

(11) Número de Publicação: **PT 1816121 E**

(51) Classificação Internacional:
C07C 405/00 (2007.10) **A61K 31/5575**
(2007.10)
A61P 15/08 (2007.10) **A61P 19/10** (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2005.11.21**

(30) Prioridade(s):

(43) Data de publicação do pedido: **2007.08.08**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.03.17**
104/2008

(73) Titular(es):
BAYER SCHERING PHARMA
AKTIENGESELLSCHAFT
MÜLLERSTRASSE 178 13353 BERLIN **DE**

(72) Inventor(es):
WERNER SKUBALLA **DE**
DARYL FAULDS **US**
BERND BUCHMANN **DE**
BERNHARD LINDENTHAL **DE**
GERNOT LANGER **DE**

(74) Mandatário:
PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA
RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA **PT**

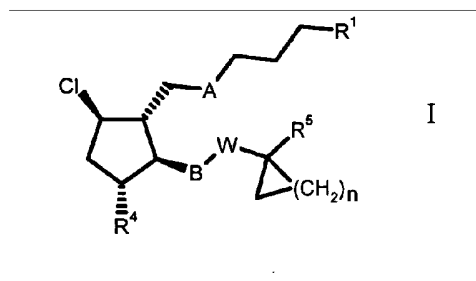
(54) Epígrafe: **DERIVADOS DE 9-CLORO-15-DESOXIPROSTAGLANDINA, PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO E SUA UTILIZAÇÃO COMO MEDICAMENTOS**

(57) Resumo:

RESUMO

"DERIVADOS DE 9-CLORO-15-DESOXIPROSTAGLANDINA, PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO E SUA UTILIZAÇÃO COMO MEDICAMENTOS"

A presente invenção refere-se a derivados de 9-cloroprostaglandina da fórmula I que podem ser vantajosos para o tratamento de problemas de fertilidade.



DESCRIÇÃO

"DERIVADOS DE 9-CLORO-15-DESOXIPROSTAGLANDINA, PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO E SUA UTILIZAÇÃO COMO MEDICAMENTOS"

A presente invenção refere-se a derivados de 9-cloroprostaglandina, processo para a sua preparação e sua utilização como medicamentos.

É há muito conhecido que as prostaglandinas são as moléculas essenciais nos processos de biologia reprodutiva feminina, tais como, por exemplo, controlo da ovulação, da fertilização, da nidadação, da decidualização (e. g., formação de placenta) e menstruação. Do mesmo modo, as prostaglandinas desempenham uma parte importante nas alterações patológicas no tracto reprodutor, incluindo menorragia, dismenorreia, endometriose e cancro. O mecanismo através do qual as prostaglandinas provocam estas alterações ainda não foi completamente elucidado. Os resultados recentes indicam que as prostaglandinas, seus receptores e suas vias de transdução de sinal estão envolvidas em processos, tais como angiogénese, apoptose e proliferação.

Os efeitos das prostaglandinas são mediados pelos seus receptores associados a proteína G, que estão localizados na superfície celular. A prostaglandina E_2 (PGE_2) é de particular interesse, com uma ampla variedade de efeitos celulares através da ligação de subtipos de receptores funcionalmente diferentes, nomeadamente, os receptores EP_1 , EP_2 , EP_3 e EP_4 . Assim, foi

possível demonstrar que as funções reprodutoras estão diminuídas em murganhos com EP₂ silenciado (EP₂) e que estes animais têm uma ninhada" mais pequena (Matsumoto et al., 2001, Biology of Reproduction 64, 1557-1565). Foi igualmente possível demonstrar que estes murganhos com EP₂ silenciado (Hizaki et al., Proc Natl Acad Sci U.S.A. 31 Aug 1999; 96(18):10501-10506) apresentam expansão de cumulus distintamente reduzida e subfertilidade grave, demonstrando o significado do receptor da prostaglandina EP₂ neste processo. Consequentemente, o receptor EP₂ representa um alvo importante no desenvolvimento de medicamentos para o controlo da fertilidade feminina. A subclasse 4 do receptor EP₂ abre a possibilidade do desenvolvimento direccionado de compostos PGE₂ selectivamente activos. No entanto, até ao momento, não são conhecidos praticamente nenhuns ligandos selectivos do receptor EP₂ e a maioria dos compostos conhecidos ligam-se também a outros subtipos do receptor EP₂, tais como, por exemplo, ao receptor EP₄.

A Patente europeia EP 1306087 descreve agonistas do receptor EP₂ que são utilizados no tratamento de disfunção eréctil. A mesma classe estrutural é descrita na Patente europeia EP 860430 e é reivindicada a sua utilização na produção de um medicamento para o tratamento de distúrbios imunológicos, asma e aborto. O pedido WO 04/32965 descreve os agonistas do receptor EP₂ que são utilizados para o tratamento e prevenção de distúrbios provocados por uma disfunção de órgão provocada por isquémia. O documento WO 04/009117 descreve agonistas do receptor EP₂ e EP₄ para o tratamento de distúrbios provocados por contracção.

Os pedidos WO 03/74483 e WO 03/09872 descrevem agonistas que se ligam igualmente ao receptor EP₂ e EP₄ (Ono Pharmaceuticals).

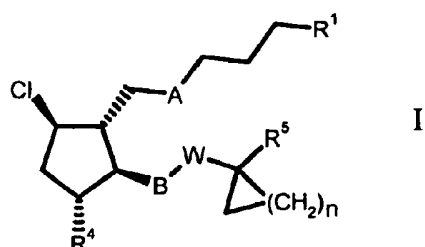
Os agonistas do receptor EP₂ e EP₄ são frequentemente descritos em associação com o tratamento de osteoporose (documentos WO 99/19300, US 2003/0166631, WO 03/77910, WO 03/45371, WO 03/74483 e WO 03/09872) e para o tratamento de glaucoma (documentos WO 04/37813, WO 04/37786, WO 04/19938, WO 03/103772, WO 03/103664, US 6747037, US 6410591, WO 03/40123, WO 03/47513, WO 03/47417).

O pedido de patente WO 04/12656 reivindica agonistas do receptor EP₂ em associação com inflamação.

O pedido de patente WO 03/77919 reivindica agonistas do receptor EP₄ para o tratamento de fertilidade. Até ao momento, ainda não foram descritos agonistas selectivos do receptor EP₂ que controlam os processos que contribuem, eventualmente, para a nidação e decidualização e, assim, para a promoção de fertilidade. O objectivo de proporcionar compostos estáveis, selectivos e eficazes que se liguem ao receptor EP₂ para o desenvolvimento de novos medicamentos surge a partir destes.

As Patentes europeias anteriormente mencionadas de Ono Pharmaceuticals (documentos EP 0030377 e EP 1306087) divulgam derivados de prostaglandinas com um átomo de cloro na posição 9. No entanto, os compostos reivindicados nestas patentes compreendem *inter alia* um grupo hidroxilo na cadeia lateral inferior, e. g., na posição 15 ou 16.

Foi demonstrado, de um modo surpreendente, que os compostos da fórmula geral I



onde

R^1 é um grupo CH_2OH , $-\text{COOR}^2$, $-\text{CONHR}^2$ ou $-\text{CONHR}^3$,

R^2 é um hidrogénio,

radical alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ que é linear ou ramificado, opcionalmente, mono- a polinsaturado e é opcionalmente mono- a polissubstituído com halogéneo, alcoxilo $\text{C}_1\text{-C}_4$, arilo $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ substituído ou aroílo $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ opcionalmente substituído, di-alquil $\text{C}_1\text{-C}_5$ -amino ou tri-alquil $\text{C}_1\text{-C}_5$ -amino substituído

um cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ que é opcionalmente substituído com alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$, um arilo $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ que é opcionalmente substituído com fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo que, por sua vez, pode ser substituído na posição 3 e na posição 4 por flúor, cloro, alcoxilo ou trifluorometilo ou na posição 4 por hidroxilo, halogéneo, fenilo, um ou mais grupos alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$, clorometilo, fluorometilo, trifluorometilo, carboxilo, hidroxilo ou alcoxilo $\text{C}_1\text{-C}_4$,

ou um heterocicloalquilo-C₃-C₇,

R³ é um ácido C₁-C₁₅-carboxílico ou ácido C₁-C₁₅-sulfónico,

A é um grupo *cis*-CH=CH- ou -CH₂-CH₂-,

B é um grupo *trans*-CH=CH- ou -CH₂-CH₂-,

W é um alquilenos C₂-C₆,

R⁴ é um grupo hidroxilo, um radical O-R⁶ ou O-R⁷, onde R⁶ é um radical tetra-hidropiraniilo, tetra-hidrofuraniilo, trimetilsililo, terc-butildimetilsililo, terc-butildifenilosililo ou tribenzilsililo e R⁷ é um ácido C₁-C₁₅-carboxílico,

R⁵ é um hidrogénio, um grupo alquilo C₁-C₁₀ ou alcenilo C₁-C₁₀,

n é o número 1-4,

e os seus sais e seus clatratos de ciclodextrina com bases fisiologicamente toleráveis,

superam as desvantagens conhecidas e, através da omissão do grupo hidroxilo, pode ser alcançada uma melhor selectividade para o receptor EP₂ e melhor actividade e duração de acção mais longa.

Os grupos alquilo são grupos alquilo lineares ou ramificados, radicais alquilo saturados ou insaturados com 1-10

átomos de carbono. Os exemplos que podem ser mencionados são grupos metilo, etilo, propilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, neopentilo, hexilo, heptilo, octilo, decilo, butenilo, isobutenilo, propenilo, pentenilo, benzilo, m- e p-clorobenzilo.

Os grupos alquilo podem ser, opcionalmente, mono- a polissubstituídos por átomos de halogéneo, e. g., flúor, cloro ou bromo, por grupos alcoxilo, tais como, por exemplo, grupos metoxilo, etoxilo, opcionalmente, com grupos arilo ou aroílo substituídos, e. g., fenilo, ou por dialquilamino, e. g., dimetilamino, dietilamino, dimetilaminopropilo e trialquilamónio, onde é preferida a monossustituição.

Os grupos arilo adequados são grupos arilo substituídos e não substituídos, tais como, por exemplo, fenilo, 1-naftilo e 2-naftilo, cada um dos quais pode ser substituído com 1-3 átomos de halogéneo, um grupo fenilo, 1-3 grupos alquilo, cada um com 1-4 átomos de C, um grupo clorometilo, fluorometilo, trifluorometilo, carboxilo, hidroxilo ou alcoxilo com 1-4 átomos de C.

O grupo cicloalquilo pode compreender 3-10 átomos de carbono no anel. Os anéis podem ser substituídos por grupos alquilo com 1-4 átomos de carbono. Exemplos que podem ser mencionados são ciclopentilo, ciclo-hexilo, metilciclo-hexilo e adamantilo. Os grupos heterocíclicos adequados são heterociclos com 5 e 6 membros que compreendem, pelo menos, 1 heteroátomo, de um modo preferido, azoto, oxigénio ou enxofre. Exemplos que podem ser mencionados são 2-furilo, 2-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, oxazolilo, tiazolilo, pirimidinilo, piridazinilo, pirazinilo, 3-furilo, 3-tienilo, 2-tetrazolilo.

Resíduos fisiologicamente toleráveis são adequados como resíduos ácidos. Os ácidos preferidos são ácidos carboxílicos orgânicos e sulfônicos com 1-15 átomos de carbono que pertencem às séries alifática, cicloalifática, aromática e heterocíclica. Exemplos de substituintes que podem ser mencionados são grupos alquiloC₁-C₁₅, hidroxilo, alcoxiloC₁-C₁₅, oxo e amino ou átomos de halogéneo. Exemplos de ácidos carboxílicos que podem ser mencionados são os seguintes: ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido valérico, ácido isovalérico, ácido capróico, ácido oenântico, ácido caprílico, ácido pelargônico, ácido cáprico, ácido undecílico, ácido láurico, ácido tridecílico, ácido mirístico, ácido pentadecílico, ácido trimetilacético, ácido dietilacético, ácido terc-butilacético, ácido ciclopropilacético, ácido ciclopentilacético, ácido ciclo-hexilacético, ácido ciclopropanocarboxílico, ácido ciclo-hexanocarboxílico, ácido fenilacético, ácido fenoxiacético, ácido metoxiacético, ácido etoxiacético, ácido mono-, di- e tricloroacético, ácido aminoacético, ácido dietilaminoacético, ácido piperidinoacético, ácido morfolinoacético, ácido láctico, ácido succínico, ácido adípico, ácido benzóico, ácidos benzóicos substituídos por halogéneo, grupos trifluorometilo, hidroxilo, alcoxilo ou carboxilo, ácido nicotínico, ácido isonicotínico, ácido furano-2-carboxílico, ácido ciclopentilpropiônico. Exemplos de ácido sulfônicos são ácido metanossulfônico, ácido etanossulfônico, ácido isopropanossulfônico, ácido β-cloroetanossulfônico, ácido butanossulfônico, ácido ciclopentanossulfônico, ácido ciclo-hexanossulfônico, ácido benzenossulfônico, ácido p-toluenossulfônico, ácido p-clorobenzenossulfônico, ácido N,N-dimetilaminossulfônico, ácido N,N-dietilaminossulfônico, ácido N,N-bis(β-cloroetil)aminossulfônico, ácido N,N-diisobutilaminossulfônico, ácido N,N-dibutilaminossulfônico,

ácido pirrolidino-, piperidino-, piperazino-, N-metilpiperazino- e morfolinossulfónico.

O grupo hidroxilo pode ser modificado funcionalmente, por exemplo, por eterificação ou esterificação.

Os resíduos de éter adequados são os resíduos conhecidos do especialista na técnica. É atribuída preferência a resíduos de éter que podem ser facilmente eliminados, tais como, por exemplo, os radicais tetra-hidropiraniilo, tetra-hidrofuraniilo, trimetilsililo, terc-butildimetilsililo, terc-butildifenilosililo ou tribenzilsililo.

Os radicais acilo adequados são os ácidos carboxílicos mencionados sob R⁷. Exemplos destes que podem ser mencionados pelo nome são acetilo, propionilo, butirilo e benzoílo.

Para a formação de sal são adequadas bases inorgânicas e orgânicas como conhecidas do especialista na técnica para a formação de sais fisiologicamente toleráveis. Exemplos que podem ser mencionados são hidróxidos de metais alcalinos, tais como hidróxidos de potássio e sódio, hidróxidos de metais alcalino terrosos, tal como hidróxido de cálcio, amónio, aminas, tais como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, N-metilglucamina, morfolina, tris(hidroximetil)etilamina etc.

Os compostos da fórmula geral I que mostraram ser particularmente eficazes são aqueles onde

R¹ é um grupo CH₂OH, -COOR², -CONHR² ou -CONHR³,

R² é um hidrogénio ou

um radical alquiloC₁-C₁₀ que é linear ou ramificado, opcionalmente, mono- a polinsaturado e é opcionalmente monossustituído com flúor, cloro ou bromo, por alcoxiloC₁-C₄, ariloC₃-C₁₀ substituído ou aroíloC₃-C₁₀ opcionalmente substituído, di-alquilC₁-C₅-amino ou tri-alquilC₁-C₅-amino opcionalmente substituído,

um cicloalquiloC₅-C₆ que é opcionalmente substituído com alquiloC₁-C₄,

um radical ariloC₃-C₁₀ que é opcionalmente substituído com fenilo que pode ser substituído na posição 3 ou 4 por flúor, cloro, alcoxilo ou trifluorometilo ou na posição 4 por hidroxilo,

um heterocicloalquiloC₅-C₆ que pode ser interrompido uma ou mais vezes com azoto, oxigénio ou enxofre,

R³ é um ácido C₁-C₁₀-carboxílico ou ácido C₁-C₁₀-sulfónico,

A é um grupo *cis*-CH=CH- ou -CH₂-CH₂-,

B é um grupo *trans*-CH=CH- ou -CH₂-CH₂-,

W é um alquilenoc₂-C₆,

R⁴ é um grupo hidroxilo,

R⁵ é um hidrogénio, um grupo alquiloC₁-C₆ ou alceniloC₁-C₁₀ e

n é o número 1-4.

Os compostos da fórmula geral I que mostraram ser particularmente muito eficazes são aqueles onde

R¹ é um grupo -CH₂OH, -COOR² -CONHR² ou -CONHR³,

R² é um hidrogénio ou um alquiloC₁-C₄ que é opcionalmente substituído com fenilo,

um cicloalquiloC₅-C₆,

um ariloC₃-C₆ que é opcionalmente substituído com fenilo,

R³ é um ácido C₁-C₆-carboxílico ou ácido C₁-C₆-sulfónico,

A é um grupo *cis*-CH=CH- ou -CH₂-CH₂-,

B é um grupo *trans*-CH=CH- ou -CH₂-CH₂-,

W é um alquilenoc₂,

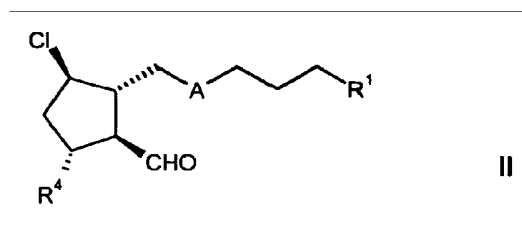
R⁴ é um grupo hidroxilo,

R⁵ é um hidrogénio, um grupo alquiloC₁-C₄ ou alceniloC₁-C₅ saturado e

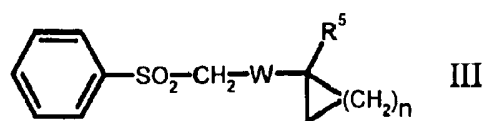
n é o número 1-4.

A invenção refere-se, adicionalmente, a um processo para preparar os derivados de prostano, de acordo com a invenção, da

fórmula geral I, caracterizado por um aldeído da fórmula geral II,



no qual R^1 tem o significado dos radicais $-\text{COOR}^2$, $-\text{CONHR}^3$ e A e R^4 têm os significados indicados anteriormente, onde o grupo OH livre em R^4 é protegido, é feito reagir com o carbanião da sulfona da fórmula geral III



A acetilação da hidroxissulfona resultante é seguida por eliminação redutora para proporcionar a olefina e, quando apropriado, uma subsequente desprotecção dos grupos hidroxilo que são protegidos em qualquer sequência e, quando apropriado, esterificação, eterificação e/ou hidrogenação de ligações duplas e/ou esterificação de um grupo carboxilo esterificado ($R^1 = \text{COOR}^2$) e/ou de um grupo carboxilo livre (COOR^2 com $R^2 = \text{H}$) e/ou conversão de um grupo carboxilo livre (COOR^2 com $R^2 = \text{H}$) numa amida ($R^1 = \text{CONR}^2$) e/ou redução de um grupo carboxilo esterificado ($R^1 = \text{CONHR}^3$).

A reacção do aldeído da fórmula geral II com o carbanião produzido da sulfona III ocorre de um modo conhecido *per se*,

utilizando um solvente inerte, tal como, por exemplo, tetra-hidrofurano ou éter dietílico, a temperaturas entre $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $24\text{ }^{\circ}\text{C}$, de um modo preferido, $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. O carbanião da sulfona III é produzido de um modo convencional com uma base, tais como, por exemplo, butil-lítio, metil-lítio, terc-butóxido de potássio, hidreto de sódio, diisopropilamida de lítio, de um modo preferido, butil-lítio. A formação de carbanião é efectuada a temperaturas de $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, de um modo preferido, a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A acetilação do grupo hidroxilo produzido ocorre, de um modo conhecido, com anidrido acético, quando apropriado, na presença de uma base, por exemplo, piridina, a temperaturas entre $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A eliminação redutora do intermediário acetoxissulfona para proporcionar a trans-olefina da fórmula geral I ocorre com pó de magnésio em metanol com a adição de uma quantidade catalítica de clorotrimetilsilano. A reacção é efectuada a temperaturas entre $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, de um modo preferido, entre $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Alternativamente, a eliminação redutora pode também ser efectuada com amálgama de sódio.

A redução para proporcionar os compostos da fórmula geral I com R^1 , no significado de um grupo $-\text{CH}_2\text{OH}$, é efectuada com um agente redutor adequado para a redução de ésteres ou ácidos carboxílicos, tais como, por exemplo, hidreto de alumínio e lítio, hidreto de diisobutilalumínio. Os solventes adequados são éter dietílico, tetra-hidrofurano, dimetoxietano, tolueno. A redução é efectuada a temperaturas de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ até ao ponto de ebulição do solvente utilizado, de um modo preferido, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Os grupos hidroxilo funcionalmente modificados são libertados por métodos conhecidos. Por exemplo, a eliminação de grupos protectores de hidroxilo tais como, por exemplo, o radical tetra-hidropiraniolo, é efectuada numa solução aquosa de um ácido orgânico, tal como, por exemplo, ácido oxálico, ácido acético, ácido propiónico, *inter alia*, ou numa solução aquosa de um ácido inorgânico, tal como, por exemplo, ácido clorídrico. É conveniente adicionar um solvente orgânico inerte miscível em água para melhorar a solubilidade. Exemplos de solventes orgânicos adequados são álcoois, tais como metanol e etanol e éteres, tais como dimetoxietano, dioxano e tetra-hidrofurano. De um modo preferido, é utilizado tetra-hidrofurano. A eliminação é efectuada, de um modo preferido, a temperaturas entre 20 °C e 80 °C.

Os grupos acilo são hidrolisados, por exemplo, com carbonatos ou hidróxidos de metal alcalino ou metal alcalino terroso num álcool ou na solução aquosa de um álcool. Os álcoois adequados são álcoois alifáticos, tais como, por exemplo, metanol, etanol, butanol, de um modo preferidos, metanol. Os carbonatos e hidróxidos de metal alcalino que podem ser mencionados são sais de potássio e sódio. Os sais de potássio são preferidos.

Exemplos de carbonatos e hidróxidos de metais alcalino terrosos são carbonato de cálcio, hidróxido de cálcio e carbonato de bário. A reacção é efectuada de -10 °C a +70 °C, de um modo preferido, a +25 °C.

O grupo éster -COOR^2 para R^1 , por exemplo, no qual R^2 é um grupo alquilo com 1-10 átomos de C, é introduzido pelos métodos

conhecidos pelo especialista na técnica. Os compostos 1-carboxilo são feitos reagir, por exemplo, com diazo-hidrocarbonetos de um modo conhecido *per se*. A esterificação com diazo-hidrocarbonatos é efectuada, por exemplo, por mistura de uma solução de diazo-hidrocarbonatos num solvente inerte, de um modo preferido, em éter dietílico, com o composto 1-carboxilo no mesmo ou num solvente inerte diferente, tal como, por exemplo, cloreto de metileno. Após o fim da reacção em 1 a 30 minutos, o solvente é removido e o éster é purificado de um modo convencional. Os diazoalcanos são conhecidos ou podem ser preparados por métodos conhecidos (Org. Reactions Vol. 8, páginas 389-394 (1954)).

O grupo éster COOR^2 para R^1 , no qual R^2 é um grupo arilo substituído ou não substituído, é introduzido por métodos conhecidos pelo especialista na técnica. Por exemplo, os compostos 1-carboxilo são feitos reagir com os compostos aril-hidroxis apropriados com diciclo-hexilcarbodiimide na presença de uma base adequada, por exemplo, piridina, DMAP, trietilamina, num solvente inerte. Os solventes adequados são cloreto de metileno, cloreto de etileno, clorofórmio, acetato de etilo, tetra-hidrofurano, de um modo preferido, clorofórmio. A reacção é efectuada a temperaturas entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $+50\text{ }^{\circ}\text{C}$, de um modo preferido, a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pretende-se reduzir as ligações duplas $\text{C}=\text{C}$ presentes no produto inicial, a hidrogenação ocorre por métodos conhecidos *per se*.

A hidrogenação da ligação dupla 5,6 é efectuada de um modo conhecido *per se* a baixas temperaturas, de um modo preferido, a cerca de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, numa atmosfera de hidrogénio na presença de um

catalisador de metal nobre. Um exemplos de um catalisador adequado é paládio a 10% em carbono.

Se a ligação dupla 5,6 e ligação dupla 13,14 são hydrogenadas, é utilizada uma temperatura mais elevada, de um modo preferido, cerca de 20 °C.

Os derivados de prostaglandina da fórmula geral I com R^2 a significar um átomo de hidrogénio podem ser convertidos num sal, por neutralização utilizando quantidades adequadas das bases inorgânicas apropriadas. Por exemplo, dissolver os ácidos de prostaglandina apropriados em água, contendo a quantidade estequiométrica da base resulta, após a água ter sido removida por evaporação ou solvente miscível com água, e. g., álcool ou acetona, ter sido adicionado, no sal orgânico sólido.

Um sal de amina é preparado de um modo convencional, por dissolução do ácido de prostaglandina, por exemplo, num solvente adequado, por exemplo, etanol, acetona, éter dietílico, acetonitrilo ou benzeno e adição de, pelo menos, a quantidade estequiométrica da amina a esta solução. Isto normalmente resulta no sal na forma sólida ou é isolado do modo normal após evaporação do solvente.

O grupo amina $-CONHR^3$ para R^1 é introduzido por métodos conhecidos pelo especialista. Os ácidos carboxílicos da fórmula geral I ($R^2 = H$) são inicialmente convertidos no anidro misto com cloroformato de isobutilo, na presença de uma amina terciária, tal como, por exemplo, trietilamina. A reacção do anidro misto com o sal de metal alcalino da amina apropriada ou com amónia ($R^3 = H$) é efectuada num solvente ou mistura de solventes inerte, tal como, por exemplo, tetra-hidrofurano, dimetoxietano,

dimetilformamida, triamida hexametilfosfórica, a temperaturas entre -30 °C e +60 °C, de um modo preferido, a 0 °C e 30 °C.

Outra possibilidade para introduzir o grupo amida -CONHR³ para R¹ consiste na reacção de um ácido 1-carboxílico da fórmula geral I (R² = H), no qual existe, opcionalmente, a protecção intermediária dos grupos hidroxilo livre, com os compostos da fórmula geral IV



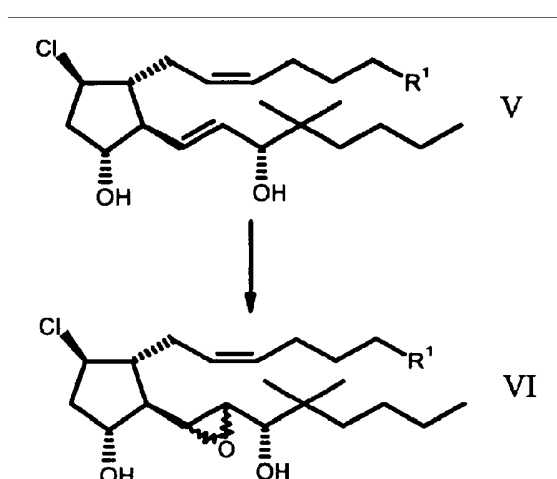
no qual R³ tem os significados indicados anteriormente.

A reacção do composto da fórmula geral I (R² = H) com um isocianato da fórmula IV ocorre, quando apropriado, com a adição de uma amina terciária, tal como, por exemplo, trietilamina ou piridina. A reacção pode ser efectuada sem solvente ou num solvente inerte, de um modo preferido, acetonitrilo, tetra-hidrofurano, acetona, dimetilacetamida, cloreto de metileno, éter dietílico, tolueno, a temperaturas entre -80 °C a 100 °C, de um modo preferido, a 0 °C até 30 °C.

Se o material de partida compreende grupos OH no resíduo de prostano, esses grupos OH são também feitos reagir. Se os produtos finais eventualmente desejados compreendem grupos hidroxilo livres no resíduo de prostano, é conveniente começar de materiais de partida com sua protecção intermediária por radicais éter ou acilo que podem, de um modo preferido, ser facilmente eliminados.

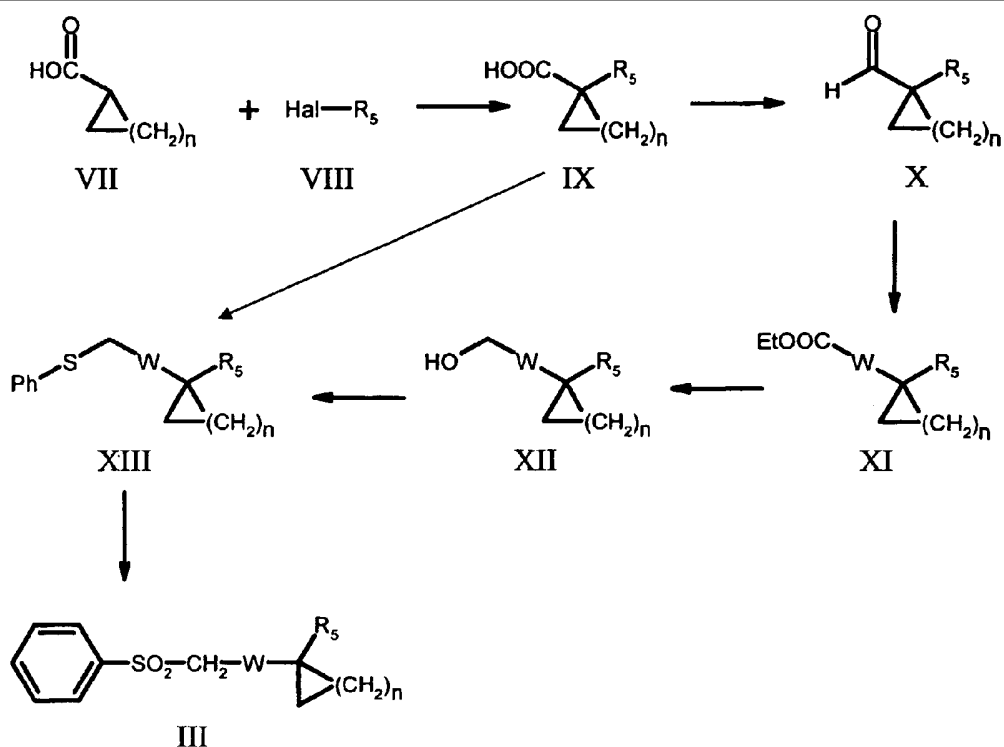
Os aldeídos da fórmula geral II que são utilizados como materiais de partida são conhecidos ou podem ser preparados, por

exemplo, por epoxidação selectiva de um modo conhecido *per se* da ligação dupla 13,14 de uma 9-haloprostaglandina da fórmula geral V, de um modo preferidos, com R¹ a significar um grupo -COOCH₃, com hidroperóxido de terc-butilo e isopropóxido de titânio (IV) em cloreto de metileno a -20 °C.



A clivagem do epóxido subsequente com ácido periodíco em éter dietílico e, quando apropriado, protecção do grupo 11-hidroxilo, por exemplo, com di-hidropirano, proporciona o aldeído da fórmula geral II.

A sulfona da fórmula geral III utilizada como material de partida pode ser preparada a partir de ácidos cicloalquilocarboxílicos da fórmula geral VII, nos quais n tem o significado indicado anteriormente, por alquilação com um halogeneto de alquilo da fórmula geral VIII, no qual R⁵ tem o significado indicado anteriormente, e o halogéneo pode ser iodo, cloro ou bromo.



A esterificação de IX com iodeto de metilo e carbonato de potássio em acetona é seguida por redução do éster metílico resultante no álcool com hidreto de alumínio e lítio em éter dietílico. A oxidação do álcool com o complexo SO₂-piridina na presença de trietilamina numa mistura de sulfóxido de dimetilo e cloreto de metileno, proporciona o aldeído da fórmula geral X. A reacção de Wittig-Horner subsequente e, quando apropriado, hidrogenação da ligação dupla para proporcionar XI conduz, após redução com hidreto de diisobutilalumínio, ao álcool da fórmula geral XII. A hidrogenação da dupla ligação pode, no entanto, também ser efectuada após redução do Ester XI no álcool XII, com W a significar uma dupla ligação.

A substituição subsequente do grupo hidroxilo ocorre após tosilação intermediária por reacção com tiofenol em tolueno. O

tioéter XIII obtido deste modo é finalmente oxidado numa solução metanólica aquosa na sulfona da fórmula geral III.

Em comparação com a prostaglandina E_2 , os novos agonistas de EP_2 são distinguidos por maior selectividade e estabilidade. Os novos análogos de prostaglandina do tipo EP_2 são adequados, por exemplo, para o tratamento e profilaxia de distúrbios de fertilidade, doenças infecciosas, cancro, infecções virais, distúrbios cardiovasculares, pressão intraocular elevada, glaucoma, distúrbios do sistema esquelético, distúrbios angiogénicos, anormalidades na contracção uterina, distúrbios de dor e nefrológicos.

Por distúrbios de fertilidade pretende-se indicar distúrbios que conduzem a que não ocorra ovulação, ao complexo oócito ovulado/células cumulus não ser fertilizado, a que não ocorra nidação de um oócito fertilizado e não ocorra decidualização, por doenças infecciosas pretende-se indicar doenças provocadas por parasitas unicelulares, por cancro pretende-se indicar tumores sólidos e leucemia, por infecções virais pretende-se indicar infecções por citomegalovírus, hepatite, hepatite B e C e distúrbios de VIH, por distúrbios cardiovasculares pretende-se indicar distúrbio de isquemia reperfusão, estenose, arteriosclerose e restenose, por distúrbios angiogénicos pretende-se indicar, por exemplo, endometriose, por pressão intraocular elevada pretende-se indicar glaucoma, por anormalidades de contracção uterina pretende-se indicar, por exemplo, menstruação dolorosa, por distúrbios do sistema esquelético pretende-se indicar osteoporose e por distúrbios nefrológicos pretende-se indicar glomerulonefrite.

Para utilização dos compostos de acordo com a invenção como medicamentos, estes podem ser convertidos na forma de um produto farmacêutico que, para além do ingrediente activo, compreende materiais veículos farmacêuticos, orgânicos ou inorgânicos inertes, adequados para administração entérica ou parentérica, tais como, por exemplo, água, gelatina, goma arábica, lactato, amido, estearato de magnésio, talco, óleos vegetais, polialquilenoglicóis. Os produtos farmacêuticos podem estar na forma sólida, por exemplo, como comprimidos, comprimidos revestidos, supositórios, cápsulas ou na forma líquida, por exemplo, como soluções, suspensões ou emulsões. Adicionalmente, compreendem, quando apropriado, excipientes, tais como, conservantes, estabilizadores, agentes humidificantes ou emulsionantes; sais para alterar a pressão osmótica ou tampões.

Do mesmo modo, a presente invenção refere-se a estes produtos farmacêuticos.

As soluções de aerossóis são produzidas de um modo conveniente para inalação.

Particularmente adequadas para utilização oral são comprimidos, comprimidos revestidos ou cápsulas com talco e/ou veículos de hidratos de carbono ou ligandos, tais como, por exemplo, lactose, amido de milho ou amido de batata. A utilização é também possível na forma líquida, tal como, por exemplo, como fluído ao qual é adicionado um adoçantes quando apropriado.

São utilizadas soluções oleosas ou aquosas injectáveis estéreis para administração parentérica. As soluções para injeção ou suspensões são particularmente adequadas, são

especialmente adequadas soluções aquosas dos compostos activos em óleo de rícino polietoxilado.

Os supositórios, por exemplo, são adequados e normais para administração vaginal.

Os sistemas de transporte que também podem ser utilizados são excipientes de superfície activa, tais como sais de ácidos biliares ou fosfolípidos vegetais ou animais, mas também as suas misturas e lipossomas ou seus constituintes.

Do mesmo modo, a presente invenção refere-se a administrações entéricas, parentéricas, vaginais e orais.

Os compostos da invenção são administrados a um doente com tal necessidade numa quantidade eficaz. Por uma "quantidade eficaz" pretende-se indicar uma quantidade ou dosagem necessária para tratar ou prevenir um distúrbio particular, cuja quantidade ou dosagem pode ser determinada por métodos conhecidos na técnica sem experimentação indevida.

A dosagem dos ingredientes activos pode variar dependendo da via de administração, idade e peso do doente, natureza e gravidade do distúrbio a ser tratado e factores semelhantes. A dose diária é de 0,5-1000 mg, de um modo preferido, 50-200 mg, sendo possível que dosagem a ser administrada, como um dose individual, seja administrada uma vez ou dividida em 2 ou mais doses diárias.

Do mesmo modo, a presente invenção refere-se a medicamentos para o tratamento dos distúrbios indicados anteriormente, que compreendem, pelo menos, um composto de acordo com a fórmula

geral I e medicamentos com veículos e substâncias de formulação adequadas.

Do mesmo modo, a presente invenção refere-se à utilização dos compostos da fórmula geral (I) para produzir um medicamento para o tratamento e profilaxia de distúrbios que incluem distúrbios de fertilidade, doenças infecciosas, cancro, infecções virais, distúrbios cardiovasculares, pressão intraocular elevada, glaucoma, distúrbios do sistema esquelético, distúrbios angiogénicos, anormalidades na contracção uterina, distúrbios de dor e nefrológicos.

Por distúrbios de fertilidade pretende-se indicar distúrbios que conduzem a que não ocorra ovulação, ao complexo oócito ovulado/células cumulus não ser fertilizado, a que não ocorra nidação de um oócito fertilizado e não ocorra deciduização, por doenças infecciosas pretende-se indicar doenças provocadas por parasitas unicelulares, por cancro pretende-se indicar tumores sólidos e leucemia, por infecções virais pretende-se indicar infecções por citomegalovírus, hepatite, hepatite B e C e distúrbios de VIH, por distúrbios cardiovasculares pretende-se indicar distúrbio de isquemia reperfusão, estenose, arteriosclerose e restenose, por distúrbios angiogénicos pretende-se indicar, por exemplo, endometriose, por pressão intraocular elevada pretende-se indicar glaucoma, por anormalidades de contracção uterina pretende-se indicar, por exemplo, menstruação dolorosa, por distúrbios do sistema esquelético pretende-se indicar osteoporose e por distúrbios nefrológicos pretende-se indicar glomerulonefrite.

Os compostos, de acordo com a invenção, da fórmula geral I ligam-se ao receptor EP₂ e tem uma acção agonística. A ligação da PGE₂ ao subtipo EP₂ do receptor PGE₂ humano induz a activação de adenilato ciclases associadas à membrana e conduz à formação de AMPc.

A Figura 1 mostra uma actividade muito elevada (EC₅₀ < 9,5x10e-10 M) no teste de agonismo celular sem qualquer inibição no teste de antagonismo (IC₅₀ > 2x10e-5 M).

Do mesmo modo, a presente invenção refere-se à utilização de substâncias, de acordo com a invenção, como agonistas do receptor EP₂.

Os compostos, de acordo com a invenção, da fórmula geral I têm um efeito pró-fertil. O oócito é rodeado no folículo antral pré-ovulatório por células cumulos que formam um anel denso de células que rodeia o oócito. Após o pico da hormona luteinizante (pico LH), é activada uma série de processos que conduzem a uma grande alteração morfológica neste anel de células constituído por células cumulus. Neste caso, as células do cumulus formam uma matriz extracelular que conduz a denominada expansão do cumulus (Vanderhyden et al., Dev Biol. Agos 1990;140(2):307-317). Esta expansão do cumulus é um componente importante do processo ovulatório e da subsequente possibilidade de fertilização.

As prostaglandinas, e aqui a prostaglandina E₂, cuja síntese é induzida pelo pico de LH, são de importância crucial na expansão do cumulus. Os murganhos com prostanóide EP₂ silenciado (Hizaki et al., Proc Natl Acad Sci USA. 31 Ago 1999; 96(18):10501-6.) mostram uma expansão do cumulus marcadamente

acentuada e subfertilidade grave, demonstrando a importância do receptor prostanóide EP₂ para este processo.

O agonista EP₂ conduz a uma grande expansão dependente da concentração no complexo de cumulus. A expansão de cumulus induzida pela substância de teste é equivalente em concentrações de 0,5 µM e 1 µM na expansão do cumulus induzida pelo agonista natural PGE₂ no receptor EP₂ numa concentração de 1 µM (n = 16 complexos de cumulus-oócitos por grupo, ver Figura 1).

O agonista EP₂ conduz a um aumento significativo dependente da concentração em oócitos ovulados. Este aumento significativo nos oócitos ovulados ocorre na administração de apenas 0,00015 mg/animal em cada caso e mostra que é possível aumentar o número de oócitos ovulados mesmo com uma dose convencional de HCG utilizada para ovulação (n = 11-12 animais por grupo; **p < 0,005 e *p < 0,05), Figura 2).

Do mesmo modo, a presente invenção refere-se à utilização dos compostos de acordo com a invenção para o tratamento de distúrbios de infertilidade, tais como ovulação ausente ou deficiente, fertilização deficiente do complexo oócito/células de cumulus, implantação deficiente e decidualização deficiente.

As prostaglandinas desempenham uma parte importante na angiogénese (Sales, Jabbour, 2003, Reproduction 126, 559 - 567).

A endometriose é um distúrbio crónico provocado por insuficiências nos vasos sanguíneos. Cerca de 10% das mulheres sofrem regularmente de hemorragia grave durante a menstruação, provocada por alterações nos vasos sanguíneos do endométrio. Além disso, foram observadas diferenças estruturais nos vasos

sanguíneos, tais como, por exemplo, formação incompleta da camada de células de músculo liso (Abberton et al., 1999, Hum. Reprod. 14, 1072-1079). Uma vez que a perda de sangue durante a menstruação é parcialmente controlada pela constrição dos vasos sanguíneos, é óbvio que os defeitos nos músculos lisos têm uma contribuição substancial na hemorragia.

Do mesmo modo, as prostaglandinas e efeitos mediados pelo receptor EP₂ desempenham uma parte na regulação hormonal de lesões endometrióticas (Sun et al., 2003, Endocrinology 144, 3934-3942).

Evidências crescentes sugerem que a endometriose está associada com uma resposta inflamatória significativa que pode ser mediada por macrófagos e linfócitos activados e níveis aumentados de citocinas, quimocinas e factores de crescimento. Foi colocada a hipótese que estes processos inflamatórios medeiam algumas das características clínicas associadas com a endometriose. O fluido peritoneal de mulheres com endometriose é conhecido por conter mais células inflamatórias e suas citocinas, quimocinas e factores de crescimento associados (Murphy AA. Clinical aspects of endometriosis. Ann NY Acad Sci. Março 2002;955:1-10). O resultado é um ambiente que promove a implantação e proliferação.

As prostaglandinas, e aqui prostaglandina E₂, reduzem a expressão de citocinas inflamatórias, tais como TNF α de macrófagos activados. Os murganhos com prostanóide EP₂ silenciado (Shinomiya S et al., Regulation of TNF α and IL-10 production by prostaglandins I₂ and E₂: studies with prostaglandin receptor-deficient mice and prostaglandin E-receptor subtype-selective synthetic agonists (Bioch Phar 2001; 61 1153) não responderam a

agonistas EP₂, demonstrando a importância do receptor prostanóide EP₂ para este processo.

A Tabela 1 mostra que um agonista de EP₂ conduz a uma inibição nos níveis de citocinas determinado no sobrenadante de cultura. O agonista EP₂ também provoca uma diminuição significativa no TNF α , como demonstrado na Figura 3.

A presente invenção refere-se à utilização dos compostos da fórmula geral I para o tratamento de endometriose.

As prostaglandinas desempenham uma parte importante na contracção uterina, e contracções excessivamente fortes são responsáveis por menstruação dolorosa (Sales, Jabbour, 2003, Reproduction 126, 559 - 567).

A presente invenção refere-se à utilização das substâncias da fórmula geral I para o tratamento de menstruação dolorosa.

Adicionalmente, os agonistas do receptor EP₂ desempenham uma parte significativa no controlo da pressão intraocular. Foi possível demonstrar que os receptores EP₂, em particular, estão presentes em concentrações elevadas nos vasos da malha trabecular (TM) do olho. As lágrimas deixam o olho via a TM e o canal de Schlemm e os agonistas do receptor EP₂ influenciam as dinâmicas do fluido lacrimal ao estimular a fluxo de saída do fluido lacrimal e, assim, conduzir a uma redução na pressão intraocular (W. Kamphuis *et al.*, Current Eye Res. 2004, 29, 17-26). A presente invenção refere-se à utilização de substâncias de acordo com a invenção para o tratamento de pressão intraocular elevada, como associado *inter alia* com glaucoma.

As prostaglandinas também desempenham uma parte importante nos processos que neutralizam a osteoporose. Assim, a presente invenção refere-se à utilização de substâncias de acordo com a invenção para o tratamento de osteoporose.

As prostaglandinas também desempenham uma parte importante nos processos que controlam a pressão sanguínea. Deste modo, a presente invenção refere-se à utilização de substâncias de acordo com a invenção, para o tratamento de pressão sanguínea elevada.

As prostaglandinas também influenciam a produção de Citocinas. A Esclerose Múltipla (MS) é considerada como uma doença autoimunitária sistémica mediada por linfócitos T, cujo tecido alvo é o sistema nervoso central. Os perfis de libertação de citocinas de linfócitos T podem ser desviados para a linhagem T de auxílio 1 ou T de auxílio 2 (Th-1 ou Th-2). As células Th-1 secretam citocinas, tais como interferão gama (INF- γ) e induzem uma resposta imunitária mediada por células, enquanto as células Th-2 secretam IL-4, IL-5 e IL-10 e induzem uma resposta humoral ou mediada por anticorpos (Mossman *et al.*, 1989, Annual Rev Immunol. 7: 145-173). A expressão de INF- γ está associada com a MS e utilizando uma determinação multifactorial de incapacidade, a expressão de IFN- γ em resposta aos péptidos PLP e péptidos MBP está significativamente correlacionada com a incapacidade (Hirsch *et al.*, 1985, J. Clin Immunol Nov; 5(6):386-389; Moldovan *et al.*, 2003, J. Neuroimmunol. Ago; 141(1-2):132-140). De grande importância, estudos clínicos mostram que a administração de IFN- γ provoca exacerbações em doentes com MS (Panitch *et al.*, Lancet, Abr 18; (8538):893-895).

A Tabela 2 mostra que os agonistas EP₂ conduzem a uma inibição da expressão de INF- γ de células T dadoras humanas activadas no ensaio de células T activadas. A Tabela 3 mostra uma regulação negativa de citocinas associadas a Th-1 num ensaio em células dendríticas derivadas de monócitos de dadores humanos, activados na presença de um agonista EP₂. Deste modo, ao inibir directamente a expressão de INF- γ e ao desviar a polarização mediada por células dendríticas de células T CD4+ para longe da linhagem Th-1 que expressa o INF- γ , prevê-se que o agonista EP₂ reduza a expressão de INF- γ em doentes com MS.

Do mesmo modo, a presente invenção refere-se à utilização dos compostos de acordo com a invenção para o tratamento de doenças autoimunitárias, tal como doença autoimunitária seleccionada do grupo consistindo de esclerose múltipla, esclerose múltipla progressiva secundária, psoríase, artrite reumatóide, doença de Crohn e alopecia areata.

Quando a preparação dos compostos de partida não é descrita, estes são conhecidos ou podem ser preparados por analogia com compostos conhecidos ou com processos aqui descritos. Do mesmo modo, é possível executar todas as reacções aqui descritas em reactores paralelos ou através de técnicas operacionais combinatórias.

As misturas de isómeros podem ser fraccionadas por métodos convencionais, tais como, por exemplo, cristalização, cromatografia ou formação de sal nos enantiómeros ou isómeros E/Z.

Os sais são preparados, de um modo convencional, por adição da quantidade equivalente ou um excesso de uma base ou ácido,

que está em solução quando apropriado, a uma solução do composto da fórmula I e separação do precipitado ou processamento da solução de um modo convencional.

Assim, a invenção refere-se também a medicamentos baseados nos compostos da fórmula geral I e excipientes ou veículos convencionais.

Os seguintes exemplos pretendem explicar a invenção em detalhe sem desse modo serem considerados uma limitação.

Exemplos de preparação

Exemplo 1

(5Z, 13E)-(9R, 11R)-9-Cloro-11-[(2H)-tetra-hidropiran-2-iloxi]-17,17-tetrametileno-20-nor-5,13-prostadienoato de metilo

São adicionados, gota a gota, 0,68 mL de uma solução de butil-lítio 1,6 M em hexano a uma solução de 290 mg de 1-fenilsulfonil-4,4-(trimetileno)hexano em 2,4 mL de tetra-hidrofurano a -78 °C sob azoto e uma mistura é agitada a -78 °C durante 1,5 horas. Esta solução é, depois, adicionada, gota a gota, a -100 °C a uma solução de 315 mg de aldeído (do Exemplo 1c) em 2,4 mL de tetra-hidrofurano. A mistura é depois agitada a -100 °C durante 30 min e a -78 °C durante 1 h. Depois são adicionados 0,16 mL de anidro acético à mistura reaccional e a mistura é aquecida até à temperatura ambiente ao longo de 1 h. A mistura reaccional é misturada com solução de cloreto de amónia, extraída 3× com acetato de etilo, as fases orgânicas combinadas são lavadas 1× com água e 1× com solução saturada de

cloreto de sódio, secas sobre sulfato de sódio e concentradas *in vacuo*. O intermediário é dissolvido em 6 mL de metanol e sob azoto são adicionadas 160 mg de pó de magnésio. A mistura é, depois, agitada à temperatura ambiente durante 15 min. É depois adicionada uma gota de clorotrimetilsilano à mistura reaccional e a mistura é agitada à temperatura ambiente durante mais 3 h. A mistura reaccional é adicionada a 5 mL de solução de cloreto de amónio gelado e extraída 3x com acetato de etilo e as fases orgânicas combinadas são lavadas 1x com água e 1x com solução saturada de cloreto de sódio, secas sob sulfato de sódio e concentradas *in vacuo*. A cromatografia em sílica gel com hexano/acetato de etilo (8:2) resulta em 140 mg do éster.

RMN de ^1H (CDCl_3): δ = 0,75 (3H), 1,4-2,4 (30H), 3,44 (1 H), 3,66 (3H), 3,8-4,15 (3H), 4,63 (1H), 5,15-5,65 (4H)

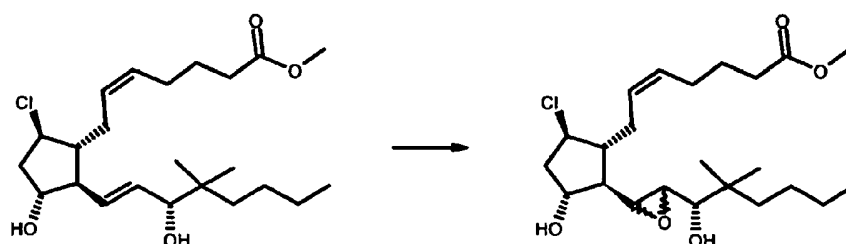
O aldeído de partida é preparado como se segue.

1a) (5Z)-(9R,11R,13RS,14RS,15S)-9-Cloro-11,15-di-hidroxilo-16,16-dimetil-13,14-epoxi-5-prostenoato de metilo

São adicionados, gota a gota, 4,7 mL de isopropóxido de titânio(IV) a uma solução de 6,52 g de (5Z,13E)-(9R,11R,15R)-9-cloro-11,15-di-hidroxilo-16,16-dimetil-5,13-prostadienoato de metilo em 33 mL de cloreto de metileno a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ sob azoto e a mistura é agitada a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min. São depois adicionados 6 mL de hidroperóxido de terc-butilo à mistura reaccional. É subsequentemente adicionada uma solução de 10 g de sulfato de ferro e 20 g de ácido cítrico em 100 mL de água e a mistura é extraída 3x com cloreto de metileno. As fases orgânicas combinadas são lavadas 1x com solução saturada de cloreto de sódio, secas sob sulfato de sódio e concentradas *in*

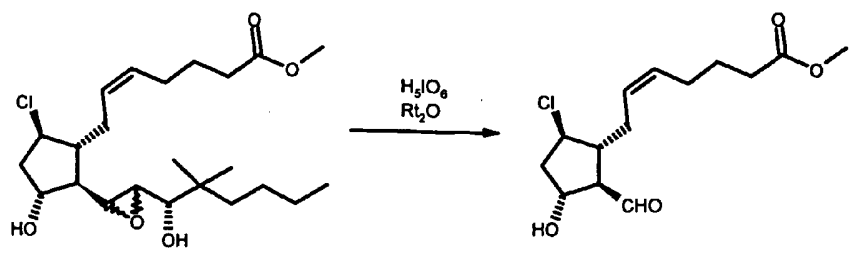
vacuo. A cromatografia em sílica gel com cloreto de metileno/acetato de etilo (0-40%) resulta em 3,55 g do epóxido como um óleo incolor.

RMN de ^1H (CDCl_3): δ = 0,75-1,05 (9H), 1,1-2,4 (18H), 2,9-3,0 (2H), 3,2 (1H), 3,65 (3H), 4,0-4,15 (2H), 4,63 (1 H), 5,3-5,55 (2H)



1b) (5Z)-(9R, 11R)-9-Cloro-11-hidroxilo-14,15,16,17,18,19,20-heptanor-12-oxo-5-prostenoato de metilo

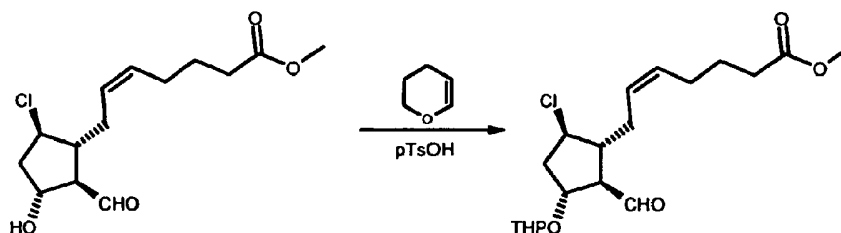
5 g de ácido periódico são vigorosamente agitadas em 360 mL de éter, sob azoto, durante 1 h. São adicionados 125 mL desta solução a uma solução de 2 g do epóxido em 5 mL de éter e a mistura é agitada, sob azoto, à temperatura ambiente. Após 1 h, são adicionados mais 125 mL da solução de ácido periódico à mistura reaccional e, após 2 h, é adicionada a restante solução de ácido periódico. Após filtração, o filtrado é lavado 1x com solução saturada de bicarbonato de sódio, 1x com água e 1x com solução saturada de cloreto de sódio, seco sobre sulfato de sódio e concentrado *in vacuo*. Rendimento: 1,9 g do aldeído.



1c) (5Z)-(9R, 11R)-9-Cloro-11-[(2H)-tetra-hidropiran-2-iloxi]-14,15,16,17,18,19,20-heptanor-12-oxo-5-prostenoato de metilo

São dissolvidas 1,9 g do aldeído em 20 mL of cloreto de metileno e misturadas com 1,6 mL de di-hidropirano e 8,8 mg de pTsOH e agitadas durante 30 min. A mistura é depois diluída com éter, lavada 1x com solução saturada de bicarbonato de sódio e 1x com solução saturada de cloreto de sódio, seca sob sulfato de sódio e concentrada *in vacuo*. A cromatografia em sílica gel duas vezes [1^a coluna: cloreto de metileno/acetato de etilo (2-10%), 2^a coluna: hexano/acetato de etilo (0-20%)] resulta em 720 mg do éter tetra-hidropiraniilo.

RMN de ¹H (CDCl₃): δ = 1,35-2,7 (17H), 3,65 (3H), 3,4-4,1 (3H), 4,58 (2H), 5,3-5,55 (2H), 9,75 (1 H)

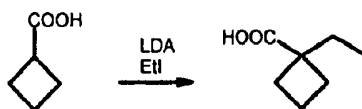


Preparação da sulfona

1d) Ácido 2,2-(trimetileno)butânico

Uma solução de 61,6 mL de diisopropilamina em 180 mL de tetra-hidrofurano é adicionada, gota a gota, a 275 mL de butil-lítio (1 M em hexano) a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob azoto e a mistura é agitada a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. A $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, são adicionados, gota a gota, 19,1 mL de ácido ciclobutanocarboxílico à mistura reaccional e a mistura reaccional é agitada durante 4 horas, durante as quais aquece até à temperatura ambiente. A suspensão é vertida em 300 mL de água gelada, ajustada para pH 1 com ácido clorídrico 2 N e extraída 4x com 300 mL de éter de cada vez, e as fases orgânicas combinadas são lavadas 1x com solução saturada de cloreto de sódio, secas sob sulfato de sódio e concentradas *in vacuo*. Rendimento: 30,1 g do ácido carboxílico.

RMN de ^1H (CDCl_3): $\delta = 0,88$ (3H), 1,75-1,95 (6H), 2,4 (2H)

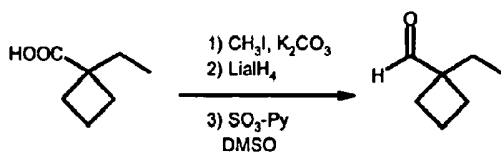


1e) 2,2-Trimetilenobutan-1-al

São adicionadas 62,2 g de carbonato de potássio e 28 mL de iodeto de metilo a uma solução de 25,6 g de 1d em 300 mL de acetona à temperatura ambiente sob azoto e a mistura é agitada durante 12 horas. O precipitado é depois removido por filtração com sucção e o filtrado é concentrado *in vacuo* à temperatura ambiente. O produto em bruto é dissolvido em 500 mL de éter e

lavado 1x com água e 1x com solução saturada de cloreto de sódio e a fase orgânica é seca sob sulfato de sódio e concentrada *in vacuo*. O resíduo é destilado *in vacuo* a 85 mbar e 110 °C (ponto de ebulição de 85-90 °C). Rendimento: 24,5 g do éter.

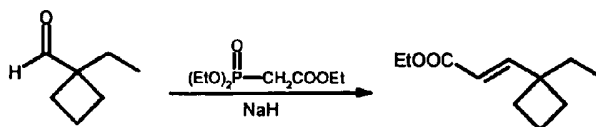
São dissolvidas 20 g do éter em 40 mL de éter, esta solução é adicionada, gota a gota, a uma suspensão de 4,8 g de hidreto de lítio e alumínio em 390 mL de éter a 0 °C sob azoto e a mistura é agitada a 0 °C durante uma hora e à temperatura ambiente durante 1 hora. O excesso de hidreto de lítio e alumínio é decomposto muito cuidadosamente, a 0 °C, com 11 mL de água, 11 mL de solução de hidróxido de sódio com 15% de força e novamente com 30 mL de água. A agitação durante 20 minutos é seguida por filtração e depois lavagem exaustiva com éter e o filtrado é seco sobre sulfato de sódio e concentrado *in vacuo*. Rendimento: 16,3 g do álcool. É adicionado 48 mL de trietilamina e 22,27 g do complexo SO₃-piridina a uma solução de 8 g de álcool em 450 mL de cloreto de metileno e 100 mL de dimetilsulfóxido à temperatura ambiente sob azoto. A mistura é agitada durante 1 hora, depois misturada com 300 mL de solução saturada de cloreto de amônio e novamente agitada durante 15 min. É depois diluída com 1,5 L de éter, as fases são separadas e a fase orgânica é lavada 2x com solução saturada de cloreto de sódio, seca sob sulfato de sódio e concentrada *in vacuo*. Rendimento: 9,5 g do aldeído.



1f) 4,4-(Trimetileno)-2-hexenocarboxilato de etilo

Uma solução de 18,3 mL de fosfonoacetato de trietilo em 20 mL de tetra-hidrofurano é adicionada, gota a gota, a uma suspensão de 3,39 g de hidreto de sódio em 60 mL de tetra-hidrofurano a 0 °C sob azoto e a mistura é agitada a temperatura ambiente durante 30 min. O aldeído (preparado em 1e) é depois adicionado, gota a gota, à mistura reaccional a 0 °C e a mistura é agitada à temperatura ambiente durante 3 horas. É depois rapidamente arrefecida com solução saturada de cloreto de amónio e extraída 3x com éter e as fases orgânicas combinadas são lavadas 1x com água e 1x com solução saturada de cloreto de sódio, secas sob sulfato de sódio e concentradas *in vacuo*. A cromatografia em sílica gel com hexano/éter (0-10%) resulta em 9,81 g do éster.

RMN de ^1H (CDCl_3): δ = 0,71 (3H), 1,27 (3H), 1,65 (2H), 1,78-2,1 (6H), 4,18 (2H), 5,75 (1 H), 6,97 (1H),



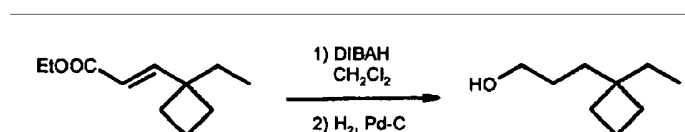
1g) 4,4-(Trimetileno)hexan-1-ol

São lentamente adicionados, gota a gota, 78,5 mL de DIBAH a uma solução de 7,8 g do éster preparado como em 1f) em 65 mL de cloreto de metileno a -70 °C sob azoto. Após 30 min, são lentamente adicionados, gota a gota, 20 mL de isopropanol e, depois, 36 mL de água à mistura reaccional. A mistura é agitada

à temperatura ambiente durante 2 horas, o precipitado é removido por filtração com sucção e lavado exaustivamente com cloreto de metileno e o filtrado é concentrado *in vácuo*. A cromatografia em sílica gel com hexano/acetato de etilo (0-40%) resulta em 5,4 g do álcool alílico.

São dissolvidas 5 g do álcool alílico em 200 mL de acetato de etilo misturadas com 500 mg de Pd/C e esta é seguida por filtração com sucção através de Celite e através de lavagem com acetato de etilo. A concentração do filtrado *in vacuo* resulta em 4,5 g do álcool primário.

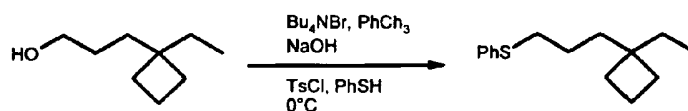
RMN de ^1H (CDCl_3): $\delta = 0,8$ (3H), 1,2-1,9 (12H), 3,6 (2H)



1h) 1-Feniltio-4,4-(trimetileno)hexano

Uma solução de 6,19 g de cloreto de p-toluenossulfonilo em 7,4 mL de tolueno é adicionada, gota a gota, a uma mistura de 4,4 g do álcool preparado como em 1 g), 25 mL de tolueno, 997 mg de brometo de tetrabutílamônio e 46 mL de NaOH 2 N a 0 °C sob azoto e a mistura é agitada durante 2 horas. As fases são depois separadas e a fase orgânica é lavada 3x com água e 1x com solução saturada de cloreto de sódio, seca sob sulfato de sódio e concentrada *in vacuo*. A cromatografia em sílica gel com hexano/éter (0-20%) resulta em 4,6 g do tioéter.

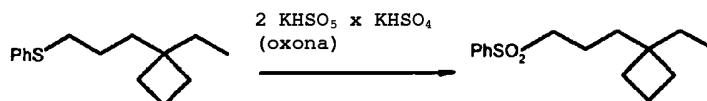
RMN de ^1H (CDCl_3): $\delta = 0,75$ (3), $1,39$ (2H), $1,45-1,88$ (10H), $2,88$ (2H), $7,15-7,53$ (5H)



1i) 1-Fenilsulfonil-4,4-(trimetileno)hexano

Uma solução de 18 g de ozono em 70 mL de água é adicionada, gota a gota, a uma solução de 4,6 g do produto preparado como em 1 h) em 70 mL de metanol a $0-10^\circ\text{C}$ sob azoto e a mistura é agitada durante 2 horas. É depois diluída com 100 mL de água e extraída 4x com acetato de etilo e as fases orgânicas combinadas são lavadas 1x com água, 2x com solução saturada de tiosulfato e 1x com solução saturada de cloreto de sódio, secas sob sulfato de sódio e concentradas *in vacuo*. A cromatografia em sílica gel com hexano/acetato de etilo (0-20%) resulta em 2,55 g da sulfona.

RMN de ^1H (CDCl_3): $\delta = 0,7$ (3H), $1,3-1,85$ (12H), $3,08$ (2H), $7,5-7,7$ (3H), $7,9$ (2H)



Exemplo 2

(5Z,13E)-(9R,11R)-9-Cloro-11-hidroxilo-17,17-tetrametileno-20-nor-5,13-prostadienoato de metilo

São adicionadas 2,5 mg de pTsOH a uma solução de 140 mg do produto preparado no Exemplo 1 em 1,5 mL de metanol a 0 °C sob azoto e a mistura é agitada durante 3 horas. A mistura reaccional é depois vertida em 3 mL de solução saturada de carbonato de sódio e extraída 3x com acetato de etilo e as fases orgânicas combinadas são lavadas 1x com solução saturada de cloreto de sódio, secas sob sulfato de sódio e concentradas *in vacuo*. A cromatografia em sílica gel com hexano/acetato de etilo (0-50%) resulta em 105 mg do álcool.

RMN de ^1H (CDCl_3): δ = 0,75 (3H), 1,38-2,4 (24H), 3,65 (3H), 3,9-4,13 (2H), 5,2-5,63 (4H)

Exemplo 3

Ácido (5Z,13E)-(9R,11R)-9-cloro-11-hidroxi-17,17-tetrametileno-20-nor-5,13-prostadienónico

São adicionados 0,2 mL de solução de hidróxido de sódio 2 N a uma solução de 68 mg do álcool preparado no Exemplo 2 em 1 mL de metanol sob azoto e a mistura é agitada durante 5 horas. É depois diluída com 1 mL de água, ajustada para pH 3 com ácido clorídrico 2 N e extraída 3x com acetato de etilo e as fases orgânicas combinadas são lavadas 1x com solução saturada de cloreto de sódio, secas sob sulfato de sódio e concentradas *in vacuo*.

A cromatografia em sílica gel com hexano/acetato de etilo (50-80%) resulta em 50,3 mg do ácido carboxílico.

RMN de ^1H (CDCl_3): $\delta = 0,75$ (3H), $1,38-2,4$ (24H), $3,9-4,1$ (2H), $5,2-5,62$ (4H)

Exemplos biológicos:

1. Detecção do antagonismo do sinal do receptor da prostaglandina E_2 (subtipo EP_2) humano

1.1. Princípio da detecção

A ligação de PGE_2 ao subtipo EP_2 do receptor PGE_2 humano induz a activação de adenilatos ciclases associadas à membrana e conduz à formação de AMPc. Na presença do inibidor da fosfodiesterase IBMX, o AMPc que se acumulou devido à sua estimulação, e foi libertado pela lise celular, é empregue num método de detecção competitivo. Neste ensaio, o AMPc no lisado compete com o AMPc-XL665 para a ligação de um anticorpo anti-AMPc marcado com criptato de Eu.

Isto resulta, na ausência de AMPc celular, num sinal máximo que deriva da junção deste anticorpo à molécula de AMPc-XL665. Após excitação a 337 nm, isto resulta num sinal de emissão de longa duração, baseado em FRET (transferência de energia de ressonância de fluorescência) a 665 nm (e a 620 nm). Os dois sinais são determinados num instrumento de medição adequado com um intervalo de tempo, i. e., após a fluorescência de fundo ter diminuído. Qualquer aumento no sinal de FRET baixo provocado

pela adição da prostaglandina E_2 (determinada como a alteração na razão no poço = $\text{emissão}_{665 \text{ nm}} / \text{emissão}_{620 \text{ nm}} * 10000$) mostra o efeito dos antagonistas.

1.2. Método de detecção

1.2.1. Ensaio de antagonismo (dados para cada poço de uma placa de 384 poços):

As soluções da substância (0,75 μL) introduzida numa placa de ensaio e DMSO a 30% são dissolvidas em 16 μL de uma solução de estimulação KRSB+IBMX (1 X Tampão Bicarbonato de Krebs-Ringer; Sigma-Aldrich # K-4002; incluindo 3-isobutil-1-metilxantina 750 μM Sigma-Aldrich # I-7018) e, depois, são transferidos 15 μL para uma placa de cultura celular livre de meio que tinha sido lavada com KRSB imediatamente antes.

Após pré-incubação à temperatura ambiente (t.a.) durante 30 minutos, são adicionados 5 μL de uma solução 4x de PGE_2 (11 nM) e a incubação é efectuada na presença do agonista à t.a. durante mais 60 min (volume: ~20 μL) antes da reacção ser, depois, interrompida por adição de 5 μL de tampão de lise e incubada à t.a. durante mais 20 minutos (volume: ~25 μL). O lisado celular é depois transferido para uma placa de determinação e medida de acordo com as informações do fabricante (kit de AMP cíclico Cisbio International # 62AMPPEC).

1.2.2. Ensaio de agonismo (dados para cada poço de uma placa de 384 poços):

As soluções da substância (0,75 µL) introduzida numa placa de ensaio e DMSO a 30% são dissolvidas em 16 µL de uma solução de estimulação KRSB+IBMX (1X Tampão Bicarbonato de Krebs-Ringer; Sigma-Aldrich # K-4002; incluindo 3-isobutil-1-metilxantina 750 µM Sigma-Aldrich # I-7018) e, depois, são transferidos 15 µL para uma placa de cultura celular livre de meio que tinha sido lavada com KRSB imediatamente antes.

Após incubação à temperatura ambiente (t.a.; volume: ~15 µL) durante 60 minutos, a reacção é depois interrompida por adição de 5 µL de tampão de lise e incubada à t.a. durante mais 20 minutos (volume: ~20 µL). O lisado celular é depois transferido para uma placa de determinação e medida de acordo com as informações do fabricante (kit de AMP cíclico Cisbio International # 62AMPPEC).

O composto de teste mostrou no ensaio de agonismo celular uma actividade muito elevada ($EC_{50} < 9,5 \times 10^{-10}$ M) sem qualquer inibição no ensaio de antagonismo ($IC_{50} > 2 \times 10^{-5}$ M).

2. O subtipo EP_2 do receptor PGE_2 e a expansão do cumulus pré-ovulatória

2.1. Antecedentes:

No folículo antral pré-ovulatório, o oócito é rodeado por células do cumulus que formam um anel denso de células à volta do oócito. Após o pico de LH (hormona luteinizante), é activada

uma série de processos e conduz a uma grande alteração morfológica neste anel de células constituído por células de cumulus. Neste caso, as células de cumulus formam uma matriz extracelular que conduz à denominada expansão de cumulus (Vanderhyden *et al.*, Dev Biol. Ago 1990;140(2):307-317). Esta expansão do cumulus é um componente importante do processo ovulatório e da subsequente possibilidade de fertilização.

As prostaglandinas, e aqui a prostaglandina E₂, cuja síntese é induzida por um pico de LH, são de importância crucial na expansão de cumulus. Os murganhos com prostanóide EP₂ silenciado (Hizaki *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. Ago 1999 31;96(18):10501-6.) mostram uma expansão de cumulus marcadamente reduzida e subfertilidade grave, demonstrando a importância do receptor EP₂ prostanóide neste processo.

2.2. Ensaio de expansão do cumulus *in vitro*

A foliculogénese é induzida em murganhos imaturos fêmeas (estirpe: CD1 (ICR) de Charles River) com uma idade de 20-24 dias por uma dose individual (intraperitoneal) de 7,5 I.U. de PMSG (Gonadotrofina Sérica da Égua Prenha; Sigma G-4877, Lote 68H0909). 47-50 horas após a injeção, os ovários são removidos e são removidos os complexos cumulus-oócitos. Nesta fase, o complexo de cumulus ainda não está expandido.

Os complexos cumulus-oócitos são depois incubados com prostaglandina E₂ (PGE₂) (1 µM), veículo de controlo (etanol) ou substâncias de teste durante 20-24 horas.

Meio: meio alfa-MEM com IBMX 0,1 mM, piruvatos (0,23 mM), glutaminas (2 mM), pen/estrep 100 IU/mL de pen. e 100 µg/mL de estrep.) e HSA (8 mg/mL)). A expansão do cumulus é depois estabelecida através da divisão em quatro fases (de acordo com Vanderhyden *et al.*, Dev Biol. Ago 1990; 140(2):307-317).

A substância de teste conduz a uma grande expansão dependente da concentração no complexo de cumulus. A expansão de cumulus induzida pela substância de teste é equivalente, em concentrações de 0,5 µM e 1 µM, à expansão do cumulus induzida pelo agonista PGE₂ do receptor EP₂ natural numa concentração de 1 µM (n = 16 complexos de cumulus-oócito por grupo; ver Figura 1).

2.3. Ensaio de ovulação *in vivo*:

A foliculogénese é induzida em murganhos fêmeas imaturas (estirpe: B6D2F1 de Charles River) com uma idade de 16-20 dias através de uma dose individual (intraperitoneal) de 10 I.U. de PMSG (Gonadotrofina Sérica da Égua Prenha; Sigma G-4877, Lote 68H0909). 47-50 horas após a estimulação com PMSG, é utilizada uma dose de 10 IU de HCG (gonadotrofina coriónica humana) para induzir a maturação final do folículo e ovulação. A substância de teste é administrada 10 horas, 5 horas e 0 horas antes da dose de HCG (s.c. em benzoato de benzilo/óleo de rícino 1+4 v/v). Catorze horas depois da dose de HCG, é efectuada a autópsia e é determinado o número de oócitos ovulados nas trompas de Falópio.

O agonista EP₂ conduz a um aumento significativo, dependente da concentração, nos oócitos ovulados. Este aumento

significativo nos oócitos ovulados ocorre após administração de apenas 0,00015 mg/animal em cada caso e mostra que é possível aumentar o número de oócitos ovulados mesmo com uma dose convencional de HCG utilizada para a ovulação (n = 11-12 animais por grupo; **p < 0,005 e *p < 0,05).

3. O subtipo EP₂ do receptor PGE₂ receptor e o ensaio de libertação de citocina

3.1. Antecedentes

Evidências crescentes sugerem que a endometriose está associada com uma resposta inflamatória significativa que pode ser mediada por macrófagos e linfócitos activados e níveis aumentados de citocinas, quimocinas e factores de crescimento. Foi colocada a hipótese que estes processos inflamatórios medeiam algumas das características clínicas associadas com endometriose. O fluido peritoneal de mulheres com endometriose é conhecido por conter mais células inflamatórias e suas citocinas, quimocinas e factores de crescimento associados. (Murphy AA. Clinical aspects of endometriosis. Ann NY Acad Sci. Março 2002;955:1-10). O resultado é um ambiente que promove a implantação e proliferação.

As prostaglandinas, e aqui a prostaglandina E₂, reduzem a expressão de citocinas inflamatórias, tais como TNF α de macrófagos activados. Os murganhos com prostanóide EP₂ silenciado (Shinomiya S et al., Bioch Phar 2001; 61 1153) não responderam a agonistas EP₂, demonstrando a importância do receptor EP₂ prostanóide neste processo.

3.2. Ensaio de libertação de citocinas *in vitro*

As células dendríticas derivadas de monócitos de dadores humanos são cultivadas em RPMI-1640 contendo soro bovino fetalico a 10% durante seis dias na presença de IL-4 10 ng/mL e GM-CSF 200 ng/mL. As células são activadas com vários estímulos de activação: LPS 10 ng/mL (Sigma), ligando CD-40 recombinante humano 5 µg/mL (R&D Systems) ou CpG-ADN Humano 5 µM (HyCult Biotechnology) na presença de prostaglandina E₂ (PGE₂) (1 µM), veículo de controlo (DMSO) ou substância de teste (1 µM) durante 18 horas. Os níveis de TNFα no sobrenadante da cultura celular para dadores individuais são determinados por kits ELISA comerciais. As substâncias de testes conduzem a uma inibição nos níveis de citocinas determinados no sobrenadante de cultura, como apresentado na Tabela 1.

3.3. Ensaio de libertação de citocinas *ex vivo*

A substância de teste ou veículo de controlo é administrado intraperitonealmente aos grupos de tratamento de murganhos CD-1 pesando 30-35 gramas cada um (n=5). Vinte minutos depois os murganhos são eutanaziados, os baços removidos e os esplenócitos são cultivados em RPMI + soro bovino fetalico a 10%. As células são activadas com PHA e ConA na ausência de substância de teste e cultivadas durante 18 horas. Os níveis de TNFα no sobrenadante da cultura celular para dadores individuais são determinados por kits ELISA comerciais. O agonista EP₂ provoca uma diminuição significativa no TNFα, como demonstrado na Figura 3.

4. Demonstração da inibição de libertação de citocinas de linfócitos T Th-1

4.1. Princípio

A activação de um linfócito T humano por uma célula apresentadora de antigénio e antigénio através do receptor da célula T é mimetizada em condições experimentais através da Lectina concanavalina A (ConA). É conhecido que a ConA se liga ao receptor da célula T e estimula a célula a libertar várias citocinas. Uma das citocinas libertada por Th-1 é o INF- γ . As actividades bioquímicas e biológicas de INF- γ foram extensivamente revistas.

4.2. Método de detecção

O INF- γ é um dímero da proteína expressa com 143 aminoácidos. Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) baseados em anticorpos específicos para o INF- γ estão disponíveis comercialmente. Os padrões e amostras são pipetados para os poços de uma microplaca. É adicionado um anticorpo específico para o INF- γ humano aos poços. É adicionado um substrato aos poços e forma-se uma cor em proporção com a quantidade de INF- γ ligado. É determinada a intensidade da cor.

4.3. Processo

São isolados linfócitos de sangue periférico de dadores humanos utilizando um gradiente de densidade Ficoll e os eritrócitos residuais removidos por lise selectiva. Os

linfócitos são cultivados a, aproximadamente, 10^6 células por mL em RPMI1640 com mais soro bovino fetalico a 10%. As culturas celulares são activadas com 2 µg/mL de ConA como descrito acima. A substância de teste é adicionada a várias diluições durante a activação com ConA. As células são incubadas durante, aproximadamente, 18 h a 37 °C. O INF-γ libertado durante a activação é determinado por ELISA.

5. Demonstração da inibição da libertação de citocinas de células dendríticas derivadas de monócitos humanos

5.1. Princípio:

As células dendríticas (DC) são as células apresentadoras de antígenos mais potentes e desempenham uma função central na resposta imunitária. Após estimulação através de receptores do tipo toll (TLR), as DC expressam e libertam citocinas e quimocinas pró-inflamatórias e podem induzir a activação e proliferação de células T naive. A ligação de um agonista EP₂ ao receptor EP de DC inibe a libertação de Interleucina 12 (IL-12) estimulada pelo ligando TLR4 (LPS). A ligação de um agonista EP₂ ao receptor EP de DC não inibe a libertação de Interleucina 10 (IL-10) estimulada pelo ligando TLR4 (LPS). Deste modo, um agonista EP₂ desvia a diferenciação de células T CD4 para longe da linhagem Th.

5.2. Método de detecção

A IL-12 é um heterodímero de glicoproteína com 75 kDa (p70), composta por duas subunidades não relacionadas geneticamente ligadas por uma ponte persulfureto. Os ensaios

imunoenzimáticos (ELISA) baseados em anticorpos específicos para a IL-12 p70 estão disponíveis comercialmente. Os padrões e amostras são pipetados para os poços de uma microplaca. É adicionado um anticorpo específico para a IL-12 humana aos poços. É adicionado um substrato aos poços e forma-se uma cor em proporção com a quantidade de IL-12 ligada. É determinada a intensidade da cor.

A IL-10 inicialmente designado factor inibidor da síntese de citocinas (CSIF), foi identificada originalmente como um produto de clones Th-2 que suprimiu a produção de citocinas pelos clones Th-1, respondendo ao estímulo pelo antígeno na presença de células apresentadoras de antígeno. A IL-10 é um dímero constituído por duas subunidades idênticas com 160 aminoácidos. Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) baseados em anticorpos específicos para a IL-10 estão disponíveis comercialmente. Os padrões e amostras são pipetados para os poços de uma microplaca. É adicionado um anticorpo específico para a IL-10 humana aos poços. É adicionado um substrato aos poços e forma-se uma cor em proporção com a quantidade de IL-10 ligada. É determinada a intensidade da cor.

5.3. Processo

São isoladas células dendríticas derivadas de monocitos humanos de dadores humanos utilizando um gradiente de densidade Ficoll e os eritrócitos residuais removidos por lise selectiva. São utilizadas MicroBeads CD14 para a separação de células humanas baseadas na expressão do antígeno CD14. As células dendríticas são cultivadas a, aproximadamente, $1,5 \times 10^6$ células por mL em RPMI1640 com soro bovino fetalico, GM-CSF (Leucina)

200 ng/mL e IL-4 10 ng/mL. As células crescem durante um período de 3 dias e, depois, o meio é substituído. É utilizado LPS 10 ng/mL para activar as células. 1 μ M de substância (agonista EP₂) e 1 μ M de PGE₂ são adicionados durante a estimulação com LPS: As células são incubadas durante, aproximadamente, 18 h a 37 °C. A libertação de IL-12 e IL-10 durante a activação é determinada por ELISA.

Tabelas:

A Tabela 1 mostra o efeito de substâncias de teste na libertação de TNF α de células monocíticas activadas *in vitro*. A substância de teste é administrada numa concentração de 18 mM. As células são activadas durante 18 horas. As substâncias de teste mostram actividade inibidora muito elevada de um modo sensível à dose na libertação de citocinas Th-1 de linfócitos T.

A Tabela 2 demonstra o efeito da substância de teste na inibição da libertação de citocinas Th-1 de linfócitos T. A substância de teste é adicionada, de um modo dependente da dose (0-20 nM), a células durante a sua activação por ConA, as células são incubadas durante 18 horas.

As Tabelas 3 a) e b) demonstram o efeito da substância de teste na inibição de libertação de citocinas de células dendríticas derivadas de monócitos humanos. A substância de teste ou PGE₂ é adicionada a uma concentração de 1 μ M durante a estimulação de células com LPS. As células são incubadas durante 18 horas. Os compostos de teste mostram elevada actividade imunomoduladora no ensaio de libertação de citocinas de células dendríticas (DC) derivadas de monócitos humanos e uma supressão

da citocina IL-12 promotora de Th-1 (3a) enquanto resguardou, de facto aumentou, a citocina IL-10 promotora de Th-2 (3b).

Figuras:

A Figura 1 mostra a expansão de cumulus induzida pela substância de teste em concentrações de 0,5 μ M e 1 μ M. Esta expansão é equivalente à expansão de cumulus induzida pelo agonista natural PGE₂ do receptor EP₂ numa concentração de 1 μ M (n = 16 complexos cumulus-oócito por grupo).

A Figura 2 mostra a ovulação induzida pela substância de teste *in vivo*. A substância de teste é administrada em concentrações de 0,00015; 0,0015 e 0,015 mg/animal, 10, 5 e 0 horas antes de HCG.

A Figura 3 mostra o efeito da substância de teste na activação de esplenócitos de murganho *ex vivo*. As células são activadas com PHA ou ConA. A substância de teste é administrada intraperitonealmente em concentrações de 1 e 2 μ g/animal, 20 min antes do sacrifício.

Tabela 1: Inibição da Libertação de TNF α de células monocíticas activadas

Substância de Teste + LPS	Dador 4 (TNFα pg/mL)	Dador 6 (TNFα pg/mL)
Veículo	3566,9	10750,1
PGE2	0,0	174,8
Substância de teste	643,6	753,7

Substância de Teste + ligando CD40	Dador 3 (TNFα pg/mL)	Dador 4 (TNFα pg/mL)	Dador 6 (TNFα pg/mL)
Veículo	567,1	546,3	541,8
PGE2	147,9	87,0	54,2
Substância de teste	274,3	226,8	142,4

Substância de Teste + CpG	Dador 1 (TNFα pg/mL)	Dador 3 (TNFα pg/mL)	Dador 6 (TNFα pg/mL)
Veículo	2155,9	1340,7	467,8
PGE2	104,5	70,0	106,2
Substância de teste	291,3	599,4	115,9

Tabela 2: Inibição da libertação de citocinas do tipo Th-1
forem linfócitos T

	% de inibição abaixo do controlo, estimulado com ConA, não tratado ($\pm$ desvio padrão)	
Substância de teste [nM]	Dador 1	Dador 2
0	0 $\pm$ 6	0 $\pm$ 13
0,5	5 $\pm$ 5	7 $\pm$ 22
1,12	8 $\pm$ 4	28 $\pm$ 27
2,5	33 $\pm$ 13	36 $\pm$ 14
5	52 $\pm$ 11	56 $\pm$ 7
10	70 $\pm$ 8	74 $\pm$ 3
20	84 $\pm$ 1	81 $\pm$ 6

Tabela 3 a: Inibição da libertação de citocinas em células dendríticas derivadas de monócitos humanos, determinação de IL-12 (pg/mL)

	% de inibição abaixo do controlo, estimulado com LPS, não tratado	
Dador	Substância de teste [1 µM]	PGE ₂ [1 µM]
1	64	78
2	7	44
3	38	84
4	29	29

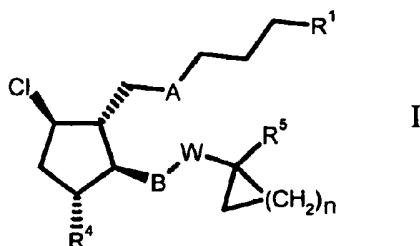
Tabela 3 b: Inibição da libertação de citocinas em células dendríticas derivadas de monócitos humanos, determinação de IL-10 (pg/mL)

	% de inibição abaixo do controlo, estimulado com LPS, não tratado	
Dador	Substância de teste [1 µM]	PGE ₂ [1µM]
1	144	103
2	168	134
3	153	107

Lisboa, 15 de Maio de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Composto da fórmula geral I



onde

R^1 é um grupo CH_2OH , $-COOR^2$, $-CONHR^2$ ou $-CONHR^3$,

R^2 é um hidrogénio,

um radical alquilo C_1-C_{10} que é linear ou ramificado, opcionalmente, mono- a polinsaturado e é opcionalmente mono- a polissubstituído com halogéneo, alcoxi C_1-C_4 , arilo C_3-C_{10} substituído ou aroílo C_3-C_{10} opcionalmente substituídos, di-alquil C_1-C_5 -amino ou tri-alquil C_1-C_5 -amino substituído

um cicloalquilo C_3-C_{10} que é opcionalmente substituído com alquilo C_1-C_4 , um arilo C_3-C_{10} que é opcionalmente substituído com fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo que, por sua vez, pode ser substituído na posição 3 e na posição 4 com flúor, cloro, alcoxi ou trifluorometilo ou na posição 4 com hidroxilo, halogéneo, fenilo, um ou mais grupos alquilo C_1-C_4 ,

clorometilo, fluorometilo, trifluorometilo, carboxilo, hidroxilo ou alcóxiloC₁-C₄,

ou um heterocicloalquiloC₃-C₇,

R³ é um ácido C₁-C₁₅-carboxílico ou ácido C₁-C₁₅-sulfónico,

A é um grupo *cis*-CH=CH- ou -CH₂-CH₂-,

B é um grupo *trans*-CH=CH- ou -CH₂-CH₂-,

W é um alquilenoc₂-C₆,

R⁴ é um grupo hidroxilo, um radical O-R⁶ ou O-R⁷, onde R⁶ é um radical tetra-hidropirânico, tetra-hidrofuranílico, trimetilsililo, terc-butildimetilsililo, terc-butildifenilsililo ou tribenzilsililo e R⁷ é um ácido C₁-C₁₅-carboxílico,

R⁵ é um hidrogénio, um grupo alquiloC₁-C₁₀ ou alceniloC₁-C₁₀,

n é o número 1-4,

e os seus sais e seus clatratos de ciclodextrina com bases fisiologicamente toleráveis,

2. Composto de acordo com a Reivindicação 1,

onde

R¹ é um grupo CH₂OH, -COOR², -CONHR² ou -CONHR³,

R² é um hidrogénio, ou

um radical alquiloC₁-C₁₀ que é linear ou ramificado, opcionalmente, mono- a polinsaturado e é opcionalmente monossustituído com flúor, cloro ou bromo, com alcoxiloC₁-C₄, ariloC₃-C₁₀ substituído ou opcionalmente substituído aroíloC₃-C₁₀, di-alquilC₁-C₅-amino ou tri-alquilC₁-C₅-amino,

um cicloalquiloC₅-C₆ que é opcionalmente substituído com alquiloC₁-C₄,

um radical ariloC₃-C₁₀ que é opcionalmente substituído com fenilo que pode ser substituído na posição 3 ou 4 com flúor, cloro, alcoxilo ou trifluorometilo ou na posição 4 por hidroxilo,

um heterocicloalquiloC₅-C₆ que pode ser interrompido uma ou mais vezes com azoto, oxigénio ou enxofre,

R³ é um ácido C₁-C₁₀-carboxílico ou ácido C₁-C₁₀-sulfónico,

A é um grupo *cis*-CH=CH- ou -CH₂-CH₂-,

B é um grupo *trans*-CH=CH- ou -CH₂-CH₂-,

W é um alquilenosC₂-C₆,

R⁴ é um grupo hidroxilo,

R⁵ é um hidrogénio, um grupo alquiloC₁-C₆ ou alceniloC₁-C₁₀,

n é o número 1-4.

3. Compostos de acordo com a Reivindicação 1 ou 2, onde

R¹ é um grupo -CH₂OH, -COOR² -CONHR² ou -CONHR³,

R² é um hidrogénio ou um alquiloC₁-C₄ que é opcionalmente substituído com fenilo,

um cicloalquiloC₅-C₆,

um ariloC₃-C₆ que é opcionalmente substituído com fenilo,

R³ é um ácido C₁-C₆-carboxílico ou ácido C₁-C₆-sulfónico,

A é um grupo *cis*-CH=CH- ou -CH₂-CH₂-,

B é um grupo *trans*-CH=CH- ou -CH₂-CH₂-,

W é um alquilenoc₂,

R⁴ é um grupo hidroxilo,

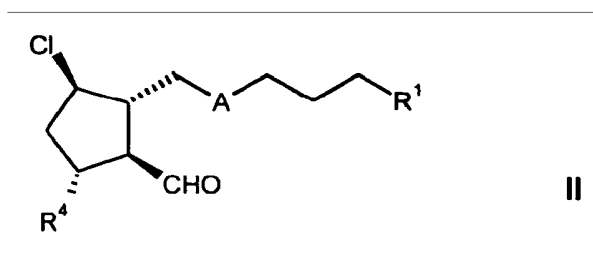
R⁵ é um hidrogénio, um grupo alquiloC₁-C₄ ou alceniloC₁-C₅ saturado e

n é o número 1-4.

4. Medicamentos que compreendem, pelo menos, um dos compostos da fórmula I de acordo com as Reivindicações 1-3.
5. Medicamentos de acordo com a Reivindicação 4, caracterizados por o derivado de prostaglandina da fórmula geral I estar presente numa quantidade eficaz.
6. Compostos de acordo com a Reivindicação 1-3 e medicamentos de acordo com as Reivindicações 4 e 5 com veículos e substâncias de formulação adequadas.
7. Derivado de prostaglandina da fórmula geral I, de acordo com as Reivindicações 1-3, para utilização como um medicamento.
8. Medicamentos de acordo com a Reivindicação 7, para promover a fertilidade.
9. Medicamentos de acordo com a Reivindicação 7, para fertilização *in vitro*.
10. Medicamentos de acordo com a Reivindicação 7, para promover a ovulação.
11. Medicamentos de acordo com a Reivindicação 7, para eliminar a expansão de cumulus insuficiente e as suas sequelas.
12. Medicamentos de acordo com a Reivindicação 7, para tratar distúrbios.

13. Medicamentos de acordo com a Reivindicação 12, caracterizados por o distúrbio compreender distúrbios de fertilidade.
14. Medicamentos de acordo com a Reivindicação 12, caracterizados por o distúrbio compreender menstruação dolorosa.
15. Medicamentos de acordo com a Reivindicação 12, caracterizados por o distúrbio compreender endometriose.
16. Medicamentos de acordo com a Reivindicação 12, caracterizados por o distúrbio compreender pressão intraocular elevada.
17. Medicamentos de acordo com a Reivindicação 12, caracterizados por o distúrbio compreender osteoporose.
18. Medicamentos de acordo com a Reivindicação 12, caracterizados por o distúrbio compreender pressão sanguínea elevada.
19. Medicamentos de acordo com a Reivindicação 12, caracterizados por o distúrbio compreender doenças autoimunitárias.
20. Medicamentos de acordo com a reivindicação 19, em que a referida doença autoimunitária é seleccionada do grupo consistindo de esclerose múltipla, esclerose múltipla secundária progressiva, psoríase, artrite reumatóide, doença de Crohn e alopecia areata.

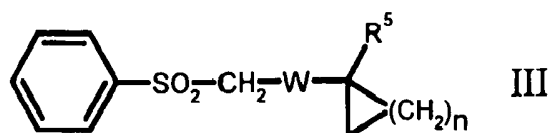
21. Medicamentos de acordo com a reivindicação 19, em que a referida doença autoimunitária é esclerose múltipla.
22. Derivado de prostaglandina da fórmula geral I, de acordo com as Reivindicações 1-3, na forma de um produto farmacêutico para administração entérica, parentérica, vaginal e oral.
23. Processo para a preparação dos compostos de acordo com as Reivindicações 1-3, caracterizado por um aldeído da fórmula geral II



no qual R^1 tem o significado dos radicais $-\text{COOR}^2$, $-\text{CONHR}^3$ e A e R^4 têm os significados indicados acima,

onde o grupo OH livre em R^4 é protegido,

é feito reagir com o carbanião da sulfona da fórmula geral III



e

acetilação da hidroxissulfona resultante é seguida por eliminação redutora, para proporcionar a olefina e, quando apropriado, uma subsequente desprotecção dos grupos hidroxilo que são protegidos por qualquer sequência e, quando apropriado, esterificação, eterificação e/ou hidrogenação de ligações duplas e/ou esterificação de um grupo carboxilo esterificado ($R^1 = \text{COOR}^2$) e/ou de um grupo carboxilo livre (COOR^2 com $R^2 = \text{H}$) e/ou conversão de um grupo carboxilo livre (COOR^2 com $R^2 = \text{H}$) numa amida ($R^1 = \text{CONR}^2$) e/ou redução de um grupo carboxilo esterificado ($R^1 = \text{CONHR}^3$).

Lisboa, 15 de Maio de 2008

Figura 1

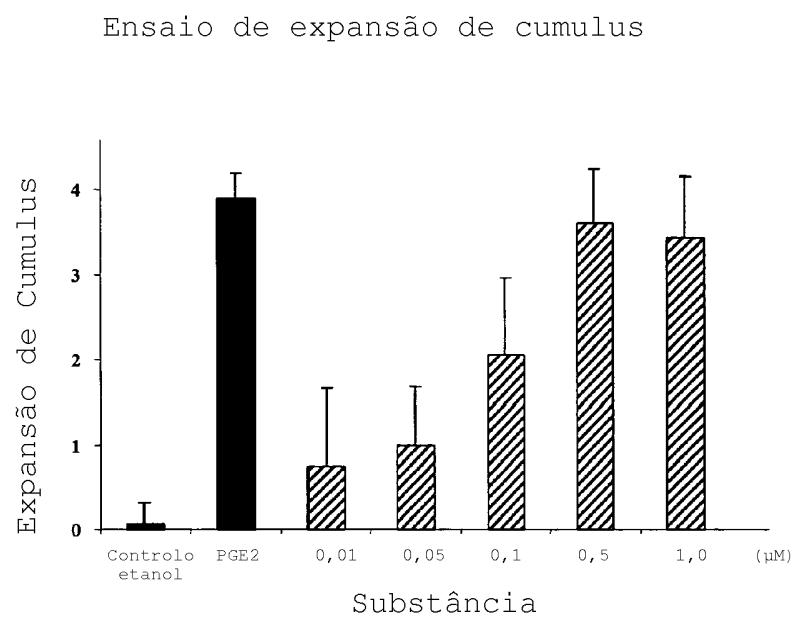


Figura 2

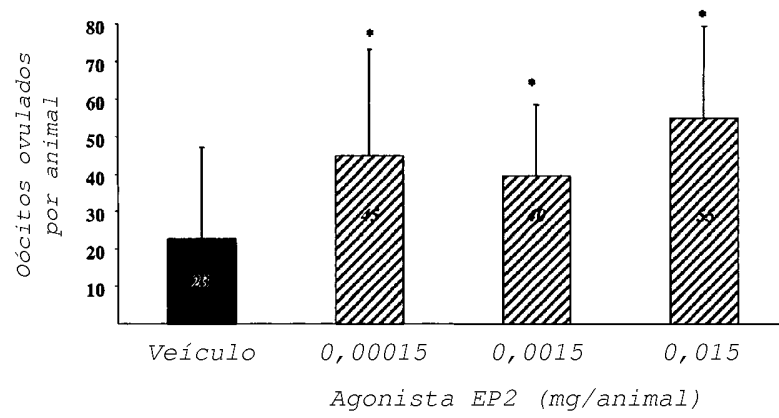


Figura 3

