



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 948**

51 Int. Cl.:

C07D 207/44 (2006.01)

C07D 285/08 (2006.01)

C07D 209/48 (2006.01)

C07C 49/597 (2006.01)

A61K 31/433 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01928117 .9**

86 Fecha de presentación : **11.05.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1286964**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **05.03.2003**

54

Título: **Inhibidores heterocíclicos del glicógeno sintasa quinasa GSK-3.**

30

Prioridad: **11.05.2000 ES 200001185**
12.12.2000 GB 0030284

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2008

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2008

73

Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad Autónoma de Madrid**

72

Inventor/es: **Martínez Gil, Ana;**
Castro Morera, Ana;
Pérez Martín, María Concepción;
Alonso Cascón, Mercedes;
Dorronsoro Díaz, Isabel;
Moreno Muñoz, Francisco José y
Wandosell Jurado, Francisco

74

Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

ES 2 288 948 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidores heterocíclicos del glicógeno sintasa quinasa GSK-3.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a inhibidores heterocíclicos del glicógeno sintasa quinasa GSK-3 y a su uso para el tratamiento de una enfermedad en la que está implicado el GSK-3.

10 **Antecedentes de la invención**

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un procedimiento neurodegenerativo caracterizado por trastornos cognitivos asociados con un deterioro progresivo de la función colinérgica, y lesiones neuropatológicas tales como placas seniles, formadas por el β -amiloide fibrilar, y entramados neurofibrilares, haces de filamentos helicoidales emparejados.

15 En términos generales, la AD está restringida a grupos de edad de 60 años o más y es la causa más común de demencia en la población anciana. Hoy en día, la AD afecta a 23 millones de personas en el mundo entero. A medida que se incrementa la longevidad, se estima que en el año 2050 el número de casos de AD se habrá más que triplicado [L. Amaduci; L. Fratiglioni, "Epidemiology of AD: Impact on the treatment", in *Alzheimer Disease: Therapeutic Strategies*, E. Giacobini y R. Becker, Eds. Birkhäuser, EEUU, 1994, pág. 8].

20 Se observan dos lesiones histológicas principales en los cerebros de AD asociados con la pérdida neuronal: entramados neurofibrilares y placas seniles en el nivel intracelular y extracelular respectivamente ["Alzheimer Disease: From molecular biology to therapy", E. Giacobini y R. Becker, Eds. Birkhäuser, EEUU, 1996].

25 Los entramados neurofibrilares son estructuras formadas por los filamentos helicoidales emparejados (PHF). Están principalmente comprendidos de la proteína asociada a microtúbulos (MAP) tau en un estado anormalmente hiperfosforilado [I. Grundke-Iqbal; K. Iqbal; Y. C. Tung; M. Quinlan; H. M. Wisniewski; L. I. Binder, "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 4913-4917; I. Grundke-Iqbal; K. Iqbal; M. Quinlan; Y. C. Tung; M. S. Zaidi; H. M. Wisniewski, "Microtubule-associated protein tau. A component of the Alzheimer paired helical filaments", *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 6084-6089; S. G. Greenberg; P. Davies; J. D. Schein; L. I. Binder, "Hydrofluoric acid-treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau", *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 564-569]. Dicha fosforilación aberrante de tau, determinada por los efectos de diferentes proteínas quinasas y fosfatasa, parece comprometer su capacidad de unirse a y de estabilizar los microtúbulos y esto puede contribuir a la patología de la AD [F. J. Moreno; M. Medina; M. Pérez; E. Montejo de Garcini; J. Ávila, "Glycogen sintase kinase 3 phosphorylation of different residues in the presence of different factors: Analysis on tau protein", *FEBS Lett.*, 1995, 372, 65-68]. De este modo, el bloqueo de esta etapa de hiperfosforilación puede ser un primer objetivo en el que interrumpir la cascada patogénica. Los inhibidores selectivos de las quinasas tau pueden ser nuevos fármacos efectivos para el tratamiento de la AD. La búsqueda de inhibidores de las quinasas tau es un campo de un gran interés. El tau puede ser fosforilado por diferentes proteínas quinasas dirigidas a la prolina (PDKs) y no-PDKs. Sin embargo, en la AD el papel exacto de cualquiera de estas quinasas en la hiperfosforilación anormal de tau no ha sido todavía entendido y hasta la fecha, no se ha encontrado sobre-regular la actividad de estas quinasas. No hay duda de que el glicógeno sintasa quinasa 3β (GSK- 3β) es una quinasa tau *in vivo* en el cerebro [S. Lovestone; C. L. Hartley; J. Pearce; B. H. Anderton, "Phosphorylation of tau by glycogen synthase-3 in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules", *Neuroscience*, 1996, 73, 1145-1157; U. Wagner; M. Utton; J. M. Gallo; C. C. Miller, "Cellular phosphorylation of tau by GSK- 3β influences tau binding to microtubules and microtubule organization", *J. Cell. Sci.*, 1996, 109, 1537-1543; M. Ledesma; F. J. Moreno; M. M. Pérez; J. Ávila, "Binding of apolipoprotein E3 to tau protein: effects on tau glycation, tau phosphorylation and tau-microtubule binding, *in vitro*", *Alzheimer Res.*, 1996, 2, 85-88]. Estos descubrimientos abren la puerta al uso de los inhibidores de GSK- 3β como agentes terapéuticos en el tratamiento de la AD. Hasta el momento se conocen pocos compuestos con esta propiedad inhibitoria enzimática. El litio se comporta como un inhibidor específico de la familia de proteínas quinasas de GSK- 3β *in vitro* y en células intactas J. R. Muñoz-Montaña; F. J. Moreno; J. Ávila; J. Díaz-Nido, "Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons", *FEBS Lett.*, 1997, 411, 183-188]. Martínez y col., [Biorganic and Medicinal Chemistry 5, 1275-1283; 1997] hace referencia a arylamino-1,2,4-thiazolidinonas; una nueva familia de operadores de canales de potasio.

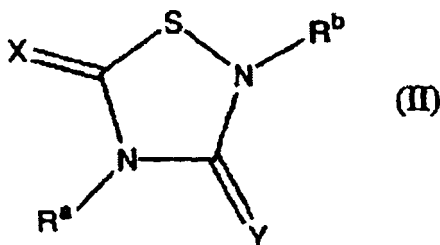
30 Finalmente, se observó que el GSK- 3β inactiva la insulina y se ha demostrado que la diabetes mellitus dependiente de la insulina se desarrolló con la activación de esta enzima. De este modo, los inhibidores de GSK- 3β serán una nueva terapia para la diabetes mellitus no dependiente de la insulina.

60 En nuestro equipo de trabajo hemos descubierto recientemente una nueva familia de pequeñas moléculas heterocíclicas sintéticas con propiedades inhibitorias de GSK- 3β a nivel micromolar.

65

Descripción de la invención

La invención está dirigida al uso de un compuesto que tiene la fórmula general (II)



en donde

20 R^a y R^b están seleccionados de forma independiente entre hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo, arilo, $(Z)_n$ -arilo, heteroarilo, $-OR^3$, $-C(O)R^3$, $-C(O)OR^3$, $-(Z)_n-C(O)OR^3$ y $-S(O)_t$;

Z está seleccionado de forma independiente entre $-C(R^3)(R^4)-$, $-C(O)-$, $-O-$, $-C(=NR^3)-$, $-S(O)_t-$ y $N(R^3)-$;

25 n es cero, uno o dos;

t es cero, uno o dos;

R^3 y R^4 están independientemente seleccionados entre hidrógeno, alquilo, arilo y heterocíclico;

30 X e Y están independientemente seleccionados entre $=O$, $=S$, $=N(R^3)$ y $=C(R^1)(R^2)$; y

R^1 y R^2 están independientemente seleccionados entre hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo, arilo, $(Z)_n$ -arilo, heteroarilo, $-OR^3$, $-C(O)R^3$, $-C(O)OR^3$, $-(Z)_n-C(O)OR^3$ y $-S(O)_t$

35 en la preparación de una composición farmacéutica para un método de tratamiento de una enfermedad en la que está implicado el GSK-3, comprendiendo el método la administración a un humano que precise dicho tratamiento de una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula (II).

40 **Descripción detallada de la invención**

Tal como se utiliza en la presente invención y en las reivindicaciones añadidas, a no ser que se especifique de modo contrario, los siguientes términos tienen el significado indicado:

45 “Alquilo” hace referencia a un radical de cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que consiste en átomos de carbono e hidrógeno, no conteniendo saturación, teniendo entre uno y ocho átomos de carbono, y que está unida al resto de la molécula por un enlace simple, por ej., metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo, etc. Los radicales alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes seleccionados de forma independiente entre el grupo que consiste en una halo, hidroxilo, alcoxi, carboxi, ciano, carbonilo, acilo, alcocarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

50 “Alcoxi” hace referencia a un radical de fórmula $-OR_a$ en donde R_a es un radical alquilo tal como se ha definido anteriormente, por ej., metoxi, etoxi, propoxi, etc

55 “Alcoxycarbonilo” hace referencia a un radical de la fórmula $-C(O)OR_a$ en donde R_a es un radical alquilo tal como se ha definido anteriormente, por ej., metoxycarbonilo, etoxycarbonilo, propoxycarbonilo, etc.

60 “Alquiltio” hace referencia a un radical de la fórmula $-SR_a$ donde R_a es un radical alquilo tal como se ha definido anteriormente, por ej., metilitio, etiltio, propiltio, etc.

“Amino” hace referencia a un radical de la fórmula $-NH_2$.

65 “Arilo” hace referencia a un radical fenilo o naftilo, preferiblemente a un radical fenilo. El radical arilo puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo que consiste en hidroxilo, mercapto, halo, alquilo, fenilo, alcoxi, haloalquilo, nitro, ciano, dialquilamino, aminoalquilo, acilo y alcocarbonilo, tal como se definen en la presente memoria.

ES 2 288 948 T3

“Aralquilo”	hace referencia a un grupo arilo unido a un grupo alquilo. Ejemplos preferidos incluyen bencilo y fenetilo.
5 “Acilo”	hace referencia a un radical de fórmula $-C(O)-R_c$ y $-C(O)-R_d$ en donde R_c es un radical alquilo tal como se ha definido anteriormente y R_d es un radical arilo tal como se ha definido anteriormente, por ej., acetilo, propionilo, benzoilo, y similares.
10 “Aroialquilo”	hace referencia a un grupo alquilo sustituido con $-C(O)-R_d$. Ejemplos preferidos incluyen benzoilmetilo.
“Carboxi”	hace referencia a un radical de la fórmula $-C(O)OH$.
“Ciano”	hace referencia a un radical de fórmula $-CN$
15 “Cicloalquilo”	hace referencia a un radical monocíclico o bicíclico estable de 3- a 10- miembros que está saturado o parcialmente saturado, y que consiste únicamente en átomos de carbono e hidrógeno. A no ser que se establezca específicamente de otro modo en la especificación, el término “cicloalquilo” pretende incluir radicales cicloalquilo que están opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes seleccionados de forma independiente entre el grupo que consiste en
20 “Arilo fusionado”	hace referencia a un grupo arilo, especialmente un grupo fenilo o heteroarilo, fusionado al anillo de cinco miembros.
25 “Halo”	hace referencia a bromo, cloro, yodo o fluoro.
“Haloalquilo”	hace referencia a un radical alquilo, tal como se ha definido anteriormente, que está sustituido por uno o más radicales halo, tal como se han definido anteriormente, por ej., trifluorometilo, triclorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 1-fluorometil-2-fluoroetilo, y similares.
30 “Heterociclo”	hace referencia a un radical heterociclilo. El heterociclo hace referencia a un anillo de 3- a 15- miembros que consiste en átomos de carbono y entre uno y cinco heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno, y azufre, preferiblemente un anillo de 4- a 8- miembros con uno o más heteroátomos, más preferiblemente un anillo de 5- o 6- miembros con uno o más heteroátomos. Para los objetivos de esta invención, el heterociclo puede ser un sistema de anillo monocíclico, bicíclico o tricíclico, que puede incluir sistemas de anillo fusionados; y los átomos de nitrógeno, carbono o azufre en el radical heterociclilo pueden estar opcionalmente oxidados; el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado; y el radical heterociclilo puede estar parcialmente o totalmente saturado o ser aromático.
35 “Heteroarilo”	hace referencia a un heterociclo aromático.
40 “Mercapto”	hace referencia a un radical de fórmula $-SH$.
45 “Nitro”	hace referencia a un radical de la fórmula $-NO_2$.

50 De acuerdo con una realización preferida, la enfermedad en la que está implicado el GSK-3 es la enfermedad de Alzheimer o la diabetes mellitus no dependiente de la insulina. De acuerdo con otra realización preferida, la enfermedad es una enfermedad hiperproliferativa, tal como el cáncer, displasias o metaplasmas de tejido, soriasis, arterosclerosis o restenosis.

De acuerdo con una realización preferida, en la fórmula (II), X e Y están preferiblemente seleccionados entre oxígeno, azufre, y $-NR^3$ en donde R^3 es heterociclo, especialmente un heterociclo de 6-miembros que tiene un heteroátomo que es nitrógeno, siendo opcionalmente aromático y estando opcionalmente oxidado o cuaternizado. Preferiblemente X es oxígeno, más preferiblemente, tanto X como Y son ambos oxígeno.

Preferiblemente, R^a y R^b están seleccionados de forma independiente entre hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo (opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre alquilo, halo y alcoxi), $-C(R^3)(R^4)$ -arilo (estando la parte arilo opcionalmente sustituida con un grupo seleccionado entre alquilo, halo y alcoxi),

$-OR^3$, $-C(O)OR^3$ y $-C(R^3)(R^4)-C(O)OR^3$, y R^3 y R^4 están seleccionados de forma independiente entre hidrógeno,

alquilo y heterociclo.

Más preferiblemente R^a y R^b están seleccionados de forma independiente entre alquilo, arilo (opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre alquilo, halo y alcoxi), $-\text{CH}_2$ -arilo (estando la parte arilo opcionalmente sustituida con un grupo seleccionado entre alquilo, halo y alcoxi), y $-\text{CH}_2\text{-C(O)OR}^3$ en donde R^3 es hidrógeno o alquilo.

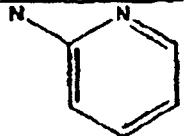
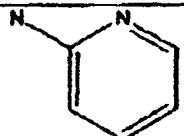
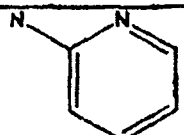
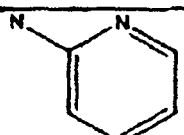
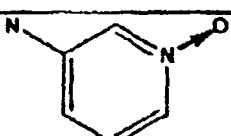
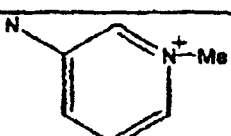
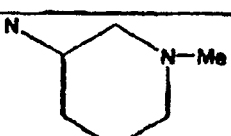
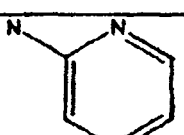
Todavía más preferiblemente, R^a y R^b están seleccionados de forma independiente entre metilo, etilo, propilo, bencilo, fenilo (opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre metilo, fluoro, cloro, bromo y metoxi) y $-\text{CH}_2\text{-C(O)O-}$ etilo.

Otro grupo preferido de compuestos son aquellos en los que R^a y R^b están seleccionados de forma independiente entre hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo (opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre alquilo, halo y alcoxi), $-\text{C(R}^3\text{)(R}^4\text{)-}$ arilo (estando la parte arilo opcionalmente sustituida con un grupo seleccionado entre alquilo, halo y alcoxi), $-\text{OR}^3$, $-\text{C(O)OR}^3$ y $-\text{C(R}^3\text{)(R}^4\text{)-C(O)OR}^3$, en donde R^3 y R^4 están independientemente seleccionados entre hidrógeno, alquilo y heterociclo, y X e Y están independientemente seleccionados entre $=\text{O}$, $=\text{S}$ y $=\text{NR}^3$.

Preferiblemente, R^a y R^b están seleccionados de forma independiente entre hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo (opcionalmente sustituidos con un grupo seleccionado entre metilo, fluoro, cloro, bromo y metoxi) y $-\text{CH}_2\text{-C(O)O-}$ etilo; en donde X es $=\text{O}$ e Y es $=\text{O}$.

En una realización preferida, el compuesto de fórmula (II) encaja con una de las siguientes posibilidades:

R^a	R^b	X	Y
CH_2Ph	Me	O	O
Et	Me	O	O
Et	nPr	O	O
Et	cyclohexyl	O	O
Ph	Me	O	O
$\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$	Me	O	O
4-OMePh	Me	O	O
CH_2Ph	Et	O	O
Et	iPr	O	O
CH_2Ph	Et	O	S
CH_2Ph	CH_2Ph	O	S
Ph	Ph	O	S

Et	Et	O	S
Cyclohexyl	Me	O	O
4-MePh	Me	O	O
4-BrPh	Me	O	O
4-FPh	Me	O	O
4-ClPh	Me	O	O
Et	Me		O
Et	Et		O
Et	H		O
Me	Me		O
Et	Me		O
Et	Me		O
Et	Me		O
Et	Me		S

ES 2 288 948 T3

Los compuestos más preferidos de fórmula (II) son los del grupo siguiente:

R ^a	R ^b	X	Y
CH ₂ Ph	Me	O	O

Et	Me	O	O
Ph	Me	O	O
CH ₂ CO ₂ Et	Me	O	O
4-OMePh	Me	O	O
4-MePh	Me	O	O
4-BrPh	Me	O	O
4-FPh	Me	O	O
4-ClPh	Me	O	O
CH ₂ Ph	CH ₂ Ph	O	S
Ph	Ph	O	S

Un aspecto adicional de la presente invención es una formulación farmacéutica que contiene como ingrediente activo un compuesto de fórmula (II) tal como se ha definido anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (II) en donde dicho compuesto es uno de los siguientes:

R ^a	R ^b	X	Y
CH ₂ Ph	Me	O	O
CH ₂ CO ₂ Et	Me	O	O
4-OMePh	Me	O	O
4-MePh	Me	O	O
4BrPh	Me	O	O

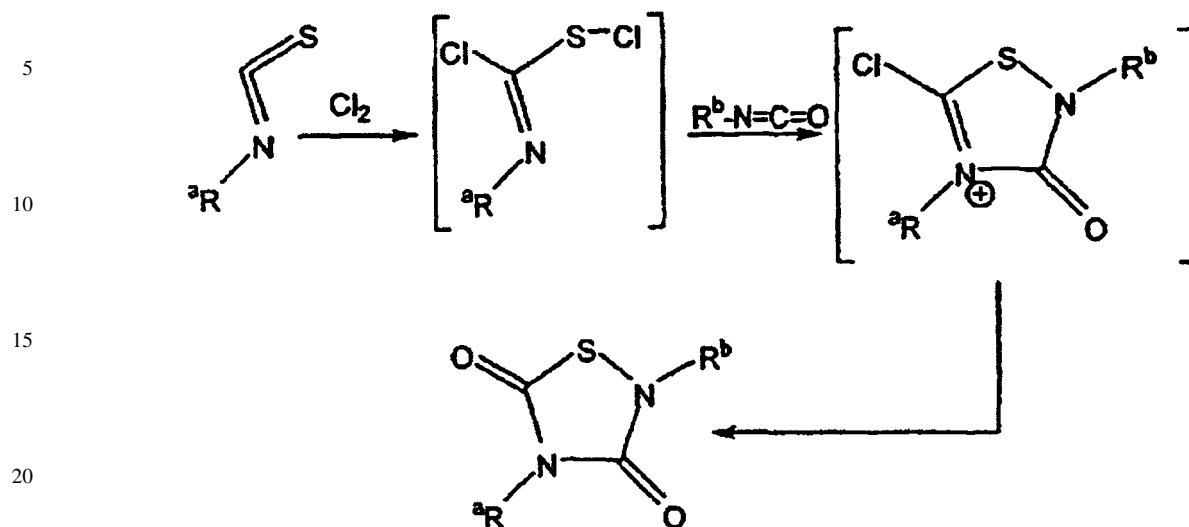
Síntesis de los compuestos de la invención

Los compuestos de la invención pueden ser sintetizados por procedimientos disponibles.

Para los compuestos preferidos de fórmula (II), está disponible un procedimiento general [A. Martínez; A. Castro; I. Cardelús, J. Llenas; J. M. Palacios, *Bioorg. Med. Chem.*, 1997, 5, 1275-1283].

Concretamente, los compuestos de fórmula general (II) y los recogidos en la Tabla I, se prepararon siguiendo el procedimiento sintético descrito en el esquema 1, y utilizando la reactividad de los cloruros de N-alkil-S-[N'-clorocarbamoil]amino]isotiocarbamoilo con diferentes isocianatos. La cloración de los isocianatos se lleva a cabo por adición de una cantidad equimolecular de cloro sobre una solución de hexano del mencionado isocianato a -15°C. La reacción del cloruro de iminiclouroalquilsulfenilo formado con arquil o arilisocianato bajo atmósfera inerte e hidrólisis subsiguiente, rindió las tiadiazolidindionas descritas en la tabla I.

Esquema 1



Los compuestos típicos de esta invención inhiben de forma selectiva el GSK-3 β sin inhibición de otras proteínas tales como PKA, PKC, CK-2 y Cdk2, que pueden eliminar los efectos de expansión. El GSK-3 β está implicado en la etiopatogénesis de la AD y es el responsable de la hiperfosforilación anormal de la proteína tau. Los inhibidores selectivos aquí descritos pueden ser utilizados en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas asociadas a la patología de la proteína tau, especialmente para la AD que forma parte de esta invención. La acción inhibitoria de estos compuestos contra el GSK-3 β permite el diseño de fármacos capaces de detener la formación de entramados neurofibrilares, uno de las señales presentes en este proceso neurodegenerativo.

Estos compuestos pueden ser útiles en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de otras patologías en las que está implicado el GSK-3 β , tal como la diabetes mellitus no dependiente de la insulina.

De forma adicional, estos compuestos pueden ser útiles en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas tales como displasias y metaplasmas de diferentes tejidos, soriasis, arterioesclerosis, restenosis y cáncer, debido a su inhibición del ciclo celular que forma parte de esta invención.

De acuerdo con ello, la presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de esta invención junto con un soporte o diluyente farmacéuticamente aceptable. Las formas de dosificación apropiadas y las velocidades de dosificación pueden ser concebidas y adoptadas de acuerdo con la práctica convencional.

Ejemplos

Ejemplo 1

Inhibición enzimática de los compuestos de la invención

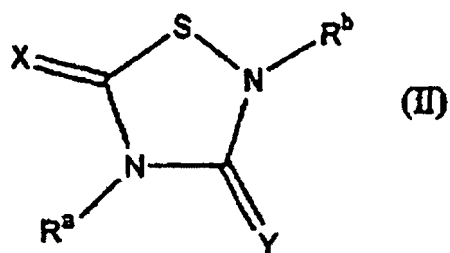
Inhibición del GSK-3 β : Se determinó la actividad del GSK-3 por incubación de una mezcla de enzima de GSK-3 (Sigma), una fuente de fosfato y un sustrato de GSK-3 en presencia y en ausencia del correspondiente compuesto de ensayo, y por medición de la actividad del GSK-3 de esta mezcla.

De forma concreta, se determinó la actividad del GSK-3 por incubación de la enzima a 37°C durante 20 minutos en un volumen final de 12 μ l de tampón (50 mM de tris, pH = 7,5, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 1 mM de DTT, 10 mM de Cl₂Mg) suplementado con 15 μ M (concentración final) del péptido sintético GS 1 [J. R. Woodgett, "Use of peptides for affinity purification of protein-serine kinases", *Anal. Biochem.* 1989, 180, 237-241] como sustrato, 15 μ M de ATP, 0,2 μ Ci de [γ ³²P]ATP y diferentes concentraciones del compuesto de ensayo. La reacción se finalizó por adición de una alícuota de la mezcla de reacción en papeles p81 de fosfocelulosa.

Estos papeles se lavaron tres veces con ácido fosfórico al 1% y la radioactividad incorporada al péptido GS 1 se midió en un contador de centelleo líquido.

Los compuestos mostrados en la tabla I son representativos de la actividad inhibitoria del GSK-3 objeto de esta invención. Los valores de la CI₅₀ (concentración a la que se produce un 50% de inhibición de la enzima) se muestran a continuación en la Tabla 3.

TABLA 3



15

20

25

30

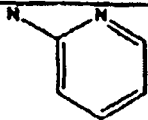
35

40

45

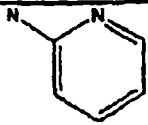
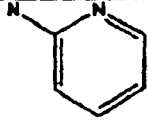
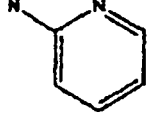
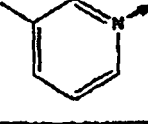
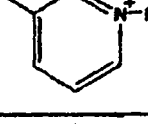
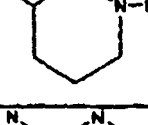
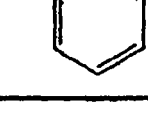
50

55

R ^a	R ^b	X	Y	IC ₅₀ (μM)
CH ₂ Ph	Me	O	O	1
Et	Me	O	O	5
Et	nPr	O	O	10
Et	cyclohexyl	O	O	10
Ph	Me	O	O	2
CH ₂ CO ₂ Et	Me	O	O	5
4-OMePh	Me	O	O	5
CH ₂ Ph	Et	O	O	7
Et	iPr	O	O	35
CH ₂ Ph	Et	O	S	6
CH ₂ Ph	CH ₂ Ph	O	S	10
Ph	Ph	O	S	20
Et	Et	O	S	20
Cyclohexyl	Me	O	O	>100
4-MePh	Me	O	O	5
4-BrPh	Me	O	O	3
4-FPh	Me	O	O	4
4-ClPh	Me	O	O	4
Et	Me		O	>100

60

65

5	Et	Et		O	>100
10	Et	H		O	>100
15	Me	Me		O	>100
20	Et	Me		O	>100
25	Et	Me		O	>100
30	Et	Me		O	>100
35	Et	Me		S	10

40 *Inhibición del GSK-3*: Los experimentos de inhibición también se llevaron a cabo a concentraciones variables de ATP (de hasta 50 μM) y en todos los casos se obtuvo el mismo valor de la CI_{50} . Esto podría sugerir que las tiadiazolindionas no compiten con la ATP en la unión al GSK-3.

Los primeros cuatro compuestos se ensayaron para la inhibición de otras enzimas.

45 *Inhibición de la proteína quinasa A (PKA)*: Se evaluó la inhibición potencial de esta enzima por determinación de la fosforilación de la estatmina por la proteína quinasa A (PKA). Se purificó la estatmina siguiendo el procedimiento descrito por Belmont y Mitchinson (L. D. Belmont; T. J. Mitchinson, "Identification of a protein that interact with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubule" *Cell*, 1996, 84, 623-631).

50 Concretamente, se utilizó PKA purificada (Sigma, subunidad catalítica de corazón de bovino (p 2645)) y 10-15 μg de sustrato (estatmina) en un volumen total de 25 μl de solución de tampón conteniendo 20 μM de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP. Se llevó a cabo la cAMP proteína quinasa (100 ng/reacción) en 50 μl de hepes 25 mM, pH 7,4, 20 mM de MgCl_2 , 2 mM de EGTA, 2 mM de ditiotretitol, 0,5 mM de Na_2VO_4 . Después de que tuviera lugar la reacción, se añadió un tampón para finalizar la reacción, se hirvió la mezcla de reacción a 100°C durante 5 minutos y se caracterizó la proteína fosforilada por electroforesis sobre gel y se cuantificó por autoradiografía.

En estas condiciones ninguno de los compuestos ensayados mostró ninguna inhibición del PKA.

60 *Inhibición de la proteína quinasa C (PKC)*: Se evaluó la inhibición potencial de esta enzima por determinación de la fosforilación del péptido PANLTPPKSPGEPK (Woodgett, J. R. "Use of peptides for affinity purification of protein-serine kinases", *Anal. Biochem.*, 1989, 180, 237-241) por la proteína quinasa C (PKC) utilizando fosfatidil serina como agente estimulante. El método seguido es el mismo que se ha descrito anteriormente para el GSK-3.

65 Concretamente, se utilizó la PKC purificada de cerebros de rata siguiendo el método descrito por Walsh (M. P. Walsh; K. A. Valentine; P. K. Nagi; C. A. Corruthers; M. D. Hollenberg, *J. Biochem.*, 1984, 224, 117-127) y 1-10 mM de sustrato en un volumen total de 25 μl de una solución de tampón adecuada conteniendo 10 μM de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP.

En estas condiciones ninguno de los compuestos ensayados mostró ninguna inhibición de la PKC.

ES 2 288 948 T3

Inhibición de la casein quinasa 2 (CK-2): Se ha medido la actividad fosforilante de esta enzima frente a la estatmina utilizando CK-2 purificada de cerebros de bovino, siguiendo el método descrito por Alcázar (A. Alcázar; E. Marín; J. López-Fando; M. Salina, "An improved purification procedure and properties of casein kinase II from brain", *Neurochem. Res.*, 1988, 13, 829-836), con 3,6 μM del sustrato en un volumen total de 25 μl de una solución tampón adecuada conteniendo 20 μM ($\gamma\text{-}^{32}\text{P}$)ATP. Los ensayos de CK-2 se llevaron a cabo con estatmina como sustrato (ver determinación de PKA) en 50 μl de Hepes, pH 7,4, 20 mM de MgCl_2 , 2 mM de EGTA, 2 mM de ditioneol, 0,5 mM de Na_3VO_4 y 100 ng de CK-2 purificado. Después de que tenga lugar la reacción, se siguió el mismo método descrito para PKA.

En estas condiciones ninguno de los compuestos ensayados mostró ninguna inhibición del CK2.

Inhibición de la protein quinasa dependiente de ciclina: Se ha medido la actividad fosforilante de esta encima contra la histona H1 utilizando Cdc2 (Calbiochem) siguiendo el método descrito por Kobayashi (H. Kobayashi; E. Stewart; R.Y. Poon; T. Hunt "Cyclin A and cyclin B dissociate from p34cdc2 with half-times of 4 and 15h, respectively, regardless of the phase of the cell cycle", *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 29153-29160), con 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de sustrato en un volumen total de 25 μl de una solución tampón adecuada que contiene 20 μM ($\gamma\text{-}^{32}\text{P}$)ATP. Los ensayos Cdc2 se realizaron con histona H1 como sustrato (ver determinación del PKA) en 50 μl de tampón con pH 7.5, 50 mM de Tris-HCl, 10 mM de Cl_2Mg , 1 mM de DTT, 1 mM de Egta, 100 μM de ATP, 0.01% de BRIJ-35. Después de sucederse la reacción, se siguió el mismo método descrito para la PKA.

En estas condiciones ninguno de los compuestos ensayados mostró ninguna inhibición de Cdc2.

Ejemplo 2

Análisis del crecimiento de neuritas después del tratamiento con el fármaco

Las células se mantuvieron en un medio Dulbecco (DEMEM) con un 10% de suero de bovino fetal, glutamina (2 mM) y antibióticos. Para el análisis de la inhibición del GSK-3 potencial *in vivo*, se utilizaron cultivos de neuroblastomas N_2A (J. García-Pérez; J. Ávila; J. Díaz-Nido, "Lithium induces morphological differentiation of mouse neuroblastoma", *J. Neurol. Res.*, 1999, 57, 261-270). Se añadieron los compuestos de ensayo a estos cultivos de células. Esta línea celular tiene la particularidad de expresar un cierto tipo de fenotipo neuronal (extensiones neuríticas) después de la adición de cloruro de litio (10 mM), un inhibidor del GSK-3 conocido. Después de 2-3 días de cultivo, se comprobó el efecto de los compuestos ensayados recogidos en la tabla I. se observó la generación de extensión neurítica en la misma extensión que cuando se añadió litio. El hecho confirma la inhibición *in vivo* de GSK-3 de los compuestos de la invención.

Ejemplo 3

Bloqueo del ciclo celular

En paralelo, se estudió la interferencia potencial de estos compuestos con el ciclo celular en células N_2A . Se mantuvo el cultivo celular en un medio Dulbecco (DEMEM) con un suero de bovino fetal al 10%, glutamina (2 mM) y antibióticos.

Se ensayaron los primeros cuatro compuestos de fórmula general (II) reunidos en la Tabla 3 en las condiciones descritas y mostraron la capacidad de inhibir el ciclo celular a una concentración de inhibición comprendida entre 100 nM y 1 μM . Se observó inicialmente el bloqueo celular a concentraciones comprendidas entre 100-200 nM y fue totalmente efectivo a 1 μM .

Los compuestos ensayados fueron no tóxicos en cultivos de fibroblastos estacionarios MRC-5 después de 10 días de exposición continua a los inhibidores.

Ejemplo 4

Bloqueo del ciclo celular

En la Tabla 5, a continuación, se reunieron las CI_{50} para los compuestos ensayados en cultivos de células N_2A .

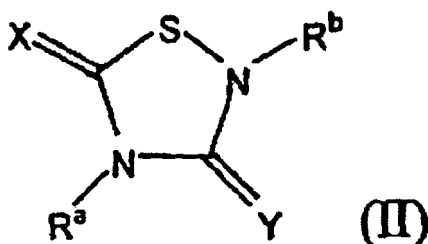
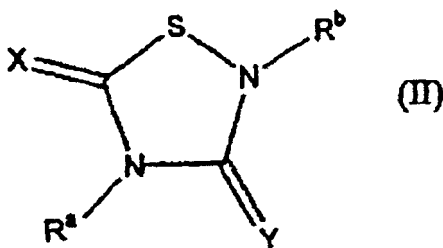


TABLA 5

R ^a	R ^b	X	Y	IC ₅₀ (μM)
CH ₂ Ph	Me	O	O	4-8
Et	Me	O	O	40-100
Et	nPr	O	O	5-10
Et	cyclohexyl	O	O	6-9
Ph	Me	O	O	4-7
CH ₂ CO ₂ Et	Me	O	O	1-2
4-OMePh	Me	O	O	1-2
CH ₂ Ph	Et	O	O	4-7
CH ₂ Ph	CH ₂ Ph	O	O	2-3
Et	Et	O	O	30-80
CH ₂ Ph	CH ₂ Ph	O	S	1-2
Ph	Ph	O	S	4-8

REIVINDICACIONES

1. El uso de un compuesto que tiene la fórmula general (II):



en donde

R^a y R^b están seleccionados de forma independiente entre hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo, arilo, $(Z)_n$ -arilo, heteroarilo, $-OR^3$, $-C(O)R^3$, $-C(O)OR^3$, y $-(Z)_n-C(O)OR^3$;

Z está seleccionado de forma independiente entre $-C(R^3)(R^4)-$, $-C(O)-$, $-O-$, $-C(=NR^3)-$, $-S(O)_t-$ y $N(R^3)-$;

n es cero, uno o dos;

t es cero, uno o dos;

R^3 y R^4 están independientemente seleccionados entre hidrógeno, alquilo, arilo y heterocíclico;

X e Y están independientemente seleccionados entre $=O$, $=S$, $=N(R^3)$ y $=C(R^1)(R^2)$; y

R^1 y R^2 están independientemente seleccionados entre hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo, arilo, $(Z)_n$ -arilo, heteroarilo, $-OR^3$, $-C(O)R^3$, $-C(O)OR^3$, y $-(Z)_n-C(O)OR^3$;

en la preparación de una composición farmacéutica para un método de tratamiento de una enfermedad en la que está implicado el GSK-3, comprendiendo el método la administración a un humano que precise dicho tratamiento de una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula (II).

2. Un uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enfermedad esté seleccionada entre la enfermedad de Alzheimer y la diabetes mellitus no dependiente de la insulina.

3. Un uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enfermedad es una enfermedad hiperproliferativa tal como el cáncer, displasias o metaplasmas de tejido, soriasis, arterioesclerosis o restenosis.

4. Un uso de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en donde el compuesto de fórmula (II), R^a y R^b están seleccionados de forma independiente entre hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo (opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre alquilo, halo y alcoxi), $-C(R^3)(R^4)$ -arilo (estando la parte arilo opcionalmente sustituida con un grupo seleccionado entre alquilo, halo y alcoxi), $-OR^3$, $-C(O)OR^3$ y $-C(R^3)(R^4)-C(O)OR^3$, y R^3 y R^4 están independientemente seleccionados entre hidrógeno, alquilo y heterociclo.

5. Un uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde en el compuesto de fórmula (II), R^a y R^b están seleccionados de forma independiente entre alquilo, arilo (opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre alquilo, halo y alcoxi), $-CH_2$ -arilo (estando la parte arilo opcionalmente sustituida con un grupo seleccionado entre alquilo, halo y alcoxi), y $-CH_2-C(O)OR^3$ y R^3 es hidrógeno o alquilo.

6. Un uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde en el compuesto de fórmula (II), R^a y R^b están seleccionados de forma independiente entre metilo, etilo, propilo, bencilo, fenilo (opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre metilo, fluoro, cloro, bromo y metoxi) y $-CH_2-C(O)O$ -etilo.

7. Un uso de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3, en donde en el compuesto de fórmula (II), X e Y están seleccionados de forma independiente entre $=O$, $=S$ y $=NR^3$ (en donde R^3 es heterociclo).

8. Un uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde en el compuesto de fórmula (II), X es $=O$.

9. Un uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde en el compuesto de fórmula (II), X es $=O$ e Y es $=O$.

ES 2 288 948 T3

10. Un uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en donde:

5 R^a y R^b están seleccionados de forma independiente entre hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo (opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre alquilo, halo y alcoxi), $-C(R^3)(R^4)$ -arilo (estando la parte arilo opcionalmente sustituida con un grupo seleccionado entre alquilo, halo y alcoxi), $-OR^3$, $-C(O)OR^3$ y $-C(R^3)(R^4)-C(O)OR^3$,

R^3 y R^4 están independientemente seleccionados entre hidrógeno, alquilo y heterociclo, y

10 X e Y están independientemente seleccionados entre $=O$, $=S$ y $=NR^3$.

11. Un uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde:

15 R^a y R^b están seleccionados de forma independiente entre hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo (opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre alquilo, halo y alcoxi), $-C(R^3)(R^4)$ -arilo (estando la parte arilo opcionalmente sustituida con un grupo seleccionado entre alquilo, halo y alcoxi), $-OR^3$, $-C(O)OR^3$ y $-C(R^3)(R^4)-C(O)OR^3$,

20 R^3 y R^4 están independientemente seleccionados entre hidrógeno y alquilo; y

X es $=O$.

25 12. Un uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde:

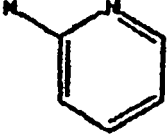
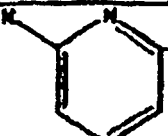
R^a y R^b están seleccionados de forma independiente entre metilo, etilo, propilo, bencilo, fenilo (opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado entre metilo, fluoro, cloro, bromo y metoxi), y $-CH_2-C(O)O$ -etilo;

30 X es $=O$; y

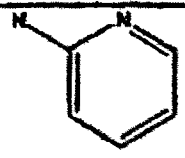
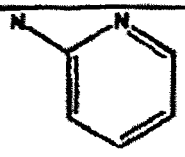
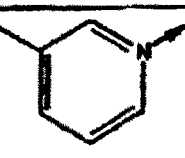
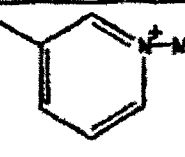
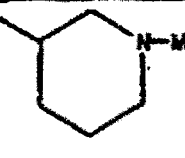
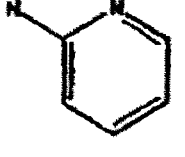
Y es $=O$.

35
40
45
50
55
60
65
(Tabla pasa a página siguiente)

13. Un uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto de Fórmula (II) se ajusta a una de las siguientes posibilidades:

R ^a	R ^b	X	Y
CH ₂ Ph	Me	O	O
Et	Me	O	O
Et	nPr	O	O
Et	cyclohexyl	O	O
Ph	Me	O	O
CH ₂ CO ₂ Et	Me	O	O
4-OMePh	Me	O	O
CH ₂ Ph	Et	O	O
Et	iPr	O	O
CH ₂ Ph	Et	O	S
CH ₂ Ph	CH ₂ Ph	O	S
Ph	Ph	O	S
Et	Et	O	S
Cyclohexyl	Me	O	O
4-MePh	Me	O	O
4-BrPh	Me	O	O
4-FPh	Me	O	O
4-ClPh	Me	O	O
Et	Me		O
Et	Et		O

5
10
15
20
25
30
35
40

Et	H		O
Me	Me		O
Et	Me		O
Et	Me		O
Et	Me		O
Et	Me		S

14. Un uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el compuesto de Fórmula (II) se ajusta a una de las siguientes posibilidades:

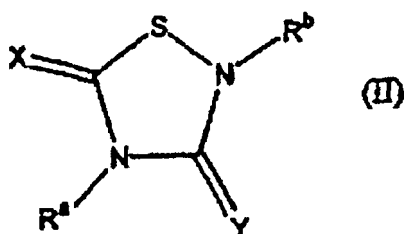
45
50
55
60
65

R ^a	R ^b	X	Y
CH ₂ Ph	Me	O	O
Et	Me	O	O
Ph	Me	O	O
CH ₂ CO ₂ Et	Me	O	O
4-OMePh	Me	O	O
4-MePh	Me	O	O
4-BrPh	Me	O	O

4-FPh	Me	O	O
4-ClPh	Me	O	O
CH ₂ Ph	CH ₂ Ph	O	S
Ph	Ph	O	S

15. Una formulación conteniendo como ingrediente activo un compuesto de fórmula (II) tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

16. Un compuesto teniendo la fórmula general (II):



en donde el compuesto es uno de los siguientes:

R ^a	R ^b	X	Y
CH ₂ Ph	Me	O	O
CH ₂ CO ₂ Et	Me	O	O
4-OMePh	Me	O	O
4-MePh	Me	O	O
4-BrPh	Me	O	O