

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

ANEXOS DE LA SOLICITUD

- Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica ☒
- Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la SIC Adjunto ☒
- Recibo de la tasa respectiva ☒
- Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras de la publicación ☐
- Si se reivindica prioridad Andina: ☐
- Copia de la primera solicitud ☐
- Traducción oficial ☐
- Si se reivindica prioridad Unionista: ☐
- Copia certificada de la primera solicitud ☒
- Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior
- Traducción simple ☒
- Capítulo descriptivo ☒
- Dibujos, planos necesarios ☐
- Capítulo reivindicatorio ☒
- Tarjeta archivo propietarios según formato ☒
- Tarjeta archivo temático según formato ☒
- Extracto para publicación según formato ☒
- Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cms ☐
- Otros Documentos Sustitución ☒

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO
QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA

NOMBRE CARLOS R. OLARTE

CC. 79.782.747 de Bogotá

T.P.No. 74.295

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 71,723
FECHA : NOVIEMBRE 21 DE 2000

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	Nº. PAGO	Vr. PAGO
JORGE LUIS GOMEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050-00110-6	3118427	12,160,000.00

C O N C E P T

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1	TRANITES DE SOL. DE PATENTE DE IN
			608,000.00
		TOTAL :	\$ 608,000.00

SCH: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

RAISBECK, LARA, RODRIGUEZ & RUEDA

MIEMBROS DE LA FIRMA

BAKER & McKENZIE

CALLE 35 No. 7-25, PISO 4
TELÉFONO: (57-1) 285-1400
SANTA FE DE BOGOTÁ, D.C.
COLOMBIA

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Re: Nueva solicitud de Patente de Invención

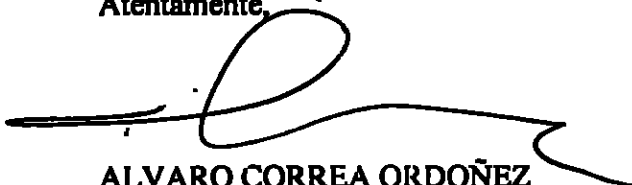
Titulada : "AGONISTAS SELECTIVOS DEL RECEPTOR
EP4 EN EL TRATAMIENTO DE LA OSTEOPOROSIS".

Solicitante : PFIZER PRODUCTS INC.

ALVARO CORREA ORDOÑEZ, mayor de edad y vecino de Santafé de Bogotá, D.C. identificado como aparece al pie de mi firma, actuando en mi carácter de apoderado de la sociedad de la referencia, respetuosamente me permito manifestar que SUSTITUYO el poder a mi conferido por la mencionada sociedad en el doctor CARLOS R. OLARTE, identificado con la Cédula de Ciudadanía No. 79.782.747 de Bogotá y con la Tarjeta Profesional No. 74.295.

El apoderado sustituto queda con las mismas facultades del principal.

Atentamente,



ALVARO CORREA ORDOÑEZ
C.C. No. 79.143.366 de Usaquén
T.P. 20.281

**DILIGENCIA DE RECONOCIMIENTO
Y PRESENTACION PERSONAL**

Ante el Notario Once del Circulo de Santafé de
Bogotá, compareció Julma Navarro de Bautista

Quien exhibió la C.C. No. 1.723.234

expedida en BOGOTÁ T.P. 2021

y declaró que la firma y huella que aparecen en
el presente memorial son suyas y que el conte-
nido del mismo es cierto.

Memorial dirigido a Subteniente

Santafé de Bogotá, D.C.

12 DIC 2021

Firma del Declarante

HUELLA

Autorizó la anterior Diligencia

NOTARIO ONCE DEL CIRCULO DE SANTAFÉ DE BOGOTÁ

REPUBLICA DE COLOMBIA
CIRCULO DE SANTAFÉ DE BOGOTÁ
BOGOTÁ, D.C.

JULMA NAVARRO DE BAUTISTA
NOTARIA ONCE

patentes

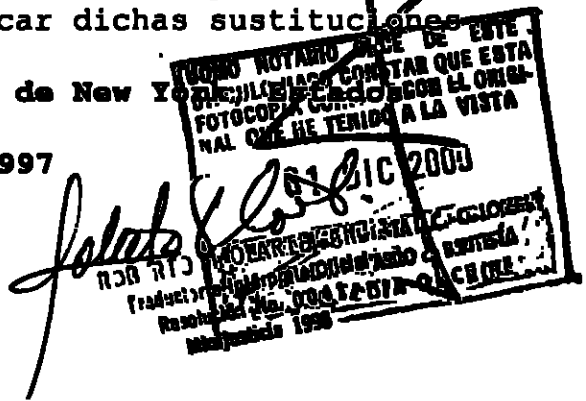
Raisbeck, Lara, Rodríguez
Miembros de la Firma
BAKER & MCKENZIE
Abogados
Apartado Aéreo 3746
Teléfono : 285-1400
Santa fe de Bogotá, D.C.
Colombia

PODER

La abajo firmante **PFIZER PRODUCTS INC.**, una sociedad constituida bajo las leyes del Estado de Connecticut, Estados Unidos de América, domiciliada en **Eastern Point Road, Groton Connecticut 06340, Estados Unidos de América**, declara por el presente otorgar a **ALVARO CORREA ORDÓÑEZ y/o JAMES W.F. RAISBECK y/o LUZ HELENA VILLAMIL y/o CARLOS R. OLARTE** poder especial amplio y bastante para recabar de las oficinas y autoridades nacionales que correspondan, la obtención de: **Registro de marcas, renovaciones, fusiones, cambios de nombre, traspasos, presentación y tramitación de oposiciones, depósitos de nombres comerciales, cambios de dirección registro de patentes de invención, fusiones, cambios de nombre, traspasos, presentación y tramitación de oposiciones, cambios de dirección**, a cuyo efecto los faculta para dar ante dichas autoridades, todos los pasos necesarios al objeto indicado, elevar solicitudes, formular descripciones, protestas, declaraciones, apelaciones y reclamos, oblar impuestos, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede a los expresados mandatarios poder bastante par recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quien vayan a representar a la compañía judicial y estrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de las marcas se presentaren y hacer cuanto fuere necesario, ante las autoridades administrativas o judiciales de cualquier orden, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y en caso necesario revocar dichas sustituciones.

Dado y firmado en Nueva York, Estado de New York, Estados Unidos de América.

A los 8 días del mes de Octubre de 1997



PFIZER PRODUCTS INC.
(Firma ilegible)
ALLEN J. SPIEGEL
Vicepresidente

Estado de nueva York)
Condado de nueva York)

SUSCRITO Y JURADO ante mí a los 8 días del mes de octubre de
1997.

Firmado John (ilegible)

JOHN ALPHONSO

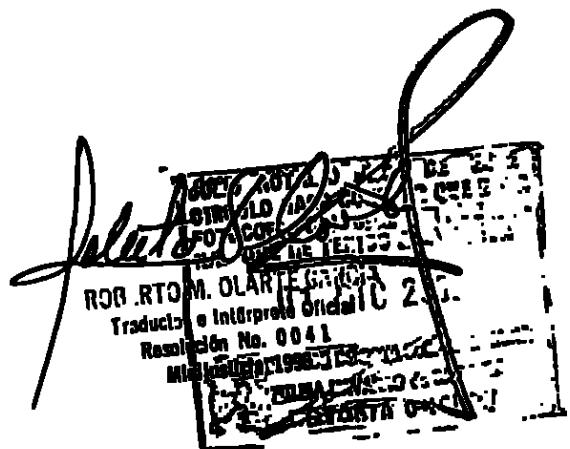
Notario Público, Estado de Nueva York

No. 30-4859888

Calificado en el Condado de Nassau

Certificado Registrado en el Condado de Nueva York

Comisión expira el 19 de mayo de 1998



2

Raisbeck, Lara, Rodríguez
Miembros de la Firma
BAKER & MCKENZIE
Abogados
Apartado Aéreo 3746
Teléfono : 285-1400
Santa fe de Bogotá, D.C.
Colombia

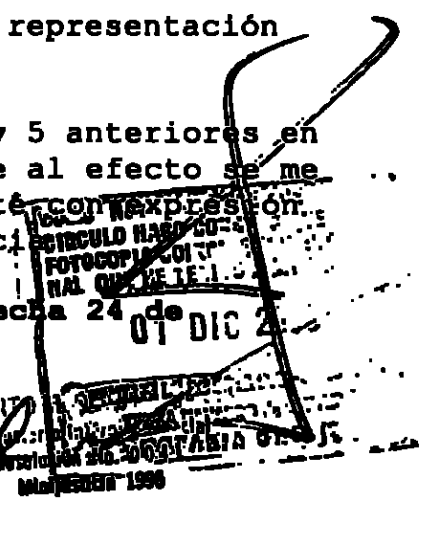
CERTIFICADO NOTARIAL

A los 8 días del mes de Octubre de 1997, el suscrito Notario

DA FE

1. Que **ALLEN J. SPIEGEL**, mayor y domiciliado en Nueva York, Estado de New York, Estados Unidos de América, suscribió de su puño y letra el siguiente documento que antecede
2. Que conozco al otorgante y que éste tiene capacidad legal para el otorgamiento.
3. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de **Vicepresidente** de la persona jurídica **PFIZER PRODUCTS INC.**
4. Que la persona jurídica **PFIZER PRODUCTS INC.** con sede en **Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, Estados Unidos de América** está legalmente constituida, que tiene existencia legal actual y que el acto para el cual se ha otorgado el poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.
5. Que el otorgante efectivamente tiene la representación que ostenta y que ésta es legítima.
6. Que he basado las certificaciones 3, 4 y 5 anteriores en los siguientes documentos auténticos que al efecto se me exhibieron y que menciono específicamente con expresión de sus fechas y de su origen o procedencia:

Resolución de Pfizer Products Inc. de fecha 24 de febrero de 1997.



b.i.

No. 21320

5

1

1

1

5

5

Legalización No. 148381 del Consulado de Colombia en Nueva York de la firma de Norman Goodman como Funcionario del Condado de Nueva York. Julio 31 de 1997.

Firma ilegible
Federico Mejía Mejía
Cónsul de Colombia

Legalización No. 065918 del Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia de la firma de Federico Mejía como Cónsul de Colombia en Nueva York, Estados Unidos de América. Santa fe de Bogotá, agosto 13 de 1998.

Firma ilegible
Jefe de Legalizaciones

Traducción Oficial, de un texto del idioma inglés.
Traducción Oficial realizada por **ROBERTO M. OLARTE GARCIA**, Traductor e intérprete oficial juramentado según Resolución 0041 del Ministerio de Justicia 1996. Santa fe de Bogotá, agosto 13, 1998.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
98 AUG 18 AM 9:53
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTA FE DE BOGOTÁ D.C.

Roberto M. Olarte Garcia
ROBERTO M. OLARTE GARCIA
Traductor e Intérprete Oficial
Resolución No. 0041
Ministerio de Justicia 1996

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
1738132-11
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

01 L.
CIRCULO H...
FOTOGRAFIA
DEL C...
[Handwritten signature]



CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA
10 EAST 46TH STREET, NUEVA YORK, NY 10017
TEL. (212) 370-0004 FAX (212) 972-1725

10

EL SUSCRITO CONSUL DE COLOMBIA

VISTOS LOS DOCUMENTOS PRESENTADOS POR LOS INTERESADOS

CERTIFICA:

Que el (la) Sr.(a) **NORMAN GOODMAN**, Clerk del Condado de New York Estados Unidos de América, certifica que **JOHN ALPHONSO** es Notario Público del Estado de New York y que ejercía en la fecha las funciones allí expresadas y que la firma y sellos que en el documento aparecen como suyos son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales.

Que el notario citado autenticó el documento adjunto firmado por **ALLEN J. SPIEGEL** en su calidad de **VICEPRESIDENTE** de la firma **PFIZER PRODUCTS INC.**, compañía legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de su país y cumple con su objeto social de acuerdo con las mismas.

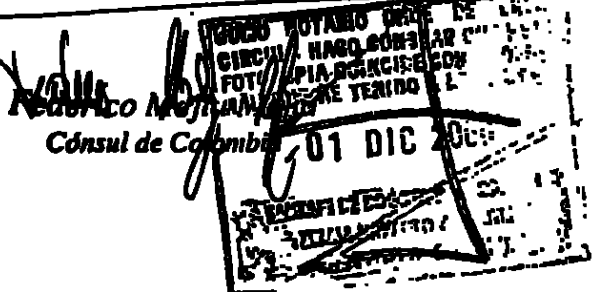
Que ha tenido a la vista los documentos probatorios de los hechos citados constatados por el Notario Público y el County Clerk de New York, los cuales forman parte integral del presente documento.

Se expide esta certificación en concordancia con el artículo 259 del Código de Procedimiento Civil y 480 del Código de Comercio a solicitud del interesado a los 31 días del mes de Julio de 1998.

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD POR EL CONTENIDO DE LOS DOCUMENTOS ADJUNTOS.

PAGADO IMPUESTO DE TIMBRE Y DERECHOS CONSULARES

VALOR CINCUENTA Y SEIS DOLARES US\$56.00 RECIBO No. 14881



0123456789
10111213141516171819
20212223242526272829
30313233343536373839
40414243444546474849
50515253545556575859
60616263646566676869
70717273747576777879
80818283848586878889
90919293949596979899

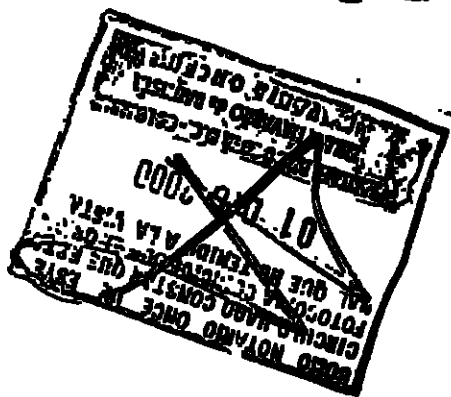
~~98 AUG 13 AM 9:15~~

**JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.**

**MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES.**

065918

RECUERDA FIRMAR LA PARTE FN:
DOCUMENTO DESEMPEÑO:
LAS FUNCIONES INDICADAS:



State of New York
County of New York, } ss.:

NEW YORK

21320

Page 1

I, NORMAN GOODMAN, County Clerk of the Supreme Court of the State of New York, in and for the County of New York, a Court of Record, having by law a seal, DO HEREBY CERTIFY pursuant to the Executive Law of the State of New York, that

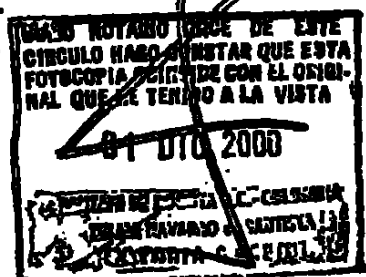
John A. Pharo
whose name is subscribed to the annexed affidavit, deposition, certificate of acknowledgment or proof, was at the time of taking the same a NOTARY PUBLIC in and for the State of New York duly commissioned, sworn and qualified to act as such; that pursuant to law, a commission or a certificate of his official character, with his autograph signature has been filed in my office; that at the time of taking such proof, acknowledgment or oath, he was duly authorized to take the same; that I am well acquainted with the handwriting of such NOTARY PUBLIC or have compared the signature on the annexed instrument with his autograph signature deposited in my office, and I believe that such signature is genuine.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand affixed my official seal this

OCT 14 1897

RECEIVED PAID \$1.00

Norman Goodman
County Clerk and Clerk of the Supreme Court, New York County



RAISBECK, LARA, RODRIGUEZ & RUEDA

Members of the Firm

BAKER & MCKENZIE

ATTORNEYS AT LAW

APARTADO AEREO 3746

TELEFONO: 268-1419

SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

COLOMBIA

POWER OF ATTORNEY

The undersigned, PFIZER PRODUCTS INC., a corporation organized under the laws of the State of Connecticut, United States of America, located in Eastern Point Road, Groton Connecticut 06340, United States of America, declares that it hereby grants to

**ALVARO CORREA ORDOÑEZ and/or
JAMES W.F. RAISBECK and/or
LUZ HELENA VILLAMIL and/or
CARLOS R. OLARTE**

a full and sufficient power of attorney to apply to the proper national officers and authorities for the issue of:

Trademark registrations, renewals, mergers, changes of name, assignments, filing and prosecution of oppositions, deposit of commercial names, changes of address.

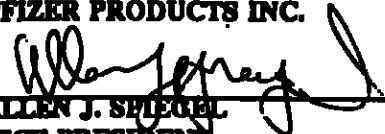
Letters Patent, mergers, changes of name, assignments, filing and prosecution of oppositions, changes of address,

to which end it empowers them to take all steps necessary before said authorities for the objects stated, to file petitions, prepare descriptions, make protests, declarations, appeals and objections, pay imposts, apply for certifications, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. To the said mandatories sufficient power is granted hereby to receive notifications for and on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the marks, and to do everything that may be required, before administrative or judicial officers of any class, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions if necessary.

Done and subscribed in New York, New York, USA

Dated 08 October 1997

PFIZER PRODUCTS INC.


**ALLEN J. SPIEGEL
VICE PRESIDENT**

PODER

La abajo firmada

PFIZER PRODUCTS INC.

domicilada en
Eastern Point Road, Groton
Connecticut 06340,
Estados Unidos de América.

declara por el presente otorgar a
**ALVARO CORREA ORDOÑEZ y/o
JAMES W. F. RAISBECK y/o
LUZ HELENA VILLAMIL y/o
CARLOS R. OLARTE**

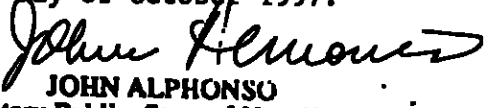
poder especial amplio y bastante para recabar de las oficinas y autoridades nacionales que correspondan, la obtención de: Registro de marcas renovaciones, fusiones, cambios de nombre, traspasos, presentación y tramitación de oposiciones, depositos de nombres comerciales, cambios de dirección, continúe otorgar a cuyo efecto los faculta para dar ante dichas autoridades, todos los pasos necesarios al objeto indicado, elevar solicitudes, formular descripciones, protestas, declaraciones, apelaciones y reclamos, oblar impuestos, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede a los expresados mandatarios poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de las marcas se presentaren y hacer cuanto fuere necesario, ante las autoridades administrativas o judiciales de cualquier orden, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y en caso necesario revocar dichas sustituciones.

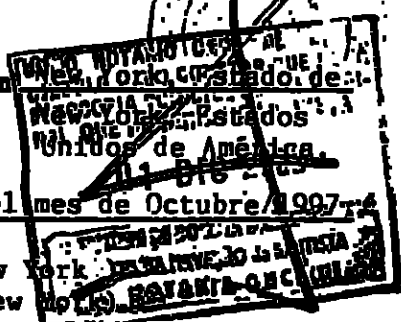
Dado y firmado en

a los 8 días del mes de Octubre 1997

State of New York
County of New York

SUBSCRIBED AND SWORN to before me this
8th day of October 1997.

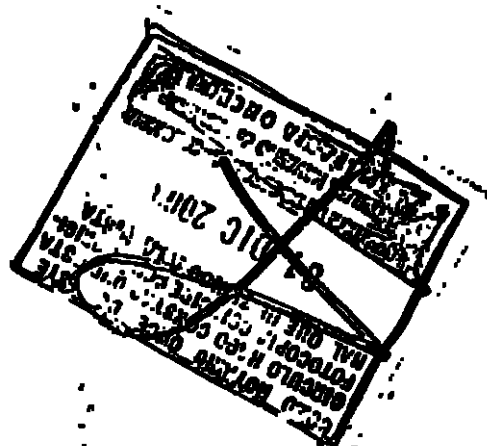

**JOHN ALPHONSO
Notary Public, State of New York
No. 30-4859888
Qualified in Nassau County
Certificate filed in New York County
Commission Expires May 19, 1998**





* Continuación...

Registro de Patentes de Invención,
fusiones, cambios de nombre,
traspasos, presentación y
tramitación de oposiciones,
cambios de dirección.



RAISBECK, LARA, RODRIGUEZ & RUEDA

Members of the Firm

BAKER & MCKENZIE

ATTORNEYS AT LAW

APARTADO AEREO 3748

TELEFONO: 285-1488

SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

COLOMBIA

NOTARIAL CERTIFICATION

On this 8th day of October

1997, the undersigned Notary

CERTIFIES

1. That ALLEN J. SPIEGEL

is of legal age and domiciled in New York, New York,
United States of America,

and set his hand on the foregoing document

2. That the grantor is to me personally known and that he/she has
legal capacity to execute the instrument

3. That the grantor has executed the foregoing document
as

VICE PRESIDENT

of the juridical person

PFIZER PRODUCTS INC.

4. That the juridical person
PFIZER PRODUCTS INC.

having its home office in Eastern Point Road, Groton,
Connecticut 06340, United States of America,

is duly organized, has present existence and that the purposes for
which the power of attorney is given are within the scope of its corporate
purposes.

5. That the grantor has in fact the referred to authority and that his/her
representation is legal.

6. That I have based certifications 3, 4 and 5 above on the following authentic
documents for such purpose exhibited to me and which I mention
specifically, giving their dates and their origin or source:

Resolution of Pfizer Products Inc. dated
24 February 1997.

John Alphonso

JOHN ALPHONSO

Notary Public, State of New York
New York State Notary Public No. 59888

Qualified in Nassau County
Certificate filed in New York County
Commission Expires May 19, 1998

CERTIFICACION NOTARIAL

A los 8 dias del mes de Octubre

de 19 97, el suscrito Notario

DA FE

1. Que ALLEN J. SPIEGEL

mayor y domiciliado en
New York, Estado de New York,
Estados Unidos de América.
suscrito de su puño y letra el documento que antecede

2. Que conozco al otorgante y que éste tiene capacidad legal
para el otorgamiento

3. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su
carácter de:

Vice-presidente

de la persona jurídica

PFIZER PRODUCTS INC.

4. Que la persona jurídica

PFIZER PRODUCTS INC.

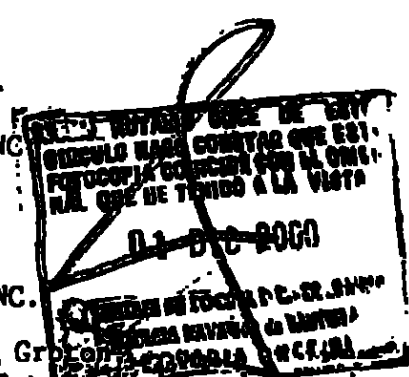
con sede en
Eastern Point Road, Groton,
Connecticut 06340, Estados Unidos de América
está legalmente constituida, que tiene existencia legal actual y que el
acto para el cual se ha otorgado el poder está comprendido entre los
que constituyen su objeto social

5. Que el otorgante efectivamente tiene la representación que ostenta
y que esta es legítima

6. Que he basado las certificaciones 3, 4 y 5 anteriores en los
siguientes documentos auténticos que al efecto se me exhibieron y
que menciono específicamente con expresión de sus fechas y de su
origen o procedencia:

Resolución de Pfizer Products Inc, de
fecha 24 de febrero de 1997.

El Notario Público



PATRICIA KOCH MORENO
INGLIS Y ALFMAN
c/ Canalejas, 113
Tel. 519599J - MADRID

121

A QUIENES LES SEAN PRESENTADOS ESTOS DOCUMENTOS:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

La Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

23 de agosto de 2000

POR LA PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES COPIA FIEL DEL ORIGINAL DE LA SOLICITUD DE PATENTE IDENTIFICADA MAS ADELANTE, A LA QUE LE FUE OTORGADA FECHA DE PRESENTACION AL CUMPLIR LOS REQUISITOS ESTABLECIDOS EN EL ARTICULO 111 TITULO 35 DEL CODIGO DE LOS ESTADOS UNIDOS, Y QUE OBRA EN EL REGISTRO DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS.

NUMERO DE SOLICITUD: 60/171,353 ✓

FECHA DE PRESENTACION: 22 de diciembre de 1999 ✓

Por delegación del

COMISIONADO DE PATENTES Y MARCAS

T. LAWRENCE

Oficial de certificaciones

PATRICIA NECH MURILLO
INGLES Y AL CAN
C. Cartagena, 113
Tele. 519 59 90 - MADRID

IMPRESO DE S LICITUD PROVISIONAL

Instancia para registrar una SOLICITUD PROVISIONAL bajo CFR 37 1.53(b) (2).

N° de Archivo PC10653RTR Escriba una cruz (+) en esta casilla ±

2° Apellido	1er Apellido	Inicial	Residencia (ciudad y estado o país)
Cameron	Kimberly	O.	5 Winchester Court North, East Lyme, CT 06333
Ke	HuaZhu	-	2 Deer Lane, Ledyard, CT 06339, USA
Lefker	Bruce	A.	21 Eagle Ridge Dr. Gales Ferry, CT 06335
Thompson	David	D.-	37 Bittersweet Drive, Gales Ferry, CT 06335

TITULO DE LA INVENCIÓN (máximo 280 caracteres)

AGONISTAS SELECTIVOS DEL RECEPTOR EP4 EN EL TRATAMIENTO DE LA OSTEOPOROSIS

DIRECCION PARA LA CORRESPONDENCIA

Gregg C. Benson
Pfizer Inc.
Eastern Point Road
Groton

ANEXOS DE LA SOLICITUD (Revisar todas los aplicables)

☒ Descripción, 22
Declaración de Pequeña Empresa
_ DibujosNúm. hojas
_ Otros (especificar)Resumen, página

FORMA DE PAGO (señalar una de las opciones)

_ Se adjunta cheque o pago en metálico IMPORTE TASAS
para cubrir tasas solicitud provisionalSOLICITUD
PROVISIONAL (\$) \$150
☒ El Comisionado está autorizado para
cargar las tasas de solicitud en la
Cuenta número 16-1445

La invención fue realizada por una agencia del Gobierno de los Estados Unidos
o bajo contrato con una agencia del Gobierno de los Estados Unidos

☒ No

_ Sí, el nombre de la agencia del Gobierno de los Estados Unidos y el n°
de contrato son:

Respetuosamente presentado,
FIRMA (ilegible)
Robert T. Ronau

FECHA 22/12/99
N° DE REGISTRO 36,257
(si procede)

_ Inventores Adicionales es especifican en las hojas adjuntas

UNICAMENTE SOLICITUD PROVISIONAL

CORREO URGENTE N° E5248205635US

~~16~~

PC10653RTR 1
U.S.A. 60/171,353 solicitada el 22 de diciembre de 1999

**AGONISTAS SELECTIVOS DEL RECEPTOR EP4 EN EL TRATAMIENTO
DE LA OSTEOPOROSIS**

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a procedimientos y a
5 composiciones farmacéuticas que comprenden agonistas de
prostaglandina que son útiles para prevenir la pérdida ósea
o para restaurar o aumentar la masa ósea y para potenciar
la curación ósea, incluyendo el tratamiento de trastornos
que se presentan con una masa ósea reducida y/o defectos
10 óseos en vertebrados, y en particular en mamíferos,
incluyendo seres humanos. Esta invención se refiere de
forma específica a procedimientos y a composiciones
farmacéuticas que comprenden agonistas de prostaglandinas
selectivos para el receptor EP4.

15 La osteoporosis es una enfermedad esquelética
sistémica, caracterizada por una masa ósea reducida y por
el deterioro del tejido óseo, con un incremento
consiguiente de la fragilidad del hueso y susceptibilidad
a fracturas. En los Estados Unidos, el trastorno afecta a
20 más de 25 millones de personas y provoca más de 1,3
millones de fracturas cada año, que anualmente incluyen
500.000 fracturas de columna vertebral, 250.000 de cadera
y 240.000 de muñeca. Las fracturas de cadera son la
consecuencia más grave de la osteoporosis, muriendo un 5-
25 20% de pacientes en un período de un año, y quedando más

del 50% de los supervivientes físicamente impedidos.

Los ancianos son los sujetos con un mayor riesgo de osteoporosis y, por tanto, puede predecirse que el problema aumente significativamente con el envejecimiento de la población. La incidencia de fractura en todo el mundo se prevé que aumente tres veces durante los próximos 60 años, y un estudio ha estimado que en el año 2050 serán 4,5 millones las fracturas de cadera en todo el mundo.

Las mujeres tienen un mayor riesgo de osteoporosis que los varones. Las mujeres experimentan una brusca aceleración de la pérdida ósea durante los cinco años posteriores a la menopausia. Otros factores que incrementan el riesgo incluyen fumar, abuso de alcohol, un modo de vida sedentario y una ingesta baja de calcio.

Actualmente existen dos tipos principales de terapias farmacéuticas para el tratamiento de la osteoporosis. El primero es el uso de compuestos antiresorción para reducir la resorción del tejido óseo.

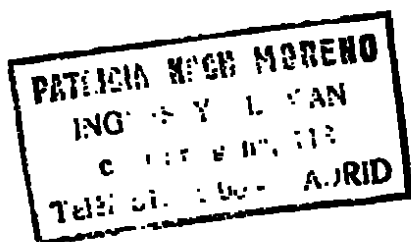
Los estrógenos son un ejemplo de un agente antiresorción. Es conocido que los estrógenos reducen las fracturas. Además, Black et al., en el documento EP 0605193A1 describen que los estrógenos, particularmente cuando se toman oralmente, disminuyen los niveles plasmáticos de LDL y elevan los de lipoproteínas de alta densidad (HDL) beneficiosas. Sin embargo, los estrógenos

son incapaces de restablecer el hueso hasta los niveles de
adultos jóvenes en el esqueleto ya osteoporótico. Además,
la terapia de estrógenos a largo plazo se ha relacionado
con una serie de trastornos que incluyen un incremento en
5 el riesgo de cáncer de útero, cáncer endometrial y
posiblemente cáncer de mama, provocando que muchas mujeres
eviten este tratamiento. Los efectos secundarios
significativos indeseables asociados a la terapia de
estrógenos apoyan la necesidad de desarrollar terapias
10 alternativas para la osteoporosis que tengan el efecto
deseable sobre las LDL en suero pero que no provoquen
efectos indeseables.

Un segundo tipo de terapia farmacéutica para el
tratamiento de la osteoporosis es el uso de agentes
15 anabólicos para promover la formación de hueso e
incrementar la masa ósea. Se espera que esta clase de
agentes restablezca el hueso en el esqueleto ya
osteoporótico.

En los documentos de Gran Bretaña 1478281, 1479156 y
20 en las patentes de los Estados Unidos n^o 4.175.203,
4.055.596, 4,175.203, 3.987.091 y 3.991.106 se describen
ciertos agonistas de prostaglandinas por ser útiles como,
por ejemplo, vasodilatadores renales.

La patente de los Estados Unidos n^o 4.033.996 describe
25 ciertas 8-aza-9-oxo(y dioxo)-tia-11,12-secoprostaglandinas



que son útiles como vasodilatadores renales, para la prevención de la formación de trombos, para inducir la liberación de hormona del crecimiento y como reguladores de la respuesta inmune.

- 5 La patente francesa n° 897.566 describe ciertos derivados de aminoácidos para el tratamiento de enfermedades neurológicas, mentales o cardiovasculares.

J. Org. Chem. 26; 1961; 1437 describe el ácido N-acetil-N-bencil-p-aminofenilmercaptoacético.

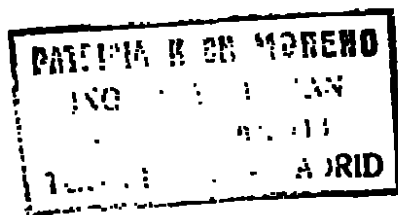
- 10 La patente de los Estados Unidos n° 4.761.430 describe ciertos compuestos arilbencenosulfonamida como agentes para reducir los lípidos.

La patente de los Estados Unidos n° 4.443.477 describe ciertos ácidos sulfonamidofenilcarboxílicos como agentes
15 para reducir los lípidos.

La patente de los Estados Unidos n° 3.528.961 describe ciertos derivados de ε-caprolactama como colorantes.

La patente de los Estados Unidos n° 3.780.095 describe ciertos ácidos anilino-carboxílicos acilados como
20 coleréticos.

La patente de los Estados Unidos n° 4.243.678 describe ciertos ácidos acilhidrocarbáminoalcanoicos por tener utilidad en el tratamiento de úlceras gástricas, como inhibidores de la excreción de las glándulas sebáceas y
25 para combatir la inflamación cutánea.

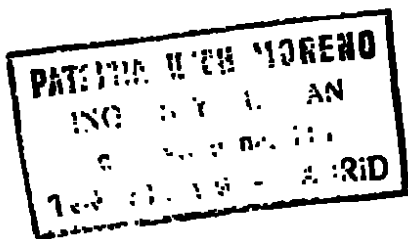


27

La patente de los Estados Unidos n° 4.386.031 describe ciertos ácidos N-benzoil- ω -anilinoalcanocarboxílicos como agentes antialérgicos, inhibidores de la agregación trombótica, agentes antiinflamatorios y agentes para 5 reducir los lípidos.

Además de osteoporosis, aproximadamente 20-25 millones de mujeres y un número en aumento de hombres sufren fracturas vertebrales detectables como consecuencia de una 10 masa ósea reducida, con unas 250.000 fracturas de cadera adicionales anuales descritas solamente en los Estados Unidos. El caso anterior está asociado a una tasa de mortalidad del 12% en los dos primeros años y a una tasa del 30% de pacientes que requieren cuidados asistenciales 15 a domicilio después de la fractura. Aunque esto es ya significativo, es de esperar que aumenten las consecuencias económicas y médicas de la convalecencia debida a una curación lenta o imperfecta de estas fracturas de hueso, a causa del envejecimiento de la población general.

20 Los estrógenos han demostrado (Bolander et al., 38th Annual Meeting Orthopedic Research Society, 1992) que mejoran la calidad de la curación de fracturas apendiculares. Por tanto, la terapia de sustitución de estrógenos podría ser procedimiento eficaz para el 25 tratamiento de reparación de fracturas. Sin embargo, el

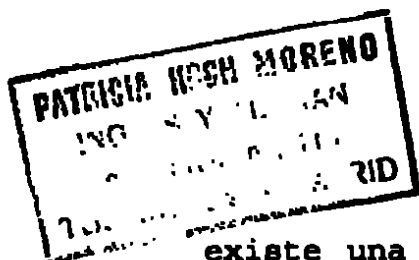


24

cumplimiento del paciente con la terapia de estrógenos es relativamente malo debido a sus efectos secundarios, que incluyen la reaparición de la menstruación, mastodinia y un mayor riesgo de cáncer de útero, un mayor riesgo percibido de cáncer de mama, y el uso concomitante de progestinas. Además, los hombres son propensos a objetar el uso del tratamiento con estrógenos. Existe la necesidad de una terapia que sea beneficiosa para pacientes que han sufrido fracturas óseas debilitantes y que aumente el cumplimiento del paciente.

Se ha demostrado que la prostaglandina E2 (PGE2) puede restaurar el hueso en un modelo de rata ovariectomizada (OVX), un modelo de osteoporosis postmenopáusica. Ke, H.Z., et al., Bone, 23:249-255, 1998. Sin embargo, existen graves efectos secundarios asociados con la PGE2. Jee., W.S.S. and Ma, Y.F. Bone 21:297-304, 1997.

Aunque existen una serie de terapias para la osteoporosis, existe una continua necesidad y una búsqueda continua en este campo de la técnica de terapias alternativas para la osteoporosis. Por otro lado, existe una necesidad de terapias para la curación de las fracturas óseas. Además, existe una necesidad de terapias que puedan promover un nuevo crecimiento en áreas esqueléticas en las que existan defectos tales como defectos provocados o producidos por, por ejemplo, tumores en el hueso. Además,



existe una necesidad de terapias que puedan promover un nuevo crecimiento en las áreas esqueléticas en las que están indicados injertos óseos.

SUMARIO DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere a procedimientos para tratar un trastorno que presenta una masa ósea reducida en un mamífero, que comprende administrar a dicho mamífero un agonista selectivo del receptor EP4, uno de sus profármacos o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho agonista
10 selectivo del receptor EP4 o de dicho profármaco.

La invención se refiere en particular a dichos procedimientos en los que dicho trastorno es osteoporosis, fragilidad, una fractura osteoporótica, un defecto óseo, pérdida ósea idiopática de la niñez, pérdida ósea alveolar,
15 pérdida ósea mandibular, fractura ósea, osteotomía, pérdida ósea asociada a periodontitis o crecimiento interno protésico. En los procedimientos preferidos de esta invención, el agonista selectivo del receptor EP4 se administra por vía sistémica, por ejemplo, por vía oral,
20 subcutánea, intramuscular o por aerosol. En otros procedimientos preferidos de esta invención, el agonista de EP4 se administra localmente.

Los procedimientos de esta invención son especialmente útiles cuando dicho trastorno es fragilidad.

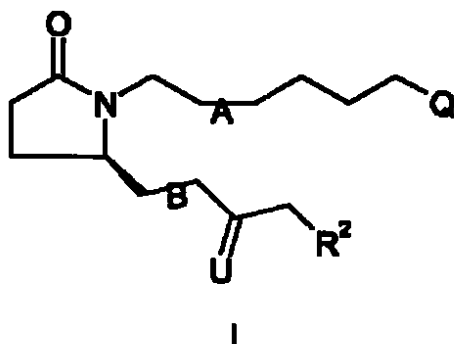
25 Los procedimientos de esta invención son especialmente

útiles cuando dicho trastorno es osteoporosis.

Los procedimientos de esta invención son especialmente útiles cuando dicho trastorno es fractura ósea o fractura osteoporótica.

- 5 Los agonistas selectivos de EP4 preferidos para usar en los procedimientos de esta invención incluyen los compuestos de Fórmula I:

10



los profármacos de los mismos y las sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos o de dichos profármacos, en la que:

Q es COOR³, CONHR⁴ o tetrazol-5-ilo;

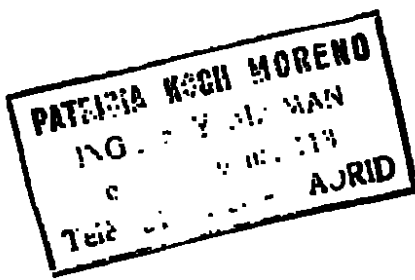
A es un enlace sencillo o cis-doble;

B es un enlace sencillo o trans-doble;

20 U es



R² es α -tienilo, fenilo, fenoxi, fenilo monosustituido y fenoxi monosustituido, siendo dichos sustituyentes cloro,



26

En los procedimientos de esta invención, los trastornos que presentan una masa ósea reducida incluyen trastornos tales como, por ejemplo, osteoporosis, pérdida ósea idiopática de la infancia, pérdida ósea alveolar, 5 pérdida ósea mandibular, fractura ósea, osteotomía, pérdida ósea asociada a periodontitis y crecimiento interno protésico.

También se incluyen procedimientos para tratar la "osteoporosis secundaria", dentro de los procedimientos de 10 esta invención. "Osteoporosis secundaria" incluye osteoporosis inducida por glucocorticoides, osteoporosis inducida por hipertiroidismo, osteoporosis inducida por inmovilización, osteoporosis inducida por heparina u osteoporosis inducida por inmunosupresores en un 15 vertebrado, por ejemplo un mamífero (incluyendo a un ser humano). Estos procedimientos se llevan a cabo administrando a dicho vertebrado, por ejemplo un mamífero, una cantidad para tratar la "osteoporosis secundaria" de un agonista de prostaglandina selectivo para el receptor EP4, 20 uno de sus profármacos o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho agonista de prostaglandina selectivo para el receptor EP4 o de dicho profármaco.

Otro aspecto adicional de la presente invención se refiere a procedimientos para reforzar un injerto óseo, 25 inducir sinóstosis vertebral, potenciar la extensión de los

reducida" se refiere a un trastorno en el que el nivel de masa ósea es inferior al normal específico para la edad, como se define en las normas de la Organización Mundial de la Salud "Assessment of Fracture Risk and its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis (1994). Report of a World Health Organization Study Group. World Health Organization Technical Series 843". En "trastorno(s) que presenta(n) una masa ósea reducida" se encuentra incluida la osteoporosis primaria y secundaria, tal y como se han descrito antes. Además, se incluye enfermedad periodontal, pérdida ósea alveolar, pérdida ósea por osteotomía y pérdida ósea idiopática de la infancia. La frase "trastorno(s) que presenta(n) una masa ósea reducida" también incluye las complicaciones a largo plazo de la osteoporosis como curvatura de la columna vertebral, pérdida de peso y cirugía protésica.

La frase "trastorno(s) que presenta(n) una masa ósea reducida" se refiere también a un vertebrado, por ejemplo un mamífero, conocido por tener una posibilidad significativamente mayor que la media de desarrollar las enfermedades que se describen anteriormente, incluyendo osteoporosis (por ejemplo, mujeres postmenopáusicas, hombres mayores de 50 años). Otros usos que aumenten o potencien la masa ósea incluyen la restauración ósea, incrementar la velocidad de curación de fracturas óseas,

reemplazar la cirugía de injertos óseos totalmente, potenciar el índice de éxitos de los injertos óseos, la curación ósea después de una reconstrucción facial o una reconstrucción maxilar o una reconstrucción mandibular, el
5 crecimiento interno protésico, la sinóstosis vertebral o la extensión de huesos largos.

Los procedimientos de esta invención también pueden usarse combinados con dispositivos ortopédicos como estructuras de fusión espinal, equipo de fusión espinal,
10 dispositivos de fijación ósea internos y externos, tornillos y clavos.

Los expertos en la técnica reconocerán que el término masa ósea se refiere realmente a la masa ósea por unidad de superficie, que en algunas ocasiones (aunque no de forma
15 estrictamente correcta) se denomina densidad mineral del hueso.

El término "tratar", "trato" o "tratamiento", tal como se usa en la presente, incluye el tratamiento preventivo (por ejemplo, profiláctico) y paliativo y curativo.

20 El término "farmacéuticamente aceptable" significa que el portador, vehículo, diluyente, excipientes y/o sal deben ser compatibles con el resto de ingredientes de la formulación, y no perjudicar al receptor de las mismas.

La expresión "profármacos" se refiere a compuestos que
25 son precursores farmacológicos que, después de la

los trastornos óseos relacionados.

A partir de la memoria descriptiva y las reivindicaciones que describen la invención serán evidentes otras características y ventajas.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

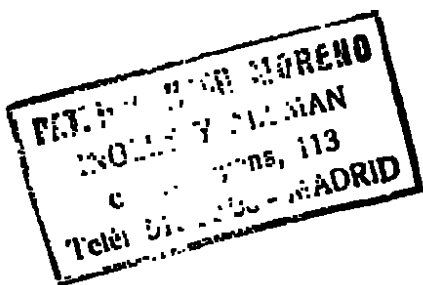
Como agonista selectivo del receptor EP4 de esta invención se puede usar cualquier agonista selectivo del receptor EP4. Los agonistas selectivos de EP4 son compuestos que tienen una IC50 en el receptor EP1, EP2 y
10 EP3 que es al menos 10 veces mayor que la IC50 en el subtipo de receptor EP4. Por ejemplo, el ácido 7-(2-(3-hidroxi-4-fenil-butil)-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico es un agonista de PGE2 selectivo para el receptor EP4 con una IC50 de unión al receptor EP4 de 16 nM. En todos los demás
15 subtipos de receptor EP, incluyendo los subtipos de receptor EP1, EP2 y EP3, la IC50 para el ácido 7-(2-(3-hidroxi-4-fenil-butil)-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico es mayor de 3200 nM.

Los compuestos de Fórmula I se pueden preparar como se
20 describe en el documento de los Estados Unidos 4.177.346, de cesión común y que se incorpora en la presente como referencia.

Todos los agonistas selectivos del receptor EP4 usados en los procedimientos de esta invención están adaptados al
25 uso terapéutico como agentes que estimulan la formación

ósea y aumentan la masa ósea en vertebrados, por ejemplo mamíferos y en particular en seres humanos. Puesto que la formación ósea está muy relacionada con el desarrollo de osteoporosis y trastornos relacionados con los huesos, los
5 agonistas usados en los procedimientos de esta invención, en virtud de su acción ósea, previenen, detienen y/o invierten la osteoporosis.

La utilidad de los agonistas selectivos de EP4 usados en los procedimientos de la presente invención como agentes
10 medicinales en el tratamiento de trastornos que presentan una masa ósea reducida (por ejemplo, osteoporosis) en vertebrados, por ejemplo mamíferos (por ejemplo, seres humanos, particularmente en la mujer) se demuestra por la actividad de estos agonistas en ensayos convencionales,
15 incluyendo un ensayo de unión al receptor, un ensayo de AMP cíclico, un ensayo *in vivo* y el ensayo de curación de la fractura, todos los cuales se describen más adelante. Tales ensayos proporcionan también un medio mediante el cual comparar las actividades de los agonistas selectivos de EP4
20 entre sí y con las actividades de otros compuestos y composiciones conocidos. Los resultados de estas comparaciones son útiles para determinar los niveles de dosificación en vertebrados, por ejemplo mamíferos, incluyendo seres humanos, para el tratamiento de tales
25 enfermedades.



32 Z

Ensayo in vivo

La actividad de los agentes anabólicos óseos en la estimulación de la formación ósea y el aumento de la masa ósea se puede comprobar en ratas intactas macho o hembra, 5 o ratas macho (orquidectomizadas) o hembra (ovariectomizadas) deficientes en hormonas sexuales.

Se pueden utilizar en el estudio ratas macho o hembra de diferentes edades (tal como de tres meses de edad). Las ratas pueden estar intactas o bien castradas 10 (ovariectomizadas u orquidectomizadas), y se inyectan subcutáneamente o se dosifican por sonda nasogástrica con agonistas de prostaglandina en diferentes dosis (tal como 1, 3 ó 10 mg/kg/día) durante 30 días. En las ratas castradas, el tratamiento se comienza en el día posterior 15 a la cirugía (con el propósito de prevenir la pérdida ósea) o en el momento en el que ya se ha producido la pérdida ósea (con el propósito de recuperar la masa ósea). Durante el estudio, se permite el libre acceso de todas las ratas a agua y una dieta comercial en gránulos (Teklad Rodent 20 Diet N° 8064, Harlan Teklad, Madison, WI) que contiene 1,46% de calcio, 0,99% de fósforo y 4,96 UI/g de Vitamina D₃. Todas las ratas reciben inyecciones subcutáneas de 10 mg/kg de calceína en los días 12 y 2 antes del sacrificio. Se sacrifican las ratas. Se determinan los siguientes 25 parámetros:

Medidas minerales en el hueso femoral:

Se extirpa el fémur derecho de cada rata en autopsia y se explora utilizando absorciometría de rayos X de doble haz (DXA, QDR 1000/W, Hologic Inc., Waltham, MA) equipado
5 con el programa informático "Regional High Resolution Scan" (Hologic Inc., Waltham, MA). El tamaño del campo de exploración es de 5,08 x 1,902 cm, la resolución es de 0,0254 x 0,0127 cm y la velocidad de exploración es de 7,25 mm/seg. Se analizan las imágenes de la exploración femoral
10 y se determina el área ósea, contenido mineral óseo (BMC) y densidad mineral ósea (BMD) del fémur completo (WF), metáfisis femoral distal (DFM), diáfisis femoral (FS) y fémur proximal (PF).

Análisis histomorfométrico del hueso tibial:

15 Se extirpa la tibia derecha en la autopsia, se disecciona todo el músculo y se corta en tres partes. Se fijan la tibia proximal y la diáfisis tibial en etanol al 70%, se deshidrata en concentraciones graduadas de etanol, se desengrasa en acetona y después se introduce en
20 metacrilato de metilo (Eastman Organic Chemicals, Rochester, NY).

Se cortan las secciones frontales de la metáfisis tibial proximal con un espesor de 4 y 10 μ m, utilizando un microtomo Reichert-Jung Polycut S. Las secciones de 4 μ m se
25 tiñen con tinte modificado Trichrome de Masson, mientras

que las secciones de 10 μ m permanecen sin teñir. Se utilizan una sección de 4 μ m y una de 10 μ m de cada rata para histomorfometría de hueso canceloso.

Se cortan las secciones transversales de la diáfisis tibial de 10 μ m de espesor utilizando un microtomo Reichert-Jung Polycut S. Estas secciones se utilizan para análisis histomorfométrico del hueso cortical.

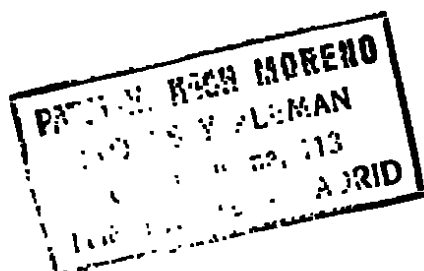
Histomorfometría de hueso canceloso: Se utiliza un sistema de histomorfometría Bioquant OS/2 (R&M Biometrics, Inc., Nashville, TN) para las medidas histomorfométricas estáticas y dinámicas de la parte esponjosa secundaria de la metáfisis tibial proximal entre 1,2 y 3,6 mm distal a la unión de crecimiento placa-epifiseal. Los primeros 1,2 mm de la región metafiseal tibial necesitan ser omitidos para limitar las medidas a la parte esponjosa secundaria. Se utilizan las secciones de 4 μ m para determinar los índices relacionados con el volumen óseo, estructura ósea y resorción ósea, mientras que las secciones de 10 mm se utilizan para determinar los índices relacionados con la formación y regeneración del hueso.

I) Medidas y cálculos relacionados con el volumen y estructura óseo trabecular: (1) Área total metafiseal (TV, mm²): Área metafiseal entre 1,2 y 3,6 mm distal a la unión placa-epifiseal de crecimiento. (2) Área ósea trabecular (BV, mm²): Área total de trabécula en TV. (3) Perímetro

óseo trabecular (BS, mm): La longitud del perímetro total de la trabécula. (4) Volumen óseo trabecular (BV/TV, %): $BV/TV \times 100$. (5) Número óseo trabecular (TBN, N°/mm): $1,199/2 \times BS/TV$. (6) Espesor óseo trabecular (TBT, μm): $5 (2.000/1,199) \times (BV/BS)$. (7) Separación ósea trabecular (TBS, μm): $(2.000 \times 1,199) \times (TV-BV)$.

II) Medidas y cálculos relacionados con la resorción ósea: (1) Número de osteoclastos (OCN, N°): N° total de osteoclastos en el área metafiseal total. (2) Perímetro de osteoclasto (OCP mm): longitud del perímetro trabecular cubierto por osteoclastos. (3) N°/mm de osteoclastos (OCN/mm, N°/mm): OCN/BS . (4) Perímetro porcentual cubierto por osteoclastos (%OCP, %): $OCP/BS \times 100$.

III) Medidas y cálculos relacionados con la regeneración y formación ósea: (1) Perímetro con una marca de calceína (SLS, mm): longitud total del perímetro trabecular con una marca de calceína. (2) Perímetro con dos marcas de calceína (DLS, mm): Longitud total del perímetro trabecular con dos marcas de calceína. (3) Anchura entre marcas (ILW, μm): Distancia promedio entre dos marcas de calceína. (4) Perímetro porcentual de mineralización (PMS, %): $(SLS/2 + DLS)/BS\% \times 100$. (5) Velocidad de depósito mineral (MAR, $\mu m/día$): $ILW/\text{intervalo entre marcas}$. (6) Velocidad de formación de hueso/superficie de ref. (BFR/BS, $\mu m^2/d/\mu m$): $(SLS/2 + DLS) \times MAR / BS$. (7) Velocidad de



36

regeneración ósea (BTR, μ/y): $(SLS/2 + DLS) \times MAR / BV \times 100$.

Histomorfometría cortical ósea: Se utiliza un sistema histomorfométrico Bioquant OS/2 (R&M Biometrics, Inc., 5 Nashville, TN) para las medidas histomorfométricas estáticas y dinámicas de la diáfisis tibial en las medidas del hueso cortical en la diáfisis tibial. Se mide el área tisular total, área de la cavidad de la médula, perímetro periosteal, perímetro endocortical, perímetro con una 10 marca, perímetro con dos marcas y anchura entre marcas en ambas superficies periosteales y endocorticales, y se calculan el área ósea cortical (área tisular total - área de cavidad de la médula), área porcentual cortical ósea (área cortical/área del tejido total $\times 100$), área 15 porcentual de médula (área de cavidad de la médula/área del tejido total $\times 100$), perímetro porcentual periosteal y endocortical marcado $[(\text{perímetro con una marca}/2 + \text{perímetro con 2 marcas})/\text{perímetro total} \times 100]$ velocidad de depósito mineral (anchura entre marcas/intervalos) y 20 velocidad de formación de hueso $[\text{velocidad de depósito mineral} \times [(\text{perímetro con una marca}/2 + \text{perímetro con dos marcas})/\text{perímetro total}]]$.

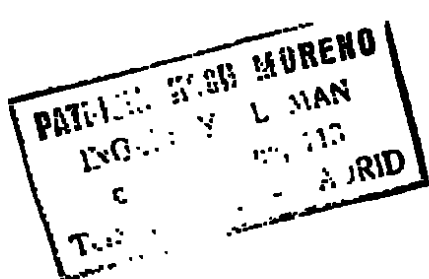
Estadísticas

Se pueden calcular los datos estadísticos utilizando 25 paquetes Stat View 4.0 (Abacus Concepts, Inc., Berkeley,

CA). Se utiliza la prueba de análisis de varianza (ANOVA) seguida de PLSD de Fisher (Stat View, Abacus Concepts Inc., 1918 Bonita Ave, Berkeley, CA 94704-1014) para comparar las diferencias entre grupos.

5 Determinación de la elevación del cAMP en líneas de
células 293-S que sobreexpresan de forma estable los
receptores humanos recombinantes EP₄

Los cDNA, que representan los marcos de lectura
abierta completa de los receptores humanos EP₄, se generan
10 por reacción en cadena con polimerasa de la transcriptasa
inversa utilizando cebadores oligonucleótidos basados en
secuencias publicadas (1) y RNA de células de pulmón humano
primarias (EP₄) como moldes. El cDNA se clona en el sitio
de clonación múltiple de pCDNA3 (Invitrogen Corporation,
15 3985B Sorrento Valley Blvd., San Diego, CA 92121) y se usa
para transfectar células de riñón de embrión humano 293-S
por la vía de coprecipitación con fosfato de calcio. Las
colonias resistentes a G418 se expanden y se analizan las
uniones específicas [³H]PGE₂. Las células transfectadas que
20 muestran niveles altos de uniones específicas a [³H]PGE₂ se
caracterizan adicionalmente mediante análisis de Scatchard
para determinar B_{max} y K_ds para PGE₂. Las líneas
seleccionadas para el rastreo de compuestos tienen
aproximadamente 256.400 receptores por célula y un K_d = 2,9
25 nM para PGE₂ (EP₄). La expresión constitutiva del receptor



21

en las células madre 293-S es insignificante. Las células se mantienen en RPMI suplementado con suero bovino fetal (10% final) y G418 (700 ug/ml final).

Las respuestas de cAMP en las líneas 293-S/EP₄ se determinan por separación de células de los matraces de cultivo en 1 ml de PBS deficiente en Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ por agitación vigorosa, añadiendo RPMI exento de suero hasta una concentración final de 1×10^6 células/ml y añadiendo 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) hasta una concentración final de 1 mM. Se toman inmediatamente alícuotas de 1 ml de la suspensión de células en tubos de microcentrífuga con tapón de rosca de 2 ml y se incuban durante 10 minutos, destapados, a 37°C, con una humedad relativa del 95% y 5% de CO₂. El compuesto a analizar se añade a las células en diluciones 1:100 de forma que las concentraciones finales de DMSO o etanol sean del 1%. Inmediatamente después de añadir el compuesto, se tapan los tubos, se mezclan invirtiéndolos 2 veces y se incuban a 37° durante 12 minutos. Las muestras son entonces lisadas por incubación a 100°C durante 10 minutos e inmediatamente enfriadas sobre hielo durante 5 minutos. Los restos celulares se sedimentan por centrifugación a 1.000 g durante 5 minutos, y los lisados aclarados se transfieren a tubos limpios. Las concentraciones de cAMP se determinan utilizando un estuche de radioinmunoensayo de cAMP disponible comercialmente

PATRICIA ROCH MORENO
ING. EN Y ALEMAN
CARR. 113
A.D.R.D

39

(NEK-033, DuPont/NEN Research Products, 549 Albany St., Boston, MA 02118) después de diluir los lisados aclarados 1:10 en solución tampón de análisis cAMP RIA (incluida en el estuche). Normalmente, se tratan las células con 6 a 8 5 concentraciones del compuesto a analizar en incrementos logarítmicos. Los cálculos de EC50 se realizan mediante una calculadora utilizando análisis de regresión lineal en la porción lineal de las curvas de respuesta a la dosis.

Referencias

10 1. Regan, J.W. Bailey, T.J. Pepperl, D.J. Pierce, K.L. Bogardus, A.M. Donello, J.E. Fairbairn, C.E. Kedzie, K.M. Woodward, D.F. y Gil, D.W. 1994 Cloning of a Novel Human Prostaglandin Receptor with Characteristics of the Pharmacologically Defined EP₂ Subtype. Mol. Pharmacology 15 46:213-220.

Ensayo de la unión a los receptores E₂ de las prostaglandinas

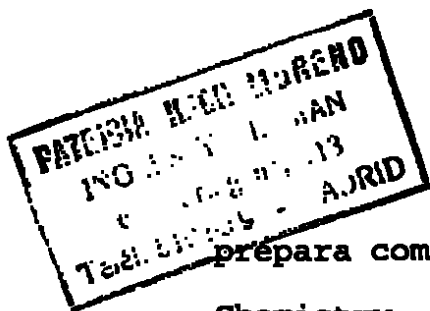
Preparación de la membrana: Todas las preparaciones se realizan a 4°C. Las células transfectadas que expresan 20 receptores tipo 1 de prostaglandina E₂ (EP₁), tipo 2 (EP₂), tipo 3 (EP₃) o tipo 4 (EP₄) se recogen y suspenden hasta 2 millones de células por ml en solución tampón A [Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM, péptido Pefabloc 1 mM, (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN), péptido 25 Phosporamidon 10 uM (Sigma, St. Luis, MO), péptido

Pepstatina A 1 μ M (Sigma, St. Luis, MO), péptido Elastatinal 10 μ M (Sigma, St. Luis, MO), péptido Antipaina 100 μ M (Sigma, St. Luis, MO)]. Las células se lisan por sonicación con un sonicador Branson (modelo N° 250, Branson 5 Ultrasonics Corporation, Danbury, CT) en dos impactos de 15 segundos. Se eliminan las células no lisadas y los restos por centrifugación a 100 g durante 10 minutos. Las membranas se recogen entonces por centrifugación a 45.000 g durante 30 minutos. Las membranas sedimentadas se resuspenden hasta una concentración de 3 a 10 mg de proteína por ml, determinándose la concentración de proteína por el procedimiento de Bradford [Bradford, M., Anal. Biochem., 72, 248 (1976)]. Las membranas resuspendidas se conservan congeladas a -80°C hasta su uso.

15 Ensayo de unión: Las membranas congeladas preparadas de la forma descrita anteriormente son descongeladas y diluidas hasta 1 mg de proteína por ml en el Tampón A anterior. Se combina un volumen de preparación de membrana con 0,05 volúmenes del compuesto de prueba o solución 20 tampón y un volumen de ^{3} H-prostaglandina E₂ 3 nM (N° TRK 431, Amersham, Arlington Heights, IL) en solución tampón A. La mezcla (volumen total 205 μ l) se incuba durante una hora a 25°C. Las membranas se recuperan entonces por filtración en filtros de fibra de vidrio del tipo GF/C (N° 1205-401, 25 Wallac, Gaithersburg, MD) utilizando un recolector Tomtec

(modelo Mach II/96, Tomtec, Orange, CT). Las membranas con unión ^3H -prostaglandina E_2 quedan retenidas en el filtro, mientras que la solución tampón y la ^3H -prostaglandina E_2 no unida pasa por el filtro y se desecha. Cada una de las 5 muestras se lava entonces tres veces con 3 ml de [Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), MgCl_2 10 mM, EDTA 1 mM]. Los filtros se secan entonces mediante calentamiento en un horno de microondas. Para determinar la cantidad de ^3H -prostaglandina unida a las membranas, se colocan los 10 filtros secos en bolsas de plástico con líquido de centelleo y se hace el recuento en un lector LKB 1205 Betaplate (Wallac, Gaithersburg, MD). Las IC_{50} se determinan a partir de la concentración del compuesto de ensayo necesaria para desplazar el 50% del enlace 15 específico ^3H -prostaglandina E_1 .

La secuencia de codificación de longitud completa para el receptor EP_1 se prepara como se describe en Funk et al., Journal of Biological Chemistry, 1993, 268, 26767-26772. La secuencia de codificación de longitud completa para el 20 receptor EP_2 se prepara como se describe en Regan et al., Molecular Pharmacology, 1994, 46, 213-220. La secuencia de codificación de longitud completa para el receptor EP_3 se prepara como se describe en Regan et al., British Journal of Pharmacology, 1994, 112, 377-385. La secuencia de 25 codificación de longitud completa para el receptor EP_4 se



47

prepara como se describe en Bastien, Journal of Biological Chemistry, 1994, 269, 11873-11877. Estos receptores de longitud completa se usan para preparar las células 293S que expresan los receptores EP₁, EP₂, EP₃ y EP₄.

5 Las células 293S que expresan cualquiera de los receptores E₁ de prostaglandina EP₁, EP₂, EP₃ y EP₄ humanos se generan conforme a procedimientos conocidos por los expertos en la materia. De forma típica, se preparan los cebadores por PCR (reacción en cadena con polimerasa), que
10 corresponden a los extremos 5' y 3' del receptor de longitud completa publicados, conforme a procedimientos bien conocidos descritos antes y se usan en una reacción en cadena con polimerasa y transcriptasa inversa (RT-PCR) usando un RNA total de riñón humano (para EP₁), de pulmón
15 humano (para EP₂), de pulmón humano (para EP₃) o de linfocitos humanos (para EP₄) como fuente. Los productos de PCR se clonan por el procedimiento TA con un saliente en pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se confirma la identidad del receptor clonado por secuenciación de DNA.

20 Las células 293S (Mayo, Dept. of Biochemistry, Northwestern Univ.) se transfectan con el receptor clonado en pcDNA3 por electroporación. Se establecen líneas de células estables que expresan el receptor después de seleccionar las células transfectadas con G418.

25 Las línea de células clonadas que expresan el número

máximo de receptores se eligen después de un ensayo de unión a $^3\text{H-PGE}_2$ de células completas usando PGE_2 no marcada como competidor.

ENSAYOS DE CURACIÓN DE FRACTURAS

5 ENSAYO DE LOS EFECTOS SOBRE LA CURACIÓN DE FRACTURAS

DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA

Técnica de fractura: Se anestesian ratas Sprague-Dawley de 3 meses de edad con Ketamina. Se hace una incisión de 1 cm en la cara anteromedial de la parte proximal de la tibia o fémur derechos. A continuación se describe la técnica quirúrgica tibial. La incisión se realiza hasta alcanzar el hueso, y se perfora un orificio de 1 mm, 4 mm proximal a la cara distal de la tuberosidad tibial, 2 mm medial al surco anterior. Se introducen agujas intramedulares mediante un tubo de acero inoxidable de 0,8 mm (carga máxima 36,3 N, rigidez máxima 61,8 N/mm, comprobado bajo las mismas condiciones que los huesos). No se ensancha el canal medular. Se produce una fractura normalizada cerrada 2 mm por encima de la unión tibiofibular mediante curvatura en tres puntos utilizando fórceps ajustable, especialmente diseñado con mordazas romas. Para minimizar el daño al tejido blando, se debe tener precaución para no desplazar la fractura. La piel se cierra con suturas monofilamento de nylon. La operación se realiza bajo condiciones estériles. Se toman radiografías

de todas las fracturas inmediatamente después de la inserción de las agujas, y las ratas con fracturas fuera del área diafisal especificada o con agujas desplazadas, se excluyen. El resto de los animales se dividen
5 aleatoriamente en los siguientes grupos con 10 a 12 animales por subgrupo para comprobar la curación de las fracturas. El primer grupo recibe administraciones por sonda nasogástrica diarias de vehículo (agua: 100% Etanol = 95:5) en un 1 ml/rata, mientras que los otros reciben
10 administración diaria por sonda nasogástrica de 0,01 a 100 mg/kg/día del compuesto a analizar (1 ml/rata) durante 10, 20, 40 y 80 días.

En los días 10, 20, 40 y 80, se anestesiaron 10 a 12 ratas de cada grupo con Ketamina y se sacrificaron por
15 extracción sanguínea. Se extirpan ambos huesos tibiofibulares por disección y se elimina todo el tejido blando. Se conservaron los huesos de 5 a 6 ratas de cada grupo en etanol al 70% para análisis histológicos y los huesos de otras 5 a 6 ratas de cada grupo se conservaron en
20 solución Ringer tamponada (+4°C, pH 7,4) para las radiografías y pruebas biomecánicas que se realizaron.

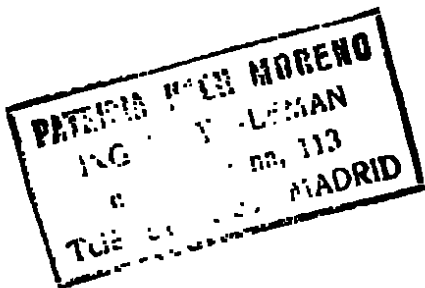
Análisis histológico: Los procedimientos para análisis histológico del hueso fracturado se han publicado previamente por Mosekilde y Bak (The Effects of Growth
25 Hormone on Fracture Healing in Rats: A histological



2/5

Description. Bone, 14:19-27, 1993). Explicado brevemente, el lugar de la fractura se aserra 8 mm a cada lado de la línea de la fractura, se introduce descalcificado en metacrilato de metilo, y se cortan las secciones frontales con un microtomo Reichert-Jung Polycut con un espesor de 8 μ m. Las secciones medianas frontales teñidas con Masson-Trichrome (incluyendo ambas tibiae y fémures) se utilizan para la visualización de la respuesta celular y tisular a la curación de la fractura con y sin tratamiento. Las secciones teñidas de rojo Sirius se utilizan para demostrar las características de la estructura callosa y para diferenciar entre el hueso entrelazado y el lamelar en el lugar de la fractura. Se realizan las siguientes medidas: (1) espacio de fractura - medido como la distancia más corta entre los extremos corticales del hueso en la fractura, (2) longitud y diámetro del callo, (3) área del volumen total óseo del callo, (4) tejido de hueso por área de tejido dentro del área callosa, (5) tejido fibroso en el callo, (6) área de cartílago en el callo.

Análisis biomecánico: Los procedimientos de análisis biomecánico se han publicado previamente por Bak y Andreassen (The Effects of Aging on Fracture Healing in Rats. Calcif Tissue Int 45:292-97, 1989). Explicado en forma resumida, se toman radiografías de todas las fracturas antes del ensayo biomecánico. Se analizan las



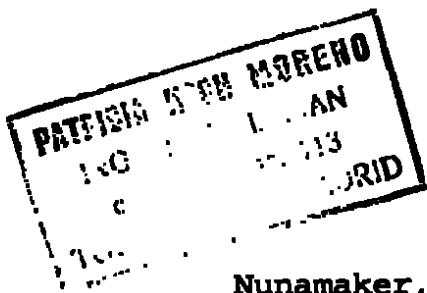
propiedades mecánicas de las fracturas soldadas mediante un procedimiento destructivo de curvatura en tres o cuatro puntos. Se determina la carga máxima, rigidez, energía en carga máxima, desviación en la carga máxima y la tensión
5 máxima.

ENSAYO DE LOS EFECTOS SOBRE LA CURACIÓN DE FRACTURAS

DESPUÉS DE ADMINISTRACIÓN LOCAL

Técnica de fractura: Se utilizan en este estudio perros Beagle macho o hembra de aproximadamente 2 años de
10 edad bajo anestesia. Se producen fracturas radiales transversales por carga lenta continua doblándolo en tres puntos, tal como describen Lenehan et al (Lenehan, T.M.; Balligand, M.; Nunamaker, D.M.; Wood, F.E.: Effects of EHDP on Fracture Healing in Dogs. J. Orthop Res 3:499-507;
15 1985). Se arrastra el hilo a través del lugar de la fractura para asegurar la interrupción anatómica completa del hueso. Después, se consigue la liberación local de agonistas de prostaglandina en el lugar de la fractura mediante liberación lenta del compuesto suministrado por
20 gránulos de liberación lenta o por la administración de los compuestos en una formulación adecuada como una solución o suspensión de gel en pasta durante 10, 15 o 20 semanas.

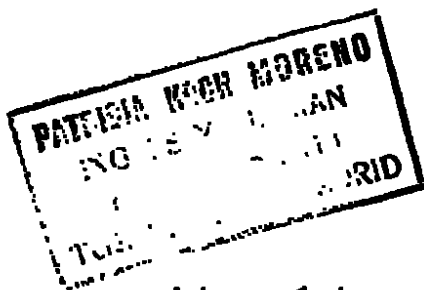
Análisis histológico: Los procedimientos de análisis histológico de huesos fracturados se han publicado
25 anteriormente por Peter et al (Peter, C.P.; Cook, W.O.;



47

Nunamaker, D.M.; Provost, M.T.; Seedor, J.G.; Rodan, G.A. Effects of alendronate on fracture healing and bone remodeling in dogs. J. Orthop. Res. 14:74-70, 1996) y Mosekilde y Bak (The Effects of Growth Hormone on Fracture Healing in Rats: A Histological Description. Bone, 14:19-27, 1993). Explicado brevemente, después del sacrificio, se aserra el lugar de la fractura 3 cm a cada lado de la línea de la fractura, se introduce una vez descalcificado en metacrilato de metilo y se corta con un microtomo Reichert-Jung Polycut en secciones frontales de 8 μ m de espesor. Se utilizan las secciones teñidas con Masson-Trichrome de la parte media frontal (incluyendo la tibia y la fíbula) para la visualización de la respuesta celular y tisular a la curación de la fractura con y sin tratamiento. Se utilizan las secciones teñidas con rojo Sirius para demostrar las características de la estructura del callo y para diferenciar entre el hueso entrelazado y el lamelar en el lugar de la fractura. Se realizan las siguientes medidas: (1) espacio de fractura - medido como la distancia más corta entre los extremos corticales del hueso en la fractura, (2) longitud y diámetro del callo, (3) área del volumen de hueso total del callo, (4) tejido de hueso por área de tejido dentro del área del callo, (5) tejido fibroso en el callo, (6) área de cartílago en el callo.

Análisis biomecánico: Los procedimientos de análisis



48

biomecánico se han publicado previamente por Bak y
Andreassen (The Effects of Aging on Fracture Healing in
Rats. Calcif Tissue Int 45:292-297, 1989) y Peter et al.
(Peter, C.P.; Cook, W.O.; Nunamaker, D.M.; Provost, M.T.;
5 Seedor, J.G.; Rodan, G.A. Effects of Alendronate On
Fracture Healing And Bone Remodeling In Dogs. J. Orthop.
Res. 14:74-70, 1996). Explicado brevemente, se toman
radiografías de todas las fracturas antes de los ensayos
biomecánicos. Se analizan las propiedades mecánicas de las
10 fracturas en curación por un procedimiento destructivo de
curvatura en tres o cuatro puntos. Se determina la carga
total, rigidez, energía en carga máxima, desviación en
carga máxima y tensión máxima.

La administración de agonistas selectivos del receptor
15 EP4 conforme a los procedimientos de esta invención se
puede realizar por cualquier modo que libere el agonista
selectivo del receptor EP4 por vía sistémica y/o local (por
ejemplo, en el lugar de la fractura ósea, osteotomía o
cirugía ortopédica). Estos procedimientos incluyen las vías
20 oral, parenteral, intraduodenal y similares. Por lo
general, los compuestos de esta invención se administran
oralmente, pero se puede utilizar la administración
parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular,
transdérmica, subcutánea, rectal o intramedular), por
25 ejemplo, cuando la administración oral sea inadecuada para

el objeto deseado o cuando el paciente sea incapaz de ingerir el fármaco.

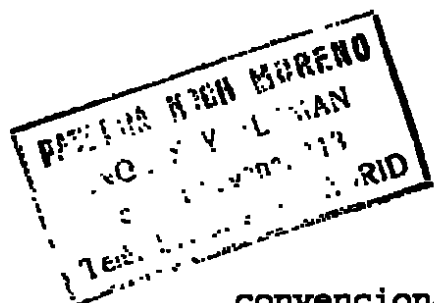
Los procedimientos de esta invención se utilizan para el tratamiento y promoción de la curación de las fracturas
5 óseas y osteotomías por aplicación local (por ejemplo, en los lugares de fracturas óseas u osteotomías) de los agonistas selectivos del receptor EP4. Los agonistas selectivos del receptor EP4 de esta invención se aplican a los lugares de fractura ósea u osteotomía, por ejemplo, por
10 inyección del compuesto en un disolvente adecuado (por ejemplo, un disolvente oleoso tal como aceite de cacahuete) en la placa de crecimiento del cartílago o, en casos de cirugía abierta, por aplicación local de tales compuestos en un vehículo, portador o diluyente adecuado tal como cera
15 para hueso, polvo de hueso desmineralizado, cementos óseos poliméricos, selladores de hueso, etc. Como alternativa, se puede conseguir la aplicación local aplicando una solución o dispersión del compuesto en un portador o diluyente adecuado sobre su superficie, o incorporándolo en un
20 implante sólido o semisólido usado convencionalmente en cirugía ortopédica, tal como malla de dacron, espumas de gel y hueso Kiel o prótesis.

En cualquier caso, la cantidad y frecuencia de los compuestos administrados dependerá, por supuesto, del
25 sujeto que se está tratando, de la gravedad de la

enfermedad, de la forma de administración y del juicio del
médico prescriptor. Así, debido a la variabilidad entre
pacientes, las dosificaciones proporcionadas en la presente
son una guía y el médico puede valorar la dosis del fármaco
5 para conseguir el tratamiento (por ejemplo, aumento de la
masa ósea) que el médico considere adecuada para el
paciente. Al considerar el grado de tratamiento deseado, el
médico debe valorar varios factores, tales como el nivel
inicial de masa ósea, la edad del paciente, la presencia de
10 enfermedad preexistente, así como la presencia de otras
enfermedades (por ejemplo, enfermedad cardiovascular).

En general, se usa una cantidad de agonista selectivo
del receptor EP4 de esta invención que es suficiente para
aumentar la masa ósea hasta un nivel superior al umbral de
15 fractura ósea (tal como se detalla en el World Health
Organization Study citado anteriormente en la presente
memoria).

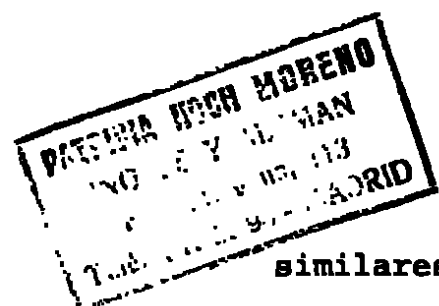
Los agonistas selectivos del receptor EP4 usados en
los procedimientos de la presente invención se administran
20 generalmente en forma de una composición farmacéutica que
comprende al menos uno de los compuestos de esta invención
junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente
aceptable. Así, el agonista selectivo del receptor EP4 de
esta invención se puede administrar individualmente de
25 forma local o sistémica en cualquier forma de dosificación



15

convencional oral, intranasal, parenteral, rectal o transdérmica.

Para administración oral la composición farmacéutica puede tomar la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos y similares. Los comprimidos que contienen diferentes excipientes, tales como citrato de sodio, carbonato de calcio y fosfato de calcio, se emplean junto con diferentes disgregantes, tales como almidón y preferiblemente almidón de patata o tapioca y ciertos silicatos complejos, junto con agentes ligantes tales como polivinilpirrolidona, sacarosa, gelatina y goma arábica. Adicionalmente, los agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio y talco son con frecuencia muy útiles para la elaboración de comprimidos. También se emplean composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina dura y blanda rellenas; los materiales preferidos para este fin incluyen también lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular. Cuando se desean suspensiones y/o elixires acuosos para administración oral, los compuestos de esta invención se pueden combinar con diferentes agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes, agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión, así como diluyentes como agua, etanol, propilenglicol, glicerina y diferentes combinaciones

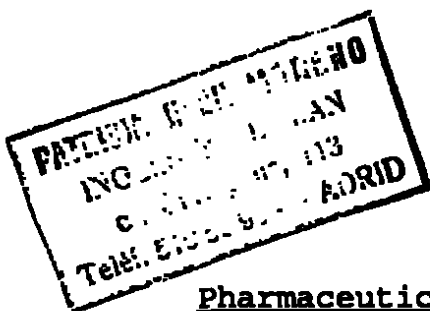


similares.

Para administración parenteral, se pueden emplear soluciones en aceite de sésamo y de cacahuete o en propilenglicol acuoso, así como soluciones acuosas estériles de las correspondientes sales solubles en agua. Tales soluciones acuosas pueden estar adecuadamente tamponadas, si es necesario, y el líquido diluyente se puede hacer primero isotónico con solución salina o glucosa suficiente. Estas soluciones acuosas son especialmente adecuadas para inyecciones intravenosas, intramusculares, subcutáneas e intraperitoneales. En relación a lo anterior, todos los medios acuosos estériles empleados son fácilmente obtenibles por técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia.

Para administración transdérmica (por ejemplo, tópica) se preparan soluciones acuosas estériles diluidas o soluciones parcialmente acuosas (habitualmente en concentración aproximada de 0,1% a 5%), similares a las soluciones parenterales anteriores.

Los procedimientos para preparar las diferentes composiciones farmacéuticas, con una cierta cantidad de ingrediente activo son conocidos, o serán evidentes a la luz de esta descripción, para los expertos en la materia. Para ejemplos de procedimientos de preparación de composiciones farmacéuticas véase Remington's

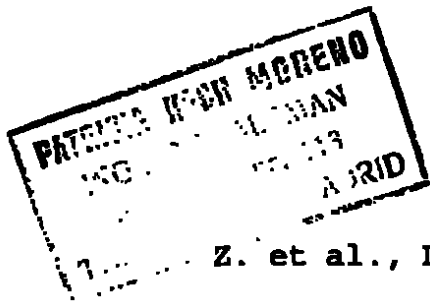


Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easter, Pa., 19th Edición (1995).

Protocolo de estudio

El objeto de este estudio es determinar si un agonista selectivo del receptor EP4 y, en especial, el ácido 7-(2-(3-hidroxi-4-fenil-butil)-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico, puede restaurar la masa ósea en un modelo de rata OVX.

Se ovariectomizaron (OVX) ratas Sprague-Dawley a los 3,5 meses de edad. Diez meses después de la OVX, las ratas se trataron por inyección subcutánea con vehículo o con ácido 7-(2-(3-hidroxi-4-fenil-butil)-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico a 30 mg/kg/día durante 28 días. Las ratas se sometieron a autopsia. El fémur derecho se extirpa a cada rata en la autopsia y se explora usando absorciometría de rayos X de doble haz (DEXA, QDR 1000/W, Hologic, Inc., Waltham, MA) equipada con un programa informático "Regional High Resolution Scan" (Hologic, Inc., Waltham, MA). El tamaño de campo de exploración es de 5 x 1,902 cm, la resolución es de 0,0254 x 0,0127 cm, y la velocidad de exploración es de 7,25 mm/seg. Se analizan las imágenes exploradas femorales. Se determina el contenido mineral óseo (BMC) y se calcula la densidad mineral ósea (MBD) del fémur completo (WF), la metáfisis femoral distal (DFM) y la diáfisis femoral (FS) según el procedimiento descrito en H.

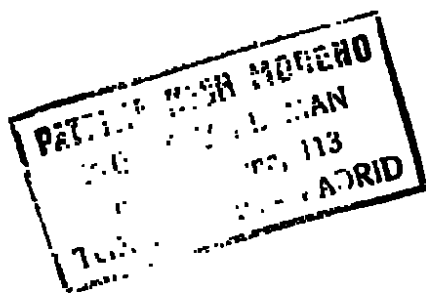


Z. et al., Droloxifene, a New Estrogen Antagonist/Agonist, Prevents Bone Loss in Ovariectomized Rats. ENDOCRINOLOGY 136; 2435-2441, 1995.

Resultados del estudio y discusión

5 Al comparar con las ratas OVX tratadas con vehículo, las ratas OVX tratadas con ácido 7-(2-(3-hidroxi-4-fenil-butyl)-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico mostraron un BMC femoral total un 17% mayor, una BMD femoral total un 13% mayor, un BMC femoral distal un 8% mayor, una BMD femoral
10 distal un 13% mayor, un BMC de la diáfisis femoral un 20% mayor y una BMD de la diáfisis femoral un 18% mayor. No se apreciaron efectos secundarios similares a PGE2 en ratas tratadas con ácido 7-(2-(3-hidroxi-4-fenil-butyl)-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico.

15 Estos datos muestran que el ácido 7-(2-(3-hidroxi-4-fenil-butyl)-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico, un agonista de PGE2 selectivo para el receptor EP4, estimula la formación ósea y restaura el hueso en ratas OVX ya osteopénicas.



REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para tratar un trastorno que presenta una masa ósea reducida en un mamífero, que comprende administrar a dicho mamífero un agonista selectivo del receptor EP4, uno de sus profármacos, o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho agonista selectivo del receptor EP4 o de dicho profármaco.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho trastorno es osteoporosis, fragilidad, una fractura osteoporótica, un defecto óseo, pérdida ósea idiopática de la infancia, pérdida ósea alveolar, pérdida ósea mandibular, fractura ósea, osteotomía, pérdida ósea asociada a periodontitis o crecimiento protésico interno.

3. Un procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicha composición se administra por vía sistémica.

4. Un procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicha composición se administra por vía local.

5. Un procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho trastorno es fragilidad.

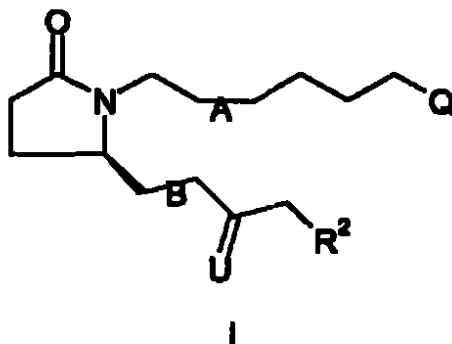
6. Un procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho trastorno es osteoporosis.

7. Un procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho trastorno es una fractura ósea o una fractura osteoporótica.

8. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el

que dicho agonista selectivo de EP4 es un compuesto de
Fórmula I:

5



uno de sus profármacos o una sal farmacéuticamente
10 aceptable de dicho compuesto o de dicho profármaco, en la
que:

Q es COOR³, CONHR⁴ o tetrazol-5-ilo;

A es un enlace sencillo o cis-doble;

B es un enlace sencillo o trans-doble;

15 U es



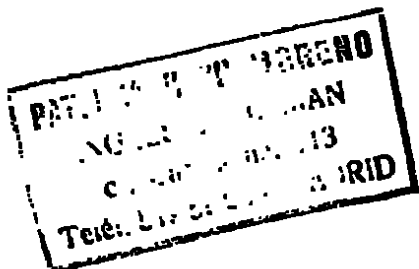
R² es α -tienilo, fenilo, fenoxi, fenilo monosustituido y
fenoxi monosustituido, siendo dichos sustituyentes cloro,
fluoro, fenilo, metoxi, trifluorometilo o alquilo C₁-C₃;

20 R³ es hidrógeno, alquilo C₁-C₃, fenilo o p-bifenilo;

R⁴ es COR⁵ o SO₂R⁵; y

R⁵ es fenilo o alquilo C₁-C₃.

9. Un procedimiento según la reivindicación 8, en el



57

que dicho agonista selectivo del receptor EP4 es un compuesto de Fórmula I en el que Q es 5-tetrazolilo.

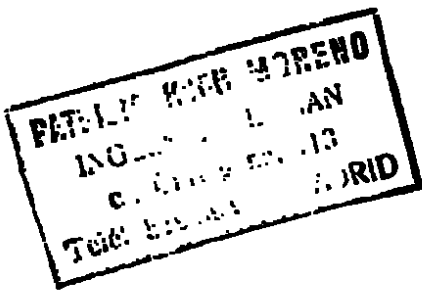
10. Un procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicho compuesto es 5-(3-hidroxi-4-fenil-but-1-enil)-1-
5 [6-(1H-tetrazol-5-il)-hexil]-pirrolidin-2-ona.

11. Un procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicho compuesto es 5-(3-hidroxi-4-fenil-butil)-1-[6-(1H-tetrazol-5-il)-hexil]-pirrolidin-2-ona.

12. Un procedimiento según la reivindicación 8, en el
10 que dicho agonista selectivo del receptor EP4 es un compuesto de Fórmula I en el que Q es COOH

13. Un procedimiento según la reivindicación 12, en el que dicho compuesto es ácido 7-(2-(3-hidroxi-4-fenil-butil)-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico.

15 14. Un procedimiento según la reivindicación 12, en el que dicho compuesto es ácido 7-[2-(3-hidroxi-4-fenil-but-1-enil)-5-oxo-pirrolidin-1-il]-heptanoico.

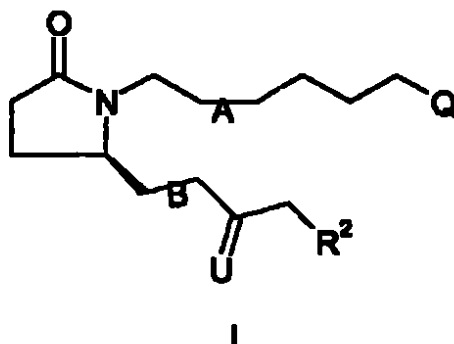


58

RESUMEN DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a procedimientos para tratar trastornos que presentan una masa ósea reducida, en particular osteoporosis, fragilidad, una fractura 5 osteoporótica, un defecto óseo, pérdida ósea idiopática de la infancia, pérdida ósea alveolar, pérdida ósea mandibular, fractura ósea, osteotomía, pérdida ósea asociada a periodontitis o recremento protésico, que comprenden administrar agonistas de prostaglandinas que son 10 agonistas de prostaglandinas selectivos para el receptor EP4. Esta invención se refiere especialmente a los procedimientos en los que el agonista selectivo del receptor EP4 es un compuesto de Fórmula I:

15



20 en la que las variables son como se han definido en la memoria descriptiva.

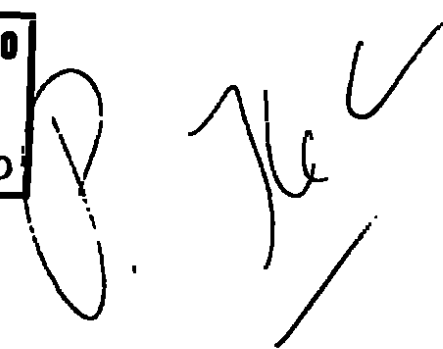
PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

59

Doña PATRICIA KOCH MORENO, intérprete jurado de inglés y alemán, certifica que la adjunta es traducción fiel y completa al español del documento adjunto redactado en inglés.

En Madrid, a 05 DIC 2000

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

Handwritten signature and initials in black ink, appearing to be 'P. Koch' and 'J. M.' with a checkmark.



60
N

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

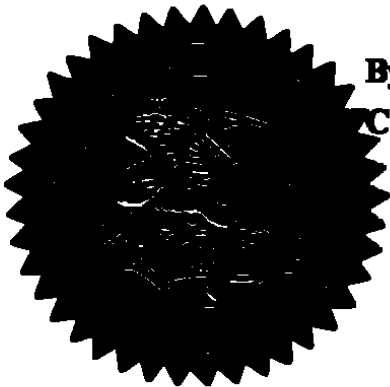
United States Patent and Trademark Office

August 23, 2000

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: 60/171,353

FILING DATE: December 22, 1999



By Authority of the

COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

T. LAWRENCE
Certifying Officer

PROVISIONAL APPLICATION COVER SHEET

A/PRO✓ 61

This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION under 37 CFR 1.53 (c).

Docket Number		PC10653RTR		Type a plus sign (+) inside this box		+
INVENTOR(s)/APPLICANT(s)						
LAST NAME	FIRST NAME	MIDDLE INITIAL	RESIDENCE (CITY AND EITHER STATE OR FOREIGN COUNTRY)			
Cameron	Kimberly	O.	5 Winchester Court North, East Lyme, CT 06333			
Ke	HuaZhu	-	2 Deer Lane, Ledyard, CT 06339, USA			
Lefker	Bruce	A.	21 Eagle Ridge Dr, Gales Ferry, CT 06335			
Thompson	David	D.-	37 Bittersweet Drive, Gales Ferry, CT 06335			
TITLE OF THE INVENTION (280 characters max)						
EP4 Receptor Selective Agonists in the Treatment of Osteoporosis						
CORRESPONDENCE ADDRESS						
Gregg C. Benson Pfizer Inc. Eastern Point Road Groton						
STATE	Connecticut	ZIP CODE	06340	COUNTRY	USA	
ENCLOSED APPLICATION PARTS (check all that apply)						
☒	Specification	Number of Pages	22	☐	Small Entity Statement	
☐	Drawing(s)	Number of Sheets	-	☐	Other (specify) _____	
METHOD OF PAYMENT (check one)						
☐	A check or money order is enclosed to cover the Provisional filing fees			PROVISIONAL FILING FEE AMOUNT(\$)	\$150.00	
☒	The Commissioner is hereby authorized to charge filing fees and credit Deposit Account Number: 16-1446					

The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government.

- ☒ No.
- ☐ Yes, the name of the U.S. Government agency and the Government contract number are: _____

Respectfully submitted,

SIGNATURE Robert T. Ronau

DATE 12/22/99

TYPED or PRINTED NAME Robert T. Ronau

REGISTRATION NO. 23267
(if appropriate)

- ☐ Additional inventors are being named on separately numbered sheets attached hereto.

PROVISIONAL APPLICATION FILING ONLY

EXPRESS MAIL NO. 2524820563545

provcvr.dot

EP4 RECEPTOR SELECTIVE AGONISTS IN THE
TREATMENT OF OSTEOPOROSIS
BACKGROUND OF INVENTION

This invention relates to methods and pharmaceutical compositions
5 comprising prostaglandin agonists which are useful to prevent bone loss, restore or
augment bone mass and to enhance bone healing including the treatment of
conditions which present with low bone mass and/or bone defects in vertebrates, and
particularly mammals, including humans. This invention specifically relates to
methods and pharmaceutical compositions comprising EP4 receptor selective
10 prostaglandin agonists.

Osteoporosis is a systemic skeletal disease, characterized by low bone mass
and deterioration of bone tissue, with a consequent increase in bone fragility and
susceptibility to fracture. In the U.S., the condition affects more than 25 million people
and causes more than 1.3 million fractures each year, including 500,000 spine,
15 250,000 hip and 240,000 wrist fractures annually. Hip fractures are the most serious
consequence of osteoporosis, with 5-20% of patients dying within one year, and over
50% of survivors being incapacitated.

The elderly are at greatest risk of osteoporosis, and the problem is therefore
predicted to increase significantly with the aging of the population. Worldwide fracture
20 incidence is forecasted to increase three-fold over the next 60 years, and one study
has estimated that there will be 4.5 million hip fractures worldwide in 2050.

Women are at greater risk of osteoporosis than men. Women experience a
sharp acceleration of bone loss during the five years following menopause. Other
factors that increase the risk include smoking, alcohol abuse, a sedentary lifestyle
25 and low calcium intake.

There are currently two main types of pharmaceutical therapy for the
treatment of osteoporosis. The first is the use of anti-resorptive compounds to reduce
the resorption of bone tissue.

Estrogen is an example of an anti-resorptive agent. It is known that estrogen
30 reduces fractures. In addition, Black, et al. in EP 0605193A1 report that estrogen,
particularly when taken orally, lowers plasma levels of LDL and raises those of the
beneficial high density lipoproteins (HDL's). However, estrogen fails to restore bone
back to young adult levels in the established osteoporotic skeleton. Furthermore long-
term estrogen therapy has been implicated in a variety of disorders, including an

EXPRESS MAIL NO. 23248205635US

60171353-1222 9

63
7

increase in the risk of uterine cancer, endometrial cancer and possibly breast cancer, causing many women to avoid this treatment. The significant undesirable effects associated with estrogen therapy support the need to develop alternative therapies for osteoporosis that have the desirable effect on serum LDL but do not cause
5 undesirable effects.

A second type of pharmaceutical therapy for the treatment of osteoporosis is the use of anabolic agents to promote bone formation and increase bone mass. This class of agents is expected to restore bone to the established osteoporotic skeleton.

Certain prostaglandin agonists are disclosed in GB 1478281, GB1479156 and
10 U.S. pat. nos. 4,175,203, 4,055,598, 4,175,203, 3,987,091 and 3,991,108 as being useful as, for example, renal vasodilators.

U.S. pat. no. 4,033,996 discloses certain 8-aza-9-oxo(and dioxo)-thia-11,12-secoprostaglandins which are useful as renal vasodilators, for the prevention of thrombus formation, to induce growth hormone release, and as regulators of the
15 immune response.

French patent no. 897,566 discloses certain amino acid derivatives for the treatment of neurological, mental or cardiovascular disease.

J. Org. Chem. 26; 1961; 1437 discloses N-acetyl-N-benzyl-p-aminophenylmercaptoacetic acid.

U.S. pat. no. 4,761,430 discloses certain arylbenzenesulfonamide compounds as lipid-lowering agents.
20

U.S. pat. no. 4,443,477 discloses certain sulphonamidophenylcarboxylic acids as lipid lowering agents.

U.S. pat. no. 3,528,961 discloses certain ϵ -caprolactam derivatives as dyes.

U.S. pat. no. 3,780,095 discloses certain acylated anilino-carboxylic acids as
25 choleretics.

U.S. pat. no. 4,243,678 discloses certain acylhydrocarbylaminoalkanoic acids as having utility in the treatment of gastric ulcers, as sebaceous gland excretion inhibitors and for combatting skin inflammation.

U.S. pat. no. 4,366,031 discloses certain N-benzoyl- ω -anilinoalkanoic acids as
30 anti-allergic agents, thrombotic aggregation inhibitors, anti-inflammatory agents and lipid-lowering agents.

In addition to osteoporosis, approximately, 20-25 million women and an increasing number of men have detectable vertebral fractures as a consequence of

60171353-1222 9

64
2

reduced bone mass, with an additional 250,000 hip fractures reported yearly in America alone. The latter case is associated with a 12% mortality rate within the first two years and with a 30% rate of patients requiring nursing home care after the fracture. While this is already significant, the economic and medical consequences of convalescence due to slow or imperfect healing of these bone fractures is expected to increase, due to the aging of the general population.

Estrogens have been shown (Bolander et al., 38th Annual Meeting Orthopedic Research Society, 1992) to improve the quality of the healing of appendicular fractures. Therefore, estrogen replacement therapy should be effective as a method for the treatment of fracture repair. However, patient compliance with estrogen therapy is relatively poor due to its side effects, including the resumption of menses, mastodynia, an increased risk of uterine cancer, an increased perceived risk of breast cancer, and the concomitant use of progestins. In addition, men are likely to object to the use of estrogen treatment. The need exists for a therapy which would be beneficial to patients who have suffered debilitating bone fractures and which would increase patient compliance.

It has been demonstrated that prostaglandin E2 (PGE2) can restore lost bone in an ovariectomized (OVX) rat model, a model for postmenopausal osteoporosis. Ke, H.Z., et al., Bone, 23:249-255, 1998. However there are severe side effects associated with PGE2. Jee, W.S.S. and Ma, Y.F., Bone, 21:297-304, 1997.

Although there are a variety of osteoporosis therapies, there is a continuing need and a continuing search in this field of art for alternative osteoporosis therapies. In addition, there is a need for bone fracture healing therapies. Also, there is a need for therapy which can promote bone re-growth into skeletal areas where defects exist such as defects caused or produced by, for example, tumors in bone. Further, there is a need for therapy which can promote bone re-growth into skeletal areas where bone grafts are indicated.

SUMMARY OF THE INVENTION

This invention is directed to methods of treating a condition which presents with low bone mass in a mammal comprising administering to said mammal an EP4 receptor selective agonist, a prodrug thereof or a pharmaceutically acceptable salt of said EP4 receptor selective agonist or of said prodrug.

This invention is particularly directed to such methods wherein said condition is osteoporosis, frailty, an osteoporotic fracture, a bone defect, childhood idiopathic

60171353.122299

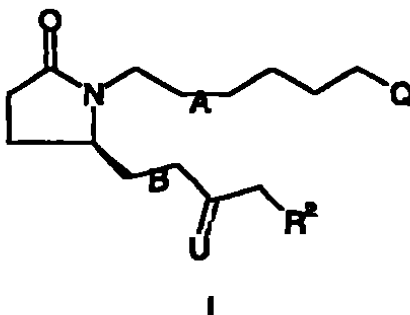
bone loss, alveolar bone loss, mandibular bone loss, bone fracture, osteotomy, bone loss associated with periodontitis, or prosthetic ingrowth. In preferred methods of this invention, the EP4 receptor selective agonist is administered systemically. In other preferred methods of this invention, the EP4 agonist is administered locally.

5 The methods of this invention are especially useful wherein said condition is frailty.

The methods of this invention are also especially useful wherein said condition is osteoporosis.

10 The methods of this invention are also especially useful wherein said condition is bone fracture or osteoporotic fracture.

Preferred EP4 selective agonists include compounds of Formula I:



prodrugs thereof and pharmaceutically acceptable salts of said compounds or said prodrugs, wherein:

Q is COOR^3 , CONHR^4 or tetrazol-5-yl;

A is a single or cis double bond;

B is a single or trans double bond;

U is



R^2 is α -thienyl, phenyl, phenoxy, monosubstituted phenyl and monosubstituted phenoxy, said substituents being chloro, fluoro, phenyl, methoxy, trifluoromethyl or $(\text{C}_1\text{-C}_6)\text{alkyl}$;

R^3 is hydrogen, $(\text{C}_1\text{-C}_6)\text{alkyl}$, phenyl or p-biphenyl;

R^4 is COR^5 or SO_2R^5 ; and

R^5 is phenyl or $(\text{C}_1\text{-C}_6)\text{alkyl}$.

A preferred group of EP4 receptor selective agonists of Formula I are those compounds of Formula I wherein Q is 5-tetrazolyl. Particularly preferred compounds

60171353-12229

within this group include 5-(3-Hydroxy-4-phenyl-but-1-enyl)-1-[6-(1H-tetrazol-5-yl)-hexyl]-pyrrolidin-2-one and 5-(3-Hydroxy-4-phenyl-butyl)-1-[6-(1H-tetrazol-5-yl)-hexyl]-pyrrolidin-2-one.

Another preferred group of EP4 receptor selective agonists of Formula I are those compound of Formula I wherein Q is COOH. Particularly preferred compounds within this group include 7-[2-(3-hydroxy-4-phenyl-butyl)-5-oxo-pyrrolidin-1-yl]-heptanoic acid and 7-[2-(3-Hydroxy-4-phenyl-but-1-enyl)-5-oxo-pyrrolidin-1-yl]-heptanoic acid.

Preferably post-menopausal women and men over the age of 60 are treated. Also preferred are individuals regardless of age who have significantly reduced bone mass, i.e., greater than or equal to 1.5 standard deviations below young normal levels.

In the methods of this invention, conditions which present with low bone mass include such conditions as, for example, osteoporosis, childhood idiopathic bone loss, alveolar bone loss, mandibular bone loss, bone fracture, osteotomy, bone loss associated with periodontitis and prosthetic ingrowth.

Methods for treating "secondary osteoporosis" are also included within the methods of this invention. "Secondary osteoporosis" includes glucocorticoid-induced osteoporosis, hyperthyroidism-induced osteoporosis, immobilization-induced osteoporosis, heparin-induced osteoporosis and immunosuppressive-induced osteoporosis in a vertebrate, e.g., a mammal (including a human being). These methods are carried out by administering to said vertebrate, e.g., mammal, a "secondary osteoporosis" treating amount of an EP4 receptor selective prostaglandin agonist, a prodrug thereof or a pharmaceutically acceptable salt of said EP4 receptor selective prostaglandin agonist or of said prodrug.

Yet another aspect of this invention is directed to methods for strengthening a bone graft, inducing vertebral synostosis, enhancing long bone extension, enhancing bone healing following facial reconstruction, maxillary reconstruction and/or mandibular reconstruction in a vertebrate, e.g., a mammal (including a human being), comprising administering to said vertebrate, e.g., a mammal which has undergone facial reconstruction, maxillary reconstruction or mandibular reconstruction, a bone enhancing amount of an EP4 receptor selective prostaglandin agonist, a prodrug thereof or a pharmaceutically acceptable salt of said EP4 receptor selective prostaglandin agonist or of said prodrug. The active EP4 receptor selective

60171353-12229

67

2

prostaglandin agonists of this invention may be applied locally to the site of bone reconstruction or may be administered systemically.

5 A preferred dosage is about 0.001 to about 100 mg/kg/day of an EP4 receptor selective agonist, a prodrug thereof or a pharmaceutically acceptable salt of said compound or said prodrug. An especially preferred dosage is about 0.01 to about 10 mg/kg/day of an EP4 receptor selective agonist, a prodrug thereof or a pharmaceutically acceptable salt of said compound or said prodrug.

10 The phrase "condition(s) which presents with low bone mass" refers to a condition where the level of bone mass is below the age specific normal as defined in standards by the World Health Organization "Assessment of Fracture Risk and its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis (1994). Report of a World Health Organization Study Group. World Health Organization Technical Series 843". Included in "condition(s) which presents with low bone mass" are primary and secondary osteoporosis, as described above. Also included is periodontal disease, 15 alveolar bone loss, post-osteotomy and childhood idiopathic bone loss. The phrase "condition(s) which presents with low bone mass" also includes long term complications of osteoporosis such as curvature of the spine, loss of height and prosthetic surgery.

20 The phrase "condition(s) which presents with low bone mass" also refers to a vertebrate, e.g., a mammal known to have a significantly higher than average chance of developing such diseases as are described above including osteoporosis (e.g., post-menopausal women, men over the age of 50). Other bone mass augmenting or enhancing uses include bone restoration, increasing the bone fracture healing rate, replacing bone graft surgery entirely, enhancing the rate of successful bone grafts, 25 bone healing following facial reconstruction or maxillary reconstruction or mandibular reconstruction, prosthetic ingrowth, vertebral synostosis or long bone extension.

The methods of this invention may also be used in conjunction with orthopedic devices such as spinal fusion cages, spinal fusion hardware, internal and external bone fixation devices, screws and pins.

30 Those skilled in the art will recognize that the term bone mass actually refers to bone mass per unit area which is sometimes (although not strictly correctly) referred to as bone mineral density.

The term "treating", "treat" or "treatment" as used herein includes preventative (e.g., prophylactic), palliative and curative treatment.

60171353.122299

68
27

By "pharmaceutically acceptable" it is meant the carrier, vehicle, diluent, excipients, and/or salt must be compatible with the other ingredients of the formulation, and not deleterious to the recipient thereof.

The expression "prodrug" refers to compounds that are drug precursors which, following administration, release the drug *in vivo* via some chemical or physiological process (e.g., a prodrug on being brought to the physiological pH or through enzyme action is converted to the desired drug form). Exemplary prodrugs upon cleavage release the corresponding drug compound.

The expression "pharmaceutically acceptable salt" refers to nontoxic anionic salts containing anions such as (but not limited to) chloride, bromide, iodide, sulfate, bisulfate, phosphate, acetate, maleate, fumarate, oxalate, lactate, tartrate, citrate, gluconate, methanesulfonate and 4-toluene-sulfonate. The expression also refers to nontoxic cationic salts such as (but not limited to) sodium, potassium, calcium, magnesium, ammonium or protonated benzathine (N,N'-dibenzylethylenediamine), choline, ethanolamine, diethanolamine, ethylenediamine, meglumine (N-methyl-glucamine), benethamine (N-benzylphenethylamine), piperazine or tromethamine (2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol).

The methods of this invention result in bone formation resulting in decreased fracture rates. This invention makes a significant contribution to the art by providing methods that increase bone formation resulting in prevention, retardation, and/or regression of osteoporosis and related bone disorders.

Other features and advantages will be apparent from the specification and claims which describe the invention.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Any EP4 receptor selective agonist may be used as the EP4 receptor selective agonist of this invention. EP4 selective agonists are compounds which have an IC50 at the EP1, EP2 and EP3 receptor which is at least 10-fold greater than the IC50 at the EP4 receptor subtype. For example, 7-(2-(3-hydroxy-4-phenyl-butyl)-5-oxo-pyrrolidin-1-yl)-heptanoic acid is an EP4 receptor selective PGE2 agonist with an EP4 receptor binding IC50 of 16 nM. At all other EP receptor subtypes, including the EP1, EP2 and EP3 receptor subtypes, the IC50 for 7-(2-(3-hydroxy-4-phenyl-butyl)-5-oxo-pyrrolidin-1-yl)-heptanoic acid is greater than 3200 nM.

The compounds of Formula I may be prepared as disclosed in commonly assigned U.S. 4,177,346, which is incorporated herein by reference.

60171353.122299

69

7

5 The EP4 receptor selective agonists used in the methods of this invention are all adapted to therapeutic use as agents that stimulate bone formation and increase bone mass in a vertebrates, e.g., mammals, and particularly humans. Since bone formation is closely related to the development of osteoporosis and bone related disorders, the agonists used in the methods of this invention, by virtue of their action on bone, prevent, arrest and/or regress osteoporosis.

10 The utility of the EP4 selective agonists used in the methods of the present invention as medical agents in the treatment of conditions which present with low bone mass (e.g., osteoporosis) in vertebrates, e.g., mammals (especially humans and particularly female humans) is demonstrated by the activity of those agonists in conventional assays, including a receptor binding assay, a cyclic AMP assay, an *in vivo* assay and a fracture healing assay, all of which are described below. Such assays also provide a means whereby the activities of the EP4 selective agonists can be compared to each other and with the activities of other known compounds and compositions. The results of these comparisons are useful for determining dosage levels in a vertebrates, e.g., mammals, including humans, for the treatment of such diseases.

In Vivo Assay

20 The activity of anabolic bone agents in stimulating bone formation and increasing bone mass can be tested in intact male or female rats, sex hormone deficient male (orchidectomy) or female (ovariectomy) rats.

25 Male or female rats at different ages (such as 3 months of age) can be used in the study. The rats are either intact or castrated (ovariectomized or orchidectomized), and subcutaneously injected or gavaged with prostaglandin agonists at different doses (such as 1, 3, or 10 mg/kg/day) for 30 days. In the castrated rats, treatment is started at the next day after surgery (for the purpose of preventing bone loss) or at the time bone loss has already occurred (for the purpose of restoring bone mass). During the study, all rats are allowed free access to water and a pelleted commercial diet (Teklad Rodent Diet #8064, Harlan Teklad, Madison, WI) containing 1.46% calcium, 0.99% phosphorus and 4.98 IU/g of Vitamin D₃. All rats are given subcutaneous injections of 10 mg/kg calcitonin on days 12 and 2 before sacrifice. The rats are sacrificed. The following endpoints are determined:

60171353-122299

Femoral Bone Mineral Measurements:

The right femur from each rat is removed at autopsy and scanned using dual energy X-ray absorptiometry (DXA, QDR 1000/W, Hologic Inc., Waltham, MA) equipped with "Regional High Resolution Scan" software (Hologic Inc., Waltham, MA). The scan field size is 5.08 x 1.902 cm, resolution is 0.0254 x 0.0127 cm and scan speed is 7.25 mm/second. The femoral scan images are analyzed and bone area, bone mineral content (BMC), and bone mineral density (BMD) of whole femora (WF), distal femoral metaphyses (DFM), femoral shaft (FS), and proximal femora (PF) are determined.

Tibial Bone Histomorphometric Analyses:

The right tibia is removed at autopsy, dissected free of muscle, and cut into three parts. The proximal tibia and the tibial shaft are fixed in 70% ethanol, dehydrated in graded concentrations of ethanol, defatted in acetone, then embedded in methyl methacrylate (Eastman Organic Chemicals, Rochester, NY).

Frontal sections of proximal tibial metaphyses at 4 and 10 μ m thickness are cut using a Reichert-Jung Polycut S microtome. The 4 μ m sections are stained with modified Masson's Trichrome stain while the 10 μ m sections remain unstained. One 4 μ m and one 10 μ m sections from each rat are used for cancellous bone histomorphometry.

Cross sections of tibial shaft at 10 μ m thickness are cut using a Reichert-Jung Polycut S microtome. These sections are used for cortical bone histomorphometric analysis.

Cancellous bone histomorphometry: A Bloquant OG/2 histomorphometry system (R&M Biometrics, Inc., Nashville, TN) is used for the static and dynamic histomorphometric measurements of the secondary spongiosa of the proximal tibial metaphyses between 1.2 and 3.6 mm distal to the growth plate-epiphyseal junction. The first 1.2 mm of the tibial metaphyseal region needs to be omitted in order to restrict measurements to the secondary spongiosa. The 4 μ m sections are used to determine indices related to bone volume, bone structure, and bone resorption, while the 10 μ m sections are used to determine indices related to bone formation and bone turnover.

1) Measurements and calculations related to trabecular bone volume and structure: (1) Total metaphyseal area (TV, mm²): metaphyseal area between 1.2 and 3.6 mm distal to the growth plate-epiphyseal junction. (2) Trabecular bone area (BV,

60171353-12229

mm²): total area of trabeculae within TV. (3) Trabecular bone perimeter (BS, mm): the length of total perimeter of trabeculae. (4) Trabecular bone volume (BV/TV, %): $BV / TV \times 100$. (5) Trabecular bone number (TBN, #/mm): $1.199 / 2 \times BS / TV$. (6) Trabecular bone thickness (TBT, μm): $(2000 / 1.199) \times (BV / BS)$. (7) Trabecular bone separation (TBS, μm): $(2000 \times 1.199) \times (TV - BV)$.

II) Measurements and calculations related to bone resorption: (1) Osteoclast number (OCN, #): total number of osteoclast within total metaphyseal area. (2) Osteoclast perimeter (OCP, mm): length of trabecular perimeter covered by osteoclast. (3) Osteoclast number/mm (OCN/mm, #/mm): OCN / BS . (4) Percent osteoclast perimeter (%OCP, %): $OCP / BS \times 100$.

III) Measurements and calculations related to bone formation and turnover: (1) Single-calcein labeled perimeter (SLS, mm): total length of trabecular perimeter labeled with one calcein label. (2) Double-calcein labeled perimeter (DLS, mm): total length of trabecular perimeter labeled with two calcein labels. (3) Inter-labeled width (ILW, μm): average distance between two calcein labels. (4) Percent mineralizing perimeter (PMS, %): $(SLS/2 + DLS) / BS \times 100$. (5) Mineral apposition rate (MAR, $\mu m/day$): $ILW / \text{label interval}$. (6) Bone formation rate/surface ref. (BFR/BS, $\mu m^2/d/\mu m$): $(SLS/2 + DLS) \times MAR / BS$. (7) Bone turnover rate (BTR, %/y): $(SLS/2 + DLS) \times MAR / BV \times 100$.

Cortical bone histomorphometry: A Bloquant OS/2 histomorphometry system (R&M Biometrics, Inc., Nashville, TN) is used for the static and dynamic histomorphometric measurements of tibial shaft cortical bone. Total tissue area, marrow cavity area, periosteal perimeter, endocortical perimeter, single labeled perimeter, double labeled perimeter, and interlabeled width on both periosteal and endocortical surface are measured, and cortical bone area (total tissue area - marrow cavity area), percent cortical bone area (cortical area / total tissue area $\times 100$), percent marrow area (marrow cavity area / total tissue area $\times 100$), periosteal and endocortical percent labeled perimeter $[(\text{single labeled perimeter}/2 + \text{double labeled perimeter}) / \text{total perimeter} \times 100]$, mineral apposition rate (interlabeled width/intervals), and bone formation rate [mineral apposition rate $\times [(\text{single labeled perimeter}/2 + \text{double labeled perimeter}) / \text{total perimeter}]$ are calculated.

50171353.122299

72
2

Statistics

Statistics can be calculated using StatView 4.0 packages (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA). The analysis of variance (ANOVA) test followed by Fisher's PLSD (Stat View, Abacus Concepts Inc., 1918 Bonita Ave, Berkeley, CA 94704-1014) are used to compare the differences between groups.

Determination of cAMP Elevation in 293-S Cell Lines Stably Overexpressing Recombinant Human EP₄ Receptors.

cDNAs representing the complete open reading frames of the human EP₄ receptors are generated by reverse transcriptase polymerase chain reaction using oligonucleotide primers based on published sequences (1) and RNA from primary human lung cells (EP₄) as templates. cDNAs are cloned into the multiple cloning site of pcDNA3 (Invitrogen Corporation, 3985B Sorrento Valley Blvd., San Diego, CA 92121) and used to transfect 293-S human embryonic kidney cells via calcium phosphate co-precipitation. G418-resistant colonies are expanded and tested for specific [³H]PGE₂ binding. Transfectants demonstrating high levels of specific [³H]PGE₂ binding are further characterized by Scatchard analysis to determine B_{max} and K_ds for PGE₂. The lines selected for compound screening have approximately 258,400 receptors per cell and a K_d = 2.9 nM for PGE₂ (EP₄). Constitutive expression of the receptor in parental 293-S cells is negligible. Cells are maintained in RPMI supplemented with fetal bovine serum (10% final) and G418 (700 ug/ml final).

cAMP responses in the 293-S/EP₄ lines are determined by detaching cells from culture flasks in 1 ml of Ca++ and Mg++ deficient PBS via vigorous pounding, adding serum-free RPMI to a final concentration of 1 X 10⁶ cells/ml, and adding 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) to a final concentration of 1 mM. One milliliter of cell suspension is immediately aliquoted into individual 2 ml screwcap microcentrifuge and incubated for 10 minutes, uncovered, at 37 °C, 5% CO₂, 95% relative humidity. The compound to be tested is then added to cells at 1:100 dilutions such that final DMSO or ethanol concentrations is 1%. Immediately after adding compound, the tubes are covered, mixed by inverting two times, and incubated at 37 °C for 12 minutes. Samples are then lysed by incubation at 100 °C for 10 minutes and immediately cooled on ice for 5 minutes. Cellular debris is pelleted by centrifugation at 1000 X g for 5 minutes, and cleared lysates are transferred to fresh tubes. cAMP concentrations are determined using a commercially available cAMP radioimmunoassay kit RIA (NEK-083, DuPont/NEN Research Products, 549 Albany

60171353-122299

St., Boston, MA 02118) after diluting cleared lysates 1:10 in cAMP RIA assay buffer (included in kit). Typically, the cells are treated with 6-8 concentrations of the compound to be tested in 1 log increments. EC50 calculations are performed on a calculator using linear regression analysis on the linear portion of the dose response curves.

References

1. Regan, J.W. Bailey, T.J. Pepperl, D.J. Pierce, K.L. Bogardus, A.M. Donello, J.E. Fairbairn, C.E. Kedzie, K.M. Woodward, D.F. and Cui, D.W. 1994 Cloning of a Novel Human Prostaglandin Receptor with Characteristics of the Pharmacologically Defined EP₂ Subtype. Mol. Pharmacology 46:213-220.

Assay for Binding to Prostaglandin E₂ Receptors

- Membrane Preparation: All operations are performed at 4 °C. Transfected cells expressing prostaglandin E₂ type 1 receptors (EP₁), type 2 (EP₂), type 3 (EP₃) or type 4 (EP₄) receptors are harvested and suspended to 2 million cells per ml in Buffer A [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM Petabloc peptide, (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN), 10 uM Phosphoramidon peptide, (Sigma, St. Louis, MO), 1 uM pepstatin A peptide, (Sigma, St. Louis, MO), 10 uM elastatinal peptide, (Sigma, St. Louis, MO), 100 uM antipain peptide, (Sigma, St. Louis, MO)]. The cells are lysed by sonification with a Branson Sonifier (Model #250, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT) in 2 fifteen second bursts. Unlysed cells and debris are removed by centrifugation at 100 x g for 10 min. Membranes are then harvested by centrifugation at 45,000 x g for 30 minutes. Pelleted membranes are resuspended to 3-10 mg of protein per ml of Buffer A, the protein concentration being determined by the method of Bradford [Bradford, M., Anal. Biochem., 72, 248 (1976)]. Resuspended membranes are then stored frozen at -60 °C until use.

- Binding Assay: Frozen membranes prepared as above are thawed and diluted to 1 mg protein per ml in Buffer A above. One volume of membrane preparation is combined with 0.05 volume test compound or buffer and one volume of 3 nM ³H-prostaglandin E₂ (#TRK 431, Amersham, Arlington Heights, IL) in Buffer A. The mixture (205 µL total volume) is incubated for 1 hour at 25°C. The membranes are then recovered by filtration through type GF/C glass fiber filters (#1205-401, Wallac, Gaithersburg, MD) using a Tomtec harvester (Model Mach IV98, Tomtec, Orange, CT). The membranes with bound ³H-prostaglandin E₂ are trapped by the filter, while the buffer and unbound ³H-prostaglandin E₂ pass through the filter into

50171353-122299

74
X

waste. Each sample is then washed 3 times with 3 ml of 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA. The filters are then dried by heating in a microwave oven. To determine the amount of ³H-prostaglandin bound to the membranes, the dried filters are placed into plastic bags with scintillation fluid and counted in a LKB 1205
5 Betaplate reader (Wallac, Gaithersburg, MD). IC50s are determined from the concentration of test compound required to displace 50% of the specifically bound ³H-prostaglandin E₂.

The full length coding sequence for the EP₁ receptor is made as disclosed in Funk et al., Journal of Biological Chemistry, 1993, 268, 26767-26772. The full length
10 coding sequence for the EP₂ receptor is made as disclosed in Regan et al., Molecular Pharmacology, 1994, 46, 213-220. The full length coding sequence for the EP₃ receptor is made as disclosed in Regan et al., British Journal of Pharmacology, 1994, 112, 377-385. The full length coding sequence for the EP₄ receptor is made as disclosed in Beasley, Journal of Biological Chemistry, 1994, 269, 11873-11877.
15 These full length receptors are used to prepare 293S cells expressing the EP₁, EP₂, EP₃ and EP₄ receptors.

293S cells expressing either the human EP₁, EP₂, EP₃ or EP₄ prostaglandin E₂ receptors are generated according to methods known to those skilled in the art. Typically, PCR (polymerase chain reaction) primers corresponding to the 5' and 3'
20 ends of the published full length receptor are made according to the well known methods disclosed above and are used in an RT-PCR reaction using the total RNA from human kidney (for EP₁), human lung (for EP₂), human lung (for EP₃) or human lymphocytes (for EP₄) as a source. PCR products are cloned by the TA overhang method into pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) and identity of the cloned receptor is
25 confirmed by DNA sequencing.

293S cells (Mayo, Dept. of Biochemistry, Northwestern Univ.) are transfected with the cloned receptor in pcDNA3 by electroporation. Stable cell lines expressing the receptor are established following selection of transfected cells with G418.

Clonal cell lines expressing the maximal number of receptors are chosen
30 following a whole cell ³H-PGE₂ binding assay using unlabeled PGE₂ as a competitor.

50171353-122299

75
X

FRACTURE HEALING ASSAYS

ASSAY FOR EFFECTS ON FRACTURE HEALING AFTER SYSTEMIC ADMINISTRATION

Fracture Technique: Sprague-Dawley rats at 3 months of age are anesthetized with Ketamine. A 1 cm incision is made on the anteromedial aspect of the proximal part of the right tibia or femur. The following describes the tibial surgical technique. The incision is carried through to the bone, and a 1 mm hole is drilled 4 mm proximal to the distal aspect of the tibial tuberosity 2 mm medial to the anterior ridge. Intramedullary nailing is performed with a 0.8 mm stainless steel tube (maximum load 38.3 N, maximum stiffness 61.8 N/mm, tested under the same conditions as the bones). No reaming of the medullary canal is performed. A standardized closed fracture is produced 2 mm above the tibiofibular junction by three-point bending using specially designed adjustable forceps with blunt jaws. To minimize soft tissue damage, care is taken not to displace the fracture. The skin is closed with monofilament nylon sutures. The operation is performed under sterile conditions. Radiographs of all fractures are taken immediately after nailing, and rats with fractures outside the specified diaphyseal area or with displaced nails are excluded. The remaining animals are divided randomly into the following groups with 10 - 12 animals per each subgroup per time point for testing the fracture healing. The first group receives daily gavage of vehicle (water : 100% Ethanol = 95 : 5) at 1 ml/rat, while the others receive daily gavage from 0.01 to 100 mg/kg/day of the compound to be tested (1 ml/rat) for 10, 20, 40 and 80 days.

At 10, 20, 40 and 80 days, 10 - 12 rats from each group are anesthetized with Ketamine and sacrificed by exsanguination. Both tibiofibular bones are removed by dissection and all soft tissue is stripped. Bones from 5 - 6 rats for each group are stored in 70% ethanol for histological analysis, and bones from another 5 - 6 rats for each group are stored in a buffered Ringer's solution (+4°C, pH 7.4) for radiographs and biomechanical testing which is performed.

Histological Analysis: The methods for histologic analysis of fractured bone have been previously published by Mosakide and Bak (The Effects of Growth Hormone on Fracture Healing in Rats: A Histological Description. Bone, 14:19-27, 1993). Briefly, the fracture site is sawed 8 mm to each side of the fracture line, embedded undecalcified in methymethacrylate, and cut frontal sections on a Reichert-Jung Polycut microtome in 8 µm thick. Masson-Trichrome stained mid-

60171353-122299

76

76

frontal sections (including both tibia and fibula) are used for visualization of the cellular and tissue response to fracture healing with and without treatment. Sirius red stained sections are used to demonstrate the characteristics of the callus structure and to differentiate between woven bone and lamellar bone at the fracture site. The following measurements are performed: (1) fracture gap - measured as the shortest distance between the cortical bone ends in the fracture, (2) callus length and callus diameter, (3) total bone volume area of callus, (4) bony tissue per tissue area inside the callus area, (5) fibrous tissue in the callus, and (6) cartilage area in the callus.

Biomechanical Analysis: The methods for biomechanical analysis have been previously published by Bak and Andreasen (The Effects of Aging on Fracture Healing in Rats. Calcif Tissue Int 45:282-297, 1989). Briefly, radiographs of all fractures are taken prior to the biomechanical test. The mechanical properties of the healing fractures are analyzed by a destructive three- or four-point bending procedure. Maximum load, stiffness, energy at maximum load, deflection at maximum load, and maximum stress are determined.

ASSAY FOR EFFECTS ON FRACTURE HEALING AFTER LOCAL ADMINISTRATION

Fracture Technique: Female or male beagle dogs at approximately 2 years of age are used under anesthesia in the study. Transverse radial fractures are produced by slow continuous loading in three-point bending as described by Lanehan et al (Lanehan, T. M.; Balligand, M.; Nunamaker, D.M.; Wood, F.E.: Effects of EHDP on Fracture Healing in Dogs. J Orthop Res 3:499-507; 1985). A wire is pulled through the fracture site to ensure complete anatomical disruption of the bone. Thereafter, local delivery of prostaglandin agonists to the fracture site is achieved by slow release of compound delivered by slow release pellets or by administration of the compounds in a suitable formulation such as a paste gel solution or suspension for 10, 15, or 20 weeks.

Histological Analysis: The methods for histologic analysis of fractured bone have been previously published by Peter et al. (Peter, C.P.; Cook, W.O.; Nunamaker, D.M.; Provost, M. T.; Sedor, J.G.; Rodan, G.A. Effects of alendronate on fracture healing and bone remodeling in dogs. J. Orthop. Res. 14:74-70, 1996) and Mosskide and Bak (The Effects of Growth Hormone on Fracture Healing in Rats: A Histological Description. Bone, 14:19-27, 1993). Briefly, after sacrifice, the fracture site is sawed 3 cm to each side of the fracture line, embedded undecalcified in methymethacrylate,

60171353-122299

and cut on a Reichert-Jung Polyout microtome in 8 μ m thick of frontal sections. Masson-Trichrome stained mid-frontal sections (including both tibia and fibula) are used for visualization of the cellular and tissue response to fracture healing with and without treatment. Sirius red stained sections are used to demonstrate the characteristics of the callus structure and to differentiate between woven bone and lamellar bone at the fracture site. The following measurements are performed: (1) fracture gap - measured as the shortest distance between the cortical bone ends in the fracture, (2) callus length and callus diameter, (3) total bone volume area of callus, (4) bony tissue per tissue area inside the callus area, (5) fibrous tissue in the callus, (6) cartilage area in the callus.

Biomechanical Analysis: The methods for biomechanical analysis have been previously published by Bak and Andreassen (The Effects of Aging on Fracture Healing in Rats. *Calcif Tissue Int* 45:292-297, 1989) and Peter et al. (Peter, C.P.; Cook, W.O.; Nunamaker, D.M.; Provost, M. T.; Sedor, J.G.; Rodan, G.A. Effects of Alendronate On Fracture Healing And Bone Remodeling In Dogs. *J. Orthop. Res.* 14:74-70, 1996). Briefly, radiographs of all fractures are taken prior to the biomechanical test. The mechanical properties of the healing fractures are analyzed by a destructive three- or four-point bending procedures. Maximum load, stiffness, energy at maximum load, deflection at maximum load, and maximum stress are determined.

Administration of the EP4 receptor selective agonists according to the methods of this invention can be via any mode which delivers the EP4 receptor selective agonist systemically and/or locally (e.g., at the site of the bone fracture, osteotomy, or orthopedic surgery). These methods include oral routes, parenteral, intraduodenal routes, etc. Generally, the compounds of this invention are administered orally, but parenteral administration (e.g., intravenous, intramuscular, transdermal, subcutaneous, rectal or intramedullary) may be utilized, for example, where oral administration is inappropriate for the target or where the patient is unable to ingest the drug.

The methods of this invention are used for the treatment and promotion of healing of bone fractures and osteotomies by the local application (e.g., to the sites of bone fractures or osteotomies) of EP4 receptor selective agonists. The EP4 receptor selective agonists of this invention are applied to the sites of bone fractures or osteotomies, for example, either by injection of the compound in a suitable solvent

60171353-122299

78
84

(e.g., an oily solvent such as arachis oil) to the cartilage growth plate or, in cases of open surgery, by local application thereto of the compound in a suitable vehicle, carrier or diluent such as bone-wax, demineralized bone powder, polymeric bone cements, bone sealants, etc. Alternatively, local application can be achieved by
5 applying a solution or dispersion of the compound in a suitable carrier or diluent onto the surface of, or incorporating it into solid or semi-solid implants conventionally used in orthopedic surgery, such as dacron-mesh, gel-foam and Kiel bone, or prostheses.

In any event, the amount and timing of compounds administered will, of course, be dependent on the subject being treated, on the severity of the affliction, on
10 the manner of administration and on the judgment of the prescribing physician. Thus, because of patient to patient variability, the dosages given herein are a guideline and the physician may titrate doses of the drug compound to achieve the treatment (e.g., bone mass augmentation) that the physician considers appropriate for the patient. In considering the degree of treatment desired, the physician must balance a variety of
15 factors such as bone mass starting level, age of the patient, presence of preexisting disease, as well as presence of other diseases (e.g., cardiovascular disease).

In general an amount of an EP4 receptor selective agonist is used that is sufficient to augment bone mass to a level which is above the bone fracture threshold (as detailed in the World Health Organization Study previously cited herein).

The EP4 receptor selective agonist compounds used in the methods of this invention are generally administered in the form of a pharmaceutical composition comprising at least one of the compounds of this invention together with a pharmaceutically acceptable vehicle or diluent. Thus, the EP4 receptor selective agonist can be administered individually in any conventional oral, intranasal,
20 parenteral, rectal or transdermal dosage form.

For oral administration the pharmaceutical composition can take the form of solutions, suspensions, tablets, pills, capsules, powders, and the like. Tablets containing various excipients such as sodium citrate, calcium carbonate and calcium phosphate are employed along with various disintegrants such as starch and
30 preferably potato or tapioca starch and certain complex silicates, together with binding agents such as polyvinylpyrrolidone, sucrose, gelatin and acacia. Additionally, lubricating agents such as magnesium stearate, sodium lauryl sulfate and talc are often very useful for tabletting purposes. Solid compositions of a similar type are also employed as fillers in soft and hard-filled gelatin capsules; preferred materials in this

60171353-122299

79
28

connection also include lactose or milk sugar as well as high molecular weight polyethylene glycols. When aqueous suspensions and/or elixirs are desired for oral administration, the compositions of this invention can be combined with various sweetening agents, flavoring agents, coloring agents, emulsifying agents and/or suspending agents, as well as such diluents as water, ethanol, propylene glycol, glycerin and various like combinations thereof.

For purposes of parenteral administration, solutions in sesame or peanut oil or in aqueous propylene glycol can be employed, as well as sterile aqueous solutions of the corresponding water-soluble salts. Such aqueous solutions may be suitably buffered, if necessary, and the liquid diluent first rendered isotonic with sufficient saline or glucose. These aqueous solutions are especially suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous and intraperitoneal injection purposes. In this connection, the sterile aqueous media employed are all readily obtainable by standard techniques well-known to those skilled in the art.

For purposes of transdermal (e.g., topical) administration, dilute sterile, aqueous or partially aqueous solutions (usually in about 0.1% to 5% concentration), otherwise similar to the above parenteral solutions, are prepared.

Methods of preparing various pharmaceutical compositions with a certain amount of active ingredient are known, or will be apparent in light of this disclosure, to those skilled in the art. For examples of methods of preparing pharmaceutical compositions, see Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 18th Edition (1965).

Study Protocol

The purpose of this study is to determine whether an EP4 receptor selective agonist, and specifically 7-(2-(3-hydroxy-4-phenyl-butyl)-5-oxo-pyrrolidin-1-yl)-heptanoic acid, can restore bone mass in OVX rat model.

Sprague-Dawley male rats were ovariectomized (OVX) at 3.5 months of age. Ten months after OVX, the rats were treated by subcutaneous injection with vehicle or 7-(2-(3-hydroxy-4-phenyl-butyl)-5-oxo-pyrrolidin-1-yl)-heptanoic acid at 30 mg/kg/day for 28 days. The rats were autopsied. The right femur from each rat was removed at autopsy and scanned using dual energy x-ray absorptiometry (DEXA, QDR 1000/W, Hologic Inc., Waltham, MA) equipped with "Regional High Resolution Scan" software (Hologic Inc., Waltham, MA). The scan field size was 5.08 x 1.902 cm, resolution is 0.0254 x 0.0127 cm and the scan speed was 7.25 mm/second. The femoral scan images were analyzed.

50171353.122299

Bone mineral content (BMC) and bone mineral density (BMD) of whole femora (WF), distal femoral metaphysis (DFM), and femoral shaft (FS) were determined according to the method described in H. Z. Ke et al., Droloxifene, a New Estrogen Antagonist/Agonist, Prevents Bone Loss in Ovariectomized Rats. ENDOCRINOLOGY 138:2435-2441, 1995.

5

Study Results and Discussion

Compared with OVX rats treated with vehicle, OVX rats treated with 7-(2-(3-hydroxy-4-phenyl-butyl)-5-oxo-pyrrolidin-1-yl)-heptanoic acid showed total femoral BMC increased by 17%, total femoral BMD increased by 13%, distal femoral BMC increased by 8%, distal femoral BMD increased by 8%, femoral shaft BMC increased by 20%, and femoral shaft BMD increased by 18%. No PGE2-like side effects were seen in rats treated with 7-(2-(3-hydroxy-4-phenyl-butyl)-5-oxo-pyrrolidin-1-yl)-heptanoic acid.

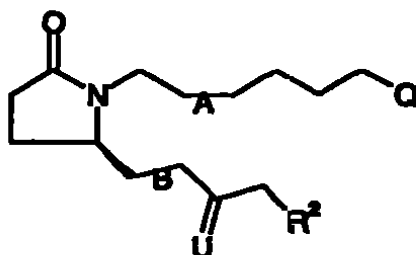
10

This data shows that 7-(2-(3-hydroxy-4-phenyl-butyl)-5-oxo-pyrrolidin-1-yl)-heptanoic acid, an EP4 receptor selective PGE2 agonist, stimulates bone formation and restores bone in established osteopenic OVX rats.

66222T-ESST-109

CLAIMS

1. A method of treating a condition which presents with low bone mass in a mammal comprising administering to said mammal an EP4 receptor selective agonist, a prodrug thereof or a pharmaceutically acceptable salt of said EP4 receptor selective agonist or of said prodrug.
2. A method of claim 1 wherein said condition is osteoporosis, frailty, an osteoporotic fracture, a bone defect, childhood idiopathic bone loss, alveolar bone loss, mandibular bone loss, bone fracture, osteotomy, bone loss associated with periodontitis, or prosthetic ingrowth.
3. A method of claim 2 wherein said composition is administered systemically.
4. A method of claim 2 wherein said composition is administered locally.
5. A method of claim 2 wherein said condition is frailty.
6. A method of claim 2 wherein said condition is osteoporosis.
7. A method of claim 2 wherein said condition is bone fracture or osteoporotic fracture.
8. A method of claim 1 wherein said EP4 selective agonist is a compound of Formula I:



20

a prodrug thereof or a pharmaceutically acceptable salt of said compound or said prodrug, wherein:

Q is COOR³, CONHR⁴ or tetrazol-5-yl;

A is a single or cis double bond;

25 B is a single or trans double bond;

U is



60171353.122299

82
2

R² is α -thienyl, phenyl, phenoxy, monosubstituted phenyl and monosubstituted phenoxy, said substituents being chloro, fluoro, phenyl, methoxy, trifluoromethyl or (C₁-C₆)alkyl;

R³ is hydrogen, (C₁-C₆)alkyl, phenyl or p-biphenyl;

5 R⁴ is COR⁵ or SO₂R⁵; and

R⁵ is phenyl or (C₁-C₆)alkyl.

9. A method of claim 8 wherein said EP4 receptor selective agonist is a compound of Formula I wherein Q is 5-tetrazolyl.

10. A method of claim 9 wherein said compound is 5-(3-hydroxy-4-phenyl-but-1-enyl)-1-[6-(1H-tetrazol-5-yl)-hexyl]-pyrrolidin-2-one.

11. A method of claim 9 wherein said compound is 5-(3-hydroxy-4-phenyl-butyl)-1-[6-(1H-tetrazol-5-yl)-hexyl]-pyrrolidin-2-one.

12. A method of claim 8 wherein said EP4 receptor selective agonist is a compound of Formula I wherein Q is COOH.

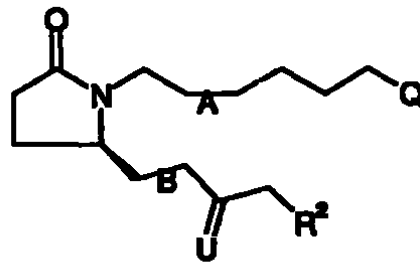
15 13. A method of claim 12 wherein said compound is 7-[2-(3-hydroxy-4-phenyl-butyl)-5-oxo-pyrrolidin-1-yl]-heptanoic acid.

14. A method of claim 12 wherein said compound is 7-[2-(3-hydroxy-4-phenyl-but-1-enyl)-5-oxo-pyrrolidin-1-yl]-heptanoic acid.

50171353.12229

ABSTRACT OF THE INVENTION

This invention is directed to methods of treating conditions which present with low bone mass, particularly osteoporosis, frailty, an osteoporotic fracture, a bone defect, childhood idiopathic bone loss, alveolar bone loss, mandibular bone loss, bone fracture, osteotomy, bone loss associated with periodontitis, or prosthetic ingrowth comprising administering prostaglandin agonists which are EP4 receptor selective prostaglandin agonists. This invention is especially directed to those methods wherein the EP4 receptor selective agonist is a compound of Formula I:



wherein the variables are as defined in the specification.

60171353.122299

**AGONISTAS SELECTIVOS DEL RECEPTOR EP4 EN EL TRATAMIENTO
DE LA OSTEOPOROSIS**

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a procedimientos y a
5 composiciones farmacéuticas que comprenden agonistas de
prostaglandina que son útiles para prevenir la pérdida ósea
o para restaurar o aumentar la masa ósea y para potenciar
la curación ósea, incluyendo el tratamiento de trastornos
que se presentan con una masa ósea reducida y/o defectos
10 óseos en vertebrados, y en particular en mamíferos,
incluyendo seres humanos. Esta invención se refiere de
forma específica a procedimientos y a composiciones
farmacéuticas que comprenden agonistas de prostaglandinas
selectivos para el receptor EP4.

15 La osteoporosis es una enfermedad esquelética
sistémica, caracterizada por una masa ósea reducida y por
el deterioro del tejido óseo, con un incremento
consiguiente de la fragilidad del hueso y susceptibilidad
a fracturas. En los Estados Unidos, el trastorno afecta a
20 más de 25 millones de personas y provoca más de 1,3
millones de fracturas cada año, que anualmente incluyen
500.000 fracturas de columna vertebral, 250.000 de cadera
y 240.000 de muñeca. Las fracturas de cadera son la
consecuencia más grave de la osteoporosis, muriendo un 5-
25 20% de pacientes en un período de un año, y quedando más

-2-

del 50% de los supervivientes físicamente impedidos.

Los ancianos son los sujetos con un mayor riesgo de osteoporosis y, por tanto, puede predecirse que el problema aumente significativamente con el envejecimiento de la población. La incidencia de fractura en todo el mundo se prevé que aumente tres veces durante los próximos 60 años, y un estudio ha estimado que en el año 2050 serán 4,5 millones las fracturas de cadera en todo el mundo.

Las mujeres tienen un mayor riesgo de osteoporosis que los varones. Las mujeres experimentan una brusca aceleración de la pérdida ósea durante los cinco años posteriores a la menopausia. Otros factores que incrementan el riesgo incluyen fumar, abuso de alcohol, un modo de vida sedentario y una ingesta baja de calcio.

Actualmente existen dos tipos principales de terapias farmacéuticas para el tratamiento de la osteoporosis. El primero es el uso de compuestos antiresorción para reducir la resorción del tejido óseo.

Los estrógenos son un ejemplo de un agente antiresorción. Es conocido que los estrógenos reducen las fracturas. Además, Black et al., en el documento EP 0605193A1 describen que los estrógenos, particularmente cuando se toman oralmente, disminuyen los niveles plasmáticos de LDL y elevan los de lipoproteínas de alta densidad (HDL) beneficiosas. Sin embargo, los estrógenos

-3-

son incapaces de restablecer el hueso hasta los niveles de adultos jóvenes en el esqueleto ya osteoporótico. Además, la terapia de estrógenos a largo plazo se ha relacionado con una serie de trastornos que incluyen un incremento en
5 el riesgo de cáncer de útero, cáncer endometrial y posiblemente cáncer de mama, provocando que muchas mujeres eviten este tratamiento. Los efectos secundarios significativos indeseables asociados a la terapia de estrógenos apoyan la necesidad de desarrollar terapias
10 alternativas para la osteoporosis que tengan el efecto deseable sobre las LDL en suero pero que no provoquen efectos indeseables.

Un segundo tipo de terapia farmacéutica para el tratamiento de la osteoporosis es el uso de agentes
15 anabólicos para promover la formación de hueso e incrementar la masa ósea. Se espera que esta clase de agentes restablezca el hueso en el esqueleto ya osteoporótico.

En los documentos de Gran Bretaña 1478281, 1479156 y
20 en las patentes de los Estados Unidos n° 4.175.203, 4.055.596, 4,175.203, 3.987.091 y 3.991.106 se describen ciertos agonistas de prostaglandinas por ser útiles como, por ejemplo, vasodilatadores renales.

La patente de los Estados Unidos n° 4.033.996 describe
25 ciertas 8-aza-9-oxo(y dioxo)-tia-11,12-secoprostaglandinas

que son útiles como vasodilatadores renales, para la prevención de la formación de trombos, para inducir la liberación de hormona del crecimiento y como reguladores de la respuesta inmune.

- 5 La patente francesa n° 897.566 describe ciertos derivados de aminoácidos para el tratamiento de enfermedades neurológicas, mentales o cardiovasculares.

J. Org. Chem. 26; 1961; 1437 describe el ácido N-acetil-N-bencil-p-aminofenilmercaptoacético.

- 10 La patente de los Estados Unidos n° 4.761.430 describe ciertos compuestos arilbencenosulfonamida como agentes para reducir los lípidos.

La patente de los Estados Unidos n° 4.443.477 describe ciertos ácidos sulfonamidofenilcarboxílicos como agentes
15 para reducir los lípidos.

La patente de los Estados Unidos n° 3.528.961 describe ciertos derivados de ε-caprolactama como colorantes.

- La patente de los Estados Unidos n° 3.780.095 describe ciertos ácidos anilínicarboxílicos acilados como
20 coleréticos.

La patente de los Estados Unidos n° 4.243.678 describe ciertos ácidos acilhidrocarbamilaminoalcanoicos por tener utilidad en el tratamiento de úlceras gástricas, como inhibidores de la excreción de las glándulas sebáceas y
25 para combatir la inflamación cutánea.

La patente de los Estados Unidos n° 4.386.031 describe ciertos ácidos N-benzoil-ω-anilinoalcanocarboxílicos como agentes antialérgicos, inhibidores de la agregación trombótica, agentes antiinflamatorios y agentes para
5 reducir los lípidos.

Además de osteoporosis, aproximadamente 20-25 millones de mujeres y un número en aumento de hombres sufren fracturas vertebrales detectables como consecuencia de una
10 masa ósea reducida, con unas 250.000 fracturas de cadera adicionales anuales descritas solamente en los Estados Unidos. El caso anterior está asociado a una tasa de mortalidad del 12% en los dos primeros años y a una tasa del 30% de pacientes que requieren cuidados asistenciales
15 a domicilio después de la fractura. Aunque esto es ya significativo, es de esperar que aumenten las consecuencias económicas y médicas de la convalecencia debida a una curación lenta o imperfecta de estas fracturas de hueso, a causa del envejecimiento de la población general.

20 Los estrógenos han demostrado (Bolander et al., 38th Annual Meeting Orthopedic Research Society, 1992) que mejoran la calidad de la curación de fracturas apendiculares. Por tanto, la terapia de sustitución de estrógenos podría ser procedimiento eficaz para el
25 tratamiento de reparación de fracturas. Sin embargo, el

cumplimiento del paciente con la terapia de estrógenos es relativamente malo debido a sus efectos secundarios, que incluyen la reaparición de la menstruación, mastodinia y un mayor riesgo de cáncer de útero, un mayor riesgo percibido de cáncer de mama, y el uso concomitante de progestinas. Además, los hombres son propensos a objetar el uso del tratamiento con estrógenos. Existe la necesidad de una terapia que sea beneficiosa para pacientes que han sufrido fracturas óseas debilitantes y que aumente el cumplimiento del paciente.

Se ha demostrado que la prostaglandina E2 (PGE2) puede restaurar el hueso en un modelo de rata ovariectomizada (OVX), un modelo de osteoporosis postmenopáusica. Ke, H.Z., et al., Bone, 23:249-255, 1998. Sin embargo, existen graves efectos secundarios asociados con la PGE2. Jee., W.S.S. and Ma, Y.F. Bone 21:297-304, 1997.

Aunque existen una serie de terapias para la osteoporosis, existe una continua necesidad y una búsqueda continua en este campo de la técnica de terapias alternativas para la osteoporosis. Por otro lado, existe una necesidad de terapias para la curación de las fracturas óseas. Además, existe una necesidad de terapias que puedan promover un nuevo crecimiento en áreas esqueléticas en las que existan defectos tales como defectos provocados o producidos por, por ejemplo, tumores en el hueso. Además,

existe una necesidad de terapias que puedan promover un nuevo crecimiento en las áreas esqueléticas en las que están indicados injertos óseos.

SUMARIO DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere a procedimientos para tratar un trastorno que presenta una masa ósea reducida en un mamífero, que comprende administrar a dicho mamífero un agonista selectivo del receptor EP4, uno de sus profármacos o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho agonista
10 selectivo del receptor EP4 o de dicho profármaco.

La invención se refiere en particular a dichos procedimientos en los que dicho trastorno es osteoporosis, fragilidad, una fractura osteoporótica, un defecto óseo, pérdida ósea idiopática de la niñez, pérdida ósea alveolar,
15 pérdida ósea mandibular, fractura ósea, osteotomía, pérdida ósea asociada a periodontitis o crecimiento interno protésico. En los procedimientos preferidos de esta invención, el agonista selectivo del receptor EP4 se administra por vía sistémica, por ejemplo, por vía oral,
20 subcutánea, intramuscular o por aerosol. En otros procedimientos preferidos de esta invención, el agonista de EP4 se administra localmente.

Los procedimientos de esta invención son especialmente útiles cuando dicho trastorno es fragilidad.

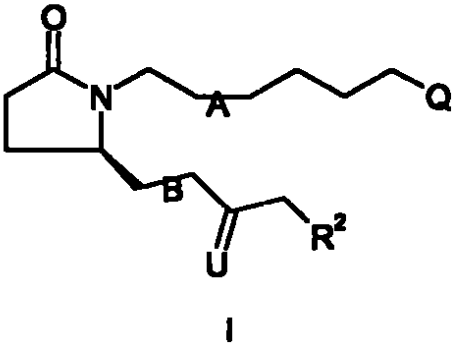
25 Los procedimientos de esta invención son especialmente

útiles cuando dicho trastorno es osteoporosis.

Los procedimientos de esta invención son especialmente útiles cuando dicho trastorno fractura ósea o fractura osteoporótica.

5 Los agonistas selectivos de EP4 preferidos para usar en los procedimientos de esta invención incluyen los compuestos de Fórmula I:

10



15 los profármacos de los mismos y las sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos o de dichos profármacos, en la que:

Q es COOR³, CONHR⁴ o tetrazol-5-ilo;

A es un enlace sencillo o cis-doble;

B es un enlace sencillo o trans-doble;

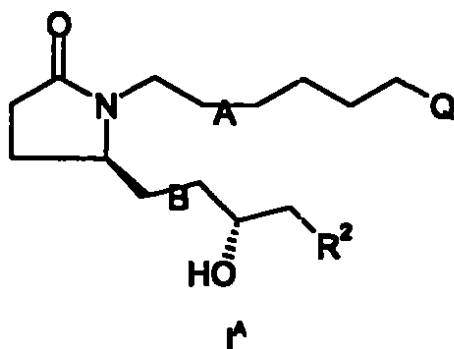
20 U es



R² es α-tienilo, fenilo, fenoxi, fenilo monosustituido y fenoxi monosustituido, siendo dichos sustituyentes cloro,

R⁵ es fenilo o alquilo C₁-C₅.

10



Los compuestos particularmente preferidos dentro de este grupo incluyen 5S-(4-3-(cloro-fenil)-3R-hidroxi-butyl)-1-(6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil-pirrolidin-2-ona; 5S-(3R-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-butyl)-1-(6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil)-pirrolidin-2-ona; 5R-(3S-hidroxi-4-fenil-but-1-enil)-1-[6-(1H-tetrazol-5-il)-hexil]-pirrolidin-2-ona; y 5S-(3R-hidroxi-4-fenil-butyl)-1-[6-(1H-

tetrazol-5-il)-hexil]-pirrolidin-2-ona.

Otro grupo preferido de agonistas selectivos del receptor EP4 de Fórmula I para usar en los procedimientos de esta invención son aquellos compuestos de Fórmula I en los que Q es COOH. Los compuestos particularmente preferidos dentro de este grupo incluyen el ácido 7-{2S-[3R-hidroxi-4-(3-fenoxi-fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico; el ácido 7-(2S-(3R-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-butil)-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico; el ácido 7-{2S-[4-(3-cloro-fenil)-3R-hidroxi-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico; el ácido 7-(2S-(3R-hidroxi-4-fenil-butil)-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico; y el ácido 7-[2R-(3S-hidroxi-4-fenil-but-1-enil)-5-oxo-pirrolidin-1-il]-heptanoico.

Preferiblemente, se tratan mujeres postmenopáusicas y hombres mayores de 60 años. También se prefieren individuos, independientemente de su edad, que tienen una masa ósea significativamente reducida, es decir, una desviación típica mayor o igual a 1,5 desviaciones estándares por debajo de los niveles de jóvenes normales.

En los procedimientos de esta invención, los trastornos que presentan una masa ósea reducida incluyen trastornos tales como, por ejemplo, osteoporosis, pérdida ósea idiopática de la infancia, pérdida ósea alveolar, pérdida ósea mandibular, fractura ósea, osteotomía, pérdida

-11-

ósea asociada a periodontitis y crecimiento interno protésico.

También se incluyen procedimientos para tratar la "osteoporosis secundaria", dentro de los procedimientos de esta invención. "Osteoporosis secundaria" incluye osteoporosis inducida por glucocorticoides, osteoporosis inducida por hipertiroidismo, osteoporosis inducida por inmovilización, osteoporosis inducida por heparina u osteoporosis inducida por inmunosupresores en un vertebrado, por ejemplo un mamífero (incluyendo a un ser humano). Estos procedimientos se llevan a cabo administrando a dicho vertebrado, por ejemplo un mamífero, una cantidad para tratar la "osteoporosis secundaria" de un agonista de prostaglandina selectivo para el receptor EP4, uno de sus profármacos o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho agonista de prostaglandina selectivo para el receptor EP4 o de dicho profármaco.

Otro aspecto adicional de la presente invención se refiere a procedimientos para reforzar un injerto óseo, inducir sinóstosis vertebral, potenciar la extensión de los huesos largos, potenciar la curación ósea después de una reconstrucción facial, una reconstrucción maxilar y/o una reconstrucción mandibular en un vertebrado, por ejemplo un mamífero, (incluyendo a un ser humano) que comprende administrar a dicho vertebrado, por ejemplo un mamífero que

se somete a reconstrucción maxilar, a reconstrucción facial o a reconstrucción mandibular, una cantidad potenciadora del hueso de un agonista de prostaglandina selectivo para el receptor EP4, uno de sus profármacos, o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho agonista de prostaglandina selectivo para el receptor EP4 o de dicho profármaco. Los agonistas de prostaglandina selectivos para el receptor EP4 de esta invención se pueden aplicar de forma local en el lugar de la reconstrucción ósea o se pueden administrar por vía sistémica.

Una dosis preferida varía de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg/kg/día de un agonista selectivo del receptor EP4, de uno de sus profármacos o de una sal farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto o de dicho profármaco. Una dosis especialmente preferida varía de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg/día de un agonista selectivo del receptor EP4, de uno de sus profármacos o de una sal farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto o de dicho profármaco.

La frase "trastorno(s) que presenta(n) una masa ósea reducida" se refiere a un trastorno en el que el nivel de masa ósea es inferior al normal específico para la edad, como se define en las normas de la Organización Mundial de la Salud "Assessment of Fracture Risk and its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis (1994). Report

of a World Health Organization Study Group. World Health Organization Technical Series 843". En "trastorno(s) que presenta(n) una masa ósea reducida" se encuentra incluida la osteoporosis primaria y secundaria, tal y como se han
5 descrito antes. Además, se incluye enfermedad periodontal, pérdida ósea alveolar, pérdida ósea por osteotomía y pérdida ósea idiopática de la infancia. La frase "trastorno(s) que presenta(n) una masa ósea reducida" también incluye las complicaciones a largo plazo de la
10 osteoporosis como curvatura de la columna vertebral, pérdida de peso y cirugía protésica.

La frase "trastorno(s) que presenta(n) una masa ósea reducida" se refiere también a un vertebrado, por ejemplo un mamífero, conocido por tener una posibilidad
15 significativamente mayor que la media de desarrollar las enfermedades que se describen anteriormente, incluyendo osteoporosis (por ejemplo, mujeres postmenopáusicas, hombres mayores de 50 años). Otros usos que aumenten o potencien la masa ósea incluyen la restauración ósea,
20 incrementar la velocidad de curación de fracturas óseas, reemplazar la cirugía de injertos óseos totalmente, potenciar el índice de éxitos de los injertos óseos, la curación ósea después de una reconstrucción facial o una reconstrucción maxilar o una reconstrucción mandibular, el
25 crecimiento interno protésico, la sinóstosis vertebral o la

97
8

-14-

extensión de huesos largos.

Los procedimientos de esta invención también pueden usarse combinados con dispositivos ortopédicos como estructuras de fusión espinal, equipo de fusión espinal, 5 dispositivos de fijación ósea internos y externos, tornillos y clavos.

Los expertos en la técnica reconocerán que el término masa ósea se refiere realmente a la masa ósea por unidad de superficie, que en algunas ocasiones (aunque no de forma 10 estrictamente correcta) se denomina densidad mineral del hueso.

El término "tratar", "trato" o "tratamiento", tal como se usa en la presente, incluye el tratamiento preventivo (por ejemplo, profiláctico) y paliativo y curativo.

15 El término "farmacéuticamente aceptable" significa que el portador, vehículo, diluyente, excipientes y/o sal deben ser compatibles con el resto de ingredientes de la formulación, y no perjudicar al receptor de las mismas.

La expresión "profármacos" se refiere a compuestos que 20 son precursores farmacológicos que, después de la administración, liberan el fármaco *in vivo* a través de un procedimiento químico o fisiológico (por ejemplo, un profármaco que se lleva al pH fisiológico o por medio de la acción de una enzima se convierte en la forma farmacológica 25 deseada). Los profármacos ejemplo liberan tras el corte el

compuesto farmacológico activo correspondiente.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales aniónicas no tóxicas que contienen aniones tales como (pero no limitados a ellos) cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, bisulfato, fosfato, acetato, maleato, fumarato, oxalato, lactato, tartrato, citrato, gluconato, metanosulfonato y 4-toluenosulfonato. La expresión se refiere también a sales catiónicas no tóxicas tales como (pero no limitadas a ellas) sales de sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio o benzetina protonada (N,N'-dibenciletilendiamina), colina, etanolamina, dietanolamina, etilendiamina, meglamina (N-metil-glucamina), benetamina (N-bencilfenetilamina), piperazina o trometamina (2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol).

Los procedimientos de la presente invención dan lugar a la formación de hueso, dando lugar a una disminución del número de fracturas. Esta invención aporta una contribución significativa a la técnica proporcionando procedimientos que aumentan la formación de hueso, dando como resultado la prevención, retraso y/o inversión de la osteoporosis y de los trastornos óseos relacionados.

Esta invención se refiere también a compuestos seleccionados de ácido 7-{2S-[3R-hidroxi-4-(3-fenoxifenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico; 5S-(4-(3-(cloro-fenil)-3R-hidroxi-butil)-1-(6-(2H-tetrazol-5-il)-

hexil-pirrolidin-2-ona; ácido 7-(2S-(3R-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-butil)-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico; ácido 7-{2S-[4-(3-cloro-fenil)-3R-hidroxi-butyl]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico; y 5S-(3R-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-butil)-1-(6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil)-pirrolidin-2-ona.

Esta invención se refiere también particularmente al ácido 7-{2S-[3R-hidroxi-4-(3-fenoxi-fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico.

10 Esta invención se refiere también particularmente a 5S-(4-(3-(cloro-fenil)-3R-hidroxi-butyl)-1-(6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil)-pirrolidin-2-ona.

Esta invención se refiere también particularmente al ácido 7-(2S-(3R-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-butil)-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico.

15 Esta invención se refiere también particularmente al ácido 7-{2S-[4-(3-cloro-fenil)-3R-hidroxi-butyl]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico.

Esta invención se refiere también particularmente a 5S-(3R-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-butil)-1-(6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil)-pirrolidin-2-ona.

A partir de la memoria descriptiva y las reivindicaciones que describen la invención serán evidentes otras características y ventajas.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

100
L

Como agonista selectivo del receptor EP4 de esta invención se puede usar cualquier agonista selectivo del receptor EP4. Los agonistas selectivos de EP4 son compuestos que tienen una IC50 en el receptor EP1, EP2 y 5 EP3 que es al menos 10 veces mayor que la IC50 en el subtipo de receptor EP4. Por ejemplo, el ácido 7-(2-(3-hidroxi-4-fenil-butil)-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico es un agonista de PGE2 selectivo para el receptor EP4 con una IC50 de unión al receptor EP4 de 16 nM. En todos los demás 10 subtipos de receptor EP, incluyendo los subtipos de receptor EP1, EP2 y EP3, la IC50 para el ácido 7-(2-(3-hidroxi-4-fenil-butil)-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico es mayor de 3200 nM.

Los compuestos de Fórmula I se pueden preparar como se 15 describe en el documento de los Estados Unidos 4.177.346, de cesión común y que se incorpora en la presente como referencia.

Todos los agonistas selectivos del receptor EP4 usados en los procedimientos de esta invención están adaptados al 20 uso terapéutico como agentes que estimulan la formación ósea y aumentan la masa ósea en vertebrados, por ejemplo mamíferos y en particular en seres humanos. Puesto que la formación ósea está muy relacionada con el desarrollo de osteoporosis y trastornos relacionados con los huesos, los 25 agonistas usados en los procedimientos de esta invención,

-18-

en virtud de su acción ósea, previenen, detienen y/o invierten la osteoporosis.

La utilidad de los agonistas selectivos de EP4 usados en los procedimientos de la presente invención como agentes medicinales en el tratamiento de trastornos que presentan una masa ósea reducida (por ejemplo, osteoporosis) en vertebrados, por ejemplo mamíferos (por ejemplo, seres humanos, particularmente en la mujer) se demuestra por la actividad de estos agonistas en ensayos convencionales, incluyendo un ensayo de unión al receptor, un ensayo de AMP cíclico, un ensayo *in vivo* y el ensayo de curación de la fractura, todos los cuales se describen más adelante. Tales ensayos proporcionan también un medio mediante el cual comparar las actividades de los agonistas selectivos de EP4 entre sí y con las actividades de otros compuestos y composiciones conocidos. Los resultados de estas comparaciones son útiles para determinar los niveles de dosificación en vertebrados, por ejemplo mamíferos, incluyendo seres humanos, para el tratamiento de tales enfermedades.

Ensayo *in vivo*

La actividad de los agentes anabólicos óseos en la estimulación de la formación ósea y el aumento de la masa ósea se puede comprobar en ratas intactas macho o hembra, o ratas macho (orquidectomizadas) o hembra

-19-

(ovariectomizadas) deficientes en hormonas sexuales.

Se pueden utilizar en el estudio ratas macho o hembra de diferentes edades (tal como de tres meses de edad). Las ratas pueden estar intactas o bien castradas
5 (ovariectomizadas u orquidectomizadas), y se inyectan subcutáneamente o se dosifican por sonda nasogástrica con agonistas de prostaglandina en diferentes dosis (tal como 1, 3 6 10 mg/kg/día) durante 30 días. En las ratas castradas, el tratamiento se comienza en el día posterior
10 a la cirugía (con el propósito de prevenir la pérdida ósea) o en el momento en el que ya se ha producido la pérdida ósea (con el propósito de recuperar la masa ósea). Durante el estudio, se permite el libre acceso de todas las ratas a agua y una dieta comercial en gránulos (Teklad Rodent
15 Diet N° 8064, Harlan Teklad, Madison, WI) que contiene 1,46% de calcio, 0,99% de fósforo y 4,96 UI/g de Vitamina D₃. Todas las ratas reciben inyecciones subcutáneas de 10 mg/kg de calceína en los días 12 y 2 antes del sacrificio. Se sacrifican las ratas. Se determinan los siguientes
20 parámetros:

Medidas minerales en el hueso femoral:

Se extirpa el fémur derecho de cada rata en autopsia y se explora utilizando absorciometría de rayos X de doble haz (DXA, QDR 1000/W, Hologic Inc., Waltham, MA) equipado
25 con el programa informático "Regional High Resolution Scan"

(Hologic Inc., Waltham, MA). El tamaño del campo de exploración es de 5,08 x 1,902 cm, la resolución es de 0,0254 x 0,0127 cm y la velocidad de exploración es de 7,25 mm/seg. Se analizan las imágenes de la exploración femoral y se determina el área ósea, contenido mineral óseo (BMC) y densidad mineral ósea (BMD) del fémur completo (WF), metáfisis femoral distal (DFM), diáfisis femoral (FS) y fémur proximal (PF).

Análisis histomorfométrico del hueso tibial:

10 Se extirpa la tibia derecha en la autopsia, se disecciona todo el músculo y se corta en tres partes. Se fijan la tibia proximal y la diáfisis tibial en etanol al 70%, se deshidrata en concentraciones graduadas de etanol, se desengrasa en acetona y después se introduce en
 15 metacrilato de metilo (Eastman Organic Chemicals, Rochester, NY).

Se cortan las secciones frontales de la metáfisis tibial proximal con un espesor de 4 y 10 μ m, utilizando un microtomo Reichert-Jung Polycut 8. Las secciones de 4 μ m se
 20 tiñen con tinte modificado Trichrome de Masson, mientras que las secciones de 10 μ m permanecen sin teñir. Se utilizan una sección de 4 μ m y una de 10 μ m de cada rata para histomorfometría de hueso canceloso.

Se cortan las secciones transversales de la diáfisis
 25 tibial de 10 μ m de espesor utilizando un microtomo

104 701

Reichert-Jung Polycut 8. Estas secciones se utilizan para análisis histomorfométrico del hueso cortical.

Histomorfometría de hueso canceloso: Se utiliza un sistema de histomorfometría Bioquant OS/2 (R&M Biometrics, Inc., Nashville, TN) para las medidas histomorfométricas estáticas y dinámicas de la parte esponjosa secundaria de la metáfisis tibial proximal entre 1,2 y 3,6 mm distal a la unión de crecimiento placa-epifiseal. Los primeros 1,2 mm de la región metafiseal tibial necesitan ser omitidos para limitar las medidas a la parte esponjosa secundaria. Se utilizan las secciones de 4 μ m para determinar los índices relacionados con el volumen óseo, estructura ósea y resorción ósea, mientras que las secciones de 10 mm se utilizan para determinar los índices relacionados con la formación y regeneración del hueso.

I) Medidas y cálculos relacionados con el volumen y estructura óseo trabecular: (1) Área total metafiseal (TV, mm^2): Área metafiseal entre 1,2 y 3,6 mm distal a la unión placa-epifiseal de crecimiento. (2) Área ósea trabecular (BV, mm^2): Área total de trabécula en TV. (3) Perímetro óseo trabecular (BS, mm): La longitud del perímetro total de la trabécula. (4) Volumen óseo trabecular (BV/TV, %): $\text{BV/TV} \times 100$. (5) Número óseo trabecular (TBN, N°/mm): $1,199/2 \times \text{BS/TV}$. (6) Espesor óseo trabecular (TBT, μm): $(2.000/1,199) \times (\text{BV/BS})$. (7) Separación ósea trabecular

(TBS, μm): $(2.000 \times 1,199) \times (\text{TV}-\text{BV})$.

II) Medidas y cálculos relacionados con la resorción

ósea: (1) Número de osteoclastos (OCN, N°): N° total de osteoclastos en el área metafiseal total. (2) Perímetro de osteoclasto (OCP mm): longitud del perímetro trabecular cubierto por osteoclastos. (3) N°/mm de osteoclastos (OCN/mm, N°/mm): OCN/BS. (4) Perímetro porcentual cubierto por osteoclastos (%OCP, %): $\text{OCP}/\text{BS} \times 100$.

III) Medidas y cálculos relacionados con la

regeneración y formación ósea: (1) Perímetro con una marca de calceína (SLS, mm): longitud total del perímetro trabecular con una marca de calceína. (2) Perímetro con dos marcas de calceína (DLS, mm): Longitud total del perímetro trabecular con dos marcas de calceína. (3) Anchura entre marcas (ILW, μm): Distancia promedio entre dos marcas de calceína. (4) Perímetro porcentual de mineralización (PMS, %): $(\text{SLS}/2 + \text{DLS})/\text{BS} \times 100$. (5) Velocidad de depósito mineral (MAR, $\mu\text{m}/\text{día}$): $\text{ILW}/\text{intervalo entre marcas}$. (6) Velocidad de formación de hueso/superficie de ref. (BFR/BS, $\mu\text{m}^2/\text{d}/\mu\text{m}$): $(\text{SLS}/2 + \text{DLS}) \times \text{MAR} / \text{BS}$. (7) Velocidad de regeneración ósea (BTR, %/y): $(\text{SLS}/2 + \text{DLS}) \times \text{MAR} / \text{BV} \times 100$.

Histomorfometría cortical ósea: Se utiliza un sistema histomorfométrico Bioquant OS/2 (R&M Biometrics, Inc., Nashville, TN) para las medidas histomorfométricas

estáticas y dinámicas de la diáfisis tibial en las medidas del hueso cortical en la diáfisis tibial. Se mide el área tisular total, área de la cavidad de la médula, perímetro periosteal, perímetro endocortical, perímetro con una
 5 marca, perímetro con dos marcas y anchura entre marcas en ambas superficies periosteales y endocorticales, y se calculan el área ósea cortical (área tisular total - área de cavidad de la médula), área porcentual cortical ósea (área cortical/área del tejido total x 100), área
 10 porcentual de médula (área de cavidad de la médula/área del tejido total x 100), perímetro porcentual periosteal y endocortical marcado $[(\text{perímetro con una marca}/2 + \text{perímetro con 2 marcas})/\text{perímetro total} \times 100]$ velocidad de depósito mineral (anchura entre marcas/intervalos) y
 15 velocidad de formación de hueso $[\text{velocidad de depósito mineral} \times [(\text{perímetro con una marca}/2 + \text{perímetro con dos marcas})/\text{perímetro total}]]$.

Estadísticas

Se pueden calcular los datos estadísticos utilizando
 20 paquetes Stat View 4.0 (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA). Se utiliza la prueba de análisis de varianza (ANOVA) seguida de PLSD de Fisher (Stat View, Abacus Concepts Inc., 1918 Bonita Ave, Berkeley, CA 94704-1014) para comparar las diferencias entre grupos.

25 Determinación de la elevación del CAMP en líneas de

107
59
1871

células 293-S que sobreexpresan de forma estable los
receptores humanos recombinantes EP₄

Los cDNA, que representan los marcos de lectura
abierta completa de los receptores humanos EP₄, se generan
5 por reacción en cadena con polimerasa de la transcriptasa
inversa utilizando cebadores oligonucleótidos basados en
secuencias publicadas (1) y RNA de células de pulmón humano
primarias (EP₄) como moldes. El cDNA se clona en el sitio
de clonación múltiple de pCDNA3 (Invitrogen Corporation,
10 3985B Sorrento Valley Blvd., San Diego, CA 92121) y se usa
para transfectar células de riñón de embrión humano 293-S
por la vía de coprecipitación con fosfato de calcio. Las
colonias resistentes a G418 se expanden y se analizan las
uniones específicas [³H]PGE₂. Las células transfectadas que
15 muestran niveles altos de uniones específicas a [³H]PGE₂ se
caracterizan adicionalmente mediante análisis de Scatchard
para determinar B_{max} y K_ds para PGE₂. Las líneas
seleccionadas para el rastreo de compuestos tienen
aproximadamente 256.400 receptores por célula y un K_d = 2,9
20 nM para PGE₂ (EP₄). La expresión constitutiva del receptor
en las células madre 293-S es insignificante. Las células
se mantienen en RPMI suplementado con suero bovino fetal
(10% final) y G418 (700 ug/ml final).

Las respuestas de cAMP en las líneas 293-S/EP₄ se
25 determinan por separación de células de los matraces de

108
911

-25-

cultivo en 1 ml de PBS deficiente en Ca^{++} y Mg^{++} por agitación vigorosa, añadiendo RPMI exento de suero hasta una concentración final de 1×10^6 células/ml y añadiendo 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) hasta una concentración
5 final de 1 mM. Se toman inmediatamente alícuotas de 1 ml de la suspensión de células en tubos de microcentrífuga con tapón de rosca de 2 ml y se incuban durante 10 minutos, destapados, a 37°C , con una humedad relativa del 95% y 5% de CO_2 . El compuesto a analizar se añade a las células en
10 diluciones 1:100 de forma que las concentraciones finales de DMSO o etanol sean del 1%. Inmediatamente después de añadir el compuesto, se tapan los tubos, se mezclan invirtiéndolos 2 veces y se incuban a 37° durante 12 minutos. Las muestras son entonces lisadas por incubación
15 a 100°C durante 10 minutos e inmediatamente enfriadas sobre hielo durante 5 minutos. Los restos celulares se sedimentan por centrifugación a 1.000 g durante 5 minutos, y los lisados aclarados se transfieren a tubos limpios. Las concentraciones de cAMP se determinan utilizando un estuche
20 de radioinmunoensayo de cAMP disponible comercialmente (NEK-033, DuPont/NEN Research Products, 549 Albany St., Boston, MA 02118) después de diluir los lisados aclarados 1:10 en solución tampón de análisis cAMP RIA (incluida en el estuche). Normalmente, se tratan las células con 6 a 8
25 concentraciones del compuesto a analizar en incrementos

logarítmicos. Los cálculos de EC50 se realizan mediante una calculadora utilizando análisis de regresión lineal en la porción lineal de las curvas de respuesta a la dosis.

Referencias

- 5 1. Regan, J.W. Bailey, T.J. Pepperl, D.J. Pierce, K.L. Bogardus, A.M. Donello, J.E. Fairbairn, C.E. Kedzie, K.M. Woodward, D.F. y Gil, D.W. 1994 Cloning of a Novel Human Prostaglandin Receptor with Characteristics of the Pharmacologically Defined EP₂ Subtype. Mol. Pharmacology
10 46:213-220.

Ensayo de la unión a los receptores E₂ de las prostaglandinas

Preparación de la membrana: Todas las preparaciones se realizan a 4°C. Las células transfectadas que expresan
15 receptores tipo 1 de prostaglandina E₂ (EP₁), tipo 2 (EP₂), tipo 3 (EP₃) o tipo 4 (EP₄) se recogen y suspenden hasta 2 millones de células por ml en solución tampón A [Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM, péptido Pefabloc 1 mM, (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN), péptido
20 Phosporamidon 10 uM (Sigma, St. Luis, MO), péptido Pepstatina A 1 uM (Sigma, St. Luis, MO), péptido Elastatinal 10 uM (Sigma, St. Luis, MO), péptido Antipaina 100 uM (Sigma, St. Luis, MO)]. Las células se lisan por sonicación con un sonicador Branson (modelo N° 250, Branson
25 Ultrasonics Corporation, Danbury, CT) en dos impactos de 15

segundos. Se eliminan las células no lisadas y los restos por centrifugación a 100 g durante 10 minutos. Las membranas se recogen entonces por centrifugación a 45.000 g durante 30 minutos. Las membranas sedimentadas se resuspenden hasta una concentración de 3 a 10 mg de proteína por ml, determinándose la concentración de proteína por el procedimiento de Bradford [Bradford, M., Anal. Biochem., 72, 248 (1976)]. Las membranas resuspendidas se conservan congeladas a -80°C hasta su uso.

10 Ensayo de unión: Las membranas congeladas preparadas de la forma descrita anteriormente son descongeladas y diluidas hasta 0,5 mg/ml (para EP2 de rata) o 0,3 mg/ml (para EP4 de rata) en solución tampón A. Se combina un volumen de preparación de membrana con 0,05 volúmenes del
15 compuesto de prueba o solución tampón y un volumen de ³H-prostaglandina E₂ 3 nM (N° TRK 431, Amersham, Arlington Heights, IL) en solución tampón A. La mezcla (volumen total 205 µl) se incuba durante una hora a 25°C. Las membranas se recuperan entonces por filtración en filtros de fibra de
20 vidrio del tipo GF/C (N° 1205-401, Wallac, Gaithersburg, MD) utilizando un recolector Tomtec (modelo Mach II/96, Tomtec, Orange, CT). Las membranas con unión ³H-prostaglandina E₂ quedan retenidas en el filtro, mientras que la solución tampón y la ³H-prostaglandina E₂ no unida
25 pasa por el filtro y se desecha. Cada una de las muestras

-28-

se lava entonces tres veces con 3 ml de [Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM]. Los filtros se secan entonces mediante calentamiento en un horno de microondas. Para determinar la cantidad de ³H-prostaglandina unida a
5 las membranas, se colocan los filtros secos en bolsas de plástico con líquido de centelleo y se hace el recuento en un lector LKB 1205 Betaplate (Wallac, Gaithersburg, MD). Las IC₅₀ se determinan a partir de la concentración del compuesto de ensayo necesaria para desplazar el 50% del
10 enlace específico ³H-prostaglandina E₁.

Las células 293S que expresan los receptores E₁ de las prostaglandinas EP₂ o EP₄ se generan conforme a procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica. De forma típica, se preparan cebadores PCR
15 (reacción en cadena con polimerasa), que corresponden a los extremos terminales 5' y 3' del receptor de longitud total publicado, conforme a procedimientos bien conocidos descritos anteriormente y se usan en una reacción RT-PCR usando el RNA total de riñón de rata para los receptores
20 EP₂ y EP₄.

La secuencia de codificación de longitud completa para el receptor EP₂ de rata se prepara como se describe en Nemoto et al., Prostaglandins, 1997, 54, 713-725. La secuencia de codificación de longitud completa para el
25 receptor EP₄ de rata se prepara como se describe en Sando

et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1994, 200, 1329-1333. Estos receptores de longitud completa se usan para preparar las células 293S que expresan los receptores EP2 y EP4.

La secuencia de codificación de longitud completa para el receptor EP1 se prepara como se describe en Funk et al., Journal of Biological Chemistry, 1993, 268, 26767-26772. La secuencia de codificación de longitud completa para el receptor EP2 se prepara como se describe en Regan et al., Molecular Pharmacology, 1994, 46, 213-220. La secuencia de codificación de longitud completa para el receptor EP3 se prepara como se describe en Regan et al., British Journal of Pharmacology, 1994, 112, 377-385. La secuencia de codificación de longitud completa para el receptor EP4 se prepara como se describe en Bastien, Journal of Biological Chemistry, 1994, 269, 11873-11877. Estos receptores de longitud completa se usan para preparar las células 293S que expresan los receptores EP₁, EP₂, EP₃ y EP₄.

Las células 293S que expresan cualquiera de los receptores E₂ de prostaglandina EP₁, EP₂, EP₃ y EP₄ humanos se generan conforme a procedimientos conocidos por los expertos en la materia. De forma típica, se preparan los cebadores por PCR (reacción en cadena con polimerasa), que corresponden a los extremos 5' y 3' del receptor de longitud completa publicados, conforme a procedimientos bien conocidos descritos antes y se usan en una reacción en

cadena con polimerasa y transcriptasa inversa (RT-PCR) usando un RNA total de riñón humano (para EP₁), de pulmón humano (para EP₂), de pulmón humano (para EP₃) o de linfocitos humanos (para EP₄) como fuente. Los productos de
5 PCR se clonan por el procedimiento TA con un saliente en pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se confirma la identidad del receptor clonado por secuenciación de DNA.

Las células 293S (Mayo, Dept. of Biochemistry, Northwestern Univ.) se transfectan con el receptor clonado
10 en pcDNA3 por electroporación. Se establecen líneas de células estables que expresan el receptor después de seleccionar las células transfectadas con G418.

Las línea de células clonadas que expresan el número máximo de receptores se eligen después de un ensayo de
15 unión a ³H-PGE₂ de células completas usando PGE₂ no marcada como competidor.

ENSAYOS DE CURACIÓN DE FRACTURAS

ENSAYO DE LOS EFECTOS SOBRE LA CURACIÓN DE FRACTURAS

DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA

20 Técnica de fractura: Se anestesian ratas Sprague-Dawley de 3 meses de edad con Ketamina. Se hace una incisión de 1 cm en la cara anteromedial de la parte proximal de la tibia o fémur derechos. A continuación se describe la técnica quirúrgica tibial. La incisión se
25 realiza hasta alcanzar el hueso, y se perfora un orificio

de 1 mm, 4 mm proximal a la cara distal de la tuberosidad tibial, 2 mm medial al surco anterior. Se introducen agujas intramedulares mediante un tubo de acero inoxidable de 0,8 mm (carga máxima 36,3 N, rigidez máxima 61,8 N/mm, 5 comprobado bajo las mismas condiciones que los huesos). No se ensancha el canal medular. Se produce una fractura normalizada cerrada 2 mm por encima de la unión tibiofibular mediante curvatura en tres puntos utilizando fórceps ajustable, especialmente diseñado con mordazas 10 romas. Para minimizar el daño al tejido blando, se debe tener precaución para no desplazar la fractura. La piel se cierra con suturas monofilamento de nylon. La operación se realiza bajo condiciones estériles. Se toman radiografías de todas las fracturas inmediatamente después de la 15 inserción de las agujas, y las ratas con fracturas fuera del área diafiseal especificada o con agujas desplazadas, se excluyen. El resto de los animales se dividen aleatoriamente en los siguientes grupos con 10 a 12 animales por subgrupo para comprobar la curación de las 20 fracturas. El primer grupo recibe administraciones por sonda nasogástrica diarias de vehículo (agua: 100% Etanol = 95:5) en un 1 ml/rata, mientras que los otros reciben administración diaria por sonda nasogástrica de 0,01 a 100 mg/kg/día del compuesto a analizar (1 ml/rata) durante 10, 25 20, 40 y 80 días.

115
#

En los días 10, 20, 40 y 80, se anestesiaron 10 a 12 ratas de cada grupo con Ketamina y se sacrificaron por extracción sanguínea. Se extirpan ambos huesos tibiofibulares por disección y se elimina todo el tejido blando. Se conservaron los huesos de 5 a 6 ratas de cada grupo en etanol al 70% para análisis histológicos y los huesos de otras 5 a 6 ratas de cada grupo se conservaron en solución Ringer tamponada (+4°C, pH 7,4) para las radiografías y pruebas biomecánicas que se realizaron.

- 10 Análisis histológico: Los procedimientos para análisis histológico del hueso fracturado se han publicado previamente por Mosekilde y Bak (The Effects of Growth Hormone on Fracture Healing in Rats: A histological Description. Bone, 14:19-27, 1993). Explicado brevemente,
- 15 el lugar de la fractura se aserra 8 mm a cada lado de la línea de la fractura, se introduce descalcificado en metacrilato de metilo, y se cortan las secciones frontales con un microtomo Reichert-Jung Polycut con un espesor de 8 µm. Las secciones medianas frontales teñidas con Masson-
- 20 Trichrome (incluyendo ambas tibias y fémurs) se utilizan para la visualización de la respuesta celular y tisular a la curación de la fractura con y sin tratamiento. Las secciones teñidas de rojo Sirius se utilizan para demostrar las características de la estructura callosa y para
- 25 diferenciar entre el hueso entrelazado y el lamelar en el

lugar de la fractura. Se realizan las siguientes medidas:

- (1) espacio de fractura - medido como la distancia más corta entre los extremos corticales del hueso en la fractura, (2) longitud y diámetro del callo, (3) área del volumen total óseo del callo, (4) tejido de hueso por área de tejido dentro del área callosa, (5) tejido fibroso en el callo, (6) área de cartílago en el callo.

Análisis biomecánico: Los procedimientos de análisis biomecánico se han publicado previamente por Bak y Andreassen (The Effects of Aging on Fracture Healing in Rats. Calcif Tissue Int 45:292-97, 1989). Explicado en forma resumida, se toman radiografías de todas las fracturas antes del ensayo biomecánico. Se analizan las propiedades mecánicas de las fracturas soldadas mediante un procedimiento destructivo de curvatura en tres o cuatro puntos. Se determina la carga máxima, rigidez, energía en carga máxima, desviación en la carga máxima y la tensión máxima.

ENSAYO DE LOS EFECTOS SOBRE LA CURACIÓN DE FRACTURAS

DESPUÉS DE ADMINISTRACIÓN LOCAL

Técnica de fractura: Se utilizan en este estudio perros Beagle macho o hembra de aproximadamente 2 años de edad bajo anestesia. Se producen fracturas radiales transversales por carga lenta continua doblándolo en tres puntos, tal como describen Lenehan et al (Lenehan, T.M.;

17
9
7

Balligand, M.; Nunamaker, D.M.; Wood, F.E.: Effects of EHDP on Fracture Healing in Dogs. J. Orthop Res 3:499-507; 1985). Se arrastra el hilo a través del lugar de la fractura para asegurar la interrupción anatómica completa del hueso. Después, se consigue la liberación local de agonistas de prostaglandina en el lugar de la fractura mediante liberación lenta del compuesto suministrado por gránulos de liberación lenta o por la administración de los compuestos en una formulación adecuada como una solución o suspensión de gel en pasta durante 10, 15 o 20 semanas.

Análisis histológico: Los procedimientos de análisis histológico de huesos fracturados se han publicado anteriormente por Peter et al (Peter, C.P.; Cook, W.O.; Nunamaker, D.M.; Provost, M.T.; Sedor, J.G.; Rodan, G.A. Effects of alendronate on fracture healing and bone remodeling in dogs. J. Orthop. Res. 14:74-70, 1996) y Mosekilde y Bak (The Effects of Growth Hormone on Fracture Healing in Rats: A Histological Description. Bone, 14:19-27, 1993). Explicado brevemente, después del sacrificio, se aserra el lugar de la fractura 3 cm a cada lado de la línea de la fractura, se introduce una vez descalcificado en metacrilato de metilo y se corta con un microtomo Reichert-Jung Polycut en secciones frontales de 8 μ m de espesor. Se utilizan las secciones teñidas con Masson-Trichrome de la parte media frontal (incluyendo la tibia y la fíbula) para

la visualización de la respuesta celular y tisular a la curación de la fractura con y sin tratamiento. Se utilizan las secciones teñidas con rojo Sirius para demostrar las características de la estructura del callo y para
5 diferenciar entre el hueso entrelazado y el lamelar en el lugar de la fractura. Se realizan las siguientes medidas:
(1) espacio de fractura - medido como la distancia más corta entre los extremos corticales del hueso en la fractura, (2) longitud y diámetro del callo, (3) área del
10 volumen de hueso total del callo, (4) tejido de hueso por área de tejido dentro del área del callo, (5) tejido fibroso en el callo, (6) área de cartílago en el callo.

Análisis biomecánico: Los procedimientos de análisis biomecánico se han publicado previamente por Bak y
15 Andreassen (The Effects of Aging on Fracture Healing in Rats. Calcif Tissue Int 45:292-297, 1989) y Peter et al. (Peter, C.P.; Cook, W.O.; Nunamaker, D.M.; Provost, M.T.; Seedor, J.G.; Rodan, G.A. Effects of Alendronate On Fracture Healing And Bone Remodeling In Dogs. J. Orthop.
20 Res. 14:74-70, 1996). Explicado brevemente, se toman radiografías de todas las fracturas antes de los ensayos biomecánicos. Se analizan las propiedades mecánicas de las fracturas en curación por un procedimiento destructivo de curvatura en tres o cuatro puntos. Se determina la carga
25 total, rigidez, energía en carga máxima, desviación en

carga máxima y tensión máxima.

La administración de agonistas selectivos del receptor EP4 conforme a los procedimientos de esta invención se puede realizar por cualquier modo que libere el agonista selectivo del receptor EP4 por vía sistémica y/o local (por ejemplo, en el lugar de la fractura ósea, osteotomía o cirugía ortopédica). Estos procedimientos incluyen las vías oral, parenteral, intraduodenal y similares. Por lo general, los compuestos de esta invención se administran oralmente, pero se puede utilizar la administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular, transdérmica, subcutánea, rectal o intramedular), por ejemplo, cuando la administración oral sea inadecuada para el objeto deseado o cuando el paciente sea incapaz de ingerir el fármaco.

Los procedimientos de esta invención se utilizan para el tratamiento y promoción de la curación de las fracturas óseas y osteotomías por aplicación local (por ejemplo, en los lugares de fracturas óseas u osteotomías) de los agonistas selectivos del receptor EP4. Los agonistas selectivos del receptor EP4 de esta invención se aplican a los lugares de fractura ósea u osteotomía, por ejemplo, por inyección del compuesto en un disolvente adecuado (por ejemplo, un disolvente oleoso tal como aceite de cacahuete) en la placa de crecimiento del cartílago o, en casos de

cirugía abierta, por aplicación local de tales compuestos en un vehículo, portador o diluyente adecuado tal como cera para hueso, polvo de hueso desmineralizado, cementos óseos poliméricos, selladores de hueso, etc. Como alternativa, se
5 puede conseguir la aplicación local aplicando una solución o dispersión del compuesto en un portador o diluyente adecuado sobre su superficie, o incorporándolo en un implante sólido o semisólido usado convencionalmente en cirugía ortopédica, tal como malla de dacron, espumas de
10 gel y hueso Kiel o prótesis.

En cualquier caso, la cantidad y frecuencia de los compuestos administrados dependerá, por supuesto, del sujeto que se está tratando, de la gravedad de la enfermedad, de la forma de administración y del juicio del
15 médico prescriptor. Así, debido a la variabilidad entre pacientes, las dosificaciones proporcionadas en la presente son una guía y el médico puede valorar la dosis del fármaco para conseguir el tratamiento (por ejemplo, aumento de la masa ósea) que el médico considere adecuada para el
20 paciente. Al considerar el grado de tratamiento deseado, el médico debe valorar varios factores, tales como el nivel inicial de masa ósea, la edad del paciente, la presencia de enfermedad preexistente, así como la presencia de otras enfermedades (por ejemplo, enfermedad cardiovascular).

25 En general, se usa una cantidad de agonista selectivo

del receptor EP4 de esta invención que es suficiente para aumentar la masa ósea hasta un nivel superior al umbral de fractura ósea (tal como se detalla en el World Health Organization Study citado anteriormente en la presente memoria).

Los agonistas selectivos del receptor EP4 usados en los procedimientos de la presente invención se administran generalmente en forma de una composición farmacéutica que comprende al menos uno de los compuestos de esta invención junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Así, el agonista selectivo del receptor EP4 de esta invención se puede administrar individualmente de forma local o sistémica en cualquier forma de dosificación convencional oral, intranasal, parenteral, rectal o transdérmica.

Para administración oral la composición farmacéutica puede tomar la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos y similares. Los comprimidos que contienen diferentes excipientes, tales como citrato de sodio, carbonato de calcio y fosfato de calcio, se emplean junto con diferentes disgregantes, tales como almidón y preferiblemente almidón de patata o tapioca y ciertos silicatos complejos, junto con agentes ligantes tales como polivinilpirrolidona, sacarosa, gelatina y goma arábica. Adicionalmente, los agentes lubricantes tales como

-39-

estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio y talco son con frecuencia muy útiles para la elaboración de comprimidos. También se emplean composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina dura y
5 blanda rellenas; los materiales preferidos para este fin incluyen también lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular. Cuando se desean suspensiones y/o elixires acuosos para administración oral, los compuestos de esta invención se pueden combinar con
10 diferentes agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes, agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión, así como diluyentes como agua, etanol, propilenglicol, glicerina y diferentes combinaciones similares.

15 Para administración parenteral, se pueden emplear soluciones en aceite de sésamo y de cacahuete o en propilenglicol acuoso, así como soluciones acuosas estériles de las correspondientes sales solubles en agua. Tales soluciones acuosas pueden estar adecuadamente
20 tamponadas, si es necesario, y el líquido diluyente se puede hacer primero isotónico con solución salina o glucosa suficiente. Estas soluciones acuosas son especialmente adecuadas para inyecciones intravenosas, intramusculares, subcutáneas e intraperitoneales. En relación a lo anterior,
25 todos los medios acuosos estériles empleados son fácilmente

obtenibles por técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia.

Para administración transdérmica (por ejemplo, tópica) se preparan soluciones acuosas estériles diluidas o
5 soluciones parcialmente acuosas (habitualmente en concentración aproximada de 0,1% a 5%), similares a las soluciones parenterales antiericres.

Los procedimientos para preparar las diferentes composiciones farmacéuticas, con una cierta cantidad de
10 ingrediente activo son conocidos, o serán evidentes a la luz de esta descripción, para los expertos en la materia. Para ejemplos de procedimientos de preparación de composiciones farmacéuticas véase Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easter,
15 Pa., 19th Edición (1995).

Protocolo de estudio

El objeto de este estudio es determinar si un agonista selectivo del receptor EP4 y, en especial, el ácido 7-(2-(3-hidroxi-4-fenil-butil)-5-oxo-pirrolidin-1-il)-
20 heptanoico, puede restaurar la masa ósea en un modelo de rata OVX.

Se ovariectomizaron (OVX) ratas Sprague-Dawley a los 3,5 meses de edad. Diez meses después de la OVX, las ratas se trataron por inyección subcutánea con vehículo o con
25 ácido 7-(2-(3-hidroxi-4-fenil-butil)-5-oxo-pirrolidin-1-

124
727

-41-

il)-heptanoico a 30 mg/kg/día durante 28 días. Las ratas se sometieron a autopsia. El fémur derecho se extirpa a cada rata en la autopsia y se explora usando absorciometría de rayos X de doble haz (DEXA, QDR 1000/W, Hologic, Inc.,
5 Waltham, MA) equipada con un programa informático "Regional High Resolution Scan" (Hologic, Inc., Waltham, MA). El tamaño de campo de exploración es de 5 x 1,902 cm, la resolución es de 0,0254 x 0,0127 cm, y la velocidad de exploración es de 7,25 mm/seg. Se analizan las imágenes
10 exploradas femorales. Se determina el contenido mineral óseo (BMC) y se calcula la densidad mineral ósea (MBD) del fémur completo (WF), la metáfisis femoral distal (DFM) y la diáfisis femoral (FS) según el procedimiento descrito en H. Z. et al., Droloxifene, a New Estrogen Antagonist/Agonist,
15 Prevents Bone Loss in Ovariectomized Rats. ENDOCRINOLOGY 136; 2435-2441, 1995.

Resultados del estudio y discusión

Al comparar con las ratas OVX tratadas con vehículo, las ratas OVX tratadas con ácido 7-(2-(3-hidroxi-4-fenil-
20 butil)-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico mostraron un BMC femoral total un 17% mayor, una BMD femoral total un 13% mayor, un BMC femoral distal un 8% mayor, una BMD femoral distal un 13% mayor, un BMC de la diáfisis femoral un 20% mayor y una BMD de la diáfisis femoral un 18% mayor. No se
25 apreciaron efectos secundarios similares a PGE2 en ratas

125
127

tratadas con ácido 7-(2-(3-hidroxi-4-fenil-butil)-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico.

Estos datos muestran que el ácido 7-(2-(3-hidroxi-4-fenil-butil)-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico, un agonista de PGE2 selectivo para el receptor EP4, estimula la formación ósea y restaura el hueso en ratas OVX ya osteopénicas.

Procedimientos experimentales generales

Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Varian Unity 400 (Varian Co., Palo Alto, California) a aproximadamente 23°C a 400 MHz para la RMN de protón. Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón. La forma de los picos se denomina como sigue: s, singlete; d, doblete; t, triplete; q, cuatriplete; m, multiplete; bs=singlete ancho. Se obtuvo el espectro de masas de ionización química a presión atmosférica (APCI) en un espectrofotómetro Fisons Platform II. Cuando se describe la intensidad de iones que contienen cloro o bromo, se observó la radiación de intensidad esperada (aproximadamente 3:1 para iones que contienen $^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$ y 1:1 para iones que contienen $^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) y se proporciona únicamente la intensidad del ion de masa inferior.

La cromatografía de media presión se realizó usando un sistema de purificación Biotage (Biotage, Dyax Corporation, Charlottesville, Virginia) en atmósfera de nitrógeno. La

126
127

cromatografía ultrarrápida se realizó con gel de sílice Baker (40 μ m) (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.) o gel de sílice 60 (EM Sciences, Gibbstown, N.J.) en columnas de vidrio a presión de nitrógeno reducida. Se realizó la

5 cromatografía radial utilizando un Chromatotron® (modelo 7924T, Harrison Research). La cromatografía preparativa se realizó usando Gel de Sílice GF de Analtech Uniplates (20 x 20 cm) (Analtech, Inc., Newark, DE). Los disolventes dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano (THF) y

10 diclorometano (CH_2Cl_2) usados como disolventes de la reacción eran de grado anhidro suministrados por Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wisconsin). El término "concentrado" se refiere a la eliminación del disolvente a presión de succión de agua en un evaporador rotatorio. La

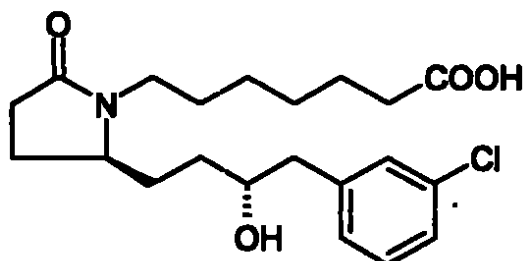
15 abreviatura "h" significa horas. El término "TBAF" se refiere a fluoruro de tetrabutylamonio. El término "DMAP" se refiere a dimetilaminopiridina. Los términos "diclorometano" y "cloruro de metileno" son sinónimos y se usan de forma indistinta en toda esta memoria descriptiva

20 y en los Ejemplos y Preparaciones.

Ejemplo 1

Ácido 7-{2S-[4-(3-cloro-fenil)-3R-hidroxi-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico

127
127



5

EtapA A: Éster etílico del ácido 7-{2R-[4-(3-cloro-fenil)-3-oxo-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico. Se añadió en varias porciones NaH (60% en peso en aceite, 426 mg, 10,7 mmol) en THF (35 ml) a una solución de éster dimetílico del ácido [3-(3-cloro-fenil)-2-oxo-propil]-fosfónico (2,66 g, 9,63 mmol) en THF (35 ml) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos. La mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C y se añadió una solución de éster etílico del ácido 7-(2R-
15 formil-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico (se suponen 10,6 mmol, preparado conforme al procedimiento descrito en la Preparación 7, pero usando diferentes cantidades de reactivos) en THF y la reacción se agitó durante 18 horas. Se añadió AcOH y la mezcla de reacción se diluyó con EtOAc.
20 La solución orgánica se lavó de forma sucesiva con solución saturada de NaHCO₃ (2 veces), agua (1 vez) y salmuera (1 vez). La solución orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de media presión eluyendo con acetona al 15% en tolueno,
25 proporcionando el éster etílico del ácido 7-{2R-[4-(3-

128
157

-45-

cloro-fenil)-3-oxo-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il]-
heptanoico (2,26 g). RMN de ^1H (CDCl_3) δ 7,27-7,15 (m, 3H),
7,08 (m, 1H), 6,66 (dd, 1H), 6,20 (d, 1H), 4,17 (m, 1H),
4,11 (q, 2H), 3,82 (s, 2H), 3,55 (m, 1H), 2,72 (m, 1H),
5 2,46-2,23 (m, 5H), 1,79 (m, 1H), 1,58 (m, 2H), 1,47-1,20
(m, 9H); EM 420,2 (M+1), 418,2 (M-1).

Etapas B: Éster etílico del ácido 7-{2R-[4-(3-cloro-fenil)-
3S-hidroxi-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il]-heptanoico.

Se añadió (R)-2-metil-CBS-oxazaborolidina (1M en tolueno,
10 5 ml, 5 mmol) a una solución del éster etílico del ácido 7-
{2R-[4-(3-cloro-fenil)-3-oxo-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-
1-il]-heptanoico (2,1 g, 5,0 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (200
ml) y la solución se enfrió hasta -45°C . La mezcla de
reacción se agitó durante 20 minutos y se añadió
15 catecolborano (1M en THF, 15 ml, 15 mmol). La mezcla de
reacción se agitó durante 18 horas a -45°C . Se añadió HCl
acuoso (1N, 100 ml) y la mezcla de reacción se agitó a
temperatura ambiente durante 18 horas. La capa acuosa ácida
se separó y la solución orgánica se lavó con NaOH 1N
20 enfriada en hielo (2 veces), seguido por salmuera (1 vez).
La solución orgánica se secó (MgSO_4), se filtró y se
concentró. La purificación por cromatografía de media
presión (EtOAc:hexanos 1:1 hasta EtOAc al 80% en hexanos)
proporcionó el éster etílico del ácido 7-{2R-[4-(3-cloro-
25 fenil)-3S-hidroxi-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il]-

heptanoico (800 mg) como una mezcla aproximadamente 6:1 de los diastereoisómeros alcohol 3S:3R por RMN de ^1H . RMN de ^1H (CDCl_3) δ 7,23-7,17 (m, 3H), 7,06 (m, 1H), 5,67 (dd, 1H), 5,46 (dd, 1H), 4,37 (m, 1H), 4,08 (q, 2H), 4,00 (m, 1H), 3,44 (m, 1H), 2,80 (m, 2H), 2,67 (m, 1H), 2,41-2,12 (m, 5H), 1,70-1,20 (m, 13H); EM 422,3 (M+1).

Etapas C: Éster etílico del ácido 7-{2S-[4-(3-cloro-fenil)-3R-hidroxi-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico. Se añadió paladio al 10% sobre carbono (80 mg) a una solución de éster etílico del ácido 7-{2R-[4-(3-cloro-fenil)-3S-hidroxi-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico (800 mg, 1,90 mmol) en EtOH (50 ml). La mezcla de reacción se sometió a hidrogenación en un agitador Parr a $3,10 \times 10^5$ Pa durante 4,5 horas. Se separó el catalizador por filtración a través de Celite® con la ayuda de EtOH. La purificación por cromatografía de media presión (hexanos:EtOAc 1:1 hasta EtOAc:hexanos 4:1) proporcionó el éster etílico del ácido 7-{2S-[4-(3-cloro-fenil)-3R-hidroxi-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico (625 mg). RMN de ^1H (CDCl_3) δ 7,27-7,21 (m, 3H), 7,09 (m, 1H), 4,10 (m, 2H), 3,84 (m, 1H), 3,61 (m, 2H), 2,90 (m, 1H), 2,78 (dd, 1H), 2,68 (m, 1H), 2,47-2,25 (m, 4H), 2,12 (m, 1H), 1,92-1,22 (m, 17H); EM 424,3 (M+1).

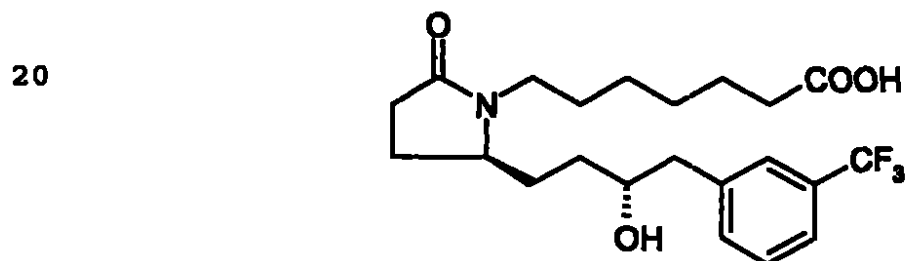
Etapas D: Ácido 7-{2S-[4-(3-cloro-fenil)-3R-hidroxi-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico. Se añadió NaOH 2N (6 ml)

-47-

a una solución del éster etílico del ácido 7-{2S-[4-(3-cloro-fenil)-3R-hidroxi-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico (595 mg, 1,40 mmol) en EtOH (25 ml). La reacción se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente y se concentró a vacío hasta aproximadamente tres cuartas partes del volumen original. Se añadió HCl 1N acuoso para obtener un pH de aproximadamente 2. La solución acuosa se lavó con cloruro de metileno (3 veces). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua seguida de salmuera. La solución orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró proporcionando el compuesto del Ejemplo 1 (500 mg). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,26-7,18 (m, 3H), 7,08 (m, 1H), 3,84 (m, 1H), 3,58 (m, 2H), 2,90 (m, 1H), 2,77 (dd, 1H), 2,68 (m, 1H), 2,43-2,28 (m, 4H), 2,10 (m, 1H), 1,78 (m, 1H), 1,66-1,22 (m, 13H); EM 396,2 (M+1), 394,2 (M-1).

Ejemplo 2

Ácido 7-{2S-[3R-hidroxi-4-(trifluorometil-fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico



Etapas A: Éster etílico del ácido 7-{2-oxo-5R-[3-oxo-4-(3-trifluorometil-fenil)-but-1-enil]-pirrolidin-1-il}-

25

131
27

heptanoico. Siguiendo el procedimiento descrito para el Ejemplo 1, Etapa A, se hizo reaccionar el anión derivado del éster dimetílico del ácido [2-oxo-3-(3-trifluorometil-fenil)-propil]-fosfónico (4,16 g, 13,40 mmol) y NaH (60% en 5 aceite, 590 mg, 14,7 mmol) con éster metílico del ácido 7-(2R-formil-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico (se suponen 14,74 mmol) durante 24 horas. La purificación por cromatografía de media presión (gradiente de disolvente de EtOAc al 20% en hexanos hasta EtOAc) proporcionó el éster 10 etílico del ácido 7-{2-oxo-5R-[3-oxo-4-(3-trifluorometil-fenil)-but-1-enil]-pirrolidin-1-il}-heptanoico (4,29 g). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,52 (d, 1H), 7,44 (m, 2H), 7,37 (d, 1H), 6,67 (dd, 1H), 6,22 (d, 1H), 4,80 (m, 1H), 4,08 (q, 2H), 3,90 (s, 2H), 3,54 (m, 1H), 2,70 (m, 1H), 2,37 (m, 15 2H), 2,24 (m, 3H), 1,78 (m, 1H), 1,56 (m, 2H), 1,44-1,20 (m, 9H); EM 454,2 (M+1), 452,2 (M-1).

Etapa B: Éster etílico del ácido 7-{2R-[3S-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico. Se añadió catecolborano (1M en THF, 9,9 ml, 9,9 20 mmol), gota a gota, a una solución de éster etílico del ácido 7-{2-oxo-5R-[3-oxo-4-(3-trifluorometil-fenil)-but-1-enil]-pirrolidin-1-il}-heptanoico (1,5 g, 3,31 mmol) y (R)-2-metil-CBS-oxazaborolidina (1M en tolueno, 0,5 ml, 0,5 mmol) en CH₂Cl₂ (100 ml) a -45°C. La solución se agitó 25 durante 24 horas a -45°C y se añadió HCl 1N. La mezcla de

reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y se separaron las capas. La solución acuosa se lavó con CH_2Cl_2 (2 veces) y las capas orgánicas reunidas se lavaron sucesivamente con NaOH 0,5N enfriada en hielo y salmuera (dos veces). La solución orgánica se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró. La purificación por cromatografía de media presión (EtOAc al 50% en hexanos hasta EtOAc al 60% en hexanos hasta EtOAc al 80% en hexanos hasta EtOAc hasta MeOH al 5% en CH_2Cl_2) proporcionó el éster etílico del ácido 7-{2R-[3S-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico (1,23 g) como una mezcla aproximadamente 5,5:1 de los diastereoisómeros alcohol 3S:3R por análisis HPLC. RMN de ^1H (CDCl_3) δ 7,51-7,35 (m, 4H), 5,72 (dd, 1H), 5,50 (dd, 1H), 4,44 (m, 1H), 4,09 (q, 2H), 4,01 (m, 1H), 3,44 (m, 1H), 2,90 (d, 2H), 2,71 (m, 1H), 2,37-2,12 (m, 5H), 1,70-1,21 (m, 13H); EM 456,3 (M+1), 454,3 (M-1).

Etapas C: Éster etílico del ácido 7-{2S-[3R-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico. Siguiendo el procedimiento descrito para el Ejemplo 1, Etapa C, se sometió a hidrogenación en presencia de paladio al 10% sobre carbono (120 mg) de $2,75 \times 10^5$ a $3,10 \times 10^5$ Pa en un agitador Parr durante 24 horas una solución del éster etílico del ácido 7-{2R-[3S-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-

il}-heptanoico (1,18 g, 2,59 mmol) en EtOH (50 ml). La purificación mediante cromatografía de media presión (EtOAc al 50% en hexanos hasta EtOAc hasta MeOH al 1% en CH₂Cl₂ hasta MeOH al 3% en CH₂Cl₂ hasta MeOH al 5% en CH₂Cl₂ hasta MeOH al 10% en CH₂Cl₂) proporcionó el éster etílico del ácido 7-{2S-[3R-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico (1,08 g). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,51-7,39 (m, 4H), 4,09 (q, 2H), 3,86 (m, 1H), 3,60 (m, 2H), 2,89 (m, 2H), 2,76 (m, 1H), 2,33 (m, 4H), 2,11 (m, 1H), 1,80 (m, 1H), 1,68-1,21 (m, 16H).

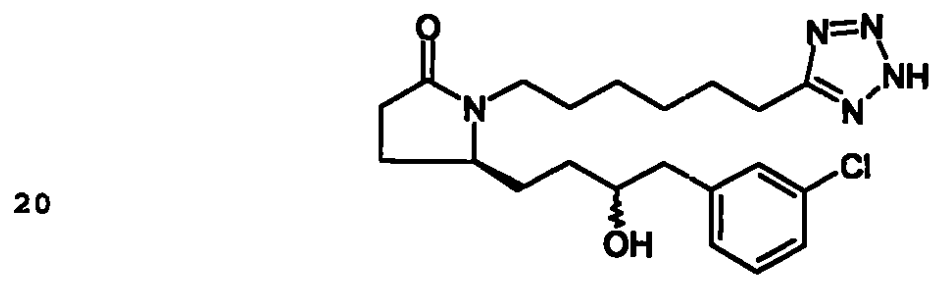
Etapas D: Ácido 7-{2S-[3R-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico. Siguiendo el procedimiento descrito para el Ejemplo 1, Etapa D, se hidrolizó el éster etílico del ácido 7-{2S-[3R-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico (1,93 g, 4,22 mmol) con NaOH 6N (26 ml) en EtOH (52 ml) durante 24 horas. La purificación por cromatografía de media presión (EtOAc hasta MeOH al 1% en CH₂Cl₂ hasta MeOH al 3% en CH₂Cl₂ hasta MeOH al 5% en CH₂Cl₂ hasta MeOH al 10% en CH₂Cl₂) proporcionó el ácido 7-{2S-[3R-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico (1,66 g). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,51-7,39 (m, 4H), 3,88 (m, 1H), 3,58 (m, 2H), 2,84 (m, 3H), 2,34 (m, 4H), 2,10 (m, 1H), 1,80 (m, 1H), 1,67-1,26 (m, 13H); EM 430,4 (M+1).

134
176

Etapa D: Sal sódica del ácido 7-{2S-[3R-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico. Se añadió NaHCO₃ (325 mg, 3,87 mmol) en agua (3 ml) a una solución del ácido 7-{2S-[3R-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico (1,66 g, 3,87 mmol) en EtOH (16 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 5 horas y se concentró a vacío. El residuo se destiló azeotrópicamente con CH₂Cl₂ (3 veces) proporcionando la sal sódica del compuesto del título del Ejemplo 2 (1,698 g). RMN de ¹H (CD₃OD) δ 7,48 (m, 4H), 3,80 (m, 1H), 3,69 (m, 1H), 3,52 (m, 1H), 2,94 (m, 1H), 2,81 (m, 2H), 2,32 (m, 2H), 2,13 (m, 3H), 1,81 (m, 1H), 1,69-1,26 (m, 13H); EM 430,3 (M-Na+1), 428,2 (M-Na-1).

Ejemplo 3

5S-[4-(3-Cloro-fenil)-3-hidroxi-butil]-1-[6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil]-pirrolidin-2-ona



Etapa A: 7-{2R-[4-(3-Cloro-fenil)-3-oxo-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo. Siguiendo el procedimiento descrito para el Ejemplo 1, Etapa A, se hizo reaccionar con 7-(2R-formil-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanonitrilo (se

suponen 13,3 mmol) durante 18 horas el anión derivado del éster dimetílico del ácido [3-(3-cloro-fenil)-2-oxo-propil]-fosfónico (3,35 g, 12,12 mmol) y NaH (60% en aceite, 533 mg, 132,3 mmol). La purificación por medio de
5 cromatografía de media presión (EtOAc al 20% en hexanos hasta EtOAc al 80% en hexanos) proporcionó el 7-{2R-[4-(3-cloro-fenil)-3-oxo-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo (1,52 g). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,24 (m, 2H), 7,17 (s, 1H), 7,06 (m, 1H), 6,64 (dd, 1H), 6,20 (d, 1H),
10 4,15 (m, 1H), 3,80 (s, 2H), 3,50 (m, 1H), 2,72 (m, 1H), 2,46-2,20 (m, 5H), 1,78 (m, 1H), 1,59 (m, 2H), 1,40 (m, 4H), 1,24 (m, 2H).

Etapas B. 7-{2S-[4-(3-Cloro-fenil)-3-oxo-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo. Siguiendo el procedimiento
15 descrito en el Ejemplo 1, Etapa C, se sometió a hidrogenación en presencia de paladio al 10% sobre carbono (86 mg) durante una hora 7-{2R-[4-(3-cloro-fenil)-3-oxo-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo (860 mg, 2,31 mmol) en MeOH (40 ml). La purificación por
20 cromatografía radial (hexanos hasta EtOAc al 20% en hexanos hasta EtOAc al 70% en hexanos) proporcionó el 7-{2S-[4-(3-cloro-fenil)-3-oxo-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo (730 mg).

Etapas C: 7-{2S-[4-(3-Cloro-fenil)-3-hidroxi-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo. Se añadió NaBH₄ (35 mg,
25

136
7

-53-

0,921 mmol) a una solución de 7-{2S-[4-(3-cloro-fenil)-3-oxo-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo (730 mg, 1,87 mmol) en MeOH (30 ml) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 45 minutos y se añadió agua. Los volátiles se eliminaron a vacío y la solución acuosa que quedó se diluyó con cloruro de metileno. La solución orgánica se lavó con agua y después con salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró. La purificación por cromatografía de media presión (hexanos:EtOAc 1:1 hasta EtOAc hasta MeOH al 3% en CH₂Cl₂) proporcionó el 7-{2S-[4-(3-cloro-fenil)-3-hidroxi-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo (730 mg). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,22 (m, 3H), 7,07 (d, 1H), 3,80 (m, 1H), 3,57 (m, 2H), 2,88 (m, 1H), 2,78 (m, 1H), 2,64 (m, 1H), 2,31 (m, 4H), 2,10 (m, 1H), 1,65-1,22 (m, 14H); EM 377,3 (M+1).

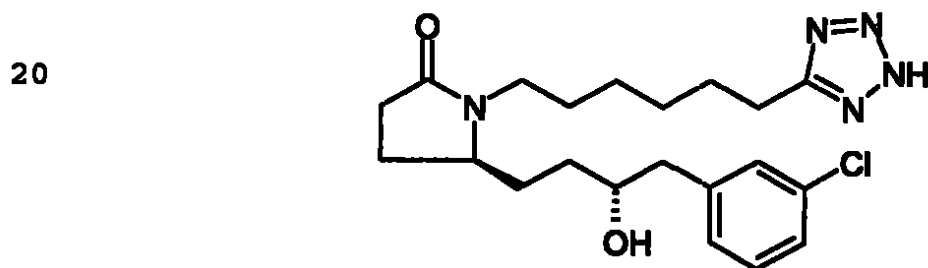
Etapas D: 5S-[4-(3-Cloro-fenil)-3-hidroxi-butil]-1-[6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil]-pirrolidin-2-ona. Se calentó a reflujo durante 18 horas una solución de 7-{2S-[4-(3-cloro-fenil)-3-hidroxi-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo (730 mg, 1,94 mmol), trimetilsililazida (0,63 ml, 0,475 mmol) y óxido de dibutilestano (96 mg, 3,87 mmol) en tolueno (30 ml). Los volátiles se eliminaron a vacío y el residuo se diluyó con CH₂Cl₂. La solución orgánica se lavó con HCl 1N, seguido de salmuera. La solución orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se

-54-

concentró. El residuo se purificó por cromatografía de media presión eluyendo con EtOAc hasta MeOH al 2% en CH₂Cl₂, hasta MeOH al 7% en CH₂Cl₂, dando el complejo en TMS. El residuo se diluyó con MeOH y se añadió HCl 2N y la solución se agitó durante 40 minutos. La solución se diluyó con CH₂Cl₂ y la capa orgánica se lavó con agua y luego con salmuera. La solución orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de media presión eluyendo con EtOAc hasta MeOH al 7% en CH₂Cl₂, proporcionando la 5S-[4-(3-cloro-fenil)-3-hidroxi-butil]-1-[6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil]-pirrolidin-2-ona (521 mg). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,23 (m, 3H), 7,09 (d, 1H), 3,85 (m, 1H), 3,66 (m, 1H), 3,53 (m, 1H), 2,96 (m, 3H), 2,81 (m, 1H), 2,70 (m, 1H), 2,44 (m, 2H), 2,18 (m, 1H), 1,88-1,27 (m, 14H); EM 420,2 (M+1), 418,3 (M-1).

Ejemplo 4

5S-[3R-Hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-butil]-1-[6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil]-pirrolidin-2-ona



Etapa A: 7-{2-Oxo-5R-[3-oxo-4-(3-trifluorometil-fenil)but-1-enil]-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo. Siguiendo el

25

procedimiento descrito para el Ejemplo 1, Etapa A, se hizo reaccionar el anión derivado de éster dimetílico del ácido [2-oxo-3-(3-trifluorometil-fenil)-propil]fosfónico (2,68 g, 8,64 mmol) y NaH (60% en aceite, 400 mg, 10 mmol) con 7-
5 (2R-formil-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanonitrilo (se suponen 10 mmol) durante 18 horas. La purificación por medio de cromatografía de media presión (EtOAc al 30% en hexanos hasta EtOAc al 80% en hexanos) proporcionó el 7-{2-oxo-5R-[3-oxo-4-(3-trifluorometil-fenil)but-1-enil]-
10 pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo (1,2 g). RMN de ^1H (CDCl_3) δ 7,52 (m, 1H), 7,45 (m, 2H), 7,37 (m, 1H), 6,67 (dd, 1H), 6,23 (d, 1H), 4,18 (m, 1H), 3,90 (s, 2H), 3,53 (m, 1H), 2,73 (m, 1H), 2,45-2,23 (m, 5H), 1,79 (m, 1H), 1,60 (m, 2H), 1,41 (m, 4H), 1,24 (m, 2H); EM 407,2 (M+1), 405,3 (M-
15 1).

Etapa B: 7-{2R-[3S-Hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo. Se añadió catecolborano (1M en THF, 8,4 ml, 8,4 mmol) gota a gota a una solución de 7-{2-oxo-5R-[3-oxo-4-(3-trifluorometil-fenil)but-1-enil]-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo (1,14 g, 2,81 mmol) y (R)-2-metil-CBS-oxazaborolidina (1M en tolueno, 0,42 ml, 0,42 mmol) en CH_2Cl_2 (112 ml) a -45°C . La mezcla de reacción se agitó a -45°C durante 18 horas y se añadió HCl 1N. La mezcla de reacción se agitó a temperatura
20
25 ambiente durante 40 minutos y se separaron las capas. La

-56-

solución orgánica se lavó con NaOH 1N fría (3 veces). La
solución orgánica se lavó secuencialmente con HCl 1N, agua
y salmuera. La solución orgánica se secó (MgSO₄), se filtró
y se concentró. La purificación por cromatografía de media
5 presión (hexanos:EtOAc 1:1 hasta EtOAc al 80% en hexanos)
proporcionó 7-{2R-[3S-hidroxi-4-(3-trifluorometil-
fenil)but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo
(820 mg) como una relación aproximadamente 2,5:1 de los
diastereoisómeros alcohol 3S:3R por RMN de ¹H. RMN de ¹H
10 (CDCl₃) δ 7,51-7,38 (m, 4H), 5,72 (dd, 1H), 5,49 (dd, 1H),
4,45 (m, 1H), 4,02 (m, 1H), 3,47 (m, 1H), 2,90 (m, 2H),
2,71 (m, 1H), 2,34 (m, 4H), 2,18 (m, 1H), 1,66 (m, 4H),
1,44 (m, 4H), 1,27 (m, 2H); EM 409,2 (M+1).

Etapas C: 7-{2S-[3R-Hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-
15 butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo. Siguiendo el
procedimiento descrito para el Ejemplo 1, Etapa C, se
sometió a hidrogenación en presencia de paladio al 10%
sobre carbono (100 mg) a $3,45 \times 10^5$ Pa durante 18 horas en
un agitador Parr el 7-{2R-[3S-hidroxi-4-(3-trifluorometil-
20 fenil)but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo
(810 mg) en MeOH (40 ml). La purificación por medio de
cromatografía de media presión (hexanos:EtOAc 1:1 hasta
MeOH al 3% en CH₂Cl₂) proporcionó el 7-{2S-[3R-hidroxi-4-(3-
trifluorometil-fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-
25 heptanonitrilo (720 mg). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,44 (m, 4H),

140
247

-57-

3,84 (m, 1H), 3,58 (m, 2H), 2,88 (m, 2H), 2,73 (m, 1H),
2,32 (m, 4H), 2,11 (m, 1H), 1,78 (m, 1H), 1,65-1,37 (m,
11H), 1,30 (m, 2H); EM 411,2 (M+1).

Etapas D: 5S-[3R-Hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-butil]-
5 1-[6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil]-pirrolidin-2-ona. Siguiendo
el procedimiento descrito para el Ejemplo 3, Etapa D, se
hizo reaccionar 7-{2S-[3R-hidroxi-4-(3-trifluorometil-
fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo (710
mg, 1,73 mmol) con azidotrimetilsilano (399 mg, 3,46 mmol)
10 y óxido de dibutilestaño (43 mg, 1,7 mmol) en tolueno (25
ml) calentado a reflujo durante 18 horas. Los volátiles se
eliminaron a vacío y el residuo se diluyó con CH₂Cl₂. La
solución orgánica se lavó sucesivamente con HCl 1N (dos
veces), agua (1 vez) y salmuera (1 vez). La solución
15 orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró. El
residuo se purificó por cromatografía de media presión
eluyendo con EtOAc hasta MeOH al 2% en CH₂Cl₂ hasta MeOH al
8% en CH₂Cl₂, proporcionando la 5S-[3R-hidroxi-4-(3-
trifluorometil-fenil)-butil]-1-[6-(2H-tetrazol-5-il)-
20 hexil]-pirrolidin-2-ona (450 mg). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,44
(m, 4H), 3,87 (m, 1H), 3,65 (m, 1H), 3,50 (m, 1H), 3,01-
2,73 (m, 5H), 2,42 (m, 2H), 2,16 (m, 1H), 1,86-1,23 (m,
14H); EM 454,4 (M+1), 452,4 (M-1).

Etapas E: Sal sódica de la 5S-[3R-hidroxi-4-(3-
25 trifluorometil-fenil)-butil]-1-[6-(2H-tetrazol-5-il)-

141
54

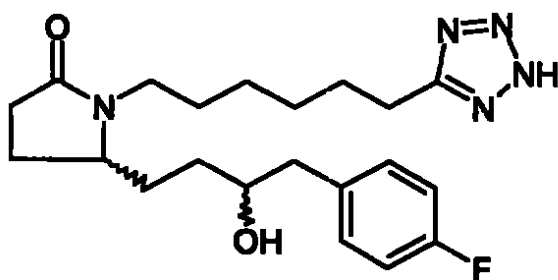
hexil]-pirrolidin-2-ona. Siguiendo el procedimiento descrito para el Ejemplo 2, Etapa E, el tratamiento de la 5S-[3R-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-butil]-1-[6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil]-pirrolidin-2-ona (428 mg, 0,944 mmol) con NaHCO₃ (79 mg, 0,94 mmol) proporcionó la sal sódica (430 mg). RMN de ¹H (CD₃OD) δ 7,48 (m, 4H), 3,79 (m, 1H), 3,67 (m, 1H), 3,51 (m, 1H), 2,86 (m, 5H), 2,30 (m, 2H), 2,12 (m, 1H), 1,84-1,27 (m, 14H); EM 454,4 (M-Na+1), 452,4 (M-Na-1).

10

Ejemplo 5

5-[4-(4-Fluoro-fenil)-3-hidroxi-butil]-1-[6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil]-pirrolidin-2-ona

15



Etapa A: 7-{2-[3-(terc-Butil-dimetil-silaniloxy)-4-(4-fluoro-fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo.

20 Se añadió una solución de 5-[3-(terc-butyl-dimetil-silaniloxy)-4-(4-fluoro-fenil)-butil]-pirrolidin-2-ona (150 mg, 0,41 mmol) en DMF (5 ml) a NaH (60% en peso en aceite, 16 mg, 0,41 mmol) en DMF (10 ml). Después de 1,5 horas, se añadió 7-bromoheptanonitrilo (78 mg, 0,41 mmol) en DMF (5
25 ml) y la mezcla de reacción se agitó a 90°C durante 2,5

-59-

horas. Se añadió agua (20 ml) y la solución acuosa se lavó con EtOAc (4 x 15 ml). Las soluciones orgánicas reunidas se lavaron con agua (2 x 15 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó por 5 cromatografía de media presión (hexanos:EtOAc 1:1), proporcionando el 7-{2-[3-(terc-butil-dimetil-silanilo)-4-(4-fluoro-fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo (161 mg). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,09 (m, 2H), 6,95 (m, 2H), 3,81 (m, 1H), 3,54 (m, 2H), 2,86 (m, 1H), 10 2,68 (m, 2H), 2,29 (m, 4H), 2,06 (m, 1H), 1,74-1,23 (m, 13H), 0,85 (s, 9H), 0,04 (m, 3H), 0,19 (m, 3H); EM 475,1 (M+1).

Etapas B: 7-{2-[4-(4-fluoro-fenil)-3-hidroxi-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo. Se añadió TBAF (1M en THF, 15 0,50 ml, 0,50 mmol) a una solución de 7-{2-[3-(terc-butil-dimetil-silanilo)-4-(4-fluoro-fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo (158 mg, 0,333 mmol) en THF (20 ml) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y se añadió NaHCO₃ acuoso 20 saturado. Los volátiles se eliminaron a vacío. La solución acuosa que quedó se lavó con CHCl₃ (4 x 5 ml) y las soluciones orgánicas reunidas se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía de media presión (hexanos:EtOAc 1:1 hasta 25 EtOAc) proporcionando 7-{2-[4-(4-fluoro-fenil)-3-hidroxi-

143
~~144~~

butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo (82 mg). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,15 (m, 2H), 7,00 (m, 2H), 3,77 (m, 1H), 3,58 (m, 2H), 2,89 (m, 1H), 2,79 (m, 1H), 2,64 (m, 1H), 2,34 (m, 4H), 2,12 (m, 1H), 1,68-1,24 (m, 14H); EM 361,2
 5 (M+1).

Etapas C: 5-[4-(4-Fluoro-fenil)-3-hidroxi-butil]-1-[6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil]-pirrolidin-2-ona. Siguiendo el procedimiento descrito para el Ejemplo 3, Etapa D, se hizo reaccionar 7-{2-[4-(4-fluoro-fenil)-3-hidroxi-butil]-5-oxo-
 10 pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo (71 mg, 0,197 mmol) con azidotrimetilsilano (45 mg, 0,394 mmol) y óxido de dibutilestaño (5 mg, 0,02 mmol) en tolueno (10 ml) calentado a reflujo durante 16 horas. Se añadieron cantidades adicionales de azidotrimetilsilano (200 mg) y de
 15 óxido de dibutilestaño (50 mg) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 5 horas. La mezcla de reacción se acidificó con HCl 1N hasta pH 2 (5 ml) y la solución acuosa se lavó con EtOAc (4 x 10 ml). Las soluciones orgánicas reunidas se secaron (MgSO₄), se filtraron y se
 20 concentraron. La purificación por cromatografía de media presión (EtOAc hasta EtOAc:MeOH 39:1 hasta EtOAc:MeOH 19:1) proporcionó el compuesto del título del Ejemplo 5A (39 mg).
 RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,16 (m, 2H), 7,00 (m, 2H), 3,81 (m, 1H), 3,68 (m, 1H), 3,53 (m, 1H), 2,99 (m, 3H), 2,80 (m,
 25 1H), 2,68 (m, 1H), 2,47 (m, 2H), 2,20 (m, 1H), 1,88-1,22

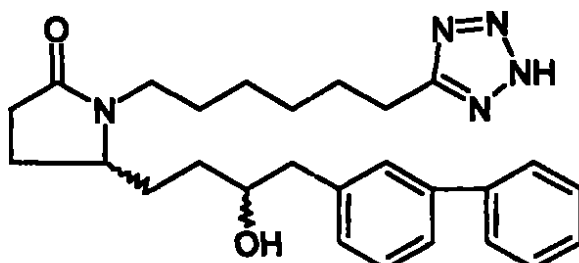
144
7767

(m, 14H); EM 404,3 (M+1), 402,3 (M-1).

Ejemplo 6

5-(4-Bifenil-3-il-3-hidroxi-butil)-1-[6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil]-pirrolidin-2-ona

5



10 **Etapas A: 7-{2-[4-Bifenil-3-il-3-(terc-butil-dimetil-silaniloxy)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo.**
Siguiendo el procedimiento descrito para el Ejemplo 5, Etapa A, se alquiló el anión derivado de 5-[4-bifenil-3-il-3-(terc-butil-dimetil-silaniloxy)-butil]-pirrolidin-2-ona
15 (239,1 mg, 0,564 mmol) y NaHMDS (1M en THF, 0,67 ml, 0,67 mmol) con 7-bromoheptanonitrilo (118 mg, 0,620 mmol) a 70°C durante 24 horas. La purificación por cromatografía de media presión (CH₂Cl₂ hasta MeOH al 1% en CH₂Cl₂ hasta MeOH al 2% en CH₂Cl₂ hasta MeOH al 4% en CH₂Cl₂) proporcionó 7-{2-
20 [4-bifenil-3-il-3-(terc-butil-dimetil-silaniloxy)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo (187 mg). EM 533,3 (M+1).

Etapas B: 7-[2-(4-Bifenil-3-il-3-hidroxi-butil)-5-oxo-pirrolidin-1-il]-heptanonitrilo. Siguiendo el procedimiento
25 descrito para el Ejemplo 5, Etapa B, se desprotegió 7-{2-

145
7/7/7

[4-bifenil-3-il-3-(terc-butil-dimetil-silanoloxi)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il]-heptanonitrilo (187 mg, 0,351 mmol) con TBAF (1M en THF, 0,53 ml, 0,53 mmol). La adición se llevó a cabo a 0°C y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La purificación por cromatografía de media presión (CH₂Cl₂ hasta MeOH al 1% en CH₂Cl₂ hasta MeOH al 2% en CH₂Cl₂ hasta MeOH al 6% en CH₂Cl₂ hasta MeOH al 10% en CH₂Cl₂) proporcionó 7-[2-(4-bifenil-3-il-3-hidroxi-butil)-5-oxo-pirrolidin-1-il]-heptanonitrilo (85 mg). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,58 (m, 1H), 7,51-7,33 (m, 4H), 7,21-7,12 (m, 4H), 3,85 (m, 1H), 3,60 (m, 2H), 2,90 (m, 1H), 2,83-2,60 (m, 2H), 2,45-2,30 (m, 4H), 2,14 (m, 1H), 1,73-1,25 (m, 14H).

Etapas C: 5-(4-Bifenil-3-il-3-hidroxi-butil)-1-[6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil]-pirrolidin-2-ona. Siguiendo el procedimiento descrito para el Ejemplo 3, Etapa D, se hizo reaccionar 7-[2-(4-bifenil-3-il-3-hidroxi-butil)-5-oxo-pirrolidin-1-il]-heptanonitrilo (109 mg, 0,260 mmol) con azidotrimetilsilano (0,69 ml, 0,52 mmol) y óxido de dibutilestano (11 mg, 0,044 mmol) en tolueno (5,3 ml) calentado a reflujo durante 72 horas. La mezcla de reacción se enfrió y se añadió agua. La mezcla se acidificó con HCl 1N hasta pH 2 y la solución acuosa se lavó con MeOH al 5% en CH₂Cl₂ (tres veces). Las soluciones orgánicas reunidas se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron. La

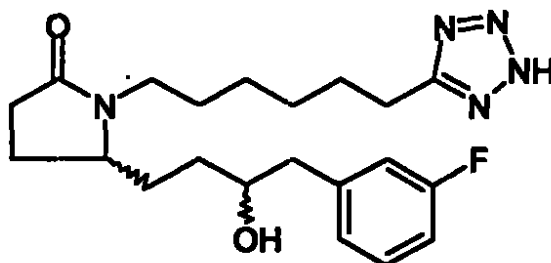
purificación por cromatografía de media presión (hexanos:EtOAc 1:1 hasta EtOAc hasta MeOH al 2% en CH₂Cl₂ hasta MeOH al 4% en CH₂Cl₂ hasta MeOH al 8% en CH₂Cl₂) proporcionó el compuesto del título del Ejemplo 6 (107 mg).

5 RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,57 (m, 1H), 7,51-7,32 (m, 4H), 7,25-7,13 (m, 4H), 3,91 (m, 1H), 3,74-3,50 (m, 2H), 2,96 (m, 3H), 2,77 (m, 1H), 2,50 (m, 2H), 2,22 (m, 1H), 2,07 (m, 1H), 1,90-1,22 (m, 14H); EM 462,2 (M+1), 460,1 (M-1).

Ejemplo 7

10 5-[4-(3-Fluoro-fenil)-3-hidroxi-butil]-1-[6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil]-pirrolidin-2-ona

15



EtapA A: 7-{2-[3-(terc-Butil-dimetil-silaniloxi)-4-(3-fluoro-fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo.

Siguiendo el procedimiento descrito para el Ejemplo 5,

20 Etapa A, se alquiló el anión derivado de 5-[3-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-4-(3-fluoro-fenil)-butil]-pirrolidin-2-ona (250 mg, 0,684 mmol) y NaHMDS (1M en THF, 0,80 ml, 0,80 mmol) con 7-bromoheptanonitrilo (142 mg, 0,748 mmol) a 70°C durante 72 horas. La purificación por cromatografía de
 25 media presión (hexanos:EtOAc 1:1 hasta EtOAc hasta MeOH al

147
147

-64-

5% en CH₂Cl₂) proporcionó el 7-{2-[3-(terc-butil-dimetil-silanoloxi)-4-(3-fluoro-fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo (261,7 mg). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,26 (m, 1H), 6,92 (m, 3H), 3,89 (m, 1H), 3,59 (m, 2H), 2,89 (m, 1H), 2,75 (m, 2H), 2,36 (m, 4H), 2,11 (m, 1H), 1,72-1,26 (m, 13H), 0,89 (s, 9H), 0,09 (s, 6H); EM 475,3 (M+1).

Etapas B: 7-{2-[4-(3-fluoro-fenil)-3-hidroxi-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo. Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 5, Etapa B, se desprotegió con TBAF (1M en THF, 0,83 ml, 0,83 mmol) el 7-{2-[3-(terc-butil-dimetil-silanoloxi)-4-(3-fluoro-fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo (261,7 mg, 0,551 mmol). La adición se llevó a cabo a 0°C y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La purificación por cromatografía de media presión (CH₂Cl₂, hasta MeOH al 1% en CH₂Cl₂, hasta MeOH al 2% en CH₂Cl₂, hasta MeOH al 4% en CH₂Cl₂) proporcionó el 7-{2-[4-(3-fluoro-fenil)-3-hidroxi-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo (141 mg). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,32 (m, 1H), 6,98 (m, 3H), 3,86 (m, 1H), 3,64 (m, 2H), 2,99-2,80 (m, 2H), 2,71 (m, 1H), 2,38 (m, 4H), 2,16 (m, 1H), 1,74-1,29 (m, 14H); EM 361,3 (M+1).

Etapas C: 5-[4-(3-Fluoro-fenil)-3-hidroxi-butil]-1-[6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil]-pirrolidin-2-ona. Siguiendo el procedimiento descrito para el Ejemplo 6, Etapa C, se hizo

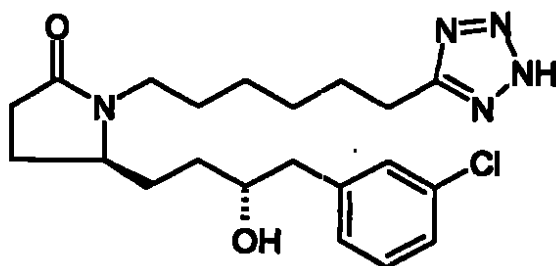
148
157

-65-

reaccionar 7-{2-[4-(3-fluoro-fenil)-3-hidroxi-butil]-5-oxo-
pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo (141,3 mg, 0,392 mmol) con
azidotrimetilsilano (0,210 ml, 1,57 mmol) y óxido de
dibutilestaño (29 mg, 0,116 mmol) en tolueno (8 ml)
5 calentado a reflujo durante 72 horas. La purificación por
cromatografía de media presión (CH₂Cl₂ hasta MeOH al 2% en
CH₂Cl₂ hasta MeOH al 4% en CH₂Cl₂ hasta MeOH al 6% en CH₂Cl₂)
proporcionó el compuesto del título del Ejemplo 5C (101,5
mg). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,26 (m, 1H), 6,94 (m, 3H), 3,87
10 (m, 1H), 3,70 (m, 1H), 3,52 (m, 1H), 2,98 (m, 3H), 2,78 (m,
2H), 2,48 (m, 2H), 2,20 (m, 1H), 1,89-1,24 (m, 14H); EM
404,2 (M+1), 401,9 (M-1).

Ejemplo 8

5S-[4-(3-Cloro-fenil)-3R-hidroxi-butil]-1-[6-(2H-tetrazol-
15 5-il)-hexil]-pirrolidin-2-ona



20

Etapa A: 7-{2R-[3S-hidroxi-4-(3-cloro-fenil)-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo. Se añadió (R)-2-metil-
CBS-oxazaborolidina (1M en tolueno, 1,3 ml, 1,3 mmol) a una
solución de 7-{2-oxo-5R-[3-oxo-4-(3-cloro-fenil)-but-1-
25 enil]-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo (1,62 g, 4,34 mmol)

149
F

-65-

en CH_2Cl_2 (200 ml) a -45°C . Después de agitar durante 20 minutos, se añadió catecolborano (1M en THF, 13 ml, 13 mmol) gota a gota. La reacción se agitó a -45°C durante 16 horas y se añadió HCl 1N. La mezcla se calentó a temperatura ambiente y se separaron las capas. La solución orgánica se lavó con NaOH 1N (3 veces). La solución orgánica se lavó sucesivamente con HCl 1N, agua y salmuera. La solución orgánica se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró. La purificación por cromatografía de media presión (hexanos:EtOAc 1:1 hasta MeOH al 20% en CH_2Cl_2) proporcionó 7-{2R-[3S-hidroxi-4-(3-cloro-fenil)-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo (536 mg) como una mezcla 8,2:1 de los alcoholes 3S:2R. RMN de ^1H (CDCl_3) δ 7,24-7,17 (m, 3H), 7,07 (m, 1H), 5,69 (dd, 1H), 5,46 (dd, 1H), 4,40 (m, 1H), 4,01 (m, 1H), 3,46 (m, 1H), 2,81 (m, 2H), 2,68 (m, 1H), 2,42-2,28 (m, 4H), 2,20 (m, 1H), 1,73-1,59 (m, 4H), 1,42 (m, 4H), 1,25 (m, 2H); EM 375 (M+1).

Etapas B: 7-{2S-[4-(3-cloro-fenil)-3R-hidroxi-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo. Siguiendo el procedimiento descrito para el Ejemplo 4, Etapa C, se sometió a hidrogenación en presencia de paladio al 10% sobre carbono (60 mg) durante 3,5 horas el 7-{2R-[3S-hidroxi-4-(3-cloro-fenil)-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo (536 mg) en EtOH (30 ml). La purificación por cromatografía

de media presión (hexanos:EtOAc 1:1 hasta MeOH al 20% en CH₂Cl₂, proporcionó el 7-{2S-[4-(3-cloro-fenil)-3R-hidroxi-butyl]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo (440 mg). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,22 (m, 3H), 7,08 (m, 1H), 3,83 (m, 1H), 3,59 (m, 2H), 2,90 (m, 1H), 2,77 (dd, 1H), 2,66 (dd, 1H), 2,39-2,29 (m, 4H), 2,11 (m, 1H), 1,78 (m, 1H), 1,68-1,39 (m, 11H), 1,29 (m, 2H); EM 377,2 (M+1).

Etapa C: S-[4-(3-Cloro-fenil)-3R-hidroxi-butyl]-1-[6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil]-pirrolidin-2-ona. Siguiendo el
10 procedimiento descrito para el Ejemplo 3, Etapa D, se calentó a reflujo durante 16 horas una mezcla de 7-{2S-[4-(3-cloro-fenil)-3R-hidroxi-butyl]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanonitrilo (420 mg, 1,114 mmol), trimetilsililazida (257 mg, 2,23 mmol) y óxido de dibutilestaño (56 mg) en
15 tolueno (30 ml). Los volátiles se eliminaron a vacío y el residuo se disolvió en MeOH y se agitó con HCl 3N durante 3 horas. La reacción se diluyó con agua y CH₂Cl₂, y se separaron las capas. La capa orgánica se lavó con agua seguida de salmuera. La solución orgánica se secó (MgSO₄),
20 se filtró y se concentró. La purificación por cromatografía de media presión (EtOAc hasta MeOH al 2% en CH₂Cl₂, hasta MeOH al 7% en CH₂Cl₂) proporcionó la 5S-[4-(3-cloro-fenil)-3R-hidroxi-butyl]-1-[6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil]-pirrolidin-2-ona (311 mg). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,22 (m,
25 3H), 7,08 (m, 1H), 3,86 (m, 1H), 3,66 (m, 1H), 3,52 (m,

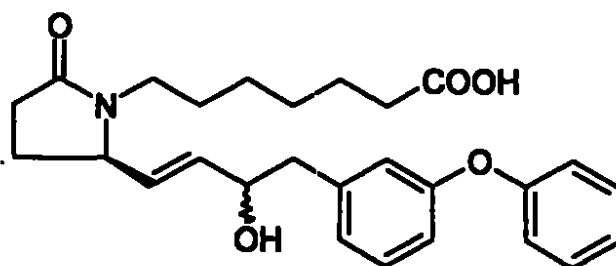
157
37

-68-

1H), 2,96 (m, 3H), 2,82-2,68 (m, 2H), 2,45 (m, 2H), 2,17 (m, 1H), 1,88-1,22 (m, 14H); EM 420,2 (M+1), 418,3 (M-1).

Ejemplo 9

Ácido 7-{2R-[3-hidroxi-4-(3-fenoxi-fenil)-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico



10

EtapA A: Éster etílico del ácido 7-{2-oxo-5R-[3-oxo-4-(3-fenoxi-fenil)-but-1-enil]-pirrolidin-1-il}-heptanoico.

Siguiendo el procedimiento descrito para el Ejemplo 1, Etapa A, se hizo reaccionar el anión derivado de éter dimetílico del ácido [2-oxo-3-(3-fenoxi-fenil)-propil]-fosfónico (633 mg, 1,98 mmol) y NaH (60% en aceite, 70 mg, 1,74 mmol) con éster etílico del ácido 7-(2R-formil-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico (se supone 1,58 mmol) durante 24 horas. La cromatografía de media presión (EtOAc) proporcionó el éster etílico del ácido 7-{2-oxo-5R-[3-oxo-4-(3-fenoxi-fenil)-but-1-enil]-pirrolidin-1-il}-heptanoico (215 mg). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,28 (m, 3H), 7,08 (m, 1H), 6,97 (m, 2H), 6,89 (m, 2H), 6,83 (m, 1H), 6,62 (dd, 1H), 6,19 (d, 1H), 4,13 (m, 1H), 4,08 (q, 2H), 3,79 (s, 2H), 3,51 (m, 1H), 2,68 (m, 1H), 2,35 (m, 2H), 2,24 (m, 3H),

25

2,24 (m, 3H), 1,75 (m, 1H), 1,54 (m, 2H), 1,43-1,20 (m, 9H).

Etapa B: Éster etílico del ácido 7-{2R-[3-hidroxi-4-(3-fenoxi-fenil)-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico. Siguiendo el procedimiento descrito para el Ejemplo 3, Etapa C, se hizo reaccionar el éster etílico del ácido 7-{2-oxo-5R-[3-oxo-4-(3-fenoxi-fenil)-but-1-enil]-pirrolidin-1-il}-heptanoico (215 mg, 0,451 mmol) con NaBH₄ (17 mg, 0,45 mmol) en EtOH (3 ml) a 0°C durante 4 horas. La purificación por cromatografía de media presión (EtOAc) proporcionó el éster etílico del ácido 7-{2R-[3-hidroxi-4-(3-fenoxi-fenil)-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico (167 mg). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,33 (m, 2H), 7,25 (m, 1H), 7,10 (m, 1H), 6,99 (m, 2H), 6,93 (m, 1H), 6,86 (m, 2H), 5,72 (m, 1H), 5,45 (m, 1H), 4,37 (m, 1H), 4,10 (q, 2H), 3,47 (m, 1H), 2,82 (m, 3H), 2,35 (m, 2H), 2,26 (t, 2H), 2,15 (m, 1H), 1,70-1,21 (m, 13H).

Etapa C: Ácido 7-{2R-[3-hidroxi-4-(3-fenoxi-fenil)-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico. Siguiendo el procedimiento descrito para el Ejemplo 1, Etapa D, se hidrolizó el éster etílico del ácido 7-{2R-[3-hidroxi-4-(3-fenoxi-fenil)-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico (29 mg, 0,060 mmol) con NaOH 2M en EtOH (4,0 ml) a temperatura ambiente durante 24 horas, proporcionando el compuesto del título (20 mg). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,33-7,21

153
\$

-70-

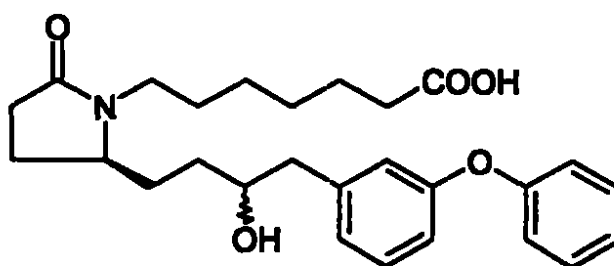
(m, 3H), 7,08 (m, 1H), 6,98-6,84 (m, 5H), 5,70 (m, 1H), 5,44 (m, 1H), 4,36 (m, 1H), 4,00 (m, 1H), 3,44 (m, 1H), 2,85-2,51 (m, 3H), 2,32 (m, 4H), 2,14 (m, 1H), 1,68-1,18 (m, 10H).

5

Ejemplo 10

Ácido 7-{2*S*-[3-hidroxi-4-(3-fenoxi-fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico

10



Etapas A: Éster etílico del ácido 7-{2*S*-[3-hidroxi-4-(3-fenoxi-fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico.

15 Siguiendo el procedimiento descrito para el Ejemplo 1, Etapa C, se sometió a hidrogenación en un agitador Parr a $3,45 \times 10^5$ Pa durante 18 horas una mezcla del éster etílico del ácido 7-{2*R*-[3-hidroxi-4-(3-fenoxi-fenil)-but-1-enil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico (139 mg, 0,290 mmol),
20 MeOH (30 ml) y paladio al 10% sobre carbono (14 mg). La purificación por cromatografía de media presión (hexanos:EtOAc 1:1) proporcionó el éster etílico del ácido 7-{2*S*-[3-hidroxi-4-(3-fenoxi-fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico (86 mg). RMN de ^1H (CDCl_3) δ
25 7,35-7,24 (m, 3H), 7,10 (m, 1H), 6,99 (m, 2H), 6,93 (m,

154
754

-71-

1H), 6,87 (m, 2H), 4,09 (q, 2H), 3,80 (m, 1H), 3,58 (m, 2H), 2,82 (m, 2H), 2,64 (m, 1H), 2,42-2,24 (m, 4H), 2,10 (m, 1H), 1,77 (m, 1H), 1,66-1,21 (m, 16H).

Etapa B: Ácido 7-{2S-[3-hidroxi-4-(3-fenoxi-fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico. Siguiendo el procedimiento descrito para el Ejemplo 1, Etapa D, se hidrolizó el éster etílico del ácido 7-{2S-[3-hidroxi-4-(3-fenoxi-fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico (86 mg, 1,79 mmol) con NaOH 2N en MeOH (4 ml) durante 18 horas, proporcionando el compuesto del título (62 mg). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,33-7,23 (m, 3H), 7,09 (m, 1H), 6,98 (m, 2H), 6,91 (m, 1H), 6,86 (m, 2H), 3,80 (m, 1H), 3,56 (m, 2H), 2,88 (m, 1H), 2,77 (m, 1H), 2,64 (m, 1H), 2,38-2,28 (m, 4H), 2,09 (m, 1H), 1,77 (m, 1H), 1,64-1,21 (m, 13H).

15 Preparación 1

7-(2R-Hidroximetil-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanonitrilo
Etapa A: 7-[2R-(terc-Butil-dimetil-silanoloximetil)-5-oxo-pirrolidin-1-il]-heptanonitrilo. Se añadió una solución de 5R-(terc-butyl-dimetil-silanoloximetil)-pirrolidin-2-ona (Tetrahedron: Asymmetry, 1996, 7, 2113) (20,00 g, 87,19 mmol) en DMF (50 ml) a una mezcla de NaH (60% en aceite, 3,826 g, 0,0959 mmol, lavada con 20 ml de DMF) en DMF (250 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas y se añadió una solución de 7-bromoheptanonitrilo (16,574 g, 87,19 mmol) en DMF (50 ml). La reacción se agitó

155
25
7

a 90°C durante 3 horas. La reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se añadió agua (750 ml). La solución acuosa se lavó con EtOAc (4x250 ml). Las soluciones orgánicas reunidas se lavaron con agua (2x250 ml), se
5 secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron. La purificación por cromatografía de media presión eluyendo con un gradiente de disolvente (hexanos:EtOAc 9:1 hasta hexanos:EtOAc 7:3 hasta hexanos EtOAc 1:1) proporcionó el
10 7-[2R-(terc-butil-dimetil-silaniloximetil)-5-oxo-pirrolidin-1-il]-heptanonitrilo (22,46 g). RMN de ¹H (CDCl₃)
δ 3,69-3,55 (m, 4H), 2,99 (m, 1H), 2,42 (m, 1H), 2,34-2,24 (m, 3H), 2,05 (m, 1H), 1,81 (m, 1H), 1,67-1,42 (m, 6H), 1,31 (m, 2H), 0,86 (s, 9H), 0,03 (s, 6H); EM 339,3 (M+1).

Etapas B: 7-(2R-Hidroximetil-5-oxo-pirrolidin-1-il)-
15 heptanonitrilo. Se añadió lentamente una solución de fluoruro de tetrabutilamonio (1M en THF, 100,0 ml, 100,0 mmol) a una solución de 7-[2R-(terc-butil-dimetil-silaniloximetil)-5-oxo-pirrolidin-1-il]-heptanonitrilo (22,39 g, 66,13 mmol) en THF (400 ml) a 0°C. La reacción se
20 calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 4 horas. Se añadió NaHCO₃ acuoso saturado (250 ml) y los volátiles se eliminaron a vacío. La solución acuosa que quedó se lavó con CHCl₃ (4x200 ml). Las soluciones orgánicas reunidas se secaron (MgSO₄), se filtraron y se
25 concentraron. La purificación por cromatografía de media

presión eluyendo con un gradiente de disolvente (hexanos:EtOAc 9:1 hasta hexanos:EtOAc 4:1 hasta hexanos:EtOAc 7:3 hasta hexanos:EtOAc 6:4 hasta hexanos:EtOAc 1:1 hasta EtOAc hasta EtOAc:MeOH 9:1) proporcionó el 7-(2R-hidroxiometil-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanonitrilo (14,922 g). RMN de ^1H (CDCl_3) δ 3,78 (dd, 1H), 3,71-3,58 (m, 3H), 3,00 (m, 1H), 2,46 (m, 1H), 2,36-2,27 (m, 3H), 2,08 (m, 1H), 1,93 (m, 1H), 1,77 (m, 1H), 1,68-1,43 (m, 6H), 1,32 (m, 2H); EM 225,1 (M+1).

10

Preparación 2

Éster etílico del ácido 7-(2R-hidroxiometil-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico

Etapas A: Éster etílico del ácido 7-[2R-(terc-butil-dimetil-silaniloximetil)-5-oxo-pirrolidin-1-il]-heptanoico.

15 Siguiendo el procedimiento descrito para la Preparación 1, Etapa A, se hizo reaccionar con 7-bromoheptanoato de etilo (32,559 g, 137,3 mmol) durante 3 horas a 90°C el anión derivado de 5R-(terc-butil-dimetil-silaniloximetil)-pirrolidin-2-ona (30,00 g, 130,8 mmol) y NaH (60% en aceite, 5,756 g, 143,9 mmol) en DMF (600 ml). La purificación por cromatografía de media presión eluyendo con un gradiente de disolvente (hexanos:EtOAc 9:1 hasta hexanos EtOAc 4:1 hasta hexanos:EtOAc 7:3 hasta hexanos:EtOAc 6:4) proporcionó el éster etílico del ácido 25 7-[2R-(terc-butil-dimetil-silaniloximetil)-5-oxo-

pirrolidin-1-il]-heptanoico (39,46 g). RMN de ^1H (CDCl_3) δ 4,10 (q, 2H), 3,62 (m, 4H), 2,95 (m, 1H), 2,42 (m, 1H), 2,27 (m, 3H), 2,04 (m, 1H), 1,81 (m, 1H), 1,65-1,26 (m, 8H), 1,23 (t, 3H), 0,86 (s, 9H), 0,03 (s, 6H); EM 386,2
5 (M+1).

Etapas B: Éster etílico del ácido 7-(2R-hidroxiometil-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico. Siguiendo el procedimiento descrito para la Preparación 1, Etapa B, se desprotegió el éster etílico del ácido 7-[2R-(terc-butil-dimetil-
10 silaniloximetil)-5-oxo-pirrolidin-1-il]-heptanoico (39,46 g, 102,3 mmol) con TBAF (1M en THF, 154,0 ml, 154,0 mmol) con un tiempo de reacción de 2,5 horas. La purificación por medio de cromatografía de media presión eluyendo con un gradiente de disolvente hexanos:EtOAc 9:1 hasta
15 hexanos:EtOAc 6:4 hasta hexanos:EtOAc 1:1 hasta EtOAc hasta EtOAc:MeOH 19:1) proporcionó el éster etílico del ácido 7-(2R-hidroxiometil-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico (25,41 g). RMN de ^1H (CDCl_3) δ 4,10 (q, 2H), 3,77 (dd, 1H), 3,64 (m, 3H), 2,96 (m, 1H), 2,46 (m, 1H), 2,35-2,25 (m, 3H),
20 2,08 (m, 1H), 1,93 (m, 1H), 1,71 (m, 1H), 1,63-1,27 (m, 8H), 1,23 (t, 3H); EM 272,2 (M+1).

Preparación 3

Éster dimetílico del ácido [2-oxo-3-(3-trifluorometil-fenil)-propil]-fosfónico

25 Etapas A: N-Metoxi-N-metil-2-(3-trifluorometil-fenil)-

158
97

-75-

acetamida. Se añadió trietilamina (2,25 ml) a una solución de clorhidrato de N,O-dimetilhidroxilamina (1,577 g, 16,2 mmol) en DMF (25 ml) y CH_2Cl_2 (25 ml) a 0°C. Después de agitar durante 5 minutos, se añadieron ácido 3-trifluorometilfenilacético (3,0 g, 14,7 mmol), HOBT (3,177 g, 23,5 mmol) y DEC (clorhidrato del cloruro de 2-dietilaminoetilo, 3,10 g, 16,2 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas y se concentró a vacío. El residuo se diluyó con EtOAc y la solución orgánica se lavó sucesivamente con NaOH 1N (2 veces), agua y salmuera. La solución orgánica se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró a vacío. La cromatografía de media presión (EtOAc al 20% en hexanos hasta EtOAc al 50% en hexanos) proporcionó la N-metoxi-N-metil-2-(3-trifluorometil-fenil)-acetamida.

Etapas B: Éster dimetílico del ácido [2-oxo-3-(3-trifluorometil-fenil)-propil]-fosfónico. Se añadió lentamente n-BuLi (2,5M en hexanos, 28 ml, 70 mmol) a una solución de dimetilmetilfosfonato (9,4 g, 75,8 mmol) en tolueno (80 ml) a -78°C. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora y se añadió lentamente una solución de N-metoxi-N-metil-2-(3-trifluorometil-fenil)-acetamida (14,39 g) en tolueno (50 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 2,5 horas y se añadió AcOH (40 ml). La mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se añadió

-76-

agua. La capa orgánica se lavó con agua, seguido por salmuera. La solución orgánica se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró a vacío. La cromatografía de media presión (CH_2Cl_2 hasta MeOH al 2% en CH_2Cl_2) proporcionó el compuesto 5 del título de la Preparación 3 (9,37 g). RMN de ^1H (CDCl_3) δ 7,52 (m, 1H), 7,44 (m, 2H), 7,37 (m, 1H), 3,96 (s, 2H), 3,87 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 3,12 (d, 2H).

Preparación 4

10 Éster dimetílico del ácido [3-(3-cloro-fenil)-2-oxo-propil]-fosfónico

Sustituyendo los materiales apropiados, se preparó el compuesto del título de la Preparación 4 siguiendo un procedimiento análogo al descrito para la Preparación 3.

Preparación 5

15 Éster dimetílico del ácido [3-(3-cloro-fenil)-2-oxo-propil]-fosfónico

Se añadió lentamente $n\text{-BuLi}$ (2,5M, 64,2 ml, 160,6 mmol) a una solución de dimetilmetilfosfonato (17,93 g, 144 mmol) en THF (270 ml) a -78°C . La mezcla de reacción se 20 agitó durante 1 hora y se añadió lentamente éster metílico del ácido (3-cloro-fenil)-acético (26,93 g, 146 mmol). La mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 24 horas. Se añadió AcOH (15 ml) y los volátiles se eliminaron a vacío. El residuo se 25 diluyó con CH_2Cl_2 y la solución orgánica se lavó

160
17

-77-

cuidadosamente con NaHCO_3 acuoso saturado (3 veces). La
capa orgánica se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró a
vacío. La purificación por medio de cromatografía de media
presión (EtOAc al 20% en hexanos hasta EtOAc) proporcionó
5 el compuesto del título (9,28 g).

Preparación 6

Tetrahidro-pirrolidin-3,5-diona

El compuesto del título de la Preparación 6 se preparó
siguiendo el procedimiento descrito en la patente de los
10 Estados Unidos número 4.663.464.

Preparación 7

Éster etílico del ácido 7-(2R-formil-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico

Se añadió clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-
15 etilcarbodiimida (3,46 g, 18,03 mmol) y DMSO (1,5 ml, 24,04
mmol) a una solución de éster etílico del ácido 7-(2R-
hidroximetil-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico (1,63 g,
6,01 mmol) en benceno (50 ml). La solución se enfrió hasta
0°C y se añadió trifluoroacetato de piridinio (1,28 g, 6,61
20 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 15
minutos y luego a temperatura ambiente durante 2 horas. La
solución se decantó del residuo oleoso. El residuo se lavó
con benceno (3 veces) y las aguas de lavado del benceno
reunidas se concentraron a vacío proporcionando el éster
25 etílico del ácido 7-(2R-formil-5-oxo-pirrolidin-1-il)-

161
163

-78-

heptanoico, que se usó sin purificación posterior.

Preparación 8

Éster metílico del ácido 4-(3-{2-[4-bifenil-3-il-3-(terc-
butil-dimetil-silanoloxi)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-
5 propil)-benzoico

Etapas A: 5-(3-Bromo-3-oxo-butil)-pirrolidin-2-ona. Se
añadió bromuro de 3-bromobencilmagnesio (0,25 M en Et₂O,
155 ml, 38,8 mmol), gota a gota, a una solución de
tetrahidropirrolizina-3,5-diona (5 g, 36 mmol) en CH₂Cl₂ (320
10 ml) a 0°C. La solución se agitó a 0°C durante 2 horas y se
inactivó con cloruro amónico acuoso saturado. Se añadió HCl
1N acuoso para llegar a un pH de 3. Después de calentar
hasta temperatura ambiente, la solución acuosa se extrajo
con CH₂Cl₂ (3 veces). Los extractos orgánicos reunidos se
15 secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron. La
purificación por cromatografía de media presión usando un
gradiente de disolvente (hexanos:EtOAc 1:1 hasta EtOAc
hasta MeOH al 5% en CH₂Cl₂) proporcionó la 5-(3-bromo-3-oxo-
butil)-pirrolidin-2-ona (7,84 g). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,41-
20 7,11 (m, 4H), 6,24 (s ancho, 1H), 3,67 (s, 2H), 3,60 (m,
1H), 2,52 (t, 2H), 2,32 (m, 2H), 2,20 (m, 1H), 1,88-1,60
(m, 3H).

Etapas B: 5-(3-Bromo-3-hidroxi-butil)-pirrolidin-2-ona. Se
añadió NaBH₄ (480 mg, 12,6 mmol) a una solución de 5-(3-
25 bromo-3-oxo-butil)-pirrolidin-2-ona (7,84 g, 25,3 mmol) en

EtOH (130 ml) y la reacción se agitó a 0°C durante 2,5 horas. La reacción se inactivó con cloruro amónico acuoso saturado. Se añadieron agua y CH₂Cl₂. La capa acuosa se lavó con CH₂Cl₂ (3 veces) y los extractos orgánicos reunidos se
5 secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron. La purificación por cromatografía de media presión usando un gradiente de disolvente (hexanos:EtOAc 1:1 hasta EtOAc hasta MeOH al 1% en CH₂Cl₂ hasta MeOH al 3% en CH₂Cl₂ hasta MeOH al 5% en CH₂Cl₂ hasta MeOH al 8% en CH₂Cl₂) proporcionó
10 la 5-(3-bromo-3-hidroxi-butil)-pirrolidin-2-ona (6,76 g). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,36-7,09 (m, 4H), 6,27 (d, 1H), 3,78 (m, 1H), 3,63 (m, 1H), 2,75 (m, 1H), 2,62 (m, 1H), 2,32-2,18 (m, 3H), 1,88 (m, 1H), 1,73-1,42 (m, 5H); EM 312,2, 314,1 (M⁺).

15 Etapas C: 5-[3-Bromo-3-(terc-butil-dimetil-silanilo)-butil]-pirrolidin-2-ona. Se añadió cloruro de terc-butildimetilsililo (3,59 g, 23,8 mmol), seguido por imidazol (2,95 g, 43,3 mmol) y DMAP (264 mg, 2,16 mmol) a una solución de 5-(3-bromo-3-hidroxi-butil)-pirrolidin-2-
20 ona (6,76 g, 21,6 mmol) en DMF (86 ml). La reacción se agitó durante 24 horas y se inactivó con cloruro amónico acuoso saturado. La solución acuosa se lavó con EtOAc (3 veces) y los extractos orgánicos reunidos se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron. La purificación
25 por cromatografía de media presión usando un gradiente de

163
167

-80-

disolvente (CH₂Cl₂ hasta MeOH al 1% en CH₂Cl₂ hasta MeOH al 3% en CH₂Cl₂ hasta MeOH al 5% en CH₂Cl₂ hasta MeOH al 8% en CH₂Cl₂) proporcionó la 5-[3-bromo-3-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-butil]-pirrolidin-2-ona (7,45 g). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,30 (m, 2H), 7,12 (m, 1H), 7,04 (m, 1H), 5,71 (m, 1H), 3,81 (m, 1H), 3,56 (m, 1H), 2,66 (m, 2H), 2,32-2,17 (m, 3H), 1,70-1,35 (m, 5H), 0,82 (s, 9H), -0,06 (d, 3H), -0,24 (d, 3H); EM 426,2, 428,2 (M+).

Etapas D: 5-[4-Bifenil-3-il-3-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-butil]-pirrolidin-2-ona. Se añadió ácido fenilborónico (236 mg, 1,93 mmol) a una solución de 5-[3-bromo-3-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-butil]-pirrolidin-2-ona (750 mg, 1,76 mmol) en DME (15 ml). Se añadieron acetato de paladio (26,8 mg, 0,088 mmol) y tri-*o*-tolilfosfina (39,5 mg, 0,176 mmol), seguido de una solución de Na₂CO₃ (37,3 mg, 3,52 mmol) en agua (1,8 ml). La reacción se calentó a reflujo durante 24 horas. La reacción se enfrió y los volátiles se eliminaron a vacío. El residuo se diluyó con salmuera y EtOAc. La solución acuosa se lavó con EtOAc (3 veces) y los extractos orgánicos reunidos se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron. La purificación por cromatografía de media presión eluyendo con un gradiente de disolvente (hexanos:EtOAc 1:1 hasta EtOAc hasta MeOH al 1% en CH₂Cl₂ hasta MeOH al 3% en CH₂Cl₂ hasta MeOH al 5% en CH₂Cl₂) proporcionó la 5-[4-bifenil-3-

164
177

-81-

il-3-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-butil]-pirrolidin-2-
ona (717,3 mg). RMN de ^1H (CDCl_3) δ 7,57 (m, 2H), 7,43 (m,
2H), 7,33 (m, 3H), 7,11 (m, 2H), 5,78 (m, 1H), 3,91 (m,
1H), 3,59 (m, 1H), 2,76 (m, 2H), 2,27 (m, 3H), 1,73-1,38
5 (m, 5H), 0,83 (s, 9H), -0,03 (d, 3H), -0,16 (d, 3H); EM
424,3 (M+1).

Preparación 9

5-[3-(terc-Butil-dimetil-silaniloxi)-4-(3-fluoro-fenil)-
butil]-pirrolidin-2-ona

10 EtapA A: 5-[4-(3-Fluoro-fenil)-3-oxo-butil]-pirrolidin-2-
ona. Siguiendo el procedimiento descrito para la
Preparación 8, Etapa A, se hizo reaccionar tetrahydro-
pirrolizina-3,5-diona (2 g, 14 mmol) con cloruro de 3-
fluorobencilmagnesio (0,25M en Et_2O , 62 ml, 15,5 mmol)
15 durante 2,5 horas. La purificación por cromatografía de
media presión usando un gradiente de disolvente
(hexanos:EtOAc 1:1 hasta EtOAc:hexanos 2:1 hasta EtOAc
hasta MeOH al 2% en CH_2Cl_2 hasta MeOH al 10% en CH_2Cl_2)
proporcionó la 5-[4-(3-fluoro-fenil)-3-oxo-butil]-
20 pirrolidin-2-ona (2,1730 g). RMN de ^1H (CDCl_3) δ 7,32-7,27
(m, 1H), 7,00-6,90 (m, 3H), 6,12 (s ancho, 1H), 3,69 (s,
2H), 3,59 (m, 1H), 2,52 (t, 2H), 2,30 (m, 2H), 2,19 (m,
1H), 1,75 (m, 2H), 1,65 (m, 1H).

EtapA B: 5-[4-(3-Fluoro-fenil)-3-hidroxi-butil]-pirrolidin-
25 2-ona. Siguiendo el procedimiento descrito para la

165
169

Preparación 8, Etapa B, se redujo 5-[4-(3-fluoro-fenil)-3-oxo-butil]-pirrolidin-2-ona (2,17 g, 8,71 mmol) con NaBH₄ (165 mg, 4,35 mmol). La purificación por cromatografía de media presión usando un gradiente de disolvente (hexanos:EtOAc 1:1 hasta EtOAc hasta MeOH al 1% en CH₂Cl₂, hasta MeOH al 3% en CH₂Cl₂, hasta MeOH al 6% en CH₂Cl₂) proporcionó la 5-[4-(3-fluoro-fenil)-3-hidroxi-butil]-pirrolidin-2-ona (2,23 g). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,27 (m, 1H), 6,94 (m, 3H), 6,38 (m, 1H), 3,82 (m, 1H), 3,66 (m, 1H), 2,79 (m, 1H), 2,67 (m, 1H), 2,33-2,21 (m, 3H), 1,92 (d, J=4,15 Hz, 1H), 1,75-1,40 (m, 5H); EM 252,2 (M+1).

Etapa C: 5-[3-(terc-Butil-dimetil-silanoloxi)-4-(3-fluoro-fenil)-butil]-pirrolidin-2-ona. Siguiendo el procedimiento descrito para la Preparación 8, Etapa C, se hizo reaccionar la 5-[4-(3-fluoro-fenil)-3-hidroxi-butil]-pirrolidin-2-ona (2,23 g, 8,87 mmol) con cloruro de terc-butildimetilsililo (1,47 g, 9,76 mmol). La purificación por cromatografía de media presión usando un gradiente de disolvente (hexanos:EtOAc 1:1 hasta EtOAc hasta MeOH al 1% en CH₂Cl₂, hasta MeOH al 2% en CH₂Cl₂, hasta MeOH al 4% en CH₂Cl₂) proporcionó la 5-[3-(terc-butyl-dimetil-silanoloxi)-4-(3-fluoro-fenil)-butil]-pirrolidin-2-ona (2,84 g). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,23 (m, 1H), 6,88 (m, 3H), 5,75 (m, 1H), 3,85 (m, 1H), 3,57 (m, 1H), 2,71 (m, 2H), 2,30 (m, 2H), 2,25 (m, 1H), 1,70-1,38 (m, 5H), 0,84 (s, 9H), 0 (s, 3H), -0,2 (s,

166
897

3H).

Preparación 10

5-[3-(terc-Butil-dimetil-silaniloxy)-4-(4-fluoro-fenil)-butil]-pirrolidin-2-ona

5 EtapA A: 5-[4-(4-Fluoro-fenil)-3-oxo-butyl]-pirrolidin-2-ona. Siguiendo el procedimiento descrito para la Preparación 8, Etapa A, se hizo reaccionar tetrahidropirrolizina-3,5-diona (1,41 g, 10,1 mmol) con cloruro de 4-fluorobencilmagnesio (0,25M en Et₂O, 50 ml, 12,5 mmol) durante 5 horas. La purificación por cromatografía de media presión (MeOH al 2% en CH₂Cl₂) proporcionó la 5-[4-(4-fluoro-fenil)-3-oxo-butyl]-pirrolidin-2-ona (2,64 g). RMN de ¹H (CDCl₃) δ 7,18 (m, 2H), 7,03 (m, 2H), 6,34 (m, 1H), 3,70 (s, 2H), 3,62 (m, 1H), 2,54 (t, 2H), 2,34-2,15 (m, 15 3H), 1,82-1,61 (m, 3H).

EtapA B: 5-[4-(4-Fluoro-fenil)-3-hidroxi-butyl]-pirrolidin-2-ona. Siguiendo el procedimiento descrito para la Preparación 8, Etapa B, se redujo 5-[4-(4-fluoro-fenil)-3-oxo-butyl]-pirrolidin-2-ona (2,64 g, mmol) con NaBH₄ (400 mg, mmol) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió más NaBH₄ (150 mg) y la reacción se agitó durante 20 horas. La purificación por cromatografía de media presión usando un gradiente de disolvente (CH₂Cl₂ hasta MeOH al 2% en CH₂Cl₂ hasta MeOH al 4% en CH₂Cl₂) proporcionó la 5-[4-(4-fluoro-25 fenil)-3-hidroxi-butyl]-pirrolidin-2-ona (2,01 g). RMN de

167
164

-E4-

^1H (CDCl_3) δ 7,14 (m, 2H), 6,98 (m, 2H), 6,78 (m, 1H), 3,76 (m, 1H), 3,65 (m, 1H), 2,76 (m, 1H), 2,64 (m, 1H), 2,32-2,18 (m, 4H), 1,72-1,47 (m, 5H).

Etapas C: 5-[3-(terc-Butil-dimetil-silaniloxy)-4-(4-fluoro-fenil)-butil]-pirrolidin-2-ona. Siguiendo el procedimiento descrito para la Preparación 8, Etapa C, se hizo reaccionar la 5-[4-(4-fluoro-fenil)-3-hidroxi-butil]-pirrolidin-2-ona (1,95 g, 7,79 mmol) con cloruro de terc-butildimetilsililo (1,47 g, 9,76 mmol). La purificación por cromatografía de media presión usando un gradiente de disolvente (MeOH al 1% en CH_2Cl_2) proporcionó la 5-[3-(terc-butil-dimetil-silaniloxy)-4-(4-fluoro-fenil)-butil]-pirrolidin-2-ona. RMN de ^1H (CDCl_3) δ 7,12 (m, 2H), 6,97 (m, 2H), 5,75 (m, 1H), 3,83 (m, 1H), 3,60 (m, 1H), 2,71 (m, 2H), 2,36-2,24 (m, 3H), 1,70-1,38 (m, 5H), 0,84 (s, 9H), -0,05 (d, 3H), -0,2 (d, 3H).

Preparación 11

Éster dimetílico del ácido [2-oxo-3-(3-fenoxi-fenil)-propil]-fosfónico

El compuesto del título de la Preparación 11 se preparó de forma análoga a la descrita para el compuesto de la Preparación 5, sustituyendo los materiales apropiados.

168
G.T.

Habiendo descrito la invención como antecede, se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES

① 1. Uso de un agonista selectivo del receptor EP4, uno de sus profármacos, o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho agonista selectivo del receptor EP4 o de dicho profármaco para la manufactura de una composición para el tratamiento de un trastorno que presenta una masa ósea reducida en un mamífero.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho trastorno es osteoporosis, fragilidad, una fractura osteoporótica, un defecto óseo, pérdida ósea idiopática de la infancia, pérdida ósea alveolar, pérdida ósea mandibular, fractura ósea, osteotomía, pérdida ósea asociada a periodontitis o crecimiento protésico interno.

3. Uso según la reivindicación 2, en el que dicha composición se administra por vía sistémica.

4. Uso según la reivindicación 2, en el que dicha composición se administra por vía local.

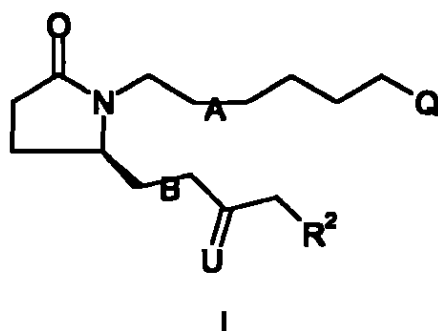
5. Uso según la reivindicación 2, en el que dicho trastorno es fragilidad.

6. Uso según la reivindicación 2, en el que dicho trastorno es osteoporosis.

7. Uso según la reivindicación 2, en el que dicho trastorno es una fractura ósea o una fractura osteoporótica.

8. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho agonista selectivo de EP4 es un compuesto de Fórmula I:

169
77



uno de sus profármacos o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho compuesto o de dicho profármaco, en la que:

Q es COOR³, CONHR⁴ o tetrazol-5-ilo;

A es un enlace sencillo o cis-doble;

B es un enlace sencillo o trans-doble;

U es



R² es α-tienilo, fenilo, fenoxi, fenilo monosustituido y fenoxi monosustituido, siendo dichos sustituyentes cloro, fluoro, fenilo, metoxi, trifluorometilo o alquilo C₁-C₃;

R³ es hidrógeno, alquilo C₁-C₅, fenilo o p-bifenilo;

R⁴ es COR⁵ o SO₂R⁵; y

R⁵ es fenilo o alquilo C₁-C₅.

9. Uso según la reivindicación 8, en el que dicho agonista selectivo del receptor EP4 es un compuesto de Fórmula I, siendo Q un 5-tetrazolilo y U un



10. Uso según la reivindicación 9, en el que dicho compuesto es 5R-(3S-hidroxi-4-fenil-but-1-enil)-1-[6-(1H-tetrazol-5-il)-hexil]-pirrolidín-2-ona.

170
172

11. Uso según la reivindicación 9, en el que dicho compuesto es 5S-(3R-hidroxi-4-fenil-butil)-1-[6-(1H-tetrazol-5-il)-hexil]-pirrolidin-2-ona.

12. Uso según la reivindicación 9, en el que dicho compuesto es 5S-(4-3-(cloro-fenil)-3R-hidroxi-butil)-1-(6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil)-pirrolidin-2-ona.

13. Uso según la reivindicación 9, en el que dicho compuesto es 5S-(3R-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-butil)-1-(6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil)-pirrolidin-2-ona.

14. Uso según la reivindicación 8, en el que dicho agonista selectivo del receptor EP4 es un compuesto de Fórmula I, siendo Q un COOH y U un



15. Uso según la reivindicación 14, en el que dicho compuesto es ácido 7-(2S-(3R-hidroxi-4-fenil-butil)-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico.

16. Uso según la reivindicación 14, en el que dicho compuesto es ácido 7-[2R-(3S-hidroxi-4-fenil-but-1-enil)-5-oxo-pirrolidin-1-il]-heptanoico.

17. Uso según la reivindicación 14, en el que dicho compuesto es ácido 7-{2S-[3R-hidroxi-4-(3-trifluorometoxi-fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico.

18. Uso según la reivindicación 14, en el que dicho compuesto es ácido 7-{2S-[3R-hidroxi-4-(3-fenoxi-fenil)-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico.

19. Uso según la reivindicación 14, en el que dicho compuesto es ácido 7-(2S-(3R-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-butil)-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico.

171
7

20. Uso según la reivindicación 14, en el que dicho compuesto es ácido 7-{2S-[4-(3-cloro-fenil)-3R-hidroxi-butyl]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico.

21. Uso según la reivindicación 8, en el que dicho compuesto se selecciona de ácido 7-{2S-[3R-hidroxi-4-(3-fenoxi-fenil)-butyl]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico; ácido 7-(2S-(3R-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-butyl)-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico; ácido 7-{2S-[4-(3-cloro-fenil)-3R-hidroxi-butyl]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico; 5S-(4-(3-(cloro-fenil)-3R-hidroxi-butyl)-1-[6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil]-pirrolidin-2-ona; y 5S-(3R-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-butyl)-1-(6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil)-pirrolidin-2-ona.

22. Un compuesto seleccionado de ácido 7-{2S-[3R-hidroxi-4-(3-fenoxi-fenil)-butyl]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico; ácido 7-(2S-(3R-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-butyl)-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico; ácido 7-{2S-[4-(3-cloro-fenil)-3R-hidroxi-butyl]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico; 5S-(4-(3-(cloro-fenil)-3R-hidroxi-butyl)-1-[6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil]-pirrolidin-2-ona; y 5S-(3R-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-butyl)-1-(6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil)-pirrolidin-2-ona.

23. El compuesto según la reivindicación 22, que es ácido 7-{2S-[3R-hidroxi-4-(3-fenoxi-fenil)-butyl]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico.

24. El compuesto según la reivindicación 22, que es 5S-(4-(3-(cloro-fenil)-3R-hidroxi-butyl)-1-(6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil)-pirrolidin-2-ona.

25. El compuesto según la reivindicación 22, que es ácido 7-(2S-(3R-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-butyl)-5-oxo-pirrolidin-1-il)-heptanoico.

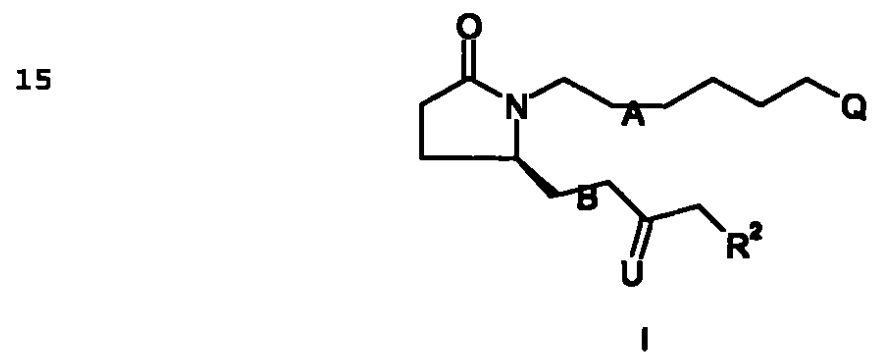
172
171
171

26. El compuesto según la reivindicación 22, que es ácido 7-{2S-[4-(3-cloro-fenil)-3R-hidroxi-butil]-5-oxo-pirrolidin-1-il}-heptanoico.

27. El compuesto según la reivindicación 22, que es 5S-(3R-hidroxi-4-(3-trifluorometil-fenil)-butil)-1-(6-(2H-tetrazol-5-il)-hexil)-pirrolidin-2-ona.

RESUMEN

Esta invención se refiere a procedimientos para tratar trastornos que presentan una masa ósea reducida, en particular osteoporosis, fragilidad, una fractura
5 osteoporótica, un defecto óseo, pérdida ósea idiopática de la infancia, pérdida ósea alveolar, pérdida ósea mandibular, fractura ósea, osteotomía, pérdida ósea asociada a periodontitis o recremento protésico, que comprenden administrar agonistas de prostaglandinas que son
10 agonistas de prostaglandinas selectivos para el receptor EP4. Esta invención se refiere especialmente a los procedimientos en los que el agonista selectivo del receptor EP4 es un compuesto de Fórmula I:



20 en la que las variables son como se han definido en la memoria descriptiva.

Folio 178
Extra para publicación
202050
Oct 17 2002

Folios 176 y 177
tarjetas

Q

REQUISITOS MINIMOS PARA ADN

Fax Bogotá: 334 12 21-23-4
Fax a Medellín: 300-18-22 35-43-44
Trámite: 102 PATENTES y REGISTRO
Inspección: 102 PATENTES y REGISTRO

PATENTE DE INVENCION [☒]

MODELO DE UTILIDAD []

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [☒]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [☒]
- Descripción de la invención [☒]
- Dibujos de ser estos pertinentes []
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [☒]

COMPLETA [☒]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. []
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño. []
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado. []
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. []
- Representación gráfica del esquema de trazado []
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha: _____

Carrera 13 No. 27-00 Pto 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-23-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@ic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

2020
Bogotá, D.C.

Doctor
CARLOS R. OLARTE
Apoderado sustituto

REFERENCIA:	Radicación No.	00-97391
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio No.	0881
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Debe allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el Inventor al solicitante o a su causante (art. 26-k, Dec 486/2000).

- Debe indicarse tanto el nombre como el domicilio del inventor (Art. 27-e, D 486/00).

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la Resolución Reglamentaria No. 210 del 15 de enero del 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

29 MAR. 2001 :

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.

202027/202022

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 382 2695
E-mail: info@sc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia