS/MS (CE = 10): m/z (% de intensidad relativa): 226 (M+H⁺, 23), 194 (100). NMR: 1H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 6,79 (m, 2H), 6,69 (dd, J=3, 8 Hz, 1H), 4,34 (dd(br), J=3, 10 Hz, 1H), 3,40 (sept. J= 6 Hz, 1H), 3,23 (s, 3H), 3,04-3,16 (m, 2H), 1,34 (d, J=6 Hz, 3H), 1,32 (d, J= 6 Hz, 3H).

65 Síntesis de (S)-O-metilisoproterenol hidrocloreuro:

- A una solución de (S)-isoproterenol bitartrato (361 mg, 1,0 mmol) en metanol (1 mL), se le añadió lentamente trifluorometanosulfonato de metilo (1 mL, 8,0 mmol) a temperatura ambiente y se agitó durante 4 horas. El solvente se eliminó rápidamente mediante el uso de un evaporador y luego el producto se purificó por HPLC preparativa (Vydac C18, columna de 5 x 25 cm, elución en gradiente (0-40 %, acetonitrilo/agua (TFA al 0,1 %) con velocidad de flujo de 20 mL/min).
- 5 El compuesto purificado se trató con HCl 0,1 N (10 mL) y se liofilizó para dar (S)-O-metilisoproterenol hidrocloreto como un sólido blanco. El producto se analizó mediante una HPLC analítica Waters (Waters SymmetryShield™ de 3,5 µm; columna de fase inversa C18 de 4,6 x 50 mm). Se usó un gradiente de acetonitrilo al 0-90 % en agua, ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 %, durante 12 minutos a una velocidad de flujo de 2 mL/min (sistema B).
- 10 C₁₂H₂₀NO₃Cl; sólido blanco; Rt = 4,6 min (sistema B). HRMS: calculado para [C₁₂H₁₉NO₃+H⁺] = 226,1443, encontrado = 226,1432. ESI-MS/MS (CE = 10): m/z (% de intensidad relativa): 226 (M+H⁺, 17), 194 (100). NMR: 1H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 6,75 (m (br), 2H), 6,64 (d (br), J=6 Hz, 1H), 4,33 (d (br), J=8 Hz, 1H), 3,36 (m(br), 1H), 3,19 (s, 3H), 3,00-3,12 (m, 2H), 1,29 (t(br), J=7 Hz, 6H).
- 15 Síntesis de (R, S)-N-terc-butilnoradrenalina:
- ω-terc-butilamino-3,4-dihidroxiacetofenona hidrocloreto
- A una solución de ω-cloro-3,4-dihidroxiacetofenona (5 g, 26,8 mmol) en dioxano (10 mL), se le añadió terc-butilamina (8,4 mL, 80 mmol) y se agitó durante 3 horas a 70-80 °C. La reacción se controló por HPLC hasta que no quedó material de partida sin reaccionar. Al producto base de aminocetona se le añadió HCl al 10 %. Después de enfriar durante toda la noche a temperatura ambiente, el sólido se filtró, se lavó con acetona y se secó para dar hidrocloreto de aminocetona (5,62 g, 81 % de rendimiento; p.f. 233-235 °C).
- 20
- 25 N-terc-butil-noradrenalina
- A una solución agitada de ω-terc-butilamino-3,4-dihidroxiacetofenona hidrocloreto (900 mg, 3,5 mmol) en metanol (20 mL), se añadió lentamente NaBH₄ (266 mg, 7 mmol) a temperatura ambiente. La reacción se controló por HPLC hasta que no quedó material de partida sin reaccionar (4 horas). El solvente se evaporó y, además, se liofilizó el producto, para dar una base libre bruta (1,32 g). La base libre bruta (500 mg) se disolvió en 2,5 mL de agua y se ajustó a pH 9-10 con HCl al 10 %. Después de la filtración, la solución marrón resultante se eluyó con metanol/agua al 40 % en cromatografía en columna RP-18, Las fracciones recogidas se combinaron y se secaron al vacío para obtener un producto marrón, que se sometió a cromatografía en columna de resina AG® 4-X4 (malla 100-200) mediante el uso de agua pura como eluyente. Después de la liofilización, se obtuvo N-terc-butil-noradrenalina pura como un cristal amarillento.
- 30
- 35 C₁₂H₁₈NO₃; cristal amarillento; Rt = 4,5 min (sistema B). HRMS: calculado para [C₁₂H₁₉NO₃+H⁺] = 226,1443, encontrado = 226,1432. ESI-MS/MS (CE = 10): m/z (% de intensidad relativa): 226 (M+H⁺, 100), 208 (60), 152 (9). NMR: 1H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 6,63 (d, J=2 Hz, 1H), 6,50-6,60 (m, 2H), 4,66 (t, J=7 Hz, 1H), 3,00 (d, J=7 Hz, 2H), 1,33 (s, 9H).
- 40 Síntesis de (S)-isoproterenol diisobutirato (Profármaco)
- (S)-N-Boc-isoproterenol
- A una solución de (S)-isoproterenol bitartrato (1,0 g, 3 mmol) en DMF (15 mL), se le añadió trietilamina (1,25 mL, 9 mmol) y Boc₂O (0,67 g, 3 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó vigorosamente durante toda la noche y la reacción se controló por HPLC. El material se extrajo con DCM (3 x 50 mL). El extracto combinado se lavó con agua (3 x 50 mL), y salmuera (50 mL) y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El residuo resultante se evaporó hasta la sequedad para obtener 0,96 g de un sólido marrón pálido. El producto se usó sin purificación adicional.
- 45
- 50 (S)-N-Boc-isoproterenol diisobutirato
- A una mezcla de (S)-N-Boc-isoproterenol (0,96 g, 3 mmol) y trietilamina (0,98 mL, 7 mmol) en DCM (10 mL) se le añadió gota a gota cloruro de isobutirilo (0,65 mL, 6 mmol) durante 10 minutos a 0 °C bajo nitrógeno y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El material crudo se extrajo con DCM (3 x 50 mL), se lavó con agua (3 x 50 mL) y salmuera (50 mL) y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. La solución resultante se evaporó hasta la sequedad para proporcionar (S)-N-Boc-isoproterenol diisobutirato como un cristal blanco (1,2 g), que se utilizó sin purificación adicional.
- 55
- (S)-isoproterenol diisobutirato hidrocloreto
- A una solución de (S)-N-Boc-isoproterenol diisobutirato (1,2 g, 2,6 mmol) en isopropanol (10 mL), se añadió cloruro de acetilo (1,88 mL, 26 mmol) a 0 °C y se agitó durante 1,5 horas a temperatura ambiente. La reacción se controló por HPLC. Después de eliminar el solvente, el producto (S)-isoproterenol diisobutirato se purificó por HPDC (TFA/agua al 0,1 %, trifluoroacetato de cetilpiridinio 4 g/L como eluyente) para proporcionar 319 mg (rendimiento global del 32 %).
- 60
- 65 C₁₉H₃₀NO₅Cl; sólido blanco; Rt = 5,8 min (sistema A). HRMS: calculado para [C₁₉H₂₉NO₅+H⁺] = 352,2124, encontrado = 352,2119. NMR: 1H NMR (CD₃OD): δ 7,40 (d, J=8 Hz, 1H), 7,34 (brs, 1H), 7,24 (d, J=8 Hz, 1H), 5,02 (dd, J=3, 11 Hz, 1H),

3,47 (m, 1H), 3,25 (dd, J=3, 12 Hz, 1H), 3,13 (dd, J=10, 12 Hz, 1H), 2,83 (m, 2H), 1,37 (d, J=7 Hz, 6H), 1,30 (d, J=3 Hz, 12 H).

Síntesis de (S)-isoproterenol dibenzoilato (Profármaco):

5

(S)-N-Boc-isoproterenol

10

A una solución de (S)-isoproterenol bitartrato (1,0 g, 3 mmol) en DMF 15 mL, se añadieron trietilamina (1,25 mL, 9 mmol) y Boc₂O (0,67 g, 3 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó vigorosamente durante toda la noche y la reacción se controló por HPLC. El producto se extrajo con DCM (3 x 50 mL), se lavó con agua (3 x 50 mL) y salmuera (50 mL) y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El residuo, además, se evaporó hasta la sequedad para obtener 0,85 g de un sólido marrón pálido. El producto se usó sin purificación adicional.

15

(S)-N-Boc-isoproterenol dibenzoilato

20

A una mezcla de (S)-N-Boc-isoproterenol (0,85 g, 2,7 mmol) en DCM (10 mL) y trietilamina (0,89 mL, 6,4 mmol) se le añadió gota a gota cloruro de benzoilo (0,63 mL, 5,4 mmol) durante 10 minutos a 0 °C bajo nitrógeno y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El producto se extrajo con DCM (3 x 50 mL), se lavó con agua (3 x 50 mL) y salmuera (50 mL) y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. La solución resultante se evaporó hasta la sequedad, para obtener (S)-N-Boc-isoproterenol dibenzoilato como un cristal blanco (1,43 g).

(S)-isoproterenol dibenzoilato

25

A una solución de (S)-N-Boc-isoproterenol dibenzoilato (1,43 g) en isopropanol (10 mL) se añadió cloruro de acetilo (2,01 mL, 28 mmol) a 0 °C y se agitó durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Después de eliminar el solvente, el (S)-isoproterenol dibenzoilato deseado se purificó por HPDC (TFA/H₂O al 0,1 %, trifluoroacetato de cetilpiridinio 4 g/L como eluyente) para producir 806 mg (rendimiento global del 64 %).

30

C₂₅H₂₆NO₅Cl; sólido blanco: Rt = 6,3 min (sistema A). HRMS: calculado para [C₂₅H₂₅NO₅+H⁺] = 420,1811, encontrado = 420,1815. NMR: ¹H NMR (CD₃OD): δ 8,03 (m, 4H), 7,63 (m, 2H), 7,60 (d, J=6,6 Hz, 1H), 7,49 (d, J=7,8 Hz, 1H), 7,49 (brs, 1H), 7,44 (m, 4H), 5,14 (dd, J=3, 10 Hz, 1H), 3,53 (m, 1H), 3,33 (dd, J=16,6 Hz, 1H), 3,21 (dd, J=10, 12 Hz, 1H), 1,41 (d, J=6,7 Hz, 6H).

35

Síntesis de (S)-isoproterenol ditoluoilato (Profármaco):

(S)-N-Boc-isoproterenol

40

A una solución de (S)-isoproterenol bitartrato (1,0 g, 3 mmol) en DMF 15 mL, se añadieron trietilamina (1,25 mL, 9 mmol) y Boc₂O (0,67 g, 3 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó vigorosamente durante toda la noche, y la reacción se controló por HPLC. Se extrajo (S)-N-Boc-isoproterenol con DCM (3 x 50 mL), se lavó con agua (3 x 50 mL) y salmuera (50 mL) y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El solvente se evaporó hasta la sequedad para obtener 0,91 g de un sólido marrón pálido.

45

(S)-N-Boc-isoproterenol ditoluoilato

50

A una mezcla de (S)-N-Boc-isoproterenol (0,91 g, 2,9 mmol) en DCM (10 mL) y trietilamina (0,94 mL, 6,8 mmol) se le añadió gota a gota cloruro de toluoilo (0,77 mL, 5,4 mmol) durante 10 min a 0 °C bajo nitrógeno y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El producto se extrajo con DCM (3 x 50 mL), se lavó con agua (3 x 50 mL) y salmuera (50 mL) y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. La solución se evaporó hasta la sequedad para proporcionar (S)-N-Boc-isoproterenol ditoluoilato como un cristal blanco (1,52 g).

(S)-isoproterenol ditoluoilato

55

A una solución de (S)-N-Boc-isoproterenol ditoluoilato (1,52 g) en isopropanol (10 mL) se le añadió cloruro de acetilo (2,04 mL, 28 mmol) a 0 °C y se agitó durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Después de eliminar el solvente, el (S)-isoproterenol ditoluoilato deseado se purificó por HPDC (0,1 % TFA/H₂O, trifluoroacetato de cetilpiridinio 4 g/L como eluyente) para proporcionar 715 mg (55 % de rendimiento total),

60

C₂₇H₃₀NO₅Cl; sólido blanco: Rt = 6,8 min (sistema A). HRMS: calculado para [C₂₇H₂₉NO₅+H⁺] = 448,2124, encontrado = 448,2109. NMR: ¹H NMR (CD₃OD): δ 7,89 (d, J=8 Hz, 4H), 7,53 (d, J=8 Hz, 1H), 7,50 (d, J=8 Hz, 1H), 7,45 (brs, 1H), 7,24 (d, J=7 Hz, 4H), 5,06 (dd, J=3, 10 Hz, 1H), 3,49 (m, 1H), 3,31 (dd, J=10 Hz, 1H), 3,19 (dd, J=10, 13 Hz, 1H), 2,38 (s, 6H), 1,38 (d, J=7 Hz, 6H).

65

Síntesis de dipivalato de isoetarina hidroclicloro (Profármaco):

- 5 A una solución de mesilato de isoetarina (1,68 g, 5 mmol) en acetona (25 mL) se le añadió NaOH 1,0 N (25 mL, 25 mmol) a temperatura ambiente y se agitó durante 10 segundos, a lo que siguió la adición de cloruro de pivaloilo (2,47 mL, 20 mmol) en una porción. La solución de la reacción se agitó durante 15 segundos adicionales y luego se enfrió con HCl 1,0 N (20 mL). El producto se extrajo con DCM (3 x 100 mL), se lavó con bicarbonato de sodio al 10 % (100 mL) y salmuera (50 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró *al vacío*. El producto crudo se purificó por HPDC (TFA/agua al 0,1 %, trifluoroacetato de cetilpiridinio 4 g/L como eluyente) para obtener un sólido blanco (1,0 g, rendimiento del 45 %).
- 10 $C_{23}H_{38}NO_5Cl$; sólido blanco; Rt = 6,6 min (sistema A). HRMS: calculado para $[C_{23}H_{37}NO_5+H^+]$ = 408,2750, encontrado = 408,2732. ESI-MS/MS (CE = 15): m/z (% de intensidad relativa): 408 (M+H⁺, 100), 390 (16), 348 (0,8), 306 (2,3). NMR: ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7,39 (dd, J=2, 9 Hz, 1H), 7,32 (d, J=2 Hz, 1H), 7,21 (d, J=9 Hz, 1H), 5,17 (d, J=4 Hz, 1H), 3,60 (sept, J=6 Hz, 1H), 3,42 (m, 1H), 1,69 (m, 1H), 1,59 (m, 1H), 1,44 (s, 3H), 1,43 (s, 3H), 1,36 (s, 9H), 1,35 (s, 9H), 0,87 (t, J=7 Hz, 3H).
- 15 Se examinó la pureza del (S)-isoproterenol dipivalato hidrocloreuro por el sistema analítico de HPLC Waters (controlador 600-MS, bomba 600E, inyector automático 717, detector de matriz de fotodiodos 996). La pureza óptica de (S)-isoproterenol bitartrato y de (S)-isoproterenol dipivalato hidrocloreuro se examinó mediante el uso de otro sistema de HPLC Waters (controlador 600, bomba 600E, inyector automático 717, un detector de matriz de fotodiodo d2996). La cromatografía de desplazamiento de alto rendimiento (HPDC) también se llevó a cabo mediante el uso del último sistema.
- 20 Los espectros de RMN se midieron por Bruker Avance 500 MHz RMN. Los espectros de masa de alta resolución se midieron con MicroMass Waters Q-ToF *Última*[™] Espectrómetro de masas GLOBAL (Mississauga, Ont, Canadá) con NanoLockspray ([Glu¹]-fibrinopéptido B como compuesto de referencia).
- 25 Las HUVEC se adquirieron de Cedarlane Laboratories (Burlington, Canadá) y se mantuvieron en medio basal de células endoteliales-2 (EBM-2) suplementado con una mezcla de factores de crecimiento EGM-2 (Clonetics) y suero bovino fetal al 2 %. Las células se cultivaron a 37 °C bajo una mezcla humidificada de aire y CO₂ al 95 %/5 % (volumen/volumen).
- 30 Los ensayos de formación de tubos de células endoteliales en Matrigel se realizaron mediante el uso de BD Matrigel[™] (Becton, Dickinson). El BD Matrigel[™] se descongeló a 4 °C, y rápidamente se añadieron 150 µL a cada pocillo de una placa de 48 pocillos y se dejó solidificar durante 60 minutos a 37 °C. Se sembraron células HUVEC (7 × 10⁴ células/mL) en medio basal EC 2 (EBM-2) a 250 µl por pocillo sobre la superficie del BD Matrigel[™] sólido en presencia de los compuestos a analizar. Las células se incubaron durante 22 horas a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5 %. La formación de tubos se controló mediante el uso de un microscopio invertido Leitz Labovert (Leitz, Wetzlar, Alemania). Se fotografiaron dos campos microscópicos seleccionados al azar con una cámara digital (Nikon, COOLPICKS 995). La longitud total de las estructuras tubulares en cada fotografía se midió mediante el uso del software gratuito ImageJ[™] (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) y se normalizó con respecto al control sin compuesto de prueba. Cada valor informado representa el promedio del total de seis fotografías de tres experimentos independientes.
- 35 La invasión de células endoteliales se midió mediante el uso de cámaras de invasión en Matrigel[™] con factor de crecimiento reducido BD BioCoat[™] (Beckton-Dickinson; tamaño de poro de 8 mm). Se colocó medio EBM-2 (500 µl en cada uno) en los pocillos inferiores. Las HUVEC (2,5 × 10⁴) en medio libre de suero EBM-2 (500 µL) se sembraron en cada uno de los pocillos superiores y se incubaron en presencia de un compuesto de prueba. A las HUVEC se les permitió migrar durante 36 horas a 37 °C en una atmósfera de 95 % de aire/5% de CO₂. Las HUVEC que permanecieron en la superficie superior del filtro se eliminaron con un bastoncillo de algodón. Las HUVEC que habían migrado a la superficie inferior de los filtros se fijaron con metanol, se tiñeron con cristal violeta al 0,1 %/metanol al 20 % (volumen/volumen) y se examinaron mediante el uso de un microscopio invertido Leitz Labovert (Leitz, Wetzlar, Alemania) después de montarlas en una lámina portaobjetos. Se capturaron digitalmente tres campos microscópicos seleccionados al azar mediante el uso de una cámara digital Nikon COOLPICKS[™] 995 y se contó directamente el número de HUVEC en cada fotografía. Cada valor informado representa el promedio y la desviación estándar de un total de cuatro fotografías de dos experimentos independientes.
- 40 El (S)-isoproterenol dipivalato hidrocloreuro que se usó en el estudio en animales se sintetizó a partir de (S)-isoproterenol bitartrato. Se añadió cloruro de pivaloilo (cloruro de trimetilacetilo) (4,1 mmol, 500 mL) a una solución de (S)-isoproterenol bitartrato (1,0 mmol, 361,3 mg) en NaOH 1,0 N al 50 % en agua/acetona (5,5 mL/5,5 mL). La mezcla se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. La solución se acidificó a pH 3-5 con HCl 1,0 N. Después de lavar con *n*-hexano (Fisher; Nepean, Ontario, Canadá), la solución se extrajo con DCM. La capa orgánica se lavó con Na₂CO₃ al 10% en solución acuosa, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía de desplazamiento de alto rendimiento (columna; Shiseido Capcell[™] PAK C18 AQ 5 µm; 250 × 4,6 mm; acetato de cetilpiridinio 4,0 mg/mL, ácido acético al 0,1% en agua, velocidad de flujo; 1,0 mL/min). El producto se eluyó por un desplazador, acetato de cetilpiridinio 4,0 mg/mL, ácido acético 0,1% en agua. Después del intercambio de sal con HCl 0,1 N y liofilización, el (S)-isoproterenol dipivalato hidrocloreuro se obtuvo con 32 ± 4 % de rendimiento y 97,2 ± 0,7 % de pureza basado en la cuantificación de las impurezas que se describe a continuación.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65 $C_{21}H_{34}NO_5Cl$; sólido blanco; Rt = 6,6 min (sistema A). HRMS: calculado para $[C_{21}H_{33}NO_5+H^+]$ = 380,2437, encontrado = 380,2426. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7,33 (dd, 7,2, 1,9 Hz, 1H), 7,24 (d, 1,9 Hz, 1H), 7,15 (d, 7,2 Hz, 1H), 4,96 (dd,

9,9, 3,1 Hz, 1H), 3,40 (m, 1H.), 3,18 (dd, 12,3, 3,1 Hz, 1H), 3,07 (dd, 12,62, 9,9 Hz, 1H), 1,32 (d, 7,0 Hz, 6H), 1,30 (s, 9H), 1,29 (s, 9H).

5 Los isómeros ópticos de (S)-isoproterenol bitartrato y de (S)-isoproterenol dipivalato hidrocloreuro se separaron por HPLC mediante el uso de una columna de CD-Ph quiral Shiseido (250 × 4,6 mm; 5 µm; isocrático 60:40 de perclorato de sodio 0,5 M/agua y acetonitrilo; velocidad de flujo, 1,0 mL/min). El perfil de elución se controló mediante la absorción a 223 nm para isoproterenol bitartrato y 264 nm para isoproterenol dipivalato hidrocloreuro. Las impurezas ópticas se cuantificaron mediante la absorbancia a 223 nm para el isoproterenol bitartrato y 264 nm para el isoproterenol dipivalato y mediante el uso de un software para ajuste de curvas TABLECurve2D (Systat). Las impurezas de (R)-isoproterenol bitartrato y de (R)-isoproterenol dipivalato hidrocloreuro se estimaron en $2,0 \pm 0,3$ % y $3,3 \pm 0,2$ %, respectivamente. Así, la racemización inducida durante la síntesis y la purificación fue mínima, si ocurriera.

15 El (S)-isoproterenol hidrocloreuro y el (S)-isoproterenol dipivalato hidrocloreuro que se usan en los estudios *in vitro* tienen una pureza óptica del 99,9 % o superior.

20 *Estudios in vivo*: El (S)-isoproterenol dipivalato hidrocloreuro se usó para estudiar la retinopatía diabética en un modelo de rata. Otra ventaja de las adrenalinas es la formulación, es decir, el colirio comercial dipivefrina es un profármaco de (R,S)-adrenalina. Es más lipofílico que la adrenalina, aún es soluble en agua y estable en solución para colirios. La adrenalina se libera cuando pasa a través de la córnea, y el ácido piválico, la forma escindida del grupo de bloqueo, tiene un amplio margen de seguridad, incluso en administraciones orales grandes. La dipivefrina mejora la absorción ocular 17 veces mejor que la adrenalina, lo que permite reducir la cantidad de la dosis y los posibles efectos secundarios (Mandell y otros, 1978). La misma formulación de profármaco se aplicó con éxito al isoproterenol (Hussain y Truelove, 1975). Así, se examinó el efecto del (S)-isoproterenol dipivalato hidrocloreuro formulado sobre la retinopatía diabética con modelo de rata.

25 El ingrediente activo en el colirio es (S)-isoproterenol dipivalato hidrocloreuro al 0,10 % (peso/volumen), y los ingredientes inactivos son D-manitol 1,84 % (peso/volumen), edetato disódico 0,005 % (peso/volumen), clorobutanol 0,10 % (peso/volumen), ácido ε-aminocaproico 0,16 % (peso/volumen), cloruro de sodio al 0,5 % (peso/volumen), cloruro de benzalconio al 0,003 % (peso/volumen) y povidona al 0,20 % (peso/volumen). El pH del colirio se ajustó a 5,5 con HCl 1,0 N. El colirio control tiene los mismos ingredientes inactivos, pero carece del ingrediente activo. El colirio se preparó fresco cada mes y se almacenó a 4 °C. No se detectó degradación de los gradientes activos ni de los inactivos en función de sus perfiles de HPLC después de un mes de almacenamiento a 4 °C. El volumen de cada gota fue de 50 µl.

35 La prevención de la retinopatía diabética por colirio de (S)-isoproterenol dipivalato se estudió con un modelo de rata. Se adquirieron ratas macho Sprague-Dawley de dos meses de edad procedentes de Charles River, Canadá. Se alojaron en las instalaciones de animales del Instituto de Investigación de Biotecnología (BRI). El alojamiento y todas las manipulaciones experimentales fueron aprobadas por el Comité de Cuidado Animal del BRI que funciona bajo las pautas del Consejo Canadiense de Cuidado Animal. La diabetes se indujo en ratas macho Sprague-Dawley que pesaban aproximadamente 200 a 250 g mediante una inyección intraperitoneal única de la toxina de células beta, Estreptozotocina (STZ) (Sigma, St. Louis, MI), a una dosis de 60 mg/kg de peso corporal en tampón citrato 0,1 M a pH 4,5. Las ratas control no diabéticas recibieron solo tampón citrato.

40 Una semana después de la inducción de diabetes, se determinaron los niveles de glucosa en la muestra de sangre de la vena de la cola mediante el uso de un sistema de monitoreo de glucosa en sangre (Ascensia ELITE Blood Glucose Meter, Bayer Inc, Toronto, ON, Canadá). Como el límite de detección del medidor de glucosa en sangre fue de 33 mM, a cualquier valor por encima se le asignó un valor máximo de 35 mM. En el estudio se retuvieron solo los animales con niveles de glucosa en sangre superiores a 15 mM. Así, los animales se asignaron a uno de cuatro grupos: Grupo I (n ~ 20): Ratas no diabéticas que reciben vehículo; Grupo II (n ~ 20): Ratas no diabéticas que reciben colirio que contiene (S)-isoproterenol dipivalato; Grupo III (n ~ 20): Ratas diabéticas que reciben vehículo; Grupo IV (n ~ 20): Ratas diabéticas que reciben colirio que contiene (S)-isoproterenol dipivalato.

50 Los colirios o los vehículos se administraron dos veces al día, siete días a la semana, en la córnea de los diferentes grupos de ratas, con un intervalo mínimo de 7 horas entre los dos tratamientos. Para promover la ganancia en peso y limitar la hiperglucemia, a las ratas diabéticas se les inyectó por vía subcutánea 2 UI de insulina ultralenta (Humulin, Eli Lilly, Toronto, ON, Canadá) tres veces por semana. Los pesos de los animales se controlaron cada semana.

55 Los efectos de (S)-isoproterenol sobre la retinopatía diabética se estudiaron mediante la tinción de los capilares retinianos con anticuerpos contra la lectina. Se analizó la densidad capilar en el centro de la retina, correspondiente a la mácula del ojo humano.

60 La diabetes induce glicosilación en la retina. Como (S)-isoproterenol es un potente agente antiglicosilación, la penetración de (S)-isoproterenol reduce la glicosilación en los capilares diabéticos de la retina. Así, las retinas que se tiñeron con anticuerpos contra lectina, también se tiñeron con anticuerpos contra albúmina de suero bovino glicosilada, y se analizó el grado de glicosilación de los capilares retinianos.

65 Resultados:

La actividad antiangiogénica de las catecolaminas y compuestos relacionados se midió mediante la inhibición de la formación de tubos capilares de HUVEC en un ensayo en Matrigel (Figura 1). La potencia de (S)-isoproterenol es de alrededor de 10 μ M bajo la condición de ensayo angiogénico que se usó en la Figura 1. Como la dopamina mostró una potencia comparable en el mismo ensayo (Figura 2A) y mostró una actividad antiangiogénica efectiva a 1 μ M (Basu y otros, 2001), la potencia *in vivo* de (S)-isoproterenol podría ser inferior a 10 μ M.

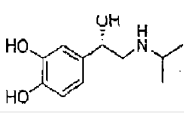
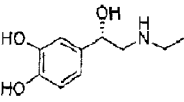
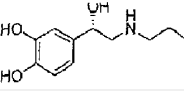
La antiangiogenicidad de algunos agentes antiangiogénicos de la presente invención se enumera en la Tabla 1A. La Tabla 1B enumera la dopamina, un compuesto antiangiogénico conocido, y algunas catecolaminas que no muestran efectos antiangiogénicos. La figura 2A es la expresión cuantitativa de la antiangiogenicidad de estos compuestos y la figura 2B muestra algunas de las fotografías que se usaron en el análisis.

La dopamina es un agente antiangiogénico a través del receptor de dopamina D2 (Basu y otros, 2001), mientras que las (R)-adrenalinas (que pertenecen a la clase de compuestos de la catecolamina) son angiogénicas a través del receptor β 2-adrenérgico (Thake y otros, 2006). Fue sorprendente e inesperado que (S)-noradrenalina, que es estructuralmente homóloga a la dopamina, no fue antiangiogénica, mientras que (S)-isoproterenol, que es menos homólogo a la dopamina que (S)-noradrenalina, fue antiangiogénico. Además, aún menos homóloga la (R,S)-N-terc-butilnoradrenalina fue antiangiogénica, a pesar de que (R)-N-terc-butilnoradrenalina es un agonista del receptor β 2-adrenérgico (Walker y otros, 1985). En consecuencia, la actividad antiangiogénica de los compuestos que se enumeran en la Tabla 1A es inesperada.

Se sabe que el (R)-isoproterenol es angiogénico y compite con la actividad antiangiogénica de (S)-isoproterenol como mezcla racémica (R, S)-isoproterenol no mostró actividad antiangiogénica. Así, la pureza óptica de (S)-isoproterenol requerida para expresar la actividad antiangiogénica se examinó con varias purezas ópticas de (S)-isoproterenol (Figura 3). Se observó actividad antiangiogénica en (S)-isoproterenol con una pureza óptica del 97 % peso/peso o superior, mientras que (S)-isoproterenol 95 % peso/peso ópticamente puro estaba en la transición de no antiangiogénico a antiangiogénico. En consecuencia, se prefiere al menos el 97 % peso/peso de pureza óptica del (S)-isoproterenol, con mayor preferencia al menos 99,9 % peso/peso, aún más preferentemente al menos 99,99 % peso/peso, porque la expresión del receptor β 2-adrenérgico *in vivo* en el tejido diana podría ser mayor que la de las HUVEC utilizadas en el ensayo, lo que requiere, además, una eliminación de (R)-isoproterenol en el fármaco.

Algunas (S)-adrenalinas enumeradas en las Tablas 1A y 1B son (S)-noradrenalina, (R,S)-adrenalina, (S)-N-etilnoradrenalina, (S)-N-propilnoradrenalina, (S)-N-butilnoradrenalina, (R,S)-N-terc-butilnoradrenalina (Colterol) e isoetarina. La menos lipofílica (S)-noradrenalina no fue antiangiogénica, mientras que las más lipofílicas (S)-N-etilnoradrenalina, (S)-N-propilnoradrenalina, (S)-isoproterenol, (S)-N-butilnoradrenalina mostraron actividad antiangiogénica. En mezcla racémica, los relativamente lipofílicos (R,S)-adrenalina y (R,S)-isoproterenol no mostraron actividad antiangiogénica. Sin embargo, las más lipofílicas (R, S)-N-terc-butilnoradrenalina e isoetarina mostraron actividad antiangiogénica. Como la (R)-isoforma de estas adrenalinas es angiogénica a través de su actividad agonista del receptor β 2-adrenérgico, actividad antiangiogénica de la (S)-isoforma de estas adrenalinas podría aumentar a medida que aumenta su lipofilia. Ejemplos de algunas otras (S)-adrenalinas se enumeran en la Figura 7.

Tabla 1A. Antiangiogenicidad de los compuestos de la presente invención.

Compuesto (medido a 20 μ M)	Estructura	Actividad
(S)-isoproterenol (> 99,9 % ópticamente puro)		Antiangiogénico; Anti-invasivo
(S)-N-etilnoradrenalina (> 99 % ópticamente pura)		Antiangiogénico
(S)-N-N-propilnoradrenalina (> 99 % ópticamente pura)		Antiangiogénico
(S)-N-n-butilnoradrenalina (> 99 % ópticamente pura)		Antiangiogénico

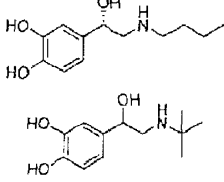
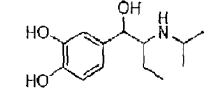
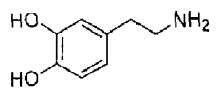
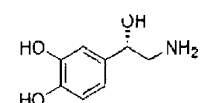
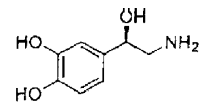
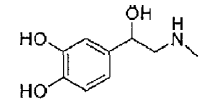
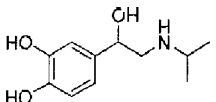
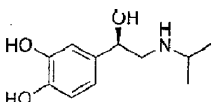
<p>(<i>R,S</i>)-<i>N</i>-<i>terc</i>-butilnoradrenalina (Colterol) (racemato)</p>		<p>Antiangiogénico</p>
<p>1-(3,4-dihidroxifenil)-2-(isopropilamino)-1(<i>R,S</i>)-butanol (Isoetarina) (racemato)</p>		<p>Antiangiogénico</p>

Tabla 1B. Dopamina y catecolaminas que no exhiben propiedades antiangiogénicas.

Compuesto (medido a 20 μ M)	Estructura	Actividad
Dopamina		Antiangiogénico ^b
(S)-Noradrenalina (99,06 \pm 0,01 % ópticamente puro)		No antiangiogénico
(R)-Noradrenalina		Angiogénico ^a
(R,S)-Adrenalina		Angiogénico ^a No antiinvasivo
(R, S)-isoproterenol		No antiangiogénico
(R)-isoproterenol		Angiogénico ^a No antiinvasivo
<p>^aRef. Thaker y otros, 2006. ^bRef. Basu y otros, 2001.</p>		

55 Como (S)-isoproterenol y sus análogos son agentes antiglicosilación (Yeboah y otros, 2005) y ahora hemos encontrado
 que son antiangiogénicos, estas actividades pueden mostrar efectos de sinergia cuando la glicosilación y la angiogénesis
 están contribuyendo a la enfermedad, por ejemplo, la retinopatía diabética. Para tales aplicaciones, se prefieren los
 60 compuestos y sus profármacos con actividad antiglicosilación y actividad antiangiogénica, pero que carecen de actividad
 adrenérgica. Más específicamente, el (S)-isoproterenol y sus profármacos son de interés particular. Algunos profármacos
 enumerados en la Figura 9 son (S)-*N*-etiladrenalina dipivalato, (S)-*N*-propilnoradrenalina dipivalato, (S)-*N*-*n*-
 butilnoradrenalina dipivalato, (S)-isoproterenol dipivalato, (S)-isoproterenol diisobutirato, (S)-isoproterenol dibenzoilato,
 (S)-isoproterenol ditoluoilato e isoetarina dipivalato. La actividad antiangiogénica se midió en algunos profármacos, lo que
 resultó en una actividad antiangiogénica nula o débil como se muestra en la Figura 10. Teniendo en cuenta que una parte
 65 de algunos profármacos puede hidrolizarse a (S)-isoproterenol antiangiogénico durante 22 horas del período de
 incubación, los profármacos en la Figura 11 pueden ser agentes no antiangiogénicos o antiangiogénicos muy débiles.

La invasión de células tumorales es un proceso involucrado en la etapa tardía del desarrollo del cáncer donde el tumor migra de un tejido a otros tejidos. La presente invención proporciona una actividad novedosa de (S)-isoproterenol para prevenir la invasión de células tumorales. La Figura 3 muestra que (S)-isoproterenol (20 µM) redujo la invasión de HUVEC en Matrigel en un 60 %. En contraste, su isómero óptico (R)-isoproterenol no mostró ninguna actividad antiinvasión. Junto con la actividad antiangiogénica, (S)-isoproterenol tiene actividades ambivalentes para tratar la metástasis tumoral.

La presente invención excluye el uso de los compuestos con actividad agonista β2-adrenérgica tales como (R)-isoproterenol ya que los agonistas β2-adrenérgicos son angiogénicos (Thaker y otros, 2006), a menos que la actividad antiangiogénica de los ingredientes exceda la actividad angiogénica de los componentes agonistas β2-adrenérgicos y la actividad β2-adrenérgica no interfiera los efectos terapéuticos de la presente invención y no proporcione efectos adrenérgicos adversos.

La presente invención incluye el uso de profármacos de (S)-isoproterenol y sus análogos, donde se modifican los grupos hidroxilo aromáticos. Los profármacos pueden mejorar y acelerar la absorción y penetración al tejido debido a su alta lipofilia. Los profármacos también protegen al grupo o grupos hidroxilo aromáticos de reacciones químicas tales como la oxidación durante el almacenamiento. Los profármacos también son menos sensibles a la luz ultravioleta en comparación con los fármacos correspondientes.

En caso de que se desee una alta pureza óptica para la actividad antiangiogénica y para minimizar los efectos adrenérgicos adversos, los profármacos reducen la racemización durante el almacenamiento. La Tabla 2 describe las purzas ópticas de (S)-isoproterenol y de (S)-isoproterenol dipivalato después de la incubación en varias formulaciones de colirios durante 10 días a 55 °C y en comparación con las purzas antes de la incubación. La incubación durante 10 días a 55 °C corresponde a la incubación durante 167 días a 22 °C.

La pureza óptica promedio de (S)-isoproterenol después de incubar 10 días a 55 °C fue 97,35 ± 0,52 %, lo que resultó en la conversión de 2,55 % de (S)-isoproterenol a (R)-isoproterenol. Esto corresponde a una reducción de la pureza óptica de (S)-isoproterenol de 99,90 % a 90 % después de 655 días de almacenamiento a temperatura ambiente. Por el contrario, la pureza óptica promedio de (S)-isoproterenol dipivalato después de incubar 10 días a 55 °C fue aproximadamente 99,85 ± 0,08 %, lo que resultó en 0,02 % de conversión de (S)-isoproterenol dipivalato a la correspondiente (R)-isoforma. Esto implica que la pureza óptica de (S)-isoproterenol dipivalato se reduce de 99,87 % a 99,78 % después de 2 años de almacenamiento a temperatura ambiente. Dado que una alta pureza óptica de (S)-isoproterenol es muy deseada para la actividad antiangiogénica, se prefiere la formulación de profármacos. La formulación del profármaco no se limita a los ésteres de pivalato. En la figura 8 se enumeran ejemplos de algunos grupos protectores de los grupos hidroxilo aromáticos.

Tabla 2. Estabilidad óptica de (S)-isoproterenol después de 10 días de almacenamiento a 55 °C.

Ingredientes	Concentraciones de ingredientes inactivos y pureza óptica de (S)-isoproterenol (1,7 mg/mL)			
(S)-isoproterenol ^a (% de pureza óptica)	97,90%	97,26%	97,56%	96,68%
Povidona	2 mg/mL	2 mg/mL	2 mg/mL	-
NaCl	-	8 mg/mL	-	8 mg/mL
Cloruro de benzalconio	0,04 mg/mL	0,04 mg/mL	-	0,04 mg/mL
D-Manitol	54,7 mg/mL	-	54,7 mg/mL	-
Clorobutanol	-	-	1 mg/mL	-
Tween™ 80	-	-	-	2,5 mg/mL
2-hidroxiopropil ciclodextrina	-	10,1 mg/mL	10,1 mg/mL	-
pH	6,0	6,0	6,0	6,0

^aLa pureza óptica del material de partida fue 99,90 %.

Tabla 3. Estabilidad óptica de (S)-isoproterenol dipivalato después de 10 días de almacenamiento a 55 °C.

Ingredientes	Concentraciones de ingredientes inactivos y pureza óptica de (S)- (3,0 mg/mL)			
(S)- dipivalato ^a (% de pureza óptica)	99,90%	99,86%	99,74%	>99,90%
Povidona	2 mg/mL	2 mg/mL	2 mg/mL	-

	NaCl	-	8 mg/mL	-	8 mg/mL
	Cloruro de benzalconio	0,04 mg/mL	0,04 mg/mL	-	0,04 mg/mL
5	D-Manitol	54,7 mg/mL	-	54,7 mg/mL	-
	Clorobutanol	-	-	1 mg/mL	-
	Tween™ 80	-	-	-	2,5 mg/mL
10	2-hidroxipropil ciclodextrina	-	10,1 mg/mL	10,1 mg/mL	-
	pH	6,0	6,0	6,0	6,0
	^a La pureza óptica del material de partida fue 99,87 %.				

15 La estreptozotocina se usó para inducir diabetes en ratas. Los niveles de glucosa en sangre se midieron una vez por semana durante un período de 27 semanas para ratas no diabéticas y diabéticas. Control, el Grupo I (que reciben vehículo) y el Grupo II (que reciben profármaco) de animales no diabéticos (diamante lleno) tienen un nivel constante de glucosa en sangre de $5,1 \pm 0,4$ y $5,1 \pm 0,4$ mM, respectivamente). Se observó un aumento en los niveles de glucosa en sangre para las ratas diabéticas del Grupo III (que reciben vehículo) y del Grupo IV (que reciben profármaco), durante las primeras 20 2 semanas de inducción de diabetes. Luego los niveles de glucosa se estabilizaron a 28 ± 4 y 27 ± 5 mM, respectivamente. Como el nivel de glucosa de alrededor de 5 mM se considera normal, las ratas en el Grupo I y el Grupo II no son diabéticas. Las ratas se consideran diabéticas cuando el nivel de glucosa en sangre excede los 15 mM. Así, todas las ratas del Grupo III y del Grupo IV son diabéticas. La consistencia del nivel de glucosa en sangre entre los grupos I y II y entre los grupos III y IV muestra que el (S)- no afecta el nivel de glucosa en sangre y la diabetes.

25 Se controló otro posible efecto adverso del (S)- en la pérdida/ganancia de peso corporal. El aumento de peso durante los experimentos es esencialmente el mismo entre el Grupo I (ratas no diabéticas que reciben el vehículo) en la Figura 5A y el Grupo II (ratas no diabéticas que reciben el profármaco) en la Figura 5B, lo que sugiere que no hay efecto del (S)-isoproterenol en la ganancia/pérdida de peso de ratas no diabéticas. El aumento de peso es mucho menor en las ratas diabéticas en comparación con las ratas no diabéticas (Chen y otros, 2004); sin embargo, el aumento de peso del Grupo III (ratas diabéticas que reciben el vehículo) en la Figura 5A es esencialmente el mismo que el del Grupo IV (ratas diabéticas que reciben el profármaco) en la Figura 5B, lo que muestra que no hubo efecto del (S)-isoproterenol en aumento/pérdida de peso de ratas diabéticas.

35 Si bien las ratas no son un organismo modelo apropiado para estudiar directamente la antiangiogenicidad, ellas pueden usarse para estudiar la capacidad de un fármaco para penetrar en la retina de un ojo. Se sabe que el (S)-isoproterenol es un potente agente antiglicosilación (Yeboah y otros, 2005). La entrada del (S)-isoproterenol en la retina se demostró al inhibir la glicosilación retiniana con colirio de (S)-isoproterenol dipivalato. Los anticuerpos contra la albúmina glicosilada de suero bovino tiñeron las proteínas glicosiladas de la retina en fluorescencia roja. La glicosilación de los capilares retinianos se evaluó mediante la superposición de la fluorescencia roja de los anticuerpos antiglicosilación con la fluorescencia verde anterior de los anticuerpos antilectina, lo que resulta en una fluorescencia verde a naranja clara de los capilares retinianos sanos con menos glicosilación y fluorescencia roja que la de los capilares retinianos altamente glicosilados. Los capilares retinianos de los ojos de ratas no diabéticas con menos glicosilación mostraron fluorescencia de verde a naranja claro. Se observaron capilares sanos similares en ojos de ratas diabéticas con (S)-isoproterenol dipivalato. Los capilares retinianos en ojos de ratas diabéticas que recibieron vehículo se tiñeron en fluorescencia roja y también se dañaron, ya que se tiñó menor número de capilares. La Figura 6 cuantifica el efecto mediante la normalización de la intensidad de fluorescencia roja de los AGE por la densidad capilar retiniana, lo que resulta en $0,43 \pm 0,15$, $0,44 \pm 0,17$ y $0,76 \pm 0,14$ para ratas no diabéticas, ratas diabéticas con tratamiento de (S)-isoproterenol dipivalato y ratas diabéticas con vehículo, respectivamente. Los valores de P son 0,052, 0,068 y 0,971 para ratas no diabéticas versus ratas diabéticas con vehículo, ratas diabéticas con (S)-isoproterenol dipivalato frente a ratas diabéticas con vehículo, y ratas no diabéticas versus ratas diabéticas con (S)-isoproterenol dipivalato, respectivamente. Debe notarse que se espera que los capilares acelulares, que están enriquecidos en la retina diabética con el vehículo, estén altamente glicosilados de manera que el grado de glicosilación para las ratas diabéticas con el vehículo sería mayor que $0,76 \pm 0,14$ en la Figura 6, lo que demuestra que el (S)-isoproterenol dipivalato efectivamente penetró (S)-isoproterenol en la retina y redujo significativamente la glicosilación en los capilares retinianos. Como el (S)- puede penetrar efectivamente en la retina de un ojo donde puede ejercer su efecto antiangiogénico, se espera que sea útil en el tratamiento y/o prevención de la retinopatía diabética.

60 En una modalidad preferida, la presente invención proporciona un uso novedoso de las isoformas del (S)-isoproterenol y sus análogos, para prevenir y/o tratar enfermedades relacionadas con la angiogénesis y/o la invasión. Estos compuestos satisfacen varios criterios importantes para esta aplicación. En primer lugar, la actividad antiangiogénica de (S)-isoproterenol y sus análogos es alta. La actividad antiangiogénica a nivel celular debe ser observable a 1 mM o menos, preferentemente a 100 μ M o menos, con mayor preferencia a 20 μ M o menos. En segundo lugar, la actividad adrenérgica, que es característica de la isoforma (R) es insignificante para la isoforma (S). Las actividades adrenérgicas de las isoformas (S) de adrenalina son mucho más bajas que las de la correspondiente isoforma (R) (Patil y otros, 1974). En

particular, la administración tópica de hasta el 20 % (S)-isoproterenol hidrocloreuro no mostró ninguna indicación de disminuir la presión intraocular en el ojo humano (Kass y otros 1976).

Las isoformas de (S)-isoproterenol y sus análogos se consideran adrenérgicamente inertes y seguras para la administración tópica y sistémica. La evidencia de que la mayoría de los fármacos comerciales de los agonistas adrenérgicos son mezclas racémicas proporciona una fuerte razón práctica para la inactividad de los isómeros (S) (Boulton y Fawcett, 2002). Las preparaciones de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención contienen solo la isoforma (S)-isoproterenol y sus análogos con el fin de reducir los posibles efectos adversos a través de la estimulación de los receptores adrenérgicos.

Se sabe que el isoproterenol tiene una duración lo suficientemente larga como para una frecuencia razonable de administración, tal como una administración dos veces al día, por ejemplo, cuando se instiló (R, S)-isoproterenol 2,47 % a ojos humanos normales, se observó una reducción del 20 % en la tensión ocular, que duró al menos 12 horas (Ross y Drance, 1970).

Una vez que el (S)-isoproterenol ingresa al sistema de circulación sanguínea, se metaboliza a 3-metil-(S)-isoproterenol y su vida media plasmática está en el intervalo de 3,0 a 4,1 minutos (Conway y otros, 1968), lo cual minimiza la posibilidad de cualquier efecto adverso sistémico del (S)-isoproterenol.

Referencias:

Akaike A., Honda K., Use of isoproterenol as retina protectant - in treatment of diseases causing injury to retinal cells e.g. diabetes mellitus, glaucoma, retinal central artery and vein occlusion, JP 09-136830 A, May 27, 1997.

Basu, S.; Nagy, J. A.; Pal, S.; Vasile, E.; Eckelhoefer, I. A.; Bliss, V. S.; Manseau, E. J.; Dasgupta, P. S.; Dvorak, H. F.; Mukhopadhyay, D. The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nat. Med.* (2001), 7, 569-574.

Bentley, G. A.; Starr, J. The antinociceptive action of some β -adrenoceptor agonists in mice. *Br. J. Pharmacol.* (1986) 88, 515-521.

Boulton, D. W.; Fawcett, J. P. β 2-Agonist eutomers: A rational option for the treatment of asthma? *Am. J. Respir. Med.* (2002), 1, 305-311.

Chen, A. S.; Taguchi, T.; Sugiura, M.; Wakasugi, Y.; Kamei, A.; Wang, M. W.; Miwa, I. Pyridoxal-aminoguanidine adduct is more effective than aminoguanidine in preventing neuropathy and cataract in diabetic rats. *Horm. Metab. Res.* (2004) 36,183-187.

Conway, W. D.; Minatorya, H.; Lnds, A. M.; Shekosky, J. M. Absorption and elimination profile of isoproterenol III. The metabolic fate of dl-isoproterenol-7-3H in the dog. *J. Pharm. Sci.* (1968) 57, 1135-1141.

Chalothorn, D.; Zhang, H.; Clayton, J.A.; Thomas, S.A.; Faber, J.E. Catecholamines augment collateral vessel growth and angiogenesis in hindlimb ischemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* (2005) 289, H947-H959.

Dejgaard, A.; Hilsted, J.; Christensen, N.J. Noradrenaline and isoproterenol kinetics in diabetic patients with and without autonomic neuropathy. *Diabetologia.* (1986) 29, 773-777.

Jarvinen, T.; Jarvinen, K. Prodrugs for improved ocular drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* (1996), 19, 203-224.

Kass, M. A.; Reid, T. W.; Neufeld, A. H.; Bausher, L. P.; Sears, M. L. The effect of d-isoproterenol on intraocular pressure of the rabbit, monkey, and man. *Invest. Ophthalmol.* (1976), 15, 113-118.

Kyselova, Z.; Stefek, M.; Bauer, V. Pharmacological prevention of diabetic cataract. *J. Diabetes Complications.* (2004) 18, 129-140.

Lands, A. M.; Luduena, F. P.; Tullar, B. F. The pharmacologic activity of the optical isomers of isoproterenol compared with that of the optically inactive analog 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-isopropylaminoethane HCl. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1954), 111, 469-474.

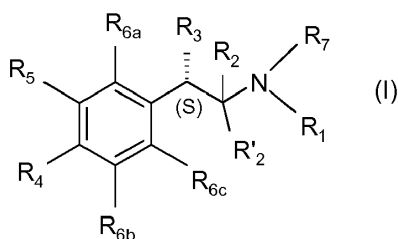
Mandell, A. I.; Stentz, F.; Kitabchi, A. E. Dipivalyl epinephrine: a new pro-drug in the treatment of glaucoma. *Ophthalmology.* (1978) 85, 268-275.

Mullick, A.; Konishi, Y. Anti-diabetic cataract compounds and their uses. International Publication Number WO 2007/109882, October 4, 2007.

- Pandya N. M. et al., Angiogenesis-a new target for future therapy, *Vascular Pharmacology*, vol. 44, no. 5, pages 265-274, May, 2006.
- 5 Patil, P. N.; Miller, D. D.; Trendelenburg U. Molecular geometry and adrenergic drug activity. *Pharmacol. Rev.* (1974), 26, 323-392.
- Ross, R. A.; Drance, S. M. Effects of topically applied isoproterenol on aqueous dynamics in man. *Arch. Ophthal.* (1970) 83, 39-46.
- 10 Sebti S.M., Inhibition of the Raf/Mek/P-Erk pathway for treating cancer, US 2007/021512 A1, January 25, 2007.
- Seidehamel, R. J.; Dungan, K. W.; Hickey, T. E. Specific hypotensive and antihypertensive ocular effects of d- in rabbits. *Am. J. Ophthalmol.* (1975), 79, 1018-1025.
- 15 Thaker, P.H.; Han, L. Y.; Kamat, A. A.; Arevalo, J. M.; Takahashi, R.; Lu, C.; Jennings, N. B.; Armaiz-Pena, G.; Bankson, J. A.; Ravoori, M.; Merritt, W. M.; Lin, Y. G.; Mangala, L. S.; Kim, T. J.; Coleman, R. L.; Landen, C. N.; Yang LI, Y.; Felix, E.; Sanguino, A. M.; Newman, R. A.; Lloyd, M.; Gershenson, D. M.; Kundra, V.; Lopez-Berestein, G.; Lutgendorf, S. K.; Cole, S. W.; Sood, A. K. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat. Med.* (2006), 12, 939-944.
- 20 Walker, S. B.; Kradjan, W. A.; Bierman, C. W. Bitolterol mesylate: a beta-adrenergic agent. *Chemistry, pharmacokinetics, pharmacodynamics, adverse effects and clinical efficacy in asthma. Pharmacotherapy* (1985), 5, 127-137.
- Wang, B. C.; Bloxham, D. D.; Goetz, K. L. Effect of dipivalyl derivatives of catecholamines on cardiovascular function in the conscious dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1977) 203, 442-448.
- 25 Yeboah, F.; Konishi, Y.; Cho, S. J.; Lertvorachon, J.; Kiyota, T.; Popek, T. Anti-glycation agents for preventing age-, diabetes-, and smoking-related complications. US Patent Publication 2005/0043408, February 24, 2005.
- Yeboah F. et al., Anti-glycation agents for preventing age-, diabetes-, and smoking-related complications, WO 03/032969 A2, April 24, 2003.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula (I)



una sal fisiológicamente tolerada del mismo o cualquier mezcla del mismo, que tenga una pureza óptica del 97 % o mayor, para usar como agente antiangiogénico para tratar o prevenir el edema macular diabético, la degeneración macular relacionada con la edad o la metástasis, en donde

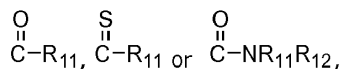
R₁ representa un C₁₋₁₀ grupo alquilo,

R₇ representa H, un C₁₋₁₀ grupo alquilo, un C₃₋₁₀ grupo cicloalquilo o un C₁₋₁₀ grupo acilo derivado de un ácido alifático o ácido aromático,

R₂ y R'₂ ambos representan H,

R₃ representa OH,

R₄ y R₅ cada uno representa independientemente OY, NHY o SY, en donde Y representa H,



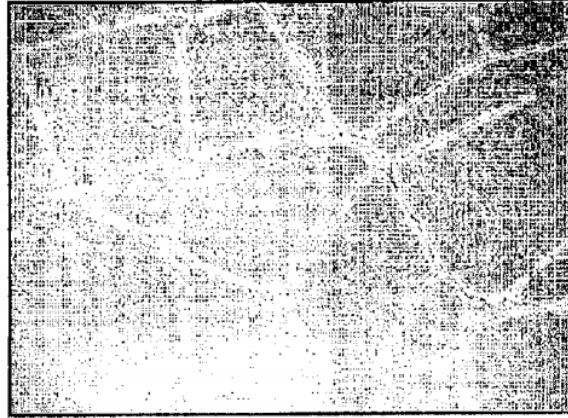
en donde R₁₁ y R₁₂ cada uno representa independientemente H, un C₁₋₁₀ grupo alquilo o un C₃₋₁₀ grupo cicloalquilo, R_{6a}, R_{6b} y R_{6c} cada uno representa H,

(S) representa un centro quiral que define una configuración (S) del compuesto,

cada C₁₋₁₀ grupo alquilo, C₃₋₁₀ grupo cicloalquilo, C₁₋₁₀ grupo acilo, C₃₋₈ el grupo heterocíclico que contiene nitrógeno incluye independientemente o no incluye uno o más heteroátomos N, O o S, y está independientemente no sustituido o sustituido con uno o más C₆₋₁₀ grupos arilo, C₆₋₁₈ grupos alcarilo o C₆₋₁₈ grupos aralquilo.

2. El compuesto para usar de conformidad con la reivindicación 1, en donde la pureza óptica es del 99 % o mayor.
3. El compuesto para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde R₇ representa H.
4. El compuesto para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde R₄ y R₅ cada uno representa independientemente OY, y cada Y representa independientemente H, pivaloilo, acetilo, propionilo, butanoilo, isobutanoilo, pentanoilo, 2-butenilo, ciclopropanoilo, ciclohexanoilo, benzoilo, 4-metilbenzoilo, 4-nitrobenzoilo, fenacetilo, 4-metilfenocetilo, metoxiacetilo o *N,N*-dimetilamido.
5. El compuesto para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde R₄ y R₅ cada uno representa OY, y cada Y representa pivaloilo.
6. El compuesto para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde R₄ y R₅ cada uno representa OY, y cada Y representa H.
7. El compuesto para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el compuesto es (*S*)-isoproterenol, (*S*)-*N*-etilnoradrenalina, (*S*)-*N-terc*-butilnoradrenalina, (*S*)-*N-n*-butilnoradrenalina, (*S*)-*N-n*-propilnoradrenalina, 1(3,4-dihidroxifenil)-2-(isopropilamino)-1(*S*)-butanol.
8. El compuesto para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el compuesto es (*S*)-isoproterenol o (*S*)-isoproterenol dipivalato.
9. El compuesto para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el compuesto es (*S*)-*N*-etiladrenalina dipivalato, (*S*)-*N*-propilnoradrenalina dipivalato, (*S*)-*N-n*-butilnoradrenalina dipivalato, (*S*)-isoproterenol dipivalato, (*S*)-isoproterenol diisoburitato, (*S*)-isoproterenol dibenzoilato, (*S*)-isoproterenol ditoluoilato o isoetarina dipivalato.
10. El compuesto para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para tratar o prevenir el edema macular diabético o la degeneración macular relacionada con la edad.
11. El compuesto para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para tratar o prevenir metástasis.

Control



(S)-Isoproterenol

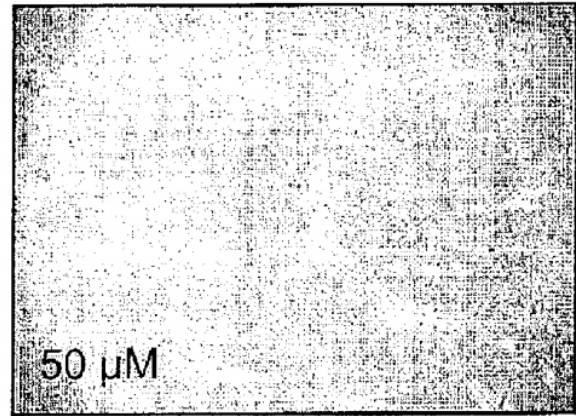
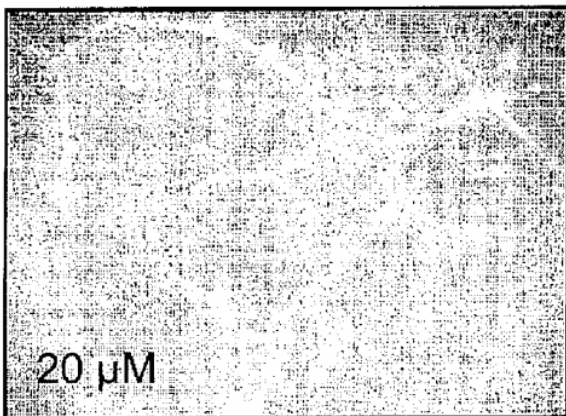
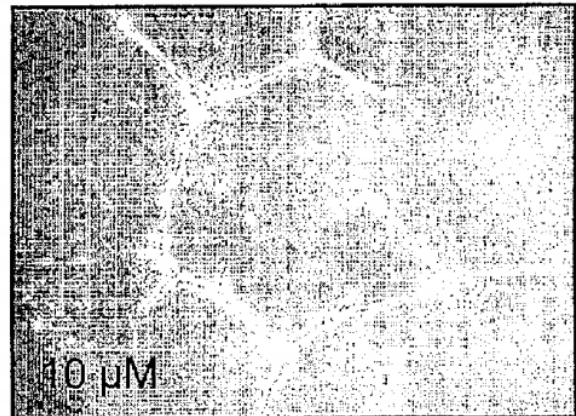
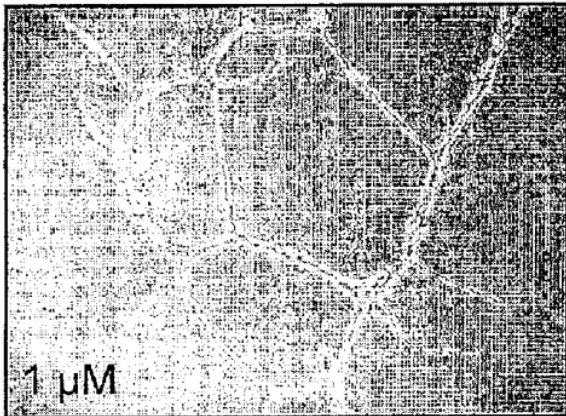


Figura 1

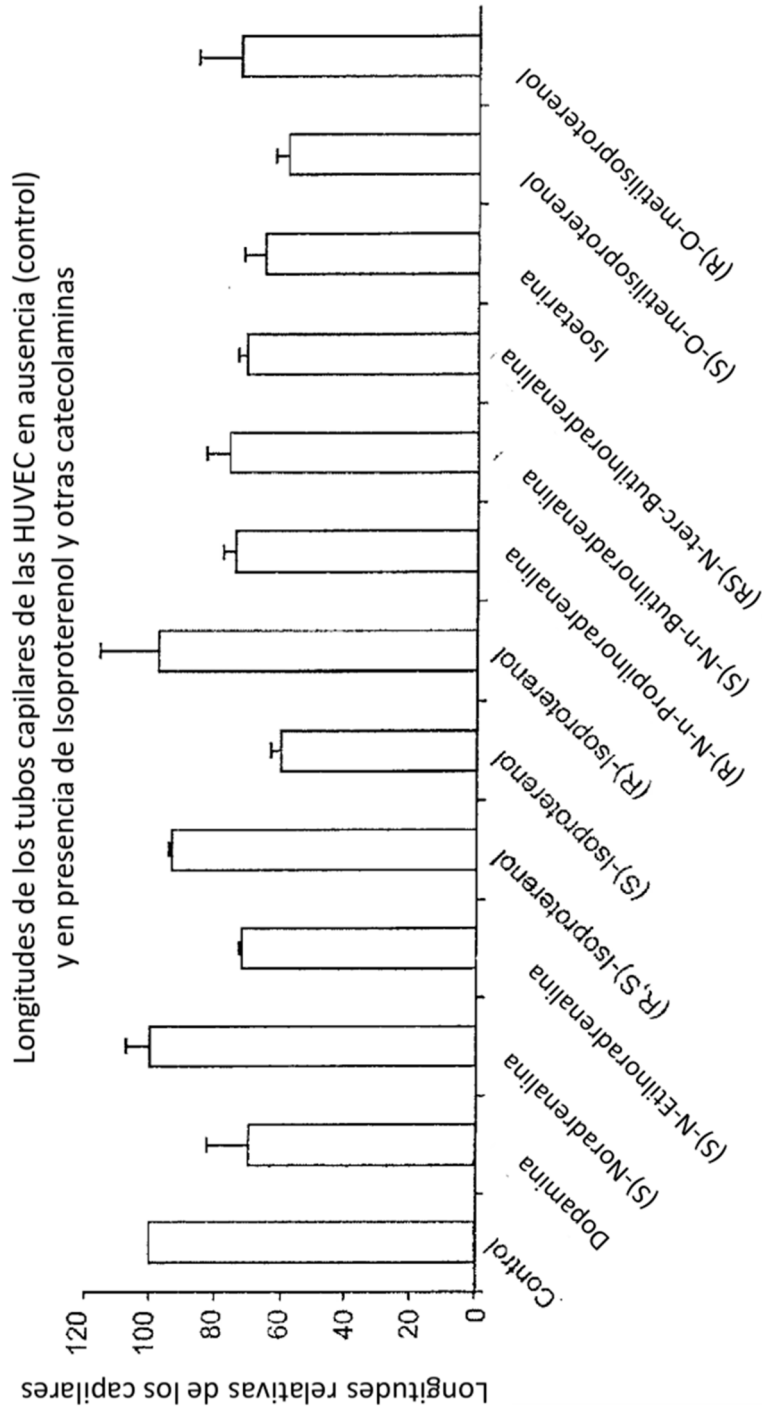


Figura 2A

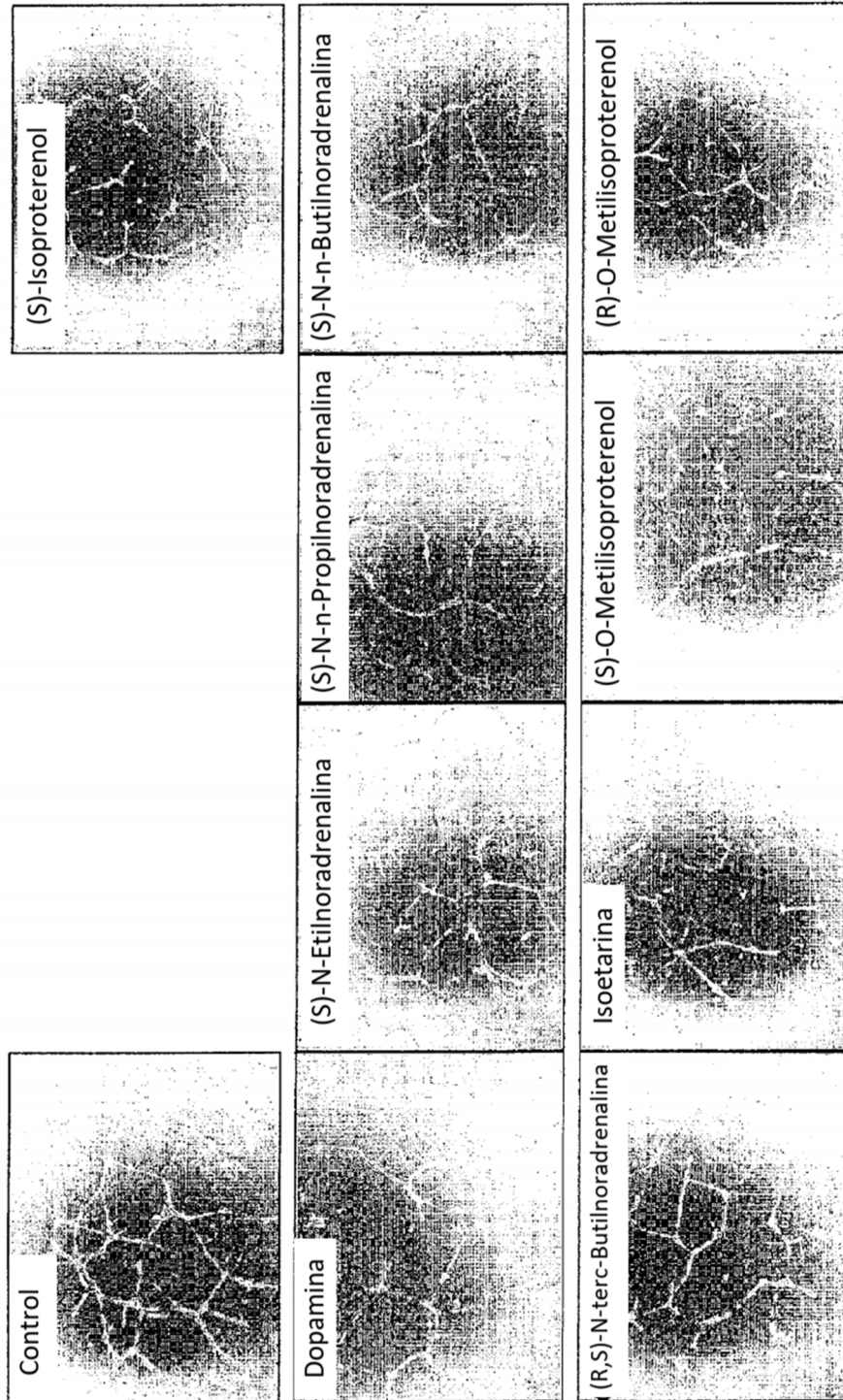


Figura 2B

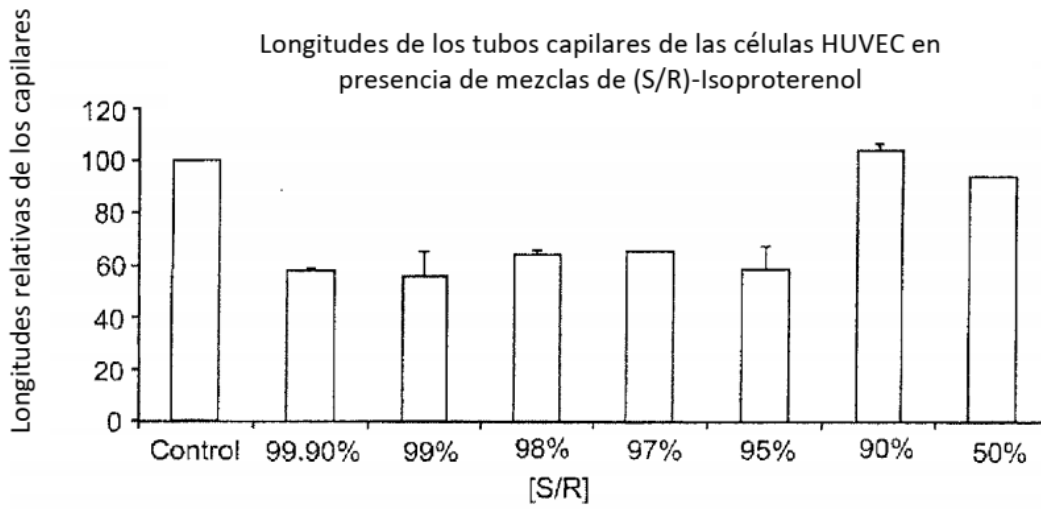


Figura 3

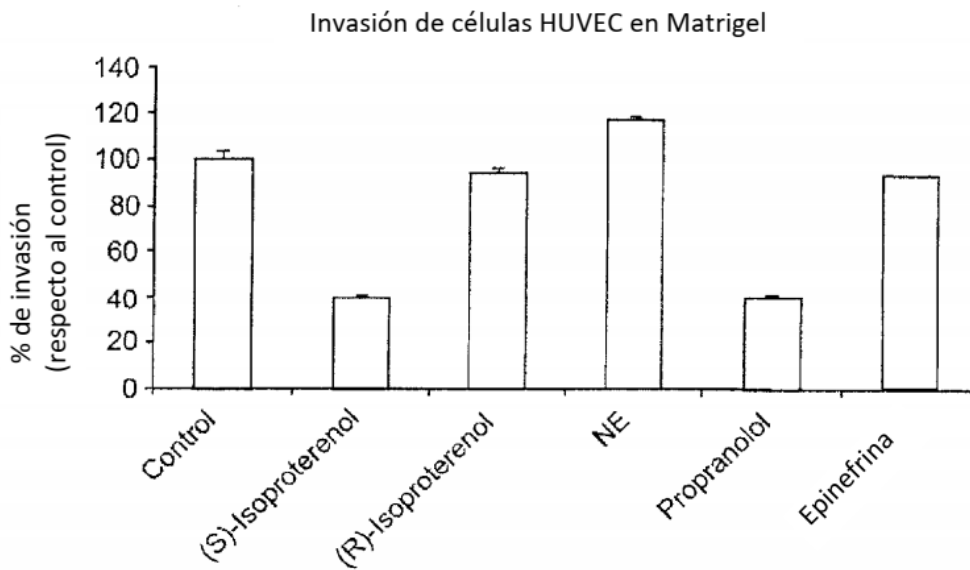


Figura 4

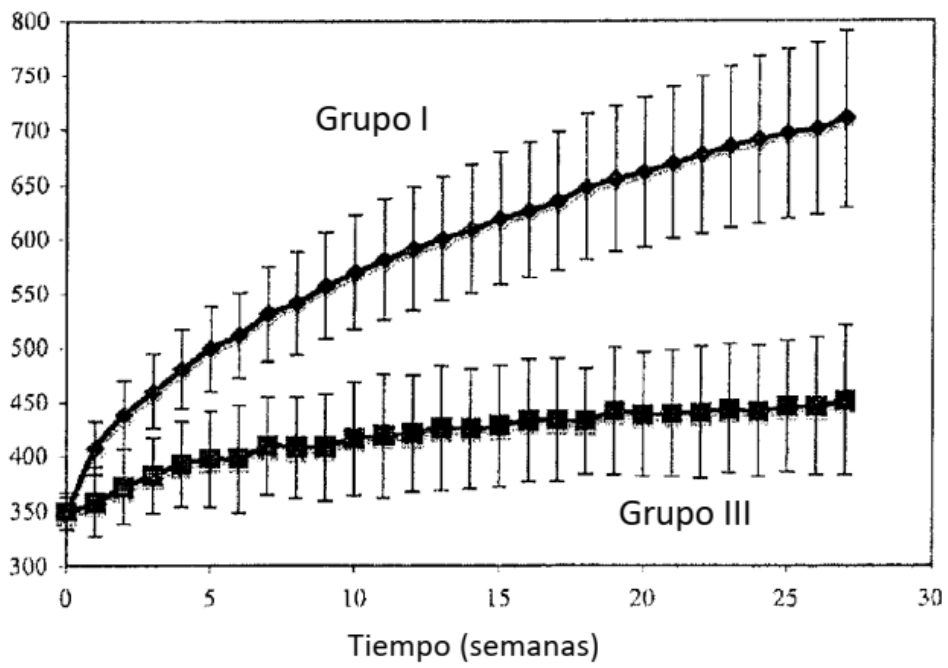


Figura 5A

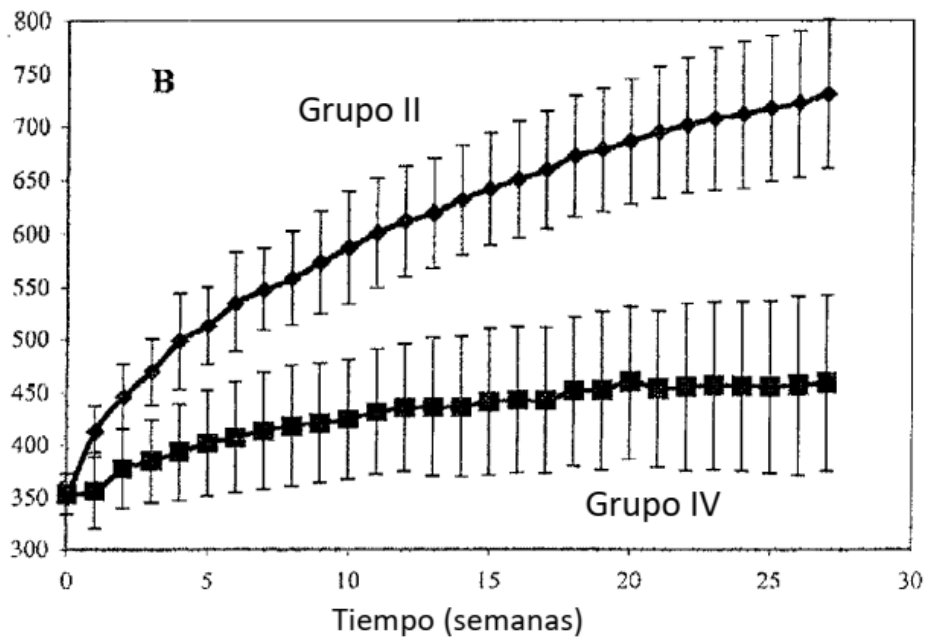


Figura 5B

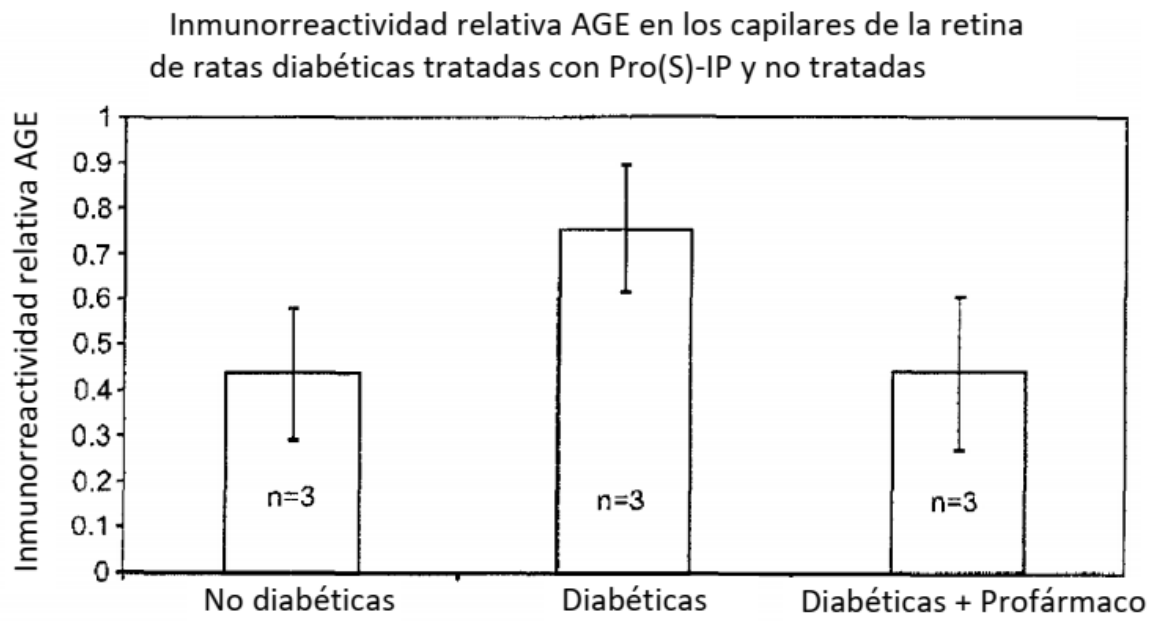


Figura 6

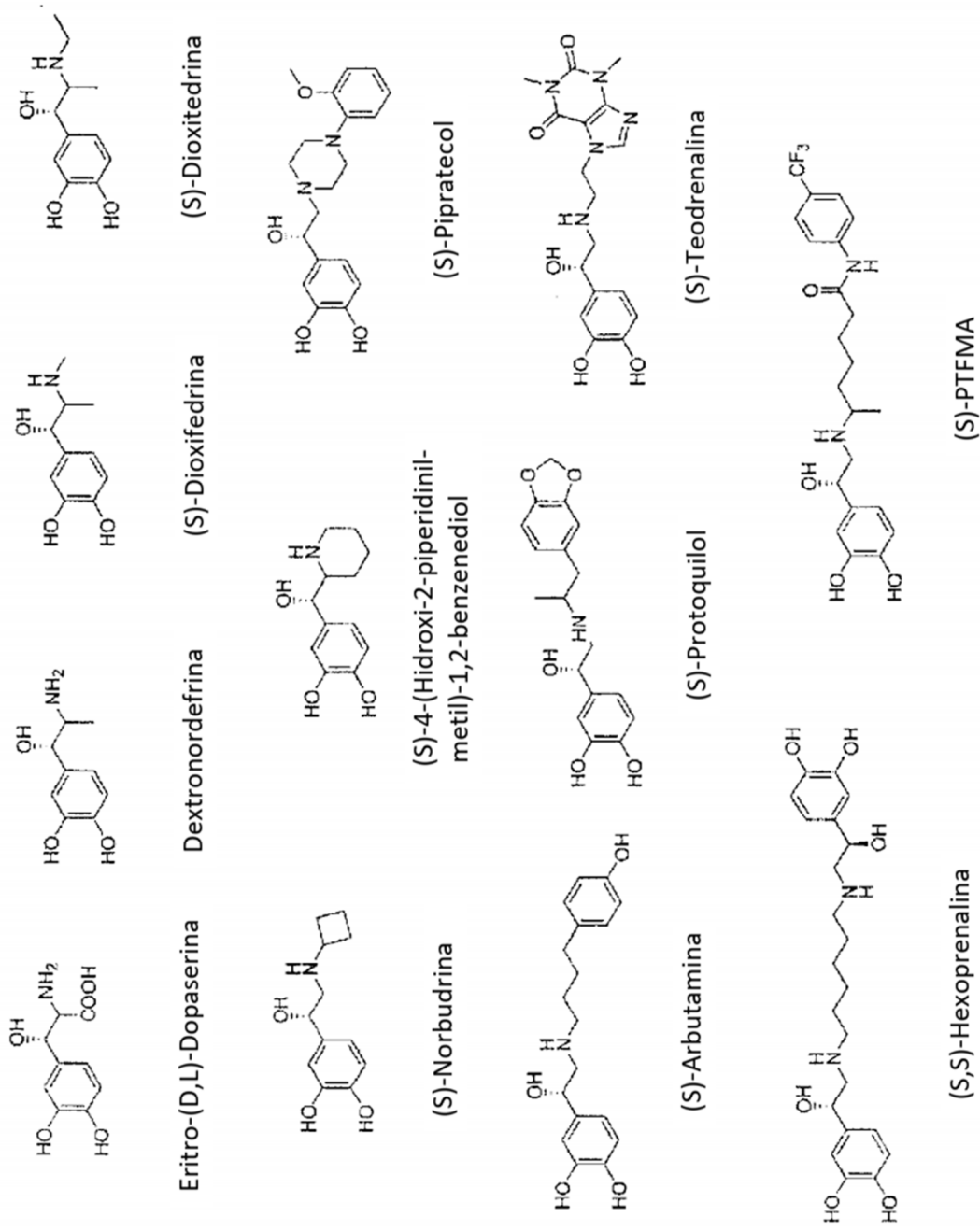


Figura 7

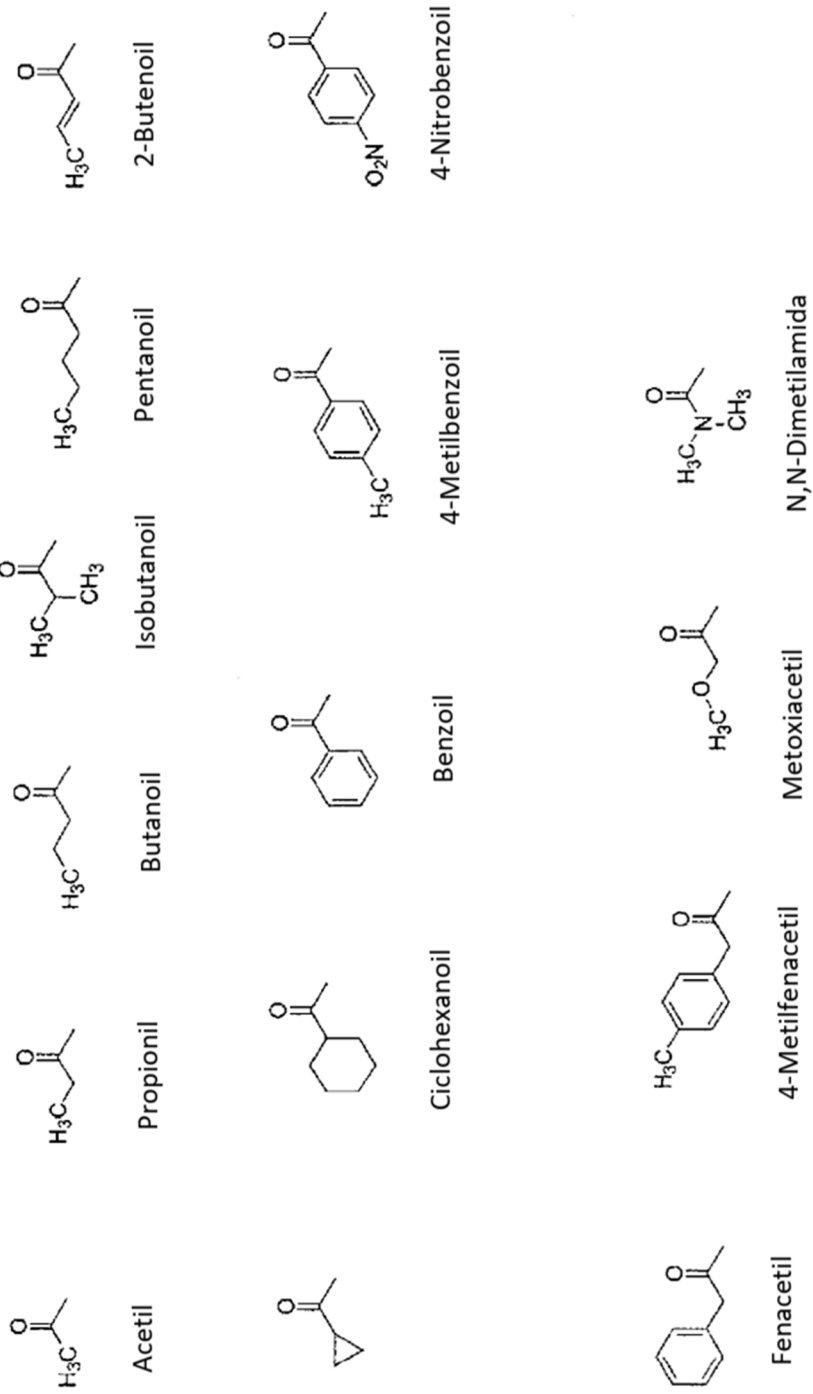


Figura 8

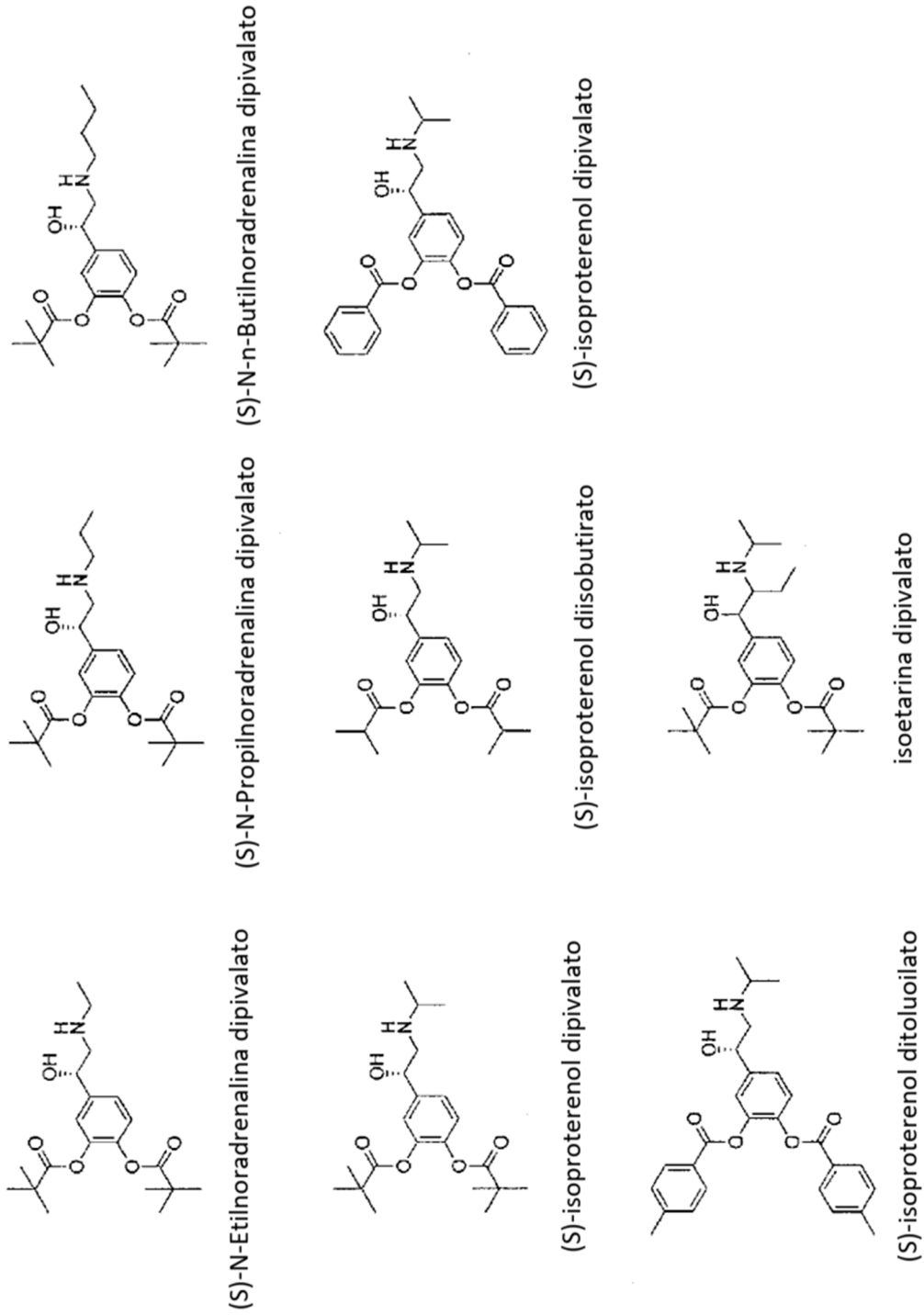


Figura 9

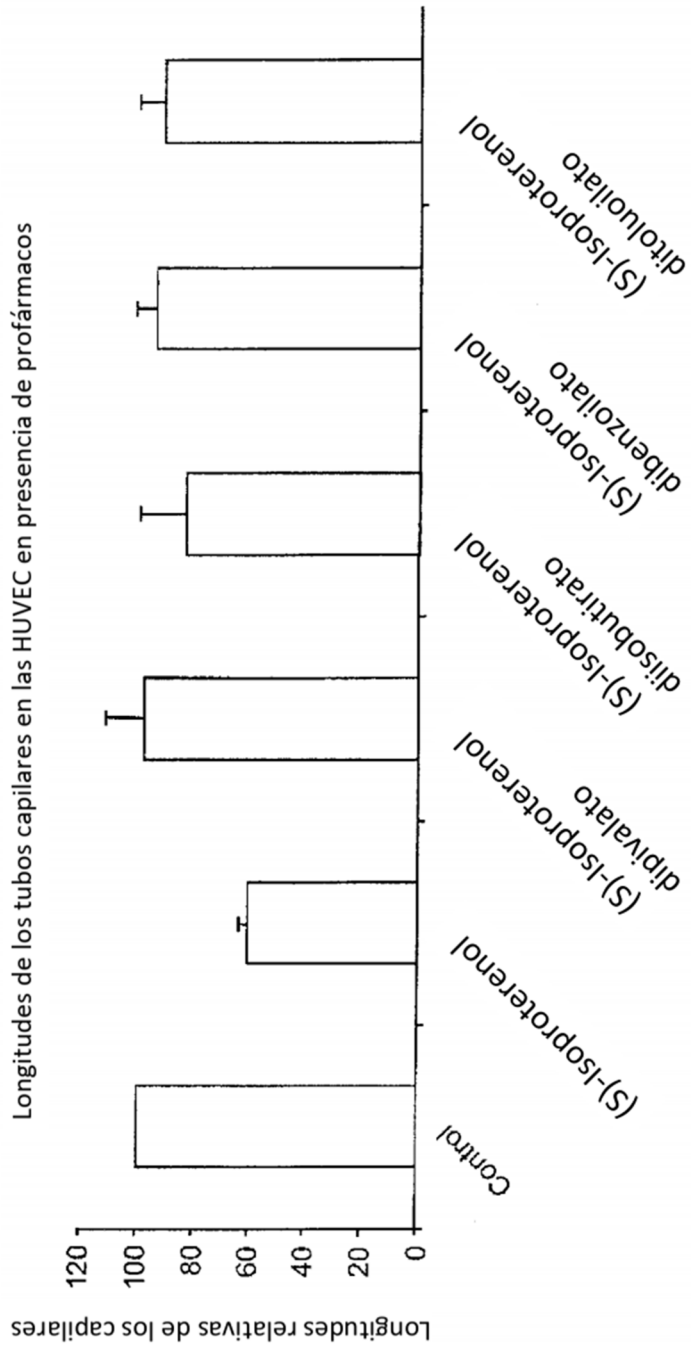


Figura 10