

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2002-3692
(22) Přihlášeno: 11.05.2001
(30) Právo přednosti: 11.05.2000 ES 2000/0001185
12.12.2000 GB 2000/30284
(40) Zveřejněno: 18.06.2003
(Věstník č. 6/2003)
(47) Uděleno: 04.11.2005
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: 11.01.2006
(Věstník č. 1/2006)
(86) PCT číslo: PCT/GB2001/002100
(87) PCT číslo zveřejnění: WO 2001/085685

(11) Číslo dokumentu:

296 087

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.:
A61K 31/433 (2000.01)
A61P 25/00 (2000.01)
A61P 3/00 (2000.01)
A61P 35/00 (2000.01)
C07D 207/44 (1974.07)
C07D 209/48 (1974.07)
C07D 285/08 (1990.01)
C07C 49/597 (1980.01)

(73) Majitel patentu:

CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS, Madrid, ES

(72) Původce:

Martinez Gil Ana, Madrid, ES
Castro Morera Ana, Madrid, ES
Pérez Martin Maria Concepción, Madrid, ES
Cascón Mercedes Alonso, Madrid, ES
Díaz Isabel Dorronsoro, Madrid, ES
Moreno Muñoz Francisco Jose, Madrid, ES
Wandosell Jurado Francisco, Madrid, ES

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000

(54) Název vynálezu:

**Farmaceutický prostředek pro léčbu nemoci, na
níž se podílí heterocyklické inhibitory
glykogensyntázakinázy GSK-3**

(57) Anotace:

Použití thiadiazolidinového derivátu obecného vzorce II, kde:
 R^a a R^b jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující
vodík, alkyl, cykloalkyl, halogenalkyl, aryl popřípadě
substituovaný skupinou vybranou ze skupiny obsahující alkyl,
halogen a alkoxy, $(Z)_n$ -aryl, přičemž aryllová část může být
popřípadě substituovaná;

Z je nezávisle vybráno ze skupiny obsahující $-C(R^3)(R^4)-$,
 $-C(O)-$, $-O-$, $-C(=NR^3)-$, $-S(O)_t-$ a $N(R^3)-$;

n je nula, jedna nebo dvě;

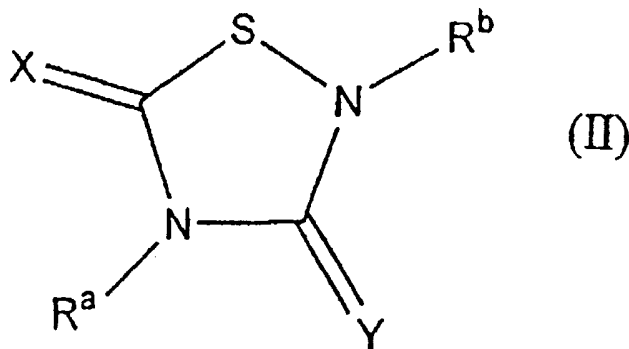
t je nula, jedna nebo dvě;

R^3 a R^4 jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující
vodík, alkyl, aryl a heterocyklický zbytek;

X a Y jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující
 $=O$, $=S$, $=N(R^3)$ a $=C(R^1)(R^2)$; a

R^1 a R^2 jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující
vodík, alkyl, cykloalkyl, halogenalkyl, aryl, $-(Z)_n$ -aryl,
aromatický heterocyklický zbytek, $-OR^3$, $-C(O)R^3$, $-C(O)OR^3$,
 $-(Z)_n-C(O)OR^3$ a $-S(O)_t-$;

pro přípravu farmaceutického prostředku pro léčbu nemoci, na
níž se podílí heterocyklické inhibitory glykogensyntázakinázy
GSK-3, včetně Alzheimerovy nemoci nebo non-inzulin
dependentního diabetes mellitus nebo hyperproliferativního
onemocnění, jako jsou rakovina, displazie nebo metaplasie
tkáně, lupénka, arterioskleróza nebo restenóza.



CZ 296087 B6

Farmaceutický prostředek pro léčbu nemoci, na niž se podílí heterocyklické inhibitory glykogensyntázakinázy GSK-3

5 Oblast techniky

Vynález se týká použití thiadiazolidinových derivátů pro přípravu farmaceutického prostředku pro léčbu nemoci, na niž se podílí heterocyklické inhibitory glykogensyntázakinázy GSK-3.

10

Dosavadní stav techniky

Alzheimerova nemoc (Alzheimer's disease, AD) je neurodegenerativním procesem charakteristickým kognitivními poruchami asociovanými s progresivním zhoršováním cholinergní funkce a s neuropatologickými lézemi, jako jsou senilní plaky tvořené fibrilárním β -amyloidem a neurofibrilárními sítěmi („tangles“), svazky spárovaných helikálních filament.

Obecně řečeno, AD je omezena na skupinu ve věku 60 a více let a je nejčastěji příčinou demence ve starší populaci. Dnes postihuje AD 23 milionů lidí po celém světě. Jak se věk prodlužuje, je odhadováno, že se do roku 2050 počet případů AD více než ztrojnásobí [Amudaci, L.; Fritiglioni, L. „Epidemiology of AD: Impact on the treatment“, v *Alzheimer Disease: Therapeutic Strategies*, E. Giacobini and R. Biecker, Eds., Birkhäuser, EEUU, 1994, pp. 8].

V AD mozcích charakterizovaných úbytkem neuronů jsou pozorovány dvě hlavní histologické léze: neurofibrilární síť a senilní plaky na intracelulární, respektive extracelulární úrovni [“Alzheimer Disease: From molecular biology to therapy“, E. Giacobini and R. Becker, Eds. Birkhäuser, EEUU, 1996].

Neurofibrilární síť jsou struktury tvořené zpárovanými helikálními filamenty (paired helical filaments, PHFs). Tyto jsou složeny hlavně z proteinu asociovaného s mikrotubuly (microtubule-associated protein, MAP) a v abnormálním hyperfosforylovaném stavu [Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Tung, Y. C.; Quinlan M.; Wisniewski, H. M.; Binder, L. II, „Abnormal Phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 4913–4917; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Quinlan, M.; Tung, Y.C.; Zaidi, M.S.; Wisniewski, H.M., „Microtubule-associated protein tau. A component of the Alzheimer paired helical filaments“, *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 6084–6089; Greenberg, S. G.; Davies, P.; Schein, J. D., Binder L. I., „Hydrofluoric acid-treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau.“ *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 564 – 569]. Takováto abnormální fosforylace tau dává účinky různých proteinkináz a fosfatáz, vede ke změně jeho schopnosti vázat a stabilizovat mikrotubuly, což může přispívat k patologii AD [Moreno, F. J.; Medina, M.; Perez, M., Mantejo de Garcini, E.; Avila, J., „Glycogen syntase kinase 3 phosphorylation of different residues in the presence of different factors: Analysis on tau protein“, *FEBS Lett.*, 1995, 372, 65–68]. Proto může být blokáda tohoto hyperfosforylačního kroku primárním cílem pro přerušení patogenické kaskády. Selektivní inhibitory taukináz mohou být novými účinnými léčivy pro léčbu AD.

Hledání taukinázových inhibitorů je předmětem velkého zájmu. Tau může být fosforylován několika prolinem cíleným proteinkináz (proline-directed protein kinases, PDKs) a prolinem necílených proteinkináz (non-PDKs). Přesto přesná role jakékoliv z těchto kináz v abnormálním hyperfosforylaci tau u AD nebyla dosud prostudována a dodnes nebyla nalezena zvýšená aktivita těchto kináz. Není pochyb o tom, že glykogensyntázakináza 3 β (GSK-3 β) je taukinázou v mozku *in vivo* [Lovestone, S.; Hartley, C.L.; Pearce, J.; Anderton, B. H., „Phosphorylation of tau by glycogen syntase-3 in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules“, *Neuroscience*, 1996, 73, 1145–1157; Wagner, U.; Utton, M.; Gallo, J. M.;

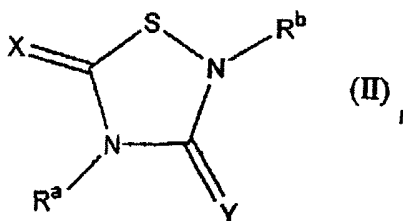
Miller, C.C., „Cellular phosphorylation of tau by GSK-3 β influences tau binding to microtubules and microtubule organisation“, *J. Cell., Sci.*, 1996, 109, 1537–1543; Ledesma, M., Moreno, F.J.; Perez, M.M.; Avila, J., „Binding of apolipoprotein E3 to tau protein: effects on tau glacetation, tau phosphorylation and taumicrotubule binding, in vitro“, *Alzheimer Res.*, 1996, 2, 85–88]. Tato zjištění otevřela bránu k použití inhibitorů GSK-3 β jako terapeutických látek při léčbě AD. V této chvíli je známo několik sloučenin s inhibičními vlastnostmi na enzymy. Lithium se chová jako specifický inhibitor rodiny proteinkináz GSK-3 *in vitro* a v intaktních buňkách [Muñoz-Montaño, J. R.; Moreno, F.J.; Avila, J.; Diaz-Nido, J., „Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons“, *FEBS Lett.*, 1997, 411, 183–188]. Martinez et al. [Bioorganica + Medicinal Chemistry 5, 1275–1983, 1997] se týká arylimino-1,2,4-thiadiazolidinonů, nové rodiny otvíračů draslíkových kanálů.

Je také pozorováno, že inzulin inaktivuje GSK-3, a je ukázáno, že při aktivaci tohoto enzymu se vyvíjí non-inzulin dependentní diabetes mellitus. Proto by inhibitory GSK-3 byly novou terapií pro non-inzulin dependentní diabetes mellitus.

Byla zjištěna nová rodina malých syntetických heterocyklických molekul s GSK-3 β inhibičními vlastnostmi při mikromolárních množstvích.

Podstata vynálezu

Vynález je zaměřen na použití sloučenin obecného vzorce II



kde

R^a a R^b jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující vodík, alkyl, cykloalkyl, halogenalkyl, aryl popřípadě substituovaný skupinou vybranou ze skupiny obsahující alkyl, halogen a alkoxy, (Z)_n-aryl, přičemž aryllová část může být popřípadě substituovaná skupinou vybranou ze skupiny obsahující alkyl, halogen a alkoxy, aromatický heterocyklický zbytek, -OR³, -C(O)R³, -C(O)OR³, -(Z)_n-C(O)OR³ a -S(O)_t;

Z je nezávisle vybráno ze skupiny obsahující -C(R³)(R⁴)-, -C(O)-, -O-, -C(=NR³)-, -S(O)_t- a N(R³)-;

n je nula, jedna nebo dvě;

t je nula, jedna nebo dvě;

R³ a R⁴ jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující vodík, alkyl, aryl a heterocyklický zbytek, kterým je stabilní 3- až 15-členný kruh, který je tvořen z uhlíkových atomů a z jednoho až pěti heteroatomů vybraných ze skupiny obsahující dusík, kyslík a síru, s výhodou 4- až 8-členný kruh s jedním nebo více heteroatomy a ještě výhodněji 5- až 6-členný kruh s jedním nebo více heteroatomy;

X a Y jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující =O, =S, =N(R³) a =C(R¹)(R²); a

R^1 a R^2 jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující vodík, alkyl, cykloalkyl, halogenalkyl, aryl, $-(Z)_n$ -aryl, aromatický heterocyklický zbytek, $-OR^3$, $-C(O)R^3$, $-C(O)OR^3$, $-(Z)_n-C(O)OR^3$ a $-S(O)_t$;

pro přípravu farmaceutického prostředku pro metodu léčby nemoci, na níž se podílí GSK-3. Tato metoda zahrnuje podávání účinného množství sloučeniny obecného vzorce II lidem, kteří tuto léčbu potřebují.

Detailní popis vynálezu

Jak jsou použity v tomto popisu a připojených patentových nárocích, pokud není specifikováno jinak, mají následující termíny tyto níže popsané významy:

„Alkyl“ odkazuje na radikál přímého nebo větveného uhlovodíkového řetězce tvořeného uhlíkovými a vodíkovými atomy, nenasycené, s jedním až osmi uhlíkovými atomy a který je připojen ke zbytku molekuly jednoduchou vazbou, např. methyl, ethyl, *n*-propyl, *i*-propyl, *n*-butyl, *t*-butyl, *n*-pentyl atd. Alkylové deriváty mohou být popřípadě substituovány jedním nebo více substituenty nezávisle na sobě vybranými ze skupiny obsahující halo, hydroxy, alkoxy, karboxy, kyano, karbonyl, acyl, alkoxykarbonyl, amino, nitro, merkaptó a alkylthio.

„Alkoxy“ odkazuje na radikál obecného vzorce $-OR_a$, kde R_a je alkylový radikál, jak byl definován výše, např. methoxy, ethoxy, propoxy, atd.

„Alkoxykarbonyl“ odkazuje na radikál obecného vzorce $-C(O)OR_a$, kde R_a je alkylový radikál, jak byl definován výše, např. methoxykarbonyl, ethoxykarbonyl, propoxykarbonyl, atd.

„Alkylthio“ odkazuje na radikál obecného vzorce $-SR_a$, kde R_a je alkylový radikál jak je definován výše, např. methylthio, ethylthio, propylthio, atd.

„Amino“ odkazuje na radikál se vzorcem $-NH_2$.

„Aryl“ odkazuje na fenylový nebo naftylový radikál, s výhodou fenylový radikál. Arylový radikál může být popřípadě substituován jedním nebo více substituenty nezávisle na sobě vybranými ze skupiny obsahující hydroxy, merkaptó, halogen, alkyl, fenyl, alkoxy, halogenalkyl, nitro, kyano, dialkylamino, aminoalkyl, acyl a alkoxykarbonyl, jak jsou zde definovány.

„Aralkyl“ odkazuje na arylovou skupinu spojenou s alkoxylovou skupinou. Výhodné příklady zahrnují benzyl a fenylethyl.

„Acyl“ odkazuje na radikál obecného vzorce $-C(O)-R_c$ a $-C(O)-R_d$, kde R_c je alkylový radikál, jak byl definován výše, a kde R_d je arylový radikál, jak byl definován výše např. acetyl, propionyl, benzoyl a podobné.

„Aroylalkyl“ odkazuje na alkylovou skupinu substituovanou $-C(O)-R_d$. Výhodné příklady zahrnují benzoylmethyl.

„Karboxy“ odkazuje na radikál se vzorcem $-C(O)OH$.

„Kyano“ odkazuje na radikál se vzorcem $-CN$.

5 „Cykloalkyl“ odkazuje na stabilní 3– až 10–členný monocyklický nebo bicyklický radikál, který je nasycený nebo částečně nasycený a který je tvořen pouze z uhlíkových a vodíkových atomů. Pokud není v popise upřesněno jinak, termín „cykloalkyl“ je zamýšlen tak, že obsahuje cykloalkylové radikály, které jsou popřípadě substituovány jedním nebo více substituenty nezávisle na sobě vybranými ze skupiny obsahující alkyl, halogen, hydroxy, amino, kyano, nitro, alkoxy, karboxy a alkoxykarbonyl.

10 „Halogen“ odkazuje na brom, chlor, jod nebo fluor.

„Halogenalkyl“ odkazuje na alkylový radikál, jak byl definován výše, který je substituovaný jedním nebo více halogenovými radikály, jak byly definovány výše, např. trifluormethyl, trichlormethyl, 2,2,2–trifluorethyl, 1–fluormethyl–2–fluorethyl a podobně.

15 „Heterocyklický zbytek“ odkazuje na stabilní 3– až 15–členný kruh, který je tvořen z uhlíkových atomů a z jednoho až pěti heteroatomů vybraných ze skupiny obsahující dusík, kyslík a síru, s výhodou 4– až 8–členný kruh s jedním nebo více heteroatomy a ještě výhodněji 5– až 6–členný kruh s jedním nebo více heteroatomy. Pro účely tohoto vynálezu může být heterocyklický zbytek monocyklický, bicyklický nebo
20 tricyklický systém, který může obsahovat fúzní kruhové systémy; a dusíkové, uhlíkové nebo sírové atomy v heterocyklickém radikálu mohou být popřípadě oxidovány; atom dusíku může být popřípadě přeměněn na kvartérní amin; a heterocyklické radikály mohou být částečně nebo zcela nasycené nebo aromatické. Příklady takovýchto heterocyklických zbytků zahrnují, ale nejsou tím
25 limitovány, azepiny, benzimidazol, benzothiazol, furan, izothiazol, imidazol, indol, piperidin, piperazin, purin, chinolin, thiodiazol, tetrahydrofuran. Heterocyklický zbytek může být popřípadě substituován R^3 a R^4 , jak byly definovány výše v souhrnu vynálezu.

30 „Merkapto“ odkazuje na radikál se vzorcem $-SH$.

„Nitro“ odkazuje na radikál se vzorcem $-NO_2$.

35 Vynález je konkrétně zaměřen na enzymatické aktivity sloučenin obecného vzorce II proti kinázám.

V obecném vzorci II jsou X a Y s výhodou vybrány ze skupiny obsahující kyslík, síru a $-NR^3-$, kde R^3 je heterocyklické, specificky 6–členný heterocyklický zbytek s jedním heteroatomem, což je dusík, a který je případně aromatický a popřípadě oxidovaný nebo v kvartérním stavu. Ještě
40 výhodněji jsou X a Y kyslíky.

S Výhodou jsou R^a a R^b nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující vodík, alkyl, cykloalkyl, aryl (popřípadě substituovaný skupinou vybranou ze skupiny obsahující alkyl, halogen a alkoxy), $-C(R^3)(R^4)-$ aryl (arylová část může být popřípadě substituována skupinou vybranou ze
45 skupiny obsahující alkyl, halogen a alkoxy), $-OR^3$, $-C(O)OR^3$ a $-C(R^3)(R^4)-C(O)OR^3$ a R^3 a R^4 jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující vodík, alkyl a heterocyklický zbytek.

Ještě výhodněji jsou R^a a R^b nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující alkyl, aryl (popřípadě substituovaný skupinou vybranou ze skupiny obsahující alkyl, halogen a alkoxy),
50 $-CH_2-$ aryl (arylová část může být popřípadě substituována skupinou vybranou ze skupiny obsahující alkyl, halogen a alkoxy) a $-CH_2-C(O)OR^3$, kde R^3 je vodík nebo alkyl.

Ještě výhodněji jsou R^a a R^b nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující methyl, ethyl, propyl, benzyl, fenyl (popřípadě substituovaný skupinou vybranou ze skupiny obsahující methyl, fluor, chlor, brom a methoxy) a $-CH_2-C(O)O-$ ethyl.
55

Nejvýhodnější sloučeniny obecného vzorce II jsou vypsány v tabulce 1 níže.

5 Tabulka 1

R ^a	R ^b	X	Y
CH ₂ Ph	Me	O	O
Et	Me	O	O
Ph	Me	O	O
CH ₂ CO ₂ Et	Me	O	O
4-OMePh	Me	O	O
4-McPh	Me	O	O
4-BrPh	Me	O	O
4-FPh	Me	O	O
4-ClPh	Me	O	O
CH ₂ Ph	CH ₂ Ph	O	S
Ph	Ph	O	S

Me značí methyl, Et značí ethyl a Ph značí fenyl

10 Příklady provedení vynálezu

Sloučeniny vynálezu mohou být syntetizovány dostupnými postupy.

15 Pro výhodné sloučeniny obecného vzorce II je dostupný obecný postup [Martinez, A.; Castro, A.; Cardelús, I.; Llenas, J.; Palacios, J.M. *Bioorg. Med. Chem.*, 1997, 5, 1275 – 1283].

20 Konkrétně se sloučeniny obecného vzorce II a uvedené v tabulce 1 připraví podle syntetického postupu popsaného schématem 1 a použitím reaktivity N-alkyl-S-[N'-(chlorkarbamoyl)amino]-izothiokarbamoyl-chloridu s různými alkylovými izokyanáty. Chlorinace izothiokyanátů se provede přidáním ekvimolárního množství chlóru do hexanového roztoku zmíněného izothiokyanátu při -15 °C. Reakce iminokloralkylsulfenyl-chloridu s alkyl nebo arylizokyanátem v inertní atmosféře a následná hydrolýza dávají vznik thiadiazolidindionům popsaným v tabulce 1.

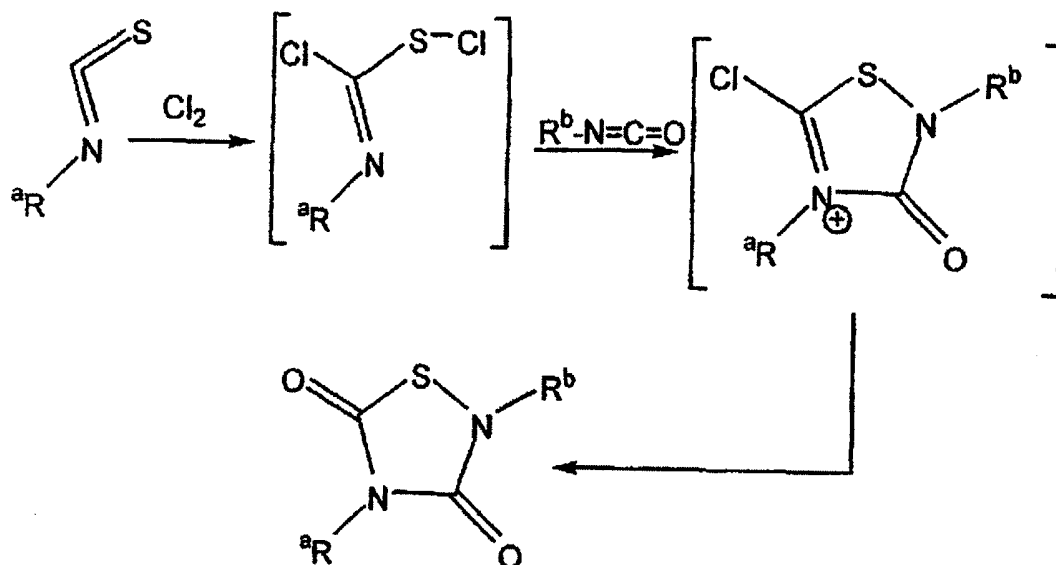


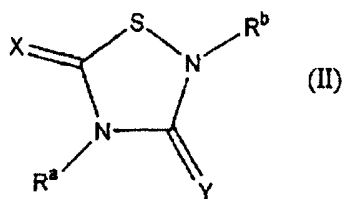
Schéma 1

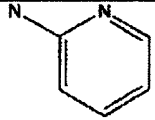
Příklad 1 – Enzymatická inhibice sloučeninami vynálezu

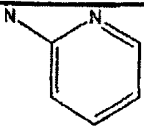
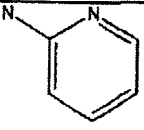
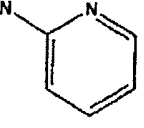
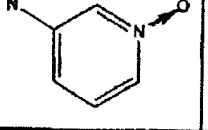
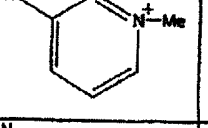
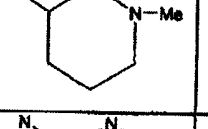
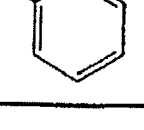
- 5 Inhibice GSK-3 β ; Aktivita GSK-3 se stanoví inkubací směsi enzymu GSK-3 (Sigma), zdroje fosfátu a substrátu GSK-3 za přítomnosti a při absenci odpovídají testované sloučeniny a měřením aktivity GSK-3 této směsi.
- 10 Konkrétně se aktivita GSK-3 stanoví inkubací enzymu při 37 °C po dobu 20 minut ve výsledném objemu 12 μl pufru (50 mM Tris, pH = 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 10 mM MgCl_2) doplněného 15 μM (výsledná koncentrace) syntetickým peptidem GS 1 [Woodgett, J. R., „Use of peptides for affinity purification of proteinserine kinases“, *Anal. Biochem.*, 1989, 180, 237–241] jako substrátu, 15 μM ATP, 0,2 μCi (γ - ^{32}P)ATP a různými koncentracemi testované sloučeniny. Reakce se ukončí přidáním alikvotu reakční směsi k fosfocelulózovým p81 papírkům
- 15 Tyto papírky se třikrát promyjí 1% kyselinou fosforečnou a ve scintilačním roztoku se změří radioaktivita inkorporována do peptidu GS1 pomocí scintilačního přístroje.

20 Sloučeniny ukázané v tabulce 1 jsou představiteli objektů tohoto vynálezu s GSK-3 inhibiční aktivitou. Hodnoty IC_{50} (koncentrace, při níž je vykazována 50% inhibice enzymu) jsou shrnuty v tabulce 3 níže.

Tabulka 3



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

Et	Et		O	>100
Et	H		O	>100
Me	Me		O	>100
Et	Me		O	>100
Et	Me		O	>100
Et	Me		O	>100
Et	Me		S	10

Me značí methyl, Et značí ethyl, Pr značí propyl a Ph značí fenyl

- 5 Inhibice GSK-3: Inhibiční experimenty se také provedou pro různé koncentrace ATP (až 50 μM) a ve všech případech se získají stejné hodnoty IC_{50} . Z toho lze usoudit, že thiadiazolindiony nekompetují s ATP o vazbu na GSK-3.

První čtyři sloučeniny se testují na inhibici dalších enzymů.

- 10 Inhibice proteinkinázy A (PKA): Možná inhibice tohoto enzymu se vyhodnotí stanovením fosforylace esthatminu proteinkinázou A (PKA). Esthatmin se purifikuje podle postupu popsaného Belmontem a Mitchinsonem (Belmont, L. D.; Mitchinson, T.J., „Identification of a protein that interact with tubulin dimers and increase the catastrophe rate of microtubule“, *Cell*, 1996, 84, 623–631).

- 15 Konkrétně se použije purifikovaná PKA (Sigma, katalytická podjednotka z hovězího srdce (p 2645)) a 10–15 μg substrátu (esthatmin) v celkovém objemu 25 μl roztoku pufru obsahujícího 20 μM ($\gamma\text{-}^{32}\text{P}$)ATP. cAMP proteinkinázová reakce (100 ng/reakce) se provede v 50 μl 25mM Hepes, pH 7,4, 20 mM MgCl_2 , 2 mM EGTA, 2 mM dithiotreitol, 0,5 mM Na_2VO_4 . Poté, co dojde k reakci, se přidá pufru ukončující reakci, reakční směs se povaří při 100 $^\circ\text{C}$ po dobu 5 minut a fosforylovaný protein se charakterizuje gelovou elektroforézou a autoradiograficky se kvantifikuje.

Za těchto podmínek žádná z testovaných sloučenin nevykazovala žádnou inhibici PKA.

Inhibice proteinkinázy C (PKC): Možná inhibice tohoto enzymu se vyhodnotí stanovením fosforylace peptidu PANKTPPKSPGEPAK (Woodget, J.R., „Use of peptides for affinity purification of protein-serine kinases“, *Anal. Biochem.*, 1989, 180, 237 – 241) proteinkinázou C (PKC) pomocí fosfatidylserinu jako stimulační látky. Postupuje se podle metody popsané výše pro GSK-3.

Konkrétně se použije PKC purifikovaná z krysích mozků podle metody opsané Walshem (Walsh, M.P.; Valentine, K.A.; Nagi, P.K.; Corruthers, C.A.; Hollenberg, M.D. *Biochem.J.*, 1984, 224, 117–127) a 1–10 mM substrát v celkovém objemu 25 µl roztoku příslušného pufru obsahujícího 10 µM (γ -³²P)ATP.

Za těchto podmínek žádná z testovaných sloučenin nevykazovala žádnou inhibici PKC.

Inhibice kaseinkinázy 2 (CK-2): Fosforylační aktivita tohoto enzymu se esthatmin se měří za použití CK-2 purifikované z mozků krav podle metody popsané Alcazarem (Alcazar, A.; Marín, E.; Lopez-Fando, J.; Salina, M. „An improved purification procedure and properties of casein kinase II from brain“, *Neurochem. Res.*, 1988, 13, 829–836), s 3,6 µM substrátem v celkovém objemu 25 µl roztoku příslušného pufru obsahujícího 20 µM (γ -³²P)ATP. Testy CK-2 se provedou s esthatminem jako substrátem (viz stanovení PKA) v 50 µl 25 mM Hepes, Ph 7,4, 20 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 2 mM dithiotreitol, 0,5 mM Na₃VO₄ a 100 ng purifikované Ck-2. Poté, co dojde k reakci, se postupuje podle stejné metody, jaká byla popsána pro PKA.

Za těchto podmínek žádná z testovaných sloučenin nevykazovala žádnou inhibici CK-2.

Inhibice cyklin-dependentní proteinkinázy 2 (Cdc2): Fosforylační aktivita tohoto enzymu na histon H1 se měří použitím Cdc2 (Calbiochem) podle metody popsané Kobayashi (Kobayashi, H.; Stewart, E.; Poon, R.Y.; Hunt, T. „Cyclin A and cyclin B dissociate from p34cdc2 with half-times of 4 and 15 h, respectively, regardless of the phase of the cell cycle“, *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 29 153 – 29 160) s 1 µg/µl substrátu v celkovém objemu 25 µl roztoku příslušného pufru obsahující 20 µM (γ -³²P)ATP. Testy Cdc2 se provedou s histonem H1 jako substrátem (viz stanovení PKA) v 50 µl pufru pH 7,5, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 100 µM ATP, 0,01% BRIJ-35. Poté, co dojde k reakci, se postupuje podle stejné metody, jaké byla popsána pro PKA.

Za těchto podmínek žádná z testovaných sloučenin nevykazovala žádnou inhibici Cdc2.

40 Příklad 2 – Analýza růstu neuritů po přidání sloučeniny

Buňky se udržují v Dulbecco médiu (DEMEM) s 10% fetálním hovězím sérem, glutaminem (2 mM) a antibiotiky. Pro analýzu potenciální inhibice GSK-3 *in vivo* se použijí myší neuroblastomové N₂A kultury (Garcia-Perez, J.; Avila, J.; Diaz-Nido, J., „Lithium induces morphological differentiation of mouse neuroblastoma“, *J. Neurol. Res.*, 1999, 57, 261 – 270). Testované sloučeniny se přidají k těmto buněčným kulturám. Tato buněčná linie je zvláštní tím, že po přidání chloridu lithného (10 mM), známého inhibitoru GSK-3, vykazuje určité vlastnosti neurálního fenotypu (neuritové extenze). Po 2 až 3 dnech kultivace se zkontroluje účinek testovaných sloučenin uspořádaných v tabulce 1. Pozoruje se vytváření neuritových extenzí, a to stejných, jako když se přidá lithium. Tento fakt potvrzuje inhibiční vlastnosti sloučenin na GSK-3 *in vivo*.

Příklad 3 – Zastavení buněčného cyklu

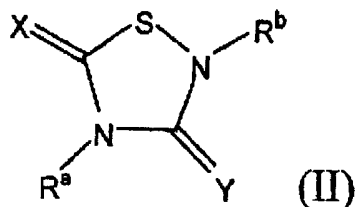
Současně se studuje potenciální interference těchto sloučenin s buněčným cyklem buněk N₂A. Buňky se udržují v Dulbecco médiu (DEMEM) s 10% fetálním hovězím sérem, glutaminem (2 mM) a antibiotiky.

První čtyři sloučeniny obecného vzorce II uvedené v tabulce 3 se testují za popsaných podmínek a vykazují schopnost zastavovat buněčný cyklus v koncentracích inhibitoru spadajících mezi 100 nM a 1 μ M. Zablokování buněk se počátečně pozoruje v koncentracích mezi 100 až 200 nM a maximální účinek nastává při 1 μ M koncentraci.

Testované sloučeniny nejsou toxické na stacionární fibroblastovou kulturu MRC-5 po 10 dnech kontinuální expozice k inhibitorům.

Příklad 4 – Zastavení buněčného cyklu

Hodnoty IC₅₀ pro některé ze sloučenin, které se testují na buněčných kulturách N₂A, jsou uvedeny v tabulce 5 níže.



Tabulka 5

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

Me značí methyl, Et značí ethyl, Pr značí propyl a Ph značí fenyl.

Průmyslová využitelnost

Typické sloučeniny tohoto vynálezu selektivně inhibují GSK-3 β bez inhibice ostatních protein-
 kináz, jako jsou PKA, PKC, CK-2 a CdK2, což může eliminovat širokospektrální účinky. GSK-
 3 β se účastní etiopatogeneze AD a je zodpovědná za abnormální hypedrfosforylace proteinu tau.
 Selektivní inhibitory zde popsané mohou být použitelné pro přípravu farmaceutického prostředku
 pro léčbu neurodegenerativních onemocnění asociovaných s patologií proteinu tau, speciálně pro
 AD, což tvoří část tohoto vynálezu. Inhibiční účinek těchto sloučenin na GSK-3 β vede k navrho-
 vání léčiv schopných zastavit tvorbu neurofibrilárních sítí, jednoho z charakteristických znak
 přítomného u tohoto neurodegenerativního procesu.

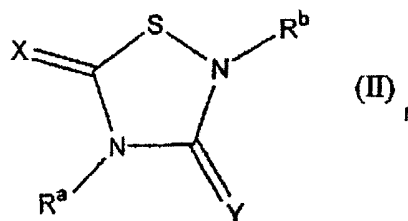
Tyto sloučeniny mohou být použitelné pro přípravu farmaceutického prostředku pro léčbu dal-
 ších patologických stavů, na kterých se podílí GSK-3 β , jako je non-inzulin dependentní diabetes
 mellitus.

Navíc tyto sloučeniny mohou být použitelné pro přípravu farmaceutického prostředku pro léčbu
 hyperproliferativních onemocnění, jako jsou dysplazie a metaplazie různých tkání, lupénky,
 arteriosklerózy, restenózy a rakoviny, díky jejich inhibování buněčného cyklu, což tvoří část
 tohoto vynálezu.

Navíc vynález dále poskytuje farmaceutické prostředky obsahující sloučeniny tohoto vynálezu
 společně s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo rozpouštědlem. Vhodné podoby dávek
 a dávkové režimy mohou být sestaveny a přizpůsobeny vsouladu s konvenční praxí.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití thiodiazolidinového derivátu obecného vzorce II



kde:

R^a a R^b jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující vodík, alkyl, cykloalkyl, halogen-
 alkyl, aryl popřípadě substituovaný skupinou vybranou ze skupiny obsahující alkyl, halogen
 a alkoxy, (Z)_n-aryl, přičemž arylová část může být popřípadě substituovaná skupinou
 vybranou ze skupiny obsahující alkyl, halogen a alkoxy, aromatický heterocyklický zbytek,
 -OR³,
 -C(O)R³, -C(O)OR³, -(Z)_n-C(O)OR³ a -S(O)_t;

Z je nezávisle vybráno ze skupiny obsahující -C(R³)(R⁴)-, -C(O)-, -O-, -C(=NR³)-, -S(O)_t-
 a N(R³)-;

n je nula, jedna nebo dvě;

t je nula, jedna nebo dvě;

R^3 a R^4 jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující vodík, alkyl, aryl a heterocyklický zbytek, kterým je stabilní 3- až 15-členný kruh, který je tvořen z uhlíkových atomů a z jednoho až pěti heteroatomů vybraných ze skupiny obsahující dusík, kyslík a síru, s výhodou 4- až 8-členný kruh s jedním nebo více heteroatomy a ještě výhodněji 5- až 6-členný kruh s jedním nebo více heteroatomy;

X a Y jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující $=O$, $=S$, $=N(R^3)$ a $=C(R^1)(R^2)$; a

R^1 a R^2 jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující vodík, alkyl, cykloalkyl, halogenalkyl, aryl, $-(Z)_n$ -aryl, aromatický heterocyklický zbytek, $-OR^3$, $-C(O)R^3$, $-C(O)OR^3$, $-(Z)_n-C(O)OR^3$ a $-S(O)_t$;

pro přípravu farmaceutického prostředku pro léčbu nemoci, na níž se podílí heterocyklické inhibitory glykogensyntázakinázy GSK-3.

2. Použití podle nároku 1, kde je nemoc vybrána z Alzheimerovy nemoci nebo noninzulin dependentního diabetes mellitus.

3. Použití podle nároku 1, kde nemocí je hyperproliferativní nemoc, jako je rakovina, dysplazie nebo metaplasie tkání, lupénka, arterioskleróza nebo restenóza.

4. Použití thiadiazolidinového derivátu obecného vzorce II podle kteréhokoli z předcházejících nároků 1 až 3, kde R^a a R^b jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující vodík, alkyl, cykloalkyl, aryl popřípadě substituovaný skupinou vybranou ze skupiny obsahující alkyl, halogen a alkoxy, $-C(R^3)(R^4)$ -aryl, přičemž arylová část je popřípadě substituována skupinou vybranou ze skupiny obsahující alkyl, halogen a alkoxy, $-OR^3$, $-C(O)OR^3$ a $-C(R^3)(R^4)-C(O)OR^3$ a R^3 a R^4 jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující vodík, alkyl a heterocyklický zbytek definovaný v nároku 1.

5. Použití thiadiazolidinového derivátu obecného vzorce II podle předcházejícího nároku 4, kde R^a a R^b jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující alkyl, aryl popřípadě substituovaný skupinou vybranou ze skupiny obsahující alkyl, halogen a alkoxy, $-CH_2$ -aryl, přičemž arylová část je popřípadě substituována skupinou vybranou ze skupiny obsahující alkyl, halogen a alkoxy, a $-CH_2-C(O)OR^3$ a R^3 je vodík nebo alkyl.

6. Použití thiadiazolidinového derivátu obecného vzorce II podle předcházejícího nároku 5, kde R^a a R^b jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující methyl, ethyl, propyl, benzyl, fenylyl, popřípadě substituovaný skupinou vybranou ze skupiny obsahující methyl, fluor, chlor, brom a methoxy, a $-CH_2-C(O)O$ -ethyl.

7. Použití thiadiazolidinového derivátu obecného vzorce II podle předcházejících nároků 1, 2 nebo 3, kde X a Y jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující $=O$, $=S$ a $=NR^3$, kde R^3 je heterocyklický zbytek definovaný v nároku 1.

8. Použití thiadiazolidinového derivátu obecného nároku II podle předcházejícího nároku 7, kde X je $=O$.

9. Použití thiadiazolidinového derivátu obecného vzorce II podle předcházejícího nároku 8, kde X je $=O$ a Y je $=O$.

10. Použití thiadiazolidinového derivátu obecného vzorce II podle předcházejících nároků 1, 2 nebo 3, kde:

5 R^a a R^b nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující vodík, alkyl, cykloalkyl, aryl (popřípadě substituovaný skupinou vybranou ze skupiny obsahující alkyl, halogen a alkoxy), $-C(R^3)(R^4)-$ aryl, přičemž arylová část může být popřípadě substituována skupinou vybranou ze skupiny obsahující alkyl, halogen a alkoxy, $-OR^3$, $-C(O)OR^3$ a $-C(R^3)(R^4)-C(O)OR^3$;

10 R^3 a R^4 jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující vodík, alkyl a heterocyklický zbytek definovaný v nároku 1; a

X a Y jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující $=O$, $=S$ a $=NR^3$.

15 11. Použití thiadiazolidinového derivátu obecného vzorce II podle předcházejícího nároku 10, kde:

20 R^a a R^b nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující alkyl, cykloalkyl, aryl popřípadě substituovaný skupinou vybranou ze skupiny obsahující alkyl, halogen a alkoxy, $-C(R^3)(R^4)-$ aryl, přičemž arylová část je popřípadě substituována skupinou vybranou ze skupiny obsahující alkyl, halogen a alkoxy, $-OR^3$, $-C(O)OR^3$ a $-C(R^3)(R^4)-C(O)OR^3$;

R^3 a R^4 jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující vodík a alkyl; a

25 X je $=O$.

12. Použití thiadiazolidinového derivátu obecného vzorce II Podle předcházejícího nároku 11, kde

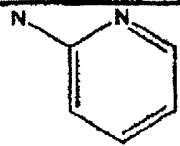
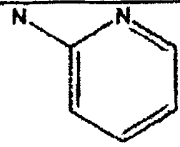
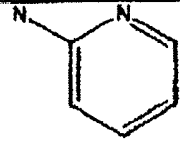
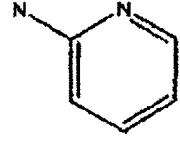
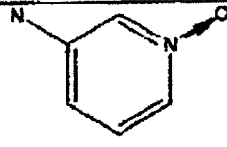
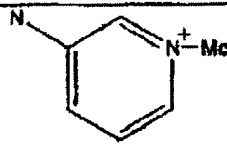
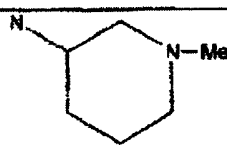
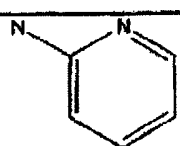
30 R^a a R^b jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující methyl, ethyl, propyl, benzyl, fenyl, popřípadě substituovaný skupinou vybranou ze skupiny obsahující methyl, fluor, chlor, brom a methoxy, a $-CH_2-C(O)O-$ ethyl;

X je $=O$; a

35 Y je $=O$.

13. Použití thiadiazolidinového derivátu obecného vzorce II podle jakéhokoliv předcházejícího nároku 1 až 3, kde tento thiadiazolidinový derivát odpovídá jedné z následujících možností:

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

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

a kde Me značí methyl, Et značí ethyl, Pr značí propyl a Ph značí fenyl.

14. Použití thiadiazolidinového derivátu obecného vzorce II podle předcházejícího nároku 13, kde tento thiadiazolidinový derivát odpovídá jedné z následujících možností:

R^a	R^b	X	Y
CH_2Ph	Me	O	O
Et	Me	O	O
Ph	Me	O	O
CH_2CO_2Et	Me	O	O
4-OMePh	Me	O	O
4-MePh	Me	O	O
4-BrPh	Me	O	O
4-FPh	Me	O	O
4-ClPh	Me	O	O
CH_2Ph	CH_2Ph	O	S
Ph	Ph	O	S

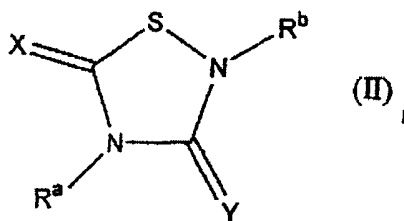
a kde Me značí methyl, Et značí ethyl a Ph značí fenyl.

5

15. Farmaceutický prostředek, **vyznačující se tím**, že obsahuje jako aktivní látku thiadiazolidinový derivát obecného vzorce II, jak byl definován v jakémkoliv předcházejícím nároku 1 až 14.

10

16. Thiadiazolidinový derivát obecného vzorce II:



kde význam substituentů odpovídá jedné z následujících možností:

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

a kde Me značí methyl, Et značí ethyl a Ph značí fenyl.

5

Konec dokumentu
