

(11) Número de Publicação: **PT 1599461 E**

(51) Classificação Internacional:

C07D 335/02 (2007.10) **C07D 335/06** (2007.10)

C07D 495/04 (2007.10) **A61K 31/38** (2007.10)

A61P 25/00 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2004.03.03**

(30) Prioridade(s): **2003.03.03 US 450648 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.11.30**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.06.10**
138/2009

(73) Titular(es):

EISAI CORPORATION OF NORTH AMERICA
100 TICE BOULEVARD, WOODCLIFF LAKE
NEW JERSEY 07677

US

(72) Inventor(es):

BARBARA S. SLUSHER **US**
TAKASHI TSUKAMOTO **US**

(74) Mandatário:

ELSA MARIA MARTINS BARREIROS AMARAL CANHÃO
RUA DO PATROCÍNIO 94 1399-019 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **TIOLACTONAS COMO INIBIDORES DE NAALADASE**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

"TIOLACTONAS COMO INIBIDORES DE NAALADase"

Este pedido reivindica as vantagens do Pedido de Patente Provisório U.S. Nº 60/450648, apresentado em 3 de Março de 2003, cujo teor total é aqui dado como incorporado por citação.

Esta invenção proporciona novos compostos, composições farmacêuticas e kits de diagnóstico compreendendo esses compostos e métodos de utilização desses compostos para inibição da actividade enzimática de NAALADase, detecção de doenças em que estão alterados os níveis de NAALADase, inibição da angiogénese, exercício de uma actividade de TGF- β ou de uma actividade neuronal e tratamento de uma anomalia de glutamato, uma doença compulsiva, neuropatia, dor, uma doença da próstata, cancro, doença de Huntington, diabetes, uma doença retiniana ou glaucoma.

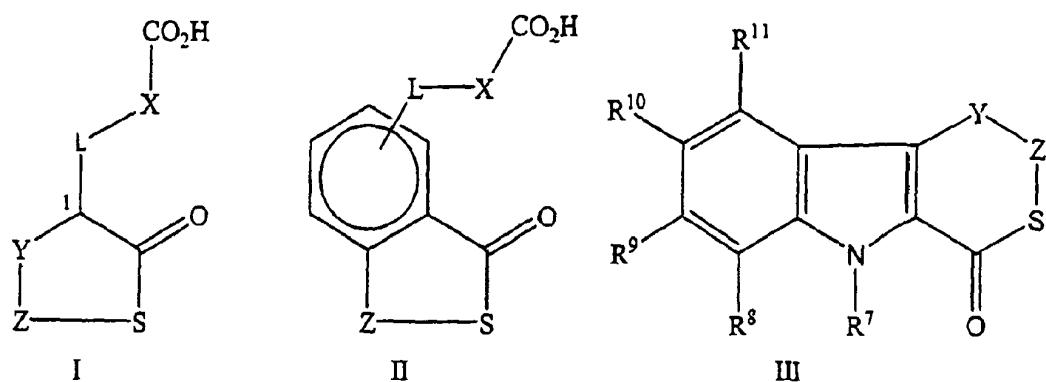
A enzima NAALADase, também conhecida como antigénio de membrana específico da próstata ("PSMA") e glutamato carboxipeptidase II humana ("GCP II"), catalisa a hidrólise do neuropéptido N-acetil-aspartil-glutamato ("NAAG") a N-acetil-aspartato ("NAA") e glutamato. Com base na homologia da sequência de aminoácidos, a NAALADase foi imputada à família M28 de peptidases.

Os estudos sugerem que os inibidores de NAALADase podem ser úteis no tratamento de isquemia, lesão da medula espinal, doenças desmielinizantes, doença de Parkinson, Esclerose Lateral Amiotrófica ("ALS"), doença de Huntington, dependência do

álcool, dependência da nicotina, dependência de opiáceos, cancro, neuropatia, dor e esquizofrenia, e na inibição da angiogénesis. Devido às suas aplicações terapêuticas potenciais, existe uma necessidade de novos inibidores de NAALADase e dos seus pró-fármacos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Esta invenção proporciona um composto de fórmula I, II ou III



ou os seus sais, hidratos e solvatos farmaceuticamente aceitáveis, em que:

X é alquílenoC₁-C₄, alcenílenoC₂-C₄, alcinílenoC₂-C₄, cicloalquílenoC₃-C₈, cicloalcenílenoC₅-C₇ ou Ar, em que o alquíleno, alceníleno, alciníleno, cicloalquíleno ou cicloalceníleno está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes;

L é uma ligação, -CR¹R²-, -O-, -S-, -SO₂- ou -NR¹-;

Y é $-O-$, $-S-$, $-CR^3R^4-$ ou $-NR^3-$;

Z é $-(CR^5R^6)_n-$;

n é 1, 2, 3 ou 4;

Ar é um radical arilo ou heteroarilo bivalente que está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes;

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 e R^6 são, independentemente, hidrogénio, alquilo C_1-C_4 ou alcenilo C_2-C_4 , em que o alquilo ou alcenilo está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes;

R^7 é hidrogénio, fenilo, feniletilo ou benzilo em que o fenilo, feniletilo ou benzilo está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes; e

R^8 , R^9 , R^{10} e R^{11} são, independentemente, hidrogénio, carboxilo, hidroxilo, halogéneo, nitro, ciano, alquilo C_1-C_4 ou alcoxilo C_1-C_4 ,

desde que quando o composto tem a fórmula I, n é 2, 3 ou 4; e

desde que quando o composto tem a fórmula I, L é uma ligação e X é etilo, então Y não é $-CR^3R^4-$; e

desde que quando o composto tem a fórmula III e quando R^8 , R^9 , R^{10} e R^{11} são hidrogénio, e Y e Z são grupos $-CH_2-$, então R^7 não é hidrogénio nem um grupo fenilo ou benzilo não substituído.

Esta invenção proporciona ainda uma composição farmacêutica e um kit de diagnóstico compreendendo o composto e um método de

utilização do composto para inibição da actividade da enzima NAALADase, detecção de uma doença em que os níveis de NAALADase estão alterados, inibição da angiogénese, influenciar uma actividade de TGF- β ou uma actividade neuronal e tratamento de uma anomalia de glutamato, um distúrbio compulsivo, neuropatia, dor, uma doença da próstata, cancro, doença de Huntington, diabetes, um distúrbio retiniano ou glaucoma.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A FIG. 1 é uma fotografia ampliada 27000x de um vaso sanguíneo retiniano de um rato não diabético de controlo.

A FIG. 2 é uma fotografia ampliada 27000x de um vaso sanguíneo retiniano de um rato diabético após seis meses de tratamento com um veículo.

A FIG. 3 é uma fotografia ampliada 27000x de um vaso sanguíneo retiniano de um rato diabético após seis meses de tratamento com o Composto B.

A FIG. 4 é um gráfico da evolução temporal das respostas de retirada da cauda de murganhos tratados com um placebo, um inibidor de NAALADase, morfina ou um inibidor de NAALADase com morfina.

A FIG. 5 é um gráfico de barras da média \pm S.E.M. dos valores da Área Sob a Curva (AUC).

DESCRÍÇÃO PORMENORIZADA

DEFINIÇÕES

"Composto B" refere-se a ácido 2-(3-sulfanilpropil)-pentanodióico.

"Composto D" refere-se a ácido 2-(2-sulfaniletil)-pentanodióico.

"Composto E" refere-se a ácido 3-carboxi-alfa-(3-mercaptopropil)benzenopropanóico.

"Composto F" refere-se a ácido 3-carboxi-5-(1,1-dimetiletil)-alfa-(3-mercaptopropil)benzenopropanóico.

"Alquilo" refere-se a um radical hidrocarboneto univalente saturado, de cadeia linear ou ramificada. Os exemplos incluem, sem limitação, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, n-pentilo e n-hexilo.

"Alquileno" refere-se a um radical hidrocarboneto bivalente saturado, de cadeia linear ou ramificada

"Alcenilo" refere-se a um radical hidrocarboneto univalente insaturado, de cadeia linear ou ramificada compreendendo, pelo menos, uma ligação dupla carbono-carbono. Os exemplos incluem, sem limitação, etenilo, propenilo, isopropenilo, butenilo, isobutenilo, terc-butenilo, n-pentenilo e n-hexenilo.

"Alcenileno" refere-se a um radical hidrocarboneto bivalente insaturado de cadeia linear ou ramificada que compreende, pelo menos, uma ligação dupla carbono-carbono.

"Alcinilo" refere-se a um radical hidrocarboneto univalente insaturado, de cadeia linear ou ramificada compreendendo, pelo menos, uma ligação tripla carbono-carbono. Os exemplos incluem, sem limitação, etinilo, propinilo, iso-propinilo, butinilo, isso-butinilo, terc-butinilo, pentinilo e hexinilo.

"Alcinileno" refere-se a um radical hidrocarboneto bivalente insaturado de cadeia linear ou ramificada que compreende, pelo menos, uma ligação tripla carbono-carbono.

"Cicloalquilo" refere-se a um radical alquilo cílico. Os exemplos incluem, sem limitação, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclo-hexilo, ciclo-heptilo e ciclooctilo.

"Cicloalquileno" refere-se a um radical alquilo cílico bivalente.

"Cicloalcenilo" refere-se a um radical alcenilo cílico univalente. Os exemplos incluem, sem limitação, ciclopentenilo, ciclo-hexenilo, ciclo-heptenilo e ciclooctenilo.

"Cicloalcenileno" refere-se a um radical alcenilo cílico bivalente.

"Alcoxilo" refere-se a um grupo alquilo ligado através de uma ligação oxigénio.

"Alcenoxilo" refere-se a um grupo alcenilo ligado através de uma ligação oxigénio.

"Arilo" refere-se a uma unidade hidrocarboneto aromático cílico, com um ou mais anéis fechados. Os exemplos incluem, sem limitação, fenilo, benzilo, naftilo, antracenilo, fenantracenilo

e bifenilo.

"Heteroarilo" refere-se a uma unidade aromática cíclica com um ou mais anéis fechados com um ou mais heteroátomos (por exemplo, enxofre, azoto ou oxigénio) em, pelo menos, um anel. Os exemplos incluem, sem limitação, pirrilo, furanilo, tienilo, piridinilo, oxazolilo, tiazolilo, benzofuranilo, benzotienilo, benzofuranilo e benzotienilo.

"Carbociclo" refere-se a uma unidade de hidrocarboneto cíclica com um ou mais anéis fechados que são alicíclicos, aromáticos, condensados e/ou em ponte. Os exemplos incluem sem limitação ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano, ciclo-hexano, ciclo-heptano, ciclopenteno, ciclo-hexeno, ciclo-hepteno, cicloocteno, benzilo, nafteno, antraceno, fenantraceno, bifenilo e pireno.

"Heterociclo" refere-se a uma unidade cíclica que tem um ou mais anéis fechados que são alicíclicos, aromáticos, condensados e/ou em ponte, com um ou mais heteroátomos (por exemplo, enxofre, azoto ou oxigénio) em, pelo menos, um dos anéis. Os exemplos incluem, sem limitação, pirrolidina, pirrole, tiazole, tiofeno, piperidina, piridina, isoxazolidina e isoxazole.

"Halogéneo" refere-se a um radical flúor, cloro, bromo ou iodo.

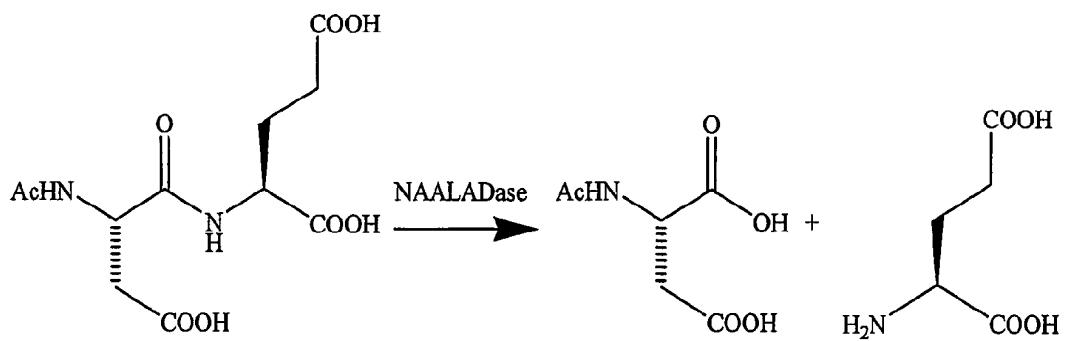
"Quantidade eficaz" refere-se à quantidade necessária para produzir um efeito desejado, por exemplo, inibir a actividade enzimática de NAALADase, tratar uma anomalia de glutamato, exercer uma actividade neuronal, tratar uma doença da próstata, tratar cancro, inibir angiogénese, exercer uma actividade de TGF- β , tratar a doença de Huntington, tratar diabetes, tratar um

distúrbio retiniano ou tratar glaucoma.

"NAAG" refere-se a N-acetil-aspartil-glutamato, um importante componente peptídico do cérebro, com níveis comparáveis ao principal inibidor neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA). O NAAG é específico de neurónios, presente nas vesículas sinápticas e libertado por estimulação neuronal em vários sistemas que se supõe serem glutamatérgicos. Os estudos sugerem que o NAAG pode funcionar como um neurotransmissor e/ou neuromodulador no sistema nervoso central ou como um precursor do neurotransmissor glutamato. Além disso, o NAAG é um agonista nos receptores de glutamato metabotrópicos do grupo II, especificamente os receptores mGluR3; quando ligado a uma unidade capaz de inibir NAALADase, espera-se que os ligandos dos receptores de glutamato metabotrópicos proporcionem inibidores de NAALADase potentes e específicos.

"NAALADase" refere-se a dipeptidase ácida α -ligada N-acetilada, uma metalopeptidase ligada à membrana que catabolisa NAAG a N-acetilaspartato ("NAA") e glutamato ("GLU"):

Catabolismo de NAAG por NAALADase



A NAALADase foi atribuída à família da peptidase M28 e é também chamada PSMA ou GCP II humana, número EC 3.4.17.21. Crê-se que a NAALADase é uma metalopeptidase de zinco/zinco co-catalítica. A NAALADase apresenta uma afinidade elevada para NAAG com uma Km de 540 nM. Se o NAAG é um péptido bioactivo, então a NAALADase pode servir para inactivar a acção sináptica de NAAG. Alternativamente, se o NAAG actua como um precursor de glutamato, a principal função da NAALADase pode ser regular a disponibilidade de glutamato sináptico.

"Inibição", no contexto de enzimas, refere-se a inibição enzimática reversível, tal como inibição competitiva, incompetitiva e não competitiva. As inibições competitiva, incompetitiva e não competitiva podem ser distinguidas pelos efeitos de um inibidor sobre a cinética de reacção de uma enzima. A inibição competitiva ocorre quando o inibidor se combina de modo reversível com a enzima de tal modo que compete com um substrato normal pela ligação ao sítio activo. A afinidade entre o inibidor e a enzima pode ser medida pela constante do inibidor, K_i , que é definida como:

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

em que $[E]$ é a concentração da enzima, $[I]$ é a concentração do inibidor e $[EI]$ é a concentração do complexo enzima-inibidor formado pela reacção da enzima com o inibidor. Salvo especificação em contrário, K_i refere-se à afinidade entre os compostos da invenção e a NAALADase. As formas de realização incluem um K_i inferior a 100 μM , inferior a 10 μM ou inferior a 1 μM , determinado utilizando qualquer ensaio apropriado

conhecido na técnica. "IC₅₀" é um termo relacionado utilizado para definir a concentração ou quantidade de um composto que é necessária para causar uma inibição de 50% da enzima alvo.

"Veículo farmaceuticamente aceitável" refere-se a um material, composição ou veículo farmaceuticamente aceitável, tal como um enchimento, diluente, excipiente ou solvente líquido ou sólido ou material de encapsulação, envolvido em levar ou transportar o composto em causa de um orgão, ou parte do corpo, para outro orgão ou parte do corpo. Cada veículo é "aceitável" no sentido de ser compatível com os outros ingredientes da formulação e de ser adequado para utilização com o doente. Exemplos de materiais que podem servir como um veículo farmaceuticamente aceitável incluem, sem limitação: (1) açúcares, tais como lactose, glucose e sacarose; (2) amidos, tais como amido de milho e fécula de batata; (3) celulose e os seus derivados, tais como carboximetilcelulose de sódio, etilcelulose e acetato de celulose; (4) tragacanta em pó; (5) malte; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tais como manteiga de cacau e ceras para supositórios; (9) óleos, tais como óleo de amendoim, óleo de sementes de algodão, óleo de cártamo, óleo de sésamo, azeite, óleo de milho e óleo de soja; (10) glicóis, tal como propilenoglicol; (11) polióis, tais como glicerina, sorbitol, manitol e polietilenoglicol; (12) ésteres, tais como oleato de etilo e laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, tais como hidróxido de magnésio e hidróxido de alumínio; (15) ácido algínico; (16) água isenta de pirogénios; (17) soro fisiológico isotônico; (18) solução de Ringer; (19) álcool etílico; (20) soluções tampão; (21) poliésteres, policarbonatos e/ou poli-anidridos; e (22) outras substâncias compatíveis não tóxicas utilizadas em formulações farmacêuticas.

"Sal farmaceuticamente aceitável" refere-se a um sal de ácido ou de base dos compostos da invenção, sal esse que possui a actividade farmacológica desejada e não é indesejável biologicamente nem de outra forma. O sal pode ser formado com ácidos que incluem, sem limitação, acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, benzenossulfonato, bissulfato, butirato, citrato, canforato, canforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanossulfonato, fumarato, gluco-heptanoato, glicerofosfato, hemissulfato, heptanoato, hexanoato, cloridrato, bromidrato, iodidrato, 2-hidroxietano-sulfonato, lactato, maleato, metanossulfonato, 2-naftalenossulfonato, nicotinato, oxalato, tiocianato, tosilato e undecanoato. Exemplos de um sal de base incluem, sem limitação, sais de amónio, sais de metais alcalinos, tais como sais de sódio e potássio, sais de metais alcalino-terrosos, tais como sais de cálcio e magnésio, sais com bases orgânicas, tais como sais de diciclo-hexilamina, N-metil-D-glucamina e sais com aminoácidos, tais como arginina e lisina. Em algumas formas de realização, os grupos que contêm azoto básico podem ser quaternizados com agentes incluindo halogenetos de alquilo inferior, tais como cloretos, brometos e iodetos de metilo, etilo, propilo e butilo; sulfatos de dialquilo, tais como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo e diamilo; halogenetos de cadeia longa, tais como cloretos, brometos e iodetos de decilo, laurilo, miristilo e estearilo; e halogenetos de aralquilo, tal como brometos de fenetilo.

"Radiossensibilizador" refere-se a um composto de baixo peso molecular administrado a animais em quantidades terapeuticamente eficazes para promover o tratamento de doenças que podem ser tratadas com radiação electromagnética. As doenças que podem ser tratadas com radiação electromagnética incluem, sem limitação, doenças neoplásicas, tumores benignos e malignos

e células cancerosas. O tratamento com radiação electromagnética de outras doenças não aqui listadas também está contemplado por esta invenção.

"Radiação electromagnética" inclui, sem limitação, radiação que tem um comprimento de onda de 10^{-20} a 10^0 metros. Os exemplos incluem, sem limitação, radiação gama (10^{-20} a 10^{-13} m), radiação de raios X (10^{-11} a 10^{-9} m), radiação ultravioleta (10 nm a 400 nm), radiação visível (400 nm a 700 nm), radiação infravermelha (700 nm a 1,0 mm) e radiação de micro-ondas (1 mm a 30 cm).

"Estereoisómeros" refere-se a isómeros que só diferem quanto à disposição dos átomos no espaço.

"Isómeros ópticos" refere-se a enantiómeros ou diastereoisómeros.

"Diastereoisómeros" refere-se a estereoisómeros que não são imagens num espelho um do outro. Os diastereoisómeros ocorrem em composto que têm dois ou mais átomos de carbono assimétricos; assim, esses compostos têm 2^n isómeros ópticos, em que n é o número de átomos de carbono assimétricos.

"Enantiómeros" refere-se a estereoisómeros que não são imagens num espelho sobreponíveis um do outro.

"Enriquecida enantiomericamente" refere-se a uma mistura em que predomina um enantiómero.

"Mistura racémica" refere-se a uma mistura contendo partes iguais de enantiómeros individuais.

"Mistura não racémica" refere-se a uma mistura contendo partes desiguais de enantiómeros individuais.

"Angiogénese" refere-se ao processo através do qual se formam novos capilares. A "inibição" da angiogénese pode ser medida por muitos parâmetros e, por exemplo, pode ser avaliada pelo aparecimento retardado de estruturas neovasculares, desenvolvimento desacelerado de estruturas neovasculares, ocorrência diminuída de estruturas neovasculares, gravidade retardada ou diminuída de efeitos patológicos dependentes da angiogénese, paragem do crescimento angiogénico ou regressão de crescimento angiogénico anterior. No extremo, a inibição completa é aqui referida como prevenção. Em relação à angiogénese ou crescimento angiogénico, "prevenção" refere-se à ausência de angiogénese ou de crescimento angiogénico substancial se nenhum deles ocorreu previamente, ou à ausência de angiogénese ou de crescimento angiogénico substancial adicional se algum deles ocorreu anteriormente.

"Doença dependente de angiogénese" inclui, sem limitação, artrite reumatóide, distúrbios cardiovasculares, doenças neovasculares do olho, distúrbios vasculares periféricas, úlceras dermatológicas e crescimento, invasão e metástase de tumores cancerosos.

"Animal" refere-se a um organismo vivo que tem sensação e o poder de movimento voluntário e que necessita, para existir, de oxigénio e alimento orgânico. Os exemplos incluem, sem limitação, membros da espécie humana, equina, porcina, bovina, murina, canina e felina. No caso de um ser humano, também se pode fazer referência a um "animal" como um "doente".

"Mamífero" refere-se a um animal vertebrado de sangue

quente.

"Ansiedade" inclui, sem limitação, o estado emocional que consiste em respostas psicofisiológicas à antevisão de perigo imaginário ou real, ostensivamente resultante de conflito intrapsíquico não identificado. Os concomitantes fisiológicos incluem ritmo cardíaco aumentado, ritmo respiratório alterado, sudação, tremor, debilidade e fadiga; os concomitantes psicológicos incluem sensação de perigo iminente, impotência, apreensão e tensão. *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*, W. B. Saunders Co., 27^a ed. (1988).

"Distúrbio da Ansiedade" inclui, sem limitação, distúrbios mentais em que predominam a ansiedade e comportamento de evitamento. *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*, W. B. Saunders Co., 27th ed. (1988). Os exemplos incluem, sem limitação, ataque de pânico, agorafobia, distúrbio do pânico, distúrbio de stress aguda, distúrbio de stress crónica, fobia específica, fobia simples, fobia social, distúrbio da ansiedade induzida por substâncias, distúrbio da ansiedade orgânica, distúrbio obsessivo-compulsiva, distúrbio de stress pós-traumático, distúrbio da ansiedade generalizada e distúrbio da ansiedade NOS. Outros distúrbios da ansiedade estão caracterizadas em *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (American Psychiatric Association, 4th ed. 1994).

"Distúrbio de défice de atenção" ("ADD") refere-se a um distúrbio caracterizado pela inattenção e impulsividade devido a desenvolvimento inadequado, com ou sem hiperactividade. "Inattenção" significa a incapacidade de terminar tarefas iniciadas, ser facilmente distraído, uma aparente falta de atenção e dificuldade de concentração em tarefas que requerem atenção prolongada. "Impulsividade" significa actuar antes de

pensar, dificuldade em esperar pela sua vez, problemas em organizar o trabalho e mudança constante de uma actividade para outra. "Hiperactividade" significa dificuldade em manter-se sentado e estar quieto e correr ou trepar excessivamente.

"Cancro" inclui, sem limitação, tumores produtores de ACTH, leucemia linfocítica aguda, leucemia não linfocítica aguda, cancro do cortex supra-renal, cancro da bexiga, cancro do cérebro, cancro da mama, cancro do colo do útero, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, cancro colorrectal, linfoma das células T cutâneo, cancro do endométrio, cancro do esófago, sarcoma de Ewing, cancro da vesícula biliar, leucemia das células pilosas, cancro da cabeça e pescoço, linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cancro do rim, cancro do fígado, cancro do pulmão (células pequenas e/ou não pequenas), efusão peritoneal maligna, efusão pleural maligna, melanoma, mesotelioma, mieloma múltiplo, neuroblastoma, linfoma não Hodgkin, osteossarcoma, cancro do ovário, cancro do ovário (células germinais), cancro do pâncreas, cancro do pénis, cancro da próstata, retinoblastoma, cancro da pele, sarcoma dos tecidos moles, cancro dos testículos, cancro da tiróide, neoplasias trofoblásticas, cancro do útero, cancro da vagina, cancro da vulva e tumor de Wilm.

"Distúrbio compulsivo" refere-se a qualquer distúrbio caracterizado por comportamento compulsivo irresistível. Exemplos de distúrbios compulsivos incluem, sem limitação, dependência de substâncias, doenças da alimentação, jogo patológico, ADD e síndrome de Tourette.

"Doença desmielinizante" refere-se a qualquer doença que envolve lesão ou remoção da bainha de mielina que naturalmente

rodeia o tecido nervoso, tal como definido na Patente U.S. N° 5859046 e na Publicação Internacional N° WO 98/03178, aqui incorporados por citação. Os exemplos incluem, sem limitação, doenças desmielinizantes periféricas (tais como o síndrome de Guillain-Barré, neuropatias periféricas e doença de Charcot-Marie Tooth) e doenças desmielinizantes centrais (tais como a esclerose múltipla).

"Doença" refere-se a qualquer desvio ou interrupção da estrutura normal ou função de qualquer parte, orgão ou sistema (ou combinações) do corpo que se manifesta por um conjunto característico de sintomas e sinais e cuja etiologia, patologia e prognose podem ser conhecidos ou desconhecidos. *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*, (W. B. Saunders Co. 27^a ed. 1988).

"Distúrbio" refere-se a qualquer perturbação ou anomalia de funcionamento; um estado mórbido físico ou mental. *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*, (W. B. Saunders Co. 27^a ed. 1988).

"Distúrbio da alimentação" refere-se a compulsão alimentar, obesidade ou obesidade grave. Obesidade significa peso corporal de 20% acima das tabelas de altura-peso padrão. Obesidade grave significa um excesso de peso de 100%.

"Glaucoma" inclui, sem limitação, glaucoma de ângulo aberto crónico (idiopático) (e. g., de pressão alta, de pressão normal); glaucoma com bloqueio pupilar (e. g., fecho de ângulo agudo, fecho de ângulo subagudo, fecho de ângulo crónico, mecanismo combinado); glaucoma de desenvolvimento (e. g., congénito (infantil), juvenil, síndrome de Anxenfeld-Rieger, anomalia de Peters, aniridídia); glaucoma associado a outros

distúrbios oculares (e. g., glaucoma associado a doença do endotélio corneano, íris, corpo ciliar, cristalino, tetina, coróide ou vítreo); glaucoma associado a pressão venosa episcleral elevada (e. g., doenças sistémicas com pressão intraocular elevada e glaucoma associados, glaucoma induzido por corticosteróides); glaucoma associado a inflamação e trauma (e. g., glaucoma associado a queratite, episclerite, esclerite, uveíte, traumatismo e hemorragia ocular); glaucoma após cirurgia intraocular (e. g., glaucoma com bloqueio ciliar (maligno), glaucoma em afaquia e pseudoafaquia, glaucoma associado a cirurgia da córnea, glaucoma associado a cirurgia vitro-retiniana).

"Anomalia de glutamato" refere-se a qualquer doença, distúrbio ou estado em que está implicado glutamato, incluindo um estado patológico envolvendo níveis elevados de glutamato. Exemplos de uma anomalia de glutamato incluem, sem limitação, distúrbio compulsivo, lesão da medula espinal, epilepsia, acidente vascular, isquemia, doença desmielinizante, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, ALS, doença de Huntington, esquizofrenia, dor, neuropatia periférica (incluindo mas não limitada a neuropatia diabética), lesão cerebral traumática, lesão neuronal, doença inflamatória, ansiedade, distúrbio da ansiedade, deterioração da memória, glaucoma e distúrbio retiniano.

"Isquemia" refere-se a anemia de tecidos localizada devido a obstrução do influxo de sangue arterial. A isquemia global ocorre quando o fluxo de sangue cessa durante um período de tempo, como pode resultar de paragem cardíaca. A isquemia focal ocorre quando uma parte do corpo, tal como o cérebro, é privado do seu fornecimento normal de sangue, como pode resultar de oclusão tromboembólica de um vaso cerebral, trauma crânio-

encefálico, edema ou tumor cerebral. Mesmo se for transitória, a isquemia quer global quer focal pode provocar lesão neuronal disseminada. Embora a lesão dos tecidos nervosos ocorra ao longo de horas ou mesmo de dias após o inicio da isquemia, alguma lesão permanente do tecido nervoso pode desenvolver-se nos minutos iniciais após a cessação do fluxo de sangue ao cérebro. Muita desta lesão é atribuída à toxicidade do glutamato e consequências secundárias de reperfusão do tecido, tais como a libertação de produtos vasoactivos pelo endotélio lesionado e a libertação de produtos citotóxicos, tais como radicais livres e leucotrienos, pelo tecido lesionado.

"Deterioração da memória" refere-se a registo, retenção ou recordação mental diminuídos de experiências, conhecimento, ideias, sensações, pensamentos ou impressões passadas. A deterioração da memória pode afectar a retenção de informação no curto de no longo prazo, a facilidade com as relações espaciais, estratégias da memória (ensaios) e recuperação e produção verbal. As causas comuns da deterioração da memória são idade, trauma crânio-encefálico grave, anoxia ou isquemia cerebral, doenças alcoólico-nutricionais, intoxicações com fármacos e doenças neurodegenerativas. Por exemplo, a deterioração da memória é uma característica comum de doenças neurodegenerativas, tais como doença de Alzheimer e demência senil do tipo Alzheimer. A deterioração da memória também ocorre com outros tipos de demência, tal como a demência multi-enfarre, a demência senil causada por deficiência cerebrovascular, e a variante dos corpos de Lewy da doença de Alzheimer com ou sem associação com a doença de Parkinson. A doença de Creutzfeldt-Jakob é uma demência rara à qual está associada a deterioração da memória. É uma encefalopatia espongiforme causada pela proteína prião; pode ser transmitida de outros doentes ou pode resultar de mutações de genes. A perda de memória é também uma

característica comum de doentes com lesões cerebrais. A lesão cerebral pode ocorrer, por exemplo, após um acidente vascular clássico ou como resultado de um acidente anestésico, trauma crânio-encefálico, hipoglicémia, envenenamento por monóxido de carbono, intoxicação com lítio, deficiência vitamínica (B1, tiamina e B12), ou utilização excessivo de álcool. A psicose amnésica de Korsakoff é uma doença rara caracterizada por profunda perda de memória e efabulação, em que o doente inventa histórias para esconder a sua perda de memória. Está frequentemente associada a consumo excessivo de álcool. A deterioração da memória pode, além disso, estar associada à idade; a aptidão para relembrar informação, tais como nomes, locais e palavras parece diminuir com o aumento da idade. A perda de memória transitória pode também ocorrer em doentes que sofrem de uma distúrbio depressivo major, após terapêutica electroconvulsiva.

"Distúrbio mental" refere-se a qualquer síndrome comportamental ou psicológica clinicamente significativa caracterizada pela presença de sintomas de angústia ou deterioração significativa do funcionamento. Presume-se que os distúrbios mentais resultam de alguma disfunção psicológica ou orgânica do indivíduo; o conceito não inclui perturbações que são essencialmente conflitos entre o indivíduo e a sociedade (desviantamento social).

"Metástase" refere-se à "aptidão das células de um cancro para disseminar e formar novos focos de crescimento em sítios não contíguos (*i. e.*, para formar metástases)". Ver Hill, R. P., "Metastasis", *The Basic Science of Oncology*, Tannock *et al.*, Eds., McGraw-Hill, Nova Iorque, páginas 178-195 (1992), aqui incorporado por citação. "A transição do crescimento do tumor *in situ* para a doença metastática é definida pela aptidão das

células tumorais do sítio primário para invadir tecidos locais e para atravessar as barreiras dos tecidos... Para iniciar o processo metastático, as células do carcinoma têm primeiro de penetrar na membrana basal epitelial e depois invadir o estroma intersticial. Para metástases distantes, o intravasamento requer invasão pelas células tumorais da membrana basal subendotelial que também tem de ser negociada durante o extravasamento das células tumorais... O desenvolvimento da malignidade também está associado à angiogénese induzida por tumores [a qual] não só permite expansão dos tumores primários, mas também permite acesso fácil ao compartimento vascular devido a defeitos nas membranas basais de vasos formados de novo". Ver Aznavoorian et al., *Cancer* (1993) 71:1368-1383, aqui incorporado por citação.

"Neuropatia" refere-se a qualquer doença ou mau funcionamento dos nervos. A neuropatia inclui, sem limitação, neuropatia periférica, neuropatia diabética, neuropatia autonómica e mononeuropatia. A neuropatia periférica pode ser idiopática ou induzida por quaisquer causas incluindo doenças (por exemplo, amiloidose, alcoolismo, VIH, sífilis, vírus, distúrbio auto-imune, cancro, porfiria, aracnoidite, neuralgia pós-herpética, síndrome de Guillain-Barre, diabetes incluindo diabetes de tipo I e tipo II), produtos químicos (por exemplo, toxinas, chumbo, dapsona, vitaminas, quimioterapia com paclitaxel, terapêutica HAART) e lesões físicas num nervo ou plexo nervoso específico (por exemplo, trauma, compressão, constrição).

"Neuroprotector" refere-se ao efeito de redução, paragem ou melhoramento da lesão nervosa e protecção, ressuscitação ou reviver de tecido nervoso que sofreu uma lesão nervosa.

"Lesão nervosa" a qualquer dano ao tecido nervoso e

qualquer incapacidade ou morte dele resultante. A causa da lesão nervosa pode ser metabólica, tóxica, neurotóxica, iatrogénica, térmica ou química e inclui, sem limitação, isquemia, hipoxia, acidente cerebrovascular, trauma, cirurgia, pressão, efeito de massa, hemorragia, radiação, vasoespasmo, doença neurodegenerativa, processo neurodegenerativo, infecção, doença de Parkinson, ALS, processos de mielinização/desmielinização, epilepsia, distúrbio cognitivo, anomalia de glutamato e os seus efeitos secundários.

"Tecido nervoso" refere-se aos vários componentes que compõem o sistema nervoso, incluindo sem limitação neurónios, células de apoio neuronal, da glia, células de Schwann, vasculatura contida no seio das e que alimentam estas estruturas, o sistema nervoso central, o cérebro, o tronco cerebral, a medula espinal, a união do sistema nervoso central ao sistema nervoso periférico, o sistema nervoso periférico e estruturas semelhantes.

"Dor" refere-se a sensações localizadas de desconforto, mal estar ou agonia, resultantes da estimulação de terminais nervosos especializados. Serve como um mecanismo protector na medida em que induz quem a sofre a eliminar a ou a afastar-se da fonte. *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*, (W. B. Saunders Co. 27^a ed. 1988). Exemplos de dor incluem, sem limitação, dor aguda, crónica, de cancro, de queimadura, por incisões, inflamatória, neuropática e lombar.

"Dor neuropática" refere-se a um estado de dor associado a uma lesão nervosa. Dependendo da síndrome específica, a dor pode ser devida a alterações do cérebro ou da medula espinal ou pode ser devida a anomalias no próprio nervo. A dor neuropática pode ser idiopática ou induzida por quaisquer causas incluindo

doenças (por exemplo, amiloidose, alcoolismo, VIH, sífilis, vírus, distúrbio auto-imune, cancro, porfiria, aracnoidite, neuralgia pós-herpética, síndrome de Guillain-Barré, diabetes incluindo diabetes de tipo I e tipo II), produtos químicos (por exemplo, toxinas, chumbo, dapsona, vitaminas, quimioterapia com paclitaxel, terapêutica HAART) e lesões físicas num nervo ou plexo nervoso específico (por exemplo, trauma, compressão, constrição).

"Jogo patológico" refere-se a uma patologia caracterizada por uma preocupação com o jogo. Semelhante ao abuso de substâncias psicoactivas, os seus efeitos incluem o desenvolvimento de tolerância com uma necessidade de apostar dinheiro em quantias progressivamente maiores, sintomas de abstinência e jogo continuado apesar dos efeitos negativos graves sobre a família e o trabalho.

"Doença da próstata" refere-se a qualquer doença que afecta a próstata. Exemplos de doença da próstata incluem, sem limitação, cancro da próstata (e. g., adenocarcinoma e cancros metastáticos da próstata) e patologias caracterizada por crescimento anormal de células epiteliais prostáticas (e. g., hiperplasia benigna da próstata).

"Doença retiniana" refere-se a retinopatia vascular, por exemplo, retinopatia hipertensora, retinopatia diabética (não proliferativa ou proliferativa), oclusão da artéria retiniana central, ou oclusão da veia retiniana central; degeneração macular relacionada com a idade; descolamento da retina; ou retinite pigmentosa.

"Esquizofrenia" refere-se a um distúrbio mental ou grupo de distúrbios mentais caracterizados por perturbações na forma e

conteúdo do pensamento (perda de associações, ilusões, alucinações), humor (sem vivacidade, abatimento, afecto inapropriado), sentido de si próprio e relacionamento com o mundo exterior (perda dos limites do ego, pensamento errático, e retraiamento autista) e comportamento (bizarro, aparentemente sem sentido e actividade estereotipada ou inactividade). Exemplos de esquizofrenia incluem, sem limitação, esquizofrenia aguda, ambulatória, borderline, catatíntica, da infância, desorganizada, hebepfrénica, latente, nuclear, paranóica, parafrénica, pré-psicótica, em processo, pseudoneurótica, pseudopsicopática, reactiva, residual, esquito-afectiva e indiferenciada. *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*, (W. B. Saunders Co. 27^a ed. 1988).

"TGF-β" refere-se ao factor beta de crescimento transformante. O TGF-β é reconhecido como um prototipo de factores de crescimento multifuncionais. Regula várias funções de células e de tecidos, incluindo o crescimento e diferenciação celular, angiogénesis, cicatrização de feridas, função imune, produção da matriz extracelular, quimiotaxia, apoptose e hematopoiese celular.

"Anomalia de TGF-β" refere-se a qualquer doença, distúrbio ou estado em que está implicado o TGF-β, incluindo doenças, patologias e estados caracterizados por níveis anormais de TGF-β.

"Nível anormal de TGF-β" refere-se a uma variância mensurável dos níveis normais de TGF-β, determinada por uma pessoa com conhecimentos correntes da técnica utilizando técnicas conhecidas.

"Janela de oportunidade terapêutica" ou "janela" refere-se,

em relação a um acidente vascular, ao atraso máximo entre o início do acidente vascular e o início de terapêutica eficaz.

"Síndrome de Tourette" refere-se a uma doença de tiques múltiplos autossómica caracterizada por praguejar compulsivo, tiques musculares múltiplos e sons ruidosos. Os tiques são movimentos breves, rápidos, involuntários que podem ser simples ou complexos; são estereotipados e repetitivos, mas não ritmicos. Os tiques simples, tais como o piscar de olhos, frequentemente começam como maneirismos nervosos. Os tiques complexos frequentemente assemelham-se a fragmentos do comportamento normal.

Salvo definição em contrário em conjunto com uma doença, distúrbio ou estado específico, "tratar" refere-se a:

(i) impedir a ocorrência de uma doença, distúrbio ou estado num animal que pode estar predisposto à doença, distúrbio e/ou estado mas que ainda não foi diagnosticado como o tendo;

(ii) inibir a doença, distúrbio ou estado, i. e., deter o seu desenvolvimento; e/ou

(iii) aliviar a doença, distúrbio ou estado, i. e. causar a regressão da doença, patologia e/ou estado.

"Tratar ALS" refere-se a:

(i) impedir que a ALS ocorra num animal que pode estar predisposto para ALS mas que ainda não foi diagnosticado como a tendo;

(ii) inibir a ALS, e. g. parar o seu desenvolvimento;

(iii) aliviar a ALS, e. g. causando a regressão da doença, patologia e/ou estado;

(iv) atrasar o início da ALS ou de sintomas da ALS;

(v) tornar mais lenta a progressão da ALS ou de sintomas da ALS;

(vi) prolongar a sobrevivência de um animal que sofre de ALS; e/ou

(vii) atenuar os sintomas de ALS.

"Tratar a doença de Huntington" refere-se a:

(i) impedir que ocorra a doença de Huntington num animal que pode estar predisposto à doença de Huntington mas que ainda não foi diagnosticado como a tendo;

(ii) inibir ou tornar mais lenta a doença de Huntington, e. g. parando o seu desenvolvimento;

(iii) aliviar a doença de Huntington, e. g. provocar a sua regressão;

(iv) melhorar a coordenação motora num animal que tem doença de Huntington; e/ou

(v) prolongar a sobrevivência de um animal que tem doença de Huntington.

"Tratar dependência de substâncias" refere-se a impedir a recaída; reduzir a apetência; suprimir a tolerância; impedir,

inibir e/ou aliviar a privação; atenuar a sensibilização; impedir, inibir (*i. e.* fazer parar o desenvolvimento de) e/ou aliviar (*i. e.* provocar a regressão de) neurotoxicidade induzida por substâncias; e/ou impedir, inibir e/ou aliviar a síndrome alcoólica fetal.

"Apetência" refere-se a um desejo forte de uma substância e/ou uma vontade compulsiva e/ou impulso irresistível de utilizar uma substância.

"Dependência" refere-se a um padrão mal adaptado de uso de uma substância, conduzindo a deterioração ou ansiedade clinicamente significativas. A dependência é tipicamente caracterizada por tolerância e/ou privação. As substâncias em relação às quais se pode desenvolver dependência incluem, sem limitação, depressivos (opiáceos, narcóticos sintéticos, barbituratos, glutetimida, metiprilon, etclorvinol, metaqualona, álcool); ansiolíticos (diazepam, clordiazepóxido, alprazolam, oxazepam, temazepam); estimulantes (anfetamina, metanfetamina, cocaína, nicotina); e alucinogénios (LSD, mescalina, peyote, marijuana).

"Opiáceo" refere-se a um analgésico narcótico que é semi ou totalmente sintético, incluindo, mas não limitado a codeína, morfina, heroína, hidromorfona (Dilaudid), oxicodona (Percodan), oximorfona (Numorphan), hidrocodona (Vicodin), meperidina (Demerol), fentanil, metadona (Dolophine), Darvon, Talwin.

"Recaída" refere-se a um retorno à utilização de uma substância após um período de abstinência, frequentemente acompanhado por reposição.

"Reposição" refere-se a um retorno a um nível pré-existente

de uso e dependência numa pessoa que retomou a utilização da substância após um período de abstinência.

"Sensibilização" refere-se a um estado em que a resposta a uma substância aumenta com a utilização repetida.

"Tolerância" refere-se a uma reacção adquirida a uma substância caracterizada por um efeito diminuído com a utilização continuada da mesma dose e/ou uma necessidade de doses acrescidas para conseguir a intoxicação ou efeito desejado previamente conseguido com doses mais pequenas. Os factores fisiológicos e psico-sociais podem contribuir para o desenvolvimento de tolerância. Em relação à tolerância fisiológica, pode desenvolver-se tolerância metabólica e/ou funcional. Por aumento da taxa de metabolismo da substância, o organismo pode ser capaz de eliminar a substância mais prontamente. A tolerância funcional é definida como um decréscimo de sensibilidade do sistema nervoso central à substância. A "tolerância a opiáceos" inclui sem limitação a insuficiência de uma dose estacionária do fármaco para sustentar o efeito farmacológico desejado ao longo do tempo, i. e., a necessidade de aumentar a dosagem do fármaco para manter o efeito farmacológico original.

"Privação" refere-se a uma síndrome caracterizada por alterações físicas adversas que ocorrem após a cessação ou redução da utilização da substância, ou administração de um antagonista farmacológico.

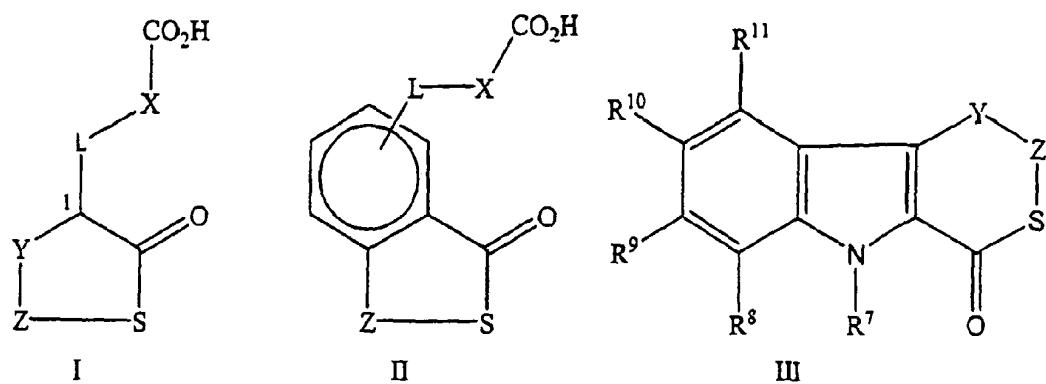
Uma pessoa com conhecimentos correntes da matéria vai reconhecer que há nomenclaturas, nosologias e sistemas de classificação alternativos das doenças, patologia e estados definidos acima. e que esses sistemas evoluem com o progresso

científico médico.

Salvo se o contexto determinar claramente de outro modo, as definições de termos no singular podem ser extrapolados para aplicação nos seus correspondentes plurais tal como ocorrem na descrição; analogamente, as definições de termos no plural podem ser extrapoladas para aplicação aos seus correspondentes singulares tal como ocorrem na descrição.

COMPOSTOS

Esta invenção proporciona um composto de fórmula I, II ou III



ou os seus sais farmaceuticamente aceitáveis, hidratos e solvatos, em que:

X é alquílenoC₁-C₄, alcenílenoC₂-C₄, alcinílenoC₂-C₄, cicloalquílenoC₃-C₈, cicloalcenílenoC₅-C₇ ou Ar, em que o alquíleno, alceníleno, alciníleno, cicloalquíleno ou cicloalceníleno está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes;

L é uma ligação, $-CR^1R^2-$, $-O-$, $-S-$, $-SO_2-$ ou $-NR^1-$;

Y é $-O-$, $-S-$, $-CR^3R^4-$ ou $-NR^3-$;

Z é $-(CR^5R^6)_n-$;

n é 1, 2, 3 ou 4;

Ar é um radical arilo ou heteroarilo bivalente que está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes;

R¹, R², R³, R⁴, R⁵ e R⁶ são, independentemente, hidrogénio, alquiloC₁-C₄ ou alceniloC₂-C₄, em que o alquilo ou alcenilo está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes;

R⁷ é hidrogénio, fenilo, feniletilo ou benzilo em que o fenilo, feniletilo ou benzilo está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes; e

R⁸, R⁹, R¹⁰ e R¹¹ são independentemente hidrogénio, carboxilo, hidroxilo, halogéneo, nitro, ciano, alquiloC₁-C₄ ou alcoxiloC₁-C₄,

desde que quando o composto tem a fórmula I, n é 2, 3 ou 4; e

desde que quando o composto tem a fórmula I, L é uma ligação e X é etilo, então Y não é $-CR^3R^4-$; e

desde que quando o composto tem a fórmula III, e quando R⁸, R⁹, R¹⁰ e R¹¹ são hidrogénio, e Y e Z são grupos $-CH_2-$, então R⁷ não é hidrogénio nem um grupo fenilo ou benzilo não substituído; e

desde que quando o composto tem a fórmula I, L é uma ligação e X é etilo, então Y não é $-CR^3R^4-$.

Noutra forma de realização do composto de fórmula I:

Y é $-CR^3R^4-$; e

n é 2.

Ainda noutra forma de realização do composto de fórmula I:

L é $-CR^1R^2-$, $-O-$, $-S-$ ou NH;

X é C₁-C₂ alcíleno ou Ar; e

Ar é feníleno, bifeníleno, benzíleno ou naftíleno, em que o feníleno, bifeníleno, benzíleno ou naftíleno está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes independentemente seleccionados de carboxílo, halogéneo, nitro, alquiloC₁-C₄, alcoxíloC₁-C₄, fenilo, fenoxílo e benzoxílo.

Numa forma de realização do composto de fórmula II:

L é uma ligação, $-CR^1R^2-$ ou $-O-$; e

n é 2.

Noutra forma de realização do composto de fórmula II:

X é C₁-C₄ alcíleno ou Ar; e

Ar é feníleno, bifeníleno ou benzíleno que está não substituído

ou substituído com um ou mais substituintes seleccionados independentemente de carboxilo, halogéneo, nitro, alquiloC₁-C₄, alcoxiloC₁-C₄, fenoxilo e benziloxilo.

Numa forma de realização do composto de fórmula III:

R⁸, R⁹, R¹⁰ e R¹¹ são independentemente hidrogénio ou carboxilo.

Noutra forma de realização do composto de fórmula III:

R⁷ é fenilo ou benzilo substituído com um ou mais substituintes seleccionados independentemente de carboxilo, halogéneo, alquiloC₁-C₄ e alcoxiloC₁-C₄.

Exemplos do um ou mais substituintes pelos quais X, Ar, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ e R⁷ podem ser substituídos incluem, sem limitação: alquiloC₁-C₄, alceniloC₂-C₄, alciniloC₂-C₄, alcoxiloC₁-C₄, alceniloxiloC₂-C₄, fenoxilo, benziloxilo, hidroxilo, carboxilo, hidroperoxilo, carbamido, carbamoílo, carbamilo, carbonilo, carbozoílo, amino, hidroxiamino, formamido, formilo, guanilo, ciano, cianoamino, isociano, isocianato, diazo, azido, hidrazino, triazano, nitrilo, nitro, nitroso, isonitroso, nitrosamino, imino, nitrosimino, oxo, alquiltioC₁-C₄, sulfamino, sulfamoílo, sulfeno, sulfidrilo, sulfinilo, sulfo, sulfonilo, tiocarboxilo, tiociano, isotiociano, tioformamido, halogéneo, halogenoalquilo, clorosilo, clorilo, perclorilo, trifluorometilo, iodosilo, iodilo, fosfino, fosfinilo, fosfo, fosfono e unidades carbocíclicas e heterocíclicas.

A definição de qualquer variável substituinte numa localização específica numa molécula é independente das suas

definições noutras pontos da molécula. Os substituintes e os padrões de substituição dos compostos da invenção podem ser seleccionados por uma pessoa com conhecimentos correntes da matéria para proporcionar compostos que são quimicamente estáveis e que podem ser facilmente sintetizados por técnicas conhecidas na matéria bem como os processos aqui apresentados.

Uma vez que os compostos da invenção podem ter um ou mais centros de carbono assimétricos, podem ser capazes de existir na forma de isómeros ópticos, bem como na forma de misturas racémicas ou não racémicas de isómeros ópticos. Os isómeros ópticos podem ser obtidos por resolução das misturas racémicas de acordo com processos convencionais. Um desses processos envolve a formação de sais diastereoisoméricos por tratamento com um ácido ou base opticamente activo, depois, separação da mistura de diastereoisómeros por cristalização, seguida por libertação das bases opticamente activas a partir dos sais. Exemplos de ácidos apropriados são ácido tartárico, diacetiltartárico, dibenzoíltartárico, ditoluíltartárico e canforsulfónico.

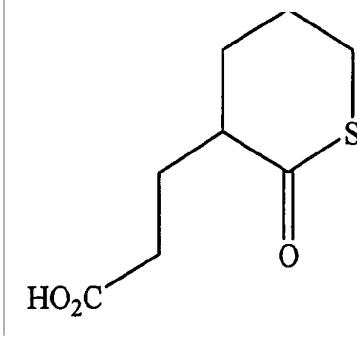
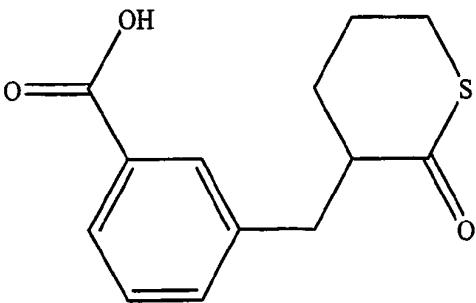
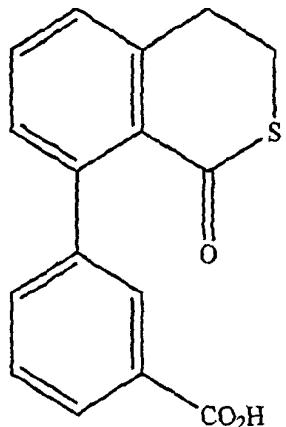
Um processo diferente para a separação de isómeros ópticos envolve a utilização de uma coluna de cromatografia quirial seleccionada de forma optimizada para maximizar a separação de enantiómeros. Ainda outro processo disponível envolve a síntese de moléculas diastereoisoméricas covalentes, por exemplo, ésteres, amidas, acetais e cetais, por reacção dos compostos da invenção com um ácido opticamente activo numa forma activada, um diol opticamente activo ou um isocianato opticamente activo. Os diastereoisómeros sintetizados podem ser separados por meios convencionais, tais como cromatografia, destilação, cristalização ou sublimação e, depois, hidrolisados para dar o composto enantiomericamente puro. Em alguns casos a hidrólise ao

fármaco "mãe" opticamente activo não é necessária antes da administração ao doente, uma vez que o composto pode comportar-se como um pró-fármaco. Os compostos opticamente activos desta invenção podem ser obtidos de modo semelhante por utilização de materiais de partida opticamente activos.

Os compostos desta invenção abrangem isómeros ópticos individuais bem como as mistura racémicas e não racémicas. Em algumas misturas não racémicas, a configuração R pode ser enriquecida enquanto que noutras misturas não racémicas, a configuração S pode ser enriquecida.

Os exemplos dos compostos da invenção incluem, sem limitação, os compostos apresentados na TABELA I.

TABELA I: COMPOSTOS REPRESENTATIVOS

Composto Número	Estrutura	Nome
1		Ácido 3-(2-oxo-tetrahidro-tiopiran-3-il)-propiónico
2		Ácido 3-[(2-oxotetrahidro-2H-thiopyran-3-il)metil]benzóico
3		Ácido 3-(1-oxoisotio-croman-8-il)-benzóico

Composto Número	Estrutura	Nome
4		Ácido 3-(1-oxoisotiocroman-8-iloximetil)-benzóico
5		Ácido 3-(1-oxo-3,4-dihidro-1H-2-tia-9-aza-fluoren-9-il)-benzóico

MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO

Embora os compostos da invenção sejam geralmente pró-fármacos de inibidores de NAALADase, os compostos da invenção também por si sós podem apresentar actividade inibidora de NAALADase. Quer por inibição da actividade de NAALADase, por conversão *in vivo* em compostos que inibem a actividade de

NAALADase ou por outro mecanismo de acção, os compostos da invenção podem ser úteis nas seguintes aplicações terapêuticas.

Método para Tratamento de Anomalias de Glutamato

Sem querer ficar comprometidos com qualquer mecanismo de acção específico, os compostos da invenção podem bloquear pré-sinapticamente a liberação de glutamato sem interactuar com receptores de glutamato pós-sinápticos. Esses compostos devem estar desprovidos de toxicidades comportamentais associadas aos antagonistas de glutamato pós-sinápticos. Assim, os compostos podem ser utilizados para tratamento de uma anomalia de glutamato num animal ou num mamífero, compreendendo a administração ao animal ou mamífero de uma quantidade eficaz de um composto de fórmula I, II ou III, como definido acima.

A anomalia de glutamato pode ser seleccionada de um distúrbio compulsivo, acidente vascular, isquemia, doença desmielinizante, doença de Parkinson, ALS, doença de Huntington, esquizofrenia, neuropatia diabética, dor, ansiedade, doença da ansiedade, deterioração da memória e glaucoma. Por exemplo o método é para tratar um distúrbio compulsivo seleccionada de dependência de álcool, nicotina, cocaína e opiáceos ou para tratamento da tolerância a opiáceos.

Os doentes de acidentes vasculares frequentemente experimentam um atraso temporal significativo entre o início da isquemia e o início da terapêutica. Assim, há uma necessidade de neuroprotectores com uma janela de oportunidade terapêutica prolongada. Espera-se que os compostos da invenção tenham uma janela de oportunidade terapêutica de, pelo menos, 1 hora. Consequentemente, quando a anomalia de glutamato é um acidente

vascular, o composto da invenção pode ser administrado ao animal ou mamífero durante até 60 minutos, 120 minutos ou mais após o início do acidente vascular.

Método para Exercer Actividades Neuronais

É proporcionado um método para exercer uma actividade neuronal num animal ou num mamífero, compreendendo a administração ao animal ou mamífero de uma quantidade eficaz de um composto de fórmula I, II ou III, como definido acima.

A actividade neuronal que é exercida pode ser estimulação de neurónios lesionados, promoção da regeneração neuronal, prevenção de neurodegeneração ou tratamento de um distúrbio neurológico.

Exemplos de um distúrbio neurológico que é tratado incluem, sem limitação: neuralgia trigeminal; neuralgia glossofaríngea; paralisia de Bell; miastenia grave; distrofia muscular; ALS; atrofia muscular progressiva; atrofia muscular hereditária bulbar progressiva; síndromes dos discos invertebrais herniados, rotos ou prolapsados; espondilose cervical; doenças do plexo; síndromes do desfiladeiro torácico; neuropatia; dor; doença de Alzheimer; doença de Parkinson; ALS; e doença de Huntington.

Numa forma de realização, o método é para tratamento de um distúrbio neurológico seleccionado de neuropatia (por exemplo, neuropatia periférica ou neuropatia diabética), dor (por exemplo, dor neuropática, tal como dor neuropática induzida por diabetes), trauma cerebral, lesão física da medula espinal, acidente vascular associado a lesão cerebral, doença desmielinizante e distúrbio neurológica relacionada com

neurodegeneração.

Quando o distúrbio neurológico é dor, o composto da invenção pode ser administrado em associação com uma quantidade eficaz de morfina.

Exemplos de um distúrbio neurológico relacionado com neurodegeneração incluem, sem limitação, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e ALS.

Método para Tratamento de Doenças da Próstata

É proporcionado um método para tratamento de uma doença da próstata num animal ou num mamífero, compreendendo a administração ao animal ou ao mamífero de uma quantidade eficaz de um composto de fórmula I, II ou III, como definido acima. Numa forma de realização, a doença da próstata é cancro da próstata.

Método para Tratamento de Cancros

É proporcionado um método para tratamento de cancro num animal ou num mamífero, compreendendo a administração ao animal ou ao mamífero de uma quantidade eficaz de um composto de fórmula I, II ou III, como definido acima. Numa forma de realização, o cancro é em tecidos em que reside NAALADase, tais como o cérebro, o rim e os testículos.

Método para Inibir a Angiogénesse

É proporcionado um método para inibição da angiogénesse num animal ou num mamífero, compreendendo a administração ao animal ou ao mamífero de uma quantidade eficaz de um composto de fórmula I, II ou III, como definido acima.

A angiogénesse pode ser necessária para a fertilidade ou metástase de tumores cancerosos ou pode estar relacionada com uma doença dependente de angiogénesse. Exemplos de uma doença dependente da angiogénesse incluem, sem limitação, artrite reumatóide, doenças cardiovasculares, doenças neovasculares do olho, distúrbios vasculares periféricos, úlceras dermatológicas e crescimento, invasão ou metástase de tumores cancerosos.

Método para Exercer Actividade de TGF- β

É proporcionado um método para exercer actividade de TGF- β num animal ou num mamífero, compreendendo a administração ao animal ou ao mamífero de uma quantidade eficaz de um composto de fórmula I, II ou III, como definido acima.

O exercer de uma actividade de TGF- β inclui aumentar, reduzir ou regular os níveis de TGF- β , e tratamento de uma anomalia de TGF- β . Exemplos de uma anomalia de TGF- β que é tratada pelo método da invenção incluem distúrbios neurodegenerativos, distúrbios de formação de matriz extracelular, doenças relacionadas com o crescimento celular, doenças infecciosas, doenças relacionadas com o sistema imunitário, formação de cicatrizes no tecido epitelial, doenças vasculares do colagénio, distúrbios fibroproliferativos, distúrbio do tecido conjuntivo, inflamação, doenças

inflamatórias, síndrome do esforço respiratório, infertilidade e diabetes.

Exemplos de um distúrbio neurodegenerativo incluem, sem limitação, lesão dos tecidos neurais resultante de isquemia, lesão de reperfusão, mielinação ou neurodegeneração.

Exemplos de um distúrbio relacionado com o crescimento celular incluem, sem limitação, distúrbios que afectam as células dos rins, células hematopoiéticas, linfócitos, células epiteliais ou células endoteliais.

Exemplos de uma doença infecciosa incluem, sem limitação, doenças causadas por um agente patogénico macrófago, particularmente um agente patogénico macrófago seleccionado de bactérias, leveduras, fungos, vírus, protozoários, *Trypanosoma cruzi*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Salmonella*, *Pneumocystis*, *Toxoplasma*, *Listeria*, *Mycobacteria*, *Rickettsia* e *Leishmania*. Exemplos de *Mycobacteria* incluem, sem limitação, *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*. Exemplos de *Toxoplasma* incluem, sem limitação, *Toxoplasma gondii*. Exemplos de *Rickettsia* incluem, sem limitação, *R. prowazekii*, *R. coronii* e *R. tsutsugamushi*. Outros exemplos de uma doença infecciosa incluem lesões cutâneas individuais ou múltiplas, doença mucósica, doença de Chagas, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), criptosporidiose, infecções por *Mycobacterium avium*, pneumonia por *Pneumocystis carinii* e lepra.

Exemplos de uma doença relacionada com o sistema imunitário incluem, sem limitação, distúrbios auto-imunes; função imune deteriorada; e imunossupressão associada a uma doença infecciosa, particularmente infecção tripanossomal, infecção

viral, vírus da imunossupressão humana, vírus linfotrópico das células T humanas (HTLV-1), vírus da coriomeningite linfocítica ou hepatite.

Exemplos de uma doença vascular do colagénio incluem, sem limitação, esclerose sistémica progressiva ("PSS"), polimiosite, esclerodermia, dermatomiosite, fasciite eosinofílica, morfeia, síndrome de Raynaud, fibrose pulmonar intersticial, esclerodermia e lupus eritematoso sistémico.

Exemplos de um distúrbio fibroproliferativo incluem, sem limitação, nefropatia diabética, doença renal, vitrorretinopatia proliferativa, cirrose hepática, fibrose biliar e mielofibrose. Exemplos de uma doença renal incluem, sem limitação, glomerulonefrite proliferativa mesangial, glomerulonefrite crescentica, neuropatia diabética, fibrose intersticial renal, fibrose renal em doentes com transplante que recebem ciclosporina e nefropatia associada a VIH.

Exemplos de uma doença do tecido conjuntivo incluem, sem limitação, esclerodermia, mielofibrose e fibrose hepática, intraocular e pulmonar.

Sem ficar limitados a qualquer mecanismo de acção específico, os compostos da invenção podem tratar doenças inflamatórias por regulação de TGF- β e/ou inibição de mieloperoxidase. Exemplos de uma doença inflamatória que é tratada pelo método da invenção incluem, sem limitação, uma doença associada a PSS, polimiosite, esclerodermia, dermatomiosite, fasciite eosinofílica, morfeia, síndrome de Raynaud, fibrose pulmonar intersticial, esclerodermia, lupus eritematoso sistémico, nefropatia diabética, doença renal, vitrorretinopatia proliferativa, cirrose hepática, fibrose

biliar, mielofibrose, glomerulonefrite proliferativa mesangial, glomerulonefrite crescêntica, neuropatia diabética, fibrose intersticial renal, fibrose renal em doentes de transplante que recebem ciclosporina e nefropatia associada a HIV.

Outras utilizações associadas às propriedades reguladoras de TGF- β dos compostos da invenção incluem:

estimulação do crescimento de tecidos, glândulas ou orgãos, especialmente crescimento que vá aumentar a produção de leite ou o ganho de peso;

estimulação da proliferação celular, especialmente a proliferação de fibroblastos, células do mesênquima ou células epiteliais;

inibição do crescimento celular, especialmente de células epiteliais, células endoteliais, linfócitos T e B ou timócitos;

inibição da expressão de músculo esquelético, adiposo ou fenotipos hematopoiéticos, neoplasias, infecções virais não citocidal ou outras infecções patogénicas ou doenças auto-imunes;

mediação da resistência ou susceptibilidade a doenças;

supressão da resposta imune celular;

inibição da formação de tecido cicatrizado, tal como na pele ou outro tecido epitelial que foi lesionado por feridas resultantes de lesão accidental, operações cirúrgicas, lacerações induzidas por traumatismos ou outros traumatismos, ou por ferimentos envolvendo o peritoneu para o qual a formação de

tecido conjuntivo excessivo são adesões abdominais;

aumento da eficácia de uma vacina, particularmente uma vacina para uma alergia a, por exemplo, pó ou febre dos fenos; e

inibição da formação de pólipos.

Administração e Dosagem

Os compostos da invenção podem ser administrados por qualquer meio conhecido por uma pessoa com conhecimentos correntes da matéria. Por exemplo, os compostos da invenção podem ser administrados oralmente, parentericamente, por pulverizador para inalação, topicalmente, rectalmente, nasalmente, bucalmente, vaginalmente, ou através de um reservatório implantado. O termo "parentérico", tal como aqui utilizado inclui injecção subcutânea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intra-esterno, intracraniana e intra-óssea e técnicas de perfusão. O protocolo de administração exacto vai variar dependendo de vários factores incluindo a idade, peso corporal, estado de saúde geral, sexo e dieta do doente; a determinação de processos de administração específicos serão rotina para uma pessoa com conhecimentos correntes da matéria.

Os compostos da invenção podem ser administrados por uma dose única, doses discretas múltiplas ou perfusão contínua. Os meios de bombagem, particularmente os meios de bombagem subcutânea, são úteis para perfusão contínua.

Os níveis de dosagem da ordem de cerca de 0,001 mg/kg/d a cerca de 10,000 mg/kg/d de um composto da invenção são úteis

para os métodos da invenção. Numa forma de realização, o nível da dose é cerca de 0,1 mg/kg/d a cerca de 1000 mg/kg/d. Noutra forma de realização, o nível da dose é cerca de 1 mg/kg/d a cerca de 100 mg/kg/d. O nível específico da dose para qualquer doente específico vai variar dependendo de diversos factores, incluindo a actividade e possível toxicidade do composto específico utilizado; da idade, peso corporal, estado de saúde geral, sexo e dieta do doente; do momento da administração; da taxa de excreção; da associação de fármacos; da gravidade da insuficiência cardíaca congestiva; e da forma de administração. Tipicamente, os resultados do efeito da dose *in vitro* facultam orientação útil sobre as doses adequadas para administração ao doente. Os estudos em modelos animais também ajudam. Os considerandos para determinação dos níveis da dose apropriados são bem conhecidos na técnica e dentro da experiência de um médico normal.

Pode ser utilizado qualquer regime de administração conhecido para regulação do momento e sequência de administração de um fármaco e repetido consoante necessário para efectuar o tratamento nos métodos mencionados. O regime pode incluir pré-tratamento e/ou co-administração com agente ou agentes terapêuticos adicionais.

Os compostos da invenção podem ser administrados sós ou em associação com um ou mais agentes terapêuticos adicionais para utilização simultânea, separada ou sequencial. Exemplos de um agente terapêutico adicional incluem, sem limitação, compostos desta invenção; esteróides (e. g., hidrocortisonas tais como metilprednisolona); fármacos anti-inflamatórios ou anti-imunes, tais como metotrexato, azatioprina, ciclofosfamida ou ciclosporina A; interferão- β ; anticorpos, tais como anticorpos anti-CD4; agentes que podem reduzir o risco de um segundo evento

isquémico, tal como ticlopidina; agentes quimioterapêuticos; composições imunoterapêuticas; radiosensibilizadores electromagnéticos; e morfina. Os compostos da invenção podem ser co-administrados com um ou mais agentes terapêuticos adicionais seja (i) conjuntamente numa única formulação, ou (ii) separadamente em formulações individuais concebidas para libertação taxas de libertação óptimas do seu respectivo agente activo.

Métodos e Kit de Diagnóstico

Esta invenção proporciona, ainda, um método para detecção *in vitro* de uma doença, distúrbio ou estado em que os níveis de NAALADase estão alterados, que compreende:

(i) pôr em contacto uma amostra de tecido ou fluido corporal com um composto de fórmula I, II ou III, como definido acima, em que o composto se liga a qualquer NAALADase na amostra; e

(ii) determinar a quantidade de qualquer NAALADase ligada à amostra, em que a quantidade é diagnóstico da doença, distúrbio ou estado.

Exemplos de uma doença, distúrbio ou estado que é detectável pelo método da invenção incluem, sem limitação, distúrbio neurológico, anomalia de glutamato, neuropatia, dor, distúrbio compulsivo, doença da próstata, cancro, anomalia de TGF- β , doença de Huntington, diabetes, distúrbio retiniano e glaucoma.

Exemplos de um tecido ou fluido corporal que é utilizado no

método da invenção incluem, sem limitação, tecido da próstata, ejaculado, fluido da vesícula seminal, fluido prostático, urina, sangue, saliva, lágrimas, suor, linfa e expectoração.

O composto da invenção pode ser marcado com um marcador utilizando técnicas conhecidas na técnica. Os marcadores úteis incluem, sem limitação, marcadores enzimáticos e reagentes de imaciologia. Exemplos de reagentes de imaciologia incluem radiomarcadores, tais como ^{131}I , ^{111}In , ^{123}I , ^{99}Tc , ^{32}P , ^{125}I , ^{3}H e ^{14}C ; marcadores fluorescentes, tais como fluoresceína e rodamina; e quimioluminescentes, tais como luciferina.

A quantidade de NAALADase pode ser determinada utilizando qualquer técnica conhecida na técnica. Exemplos dessas técnicas incluem, sem limitação, ensaios de doseamento (tais como ensaios de doseamento imunométricos, calorimétricos, densitométricos, espectrográficos e cromatográficos) e técnicas de imaciologia (tais como espectroscopia de ressonância magnética (MRS), imaciologia por ressonância magnética (MRI), tomografia computorizada de emissão de fotões únicos (SPECT) e tomografia por emissão de positrões (PET)).

Esta invenção proporciona, ainda, um kit de diagnóstico para detecção de uma doença, distúrbio ou estado em que os níveis de NAALADase estão alterados, compreendendo um composto de fórmula I, II ou III, como definido acima, marcado com um marcador. O kit pode ainda incluir um ou mais agentes tamponantes, agente ou agentes para redução da interferência de fundo, reagente ou reagentes de controlo e/ou aparelho para detectar a doença, distúrbio ou estado.

É ainda proporcionado um método para detecção de uma doença, distúrbio ou estado em que os níveis de NAALADase estão

alterados num animal ou num mamífero, compreendendo:

(i) marcar de um composto de fórmula I, II ou III, como definido acima, com um reagente de imagiologia;

(ii) administrar uma quantidade eficaz do composto marcado ao animal ou ao mamífero;

(iii) deixar que o composto marcado se localize e ligue à NAALADase presente no animal ou no mamífero; e

(iv) determinar a quantidade de NAALADase ligada ao composto marcado, em que a quantidade é diagnóstico da doença, patologia ou estado.

A quantidade de NAALADase pode ser determinada *in vivo* utilizando qualquer técnica de imagiologia conhecida, como descrito acima.

Incorporação por Citação

A relação entre os inibidores de NAALADase e glutamato, e a eficácia de inibidores de NAALADase no tratamento e detecção de várias doenças, patologias e estados foram discutidas nas Patentes U.S. Nº 5672592, 5795877, 5804602, 5824662, 5863536, 5977090, 5981209, 6011021, 6017903, 6025344, 6025345, 6046180, 6228888, 6265609, 6372726, 6395718, 6444657, 6452044, 6458775 e 6586623; Publicações Internacionais Nº WO 01/91738, WO 01/92274 e WO 03/057154; e outras referências geralmente conhecidas na técnica.

COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

Esta invenção proporciona, ainda, uma composição farmacêutica que compreende:

- (i) de uma quantidade eficaz de um composto de fórmula I, II ou III; e
- (ii) um veículo farmaceuticamente aceitável.

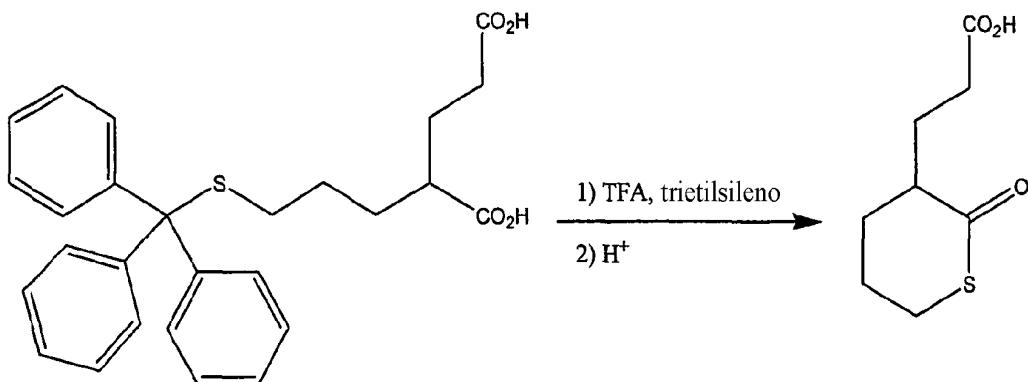
A composição farmacêutica da invenção pode compreender um ou mais ingredientes farmaceuticamente aceitáveis adicionais, incluindo sem limitação um ou mais agentes molhantes, agentes tamponantes, agentes de suspensão, agentes lubrificantes, emulsionantes, desintegrantes, absorventes, conservantes, tensoactivos, corantes, aromatizantes, edulcorantes e agentes terapêuticos adicionais.

A composição farmacêutica da invenção pode ser formulada em forma sólida ou líquida para as seguintes: (1) administração oral como, por exemplo, um produto para embeber (solução ou suspensão aquosa ou não aquosa), um comprimido (por exemplo, destinado a absorção bucal, sublingual ou sistémica), bolus, pó, granulado, pasta para aplicação na língua, cápsula de gelatina dura, cápsula de gelatina mole, pulverizador bucal, emulsão e microemulsão; (2) administração parentérica por, por exemplo, injecção subcutânea, intramuscular, intravenosa ou epidural como, por exemplo, uma solução, suspensão ou formulação de liberação prolongada estéril; (3) aplicação tópica como, por exemplo, um creme, pomada, ou penso de liberação controlada ou produto para pulverização aplicado na pele; (4) administração intravaginal ou intrarrectal como, por exemplo, um pessário, creme ou espuma; (5) administração sublingual; (6) administração

ocular; (7) administração transdérmica; ou (8) administração nasal.

EXEMPLOS

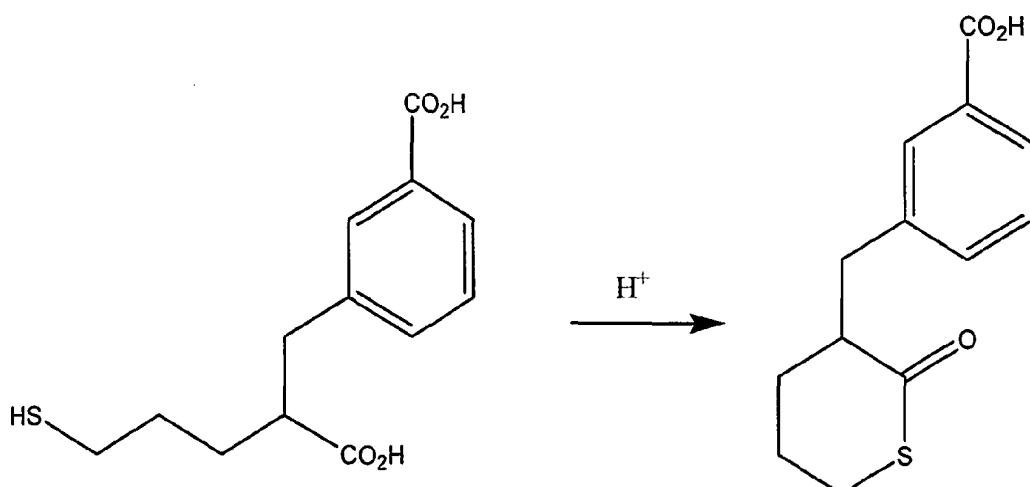
EXEMPLO 1: Preparação de ácido 3-(2-oxo-tetra-hidro-
tiopiran-3-il)propiónico (Composto 1)



A uma solução de ácido 2-[3-(tritiltio)mercaptopropil]-pentanodióico (150 g, 0,33 mol) em diclorometano (500 mL) adicionou-se, gota a gota, ácido trifluoroacético (110 mL) ao longo de 30 minutos. Depois de ser agitada durante mais 30 minutos, adicionou-se uma solução de trietilsilano (45 mL, 0,33 mol) em diclorometano (50 mL) e a mistura foi agitada a 45°C durante 1 hora. Os voláteis foram eliminados em vácuo e o resíduo foi triturado com hexanos (500 mL x 2). O resíduo oleoso foi dissolvido em tolueno (500 mL) contendo ácido 10-canforsulfônico (14 g) e aquecido a refluxo, durante 6 horas. A água libertada foi eliminada utilizando um adaptador azeotrópico de Dean-Stork. O tolueno foi eliminado por destilação e o resíduo foi purificado por cromatografia em gel

sílica (EtOAc/hexanos, 1/4). A recristalização subsequente de EtOAc/hexanos deu 23,3 g de ácido 3-(2-oxotetra-hidro-2H-tiopiran-3-il)propanóico como um sólido branco (37% de rendimento): RMN de ^1H (CD₃OD) δ 1,65–1,78 (m, 2H), 2,05–2,18 (m, 4 H), 2,35–2,48 (m, 2H), 2,65–2,74 (m, 1H), 3,13–3,29 (m, 2H); RMN de ^{13}C (CD₃OD) δ 23,3, 27,4, 29,3, 31,2, 32,3, 50,0, 177,0, 206,4. Análise calculada para C₈H₁₂O₃S: C, 51,04; H, 6,43; S, 17,03. Determinada: C, 51,08; H, 6,38; S, 17,16.

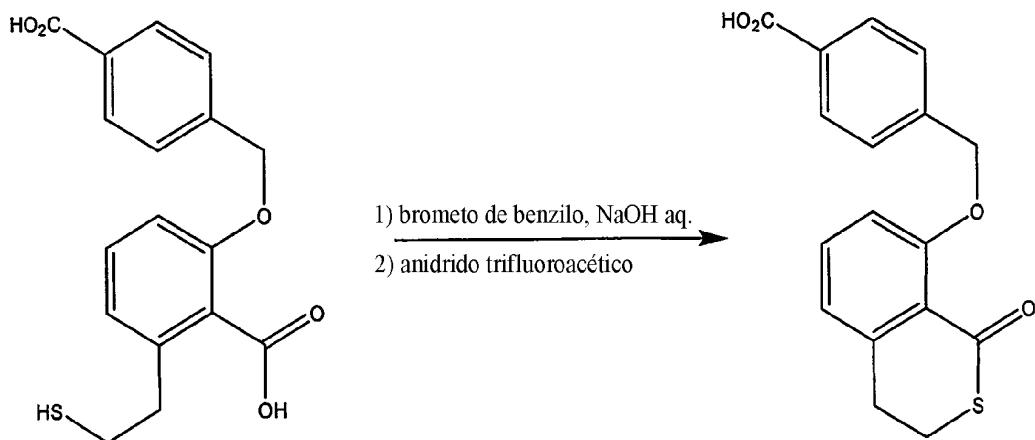
EXEMPLO 2: Preparação de ácido 3-[2-oxotetra-hidro-2H-tiopiran-3-il]metil]benzóico



Uma solução de ácido 3-(2-carboxi-5-mercaptopenil)benzóico (5,12 g, 20 mmol) e ácido 10-canforsulfónico (500 mg) em tolueno (30 mL) foi aquecida a refluxo, durante 6 horas. A água libertada foi eliminada utilizando um adaptador azeotrópico de Dean-Stork. O tolueno foi eliminado por destilação a pressão reduzida e o resíduo foi purificado por cromatografia em gel sílica (EtOAc/hexanos, 1:4). As fracções contendo o produto foram recolhidas, evaporadas e recristalizada de EtOAc/hexanos para dar 3,2 g de ácido 3-[2-oxotetra-hidro-2H-tiopiran-3-

il)metil]benzóico como um sólido branco (67% de rendimento): RMN de ^1H (CDCl_3) δ 1,58-1,68 (m, 1H), 1,90-2,02 (m, 2H), 2,04-2,13 (m, 1H), 2,68 (m, 1H), 2,78-2,86 (m, 1H), 3,08-3,19 (m, 2H), 3,37-3,44 (m, 1H), 7,38-7,48 (m, 2H), 7,93 (s largo, 1H), 7,94-8,02 (m, 1H); RMN de ^{13}C (CDCl_3) δ 22,6, 27,8, 31,1, 36,8, 52,0, 128,8, 129,2, 129,8, 131,3, 135,3, 140,1, 172,6, 203,7. Análise calculada para $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_3\text{S}$: C, 62,38; H, 5,64; S, 12,81. Determinada: C, 62,19; H, 5,65; S, 12,59.

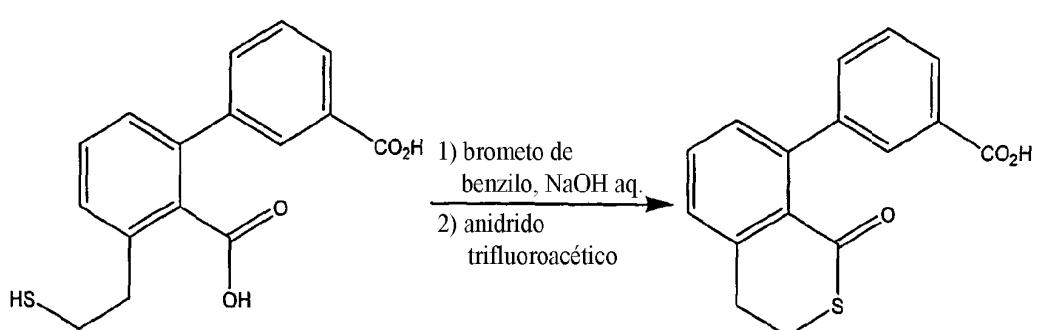
EXEMPLO 3: Preparação do ácido 4-{[(1-oxo-3,5-dihidro-1H-isotiocromen-8-il)oxi]metil}benzóico



A uma solução de ácido 2-[(4-carboxibenzil)oxil-6-(2-mercptoetil)benzóico (1,66 g, 5,0 mmol) em etanol (80 mL) adicionou-se NaOH aquoso a 4% (20 mL) e uma solução de brometo de benzilo (0,89 g, 5,2 mmol) em etanol (20 mL) a 0 °C. A mistura reaccional foi agitada, a 0 °C, durante 3 horas. O solvente foi removido a pressão reduzida e o resíduo foi dissolvido em EtOAc. A solução orgânica foi lavada com HCl 12 N. A camada orgânica foi seca sobre MgSO_4 e concentrada para dar

2,0 g de sólido branco. Este sólido foi dissolvido em anidrido trifluoroacético (15 mL) e a mistura resultante foi agitada a 60 °C durante 2 horas. Os voláteis foram removidos em vácuo e o resíduo foi dissolvido em NaHCO₃ aquoso saturado a 0 °C a que se seguiu acidificação com HCl 12 N. O precipitado resultante foi recuperado por filtração e muito bem lavado com água. O sólido recuperado foi purificado por cromatografia em gel sílica (EtOAc/hexanos/AcOH, 1/1/0,02) para dar 0,8 g de ácido 4-{[(1-oxo-3,4-di-hidro-1H-isotiocromen-8-il)oxi]metil}benzóico como um pó branco (54% de rendimento): RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ 3,15-3,30 (m, 4H), 5,26 (s, 2H), 7,02-7,07 (m, 1H), 7,20-7,27 (m, 1H), 7,53-7,60 (m, 1H), 7,66-7,72 (m, 2H), 8,00-8,05 (m, 2H); RMN de ¹³C (DMSO-d₆) δ 28,7, 31,6, 69,2, 113,2, 121,2, 121,5, 126,6, 123,3, 130,0, 134,0, 142,0, 143,8, 156,2, 167,1, 187,2. Análise calculada para C₁₃H₁₄O₃S : C, 62,38; H, 5,64; S, 12,81. Determinada: C, 62,19; H, 5,65; S, 12,59.

EXEMPLO 4: Preparação do ácido 3-(1-oxo-3,4-di-hidro-1H-isotiocromen-8-il)benzóico



Pelo método apresentado anteriormente no Exemplo 3 mas utilizando ácido 3-(2-mercptoetil)-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico preparou-se o ácido 3-(1-oxo-3,4-di-hidro-1H-isotiocromen-8-il)benzóico (34% de rendimento): RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) δ 3,21-3,42 (m, 4H), 7,27-7,37 (m, 1H), 7,45-7,53 (m, 3H), 7,57-7,64 (m, 1H), 7,75-7,79 (m, 1H), 7,87-7,94 (m, 1H).

EXEMPLO 5: Eficácia de Inibidores de NAALADase no Tratamento de Distúrbios Retinianas

Quatro grupos de ratos receberam diariamente injecções insulina para manter os seus níveis de glucose a cerca de 350 mg/dL. começando no início da hiperglicemia, o inibidor de NAALADase ácido 2-(3-sulfanilpropil)-pentanodióico (Composto B) foi administrado diariamente durante 6 meses a um grupo de ratos BB/W numa dose de 10 mg/kg e a um segundo grupo de ratos BB/W a uma dose de 30 mg/kg. Um terceiro grupo de ratos BB/W e um quarto grupo de ratos não diabéticos receberam diariamente tratamento com veículo (soro fisiológico tamponado com Hepes 50 mM).

Após 6 meses de tratamento com Composto B ou tratamento com veículo, os ratos foram sacrificados e os seus olhos foram retirados. De cada rato, um olho foi processado para digestão com elastase enquanto que o outro olho foi processado para microscopia electrónica de transmissão (TEM) e espessura da membrana basal (BM).

Digestão com Elastase

Foi preparada a digestão da retina utilizando elastase nas

retinas como descrito em Layer, N., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (1993) 34: 2097. Foram retirados olhos de ratos BB/W mortos recentemente (n=30) e controlos transgénicos de idade correspondente (n=12). As retinas (n=12) foram fixas à temperatura ambiente por imersão do olho inteiro (ranhura no limbus) em paraformaldeído a 4% (p/v) em tampão de fosfato de Na-K a 50 mmol/L com sacarose a 8%. As retinas fixadas foram lavadas com água desionizada e foram incubadas durante 3 minutos num banho de água desionizada a 37 °C com agitação em 40 unidades de elastase/mL em tampão fosfato de Na-K com NaCl a 150 mmol/L e ácido etilenodiamina tetraacético (EDTA) a 5 mmol/L, pH 6,5. Os tecidos foram lavados de um dia para o outro em Tris-HCl a 100 mmol/L (pH 8,5) e, depois, transferidos para água desionizada para remoção do humor vítreo solto e elementos neurais digeridos por agitação suave utilizando os lados de pinças fechadas e os lados e as extremidades de pincéis muito finos. Depois de retirados todos os tecidos soltos, as retinas foram incubadas, mais uma vez, em enzima fresca durante 3 minutos e, depois, submetidas a uma segunda lavagem de um dia para o outro à temperatura ambiente em tampão Tns-HCl. No terceiro dia, as retinas foram de novo transferidas para água desionizada para remoção adicional de elementos neurais digeridos. A rede vascular que estava completamente livre de elementos não vasculares foi montada plana por flotação em soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS) de Dulbecco isento de Ca²⁺ e Mg²⁺ em lâminas siliconizadas (Nº S1308, Oncor, Gaithersburg, MD). Depois de secas ao ar num ambiente sem pó, as montagens da microvasculatura retiniana foram coradas utilizando reacção de Schiff com ácido periódico e contra-coloração com hematoxilina, como descrito em Luna, L., ed. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology* (1968) McGraw-Hill, Nova Iorque, NI. As preparações foram, depois, examinadas por microscopia de luz e fotografadas.

Razões Endotelial/Pericito (E/P)

As montagens retinianas inteiras coradas e intactas foram codificadas e contadas, como descrito em Cuthbertson, R., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (1986) 27:1659-1664).

Foram contados dez campos a amplificações de 100 x para células endoteliais e pericitos utilizando critérios morfológicos anteriormente descritos (ver Kuwabara, T., *Arch. Ophthalmol.* (1960) 64:904-911). Em cada amostra, pelo menos, 200 células foram contadas a partir da zona média da retina. Os valores médios para as razões célula endotelial/pericito foram inicialmente calculadas em 3 retinas de cada dos 4 grupos de ratos.

Avaliação da Espessura da BM

Cada olho foi fixado em glutaraldeído a 4% e dissecado para ficar livre da esclera e coróides, depois aparado e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1%. Após desidratação e inserção, secções finas foram coradas com acetato de uranilo e citrato de chumbo. Inicialmente, a espessura de BM de capilares retinianos de 3 ratos não diabéticos que recebiam veículo, 3 animais diabéticos que recebiam 10 mg/kg de Composto B e 3 ratos diabéticos que recebiam 30 mg/kg de Composto B foram comparados com 3 ratos diabéticos que recebiam um veículo. Pelo menos 10 capilares por olho das camadas nuclear interna e plexiforme foram fotografados a uma amplificação de 10000 x. Determinou-se a amplificação exacta para cada conjunto de negativos com uma grelha de calibração com 28.800 linhas/polegada. Os negativos foram ampliados 3 x. Foram feitas medições, com aproximação até aos 0,25 mm, da BM que circunda a célula endotelial e foram

feitas perpendicularmente ao plano da BM, como descrito em Bendayan, M., *J. Electron Microsc. Techs* (1984) 1:243-270; e Gunderson, *J. Microscopy* (1980) 121:65-73). foram feitas pelo menos 20 determinações para cada capilar e a espessura da BM foi expressa como uma média de 20 determinações.

Análise Estatística

A análise estatística para comparação entre grupos foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) a um factor e o teste t de Student. A significância foi definida como um valor de $p < 0,05$. Os valores foram expressos como média \pm erros padrão em relação à média (SEM), salvo indicação em contrário.

Resultados das Preparações para Digestão com Elastase e Razões E/P

Em montagens inteiras intactas de digeridos retinianos os núcleos das células endoteliais, observados medialmente no seio da parece do vaso, eram grandes, ovais, com coloração pálida e sobressaiam luminalmente. Os núcleos dos pericitos, observados mais lateralmente, estavam corados de escuro e eram pequenos, redondos e sobressaiam proeminentemente afastando-se da parede do vaso. As contagens de E/P foram feitas em zonas médias das retinas. As figuras anexas mostram fotografias ampliadas 27000 x de vasos sanguíneos retinianos de rato não diabético de controlo (FIG. 1), de um rato diabético de controlo 6 meses após o tratamento com um veículo (FIG. 2) e de um rato diabético após 6 meses de tratamento com o Composto B (FIG. 3).

A inibição de NAALADase não teve efeito sobre a glucose no sangue ou o peso corporal. O tratamento com dose elevada (30 mg/kg) com Composto B resultou numa redução de 29,0% da espessura da BM (veículo em diabéticos = $101,0 \pm 14,81$ nm e NAALADase₃₀ de diabéticos = $71,7 \pm 4,07$ nm), enquanto que o tratamento com dose baixa (10 mg/kg) com Composto B resultou num decréscimo de 18,5% na espessura da BM (NAALADase₁₀ = $82,3 \pm 4,07$ nm). O tratamento de dose elevada com Composto B também resultou numa redução de 33,0% das razões de células endoteliais para pericitos (veículo em diabéticos = $3,0 \pm 0,1$ e NAALADase₃₀ = $2,0 \pm 0,9$), enquanto que o tratamento com dose baixa com Composto B resultou numa redução de 16,7% das mesmas razões de células (NAALADase₁₀ = $2,5 \pm 0,5$). Ver a TABELA II.

TABELA II

GRUPO DE RATOS	ESPESSURA DA BM (nm) \pm DP	RAZÃO E/P
CONTROLOS EM NÃO DIABÉTICOS	$56,3 \pm 4,78$	$1,8 \pm 0,07$
VEÍCULO EM DIABÉTICOS	$101 \pm 14,81$	$3,0 \pm 0,1$
30 MG/KG DE INIBIDOR DE NAALADase EM DIABÉTICOS	$71,7 \pm 4,07$	$2,0 \pm 0,4$
10 MG/KG DE INIBIDOR DE NAALADase EM DIABÉTICOS	$82,3 \pm 4,07$	$2,5 \pm 0,5$

Conclusões

Enquanto os ratos BB/W demonstraram uma alteração precoce tipicamente associada a retinopatia diabética (perda de pericitos e espessamento da BM), não evidenciaram números

significativos de microaneurismas também típicos de retinopatia diabética ou áreas de capilares acelulares habitualmente observadas numa doença mais avançada. A retinopatia observada em ratos BB/W tinha sido previamente caracterizada em Chakrabarti, *Diabetes* (1989) 38:1181-1186.

Os resultados mostram que o tratamento com um inibidor de NAALADase causa melhoramento na patologia retiniana de ratos diabéticos. Especificamente, o inibidor de NAALADase impediu a perda de pericitos e o espessamento da BM em vasos retinianos.

EXEMPLO 6: Efeito Protector de Inibidores de NAALADase em Glaucoma Experimental de Rato

Protocolo Experimental

Todas as experiências cumpriram o "Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research". 82 ratos machos Brown Norway (*Rattus norvegicus*), pesando cada um aproximadamente, 250 g, foram tratados utilizando processos aprovados pelo "Animal Care Committee of the Johns Hopkins University School of Medicine". Os ratos foram alojados com um ciclo de um período de 12 horas de luz/12 horas de escuro e alimentados *ad libitum*.

Glaucoma Experimental

A elevação unilateral da pressão intra-ocular ("IOP") foi produzida em 56 ratos por micro-injeção de soro fisiológico hipertônico em veias episcleróticas, seguindo processos descritos em Morrison, J. et al., *IOVS* (March 1998) 39: 526-531. Começando no dia da elevação da IOP, os ratos foram tratados

diariamente com injecções intraperitoneais de um veículo (23 ratos com soro fisiológico tamponado com HEPES 50 mM) ou um inibidor de NAALADase (11 ratos com 10 mg/kg de Composto A e 22 ratos com 10 mg/kg de Composto B). 11 ratos tratados com soro fisiológico, 11 ratos tratados com composto A e 11 ratos tratados com composto B foram sacrificados às 8 semanas, e os restantes ratos às 12 semanas, após a elevação de IOP inicial.

Transecção do Nervo Óptico

O nervo óptico foi transectado unilateralmente em 26 ratos sob anestesia com pentobarbital intraperitoneal. A conjuntiva foi aberta com uma tesoura e o nervo óptico foi exposto por tracção sobre os músculos extra-oculares. A transecção foi realizada com microtesouras de 5 mm na parte posterior do globo, com atenção específica para evitar lesão dos principais vasos sanguíneos oculares. Imediatamente após a transecção, a retina foi examinada oftalmoscopicamente para assegurar que o fornecimento de sangue arterial retiniano não era interrompido. A conjuntiva foi fechada com sutura absorvível e o olho tratado com pomada de antibiótico. Com início no dia da transecção, os ratos foram tratados diariamente com injecções intraperitoneais de um veículo (9 ratos com soro fisiológico tamponado com HEPES 50 mM) ou um inibidor de NAALADase (8 ratos com 10 mg/kg de Composto A e 9 ratos com 10 mg/kg de Composto B). 5 ratos tratados com soro fisiológico, 3 ratos tratados com Composto A e 4 ratos tratados com Composto B foram sacrificados à 2 semanas, e os restantes ratos às 4 semanas, após a transecção.

Contagem do Nervo Óptico

Os ratos foram sacrificados por dessangramento sob anestesia profunda com pentobarbital. Foram perfundidos através

do coração com paraformaldeído a 2%/glutaraldeído a 2% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, e os olhos com os nervos ópticos ligados foram retirados. Secções transversais dos nervos ópticos tanto de olhos experimentais (glaucoma ou transecção) e de controlo foram retirados 1,5 mm por trás do globo, 1 mm de espessura e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 2% em tampão. Estes foram processados em resina epoxi, seccionados a 1 micrometro e corados com azul de toluidina.

A área de cada secção transversal de nervo óptico foi medida por exposição do seu bordo exterior a uma ampliação de 10 x num sistema de análise de imagens (Universal Imaging Corp., Westchester, PA) com câmara digital Synsys e software Metamorph. Foram feitas três determinações da área e determinado o valor médio. Para medir a densidade e distribuição do diâmetro das fibras, foram obtidas imagens com uma objectiva de contraste de fase de 100 x de 10 áreas diferentes de cada nervo. Estas foram editadas para eliminar objectos não neurais e determinou-se o tamanho de cada axónio à bainha de mielina (o seu diâmetro mínimo) e a densidade de axónios/m quadrado para cada imagem e nervo. A densidade média foi multiplicada pela área total do nervo para dar o número de fibras para cada nervo. O número total de fibras em glaucoma ou nervos de transecção foi comparado com o olho emparelhado, normal de cada rato para dar um valor de perda percentual. O número de axónios contados entre as 10 imagens era aproximadamente, 20% dos 80-90000 axónios em nervos de ratos normais. A pessoa que determinou o número de axónios não conhecia o protocolo experimental realizado nos nervos.

Resultados

Glaucoma Experimental

A diferença média percentual de fibra em ratos de controlo tratados com soro fisiológico era significativamente mais baixa nos seus olhos com glaucoma em comparação com os seus olhos normais, com uma perda média de fibra de $14,44 \pm 5,75\%$ ($n = 11$ ratos; TABELA III) num grupo com acompanhamento durante 8 semanas e $8,15 \pm 7,84\%$ no grupo com acompanhamento durante 12 semanas ($n = 12$ ratos, TABELA IV).

Em contraste, não houve perda significativa de fibras nos ratos tratados com inibidor de NAALADase durante 8 ou 12 semanas. A perda percentual média de fibra em cada grupo tratado com inibidor de NAALADase era estatisticamente menor do que a perda nos grupos de controlo tratados com soro fisiológico (às 8 semanas, $p = 0,05$ para o Composto A e $p = 0,02$ para o Composto B).

TABELA III: RESULTADOS DO GLAUCOMA EXPERIMENTAL

Grupo de 8 semanas	N	Diferença integral de IOP	NÚMERO DE FIBRAS	Diferença percentual
Composto A	11	$85 \pm 37,5$	$79156 \pm 2436^*$	$-1,82 \pm 2,92$
Composto B	11	$116 \pm 33,2$	$80785 \pm 2121^{**}$	$-0,82 \pm 2,97$
Controlo	11	$104 \pm 26,4$	68295 ± 4617	$14,44 \pm 5,75$

TABELA IV: RESULTADOS DO GLAUCOMA EXPERIMENTAL

Grupo de 12 semanas	N	Diferença integral de IOP	NÚMERO DE FIBRAS	Diferença percentual
Composto B	11	109 ± 45,2	90504 ± 1718	-3,21 ± 2,86
Controlo	12	158 ± 66,5	79827 ± 6783	8,15 ± 7,84

Diferença Integral de IOP = diferença na exposição da IOP entre o olho com glaucoma e o olho normal em cada rato (mm Hg - dias).

Diferença Percentual = diferença percentual média do número de fibras entre o olho com glaucoma e o olho normal em cada rato (um valor positivo indica menos fibras no olho com glaucoma).

As diferenças da Diferença Integral da IOP não são significativas ($p > 0,05$). As diferenças nas diferenças percentuais entre ratos tratados com fármaco e ratos de controlo tratados com soro fisiológico às 8 semanas pós lesão são significativas ($p = 0,05^*$ e $p = 0,02^{**}$).

Transecção do Nervo Óptico

Os dados da transecção experimental sugerem um abrandamento ou resgate da morte de células ganglionares retinianas finais (RGC) em ratos tratados com inibidores de NAALADase às 2 semanas após transecção. Às 2 semanas após a transecção, ambos os grupos tratados com fármaco tinham mais axónios de RGC remanescentes do que o grupo de controlo tratado com soro fisiológico, a avaliar quer pelo número de fibras absoluto quer pela diferença percentual entre olho transectado e olho normal em cada rato.

(TABELA V). Os ratos tratados com Composto A e Composto B tinham, respectivamente, três vezes e duas vezes mais axónios remanescentes do que os ratos tratados com soro fisiológico. Todos ou praticamente todos os RGC morrem dentro dos primeiros 2 meses após a transecção, independentemente de qualquer tratamento farmacológico. Assim, pelas 4 semanas após a transecção, mais do que 80% dos axónios de RGC tinham desaparecido em todos os grupos (TABELA VI). Às 4 semanas após a transecção, não havia diferenças significativas entre os ratos tratados com fármaco e os ratos tratados com soro fisiológico.

TABELA V: TRANSECÇÃO DO NERVO ÓPTICO

Sobrevivência de 2 semanas	N	NÚMERO DE FIBRAS	Diferença percentual
Composto A	3	26.426 ± 23.025	65,3 ± 30,9
Composto B	4	19.550 ± 11.383	75,3 ± 14,8
Controlo	5	8.220 ± 9.337	90,2 ± 10,7

TABELA VI: TRANSECÇÃO DO NERVO ÓPTICO

Sobrevivência de 4 semanas	N	NÚMERO DE FIBRAS	Diferença percentual
Composto A	3	13.599 ± 7.868	82,4 ± 8,9
Composto B	4	5.162 ± 5.017	93,4 ± 6,2
Controlo	5	10.449 ± 8.157	86,9 ± 10,6

Diferença Percentual = diferença percentual média do número de fibras entre o olho com glaucoma e o olho normal em cada rato (um valor positivo indica menos fibras no olho com glaucoma).

As diferenças nas Diferenças Percentuais entre ratos

tratados com fármaco e ratos de controlo tratados com soro fisiológico não são estatisticamente significativas ($p = 0,05$).

EXEMPLO 7: Efeitos do Inibidor de NAALADase no Desenvolvimento de Tolerância à Morfina

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Indivíduos

Murganhos C57/BL machos (IMP, Lodz, Polónia), com 22-24 g de peso corporal, foram alojados em grupos em gaiolas de laboratório correntes e mantidas numa sala com temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) com um ciclo de luz/escuridão de 12 horas (luz acesa: 7:00, apagada: 19:00). Comida comercial e água da torneira estavam disponíveis *ad libitum*. Cada grupo experimental consistia em 7-28 murganhos por tratamento. Todos os murganhos foram utilizados uma só vez.

Equipamento para as Experiências 1-2

Um medidor de analgesia corrente por retirada da cauda (Columbus, Ohio, EUA, modelo 33), ajustado para uma sensibilidade de "10" com fonte de calor radiante e ligado a um cronómetro automático foi utilizado para avaliar respostas antinociceptivas. A intensidade do estímulo térmico foi ajustada de modo que a latência da retirada da cauda da linha de base fosse de 3 segundos. Uma latência máxima de 10 segundos (*i. e.*, de corte) foi utilizada para minimizar as lesões na cauda. A latência de retirar a cauda foi medida desde o início do estímulo térmico até o murganho apresentar uma retirada da

cauda. Cada avaliação de resposta consistiu em duas determinações separadas efectuadas em diferentes porções da cauda (com um espaçamento de 1,5-2 cm) e separadas por 15 segundos. A média destas respostas foi utilizada para comparações subsequentes.

A potência antinociceptiva da morfina foi investigada com a utilização de curvas de resposta à dose cumulativa que permitiu a minimização do número de animais utilizados (Paronis e Holtzman 1991). Depois dos ensaios de adaptação e de linha de base, a cada murganho foi injectada s.c. uma dose baixa de morfina (1 mg/kg). Trinta minutos depois, o murganho foi ensaiado de novo e injectado com a dose seguinte de morfina que foi aumentada em um quarto de uma unidade logarítmica. Assim, dado que a dose inicial de morfina era 1,0 mg/kg, a dose seguinte era 1,78 mg/kg, para uma dose cumulativa de 2,8 mg/kg. Este procedimento continuou até o murganho não mover a sua cauda dentro do tempo de corte ou até se atingir um patamar da curva de resposta à dose, de tal modo que a latência não aumentou de uma dose para a seguinte. Cada respondedor analgésico não foi submetido a mais avaliações por retirada da cauda mas foi injectado com a dose subsequente de morfina de modo que cada animal recebeu a mesma dose total de morfina durante um dado ensaio.

Efeitos da Tolerância à Morfina (Experiência 1) e Efeitos Agudos no Ensaio de Retirada da Cauda (Experiência 2)

A experiência 1 foi realizada para investigar o efeito de 2-PMPA no desenvolvimento de tolerância à morfina. No dia 1 (ensaio N° 1), foi realizada a primeira determinação da potência antinociceptiva da morfina, seguida por 6 dias de injecções bid

de morfina (10 mg/kg, s.c., 7:30 e 17:30) (Elliott et al. 1994; Popik et al. 2000b). O pré-tratamento com ácido 2-(fosfonometil)pentanodióico (2-PMPA; 30, 50 ou 100 mg/kg, i.p.) ou memantina (7,5 mg/kg, s.c., um "controlo positivo") foi administrado aos 30 minutos antes de cada dose de morfina nos dias 2-7. No dia 8 (ensaio N° 2), foi realizada a segunda determinação da potência antinociceptiva da morfina. O grau de tolerância à morfina foi avaliado por comparação das potências antinociceptivas da morfina (curvas de resposta à dose cumulativa) obtidas nos ensaios N° 1 e N° 2.

A experiência 2 foi concebida para determinar se o próprio 2-PMPA pode produzir efeitos antinociceptivos e/ou afectar os efeitos antinociceptivos da morfina. Administrou-se morfina (1,5 ou 3 mg/kg, s.c.) 30 min após a injecção de 100 mg/kg de 2-PMPA ou placebo, administrado i.p. A dose de 3 mg/kg de morfina corresponde à dose ED₅₀ antinociceptiva nestas condições de ensaio (dados não apresentados).

RESULTADOS

Efeitos do Inibidor de NAALADase no Desenvolvimento de Tolerância à Morfina (Experiência 1)

Não houve diferenças nos valores da ED₅₀ antinociceptivos de morfina no ensaio N° 1 entre os grupos (TABELA VII). O tratamento com 10 mg/kg bid de morfina produziu um aumento de 6,44 vezes dos valores da ED₅₀ determinados no ensaio #2. Em contraste, o pré-tratamento com memantina, 50 ou 100 (mas não 30) mg/kg de 2-PMPA administrados antes de cada dose de morfina atenuou o desenvolvimento de tolerância à morfina. Os efeitos de 2-PMPA estavam relacionados com a dose. Isto foi evidenciado por

um decréscimo significativo tanto nos valores da ED₅₀ do ensaio N° 2 (estatisticamente significativo para a dose de 100 mg/kg) como nas vezes dos desvios de morfina antinociceptiva de 2-PMPA para as doses de 100 e 50 mg/kg, em comparação com o grupo de controlo que recebeu placebo+morfina (Tabela VII). Analogamente, a memantina (7,5 mg/kg) produziu uma inibição da tolerância à morfina.

TABELA VII: EFEITOS DE 2-PMPA E MEMANTINA NO DESENVOLVIMENTO DE TOLERÂNCIA À MORFINA

Tratamento/dose mg/kg (N)	ED ₅₀ do	ED ₅₀ do	Vezes de desvio
	Ensaio N° 1	Ensaio N° 2	
Placebo + morfina (8)	1,49 ± 0,26	8,85 ± 2,22	6,44 ± 1,17
Placebo + placebo (8)	2,23 ± 0,42	3,28 ± 0,47*	1,70 ± 0,29*
2-PMPA 30 + Morfina (9)	2,00 ± 0,43	9,47 ± 2,13	5,20 ± 1,26
2-PMPA 50 + Morfina (9)	1,87 ± 0,34	5,41 ± 1,11	3,20 ± 0,66*
2-PMPA 100 + Morfina (10)	1,59 ± 0,30	3,49 ± 0,83*	2,70 ± 0,57*
Memantina 7,5 + Morfina (8)	1,51 ± 0,29	3,52 ± 0,88*	2,60 ± 0,49*
ANOVA: F(5, 46)	0,71; ns	3,891; P<0,01	4,555; P<0,01

Estão apresentados os valores médios da ED₅₀ com ± SEM determinados durante o ensaio N° 1 (pré-morfina) e ensaio N° 2 (pós-morfina) bem como as vezes de desvio resultantes. Os asteriscos (*) indicam uma diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo de Placebo + Morfina que receberam soro fisiológico e morfina durante o desenvolvimento de tolerância à morfina (*p <0,05, teste de Newman Keul).

Efeitos de 2-PMPA na Resposta de Retirada da Cauda e
Efeitos Antinociceptivos da Morfina (Experiência 2)

A análise das áreas sob as curvas (AUC) mostraram que o

tratamento com placebo + 1,5 e 3 mg/kg de morfina produziu respostas de retirada da cauda estatisticamente significativamente mais longas em comparação com o tratamento placebo + placebo. Em contraste, o tratamento com 100 mg/kg de 2-PMPA + placebo não afectou as respostas de retirada da cauda em comparação com o tratamento com placebo + placebo. Além disso, esta dose de 2-PMPA não afectou os efeitos antinociceptivos de 1,5 ou 3 mg/kg de morfina (FIG. 4).

Na FIG. 4 estão apresentados os períodos de tempo das respostas de retirada da cauda de murganhos tratados com combinação de 2-PMPA e morfina. O N está apresentado entre parênteses. Na FIG. 5 estão os valores médios ± SEM da área sob a curva (AUC) calculados com os mesmos dados.

A ANOVA a um factor $F(5,48) = 19,28$, $P < 0,0001$ e teste de Newman-Keul post-hoc mostraram que o tratamento com placebo + morfina 1,5 mg/kg e com 100 mg/kg de 2-PMPA + morfina 1,5 mg/kg diferiram significativamente (**, $P < 0,01$) do tratamento com placebo + placebo. Analogamente, o tratamento com placebo + morfina 3 mg/kg e o com 100 mg/kg de 2-PMPA + morfina 3 mg/kg diferiram significativamente (***, $P < 0,001$) do tratamento com placebo + placebo. Os efeitos do tratamento com 100 mg/kg de 2-PMPA + placebo não diferiram do tratamento com placebo + placebo. Os efeitos de placebo + doses respectivas de morfina não diferiram dos efeitos de 2-PMPA+ doses respectivas de morfina.

EXEMPLO 8

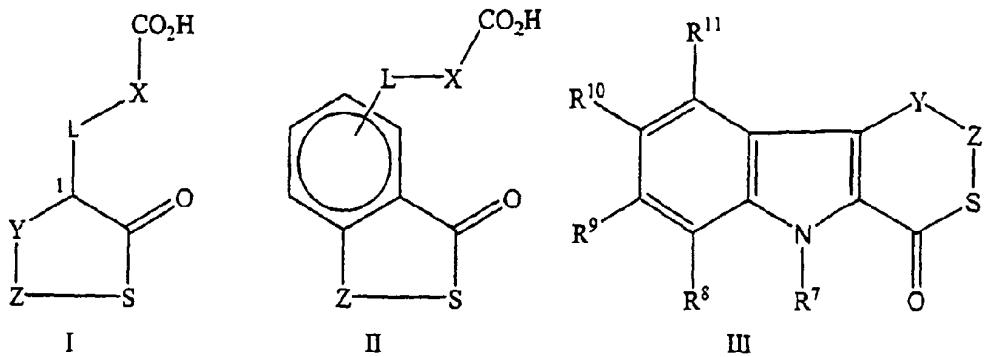
Um doente que sofre de qualquer doença, distúrbio ou estado em que os níveis de NAALADase estão alterados, incluindo

qualquer das doenças, distúrbios ou estados descritos acima. Ao doente pode então ser administrada uma quantidade eficaz de um composto da invenção. Espera-se que após esse tratamento, o doente não venha a sofrer qualquer lesão significativa devida à, esteja protegido de lesão adicional devida à, ou recupere da doença, patologia ou estado.

Lisboa, 13 de Julho de 2009

REIVINDICAÇÕES

1. Composto de fórmula I, II ou III



ou os seus sais farmaceuticamente aceitáveis, hidratos e solvatos, em que:

X é alquílenoC₁-C₄, alcenílenoC₂-C₄, alcinílenoC₂-C₄, cicloalquílenoC₃-C₈, cicloalcenílenoC₅-C₇ ou Ar, em que o alquíleno, alceníleno, alciníleno, cicloalquíleno ou cicloalceníleno está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes;

L é uma ligação, -CR¹R²-, -O-, -S-, -SO₂- ou -NR¹-;

Y é -O-, -S-, -CR³R⁴- ou -NR³-;

Z é -(CR⁵R⁶)_n-;

n é 1, 2, 3 ou 4;

Ar é um radical arilo ou heteroarilo bivalente que está não

substituído ou substituído com um ou mais substituintes;

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 e R^6 são, independentemente, hidrogénio, alquilo C_1-C_4 ou alcenilo C_2-C_4 , em que o alquilo ou alcenilo está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes;

R^7 é hidrogénio, fenilo, feniletilo ou benzilo, em que o fenilo, feniletilo ou benzilo está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes; e

R^8 , R^9 , R^{10} e R^{11} são independentemente hidrogénio, carboxilo, hidroxilo, halogéneo, nitro, ciano, alquilo C_1-C_4 ou alcoxilo C_1-C_4 ,

desde que quando o composto tem a fórmula I, n é 2, 3 ou 4; e

desde que quando o composto tem a fórmula I, L é uma ligação e X é etilo, então Y não é $-CR^3R^4-$; e

desde que quando o composto tem a fórmula III, e quando R^8 , R^9 , R^{10} e R^{11} são hidrogénio, e Y e Z são grupos $-CH_2-$, então R^7 não é hidrogénio nem um grupo fenilo ou benzilo substituído.

2. Composto da reivindicação 1, em que o composto é de fórmula I.
3. Composto da reivindicação 2, em que

Y é $-CR^3R^4-$; e

n é 2.

4. Composto da reivindicação 3, em que:

L é $-CR^1R^2-$, $-O-$, $-S-$ ou NH;

X é alquilenoC₁-C₂ ou Ar; e

Ar é fenileno, bifenileno, benzileno ou naftileno, em que o fenileno, bifenileno, benzileno ou naftileno está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes independentemente seleccionados de carboxilo, halogéneo, nitro, alquiloC₁-C₄, alcoxiloC₁-C₄, fenilo, fenoxilo e benziloxilo.

5. Composto da reivindicação 4, que é o ácido 3-[(2-oxotetrahidro-2H-tiopiran-3-il)metil]benzóico ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, hidrato e solvato.

6. Composto da reivindicação 1, em que o composto é de fórmula II.

7. Composto da reivindicação 6, em que:

L é uma ligação, $-CR^1R^2-$ ou $-O-$; e

n é 2.

8. Composto da reivindicação 7, em que:

X é alquilenoC₁-C₄ ou Ar; e

Ar é fenileno, bifenileno ou benzileno que está não

substituído ou substituído com um ou mais substituintes seleccionados independentemente de carboxilo, halogéneo, nitro, alquiloC₁-C₄, alcoxiloC₁-C₄, fenoxilo e benziloxilo.

9. Composto da reivindicação 8, que é:

ácido 3-(1-oxo-isotiocroman-8-il)-benzóico;
ácido 3-(1-oxo-isotiocroman-8-iloximetil)-benzóico;
ou um seu sal, hidrato ou solvato farmaceuticamente aceitável.

10. Composto da reivindicação 1, em que o composto é de fórmula III.

11. Composto da reivindicação 10, em que:

R⁸, R⁹, R¹⁰ e R¹¹ são independentemente hidrogénio ou carboxilo.

12. Composto da reivindicação 11, em que:

R⁷ é fenilo ou benzilo substituído com um ou mais substituintes seleccionados independentemente de carboxilo, halogéneo, alquiloC₁-C₄ e alcoxiloC₁-C₄.

13. Composto da reivindicação 12 que é o ácido 3-(1-oxo-3,4-dihidro-1H-2-tia-9-aza-fluoren-9-il)-benzóico.

14. Utilização de um composto como definido em qualquer das reivindicações 1 a 13 para a preparação de um medicamento para inibir a actividade enzimática de NAALADase, tratar uma anomalia de glutamato, exercer uma actividade neuronal, tratar uma doença da próstata, tratar cancro, inibir a

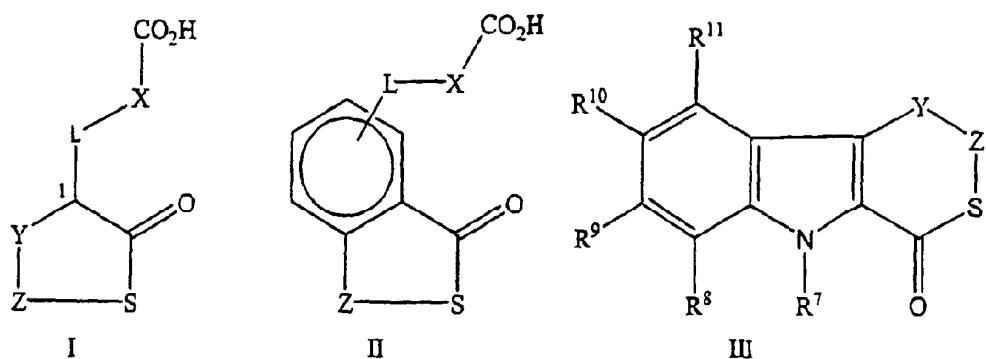
angiogéneses, exercer uma actividade de TGF- β , tratar a doença de Huntington, tratar diabetes, tratar um distúrbio retiniano ou tratar glaucoma.

15. Utilização de acordo com a reivindicação 14, em que a anomalia de glutamato é seleccionada de distúrbio compulsivo, acidente vascular, doença desmielinizante, esquizofrenia, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica (ALS), ansiedade, distúrbio da ansiedade, deterioração da memória e glaucoma.
16. Utilização de acordo com a reivindicação 15, em que a anomalia de glutamato é um distúrbio compulsivo que é dependência de álcool, nicotina, cocaína ou opiáceos.
17. Utilização de acordo com a reivindicação 14, em que o exercício de uma actividade neuronal é seleccionado de estimulação de neurónios lesionados, promoção da regeneração neuronal, prevenção da neurodegeneração e tratamento de uma doença neurológica.
18. Utilização de acordo com a reivindicação 17, em que a doença neurológica é dor, neuropatia diabética, neuropatia periférica, lesão cerebral traumática, lesão física da medula espinal, acidente vascular associado a lesão cerebral, uma doença desmielinizante ou um distúrbio neurológico relacionado com neurodegeneração.
19. Utilização de acordo com a reivindicação 18, em que a neuropatia periférica é induzida por VIH, por produtos químicos ou por vitaminas.
20. Utilização de acordo com a reivindicação 18, em que a dor é

dor neuropática diabética.

21. Utilização de acordo com a reivindicação 20, em que o composto é administrado em associação com uma quantidade eficaz de morfina.
22. Utilização de acordo com a reivindicação 18, em que a doença neurológica relacionada com neurodegeneração é doença de Parkinson.
23. Utilização de acordo com a reivindicação 18, em que o distúrbio neurológico relacionado com neurodegeneração é esclerose lateral amiotrófica (ALS).
24. Utilização de acordo com a reivindicação 14, em que a doença da próstata é o cancro da próstata.
25. Utilização de acordo com a reivindicação 14, em que o medicamento é para o tratamento de cancro do cérebro, rim ou testículos.
26. Utilização de acordo com a reivindicação 14, em que o medicamento é para o tratamento de uma anomalia de TGF- β que é um distúrbio neurodegenerativo, um distúrbio de formação da matriz extracelular, uma doença relacionada com o crescimento celular, uma doença infecciosa, uma doença relacionada com o sistema imunitário, uma formação de cicatrizes no tecido epitelial, uma doença vascular do colagénio, um distúrbio fibroproliferativo, um distúrbio do tecido conjuntivo, uma inflamação, uma doença inflamatória, síndrome do esforço respiratório, infertilidade ou diabetes.

27. Utilização de acordo com a reivindicação 14, em que o medicamento é para tratamento de diabetes mellitus de tipo I ou tipo II.
28. Utilização de acordo com a reivindicação 14, em que o medicamento é para tratamento de uma doença retiniana que é retinopatia diabética ou degeneração macular relacionada com a idade.
29. Utilização de um composto de fórmula I, II ou III



ou dos seus sais farmaceuticamente aceitáveis, hidratos e solvatos, em que:

X é alquílenoC₁-C₄, alcenílenoC₂-C₄, alcinílenoC₂-C₄, cicloalquílenoC₃-C₈, cicloalcenílenoC₅-C₇ ou Ar, em que o alquíleno, alceníleno, alciníleno, cicloalquíleno ou cicloalceníleno está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes;

L é uma ligação, -CR¹R²-, -O-, -S-, -SO₂- ou -NR¹-;

Y é -O-, -S-, -CR³R⁴- ou -NR³-;

z é $-(CR^5R^6)_n-$;

n é 1, 2, 3 ou 4;

Ar é um radical arilo ou heteroarilo bivalente que está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes;

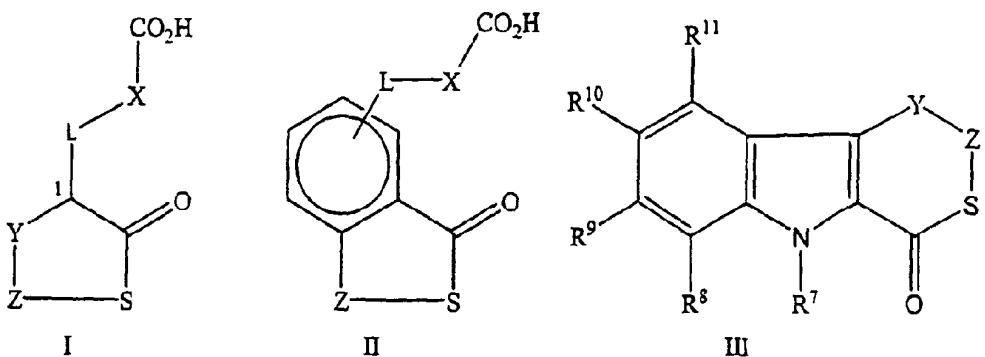
R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 e R^6 são, independentemente, hidrogénio, alquiloC₁-C₄ ou alceniloC₂-C₄, em que o alquilo ou alcenilo está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes;

R^7 é hidrogénio, fenilo, feniletilo ou benzilo em que o fenilo, feniletilo ou benzilo está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes; e

R^8 , R^9 , R^{10} e R^{11} são, independentemente, hidrogénio, carboxilo, hidroxilo, halogéneo, nitro, ciano, alquiloC₁-C₄ ou alcoxiloC₁-C₄,

para a preparação de um agente para determinação da quantidade de NAALADase ligada a uma amostra de tecido ou fluido corporal.

30. Utilização de um composto de fórmula I, II ou III



ou dos seus sais farmaceuticamente aceitáveis, hidratos e solvatos, em que:

X é alquílenoC₁-C₄, alcenílenoC₂-C₄, alcinílenoC₂-C₄, cicloalquílenoC₃-C₈, cicloalcenílenoC₅-C₇ ou Ar, em que o alquíleno, alceníleno, alciníleno, cicloalquíleno ou cicloalceníleno está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes;

L é uma ligação, -CR¹R²-, -O-, -S-, -SO₂- ou -NR¹-;

Y é -O-, -S-, -CR³R⁴- ou -NR³-;

Z é -(CR⁵R⁶)_n-;

n é 1, 2, 3 ou 4;

Ar é um radical arilo ou heteroarilo bivalente que está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes;

R¹, R², R³, R⁴, R⁵ e R⁶ são, independentemente, hidrogénio, alquiloC₁-C₄ ou alceniloC₂-C₄, em que o alquilo ou alcenilo está não substituído ou substituído com um ou mais

substituintes;

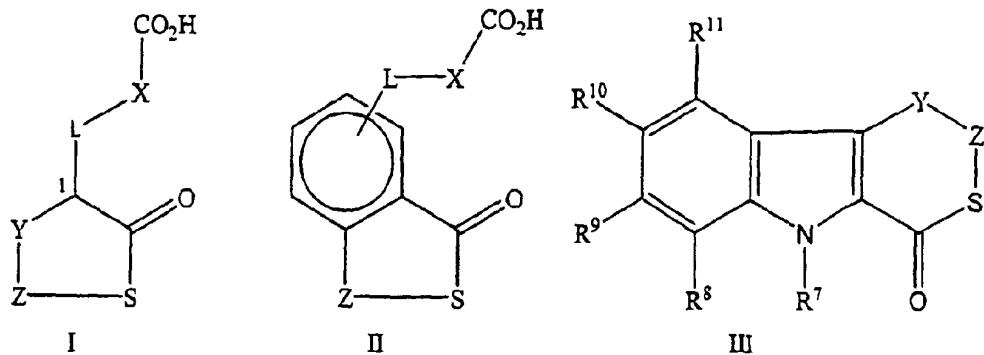
R⁷ é hidrogénio, fenilo, feniletilo ou benzilo em que o fenilo, feniletilo ou benzilo está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes; e

R⁸, R⁹, R¹⁰ e R¹¹ são, independentemente, hidrogénio, carboxilo, hidroxilo, halogéneo, nitro, ciano, alquiloC₁-C₄ ou alcoxiloC₁-C₄,

que foi marcado com uma quantidade eficaz de um reagente de imaciologia;

para a preparação de um agente para detecção de uma doença, distúrbio em que os níveis de NAALADase estão alterados num mamífero.

31. Kit de diagnóstico para a detecção de uma doença, distúrbio em que os níveis de NAALADase estão alterados, que compreende um composto de fórmula I, II ou III



ou os seus sais farmaceuticamente aceitáveis, hidratos e solvatos, em que:

X é alquilenoC₁-C₄, alcenilenoC₂-C₄, alcinilenoC₂-C₄, cicloalquilenoC₃-C₈, cicloalcenilenoC₅-C₇ ou Ar, em que o alquileno, alcenileno, alcinileno, cicloalquileno ou cicloalcenileno está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes;

L é uma ligação, -CR¹R²-, -O-, -S-, -SO₂- ou -NR¹-;

Y é -O-, -S-, -CR³R⁴- ou -NR³-;

Z é -(CR⁵R⁶)_n-;

n é 1, 2, 3 ou 4;

Ar é um radical arilo ou heteroarilo bivalente que está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes;

R¹, R², R³, R⁴, R⁵ e R⁶ são, independentemente, hidrogénio, alquiloC₁-C₄ ou alcenililoC₂-C₄, em que o alquilo ou alcenilo está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes;

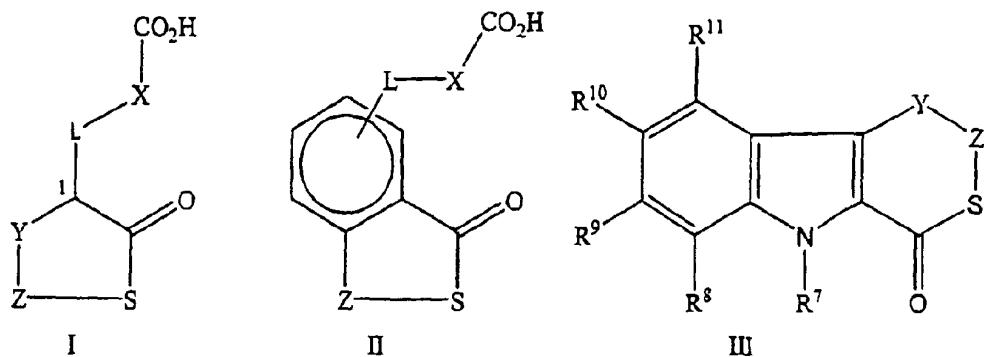
R⁷ é hidrogénio, fenilo, feniletilo ou benzilo em que o fenilo, feniletilo ou benzilo está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes; e

R⁸, R⁹, R¹⁰ e R¹¹ são independentemente hidrogénio, carboxilo, hidroxilo, halogéneo, nitro, ciano, alquiloC₁-C₄ ou alcoxiloC₁-C₄ e

em que o composto está marcado com um marcador.

32. Composição farmacêutica compreendendo

(i) uma quantidade eficaz de um composto de fórmula I, II ou III



ou dos seus sais, hidratos e solvatos farmaceuticamente aceitáveis, em que:

X é alquilenoC₁-C₄, alcenilenoC₂-C₄, alcinilenoC₂-C₄, cicloalquilenoC₃-C₈, cicloalcenilenoC₅-C₇ ou Ar, em que o alquileno, alcenileno, alcinileno, cicloalquileno ou cicloalcenileno está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes;

L é uma ligação, -CR¹R²-, -O-, -S-, -SO₂- ou -NR¹-;

Y é -O-, -S-, -CR³R⁴- ou -NR³-;

Z é -(CR⁵R⁶)_n-;

n é 1, 2, 3 ou 4;

Ar é um radical arilo ou heteroarilo bivalente que está não

substituído ou substituído com um ou mais substituintes;

R¹, R², R³, R⁴, R⁵ e R⁶ são, independentemente, hidrogénio, alquiloC₁-C₄ ou alceniloC₂-C₄, em que o alquilo ou alcenilo está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes;

R⁷ é hidrogénio, fenilo, feniletilo ou benzilo, em que o fenilo, feniletilo ou benzilo está não substituído ou substituído com um ou mais substituintes; e

R⁸, R⁹, R¹⁰ e R¹¹ são independentemente hidrogénio, carboxilo, hidroxilo, halogéneo, nitro, ciano, alquiloC₁-C₄ ou alcoxiloC₁-C₄ e

(ii) um veículo farmaceuticamente aceitável.

33. Composto que é o ácido 3-(2-oxo-tetra-idrotiopiran-3-il)-propiónico ou os seus sais, hidratos e solvatos farmaceuticamente aceitáveis.
34. Utilização de um composto como definido na reivindicação 33 para a preparação de um medicamento para inibição da actividade enzimática de NAALADase, tratamento de uma anomalia de glutamato, exercício de uma actividade neuronal, tratamento de uma doença da próstata, tratamento de cancro, inibição da angiogénese, exercício de uma actividade de TGF-β, tratamento da doença de Huntington, tratamento da diabetes, tratamento de um distúrbio retiniano ou tratamento de glaucoma.
35. Composição farmacêutica compreendendo:

- (i) uma quantidade eficaz do composto de acordo com a reivindicação 33; e
- (ii) um veículo farmaceuticamente aceitável.

Lisboa, 13 de Julho de 2009

FIG. 1



FIG. 2

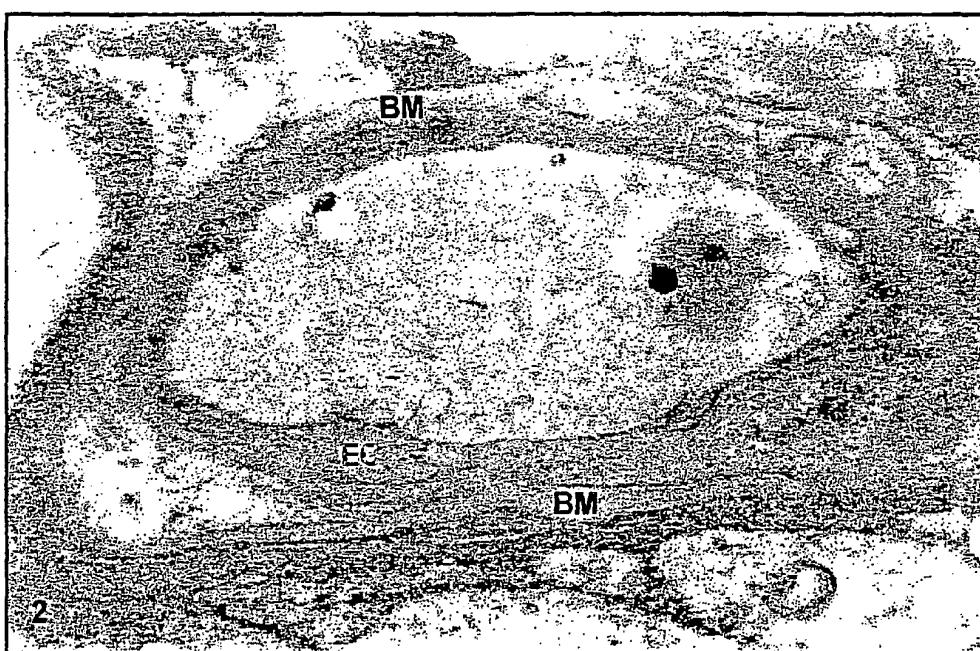
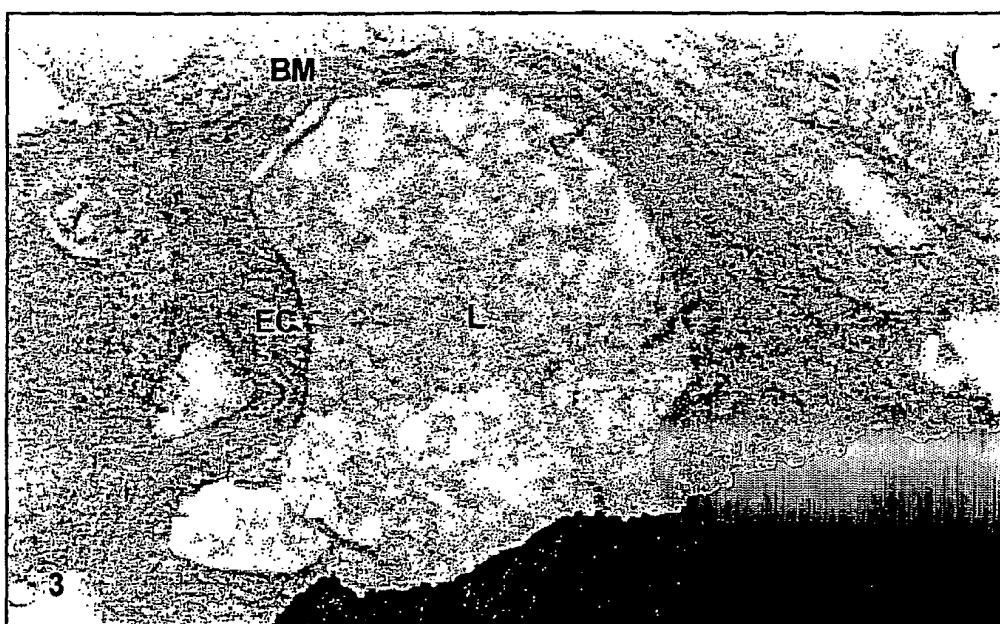


FIG. 3



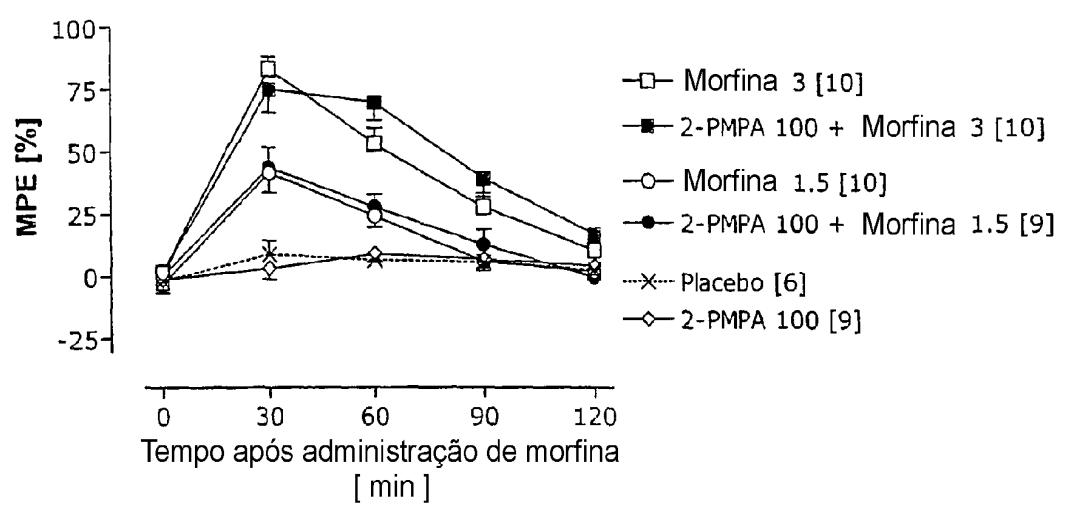


FIG. 4

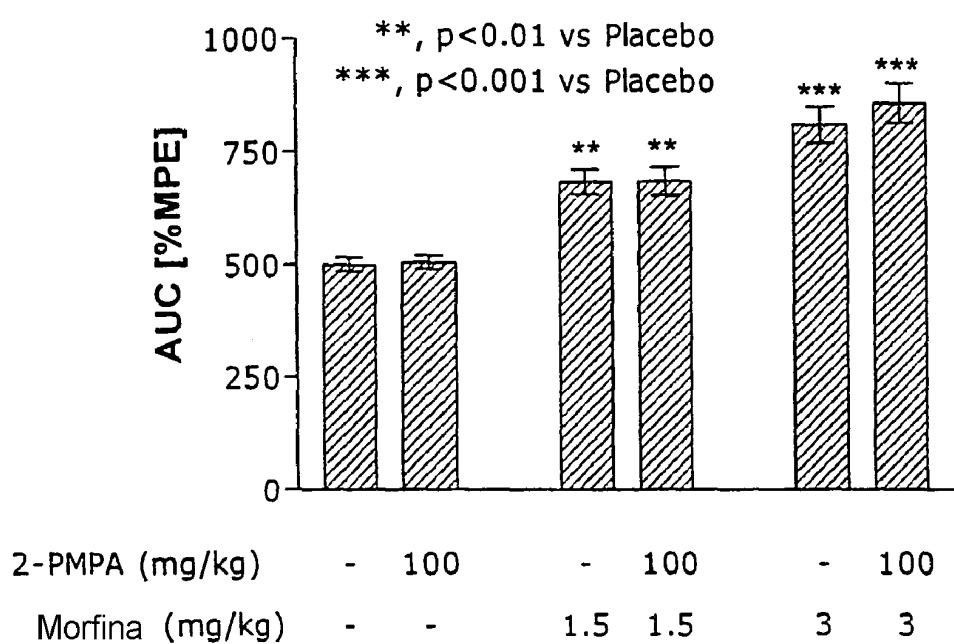


FIG. 5

RESUMO

"TIOLACTONAS COMO INIBIDORES DE NAALADase"

Esta invenção proporciona novos compostos, composições farmacêuticas e kits de diagnóstico compreendendo esses compostos e métodos de utilização desses compostos para inibição da actividade enzimática de NAALADase, de detecção de doenças em que estão alterados os níveis de NAALADase, de inibição da angiogénese, de exercício de uma actividade de TGF- β ou de uma actividade neuronal, e de tratamento uma anomalia de glutamato, um distúrbio compulsivo, neuropatia, dor, uma doença da próstata, cancro, doença de Huntington, diabetes, um distúrbio retiniano ou glaucoma.

