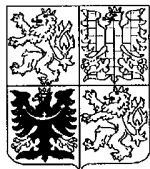


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **10.07.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **11.07.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/9702706**

(33) Země priority: **SE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.08.2000**
(Věstník č. 8/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/SE98/01368**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/02165**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 84

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. C1. ⁷:

A 61 K 31/5575

A 61 P 27/06

A 61 P 27/02

(71) Přihlašovatel:

PHARMACIA & UPJOHN AB, Stockholm, SE;

(72) Původce:

Stjernschantz Johan, Uppsala, SE;

Resul Bahram, Uppsala, SE;

Lake Staffan, Lidingö, SE;

(74) Zástupce:

Zelený Pavel JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Prostaglandinové deriváty pro léčení glaukomu,
bez vedlejších účinků**

(57) Anotace:

Je popsán nový způsob a kompozice pro léčení glaukomu a okulární hypertenze. Způsob je založen na použití antagonistů EP₁ prostanoidních receptorů, které účinně snižují intraokulární tlak, ale při tom mají nulový nebo snížený vedlejší účinek pigmentace duhovky. Prostaglandinové deriváty, které jsou EP₁ selektivními agonisty, se aplikují povrchově do oka.

Prostaglandinové deriváty pro léčení glaukomu, bez vedlejších účinků

Vynález se týká způsobu léčení glaukomu a okulární hypertenze s použitím prostaglandinových analogů nebo derivátů, které nemají nebo mají sníženou melanogenní účinnost na oko. Vynález se také týká oftalmických kompozic, které obsahují prostaglandinové sloučeniny, které mají menší nebo nulový vedlejší melanogenní účinek na oko.

Glaukom je oční porucha, charakterizovaná zvýšeným intraokulárním tlakem, narušením hlavy optického nervu a postupnou ztrátou vizuálního pole. Abnormálně vysoký intraokulární tlak je obecně známým, pro oko škodlivým příznakem a existují jasné známky toho, že při glaukomu je vysoký intraokulární tlak nejdůležitějším faktorem, který způsobuje degenerativní změny sítnice a hlavy optického nervu. Exaktní patofysiologický mechanismus zeleného očního zákalu je, nicméně, dosud neobjasněn. Pokud se glaukom neléčí, může vést ke oslepnutí, přičemž průběh nemoci obvykle začíná pomalou a postupuje progresivní ztrátou.

Intraokulární tlak (IOP) se dá definovat vzorcem (1):

$$(1) \quad IOP = P_e + (F_t - F_u) \times R$$

kde P_e je tlak v episklerální žíle, F_t je množství vytvořeného moku přední oční komory, F_u je podíl moku který odchází očním uveosklerálním odtokovým kanálkem a R je odpor trabekulárního odtokového kanálku. Mok v anteriorní a posteriorní oční komoře se tvoří v řasinkách za duhovkou. Pak teče pupilou do anteriorní komory a je normálně v oku v trabekulární síťovině a

Schlemmovým kanálkem se dostává do episklerální žíly mimo oční bulvu. Nicméně, část vodné tekutiny může oko opouštět uveosklerální odtokovou cestou. Odtok touto cestou je pouze minimálně ovlivňován intraokulárním tlakem (Bill, 1975).

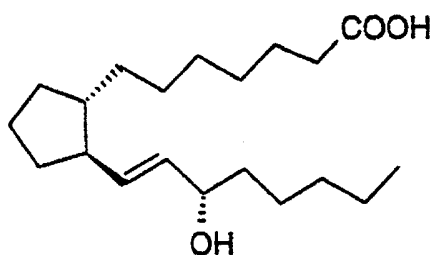
Intraokulární tlak je u lidí normálně v rozmezí 12-22 mmHg. Při vyšších tlacích, např. nad 22 mmHg, roste riziko, že se oko poškodí. Při jedné z forem glaukomu je tlak normální, nicméně k poškození může dojít při hodnotách intraokulárního tlaku, které se pohybují v rámci normálního psychologického rozmezí. Opačný případ je také známý, t.j. u některých jedinců se může projevit abnormálně vysoký intraokulární tlak mez toho, aby se manifestoval defekty ve vizuálním poli nebo v hlavě optického nervu. Takovéto stavy se obvykle popisují jako okulární hypertenze.

Léčení glaukomu se může provádět pomocí farmaceutických látek, laseru nebo chirurgického zákroku. Při léčení pomocí farmaceuticky účinných látek je cílem snížení tvorby moku přední oční komory (Ft), nebo snížení odporu, který je kladen odtoku moku z přední oční komory (R), což má mít podle vzorce (1), uvedeného shora, za následek snížení intraokulárního tlaku; alternativně také snižuje intraokulární tlak růst průtoku moku přední oční komory uveosklerální cestou, což odpovídá vzorci (1).

Prostaglandiny a nejčastěji $\text{PGF}_{2\alpha}$, jejich estery a analogy, snižují intraokulární tlak zejména zvyšováním uveosklerálního odtoku moku přední oční komory (Crawford a Kaufman, 1987; Nilsson et al., 1989; Toris et al., 1993; Stjernschantz et al., 1995). Použití prostaglandinů a jejich derivátů je popsáno v několika patentech a patentových

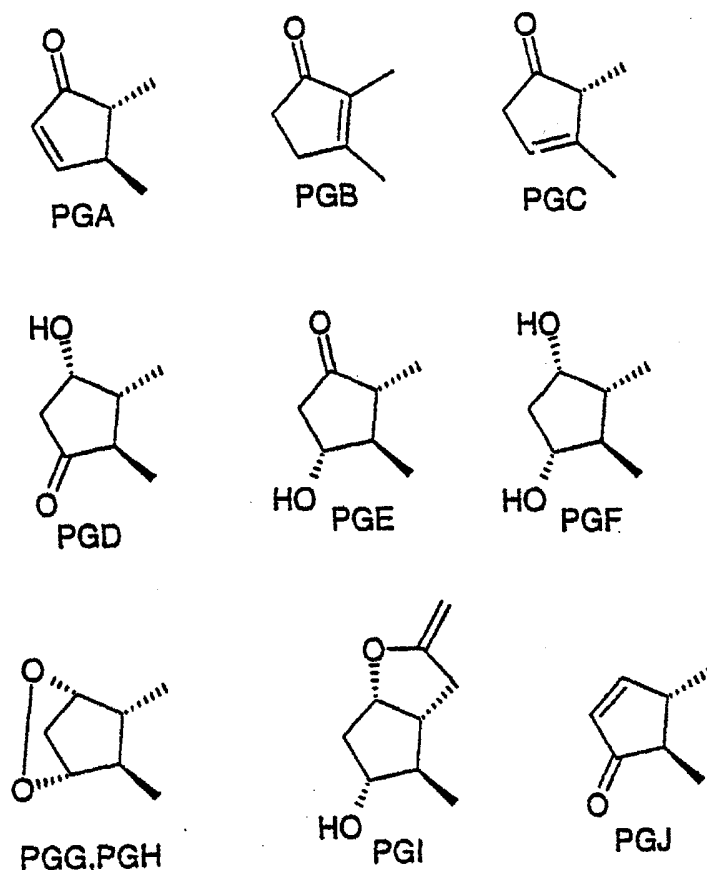
příhláškách, například v US 4,599,353 (Bito), US 4,952,581 (Bito), WO89/03384 (Resul a Stjemschantz), EP 170258 (Cooper), EP 253094 (Goh) a v EP 308135 (Ueno).

Prostaglandiny jsou mastné kyseliny, obvykle odvozené od prekursorů eikosatrienových, eikosatetraenových a eikosapentanových kyselin pomocí metabolických stupňů, zahrnujících oxidaci. Prostaglandiny, které se vyskytují v přírodě, mají obvykle obecnou strukturu, která je znázorněna na obr. 1.



Obr.1

Prostaglandiny nesou současně cyklopentanový kruh, ke kterému jsou navázány dva uhlíkaté řetězce, přičemž horní řetězec se obvykle nazývá „alfa řetězec“ a dolní řetězec se obvykle nazývá „omega řetězec“. Prostaglandiny se klasifikují do podskupin A, B, C, D, E, F, G, H, I a J podle jejich struktury substituentů na cyklopentanovém kruhu, jak je znázorněno na Obr. 2.



Obr. 2

Uvedený alfa řetězec znamená alifatický řetězec, který má 7 uhlíkových atomů, je zakončen karboxyskupinou, zatímco uvedený omega řetězec znamená alifatický řetězec s 8 uhlíkovými atomy, zakončený methylem. V závislosti na počtu dvojných vazeb v těchto řetězcích se dávají prostaglandinům dolní indexy 1 až 3. U prostaglandinů s indexem 1, například u $\text{PGF}_{1\alpha}$, je dvojná vazba umístěna mezi uhlíky 13 a 14 u omega řetězce a u přírodně se vyskytujících prostaglandinů má konfiguraci trans. U prostaglandinů s indexem 2, například. $\text{PGF}_{2\alpha}$, je další dvojná

vazba v konfiguraci cis situována mezi uhlíky 5 a 6 v alfa řetězci a nakonec u prostaglandinů s indexem 3 je třetí dvojná vazba situována mezi uhlíky 17 a 18 v omega řetězci. Tato dvojná vazba má také u přírodních prostaglandinů cis konfiguraci. Všechny přírodně se vyskytující prostaglandiny nesou hydroxylovou skupinu na uhlíku 15, což je důležité pro biologickou účinnost.

Receptorový systém pro prostaglandiny, vyskytující se v přírodě, byl objasněn teprve nedávno. Většina prostaglandinových receptorů již byla farmakologicky charakterizována a jejich molekulová struktura identifikována technikami molekulární biologie (Coleman et al., 1994). Pro přírodně se vyskytující prostaglandiny existují specifické receptory. Receptory pro PGD, PGE, PGF, PGI₂ (prostacyklin) a TxA₂ (thromboxan) se zkracují jako DP, EP, FP, IP, a TP. Dále bylo ukázáno, že EP receptory se může dále dělit do čtyř skupin receptorů, jmenovitě EP₁, EP₂, EP₃, a EP₄ receptory. Specifické tkáně nebo buňky mohou exprimovat pouze několik málo nebo také mnoho receptorů, v závislosti na evolučním vývoji tohoto autakoidního systému u jednotlivých druhů. Tak například bylo prokázáno, že sval svěrače duhovky u kočky exprimuje především FP receptory, které jsou funkčně spojeny a zprostředkují kontrakci zřítelnice, zatímco odpovídající hladký sval oka skotu exprimuje EP₁ a TP receptory, přičemž aktivace jednoho z nich způsobí kontrakci svalu. Sloučenina, která se váže na specifický receptor a aktivuje je, se nazývá agonista, zatímco sloučenina, která se pouze váže na receptor, aniž by jej aktivovala, se nazývá antagonist.

S ohledem na praktickou použitelnost mnoha prostaglandinů a jejich derivátů jako vhodných účinných látek pro léčení glaukomu nebo okulární hypertenze, může být limitujícím

faktorem jejich schopnost způsobovat vzrůst pigmentace oční duhovky (Stjernschantz a Alm, 1996). Z těchto důvodů má barva duhovky v průběhu trvalého ošetřování u opic a u lidí tendenci tmavnout a měnit se na hnědou. To sice nemá zjevný negativní efekt při aplikaci léčiva, ale je jasná, že z kosmetického hlediska je to nevhodné, zejména u pacientů, kteří se léčí pouze na jedno oko. Bylo by žádoucí identifikovat prostaglandiny, které účinně redukuje intraokulární tlak bez zvýšení pigmentace duhovky coby vedlejšího příznaku.

Nyní jsme překvapivě zjistili, že prostaglandinové deriváty a jejich analogy, které jsou selektivními agonisty pro EP_1 podskupinu prostanoidních receptorů, splňují požadavky na prostaglandinový analogy, které jsou účinné pro snižování intraokulárního tlaku aniž by způsobovaly růst produkce pigmentu (melanogenézi) v duhovce. Na pozadí tohoto zjištění byla studie, která se snažila najít a identifikovat subtypy prostanoidních receptorů u melanocytů lidské rohovky, při které jsme zjistili, že tyto buňky exprimují ve svých buněčných membránách EP_1 , EP_2 , a EP_3 receptory, ale neexprimují EP a TP receptory. Dále jsme zkoumali snížení intraokulárního tlaku, způsobené několika relativně selektivními EP_1 agonisty a tak jsme našli tyto prostaglandinové analogy, které účinně a schopně redukuje intraokulární jak u koček, tak i u opic.

Z těchto důvodů je zjevné, že použitím selektivních agonistů EP_1 receptorů se dá snížit intraokulární tlak u primátů a tudíž také u lidí, bez zvýšení nebo pozorovatelného snížení melanogenéze jako vedlejšího účinku, jelikož pro produkci melaninu v buňkách (melanocytech) chybí specifické receptory nutné pro transmembránovou signalizaci do buněk. V současné době sice nemáme klinický důkaz, že takovéto selektivní EP_1

agonisté růst pigmentace duhovky nezpůsobují, neboť doba, nutná v vyvolání tohoto jevu je přes 6-12 měsíců a jedná se tudíž o extrémně dlouhodobé a drahé pokusy, které se navíc musejí provádět na primátech, avšak můžeme dedukovat z relevantních výsledků experimentů prováděných *in vitro*, že takovéto zvýšení pigmentace by se neprojevalo při absenci specifického signálního receptoru v buněčné membráně melanocytů.

Podle toho, co bylo shora uvedeno, vysoká selektivita nebo specifičnost na EP_1 receptor ve srovnání s jinými prostaglandinovými receptory v oku charakterizuje sloučeniny, které se mají použít při způsobu nebo pro kompozice podle vynálezu. Není třeba říkat, že větší stupeň selektivity určité sloučeniny na EP_1 receptor znamená, že se s touto sloučeninou získají lepší výsledky, a určité výhody se pochopitelně dosáhnou v případech interakce s jinými receptory. Vysoká selektivita tohoto spojení znamená, že vliv na EP_1 receptor je minimálně 5 krát, v určitých případech 10 krát a někdy dokonce více než 100 krát nebo 1000 krát účinnější, než vliv na jiné prostaglandinové receptory.

Specifické prostaglandinové analogy, které jsme použili jako příklady provedení vynálezu, jsou $PGF_{2\beta}$ (1), $PGF_{2\beta}$ isopropyl ester (2), 17-fenyl-18,19,20-trinor- PGE_2 (3), 17-fenyl-18,19,20-trinor- PGE_2 isopropyl ester (4), 15(R,S)-16,16-trimethylen- PGE_2 (5), 15(R,S)-16,16-trimethylen- PGE_2 methyl ester (6) a 13,14-dihydro-17-(3-fluorfenyl)-18,19,20-trinor- PGE_2 -isopropyl ester (7). Veškeré tyto analogy jsou relativně selektivními agonisty EP_1 receptorů. Profily testovaných sloučenin pro receptory jsou uvedeny v tabulce I.

Tabulka I. Receptorové profily testovaných prostaglandinových analogů (hodnoty EC-50 jsou vyjádřeny v molech/l při testech na funkci receptorů).

Prostaglandin	FP	EP ₁	EP ₂	EP ₃	DP/IP	TP
1	5×10^{-6}	10^{-6}	10^{-5}	$>10^{-4}$	$>10^{-3}$	
	$>10^{-3}$					
3	10^{-7}	2×10^{-8}	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$		$>10^{-4}$
	$>10^{-4}$					
5	2×10^{-5}	6×10^{-9}	2×10^{-7}	3×10^{-8} #	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$
7	6×10^{-7}	4×10^{-8}	5×10^{-5}	10^{-6} #	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$

odhady založené na rozdílu v receptorových testech mezi hodnotami získanými testováním na chámovodu morčat a na kuřecím ileu.

Vynález se podle jednoho aspektu týká použití selektivních agonistů receptoru prostaglandinu EP₁ bez melanogenního efektu pro léčení glaukomu nebo okulární hypertenze. Tento způsob léčení glaukomu nebo okulární hypertenze zahrnuje krok, při kterém se na povrch oka působí kompozicí, obsahující EP₁ selektivní prostaglandin, jak je shora uvedeno, v množství schopném snížit intraokulární tlak, s cílem snížit tento tlak a udržet jej na snížené úrovni. Kompozice obvykle obsahu znamená si 0,1-100 µg, zejména 1-30 µg na jednu aplikaci účinné látky. Kompozice se aplikuje povrchově na oko 1-3 krát denně.

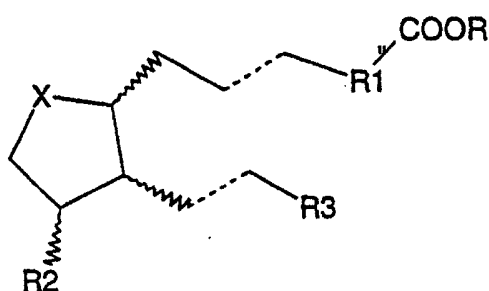
Derivát prostaglandinu se mísí s oftalmologicky snášitelným, o sobě známým vehikulem. Vehikulum, které se může použít pro přípravu kompozic podle vynálezu zahrnuje

vodné roztoky, např. fyziologický roztok, olejové roztoky nebo masti. Vehikulum může dále obsahovat oftalmologicky kompatibilní ochranné prostředky jako je například benzalkonium chlorid, surfaktanty jako je polysorbat 80, liposomy nebo polymery, například methylcelulózu, polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon a hyaluronovou kyselinu; tyto přísady se dají použít pro zvýšení viskosity. Dále je také možné použít rozpustné nebo nerozpustné inertní přísady do léčiv.

Podle dalšího aspektu se vynález týká oftalmologických kompozic pro léčení glaukomu nebo okulární hypertenze, které obsahují analog prostaglandinu, který je selektivním agonistou EP_1 receptorů, jak je definováno shora, v množství snižujícím intraokulární tlak, a oftalmologicky přijatelný nosič. Účinné množství obvykle obsahuje dávku asi 0,1-100 μg derivátu prostaglandinu v asi 10-50 μl kompozice. Kompozice podle vynálezu jsou čistá vylepšení oproti prostaglandinovým kompozicím podle známého stavu techniky, neboť mají oproti jiným prostaglandinovým sloučeninám aktivním pro EP_1 receptory vyšší selektivitu a současně je u nich riziko pigmentace odstraněno nebo alespoň podstatně sníženo.

Podle dalšího aspektu se vynález týká použití prostaglandinových analogů pro farmaceutických prostředků pro léčení glaukomu a okulární hypertenze.

Výhodně jsou prostaglandinový analogy odvozeny od PGF nebo PGE typu prostaglandinů. Zejména jsou prostaglandinový analogy vyjádřitelné obecným vzorcem:



kde:

vlnité vazby znamenají α nebo β konfiguraci a přerušované vazby představují jednoduchou vazbu, trojnou vazbu nebo dvojnou vazbu v cis nebo trans konfiguraci;

R je vodík, nasycený nebo nenasycený alkyl, zejména C_{1-10} alkyl, cykloalkyl, výhodně C_{3-5} cykloalkyl, arylová, arylalkyl, výhodně arylová- C_{2-5} alkyl, nebo heteroaryl;

R_1 znamená nasycenou nebo nenasycenou alkylovou skupinu, která má 2-5 uhlíkových atomů, popřípadě přerušenou by heteroatomy vybranými ze skupiny, do které patří kyslík, síra a dusík, cykloalkyl, výhodně C_{3-7} cykloalkyl, cykloalkenyl, výhodně C_{3-7} cykloalkenyl, arylová nebo heteroaryl;

X je C-OH nebo C=O;

R_2 je vodík, hydroxy, methyl, ethyl, methoxy nebo $OCOR_4$, kde R_4 znamená lineární nebo rozvětvenou nasycenou nebo nenasycenou alkylovou skupinu, výhodně C_{1-10} alkyl, zejména C_{1-5} alkyl, nebo a cykloalkyl, výhodně C_{3-8} cykloalkyl, nebo arylová skupina;

R_3 znamená lineární nebo rozvětvenou nasycenou nebo nenasycenou alkylovou skupinu, výhodně mající 3-8 uhlíkové atomy, zejména 3-5 uhlíkové atomy, popřípadě přerušenou jedním nebo více heteroatomy vybranými ze souboru, do kterého patří kyslík, síra a dusík, přičemž každý uhlíkový atom popřípadě může být substituován substituentem vybraným ze souboru, do kterého

patří C_{1-5} alkyl, hydroxy a karbonylové skupiny, přičemž hydroxyl a karbonyl je výhodně připojený k uhlíku 15 prostaglandinové struktury a uvedená alkylová skupina popřípadě obsahuje cykloalkyl, výhodně C_{3-8} cykloalkyl, arylovou nebo heteroarylovou skupinu, která může být mono- nebo nezávisle vícenásobně substituovaná C_{1-3} alkyl, C_{1-3} alkoxy, hydroxy, nitro, trifluormethyl nebo halogen; nebo a farmaceuticky přijatelnou sůl nebo ester některé z těchto sloučenin.

Aryl je výhodně substituovaný nebo nesubstituovaný fenyl.

Příkladem heteroarylových skupin jsou thiofen, furan, thiazol, isothiazol, oxazol, isoxazol, pyridin, pyrazin, pyrimidin, pyridazin.

Aryl, heteroaryl a cykloalkyl může být mono- nebo nezávisle di- nebo multisubstituovaný C_{1-3} alkylem, C_{1-3} alkoxyskupinou, hydroxyskupinou, nitroskupinou, trifluormethylem nebo halogenem.

Nenasycený alkyl může obsahovat jednu nebo více dvojných a/nebo trojných vazeb.

Halogen je fluor, chlor, brom nebo jod, zejména fluor, chlor nebo brom.

Prostaglandiny mohou být ve formě epimerních směsí nebo ve formě jednotlivých epimerů.

Vynález je ilustrován formou následujících neomezuujících příkladů:

Příklady provedení

Identifikace prostaglandinových receptorů. Prostaglandinové receptory byly identifikovány s použitím metody reakčního řetězce reverzní transkriptázy polymerázy (RT-PCR). Specifické priméry byly vytvořeny pro receptory FP, EP₁, EP₂, EP₃ a TP. Priméry použité v testech jsou uvedeny v tabulce II. RT-PCR byl vytvořen na mRNA izolované z kultury lidských melanocytů duhovky. Pro přípravu mRNA byly použity namnožené buňky. RT-PCR mix byl analyzován na agarozovém gelu a podíly s očekávanou velikostí byly klonovány a sekvencovány. Dedukované sekvence byly analyzovány na podobnost pro každou sekvenci každého prostaglandinového receptoru.

Metody. Melanocyty lidské duhovky byly izolovány a kultivovány podle Hu et al. (1993) a použity ve výchozích stupních. Buňky byly namnoženy na dostatečné množství a zpracovány pro obohacení mRNA.

mRNA byla izolována s použitím Dynalova mRNA přímého systému (Dynal A/S, Norway) podle instrukcí výrobce. Při obohacení bylo použito 100,000-200,000 lidských melanocytových buněk. mRNA se kovalentně naváže na oligo-dT značené perličky Dyna. S použitím reverzní transkriptázy se syntetizuje první linie cDNA přímo na perličkách „Dynabead“ s oligo-dT jako reverzní transkriptázovým primérem. Druhá linie cDNA se syntetizují s použitím známé 3' sekvenčního priméru z příslušného prostaglandinového receptoru, což má za následek dvojité vinutou cDNA. Pro každý receptor RT-PCR byl použit stejný soubor perliček „Dynabead“. Receptorově specifické priméry byly použity pro PCR zesílení DNA z cDNA vázané na Dynabead podle instrukcí výrobce. Pro reakce FP a EP₃ receptorů byla PCR

upravena do výsledného objemu 50 μ l přidáním 5% DMSO, 200 μ M dNTP a 20 pmolů každého priméru. Pro jiné receptory byl použit nový start s peletami AmpliWax (Perkin Elmer, USA) ve finálním objemu 75 μ l s 5% DMSO, 200 μ M dNTP a 20 pmoly každého priméru.

Tabulka II. Specifické priméry prostaglandinového receptoru.

FP priméry:

Primární priméry; CAC AAC CTG CCA GAC GGA AAA C a CCA GTC TTT GAT GTC TTC TGT G

Sekundární priméry; CAG TAA TCT TCA TGA CAG TGG G a TTG TAG AAA CAC CAG GTC CTG G

EP₁ priméry:

primární priméry; TGT GGC ATG GCC GTG GAG a ACC AAC ACC AGC ATT GGG C

sekundární priméry; CTG CAG GGA GGT AGA GCT C a GGC ACG TGG TGC TTC ATC G

EP₂ priméry:

primární priméry; CAA CCA TGC CTA TTT CTA CAG C a TCT CGC TCC AAA CTT GGC TG

sekundární priméry; CTA CGT GGA CAA GCG ATT GGC a TGG TTG ACG AAC ACT CGC AC

EP₃ priméry:

primární priméry; GGG ATC CAA GAT CTG GTT CAG a GCC TTC CCG ATC ACC ATG CTG

sekundární priméry; CGC AAG AAG TCG TTC CTG CTG a CAC CAA GTC CCG GGC CAC TG

TP priméry:

primární priméry; CTG GTG ACC GGT ACC ATC GTG GTG T a GTA GAT CTA CTG CAG CCC GGA GCG C

sekundární priméry; TCG CTA CAC CGT GCA ATA CC a GGC TGG AGG GAC AGC GAC

PCR mix z těchto reakcí byl analyzován na 1% LMP agarózovém gelu (BioRad Laboratories, USA). DNA fragmenty očekávané velikosti byly TA-klonovány s použitím TA-klonovací soupravy instrukcí výrobce (Invitrogen Inc., USA), a sekvencovány s použitím systému „Applied Biosystem Model 373A DNA sequencing system“ (Applied Biosystems Inc., USA) podle protokolu Applied Biosystems pro jejich soupravu „Taq Dye Dioxo Terminator cykle sequencing kit“. Generovaná primární data byla zpracována na počítači VAX s použitím programů pro analýzu sekvencí od Genetics Computer Group Inc., Madison, USA (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12 (1): 387-395 (1984).

Výsledky: V melanocytech lidské duhovky na základě našeho RT-PCR jsme mohli prokázat expresi FP, EP₂ a EP₃ receptorů. Nicméně, nebyli jsme schopni prokázat přítomnost EP₁ a TP receptorů (Tabulka III). Jako pozitivní kontroly jsme zesílili očekávané EP₁ a TP fragmenty z knihovny cDNA, z lidských ledvin, se stejnými priméry. Obohatili jsme poly A mRNA z melanocytů lidské rohovky, izolované ve dvou různých časech a prováděn pomocí PCR reakcí několikrát se stejnými výsledky.

Tabulka III. RT-PCR (sekundární PCR priméry) mRNA melanocytů lidské duhovky s použitím specifických primérů prostaglandinových receptorů (viz Tabulka II).

Gen	Přesná velikost fragmentu (bp)		Analýza sekvence
	Pozorováno	Očekáváno	
FP	+	489	shodná s FP
EP ₁	-	397	-
EP ₂	+	501	shodná s EP ₂
EP ₃	+	372	shodná s EP ₃
TP	-	484	-

SYNTÉZY PROSTAGLANDINOVÝCH DERIVÁTU

Struktury výsledných sloučenin, připravených v příkladech jsou znázorněny na schematu 1, umístěném na konci pcpisu.

Příklad 1: $\text{PGF}_{2\beta}$ (sloučenina 1)

Titulní sloučenina byla koupena od Cayman Chemicals Company, Ann Arbor Michigan, USA.

Příklad 2: $\text{PGF}_{2\beta}$ isopropyl ester (sloučenina 2)

DBU (163,5 mg, 1,01 mmol) byl přidán k míchanému roztoku $\text{PGF}_{2\beta}$ (Cayman Chemicals) (60 mg, 0,169 mmol) v acetonu (20 ml) při 0 °C. Směs byla ponechána ohřát na pokojovou teplotu, při které byl po kapkách přidán isopropyljodid (222,6 mg, 1,34 mmol). Po 48 h (TLC monitoring) byla směs rozpuštěna v ethylacetátu (40 ml), promyta solankou (30 ml), kyselinou citrónovou 3% (2x40 ml) a hydrogenuhličitanem sodným 5% (2x30 ml) a sušena nad bezvodým síranem sodným. Poté bylo rozpouštědlo odstraněno ve vakuu a zbytek byl chromatografován na silikagelu s pomocí ethylacetát:aceton 3:1 jako eluentu. To poskytlo a bezbarvý olej, výtěžek 46 mg (68%). ^1H NMR (CDCl_3) δ 1,3 (d, 6H), 1,6-1,7 (dm, 4H), 2,0-2,2 (dm, 6H), 2,3 (t, 2H), 4,0-4,1 (m, 3H), 5,0 (sept, 1H), 5,5 (m, 2H), 5,6 (m, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 135,9, 132,2, 130,5, 128,0, 75,3, 74,8, 72,85, 67,6, 56,23, 52,25, 51,59, 42,32, 37,35, 33,44, 31,74, 29,14, 26,66, 24,79, 22,6, 21,8, 14,03.

Příklad 3: 17-Fenyl-18,19,20-trinor-PGE₂ (sloučenina 3)

Titulní sloučenina byla koupena od Cayman Chemicals Company, Ann Arbor Michigan, USA.

Příklad 4: 17-Fenyl-18,19,20-trinor-PGE₂ isopropyl ester (sloučenina 4)

DBU (43,5 mg, 0,29 mmol) v acetonitrilu (1 ml) byl přidán po kapkách k míchanému roztoku sloučeniny 3 (22,1 mg, 0,057 mmol) v acetonitrilu (3 ml) při 0 °C. Směs byla ponechána ohřát na pokojovou teplotu, při které byl přidán po kapkách isopropyljodid (78,0 mg, 0,46 mmol) v acetonitrilu (2 ml). Po míchání po dobu 12 h (TLC monitoring), byla reakční směs zředěna vodou (8 ml), směs byla extrahována ethylacetátem (2x50ml), a extrakt byl promyt solankou (10 ml), kyselinou citrónovou 3% (10 ml), a na závěr hydrogenuhličitánem sodným 5% (10 ml). Po sušení bezvodým síranem sodným, bylo rozpouštědlo odstraněno ve vakuu a zbylý olej byl chromatografován na silikagelu s pomocí ethylacetát jako eluentu. To poskytlo 230 mg produktu (69%) titulní sloučeniny jako bezbarvý olej: R_f = 0,516 (ethylacetát:aceton:HOAc 1:1:0,02); ¹H NMR (CDCl₃) δ 0,89 (m, 3H), 1,3 (d, 6H), 2,6-2,8 (m, 2H), 4,1 (m, 2H), 5,0 (m, 1H), 5,3-5,7 (dm, 4H), 7,2 (m, 5H). ¹³C NMR (CDCl₃) δ 10,9, 13,9, 21,8, 22,9, 23,8, 24,49, 24,8, 25,17, 25,6, 26,68, 28,93, 30,45, 31,77, 33,90, 34,01, 34,07, 38,8, 46,22, 53,3, 54,48, 66,83, 67,62, 68,18, 71,77, 72,21, 76,35, 77,00, 77,2, 77,64, 125,93, 126,46, 128,39, 128,44, 128,79, 130,63, 130,81, 131,04, 137,79, 213,88.

Příklad 5: 15RS-16,16-trimethylen-PGE₂ (sloučenina 5)

K míchanému roztoku methylesteru 15RS-16,16-trimethylen-PGE₂ (52 mg, 0,13 mmol) v acetonu (0,4 ml) a fosforečnanového pufru o pH 7 (4 ml) byla přidán lipáza VII (40 mg). Směs byla míchána při pokojové teplotě po dobu 24 h (TLC monitoring). Směs byla zředěna ethanolem (3 ml) a extrahována ethylacetátem (2x 10 ml). Organická vrstva byla promyta solankou, sušena (síranem sodným), a zahuštěna ve vakuu, což poskytlo 46 mg produktu v podobě oleje.

Příklad 6: 15RS-16,16-trimethylen-PGE₂ methyl ester (sloučenina 6)

Syntéza 15RS-16,16-trimethylenprostaglandin E₂ (Skotnicki, S. et al. 1977) je schematicky znázorněna na schématu 2.

Dále uváděná čísla sloučenin znamenají příslušné struktury, znázorněné ve schématu 2.

Ethyl 2,2-trimethylenhexanoát (9)

K míchanému roztoku N-isopropylcyklohexylaminu (56,2 g, 398 mmol) v THF (400 ml) při -78 °C byl rychle přidán n-BuLi (159 ml, 398 mmol 2,5 M v hexanu). K výslednému roztoku byl přidán po kapkách ethyl cyklobutankarboxylát (8) (50 g, 390 mmol) a míchán po dobu 30 min, pak zahřát na 0 °C a přikapán k roztoku n-butyliodidu (159 ml, 398 mmol v 2,5 molu hexanu) v DMSO (200 ml). Reakční směs byla míchána po dobu 1 h při pokojové teplotě (TLC monitoring). Sůl byla odstraněna filtrací a filtrát byl zahuštěn pod vakuem. Zbytek byl rozpuštěn v hexanu a

promyt HCl 2%, solankou a vodou, pak sušena nad síranem scdným, a odpařen ve vakuu. Zbylý olej byl destilován (49-56 °C, 1 mmHg) což poskytlo 26,5 g (37%) produktu.

^1H NMR (CDCl_3) δ 0,9 (t, 3H), 1,2 (t, 3H), 1,8-2,0 (dm, 5H), 2,2-2,5 (m, 3H), 4,2 (m, 2H).

2,2-Trimethylenhexan-1-ol (10)

K míchanému roztoku ethyl 2,2-trimethylenhexanoát (9) (26,5 g, 144mmol) v suchém toluenu (100 ml) byl přidán po kapkách DIBAL-H (206 ml, 289 mmol 1,4 mot v toluen) při 0 °C. Výsledný roztok byl míchán při pokojové teplotě po dobu 3 h (TLC monitoring) a pak byl nalit do ledové HCl 5%. Organická vrstva byla oddělena a promyta HCl 5%, solankou, sušena, filtrována a zahuštěna, což poskytlo 30 g produktu v podobě oleje. ^1H NMR (CDCl_3) δ 0,9 (t, 3H), 1,8-2,0 (dm, 5H), 2,5 (m, 1H), 3,0 (m, 1H), 3,6 (m, 2H).

2,2-Trimethylenhexaldehyd (II)

K roztoku 2,2-trimethylenhexan-1-olu (10) (30 g, 210 mmol), v DME (400 ml), byl přidán dicyklohexankarbodiimid (DCC) (130 g, 630 mmol), DMSO (120 ml) a ortofosforečná kyselina (10,3 g). Směs byla míchána při pokojové teplotě po dobu 3 h (TLC monitoring), a filtrována. Filtrát byl rozpuštěn v dichlormethanu (300 ml), a promyt vodou. Organická vrstva byla oddělena. Zbytek byl odstraněn filtrací. Filtrát byl promyt solankou (100 ml), sušen a zahuštěn ve vakuu. Zbytek byl zahuštěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s pomocí hexanu jako eluentu, což poskytlo titulní produkt (17,3 g) jako olej. ^1H NMR (CDCl_3) δ 0,9 (t, 3H), 1,2 (t, 3H), 1,8-2,0 (dm, 5H), 8,8 (s, 1H).

4,4-Trimethylen-1-oktin-3-ol (12)

K roztoku lithium acetylid-ethylendiaminového komplexu (12,2 g, 132 mmol) v DMSO (10 ml) byl přidán roztok 2,2-trimethylen-hexaldehydu (I_1) (17 g, 120 mmol) v DMSO (20 ml) při 0 °C pod N_2 . Směs byla míchána při pokojové teplotě po dobu 24 h (TLC monitoring) a pak nalita do ledem chlazené směsi HCl 2% (50 ml) a éteru (50 ml). Organická vrstva byla oddělena a vodná vrstva byl extrahován éterem (50 ml), spojené organické fáze byly promyty solankou, sušeny, filtrovány a zahuštěny ve vakuu. Zbytek byl chromatografován na silikagelu s pomocí směsi hexan:ethylacetát 5:1 jako eluentu, což poskytlo 12 (7,6 g, 38%) v podobě oleje.

E-Tributylcín-4,4-trimethylen-1-okten-3-ol (13)

Směs 4,4-trimethylen-1-oktin-3-olu (12) (5,0 g, 30 mmol), tributylcín hydridu (14,6 ml, 54,2 mmol) a AIBN (30 mg) byla míchána při 130 °C po dobu 24 h (TLC monitoring). Zbytek byl chromatografován na silikagelu s pomocí hexanu a směsi hexan:éter 9:1, jako eluentů, což poskytlo titulní sloučeninu (13) (12,54 g, 91,4%) jako olej.

E-Tributylcín-4,4-trimethylen-3-trimethylsilyloxy-1-okten (14)

Ke směsi E-tributylcín-4,4-trimethylen-1-okten-3-ol (13) (7 g, 15,3 mmol) v DMF (100 ml) byl přidán imidazol (2,1 g, 30,6 mmol) a trimethylsilyl chlorid (2,5 g, 23,0 mmol). Reakční směs byla míchána při pokojové teplotě po dobu 1 h (TLC monitoring). Směs byla rozdělena mezi vodu (200 ml) a éter (200 ml). Organická fáze byl sušen a odpařen ve vakuu. Zbytek byl

chromatografován na silikagelu pomocí hexanu jako eluentu, což poskytlo sloučeninu 14 (5,53 g).

11,15-bis trimethylsilyloxy-16,16-trimethylen-5,6-didehydro-PGE₂ methyl ester (17)

Suchá 100-ml tříhrdlá baňka vybavená magnetickým míchadlem byla naplněna kyanidem mědným (928 mg, 10,4 mmol). Baňka byla uzavřena gumovou blánou a zahřívána pod vakuem za účelem odstranění veškerých stop vody, načež byla ochlazená na 0 °C pod N₂ a byl přidán suchý THF a následně methyllithium (14 ml, 22,4 mmol 1,6 mol v diethyléteru), přičemž se použilo injekční stříkačky. Směs byla míchána při 0 °C po dobu 15 minut, v průběhu kterých se suspenze vyčeřila a stala se homogenní. Poté byl injekční stříkačkou při 0 °C přidán roztok E-tributylcín-4,4-trimethylen-3-trimethylsilyloxy-1-oktenu (14) (5,9 g, 11,2 mmol) v THF (10 ml) a směs byla míchána při pokojové teplotě po dobu 30 min. K výslednému roztoku a roztoku 4-(t-butyldimethylsilyloxy)cyklopentenonu (15) (1,7 g, 8 mmol) v THF (6 ml) byl přidán trimethylsilylchlorid (4,35 g, 40 mmol) a následně triethylamin (8,1 g, 80 mmol), při -70 °C a směs byla míchána při -70 °C dalších 15 minut a pak ještě dalších 15 min při 0 °C. Směs byla rozdělena mezi hexan (600 ml) a vodou (300 ml). Organická vrstva byla oddělena, sušena nad síranem sodným, filtrována a zahuštěna ve vakuu, což poskytlo surový silylenol éter jako čirý olej. K míchanému roztoku takto získaného silylenol éteru v THF (50 ml), pod N₂, bylo přidáno při -30 °C methyllithium (7,7 ml, 12,3 mmol 1,6 mol v diethyléteru) a směs byla míchána po dobu 30 min s následným přidáním čerstvě připraveného methyl-1-triflat-2-hexinoátu (16) (Erhardt, P.W., et al. 1987; Caldwell A. G., et al. 1979) a směs byla míchána při -40 °C po dobu 5 min. Výsledný roztok byl zředěn nasyceným vodným

roztokem chloridu amonného (30 ml) a extrahován éterem (3x100 ml), sušen nad síranem sodným, filtrován a zahuštěn ve vákuu. Zbytek byl chromatografován na silikagelu s pomocí směsi hexan:ethylacetát (1:1) jako eluentu, což poskytlo čirý olej a směs 15RS isomerů (2,71 g, 57,3%) $R_f = 0,36$ (SiO_2 , éter:hexan 1:1). ^1H NMR CDCl_3) δ 0,2 (dm, 12H), 0,8-0,9 (ms, 18H), 1,8 (m, 2H), 2,3 (m, 4H), 3,7 (s, 3H), 3,9-4,1 (dm, 2H), 5,5S.6 (2H). ^1H NMR byla také prováděna na desilylovaném analogu, 16,16-trimethylen-S,6-didehydro-PGE₂ methyl ester. ^1H NMR (CDCl_3) δ 0,9 (t, 3H), 1,21,3 (m, 3H), 1,9-2,1 (m, 4H), 3,7 (s, 3H), 4,1 (m, 2H), 5,6-5,9 (dm, 2H).

11,15-bis Trimethylsilyloxy-16,16-trimethylen-PGE₂ methyl ester

K míchanému roztoku methyl esteru 11,15-bis-trimethylsilyloxy-16,16-trimethylen-5,6-didehydro PGE₂ (17) (500 mg, 0,8 mmol), ve směsi benzen:cyklohexan 1:1 (50 ml), byl přidán Pd-BaSO₄ (250 mg) a chinolin (250 mg) a směs byla míchána při -40 °C pod H₂ atmosférou po dobu 5 h (TLC monitoring). Reakční směs byla rozpuštěna v éter a filtrována přes celit, a zahuštěn ve vákuu. Zbytek byl chromatografován na silikagelu s pomocí směsi hexan:ethylacetát 9:1, což poskytlo 442 mg odpovídajícího produktu.

16,16-Trimethylen-PGE₂ methyl ester (6)

K roztoku methylesteru 11,15-bis trimethylsilyloxy-16,16-trimethylen-PGE₂ (374 mg, 0,589 mmol) v THF (18 ml) byl přidán HF 40% (3,5 ml) v THF (1 ml) při 0 °C. Reakční směs byla míchána po dobu 5 h (TLC monitoring) a pak byla nalita do směsi hydrogenuhličitanu sodného 5% (30 ml) a ethylacetátu (50 ml). Organická vrstva byla oddělena a vodná vrstva byla promyta

ethylacetátem (2x30 ml). Organické vrstvy byly spojeny, sušeny nad síranem sodným a zahuštěny ve vakuu. Zbytek byl chromatografován na silikagelu s pomocí směsi hexan/ethylacetát 1:1 a následně samotným ethylacetátem, což poskytlo 6 (75 mg, 31%), v podobě oleje.

^1H NMR (CDCl_3) δ 0,9 (t, 3H), 1,3 (t, 6H), 2,0-2,6 (m, 9H), (dm, 5H), 3,6 (s, 3H), 4,1 (m, 2H), 5,4 (m, 2H), 5,6-5,8 (dm, 2H);

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 14,222, 14,9, 23,7,

24,7, 25,2, 26,2, 26,5, 26,6, 26,8, 29,7, 33,4, 36,5, 44,9, 46,0, 51,6, 54,0, 54,6, 71,9, 76,7, 77,06, 77,1, 77,38, 126,5, 126,9, 127,7, 130,9, 132,5, 132,9, 133,36, 133,46, 174,15, 214,32.

Příklad 7: Syntéza 13,14-dihydro-17-(3-fluorfenyl)-18,19,20-trinor PGE_2 isopropyl esteru (sloučenina 7)

Syntéza titulní sloučeniny je schematicky znázorněna na schematu 3. Dále uvedená čísla sloučenin odpovídají strukturám, znázorněným ve schematu 3.

Dimethyl-(2-oxo-4-(3-fluorfenylbutyl) fosfonát

K míchané suspenzi hydridu sodného (4,17 g, 138 mmol) předběžně promyté n-pentanem, v suchém THF (250 ml) byl při pokojové teplotě přidán po kapkách roztok dimethyl-2-oxo-propylfosfonát (23,12 g, 132,3 mmol) v THF (110 ml). Reakční směs byla míchána po dobu 2 h, pak ochlazená v ledové lázni a podrobena působení roztoku n-BuLi (10,2 g, 158,7 mmol) v hexanu, což způsobilo změnu zbarvení roztoku na tmavě hnědou. V míchání se pokračovalo po dobu 2 h při 0 °C, s následným přidáváním 3-fluorbenzylbromidu (25 g, 132,3 mmol) v THF (50 ml) po kapkách. Reakční směs byla postupně zahřáta na pokojovou teplotu a po 3 h (TLC monitoring), byla zředěna

10% HCl (20 ml). Pak byla směs nalita do vody s ledem (200 ml), extrahována CHCl_3 (2x150 ml), organické vrstvy byly spojeny, promyty solankou (150 ml), chromatografvány na silikagelu s pomocí CH_2Cl_2 a poté EtOAc jako eluentů, což poskytlo 19,5 g a lehce žlutého oleje. $R_f = 0,37$ (silikagel, EtOAc:aceton 1:1)

(1S,5R,6R,7R)-6-Formyl-7-(4-fenylbenzoyloxy)-2-oxabicyklo-(3,3,0)-oktan-3-on (19)

K roztoku alkoholu 18 (19,0 g, 53,9 mmol) v DME (100 ml), ochlazenému na 18 °C, byl přidán dicyklohexylkarbodiimid (DCC) (33,3, 161,8 mmol), DMSO (38,2 ml) a fosforečná kyselina (1,43 ml, 21,28 mmol). Teplota reakční směs byla udržována pod 25 °C po dobu 30 min. Reakční směs byla míchána při pokojové teplotě další 2 hodiny (TLC monitoring) a sraženina byla odstraněna filtrací a promyta éterem (2x50 ml). Spojená organická vrstva byla promyta vodou (50 ml) a solankou (2x50 ml), vodný roztok byl extrahován éterem (100 ml), organické vrstvy byly spojeny a sušeny nad síranem sodným, filtrovány a použity přímo v následujícím stupni. TLC $R_f = 0,37$ (silikagel, EtOAc:toluen 2:1).

(1S,5R,6R,7R)-6-{3-Oxo-5-(3-fluorfenyl)-1-E-pentenyl}-7-(4-fenyl benzoyloxy)-2-oxabicyklo[3,3,0]oktan-3-on (20)

K míchané suspenzi NaH (1,9 g, 65,1 mmol), předběžně promyté n-pentanem v DME (130 ml) pod dusíkovou atmosférou, byl přidán po kapkách dimethyl-2-oxo-4-(3-fluorfenyl) butylfosfonát (Wadsworth, Jr., W. S., et al. 1961) (19,3 g, 70,5 mmol), v DME (100 ml) a směs byla živě míchána po dobu 1 h při pokojové teplotě. Směs byla pak ochlazena to -10 °C a po kapkách byl přidán roztok surového aldehydu 19. Po 30 minutách

při 0°C a 2 h při pokojové teplotě (TLC monitoring) byla reakční směs zneutralizována kyselinou octovou, rozpouštědlo bylo odstraněno ve vakuu a zbytek byl rozpuštěn v EtOAc (200 ml) a promyt vodou (50 ml) a solankou (50 ml). Organická vrstva byla sušena nad bezvodým síranem sodným, filtrována a odpařen ve vakuu. Zbytek byl rozmíchan v éteru (100 ml); výsledná bílá sraženina byla filtrována a promyta studeným éterem, což poskytlo bílou krystalickou látku ve výtěžku (17 g, 58,5%)

R_f = 0,56 (silikagel, ethylacetát : toluen 2:1)

(1S,5R,6R,7R)-6-(3S-3-Hydroxy-5-(3-fluorfenyl)-1-pentenyl)-7-(4-fenylbenzoyloxy)-2-oxabicyklo[3,3,0]oktan-3-on (21)

K míchanému roztoku enonu 20 (17,1 g, 34,3 mmol) v THF (20 ml) a hydrátu chloridu ceritého (CeCl₃·7H₂O) (3,8 g, 10,3 mmol) ve směsi THF:éter 1:2 (60 ml) ochlazenému na -20 °C pod dusíkovou atmosférou byl po malých podílech přidán borohydrid sodný (0,8 g, 20,57 mmol). Reakční směs byla míchána po dobu 2 h (TLC monitoring). Teplota byla zvýšena na °C, pak byla směs zředěna vodou (20 ml) a přidáním vodného roztoku 10% HCl byla její reakce upravena na pH=4, načež byla extrahována EtOAc (50 ml). Organická vrstva byla oddělena a promyta solankou, sušena nad bezvodým síranem sodným, zahuštěna ve vakuu a chromatografována dvakrát na silikagelu s pomocí směsi toluen:EtOAc 2:1 a následně 1:1 jako eluentu, což poskytlo sloučeninu 4 (5 g) jako bílý krystalický produkt R_f = 0,32 (silikagel, EtOAc/toluen 2:1).

(1S,5R,6R,7R)-6-{3R-3-Hydroxy-5-(3-fluorfenyl)-1-pentyl}-7-(4-fenyl benzoyloxyl-2-oxabicyklo[3,3,0]oktan-3-on (22)

K suspenzi 10% Pd/C (0,1 g) v dusitanu sodném (3,6 ml, 1,8 mmol) a ethanolu (15 ml) byl přidán roztok sloučeniny 21 (3 g, 6,0 mmol) v ethanolu (6,0 ml). Směs byla míchána pod vodíkovou atmosférou po dobu 6 h (TLC monitoring) a zředěna pomocí 1M roztoku HCl. Katalyzátor byl odstraněn filtrací přes celitové lože a promyt absolutní methanolem (15 ml). Rozpouštědlo bylo odstraněno ve vakuu. Výsledný olej byl rozpuštěn v EtOAc (100 ml) a promyt solankou o koncentraci 15% (30 ml). Vodná fáze byla promyta EtOAc (40 ml). Spojené organické extrakty byly sušeny nad síranem sodným a filtrovány. Rozpouštědlo bylo odstraněno pod vakuem. Zbytek byl chromatografován na silikagelu s pomocí EtOAc jako eluentu, což poskytlo sloučeninu 5 (2,94 g), $R_f = 0,25$ (silikagel, EtOAc).

(1S,5R,6R,7R)-6-{3R-3-Hydroxy-5-(3-fluorfenyl)-1-pentyl}-7-R-hydroxy-2-oxabicyklo[3,3,0]oktan-3-on (23)

K roztoku laktonu 22 (2,8 g, 5,65 mmol) v methanolu (15 ml) byl přidán uhličitán draselný (0,47 g, 3,3 mmol) a směs byla míchána při okolní teplotě po dobu 6 h (TLC monitoring). Směs byla zneutralizována pomocí 10% vodného roztoku HCl a extrahována pomocí EtOAc (2x30 ml). Organická fáze byla sušena nad bezvodým síranem sodným a odpařena do sucha. Surový produkt byl chromatografován na silikagelu s pomocí EtOAc:aceton 1:1 jako eluentu. Titulní sloučenina 23 byla získána jako bílý krystalický produkt; výtěžek 1,6 g, $R_f = 0,17$ (silikagel, EtOAc); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1,2-1,4 (m, 1H), 1,54 (m, 3H), 1,8 (m, 3H), 2,1 (m, 1H), 2,2 (m, 1H), 2,3 (m, 1H), 2,6 (m, 2H), 2,67 (m,

1H), 2,8 (m, 2H), 3,60 (m, CH₂CHOHCH₂), 4,0 (m, CHOH) 4,92 (m, CHOC=O), 6,8-7,0 (m, 3H), 7,28 (m, 1H).

(1S,5R,6R,7R)-6-(3R-3-t-butyldimethylsilyloxy-5-[3-fluorfenyl]-1-pentyl)-7-R-terc.butyldimethylsilyloxy-2-oxabicyklo[3,3,0]oktan-3-ol (24)

t-Butyldimethylsilyl chlorid (2,3 g, 14,9 mmol) byl přidán v jediném podílu přidán k roztoku diolu 23, triethylaminu (2,1 ml, 14,8 mmol) a 4-dimethylaminopyridinu (0,06 g, 0,1 mmol) v dichlormethanu (20 ml) a aplikovalo se živé míchání při pokojové teplotě po dobu 24 h. Reakční směs byla zahuštěna ve vakuu. Surový produkt byl rozpuštěn v ethylacetátu (50 ml), promyt vodou (20 ml) a 5% vodného roztoku hydrogenuhličitanem sodným (20 ml). Organická fáze byla sušena nad síranem sodným, filtrována a zahuštěna ve vakuu. Zbytek byl chromatografován na silikagelu s pomocí dichlormethanu jako eluentu, což poskytlo 3 g produktu jako olej. R_f=0,68 (silikagel, éter)

(1-S.5R,6R,7R)-6-{3R-3-t-butyl dimethylsilyloxy-5-(3-fluorfenyl)-1-pentyl}-7-R-terc.butyl dimethylsilyloxy-2-oxabicyklo[3,3,0]oktan-3-ol (25)

Roztok diisobutylaluminium hydridu (DIBAL) (1,1 g, 7,43 mmol) v suchém toluenu (5,3 ml) byl přidán po kapkách k míchanému roztoku laktonu 24 (2,7 g, 4,95 mmol) v suchém THF (30 ml) při -72/-80 °C. Po 1 h (TLC monitoring) byla reakční směs zředěna methanolem (5 ml) a byl zahřát na pokojovou teplotu a byla přidána voda (50 ml) a 10% vodný roztok HCl (50 ml). Získaná směs byla extrahována pomocí EtOAc (2x50 ml). Organická vrstva byla sušena síranem sodným, filtrována, rozpouštědlo bylo odstraněno ve vakuu, a zbytek byl

chromatografován na silikagelu s pomocí EtOAc a dále směsí EtOAc:aceton 1:1, jako eluentu, což poskytlo žlutý olejovitý produkt (2,7 g), $R_f = 0,85$ (silikagel, ethylacetát 1:1).

13,14-Dihydro-11,15-di-t-butyldimethylsilyloxy-17-(3-fluorfenyl)-
18,19,20-trinorPGF_{2α}

K míchané suspenzi 4-karboxybutyltrifenyl fosfonium bromidu (8,78 g, 19,82 mmol) v THF (50 ml) pod dusíkovou atmosférou při 0-5 °C byl přidán t-butoxid draselný (3,89 g, 34,6 mmol) a směs míchán po dobu 30 min. při pokojové teplotě. K výslednému červenooranžovému roztoku byl při -15/-10 °C přidán laktol 25 (2,7 g, 4,95 mmol) v THF (10 ml), a směs byla míchán po dobu 3-4 h (TLC monitoring). Reakční směs byla rozpuštěna v vodou (30 ml) a promyta éter (4x40 ml). Vodná vrstva byla okyselena pomocí 5% vodného roztoku kyseliny citrónové na pH 4 a extrahována pomocí EtOAc (2x50 ml). Organická fáze byla promyta solankou (30 ml), sušena nad síranem sodným a zfiltrována. Rozpouštědlo bylo odstraněno ve vakuu a kaše sloučeniny 26 byla použita přímo bez izolace pro další krok.

13,14-Dihydro-11,15-di-t-butyldimethyl silyloxy 17-(3-fluorfenyl)-
18,19,20-trinor PGF_{2α} isopropyl ester (27)

DBU (5,28 g, 34,7 mmol) byl přidán po kapkách k míchanému roztoku surového produktu 26 (3,16 g, 4,96 mmol) v acetonu (20 ml) při 0 °C. Směs byla ponechána ohřát na pokojovou teplotu a byl přidán po kapkách isopropyl jodid (5,05 g, 29,7 mmol). Po 4 h (TLC monitoring) byla směs rozpuštěna v EtOAc (100 ml), promyta solankou (30 ml), kyselinou citrónovou 3% (2x25 ml) a hydrogenuhličitanem sodným 5% (2x25 ml) a sušena nad

bezvodým síranem sodným. Rozpouštědlo bylo odstraněno ve vákuu a zbytek byl chromatografován na silikagelu s pomocí směsi éter:petroléter 1:2 jako eluentu. To poskytlo bezbarvý olej, výtěžek 1,7 g, $R_f = 0,43$ (silikagel, éter:petroléter 1:2) ^1H NMR (CDCl_3) δ 0,1 (m, 9H), 0,9 (m, 16H), 1,2 (m, 9H), 1,6-1,8 (mm, 10H), 2,12 (m, 2H), 2,22-2,33 (m, 2H), 2,6-2,9 (dm, 2H), 3,65 (m, $\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2$), 3,94 (m, CH_2CHOH), 4,16 (m, CH_2CHOH), 5,0 (sept. 1H), 5,38 (m, db), 5,47 (m, db), 6,8-7,0 (dm, Ar, 3H), 7,2 (m, Ar, 1H).

13,14-Dihydro-11,15-di-t-butyldimethylsilyloxy 17-(3-fluorfenyl)-18,19,20-trinor PGE₂ isopropyl ester (28)

Pyridin dichlorchromát (2,43 g, 11,25 mmol) na oxidu hlinitém (20 g) byl přidán v malých podílech k roztoku sloučeniny 27 (1,7 g, 2,5 mmol) v dichlormethanu (30 ml) a takto získaná směs byla míchána při pokojové teplotě (TLC monitoring), filtrována, promyta směsí éter:ethylacetát 2:1. Pak bylo rozpouštědlo odstraněno ve vákuu. Zbytek byl rozpuštěn v éteru (100 ml) a promyt vodou (30 ml), 5% vodného roztoku NaHCO_3 (3x20 ml), organická fáze byla oddělena a sušena nad síranem sodným, a odpařena ve vákuu, což poskytlo 28 (1,3 g), v podobě oleje. $R_f = 0,72$ (silikagel, ethylacetát).

13,14-Dihydro-17-(3-fluorfenyl)-18,19,20-trinor PGE₂ isopropyl ester

k roztoku sloučeniny 28 (314 mg) byl přidán fluorovodík v acetonitrilu 15% (12 ml). Směs byla míchána při pokojové teplotě po dobu 4 h (TLC monitoring). Reakční směs byla rozpuštěna v ethylacetátu (100 ml) a promyta vodou (3x20 ml), pak sušena a odpařena ve vákuu. Zbytek byl chromatografován na

silikagelu s pomocí ethylacetátu jako eluentu, což poskytlo sloučeninu 7 (64 mg) v podobě oleje, $R_f=0,43$ (silikagel, ethylacetát). ^1H NMR (CDCl_3) δ 1,2 (d, 6H), 1,6-1,8 (m, 6H), 1,8 (m, 2H), 2,12 (m, 2H), 2,2-2,3 (m, 2H), 2,6-2,8 (dm, 2H), 3,6 (m, $\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2$), 4,16 (m, CH_2CHOH), 5,0 (sept. 1H), 5,38 (m, db), 5,47 (m, db), 6,8-7,0 (dm, Ar, 3H), 7,2 (m, Ar, 1H).

Farmakologie

Snížení intraokulárního tlaku u koček a u opic vlivem testovaných sloučenin.

Sloučeniny byly testovány na schopnost snižovat intraokulární tlak na zvířecích modelech. Intraokulární tlak byl měřen pomocí kalibrovaného pneumotonometru. Jako pokusná zvířata byly použity evropské domácí kočky a opice rodu cynomolgus. Rohovka byla před měřením znecitlivěna pomocí oxibuprokainu. Snížení intraokulárního tlaku po topickém ošetření isopropylesterem $\text{PGF}_{2\beta}$ (2), isopropyl esterem 17-fenyl-18,19,20-trinor- PGE_2 (4), methyl esterem 15RS-16,16-trimethylenu (6) a isopropyl esterem 13,14-dihydro-17-(3-fluorfenyl)-18,19,20-trinor- PGE_2 (7) jsou uvedena v tabulkách IV a V.

Tabulka IV. Snížení intraokulárního tlaku při aplikaci 1-10 μg testovaných sloučenin s účinkem na EP_1 prostanoidní receptor, u koček. Kontrolní oko obdrželo pouze vehikulum.

(n= 5-6; průměr $\pm$ -směrodatná odchylka).

Prostaglandin/ Oko	Normální tlak (mmHg)	Tlak 3 h po ošetření (mmHg)
2		
Experimentální oko	24,2 $\pm$ 2,3	15,1 $\pm$ 2,8
Kontrolní oko	24,5 $\pm$ 2,7	22,5 $\pm$ 3,4
4		
Experimentální oko	22,0 $\pm$ 1,7	14,2 $\pm$ 1,7
Kontrolní oko	21,5 $\pm$ 1,7	18,7 $\pm$ 1,9
6		
Experimentální oko	19,2 $\pm$ 1,7	9,5 $\pm$ 0,5
Kontrolní oko	19,3 $\pm$ 1,7	17,0 $\pm$ 1,3
7		
Experimentální oko	20,4 $\pm$ -2,0	14,2 $\pm$ 0,9
Kontrolní oko	20,6 $\pm$ -1,8	18,4 $\pm$ 1,5

* $p < 0,01$ (stanoveno párovým t-testem mezi testovanými oky)

Tabulka V. Snížení intraokulárního tlaku aplikací testovaných sloučenin s účinkem na EP₁ receptor, u opic. Dávka isopropyl esteru PGF_{2β}- byla 30 µg, zatímco dávka isopropyl esteru 17-fenyl-18,19,20-trinor-PGE₂ a isopropyl esteru 15RS-16,16-trimethylen-PGE₂ byla 3 µg. Kontrolní oko obdrželo pouze vehikulum (n=6; průměr±směrodatná odchylka).

Prostaglandin/ oko	Základní tlak (mmHg)	Tlak 4 h po ošetření (mmHg)
2		
Experimentální oko	17,8 ± 1,4	14,1 ± 1,8
Kontrolní oko	16,9 ± 1,2	17,5 ± 2,0
4		
Experimentální oko	14,1 ± 1,1	9,9 ± 0,9
Kontrolní oko	13,9 ± 1,0	11,5 ± 0,8
6		
Experimentální oko	20,9 ± 1,6	15,3 ± 2,4
Kontrolní oko	21,3 ± 1,5	19,0 ± 1,5

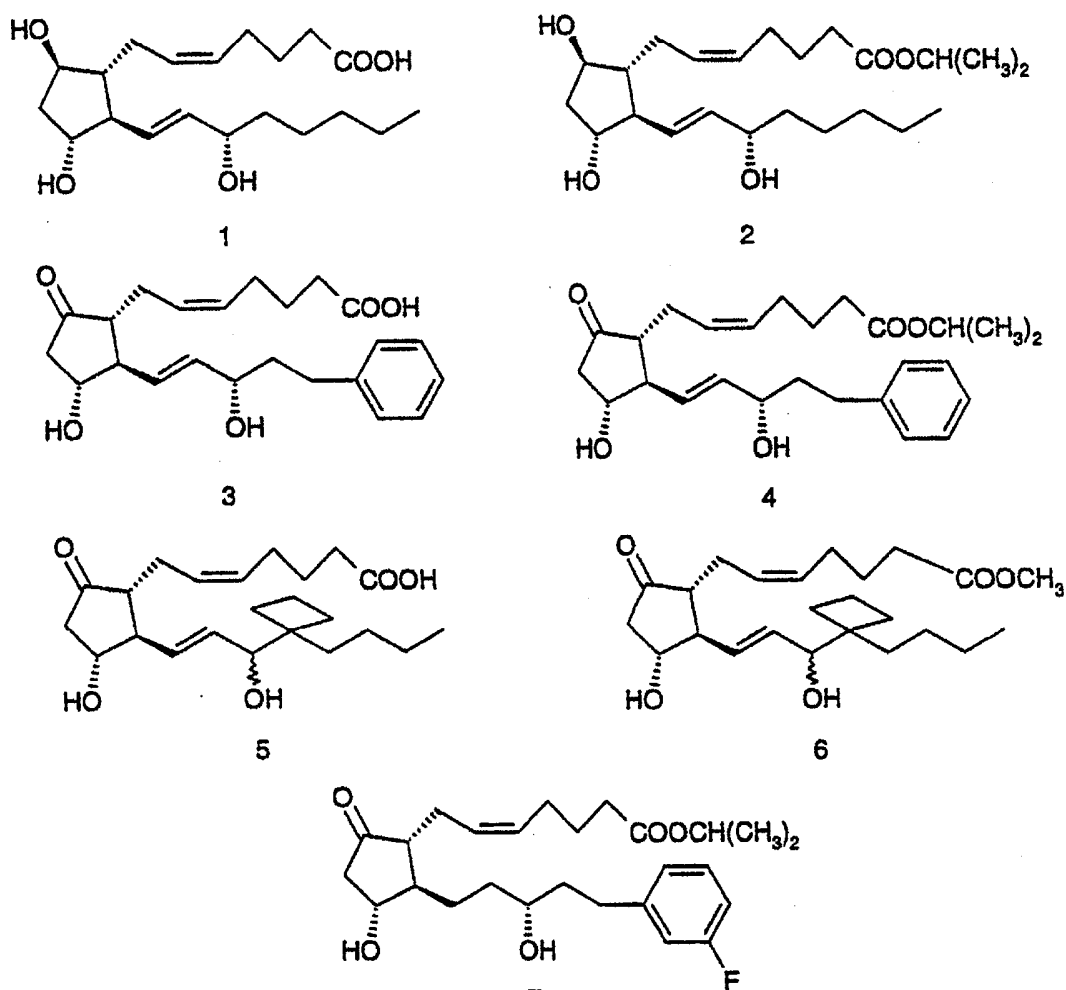
* p<0,05 (stanoveno párovým t-testem mezi testovanými oky)

Lze vidět, že jak u koček, tak u opic snižují všechny prostaglandinové analogy, které mají preferenci pro EP₁ receptor, signifikantně intraokulární tlak.

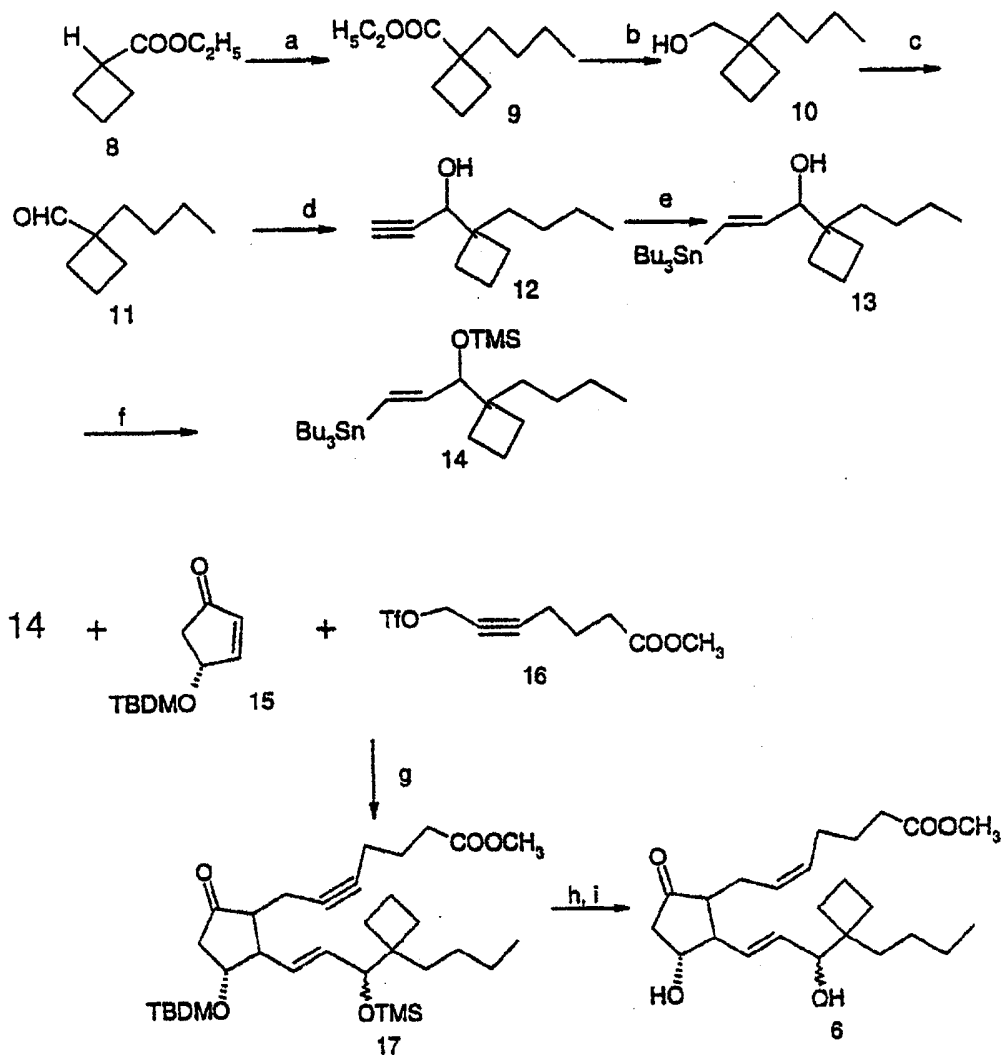
V souladu s tím vynález zveřejňuje, že sloučeniny selektivně stimulující EP₁ receptory snižují intraokulární tlak, a že takovéto

sloučeniny nemohou mít žádný melanogenní efekt, nebo alespoň mají signifikantně snížený vliv na buňky, produkující pigmentu v oku, melanocyty, nemající EP₁ receptor, u člověka man. Tudíž obvyklý vedlejší účinek, který se projevuje zvýšením pigmentace duhovky, se může eliminovat v průběhu terapie pomocí prostaglandinů, selektivních pro EP₁ receptory.

Schema 1



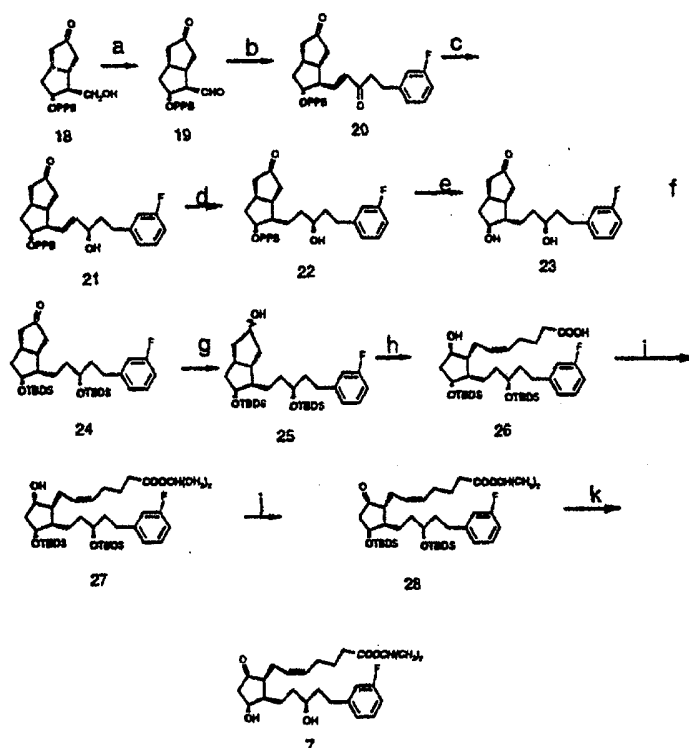
Schema 2



Reagenty:

- N-isopropylcyklohexylamin/THF, n-BuLi, ethylcyklobutankarboxylát/DMSO
- DIBAL-H/toluen
- DCC/DME, DMSO, H_3PO_4 ,
- Lithiumacetylidethylendiamin, DMSO
- tributylcínhydrid, AIBN
- Trimethylsilyl chlorid (TMSCl), imidazol/DMF
- $\text{Li}_2\text{CuCN}(\text{CH}_3)_2$, TMSCl, triethylamin, 4-t-butyldimethylsilyloxy-2-cyklopentenon, 1-tributylcín-4,4-trimethylen-3-trimethylsilyloxy-1-okten, methyl-2-in-8-oktanoát
- Pd-BaSO_4 , chinolin,
- HF/THF

Schema 3



Reagenty

- a. DCC, DMSO, H_2SO_4 , DME, H_3PO_4
- b. NaH, dimethyl-2-oxo-4-(3-fluorfenyl)-butylfosfonát
- c. NaBH_4 , $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$
- d. Pd/C. NaNO_2/THF
- e. $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{Methanol}$
- f. TBDMS, TEA, 4-dimethylamino pyridin/dichlormethan
- g. DIBAL-H/THF
- h. 4-karboxybutyl trifenyl fosfonium bromid, t-butoxid draselný, THF
- i. DBU, isopropyljodid/acetone
- j. pyridinium chlorochromát, oxid hlinitý/dichlormethan
- k. HF/acetonitril

Odkazy

Bill, A. (1975). Blood circulation and fluid dynamics in the eye. *Physiol. Rev.* 55; 383-417.

Coleman, R.A., Smith, W.L. a Narumiya, S. (1994). VIII. International Union Pharmacology classification prostanoid receptors: Properties, distribution a structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.* 46; 205-229.

Crawford, K., a Kaufman, P.(1987). Pilocarpine antagonizes $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induced ocular hypotension in monkeys. *Arch. Ophthalmol.* 105; 1112-1116.

Ernhardt, P.W, Owens, A. H. (1987) Facile Formation Quaternary azetidinium compounds During Triflation of Dialkylamino-propanols. *Synth. Commun.* 17, 469475.

Caldwell, A., G., Hams, C. J., Stepny, R., Whittaker, N. (1979). Hydantoin Prostaglandin analogues, Potent and Selective Inhibitors Platelet Aggregation. *J. C. S. Chem. Commun.* 561.

Skotnicki, S., Schaub, E., Weiss, J. (1977). Prostaglandins and congeners. 14. Synthesis and Bronchodialator Activity dl-16,16-trimethyleneprostaglandins. *J. Med. Chem.* 20, 1042.

Hu, D-N. et al. (1993). *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 34; 22102219.

Nilsson, S.F.E., Samuelsson, M., Bill, A., a Stjernschantz, J. (1989). Increased uveoscleral outflow as possible mechanism

ocular hypotension caused by prostaglandin F2 α -isopropyl ester in cynomolgus monkey. Exg. Eye Res. 48; 707716.

Stjernschantz, J., Selen, G., Sjoquist, B., a Resul, B. (1995). Preclinical pharmacology latanoprost. Advances in the Prostaglandin, Thromboxane a Leukotriene Research 23; 513-518.

Stjernschantz, J. a Alm, A. (1996). Latanoprost as a new horizon in the medical management of glaucoma Current Opinion in Ophthalmology 7; 2: 11-17.

Toris, C., Camras, C.B., a Yablonski, M.E. (1993). Effects PhXA41, a new prostaglandin F2 α analogue, on aqueous humour dynamics in human eyes. Ophthalmology 10; 1297-1304.

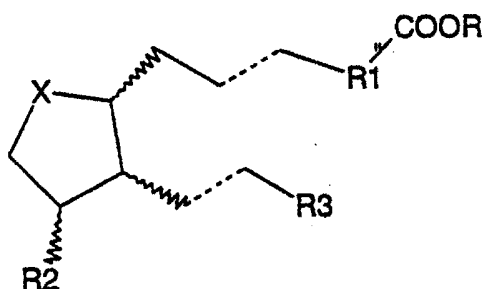
Wodswarth, Jr., W. S., Emmon, W. D. (1961). The Utility Phosphonate Carbanions in Olefin Synthesis. J. Am. Chem. Soc. 83, 1733.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Kompozice pro léčení glaukomu a okulární hypertenze, zahrnující terapeuticky aktivní fyziologicky přijatelné množství prostaglandinového analogu, který je selektivním agonistou pro EP₁ prostanoidní receptory, nebo farmaceuticky přijatelnou sůl nebo ester některé z těchto sloučenin.

2. Kompozice podle nároku 1, vyznačující se tím, že prostaglandinový analog je odvozen od prostaglandinového typu PGF nebo PGE.

3. Kompozice podle nároku 1 nebo 2, vyznačující se tím, že prostaglandinový analog je a sloučenina obecného vzorce:



ve kterém:

vlnovité vazby znamenají α nebo β konfiguraci, čárkované vazby znamenají jednoduchou vazbu, trojnou vazbu nebo dvojnou vazbu v cis nebo trans konfiguraci;

R je vodík, nasycený nebo nenasycený alkyl, výhodně C₁₋₁₀ alkyl, cykloalkyl, výhodně C₃₋₈ cykloalkyl, arylová, arylalkyl, výhodně arylová-C₂₋₅alkyl, nebo heteroaryl;

R_1 znamená nasycenou nebo nenasycenou alkylovou skupinu mající 2-5 uhlíkovými atomy, popřípadě přerušenu by a heteroatomy vybrané ze souboru, do kterého patří kyslík, síra a dusík, cykloalkyl, výhodně C_{3-7} cykloalkyl, cykloalkenyl, výhodně C_{3-7} cykloalkenyl, aryl nebo heteroaryl;

X je C-OH nebo C=O;

R_2 je vodík, hydroxy, methyl, ethyl, methoxy nebo $OCOR_4$, kde R_4 znamená lineární nebo rozvětvenou nasycenou nebo nenasycenou alkylovou skupinu, výhodně C_{1-10} alkyl, zejména C_{1-6} alkyl, nebo cykloalkyl, výhodně C_{3-8} cykloalkyl, nebo arylová skupina;

R_3 znamená lineární nebo rozvětvenou nasycenou nebo nenasycenou alkylovou skupinu, výhodně mající 3-8 uhlíkovými atomy, zejména 3-5 uhlíkových atomů, popřípadě přerušenu jedním nebo více heteroatomy vybranými ze souboru, do kterého patří kyslík, síra a dusík, přičemž každý uhlíkovými atom popřípadě může být substituován substituentem, vybraným ze souboru, do kterého patří C_{1-5} alkylové, hydroxylové a karbonylové skupiny, přičemž hydroxyl a karbonyl může být výhodně připojený k uhlíku 15 prostaglandinové struktury a uvedená alkylová skupina popřípadě obsahuje cykloalkyl, výhodně C_{3-8} cykloalkylovou, arylovou nebo heteroarylovou skupinu, která může být mono- nebo nezávisle vícenásobně substituovaná C_{1-3} alkylem, C_{1-3} alkoxyem, hydroxy, nitroskupinou, trifluormethylem nebo halogenem;

nebo farmaceuticky přijatelná sůl nebo ester některé z těchto sloučenin.

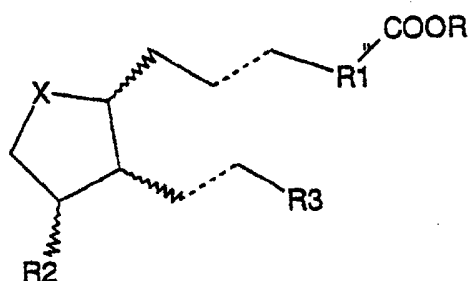
4. Kompozice podle nároku 1, 2 nebo 3, ve kterém prostaglandinový analog je 15(R,S)-16,16-trimethylen-PGE₂ nebo jeho alkyl ester.

5. Kompozice podle nároku 1, 2 nebo 3 vyznačující se tím, že prostaglandinový analog je 13,14-dihydro-17-(3-fluorfenyl)-18,19,20-trinor-PGE₂ nebo jeho alkyl ester.

6. Způsob léčení glaukomu nebo okulární hypertenze v oku subjektu, přičemž tento způsob zahrnuje uvedení povrchu oka do kontaktu s účinně intraokulární tlak snižujícím, terapeuticky aktivním a fyziologicky přijatelným prostaglandinovým analogem, který je selektivním agonistou pro EP₁ prostanoidní receptory, nebo a farmaceuticky přijatelnou solí nebo esterem některého takového analogu.

7. Způsob podle nároku 6, vyznačující se tím, že prostaglandinový analog je odvozen od PGF nebo PGE prostaglandinů.

8. Způsob podle nároku 6 nebo 7, vyznačující se tím, že prostaglandinový analog znamená sloučenina obecného vzorce:



ve kterém:

vlnovité vazby znamenají α nebo β konfiguraci, čárkované vazby znamenají jednoduchou vazbu, trojnou vazbu nebo dvojnou vazbu v cis nebo trans konfiguraci;

R je vodík, nasycený nebo nenasycený alkyl, výhodně C_{1-10} alkyl, cykloalkyl, výhodně C_{3-8} cykloalkyl, aryl, arylalkyl, výhodně aryl- C_{2-5} alkyl nebo heteroaryl;

R_1 znamená nasycenou nebo nenasycenou alkylovou skupinu, mající 2-5 uhlíkovými atomy, popřípadě přerušenou heteroatomy vybranými ze souboru, do kterého patří kyslík, síra a dusík, cykloalkyl, výhodně C_{3-7} cykloalkyl, cykloalkenyl, výhodně C_{3-7} cykloalkenyl, arylová nebo heteroaryl;

X je C-OH nebo C=O;

R_2 je vodík, hydroxy, methyl, ethyl, methoxy nebo $OCOR_4$, kde R_4 znamená lineární nebo rozvětvenou nasycenou nebo nenasycenou alkylovou skupinu, výhodně C_{1-10} alkyl, zejména C_{1-6} alkyl, nebo a cykloalkyl, výhodně C_{3-8} cykloalkyl, nebo arylovou skupinu;

R_3 znamená lineární nebo rozvětvenou nasycenou nebo nenasycenou alkylovou skupinu, výhodně mající 3-8 uhlíkových atomů, zejména 3-5 uhlíkových atomů, popřípadě přerušenou jedním nebo více heteroatomy, vybranými ze souboru, do kterého patří kyslík, síra a dusík, přičemž každý uhlíkovými atom může být popřípadě substituován substituentem, vybraným ze souboru, do kterého patří C_{1-5} alkylové, hydroxylové a karbonylové skupiny, přičemž hydroxy a karbonyl může být výhodně připojený k uhlíku 15 prostaglandinové struktury a uvedená alkylová skupina popřípadě obsahuje cykloalkyl, výhodně C_{3-8} cykloalkyl,

arylová nebo heteroaryl skupina, která může být mono- nebo nezávisle vícenásobně substituovaná C_{1-3} alkylem, C_{1-3} alkoxykem, hydroxykem, nitroskupinou, trifluormethylem nebo halogenem;

nebo a farmaceuticky přijatelnou sůl nebo ester některé z těchto sloučenin.

9. Kompozice podle nároku 6, 7 nebo 8, vyznačující se tím, že prostaglandinový analog je 15(R,S)-16,16-trimethylen-PGE₂ nebo jeho alkyl ester.

10. Kompozice podle nároku 6, 7 nebo 8 vyznačující se tím, že prostaglandinový analog je 13,14-dihydro-17-(3-fluorfenyl)-18,19,20-trinor-PGE₂ nebo jeho alkyl ester.

11. Způsob podle některého z nároků 6-10, vyznačující se tím, že terapeuticky aktive a fyziologicky přijatelná kompozice, obsahující uvedený prostaglandinový analog se podává povrchově na oko 1-3 krát denně.

12. Použití prostaglandinového analogu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, který je selektivním agonistou pro EP₁ prostanoidové receptory, pro přípravu léku k léčení glaukomu a okulární hypertenze.