
(11) Número de Publicação: **PT 1406867 E**

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

(51) Classificação Internacional:

C07C 323/56 (2006.01) **A61P 3/00** (2006.01)
C07C 323/00 (2006.01) **A61K 31/095** (2006.01)
A61K 31/185 (2006.01) **A61K 31/192** (2006.01)
A61K 31/194 (2006.01) **A61K 31/21** (2006.01)
A61K 31/216 (2006.01) **A61P 3/10** (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) **A61P 13/00** (2006.01)
A61P 13/08 (2006.01) **A61P 15/00** (2006.01)
A61P 15/08 (2006.01) **A61P 19/00** (2006.01)
A61P 19/04 (2006.01) **A61P 21/00** (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) **A61P 25/02** (2006.01)
A61P 25/04 (2006.01) **A61P 25/16** (2006.01)
A61P 25/18 (2006.01) **A61P 25/22** (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01) **A61P 25/28** (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) **A61P 31/00** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) **A61P 37/00** (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01) **A61P 43/00** (2006.01)
C07C 321/00 (2006.01) **C07C 321/10** (2006.01)
C07C 323/58 (2006.01) **C07C 323/62** (2006.01)

(22) Data de pedido: **2002.05.30**

(30) Prioridade(s): **2001.05.30 US 294036 P**
2001.12.28 US 342746 P

(43) Data de publicação do pedido: **2004.04.14**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.12.31**
039/2009

(73) Titular(es):

EISAI CORPORATION OF NORTH AMERICA
100 TICE BOULEVARD WOODCLIFF LAKE, NJ 07654-1000 US

(72) Inventor(es):

TAKASHI TSUKAMOTO US
DORIS STOERMER US
DILRUJKSHI VITHARANA US

(74) Mandatário:

MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **DERIVADOS DO ÁCIDO TIOLALQUILBENZÓICO**

(57) Resumo:

RESUMO

"DERIVADOS DO ÁCIDO TIOLALQUILBENZÓICO"

A presente invenção refere-se a novos ácidos tiolalquilbenzóicos, composições farmacêuticas e estojos de diagnóstico compreendendo esses compostos e métodos de utilização desses compostos para inibir a actividade da enzima NAALADase, detectar doenças em que os níveis de NAALADase estão alterados, realizar actividade neuronal, realizar actividade do TGF-beta, inibir a angiogénese e tratar anormalidades do glutamato, neuropatia, dor, perturbações compulsivas, doenças da próstata, cancros, glaucoma, perturbações retinianas e cancro.

DESCRIÇÃO
"DERIVADOS DO ÁCIDO TIOLALQUILBENZÓICO"

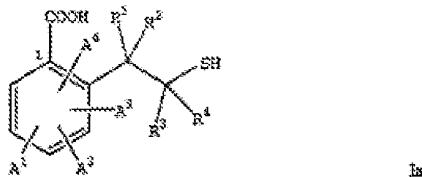
A presente invenção refere-se a novos compostos, composições farmacêuticas e estojos de diagnóstico compreendendo esses compostos e métodos de utilização desses compostos para inibir a actividade da enzima NAALADase, detectar doenças em que os níveis de NAALADase estão alterados, realizar actividade neuronal, realizar actividade do TGF- β , inibir a angiogénese e tratar anormalidades do glutamato, neuropatia, dor, perturbações compulsivas, doenças da próstata, cancros, glaucoma e perturbações retinianas.

A enzima NAALADase, também conhecida como antígeno membranar específico da próstata ("PSM" ou "PSMA") e glutamato carboxipeptidase II ("GCP II") humana, catalisa a hidrólise do neuropéptido N-acetil-aspartil-glutamato ("NAAG") em N-acetilaspartato ("NAA") e glutamato. Com base na homologia de sequências de aminoácidos, a NAALADase foi atribuída à família de peptidases M28.

Estudos sugerem que inibidores da NAALADase podem ser eficazes no tratamento de isquemia, lesão da espinha-medula, doenças desmielinizantes, doença de Parkinson, Esclerose Lateral Amiotrófica ("ALS"), dependência de álcool, dependência de nicotina, dependência de cocaína, cancro, neuropatia, dor e esquizofrenia, e na inibição da angiogénese. Considerando o seu largo espectro de aplicações potenciais, são necessários novos inibidores da NAALADase e composições farmacêuticas compreendendo esses compostos.

RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um composto de fórmula Ia, ou respectivo sal ou hidrato farmaceuticamente aceitável:



em que:

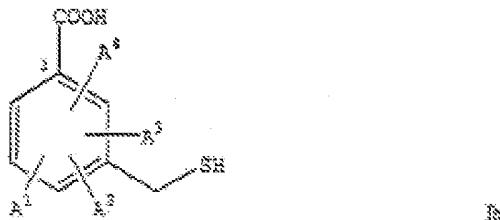
R^1 , R^2 , R^3 e R^4 , independentemente, são hidrogénio ou C_1-C_3 alquilo, e

A^1 , A^2 , A^3 e A^4 , independentemente, são hidrogénio, C_1-C_9 alquilo, C_2-C_9 alcenilo, C_2-C_9 alcinilo, arilo, heteroarilo, carbociclo, heterociclo, halo, hidroxi, sulfidrilo, nitro, amino, ciano, isociano, tiociano, isotiociano, formamido, tioformamido, sulfo, sulfino, C_1-C_9 alquilsulfonilo, C_1-C_9 alcoxi, C_2-C_9 alcenoxi, fenoxi ou benziloxi,

em que o referido alquilo, alcenilo, alcinilo, arilo, heteroarilo, carbociclo, heterociclo, alcoxi, alcenoxi, fenoxi e benziloxi, independentemente, não estão substituídos ou estão substituídos com um ou mais substituinte(s).

Numa forma de realização, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , A^2 , A^3 e A^4 são hidrogénio; e A^1 é hidrogénio, $-(CH_2)_n-W$, ou $-Y-(CH_2)_n-W$, em que: n é 0 - 3; Y é O, S ou NR em que R é hidrogénio ou C_1-C_4 alquilo; e W é C_1-C_6 alquilo ou fenilo, em que W não está substituído ou está substituído com C_1-C_4 alquilo, C_1-C_4 alcoxi, carboxi ou halo.

A presente invenção também se refere a um composto de fórmula Ib, ou respectivo sal ou hidrato farmaceuticamente aceitável:



em que A^1 , A^2 , A^3 e A^4 , independentemente, são hidrogénio, C_1-C_9 alquilo, C_2-C_9 alcenilo, C_2-C_9 alcinilo, arilo, heteroarilo, carbociclo, heterociclo, halo, hidroxi, sulfidrilo, nitro, amino, ciano, isociano, tiociano, isotiociano, formamido, tioformamido, sulfo, sulfino, C_1-C_9 alquilsulfonilo, C_1-C_9 alcoxi, C_2-C_9 alcenoxy, fenoxi ou benziloxi,

em que o referido alquilo, alcenilo, alcinilo, arilo, heteroarilo, carbociclo, heterociclo, alcoxi, alcenoxy, fenoxi e benziloxi, independentemente, não estão substituídos ou estão substituídos com um ou mais substituinte(s),

em que, se A^1 for cloro, fluoro, amino ou tiometilo, então A^2 , A^3 e A^4 poderão não ser todos hidrogénio

e em que pelo menos um dos A^1 , A^2 , A^3 e A^4 não é hidrogénio.

Numa forma de realização, A^2 , A^3 e A^4 são hidrogénio; e A^1 é $-(CH_2)_n-Ar$ ou $-Y-(CH_2)_n-Ar$, em que n é 0 - 3, Y é O, S ou NR em que R é hidrogénio ou C_1-C_4 alquilo, e Ar é fenilo, não substituído ou substituído com C_1-C_4 alquilo, carboxi ou halo.

Adicionalmente, a presente invenção refere-se a um método para inibir a actividade da enzima NAALADase, detectar doenças em que os níveis de NAALADase estão alterados, realizar actividade neuronal, realizar

actividade do TGF- β , inibir a angiogénesse ou tratar anormalidades do glutamato, neuropatia, dor, perturbações compulsivas, doenças da próstata, cancros, glaucoma ou perturbações retinianas, que compreende administrar a um mamífero necessitado dessa inibição, tratamento ou efeito uma quantidade eficaz de um composto de fórmula Ia ou Ib como definido acima.

A presente invenção também se refere a um método para detectar uma doença, perturbação ou estado em que os níveis de NAALADase estão alterados, que compreende:

- (i) contactar uma amostra de tecido ou fluido corporal com um composto de fórmula Ia ou Ib, como definido acima, em que o referido composto se liga a qualquer NAALADase presente na referida amostra, e
- (ii) medir a quantidade de qualquer NAALADase ligada à referida amostra, em que a quantidade de NAALADase é um diagnóstico da referida doença, perturbação ou estado.

A presente invenção também se refere a um método para detectar uma doença, perturbação ou estado em que os níveis de NAALADase estão alterados num animal ou num mamífero, que compreende:

- (i) etiquetar um composto de fórmula Ia ou Ib, como definido acima, com um reagente de imaciologia;
- (ii) administrar ao referido animal ou mamífero uma quantidade eficaz do composto etiquetado;
- (iii) permitir que o referido composto etiquetado localize e se ligue à NAALADase presente no referido animal ou mamífero, e

(iv) medir a quantidade de NAALADase ligada ao referido composto etiquetado, em que a quantidade de NAALADase é um diagnóstico da referida doença, perturbação ou estado.

Adicionalmente, a presente invenção também se refere a um estojo de diagnóstico para detectar uma doença, perturbação ou estado em que os níveis de NAALADase estão alterados, que compreende um composto de fórmula Ia ou Ib, como definido acima, etiquetado com um marcador.

Por fim, a presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica que compreende:

- (i) uma quantidade eficaz de um composto de fórmula Ia ou Ib, como definido acima, e
- (ii) um transportador farmaceuticamente aceitável.

DESCRÍÇÃO BREVE DAS FIGURAS

A FIG. 1 é um gráfico de barras que mostra o efeito do Composto C em concentrações de TGF- β 1 em culturas de células isquémicas.

A FIG. 2 é um gráfico de barras que mostra o efeito do Composto C em concentrações de TGF- β 2 em culturas de células isquémicas.

A FIG. 3 é um gráfico de barras que mostra a reversão do efeito neuroprotector do Composto C por anticorpos neutralizadores do TGF- β em culturas de células isquémicas.

A FIG. 4 é um gráfico de barras que mostra a não reversão do efeito neuroprotector do Composto C por

anticorpos neutralizadores do FGF em culturas de células isquémicas.

A FIG. 5 é um gráfico de barras que mostra a reversão do efeito neuroprotector do Composto C por anticorpos neutralizadores do TGF- β em ratos sujeitos a oclusão da artéria cerebral média ("MCAO").

A FIG. 6 é um gráfico de barras que mostra o efeito do Composto C nos níveis de TGF- β 1 durante a oclusão e reperfusão em ratos sujeitos a MCAO.

A FIG. 7A é um gráfico de barras que representa graficamente as pontuações da diferença de latência de remoção de ratos não diabéticos e ratos diabéticos devido a STZ tratados com um veículo ou Composto A versus os dias seguintes à administração com STZ.

A FIG. 7B é um gráfico de barras que representa graficamente as pontuações da diferença de latência de remoção de ratos não diabéticos e ratos diabéticos devido a STZ tratados com um veículo ou Composto D versus os dias seguintes à administração com STZ.

A FIG. 8 é um gráfico de barras que representa graficamente as pontuações da diferença de latência de remoção de ratos normais (não operados) e ratos onde foi induzida lesão de constrição crónica tratados com um veículo ou Composto C versus os dias seguintes à cirurgia.

A FIG. 9A é um gráfico de barras que representa graficamente a velocidade da condução de nervos motores de ratos não diabéticos e ratos diabéticos devido a STZ tratados com um veículo ou Composto A versus as semanas seguintes à administração com STZ.

A FIG. 9B é um gráfico de barras que representa graficamente a velocidade da condução de nervos sensoriais de ratos não diabéticos e ratos diabéticos

devido a STZ tratados com um veículo ou Composto A *versus* as semanas seguintes à administração com STZ.

A FIG. 10A é um gráfico de barras que representa graficamente a velocidade da condução de nervos motores de ratos não diabéticos e ratos diabéticos devido a STZ tratados com um veículo ou Composto D *versus* as semanas seguintes à administração com STZ.

A FIG. 10B é um gráfico de barras que representa graficamente a velocidade da condução de nervos sensoriais de ratos não diabéticos e ratos diabéticos devido a STZ tratados com um veículo ou Composto D *versus* as semanas seguintes à administração com STZ.

A FIG. 11 é um gráfico que representa a latência de remoção de ratos não diabéticos e ratos BB/W diabéticos tratados com um veículo, Composto D ou Composto A *versus* as semanas de tratamento.

A FIG. 12 é um gráfico que representa a velocidade da condução de nervos de ratos não diabéticos e ratos BB/W diabéticos tratados com um veículo, Composto D ou Composto A *versus* as semanas de tratamento.

A FIG. 13 é um gráfico de barras que representa as pontuações da diferença de latência de remoção de ratos onde foi induzida lesão de constrição crónica tratados com um veículo ou quantidades variáveis de Composto 9 *versus* os dias de tratamento.

A FIG. 14 é um gráfico de barras que representa as pontuações da diferença de latência de remoção de ratos onde foi induzida lesão de constrição crónica tratados com um veículo ou Composto 10 *versus* os dias de tratamento.

A FIG. 15 é um gráfico de barras que representa a percentagem de ratinhos transgénicos com 210 dias de

idade que exibiram tremuras nos membros após tratamento com Composto B ou um veículo.

A FIG. 16 é um gráfico de barras que representa o porte, medido com uma escala arbitrária que varia de 0 a 3, de ratinhos transgénicos com 210 dias de idade após tratamento com Composto B ou um veículo.

A FIG. 17 é um gráfico de barras que representa o arrastamento dos membros traseiros, medido com uma escala arbitrária que varia de 0 a 3, de ratinhos transgénicos com 210 dias de idade após tratamento com Composto B ou um veículo.

A FIG. 18 é um gráfico de barras que representa o cruzamento de membros, medido com uma escala arbitrária que varia de 0 a 3, de ratinhos transgénicos com 210 dias de idade após tratamento com Composto B ou um veículo.

A FIG. 19 é um gráfico de barras que representa o reflexo de endireitamento de ratinhos transgénicos, medido pelo tempo (segundos) que os ratinhos demoraram a endireitar-se depois de terem sido deitados sobre o lado, aos 210 dias de idade após tratamento com Composto B ou um veículo.

A FIG. 20 é um gráfico que representa a percentagem de ratinhos transgénicos tratados com Composto B ou um veículo que morreram *versus* a idade dos ratinhos (dias).

A FIG. 21 é um gráfico de sobrevivência de Kaplan-Meier que representa a percentagem de ratinhos transgénicos tratados com Composto B ou um veículo que sobreviveram *versus* o número de dias em que os ratinhos estiveram sujeitos à terapia de estudo.

A FIG. 22 mostra o efeito do tratamento com os Compostos D e E em anormalidades de dor neuropática em ratos diabéticos devido a STZ.

A FIG. 23 mostra as medições da velocidade de condução de nervos motores em ratos diabéticos devido a STZ e controlos não diabéticos antes e após o tratamento com os Compostos D e E.

A FIG. 24 representa deficiências da velocidade de condução de nervos sensoriais após tratamento com os Compostos D e E.

A FIG. 25 mostra anormalidades de dor neuropática com doses menores (1 e 3 mg/kg) de Composto D iniciadas após 7 semanas de tratamento com STZ.

As FIGS. 26 e 27 mostram a velocidade de condução de nervos sensoriais e motores, respectivamente, em ratos STZ cronicamente diabéticos tratados com doses menores de Composto D.

As FIGS. 28 e 29 mostram medições da velocidade de condução de nervos sensoriais e motores em que os ratos não foram tratados até aos 60 dias após tratamento com STZ.

A FIG. 30 mostra a velocidade de condução de nervos sensoriais em que o tratamento foi retardado até aos 90 dias após STZ.

A FIG. 31 mostra medições da velocidade de condução de nervos de um modelo de ratinho genético de diabetes aos 6 - 7 meses de idade.

A FIG. 32 mostra a velocidade de condução de nervos após 8 semanas de tratamento com Composto F administrado a 1 mg/kg por dia.

A FIG. 33 é um gráfico de barras que compara o desempenho no teste de haste rotativa ("rotarod") de ratinhos HD transgénicos e ratinhos não HD normais

tratados com Composto B, e ratinhos HD transgénicos e ratinhos não HD normais tratados com um veículo.

A FIG. 34 é um gráfico de barras que compara a distância total percorrida por ratinhos HD transgénicos e ratinhos não HD normais tratados com o Composto B, e ratinhos HD transgénicos e ratinhos não HD normais tratados com um veículo.

A FIG. 35 é um gráfico que representa o tempo de sobrevivência de ratinhos D transgénicos tratados com o Composto B ou um veículo.

A FIG. 36 é um gráfico que representa o tempo de sobrevivência de ratinhos HD transgénicos machos tratados com o Composto B ou um veículo.

A FIG. 37 é um gráfico que representa o tempo de sobrevivência de ratinhos HD transgénicos fêmeas tratados com o Composto B ou um veículo.

DESCRICAÇÃO PORMENORIZADA

DEFINIÇÕES

"Composto A" refere-se a ácido 2-[[2,3,4,5,6-penta-fluorobenzil)hidroxifosfinil]metil]pentanodióico.

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

"Composto C" refere-se a ácido 2-(fosfonometil)pentanodióico ("PMPA").

"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.

"Composto 9" refere-se a ácido 2-[(4-carboxifenil)metoxi]-6-(2-mercaptopoetil)benzóico.

"Composto 10" refere-se a ácido 3-(2-mercaptopoetil)-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico.

"Alquilo" refere-se a uma cadeia hidrocarbonada saturada ramificada ou não ramificada compreendendo um número designado de átomos de carbono. Por exemplo, C₁-C₉ alquilo é uma cadeia hidrocarbonada linear ou ramificada que contém 1 até 9 átomos de carbono, e inclui mas não está limitado a substituintes como metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, tert-butilo, n-pentilo, n-hexilo e afins, a menos que indicado em contrário.

"Alcenilo" refere-se a uma cadeia hidrocarbonada insaturada ramificada ou não ramificada compreendendo um número designado de átomos de carbono. Por exemplo, C₂-C₉ alcenilo é uma cadeia hidrocarbonada linear ou ramificada que contém 2 até 9 átomos de carbono com pelo menos uma ligação dupla, e inclui mas não está limitado a substituintes como etenilo, propenilo, isopropenilo, butenilo, iso-butenilo, tert-butenilo, n-pentenilo, n-hexenilo e afins, a menos que indicado em contrário.

"Alcoxi" refere-se ao grupo -OR em que R é alquilo como aqui definido. Preferivelmente, R é uma cadeia hidrocarbonada saturada ramificada ou não ramificada que contém 1 até 9 átomos de carbono.

"Cicloalquilo" refere-se a uma fracção hidrocarbonada cíclica com um ou mais anel(anéis) fechados que é/são alicíclicos, fundidos e/ou em ponte. Exemplos incluem ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano, ciclo-hexano, ciclo-heptano, ciclopenteno, ciclo-hexeno, ciclo-hepteno, cicloocteno.

"Arilo" refere-se a uma fracção cíclica aromática e hidrocarbonada com um ou mais anéis fechados. Exemplos

incluem, sem limitação, fenilo, naftilo, antracenilo, fenantracenilo, bifenilo e pirenilo.

"Heterocicloalquilo" refere-se a uma fracção cíclica com um ou mais anéis fechados que é/são alicíclicos, fundidos e/ou em ponte, com um ou mais heteroátomos (por exemplo, enxofre, azoto ou oxigénio) em pelo menos um dos anéis. Exemplos incluem, sem limitação, pirrolidina, piperidina, isoxazolidina.

"Heteroarilo" refere-se a uma fracção cíclica aromática com um ou mais anéis fechados que possui um ou mais heteroátomos (por exemplo, enxofre, azoto ou oxigénio) em pelo menos um dos anéis. Exemplos incluem, sem limitação, pirrolo, tiofeno, piridina e isoxazolo.

"Derivado" refere-se a uma substância produzida a partir de outra substância directamente ou por modificação ou substituição parcial.

"Quantidade eficaz" refere-se à quantidade necessária para produzir o efeito desejado. "Quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se à quantidade necessária para inibir a actividade da enzima NAALADase e/ou a angiogénesis, para realizar actividade neuronal ou actividade de TGF- β e/ou para tratar anormalidade do glutamato, neuropatia, dor, perturbação compulsiva, doença da próstata, cancro, glaucoma e/ou perturbações retinianas.

"Radiação electromagnética" inclui, sem limitação, radiação com o comprimento de onda de 10^{-20} até 10^0 metros. Exemplos incluem, sem limitação, radiação gama (10^{-20} até 10^{-13} m), radiação de raios X (10^{-11} até 10^{-9} m), luz ultravioleta (10 nm até 400 nm), luz visível (400 nm até 700 nm), radiação de infravermelhos (700 nm até 1,0 mm) e radiação de micro-ondas (1 mm até 30 cm).

"Halo" refere-se a pelo menos uma fracção fluoro, cloro, bromo ou iodo.

"Isósteros" refere-se a elementos, grupos funcionais, substituintes, moléculas ou iões com diferentes fórmulas moleculares mas exibindo propriedades físicas semelhantes ou idênticas. Por exemplo, o tetrazolo é um isósteros de ácido carboxílico porque imita as propriedades de ácido carboxílico apesar de ambos terem fórmulas moleculares diferentes. Tipicamente, duas moléculas isostéricas têm volumes e formas semelhantes ou idênticos. Idealmente, os compostos isostéricos devem ser isomórficos e capazes de co-cristalizar. Outras propriedades físicas que os compostos isostéricos habitualmente partilham incluem ponto de ebulição, densidade, viscosidade e condutividade térmica. No entanto, certas propriedades são habitualmente diferentes: momentos dipolares, polaridade, polarização, dimensão e forma, pois as orbitais externas podem ser hibridizadas de forma diferente. O termo "isósteros" abrange "bioisósteros".

"Bioisósteros" são isósteros que, para além das suas semelhanças físicas, partilham algumas propriedades biológicas comuns. Tipicamente, os bioisósteros interagem com o mesmo sítio de reconhecimento ou produzem efeitos biológicos amplamente semelhantes.

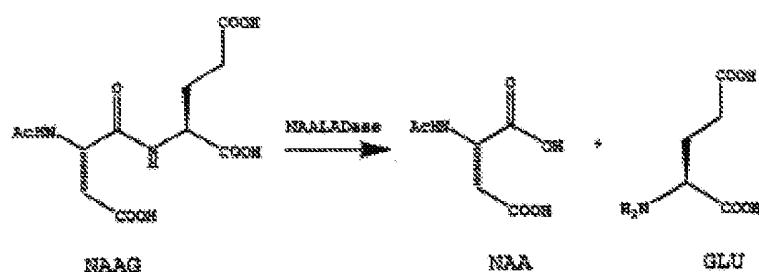
"Isósteros de ácidos carboxílicos" incluem, sem limitação, derivados directos, como ácidos hidroxâmicos, acil-cianamidas e acilsulfonamidas; heterociclos acídicos planares, como tetrazolos, mercaptoazolos, sulfinilazolos, sulfonilazolos, isoxazolos, isotiazolos, hidroxitiadiazolos e hidroxi-crómios; e funções acídicas não planares derivadas de enxofre ou fósforo, como fosfinatos, fosfonatos, fosfonamidas, sulfonatos, sulfonamidas e acilsulfonamidas.

"Metabolito" refere-se a uma substância produzida por metabolismo ou por um processo metabólico.

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

"NAALADase" refere-se a uma dipeptidase acídica α -ligada N-acetilada, uma metalopeptidase ligada a membranas que cataboliza o NAAG em N-acetilaspartato ("NAA") e glutamato ("GLU"):

CATABOLISMO DO NAAG PELA NAALADase



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

"Transportador farmaceuticamente aceitável" refere-se a qualquer transportador, diluente, excipiente, agente humedecedor, agente de tamponamento, agente de suspensão, agente lubrificante, adjuvante, veículo, sistema de distribuição, emulsionante, agente de desintegração, absorvente, conservante, surfactante, corante, aromatizante ou edulcorante, preferivelmente não tóxico, que pode ser adequado para utilização numa composição farmacêutica.

"Sal farmaceuticamente aceitável" refere-se a um sal dos compostos inventivos que possui a actividade farmacológica desejada e que não é indesejável biologicamente ou de qualquer outro modo. 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, glicero-fosfato, hemissulfato, heptanoato, hexanoato, cloridrato bromidrato, hidroiodeto, 2-hidroxietanossulfonato, lactato, maleato, metanossulfonato, 2-naftalenossulfonato, nicotinato, oxalato, tiocianato, tosilato e undecanoato.

Exemplos de um sal de base incluem sais de amónio, sais de metais alcalinos, como sais de sódio e potássio, sais de metais alcalino-terrosos, como sais de cálcio e magnésio, sais com bases orgânicas, como sais de diciclo-hexilamina, N-metil-D-glucamina, e sais com aminoácidos, como arginina e lisina. Grupos básicos que contêm azoto podem ser quaternizados com agentes que incluem haletos de alquilo de cadeia curta, como cloretos, brometos e iodetos de metilo, etilo, propilo e butilo; sulfatos de dialquilo, como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo e diamilo; haletos de cadeia longa, como cloretos, brometos e iodetos de decilo, laurilo, miristilo e estearilo, e haletos de aralquilo, como brometos de benzilo e fenetilo.

"Pró-farmaco" refere-se a compostos que sofrem biotransformação, como metabolismo, antes de exibirem o(s) seu(s) efeito(s) farmacológico(s). Um pró-fármaco é formulado com o(s) objectivo(s) de estabilidade química aumentada, maior aceitação e concordância do paciente, maior biodisponibilidade, duração da acção prolongada, maior selectividade para órgãos, formulação melhorada (por exemplo, maior hidrossolubilidade) e/ou efeitos secundários decrescidos (por exemplo, toxicidade). Um pró-fármaco pode ser facilmente preparado a partir dos compostos inventivos utilizando métodos conhecidos na área, como os descritos em "Burger's Medicinal Chemistry and Drug Chemistry", Quinta Edição, Volume 1, páginas 172-178, 949-982 (1995).

"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. 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 listadas aqui também é contemplado pela presente invenção.

"Inibição", no contexto de enzimas, refere-se a inibição reversível de enzimas, como inibição competitiva, incompetitiva e não competitiva. As inibições competitiva, incompetitiva e não competitiva podem distinguir-se pelos efeitos de um inibidor na cinética reacional de uma enzima. Ocorre inibição competitiva quando o inibidor se combina de forma reversível com a enzima de modo a competir com um substrato normal para a ligação no sítio activo. A afinidade entre o inibidor e a enzima pode ser medida pela constante inibidora, K_i , que é definida do modo seguinte:

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

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. A menos que especificado em contrário, K_i , tal como é aqui utilizado, refere-se à afinidade entre os compostos inventivos e NAALADase. "IC₅₀" é um termo relacionado utilizado para definir a concentração ou quantidade de um composto necessária para causar uma inibição de 50% da enzima-alvo.

"Inibidor da NAALADase" refere-se a qualquer composto que inibe a actividade da enzima NAALADase. Preferivelmente, um inibidor da NAALADase exibe um K_i

inferior a 100 μM , mais preferivelmente inferior a 10 μM e ainda mais preferivelmente inferior a 1 μM , determinado utilizando qualquer ensaio apropriado conhecido na área.

"Isómeros" refere-se a compostos com o mesmo número e tipo de átomos e, assim, o mesmo peso molecular mas diferindo na disposição ou configuração dos átomos.

"Esteoisómeros" são isómeros que diferem apenas na disposição espacial dos átomos.

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

"Diastereoisómeros" são estereoisómeros que não são imagens no espelho. Os diastereoisómeros ocorrem em compostos com 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" são um par de estereoisómeros que não são imagens no espelho sobrepostas um do outro. Os enantiómeros resultam da presença de um ou mais átomos de carbono assimétricos no composto (por exemplo, gliceraldeído, ácido láctico, açúcares, ácido tartárico, aminoácidos).

"Enriquecido num enantiómero" refere-se a uma mistura onde predomina um enantiómero.

"Mistura racémica" designa uma mistura que contém quantidades iguais de enantiómeros individuais.

"Mistura não racémica" é uma mistura que contém quantidades diferentes de enantiómeros.

"Angiogénese" refere-se ao processo pelo qual se formam novos capilares. A "inibição" da angiogénese pode ser medida por muitos parâmetros de acordo com a presente invenção e, por exemplo, pode ser avaliada pelo aparecimento retardado de estruturas neovasculares, desenvolvimento abrandado de estruturas neovasculares, ocorrência decrescida de estruturas neovasculares, gravidade abrandada ou decrescida de efeitos de doenças dependentes da angiogénese, crescimento angiogénico interrompido ou regressão de crescimento angiogénico prévio. Levado ao extremo, inibição completa refere-se aqui a prevenção. Relativamente à angiogénese ou crescimento angiogénico, "prevenção" refere-se à ausência de angiogénese ou crescimento angiogénico substancial, se não tiver ocorrido previamente, ou ausência de angiogénese ou crescimento angiogénico suplementar substancial se o crescimento tiver ocorrido previamente.

"Doença dependente da angiogénese" inclui, sem limitação, artrite reumatóide, doenças cardiovasculares, doenças neovasculares do olho, perturbações vasculares periféricas, úlceras dermatológicas e crescimento, invasão e metástases de tumor canceroso.

"Animal" refere-se a um organismo vivo possuindo sensações e a capacidade de movimentos voluntários e que requer, para a sua existência, oxigénio e alimentos orgânicos. Exemplos incluem, sem limitação, membros das espécies humana, equina, porcina, bovina, murina, canina ou

felina. No caso de um humano, um "animal" também pode ser referido como "paciente".

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

"Ansiedade" inclui, sem limitação, o estado emocional desagradável que inclui respostas psicofisiológicas à antecipação de perigo irreal ou imaginado, ostensivamente resultante de um conflito psíquico interior não reconhecido. Concomitantes fisiológicos incluem batimento cardíaco aumentado, velocidade respiratória alterada, sudação, tremuras, fraqueza e fadiga; concomitantes psicológicos incluem sensações de perigo iminente, incapacidade, apreensão e tensão. "Dorland's Illustrated Medical Dictionary", 27^a edição (W.B. Saunders Co. 1988).

"Perturbação de Ansiedade" inclui, sem limitação, perturbações mentais em que predominam ansiedade e comportamento de privação. "Dorland's Illustrated Medical Dictionary". Exemplos incluem, sem limitação, ataque de pânico, agorafobia, perturbação de pânico, perturbação de "stress" agudo, perturbação de "stress" crónico, fobia específica, fobia simples, fobia social, perturbação de ansiedade induzida por substâncias, perturbação de ansiedade orgânica, perturbação obsessiva compulsiva, perturbação de "stress" pós-traumático, perturbação de ansiedade generalizada e perturbação de ansiedade NOS. Outras perturbações de ansiedade são caracterizadas no "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders" (American Psychiatric Association, 4^a edição 1994).

"Perturbação de Deficiência de Atenção" ("ADD") refere-se a uma perturbação caracterizada por inatenção e impulsividade inappropriadas do ponto de vista do desenvolvimento, com ou sem hiperactividade. Inatenção designa uma falha em terminar tarefas iniciadas, distração fácil, aparente falta de atenção e dificuldade de concentração em tarefas que requerem atenção prolongada. Impulsividade significa actuar antes de pensar, dificuldade em aceitar turnos, problemas na organização do trabalho e desvio constante de uma actividade para outra. Hiperactividade designa dificuldade em permanecer sentado e quieto, e correr ou trepar de forma excessiva.

"Cancro" inclui, sem limitação, tumores produtores de ACTH, leucemia linfocítica aguda, leucemia não linfocítica aguda, cancro do córtex adrenal, cancro da bexiga, cancro do cérebro, cancro da mama, cancro do cérvix, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, cancro colorrectal, linfoma cutâneo de células T, cancro do endométrio, cancro esofágico, sarcoma de Ewing, cancro da vesícula biliar, leucemia de células pilosas, cancro da cabeça e pescoço, linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cancro do rim, cancro do fígado, cancro do pulmão (de células pequenas e/ou não pequenas), efusão peritoneal maligna, efusão pleural maligna, melanoma, mesotelioma, mieloma múltiplo, neuroblastoma, linfoma não de Hodgkin, osteossarcoma, cancro do ovário, cancro do ovário (de células germinativas), cancro pancreático, cancro do pénis, cancro da próstata, retinoblastoma, cancro da pele, sarcoma de tecidos moles, carcinomas de células escamosas, cancro do estômago, cancro testicular, cancro da tiróide, neoplasmas trofoblásticos, cancro do útero, cancro vaginal, cancro da vulva e tumor de Wilm.

"Perturbação compulsiva" refere-se a qualquer perturbação caracterizada por um comportamento impulsivo irresistível. Exemplos de perturbações compulsivas incluem, sem limitação, dependência de substâncias, perturbações de alimentação, jogos de azar patológicos, ADD e síndrome de Tourette.

"Dependência de substâncias" refere-se a dependência psicológica ou a uma tolerância física a uma substância, por exemplo, uma droga. Tolerância significa uma necessidade de aumentar progressivamente a dose para produzir o efeito originalmente atingido com quantidades menores.

"Doença desmielinizante" refere-se a qualquer doença envolvendo danos ou remoção da bainha de mielina que envolve naturalmente o tecido nervoso, como definido na Patente U.S. Nº 5,859,046 e Publicação Internacional Nº WO 98/03178, aqui incorporadas por referência. Exemplos incluem, sem limitação, doenças desmielinizantes periféricas (como síndrome de Guillain-Barré, neuropatias periféricas e doença de Charcot-Marie Tooth) e doenças desmielinizantes centrais (como esclerose múltipla).

"Doença" refere-se a qualquer desvio ou interrupção da estrutura ou função normal de qualquer parte, órgão ou sistema (ou combinações) do corpo que se manifesta por um conjunto característico de sintomas e sinais e cuja etiologia, patologia e prognóstico podem ser conhecidos ou desconhecidos. "Dorland's Illustrated Medical Dictionary".

"Perturbação" refere-se a qualquer desarranjo ou anormalidade de uma função; um estado físico ou mental mórbido. "Dorland's Illustrated Medical Dictionary".

"Perturbação de alimentação" refere-se à ingestão excessiva e compulsiva de alimentos, obesidade ou obesidade grave. Obesidade designa peso do corpo superior em 20% ao indicado pelas tabelas altura-peso comuns. Obesidade grave designa peso do corpo superior em 100%.

"Glaucoma" inclui, sem limitação, glaucomas de ângulo aberto crónicos (idiopáticos) (por exemplo, de pressão elevada, pressão normal); glaucomas de bloqueio pupilar (por exemplo, de ângulo fechado agudo, ângulo fechado subagudo, ângulo fechado crónico, de mecanismo combinado); glaucomas associados ao desenvolvimento (por exemplo, congénito (infantil), juvenil, síndroma de Anxenfeld-Rieger, anomalia de Peters, Aniridídia); glaucomas associados a outras perturbações oculares (por exemplo, glaucomas associados a perturbações do endotélio da córnea, íris, corpo ciliar, lente, retina, coroíde e vítreo); glaucomas associados a pressão venosa episcleral elevada (por exemplo, doenças sistémicas com associada pressão intra-ocular elevada e glaucoma, glaucoma induzido por corticosteróides); glaucomas associados a inflamação e traumatismo (por exemplo, glaucomas associados a queratite, episclerite, esclerite, uveíte, traumatismo ocular e hemorragia); glaucomas subsequentes a cirurgia intra-ocular, por exemplo, glaucoma por bloqueio ciliar (maligno), glaucomas em afaquia e pseudoafaquia, glaucomas associados a cirurgia da córnea, glaucomas associados a cirurgia vítreo-retiniana.

"Anormalidade do glutamato" refere-se a qualquer doença, perturbação ou estado onde está implicado o glutamato, incluindo estados patológicos envolvendo níveis elevados de glutamato. Exemplos de anormalidades do glutamato incluem, sem limitação, lesão da espinhal-medula, epilepsia, acidente vascular cerebral, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, ALS, doença de Huntington ("HD"), esquizofrenia, dor, isquemia, neuropatia periférica (incluindo mas não se limitando a neuropatia), lesão cerebral traumática, insulto neuronal, doenças inflamatórias, ansiedade, perturbações de ansiedade, enfraquecimento da memória, perturbações compulsivas, glaucoma e/ou perturbações retinianas.

"Isquemia" refere-se a anemia localizada em tecidos devido a obstrução do fluxo de entrada de sangue arterial. Ocorre isquemia global quando o fluxo de sangue cessa durante um período de tempo, como pode resultar de paragem cardíaca. Ocorre isquemia focal quando uma porção do corpo, como o cérebro, é privada do seu fornecimento normal de sangue, como pode resultar de oclusão tromboembólica de um vaso cerebral, lesão cerebral traumática, edema ou tumor cerebral. Mesmo que transitórias, tanto a isquemia global como a focal podem produzir danos neuronais disseminados. Apesar de ocorrerem danos em tecido nervoso nas horas, ou mesmo dias, após o surgimento de isquemia, alguns danos permanentes no tecido nervoso podem desenvolver-se nos minutos iniciais depois de cessar o fluxo de sangue para o cérebro. Grande parte destes danos é atribuída a toxicidade do glutamato e consequências secundárias da reperfusão do tecido, como a libertação de produtos vasoactivos por endotélio danificado e a libertação de produtos

citotóxicos, como radicais livres e leucotrienos, pelo tecido danificado.

"Enfraquecimento da memória" refere-se a um registo, retenção ou recordação mental diminuída de experiências passadas, conhecimentos, ideias, sensações, pensamentos ou impressões. O enfraquecimento da memória pode afectar a retenção de informação de curto e longo prazo, facilidade em estabelecer relações espaciais, estratégias de memória (ensaio) e pesquisa e produção verbal. Causas comuns do enfraquecimento da memória são a idade, traumatismo craniano grave, anoxia ou isquemia cerebral, doenças alcoólicas-nutricionais, intoxicações por drogas e doenças neurodegenerativas. Por exemplo, o enfraquecimento da memória é uma característica comum de doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer e demência senil do tipo Alzheimer. Também ocorre enfraquecimento da memória com outros tipos de demências, como demência de multienfartes, uma demência senil causada por deficiências cerebrovasculares, e a variante de Corpos de Lewy da doença de Alzheimer com ou sem associação a doença de Parkinson. A doença de Creutzfeldt-Jakob é uma demência rara à qual está associado enfraquecimento da memória. É uma encefalopatia espongiforme causada pela proteína prião; pode ser transmitida de outros pacientes ou pode surgir devido a mutações genéticas. A perda de memória também é uma característica comum de pacientes com danos no cérebro. Podem ocorrer danos no cérebro, por exemplo, após um acidente vascular cerebral clássico ou em resultado de um acidente anestésico, traumatismo craniano, hipoglicemia, envenenamento com monóxido de carbono, intoxicação com lítio, deficiência de vitaminas (B₁, tiamina e B₁₂) ou ingestão excessiva de álcool. A psicose amnésica de

Korsakoff é uma perturbação rara caracterizada por perda de memória profunda e conciliábulos, em que o paciente inventa histórias para ocultar a sua perda de memória. É frequentemente associada à ingestão excessiva de álcool. O enfraquecimento da memória também pode estar associado à idade; a capacidade para recordar informações como nomes, lugares e palavras parece diminuir com o envelhecimento. Também pode ocorrer perda de memória transitória em pacientes que sofrem uma perturbação depressiva grave após terapia electroconvulsiva.

"Perturbação mental" refere-se a qualquer síndrome comportamental ou psicológica clinicamente relevante caracterizada pela presença de sintomas de sofrimento ou enfraquecimento significativo do funcionamento. Presume-se que as perturbações mentais resultam de alguma disfunção psicológica ou orgânica do indivíduo; o conceito não inclui distúrbios que são essencialmente conflitos entre o indivíduo e a sociedade (desvio social).

"Metástase" refere-se à "capacidade de células de um cancro para se disseminarem e formarem novos focos de crescimento em sítios não contíguos (isto é, para formarem metástases)". Ver Hill, R. P., "Metastasis", "The Basic Science of Oncology", Tannock et al., Editores, páginas 178-195 (McGraw-Hill 1992). "A transição de crescimento tumoral *in situ* para doença metastática é definida pela capacidade de células tumorais do sítio primário para invadirem tecidos locais e atravessarem barreiras de tecidos... Para iniciarem o processo metastático, células de carcinoma devem primeiramente penetrar na membrana basal epitelial e depois invadir o estroma intersticial... Para metástases distantes, a intravasação requer invasão por

células tumorais da membrana basal subendotelial, que também deve ser ultrapassada durante a extravasação de células tumorais... O desenvolvimento de malignidade também está associado a angiogénesis induzida pelo tumor [que] não só permite a expansão dos tumores primários mas também permite acesso fácil ao compartimento vascular devido a defeitos das membranas basais de vasos formados de novo." Ver Aznavoorian et al., *Cancer* (1993) 71: 1368-1383.

"Insulto nervoso" refere-se a qualquer dano em tecido nervoso e qualquer incapacidade ou morte daí resultante. A causa do insulto nervoso pode ser metabólica, tóxica, neurotóxica, iatrogénica, térmica ou química, e inclui, sem limitação, isquemia, hipoxia, acidente cerebrovascular, traumatismo, cirurgia, pressão, efeito de massa, hemorragia, radiação, espasmos vasculares, doença neurodegenerativa, processo neurodegenerativo, infecção, doença de Parkinson, ALS, processos de mielinização/desmielinização, epilepsia, perturbação cognitiva, anormalidade do glutamato e respectivos efeitos secundários.

"Tecido nervoso" refere-se aos vários componentes que constituem o sistema nervoso, incluindo, sem limitação, neurónios, células de suporte neural, glia, células de Schwann, rede vascular contida no interior e de fornecimento destas estruturas, o sistema nervoso central, o cérebro, o tronco cerebral, a espinal-medula, a junção do sistema nervoso central com o sistema nervoso periférico, o sistema nervoso periférico e estruturas aliadas.

"Neuropatia" refere-se a qualquer doença ou má função dos nervos. 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, HIV, sífilis, vírus, perturbação autoimune, cancro, porfiria, aracnoidite, neuralgia pós-herpética, síndroma de Guillain-Barré, diabetes incluindo diabetes do Tipo I e Tipo II), compostos químicos (por exemplo, toxinas, chumbo, dapsona, vitaminas, quimioterapia com paclitaxel, terapia com HAART) e lesões físicas num nervo ou plexo nervoso particular (por exemplo, traumatismo, compressão, constrição).

"Neuroprotector" refere-se ao efeito de reduzir, terminar ou melhorar um insulto nervoso, e proteger, ressuscitar ou reviver tecido nervoso que sofreu insulto nervoso.

"Dor" refere-se a sensações localizadas de desconforto, sofrimento ou agonia resultantes da estimulação de extremidades de nervos especializados. Serve de mecanismo protector, pois induz o sofredor a remover ou retirar a fonte. "Dorland's Illustrated Medical Dictionary". Exemplos de dor incluem, sem limitação, dor aguda, crónica, devido a cancro, queimadura, devido a incisão, inflamatória, neuropática diabética e nas costas.

"Dor neuropática" refere-se a um estado de dor associado a lesão em nervos. Dependendo da síndroma particular, a dor pode dever-se a alterações do cérebro ou espinhal-medula ou pode dever-se a anormalidades no próprio nervo. Dor neuropática pode ser idiopática ou induzida por quaisquer causas, incluindo doenças (por exemplo, amiloidose, alcoolismo, HIV, sífilis, vírus, perturbação

autoimune, cancro, porfiria, aracnoidite, neuralgia pós-herpética, síndroma de Guillain-Barré e diabetes, incluindo diabetes do Tipo I e Tipo II), compostos químicos (por exemplo, toxinas, chumbo, dapsona, vitaminas, quimioterapia com paclitaxel e terapia com HAART) e lesões físicas num nervo ou plexo nervoso particular (por exemplo, traumatismo, compressão e constrição).

"Jogo de azar patológico" refere-se a um estado caracterizado por uma preocupação com jogos de azar. Semelhante à toxicomania de substâncias psicoactivas, os seus efeitos incluem desenvolvimento de tolerância com necessidade de apostar somas progressivamente maiores de dinheiro, sintomas de privação e continuação do jogo de azar apesar de efeitos negativos graves na família e ocupação.

"Doença da próstata" refere-se a qualquer doença que afecta a próstata. Exemplos de doenças da próstata incluem, sem limitação, cancro da próstata, como adenocarcinoma e cancros metastáticos da próstata, e estados caracterizados por crescimento anormal de células epiteliais prostáticas, como hiperplasia prostática benigna.

"Esquizofrenia" refere-se a uma perturbação mental ou grupo de perturbações mentais caracterizado por distúrbios na forma e conteúdo do pensamento (perda de associações, ilusões, alucinações), humor (rude, deprimido, afectado de forma inapropriada), sentido de si e relação com o mundo exterior (perda de fronteiras do ego, pensamento dereístico e afastamento autístico) e comportamento (bizarro, aparentemente sem finalidade e actividade ou inactividade estereotipada). Exemplos de esquizofrenia incluem, sem

limitação, esquizofrenia aguda, ambulatória, limítrofe, catatónica, da infância, desorganizada, hebefrénica, latente, nuclear, paranóide, parafrénica, pré-psicótica, processual, pseudoneurótica, pseudopsicopática, reactiva, residual, esquizoafectiva e indiferenciada. "Dorland's Illustrated Medical Dictionary".

"TGF- β " refere-se ao factor de transformação do crescimento beta. O TGF- β é reconhecido como um protótipo de factores de crescimento multifuncionais. Regula várias funções celulares e de tecidos, incluindo o crescimento e diferenciação celulares, angiogénesis, cura de feridas, função imunológica, produção da matriz extracelular, quimiotaxia celular, apoptose e hematopoiese.

"Anormalidade do TGF- β " refere-se a qualquer doença, perturbação ou estado onde está implicado o TGF- β , incluindo doenças, perturbações e estados caracterizados por um nível anormal do TGF- β .

"Nível anormal do TGF- β " refere-se a uma variação mensurável dos níveis normais do TGF- β , determinada pelo profissional utilizando técnicas conhecidas.

"Janela terapêutica de oportunidade" ou "janela" refere-se, relativamente a acidente vascular cerebral, ao retardamento máximo entre o início do acidente vascular cerebral e a iniciação de terapia eficaz.

"Síndroma de Tourette" refere-se a uma perturbação autossómica de múltiplos tiques caracterizada por juramentos compulsivos, múltiplos tiques musculares e

ruídos de alto volume. Os tiques são movimentos involuntários breves e rápidos que podem ser simples ou complexos; são estereotipados e repetitivos, mas não rítmicos. Tiques simples, como pestanejar, começam muitas vezes como maneirismos nervosos. Tiques complexos assemelham-se muitas vezes a fragmentos de comportamento normal.

"Tratamento" refere-se a:

- (i) prevenir a ocorrência de uma doença, perturbação ou estado num animal que pode ter predisposição para a doença, perturbação e/ou estado mas que ainda não foi diagnosticado como padecendo dela;
- (ii) inibir a doença, perturbação ou estado, isto é, parar o seu desenvolvimento, e/ou
- (iii) atenuar a doença, perturbação ou estado, isto é, causar regressão da doença, perturbação e/ou estado.

"Tratamento de ALS" refere-se a:

- (i) prevenir a ocorrência de ALS num animal que pode ter predisposição para a ALS mas que ainda não foi diagnosticado como padecendo dela;
- (ii) inibir a ALS, por exemplo, parar o seu desenvolvimento;
- (iii) atenuar a ALS, por exemplo, causar regressão da doença, perturbação e/ou estado;
- (iv) retardar o aparecimento da ALS ou sintoma(s) da ALS;
- (v) abrandar a progressão da ALS ou sintoma(s) da ALS;
- (vi) prolongar a sobrevivência de um animal que sofre de ALS, e/ou

(vii) atenuar sintoma(s) da ALS.

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

- (i) prevenir a ocorrência de doença de Huntington num animal que pode ter predisposição para doença de Huntington mas que ainda não foi diagnosticado como padecendo dela;
- (ii) inibir ou abrandar a doença de Huntington, por exemplo, parar o seu desenvolvimento;
- (iii) atenuar a doença de Huntington, por exemplo, causar a sua regressão;
- (iv) melhorar a coordenação motora de um animal que sofre de doença de Huntington, e/ou
- (v) prolongar a sobrevivência de um animal que sofre de doença de Huntington.

"Tratamento de dependência de substâncias (toxicomania)" refere-se à supressão da dependência psicológica ou tolerância física da substância e/ou atenuação e/ou prevenção de uma síndrome de privação resultante da toxicomania.

"Dependência" refere-se a um padrão não adaptável de consumo de substâncias conducente a enfraquecimento ou sofrimento clinicamente relevante. A dependência é tipicamente caracterizada por tolerância e/ou privação. Substâncias que podem desenvolver dependência incluem, sem limitação, depressivos (opioides, narcóticos sintéticos, barbituratos, glutetimida, metiprilona, etclorvinol, metaqualona, álcool); ansiolíticos (diazepam, clordiazepóxido, alprazolam, oxazepam, temazepam);

estimulantes (anfetamina, metanfetamina, cocaína), e alucinogénios (LSD, mescalina, peiote, marijuana).

"Tolerância" refere-se a uma reacção adquirida a uma substância caracterizada por um efeito diminuído com o uso continuado da mesma dose e/ou necessidade de doses aumentadas para atingir intoxicação ou efeito desejado previamente atingido com doses menores. Factores fisiológicos e psico-sociais podem contribuir para o desenvolvimento de tolerância. Relativamente à tolerância fisiológica, pode desenvolver-se tolerância metabólica e/ou funcional. Ao aumentar a taxa do metabolismo da substância, o corpo pode conseguir eliminar a substância mais rapidamente. A tolerância funcional é definida como um decréscimo da sensibilidade do sistema nervoso central à substância.

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

"Tratamento de uma perturbação retiniana" refere-se a:

- (i) prevenir a ocorrência de uma perturbação retiniana num animal que pode ter predisposição para uma perturbação retiniana mas que ainda não foi diagnosticado como padecendo dela;
- (ii) inibir uma perturbação retiniana, por exemplo, parar o seu desenvolvimento, e/ou
- (iii) atenuar uma perturbação retiniana, por exemplo, causar a sua regressão.

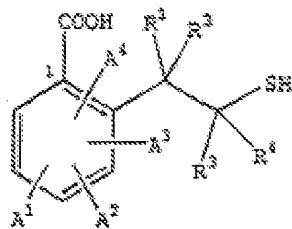
"Perturbação retiniana" refere-se a retinopatia vascular, por exemplo, retinopatia hipertensiva, retinopatia diabética (não proliferativa ou proliferativa), oclusão da artéria retiniana central ou oclusão da veia retiniana central; degenerescência macular relacionada com a idade; separação retiniana, ou retinite pigmentosa.

O profissional reconhecerá que há nomenclaturas, nosologias e sistemas de classificação alternativos para as doenças, perturbações e estados definidos acima, e que esses sistemas evoluem com os progressos científicos no domínio da medicina.

A menos que o contexto claramente dite de outra forma, as definições de termos singulares podem ser extrapoladas para se aplicarem aos seus correspondentes plurais tal como aparecem na candidatura; do mesmo modo, as definições de termos plurais podem ser extrapoladas para se aplicarem aos seus correspondentes singulares tal como aparecem na candidatura.

COMPOSTOS DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um composto de fórmula Ia:



Ia

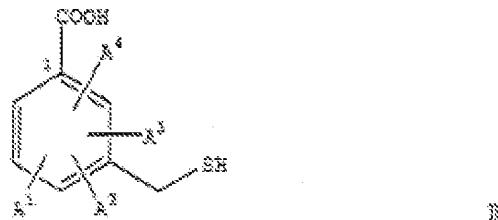
em que:

R^1 , R^2 , R^3 e R^4 , independentemente, são hidrogénio ou C_1-C_3 alquilo, e

A^1 , A^2 , A^3 e A^4 , independentemente, são hidrogénio, C_1-C_9 alquilo, C_2-C_9 alcenilo, C_2-C_9 alcinilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, halo, hidroxi, sulfidrilo, nitro, amino, ciano, isociano, tiociano, isotiociano, formamido, tioformamido, sulfo, sulfino, C_1-C_9 alquilsulfonilo, C_1-C_9 alcoxi, C_2-C_9 alcenoxi, fenoxi ou benziloxi, em que o referido alquilo, alcenilo, alcinilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alcoxi, alcenoxi, fenoxi e benziloxi, independentemente, não estão substituídos ou estão substituídos com um ou mais substituinte(s).

Numa forma de realização, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , A^2 , A^3 e A^4 são hidrogénio; e A^1 é hidrogénio, $-(CH_2)_n-W$, ou $-Y-(CH_2)_n-W$, em que: n é 0 - 3; Y é O, S ou NR em que R é hidrogénio ou C_1-C_4 alquilo; e W é C_1-C_6 alquilo ou fenilo, em que W não está substituído ou está substituído com C_1-C_4 alquilo, C_1-C_4 alcoxi, carboxi ou halo.

A presente invenção também se refere a um composto de fórmula Ib:



em que A^1 , A^2 , A^3 e A^4 , independentemente, são hidrogénio, C_1-C_9 alquilo, C_2-C_9 alcenilo, C_2-C_9 alcinilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, halo, hidroxi, sulfidrilo, nitro, amino, ciano, isociano, tiociano, isotiociano, formamido, tioformamido, sulfo,

sulfino, C_1-C_9 alquilsulfonilo, C_1-C_9 alcoxi, C_2-C_9 alcenoxi, fenoxi ou benziloxi,

em que o referido alquilo, alcenilo, alcinilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alcoxi, alcenoxi, fenoxi e benziloxi, independentemente, não estão substituídos ou estão substituídos com um ou mais substituinte(s),

em que, se A^1 for cloro, fluoro, amino ou tiometilo, então A^2 , A^3 e A^4 poderão não ser todos hidrogénio, e em que pelo menos um dos A^1 , A^2 , A^3 e A^4 não é hidrogénio.

Numa forma de realização, A^2 , A^3 e A^4 são hidrogénio; e A^1 é $-(CH_2)_n-Ar$ ou $-Y-(CH_2)_n-Ar$, em que n é 0 - 3, Y é O, S ou NR em que R é hidrogénio ou C_1-C_4 alquilo, e Ar é fenilo, não substituído ou substituído com C_1-C_4 alquilo, carboxi ou halo.

Substituintes possíveis dos referidos alquilo, alcenilo, alcinilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alcoxi, alceniloxi, fenoxi, benziloxi e anel fundido incluem, sem limitação, C_1-C_6 alquilo, C_2-C_6 alcenilo, C_2-C_6 alcinilo, C_1-C_6 alcoxi, C_2-C_6 alceniloxi, fenoxi, benziloxi, hidroxi, carboxi, hidroperoxi, 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, C_1-C_6 alquiltio, sulfamino, sulfamoílo, sulfeno, sulfidrilo, sulfinilo, sulfo, sulfonilo, tiocarboxi, tiociano, isotiociano, tioformamido, halo, haloalquilo, clorosilo, clorilo, perclorilo, trifluorometilo, iodosilo, iodilo, fosfino, fosfinilo, fosfo, fosfono, arsino, selanilo, dissilanilo, siloxi,

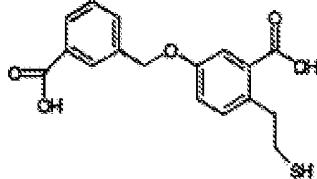
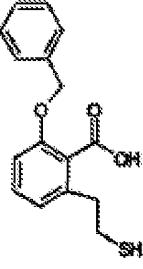
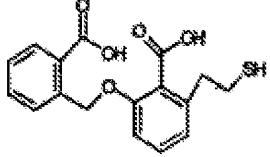
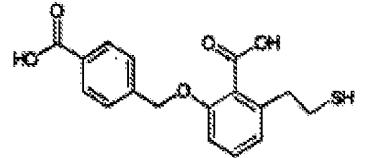
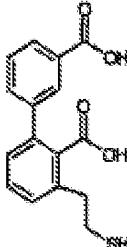
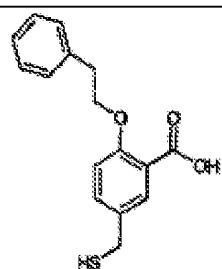
sililo, silileno e fracções de cicloalquilo e heterocicloalquilo.

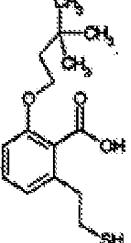
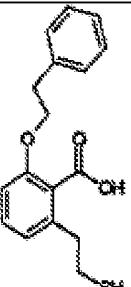
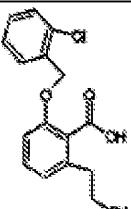
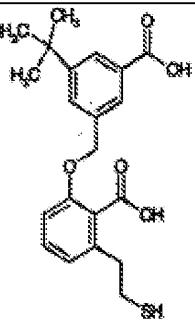
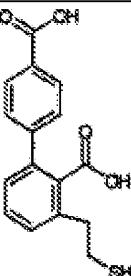
Exemplos de fracções de cicloalquilo e heterocicloalquilo incluem, sem limitação, tetra-hidrofuranilo; tetra-hidropiranilo; pirrolidinilo, tritianilo; pirazolinilo, pirazolidinilo.

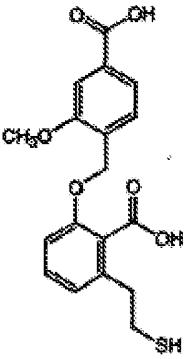
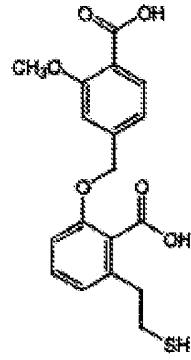
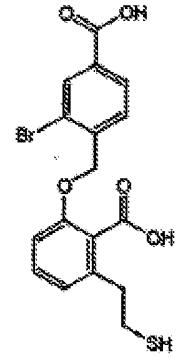
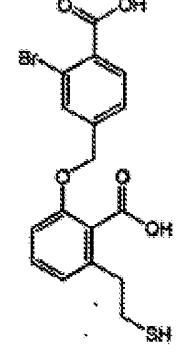
Compostos representativos da presente invenção estão apresentados abaixo na Tabela L.

TABELA I

Composto Nº	Estrutura	Nome
1		ácido 2-(2-mercptoetil)benzóico
2		ácido 5-hidroxi-2-(2-mercptoetil)benzóico
3		ácido 5-[(4-carboxifenil)metoxi]-2-(2-mercptoetil)benzóico
4		ácido 2-(2-mercptoetil)-5-(fenilmetoxi)benzóico
5		ácido 2-(carboximetoxi)-6-(2-mercptoetil)benzóico

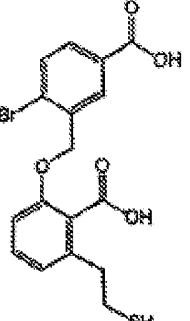
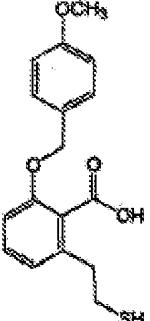
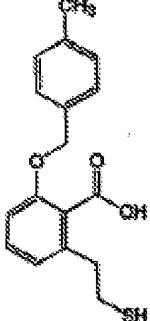
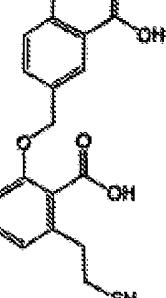
Composto Nº	Estrutura	Nome
6		ácido 5-[(3-carboxifenil)metoxi]-2-(2-mercaptopoetil)benzóico
7		ácido 2-(2-mercaptopoetil)-6-(fenilmethoxi)benzóico
8		ácido 2-[(2-carboxifenil)metoxi]-6-(2-mercaptopoetil)benzóico
9		ácido 2-[(4-carboxifenil)metoxi]-6-(2-mercaptopoetil)benzóico
10		ácido 3-(2-mercaptopoetil)-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico
11		ácido 5-(mercaptometil)-2-(2-feniletoxi)benzóico

Composto Nº	Estrutura	Nome
12		ácido 2-(3,3-dimetilbutoxi)-6-(2-mercaptoproetyl)benzóico
13		ácido 2-(2-mercaptoproetyl)-6-(2-feniletoxi)benzóico
14		ácido 2-[(2-chlorofenil)metoxi]-6-(2-mercaptoproetyl)benzóico
15		ácido 2-[[3-carboxi-5-(1,1-dimetiletínil)fenil]metoxi]-6-(2-mercaptoproethyl)benzóico
16		ácido 3-(2-mercaptoproethyl)-[1,1'-bifenil]-2,4'-dicarboxílico

Composto Nº	Estrutura	Nome
17		ácido 2-[(4-carboxi-2-metoxifenil)metoxi]-6-(2-mercaptopethyl)benzóico
18		ácido 2-[(4-carboxi-3-metoxifenil)metoxi]-6-(2-mercaptopethyl)benzóico
19		ácido 2-[(2-bromo-4-carboxifenil)metoxi]-6-(2-mercaptopethyl)benzóico
20		ácido 2-[(3-bromo-4-carboxifenil)metoxi]-6-(2-mercaptopethyl)benzóico

Composto Nº	Estrutura	Nome
21		ácido 2-(2-mercaptopropil)-6-fenoxybenzóico
22		ácido 2-(2-mercaptopropil)-6-fenilaminobenzoico
23		ácido 2-(2-mercaptopropil)-6-(feniltio)benzóico
24		ácido 5'-(1,1-dimetiletil)-3-(2-mercaptopropil)-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico
25		ácido 2-bromo-5-(2-mercaptometil)benzóico
26		ácido 4-(mercaptometil)-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico
27		ácido 5-(2-mercaptometil)-2-(fenilmethoxi)benzóico

Composto Nº	Estrutura	Nome
28		ácido 4-bromo-3-(2-mercaptopropyl)benzóico
30		ácido 3-(2-mercaptopropyl)benzóico
32		ácido 2-[(4-chlorophenyl)methoxy]-6-(2-mercaptopropyl)benzóico
33		ácido 2-(biphenyl-2-ylmethoxy)-6-(2-mercaptopropyl)benzóico
34		ácido 2-[(3-bromo-5-carboxyphenyl)methoxy]-6-(2-mercaptopropyl)benzóico

Composto Nº	Estrutura	Nome
35		ácido 2-[(2-bromo-5-carboxyfenil)metoxi]-6-(2-mercaptopropyl)benzoico
36		ácido 2-(2-mercaptopropyl)-6-[(4-methoxyphenyl)metoxi]benzoico
37		ácido 2-(2-mercaptopropyl)-6-[(4-methylphenyl)metoxi]benzoico
38		ácido 2-[(4-bromo-3-carboxyphenyl)metoxi]-6-(2-mercaptopropyl)benzoico

Composto Nº	Estrutura	Nome
39		ácido 2-[(2-carboxi-5-metoxifenil)metoxi]-6-(2-mercptoethyl)benzóico
40		ácido 2-(3-carboxibenziloxi)-6-(2-mercptoethyl)benzóico
41		ácido 2-(4-bromobenziloxi)-6-(2-mercptoethyl)benzóico
42		ácido 2-(4-tert-butylbenziloxi)-6-(2-mercptoethyl)benzóico
43		ácido 2-(3-bromobenziloxi)-6-(2-mercptoethyl)benzóico

Composto Nº	Estrutura	Nome
44		ácido 2-(2-mercaptopropil)-6-metoxibenzóico
45		ácido 2-benzidriloxy-6-(2-mercaptopropil)benzoico
46		ácido 2-(3-clorobenziloxi)-6-(2-mercaptopropil)benzoico
47		ácido 3-(2-mercaptopropil)bifenil-2-carboxílico
48		ácido 2-carboximetil-6-(2-mercaptopropil)benzoico

Os compostos da invenção possuem um ou mais centro(s) de carbono(s) assimétrico(s) e, assim, podem 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 bem conhecidos na área, por exemplo, por formação de sais diastereoisoméricos por tratamento com um ácido ou base

opticamente activo e depois separação da mistura de diastereoisómeros por cristalização, seguida de libertação das bases opticamente activas a partir destes sais. Exemplos de ácidos úteis incluem os ácidos tartárico, diacetiltartárico, dibenzoiltartárico, ditoluiltartárico e canforsulfónico.

Um processo diferente para a separação de isómeros ópticos envolve a utilização de uma coluna de cromatografia quiral escolhida de forma óptima para maximizar a separação dos enantiómeros. Ainda outro método disponível envolve a síntese de moléculas diastereoisoméricas covalentes, por exemplo, ésteres, amidas, acetais, cetais e afins, fazendo reagir compostos utilizados nos métodos inventivos e composições farmacêuticas 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, como cromatografia, destilação, cristalização ou sublimação, e depois podem ser hidrolisados para dar origem ao composto enantiomericamente puro. Nalguns casos é desnecessária a hidrólise para formar o fármaco paterno opticamente activo antes de se administrar a dosagem ao paciente, pois o composto pode comportar-se como um pró-fármaco. Os compostos opticamente activos da presente invenção podem ser igualmente obtidos utilizando materiais de partida opticamente activos.

Entende-se que os compostos da invenção abrangem isómeros ópticos, bem como misturas racémicas e não racémicas.

MÉTODOS DA INVENÇÃO

MÉTODOS DE INIBIÇÃO DA ACTIVIDADE DA ENZIMA NAALADase

A presente invenção refere-se a um método para inibir a actividade da enzima NAALADase num animal ou num mamífero, que compreende administrar ao referido animal ou mamífero uma quantidade eficaz de um composto da invenção, como definido acima.

MÉTODOS DE TRATAMENTO DE ANORMALIDADES DO GLUTAMATO

A presente invenção também se refere a um método para tratar uma anormalidade do glutamato num animal ou num mamífero, que compreende administrar ao referido animal ou mamífero uma quantidade eficaz de um composto da invenção, como definido acima.

Anormalidades do glutamato a serem tratadas podem incluir perturbação compulsiva, acidente vascular cerebral, doença desmielinizante, esquizofrenia, doença de Parkinson, ALS, neuropatia diabética, dor, ansiedade, perturbação de ansiedade, enfraquecimento da memória e glaucoma. Preferivelmente, a perturbação compulsiva é dependência de álcool, nicotina ou cocaína.

Os pacientes com acidente vascular cerebral experimentam muitas vezes um retardamento temporal significativo entre o início da isquemia e a iniciação da terapia. Assim, são necessários neuroprotectores com uma janela terapêutica de oportunidade longa. É esperado que os compostos da invenção tenham uma janela terapêutica de oportunidade de pelo menos 1 hora. Em conformidade, quando a anormalidade do glutamato é acidente vascular cerebral, o composto da invenção pode ser administrado ao referido animal ou mamífero durante um período até 60 minutos, 120

minutos ou mais após o início do acidente vascular cerebral.

Sem pretender ficar restringido a qualquer mecanismo de acção particular, é esperado que compostos preferidos da presente invenção sejam aqueles que bloqueiam a libertação do glutamato de forma pré-sináptica sem interagir com receptores do glutamato pós-sinápticos. Esses compostos não terão toxicidades comportamentais associadas a antagonistas do glutamato pós-sinápticos.

MÉTODOS PARA REALIZAR ACTIVIDADES NEURONAIAS

A presente invenção também se refere a um método para realizar uma actividade neuronal num animal ou num mamífero, que compreende administrar ao referido animal ou mamífero uma quantidade eficaz de um composto da invenção, como definido acima.

A actividade neuronal que é realizada pelo método inventivo pode ser estimulação de neurónios danificados, promoção da regeneração neuronal, prevenção da neurodegenerescência ou tratamento de uma perturbação neurológica.

Preferivelmente, a actividade neuronal é tratamento de uma perturbação neurológica que é dor, neuropatia, lesão cerebral traumática, danos físicos na espinal-medula, acidente vascular cerebral associado a danos cerebrais, uma doença desmielinizante ou uma perturbação neurológica relacionada com neurodegenerescência.

Exemplos de perturbações neurológicas aptas a serem tratadas pelos métodos da presente invenção incluem, sem

limitação: neuralgia trigeminal; neuralgia glossofaríngea; Paralisia de Bell; miastenia grave; distrofia muscular; ALS; atrofia muscular progressiva; atrofia muscular bulbar progressiva hereditária; síndromas de discos invertebrados com hérnias, rupturas ou prolapsos; espondilose cervical; perturbações do plexo; síndromas de destruição do desfiladeiro torácico; neuropatias periféricas, como as causadas por chumbo, dapsona, tiques, porfiria ou síndroma de Guillain-Barré; neuropatia diabética; dor; doença de Alzheimer, e doença de Parkinson.

O método inventivo é particularmente útil para tratar uma perturbação neurológica seleccionada do grupo que consiste em neuropatia periférica causada por lesão física ou estado de doença, neuropatia diabética, neuropatias induzidas pelo HIV, agentes químicos e vitaminas, dor, lesão cerebral traumática, danos físicos na espinal-medula, acidente vascular cerebral associado a danos cerebrais, doença desmielinizante e perturbação neurológica relacionada com neurodegenerescência.

Quando a perturbação neurológica é dor, o composto da invenção é preferivelmente administrado em combinação com uma quantidade eficaz de morfina.

O método inventivo é particularmente útil para tratar dor neuropática, por exemplo, dor neuropática induzida pelo HIV, agentes químicos e vitaminas.

Exemplos de perturbações neurológicas relacionadas com neurodegenerescência incluem doença de Alzheimer, doença de Parkinson e ALS.

MÉTODOS DE TRATAMENTO DE DOENÇAS DA PRÓSTATA

A presente invenção também se refere a um método para tratar uma doença da próstata num animal ou num mamífero, que compreende administrar ao referido animal ou mamífero uma quantidade eficaz de um composto da invenção, como definido acima. Uma doença da próstata preferida é cancro da próstata.

MÉTODOS DE TRATAMENTO DE CANCROS

A presente invenção também se refere a um método para tratar cancro num animal ou num mamífero, que compreende administrar ao referido animal ou mamífero uma quantidade eficaz de um composto da invenção, como definido acima.

Cancros preferidos a serem tratados são aqueles em tecidos onde reside a NAALADase, incluindo, sem limitação, o cérebro, rim e testículos.

MÉTODOS DE INIBIÇÃO DA ANGIOGÉNESE

A presente invenção também se refere a um método para inibir a angiogénesse num animal ou num mamífero, que compreende administrar ao referido animal ou mamífero uma quantidade eficaz de um composto da invenção, como definido acima.

A angiogénesse pode ser necessária para a fertilidade ou metástases de tumores cancerígenos, ou pode estar relacionada com uma doença dependente da angiogénesse. Assim, os métodos inventivos também podem ser úteis para tratar uma doença dependente da angiogénesse, incluindo, sem limitação, artrite reumatóide, doenças cardíacas, doenças neovasculares do olho, perturbações vasculares

periféricas, úlceras dermatológicas e crescimento, invasão ou metástases de tumor cancerígeno.

MÉTODOS PARA REALIZAR ACTIVIDADE DO TGF-β

A presente invenção também se refere a um método para realizar uma actividade do TGF-β num animal ou num mamífero, que compreende administrar ao referido animal ou mamífero uma quantidade eficaz de um composto da invenção, como definido acima.

Realizar uma actividade do TGF-β inclui aumentar, reduzir ou regular níveis do TGF-β e tratar anormalidades associadas ao TGF-β. Exemplos de anormalidades associadas ao TGF-β a serem tratadas incluem perturbações neurodegenerativas, perturbações da formação da matriz extracelular, doenças relacionadas com o crescimento celular, doenças infecciosas, doenças relacionadas com o sistema imunológico, formação de escaras de tecido epitelial, doenças vasculares associadas ao colagénio, perturbações fibroproliferativas, perturbações do tecido conjuntivo, inflamação, doenças inflamatórias, síndroma da dificuldade respiratória, infertilidade e diabetes.

Perturbações neurodegenerativas típicas a serem tratadas incluem danos em tecido neural resultantes de lesão de isquemia reperfusão, mielinização e neurodegenerescência.

Perturbações típicas relacionadas com o crescimento celular a serem tratadas incluem as que afectam células renais, células hematopoiéticas, linfócitos, células epiteliais e células endoteliais.

Doenças infecciosas típicas a serem tratadas incluem as causadas por um patogêne macrófago, particularmente um patogêne macrófago seleccionado do grupo que consiste em bactérias, leveduras, fungos, vírus, protozoários, *Trypanosoma cruzi*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Salmonella*, *Pneumocystis*, *Toxoplasma*, *Listeria*, *Mycobacteria*, *Rickettsia* e *Leishmania*. Micobactérias incluem, sem limitação, *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*. *Toxoplasma* inclui, sem limitação, *Toxoplasma gondii*. *Rickettsia* inclui, sem limitação, *R. prowazekii*, *R. coronii* e *R. tsutsugamushi*.

Outros exemplos de doenças infecciosas a serem tratadas incluem lesões cutâneas isoladas ou múltiplas, doença das mucosas, doença de Chagas, síndrome da imunodeficiência adquirida ("SIDA"), toxoplasmose, leishmaníase, tripanossomíase, schistossomíase, criptosporidiose, infecções por *Mycobacterium avium*, pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* e lepra.

Doenças típicas relacionadas com o sistema imunológico a serem tratadas incluem perturbações autoimunes; função imunológica enfraquecida, e imunossupressão associada a uma doença infecciosa, particularmente infecção por tripanossomas, infecção viral, vírus da imunossupressão humana, vírus linfotrópico de células T humano ("HTLV-1"), vírus da coriomeningite linfocítica ou hepatite.

Doenças vasculares típicas associadas ao colagénio a serem tratadas incluem esclerose sistémica progressiva ("PSS"), polimiosite, escleroderma, dermatomiosite, fascite eosinofílica, morfeia, síndrome de Raynaud, fibrose

pulmonar intersticial, escleroderma e lúpus eritematoso sistémico.

Perturbações fibroproliferativas típicas a serem tratadas incluem nefropatia diabética, doença renal, vitreorretinopatia proliferativa, cirrose do fígado, fibrose biliar e mielofibrose. Doenças renais especialmente preferidas incluem glomerulonefrite proliferativa mesangial, glomerulonefrite crescêntica, neuropatia diabética, fibrose intersticial renal, fibrose renal em pacientes transplantados que recebem ciclosporina e nefropatia associada ao HIV.

Perturbações típicas do tecido conjuntivo a serem tratadas incluem escleroderma, mielofibrose e fibrose hepática, intra-ocular e pulmonar.

Doenças inflamatórias típicas a serem tratadas estão associadas a PSS, polimiosite, escleroderma, dermatomiosite, fascite eosinofílica, morfeia, síndroma de Raynaud, fibrose pulmonar intersticial, escleroderma, lúpus eritematoso sistémico, nefropatia diabética, doença renal, vitreorretinopatia proliferativa, cirrose do fígado, fibrose biliar, mielofibrose, glomerulonefrite proliferativa mesangial, glomerulonefrite crescêntica, neuropatia diabética, fibrose intersticial renal, fibrose renal em pacientes transplantados que recebem ciclosporina ou nefropatia associada ao HIV.

Sem pretender ficar limitado a qualquer mecanismo de acção particular, compostos preferidos da presente invenção tratam doenças inflamatórias regulando o TGF- β e/ou inibindo a mieloperoxidase.

Outras aplicações associadas às propriedades reguladoras do TGF- β dos compostos inventivos incluem:

- estimulação do crescimento de tecidos, glândulas ou órgãos, particularmente do crescimento que irá aumentar a produção de leite ou ganho de peso;
- estimulação da proliferação celular, particularmente proliferação de fibroblastos, células mesenquimais ou células epiteliais;
- inibição do crescimento celular, particularmente de células epiteliais, células endoteliais, linfócitos T e B e timócitos;
- inibição da expressão de tecido adiposo, músculo-esquelético e fenótipos hematopoiéticos, neoplasmas, infecção viral não citocida ou outras infecções patogénicas e perturbações autoimunes;
- mediação da resistência e susceptibilidade a doenças;
- supressão da resposta imunológica celular;
- inibição da formação de tecido cicatricial, preferivelmente na pele ou outro tecido epitelial que tenha sido danificado por feridas resultantes de lesão accidental, operações cirúrgicas, lacerações induzidas por traumatismo ou outros traumatismos, ou feridas envolvendo o peritoneu para as quais a formação excessiva de tecido conjuntivo consiste em adesões abdominais;
- aumento da eficácia de uma vacina, particularmente uma vacina para uma alergia, por exemplo, a pó ou febre dos fenos, e
- inibição da formação de pólipos.

MÉTODOS DE TRATAMENTO DE UMA PERTURBAÇÃO RETINIANA

A presente invenção também se refere a um método para tratar uma perturbação retiniana, que compreende administrar uma quantidade eficaz de um inibidor da NAALADase a um animal necessitado desse tratamento.

MÉTODOS E ESTOJOS DE DIAGNÓSTICO

Os compostos da presente invenção são úteis para métodos de diagnóstico *in vitro* e *in vivo* com a finalidade de detectar doenças, perturbações e estados nos quais os níveis da NAALADase estão alterados, incluindo, sem limitação, perturbações neurológicas, anormalidades do glutamato, neuropatia, dor, perturbações compulsivas, doenças da próstata, cancros, anormalidades do TGF- β e glaucoma.

Em conformidade, a presente invenção também se refere a um método para detectar uma doença, perturbação ou estado no qual os níveis da NAALADase estão alterados, que compreende:

- (i) contactar uma amostra de tecido ou fluido corporal com um composto da invenção, como definido acima, em que o referido composto se liga a qualquer NAALADase presente na referida amostra, e
- (ii) medir a quantidade de qualquer NAALADase ligada à referida amostra, em que a quantidade de NAALADase é um diagnóstico da referida doença, perturbação ou estado.

Exemplos de tecidos e fluidos corporais incluem, sem limitação, tecido da próstata, fluido ejaculado, fluido da vesícula seminal, fluido prostático, urina, sangue, saliva, lágrimas, suor, linfa e expectoração.

O composto pode ser etiquetado com um marcador utilizando técnicas conhecidas na área. Marcadores úteis incluem, sem limitação, marcadores enzimáticos e reagentes de imagiologia. Exemplos de reagentes de imagiologia incluem etiquetas radioactivas, como ^{131}I , ^{111}In , ^{123}I , ^{99}Tc , ^{32}P , ^{125}I , ^{3}H e ^{14}C ; etiquetas fluorescentes, como fluoresceína e rodamina, e compostos quimioluminescentes, como luciferina.

A quantidade de NAALADase pode ser medida utilizando técnicas conhecidas na área, incluindo, sem limitação, ensaios (tais como ensaios imunométricos, calorimétricos, densitométricos, espectrográficos e cromatográficos) e técnicas de imagiologia (tais como espectroscopia de ressonância magnética ("MRS"), imagiologia de ressonância magnética ("MRI"), tomografia computorizada por emissão de um único fotão ("SPECT") e tomografia por emissão de positrões ("PET")).

A presente invenção também se refere a um estojo de diagnóstico para detectar uma doença, perturbação ou estado no qual os níveis da NAALADase estão alterados. O estojo de diagnóstico inclui um composto da invenção, como definido acima, etiquetado com um marcador. O estojo de diagnóstico também pode incluir agentes de tamponamento, agentes para reduzir a interferência de fundo, reagentes de controlo e/ou aparelhos para conduzir o teste.

A presente invenção também se refere a um método para detectar uma doença, perturbação ou estado no qual os níveis da NAALADase estão alterados num animal ou num mamífero, que compreende:

- (i) etiquetar um composto da invenção, como definido acima, com um reagente de imagiologia;
- (ii) administrar ao referido animal ou mamífero uma quantidade eficaz do composto etiquetado;
- (iii) permitir que o referido composto etiquetado localize e se ligue à NAALADase presente no referido animal ou mamífero, e
- (iv) medir a quantidade de NAALADase ligada ao referido composto etiquetado, em que a quantidade de NAALADase é um diagnóstico da referida doença, perturbação ou estado.

A quantidade de NAALADase pode ser medida *in vivo* utilizando técnicas conhecidas de imagiologia, como descrito acima.

COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS DA INVENÇÃO

A presente invenção também se refere a uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz de um composto da invenção, ou um equivalente farmaceuticamente aceitável, e um transportador farmaceuticamente aceitável.

Preferivelmente, o composto da invenção está presente numa quantidade eficaz para inibir a actividade da enzima NAALADase ou angiogénesis, realizar uma actividade neuronal ou actividade do TGF- β , ou tratar uma anormalidade do glutamato, neuropatia, dor, doença da próstata ou cancro num animal ou num mamífero.

VIA DE ADMINISTRAÇÃO

Nos métodos inventivos, os compostos serão geralmente administrados a um paciente na forma de uma formulação farmacêutica. Essa formulação inclui preferivelmente, para

além do agente activo, um transportador e/ou diluente fisiologicamente aceitável. Os compostos podem ser administrados localmente ou sistemicamente por quaisquer meios conhecidos do profissional. Por exemplo, os compostos podem ser administrados oralmente, parentericamente, por pulverização para inalação, topicalmente, rectalmente, nasalmente, bucalmente, vaginalmente ou via um reservatório implantado em formulações de dosagem contendo transportadores, adjuvantes e veículos convencionais, não tóxicos e farmaceuticamente aceitáveis. O termo parentérico, tal como é aqui utilizado, inclui injecção subcutânea, intravenosa, intra-arterial, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intra-esterno, intracraniana ou intra-óssea e técnicas de infusão. O protocolo exacto de administração irá variar dependendo de vários factores, incluindo a idade, peso do corpo, estado geral de saúde, sexo e dieta do paciente; a determinação de procedimentos de administração específicos será rotineira para um profissional.

Para serem terapeuticamente eficazes como alvos do sistema nervoso central, os compostos devem penetrar rapidamente na barreira hematoencefálica quando são administrados perifericamente. Os compostos que não conseguem penetrar na barreira hematoencefálica podem ser administrados eficazmente por uma via intraventricular ou por outros métodos reconhecidos na área. Ver, por exemplo, Patentes U.S. N°s 5,846,565, 5,651,986 e 5,626,862.

DOSAGEM

Os compostos e composições da presente invenção podem ser administrados na forma de uma única dose, múltiplas doses discretas ou infusão contínua. Os compostos são bem

adequados a infusão contínua. Para a infusão contínua é preferível a utilização de meios de bombas, particularmente meios de bombas subcutâneas.

Níveis de doses da ordem de cerca de 0,001 até cerca de 100 000 mg/kg do composto ingrediente activo são úteis no tratamento dos estados acima, em que níveis preferidos são cerca de 0,1 até cerca de 1 000 mg/kg e níveis mais preferidos são cerca de 1 até cerca de 100 mg/kg. O nível da dose específica para qualquer paciente particular irá variar dependendo de uma variedade de factores, incluindo a actividade e a possível toxicidade do composto específico empregue; a idade, peso do corpo, estado geral de saúde, sexo e dieta do paciente; a altura da administração; a taxa de excreção; combinação de fármacos; a gravidade da doença particular a ser tratada, e a forma da administração. Tipicamente, resultados de dosagem-efeito *in vitro* proporcionam directrizes úteis quanto às doses apropriadas para administração a pacientes. Estudos em modelos animais também são úteis. As considerações para determinar os níveis de doses apropriadas são bem conhecidas na área.

REGIME DE ADMINISTRAÇÃO

Para os métodos da presente invenção, qualquer regime de administração bem conhecido do profissional para regular a altura e sequência da distribuição de fármaco pode ser utilizado e repetido consoante o necessário para se obter o tratamento. Esse regime pode incluir pré-tratamento e/ou co-administração com agentes terapêuticos adicionais.

CO-ADMINISTRAÇÃO COM OUTROS TRATAMENTOS

Os compostos e composições da presente invenção podem ser utilizados isoladamente ou em combinação com um ou mais

agente(s) adicional(adicionais) para aplicação simultânea, separada ou sequencial.

O(s) agente(s) adicional(adicionais) pode(m) ser qualquer(quaisquer) agente(s) terapêutico(s) conhecido(s) do profissional, incluindo, sem limitação: um ou mais composto(s) da invenção; esteróides, por exemplo, hidrocortisonas, como metilprednisolona; fármacos anti-inflamatórios ou anti-imunológicos, como metotrexato, azatioprina, ciclofosfamida ou ciclosporina A; interferão- β ; anticorpos, como anticorpos anti-CD4; agentes que podem reduzir o risco de um segundo acontecimento isquémico, como ticlopidina; agentes quimioterapêuticos; composições imunoterapêuticas; radioossensibilizadores electromagnéticos, e morfina.

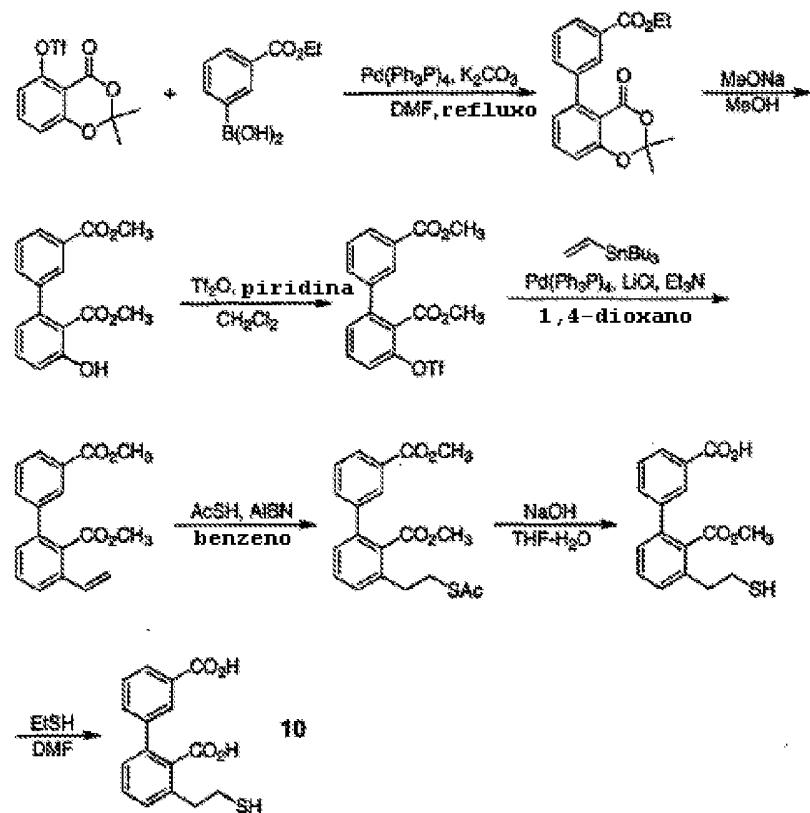
Os compostos da presente invenção podem ser co-administrados com um ou mais agentes terapêuticos, quer (i) juntamente numa única formulação ou (ii) separadamente em formulações individuais concebidas para se obterem taxas óptimas de libertação do respectivo agente activo. Cada formulação pode conter desde cerca de 0,01% até cerca de 99,99% por peso, preferivelmente desde cerca de 3,5% até cerca de 60% por peso, de um composto da presente invenção, bem como um ou mais excipientes farmacêuticos, como agentes humedecedores, emulsionantes e de tamponamento do pH.

PREPARAÇÃO DOS COMPOSTOS

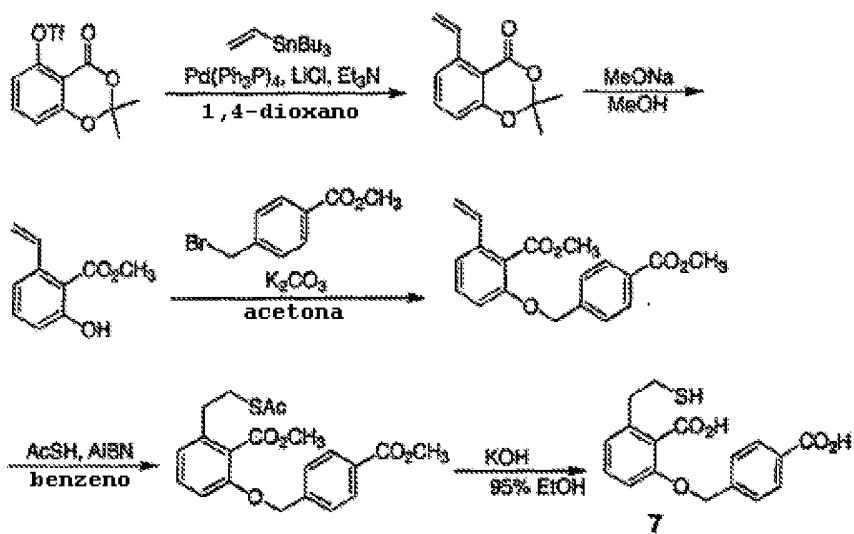
Os compostos da presente invenção podem ser facilmente preparados por técnicas comuns de química orgânica utilizando as vias de síntese gerais ilustradas abaixo nos Esquemas I, II, III e IV. Os compostos precursores estão

comercialmente disponíveis ou podem ser preparados por métodos conhecidos do profissional.

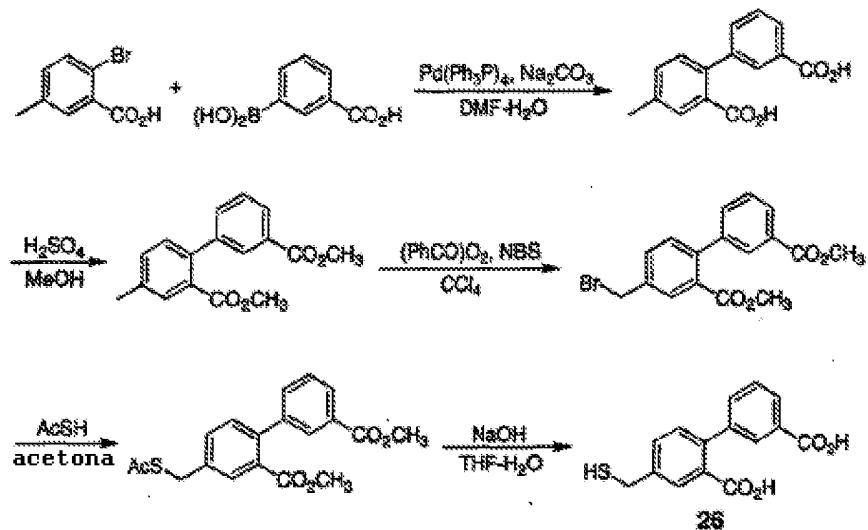
ESQUEMA I



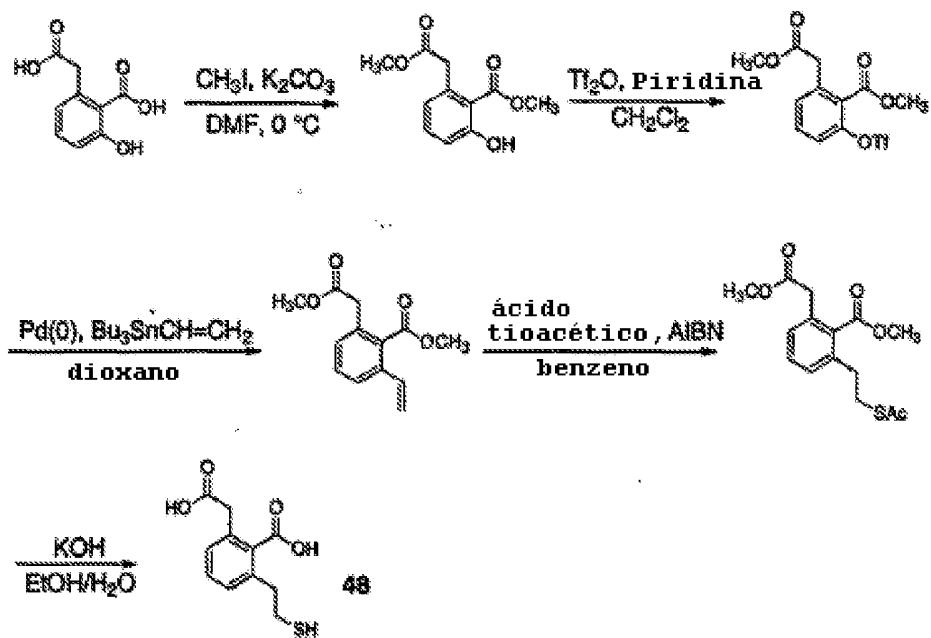
ESQUEMA II



ESQUEMA III



ESQUEMA IV



EXEMPLOS

Os exemplos seguintes são ilustrativos da presente invenção e não se pretende que lhe imponham limitações. A menos que indicado em contrário, todas as percentagens são baseadas em 100% por peso da composição final.

EXEMPLO 1**Procedimento Para A Síntese Do Ácido 3-(2-Mercaptoetil)-[1,1'-Bifenil]-2,3'-Dicarboxílico (10) (Esquema I)****Éster de etilo do ácido 3-(2,2-dimetil-4-oxo-4H-1,3-benzodioxino-5-il)benzóico**

A uma solução de 2,2-dimetil-5-trifluorometano-sulfoniloxi-4H-1,3-benzodioxino-4-ona (2,0 g, 5,8 mmol), ácido 3-eticarbonilfenilborónico (1,34 g, 6,9 mmol) e K_2CO_3 anidro em pó (2,61 g, 18,9 mmol) em DMF (30 mL) adicionou-se tetraquis(trifenilfosfina)paládio (0,202 g, 0,175 mmol). Aqueceu-se a mistura no refluxo durante 2 horas. Deixou-se a mistura reaccionar arrefecer para a temperatura ambiente ("t.a.") e adicionou-se HCl 1 N (25 mL). Extraiu-se a mistura com EtOAc (3 X 25 mL). Os extractos combinados foram lavados com água e solução salina, depois foram secos em $MgSO_4$, foram filtrados e concentrados. O material bruto foi purificado por cromatografia "flash" (EtOAc/hexanos 1:15), dando origem ao éster de etilo do ácido 3-(2,2-dimetil-4-oxo-4H-1,3-benzodioxino-5-il)benzóico (1,2 g, 63%) na forma de um sólido branco: 1H NMR ($CDCl_3$) δ 1,39 (t, J = 7,1 Hz, 3H), 1,80 (s, 6H), 4,39 (q, J = 7,0 Hz, 2H), 7,01 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,47-7,57 (m, 3H), 8,00 (t, J = 1,5 Hz, 1H), 8,07 (dt, J = 7,5, 1,5 Hz, 1H).

Éster de dimetilo do ácido 3-hidroxi-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico

A uma solução de éster de etilo do ácido 3-(2,2-dimetil-4-oxo-4H-1,3-benzodioxino-5-il)benzóico (1,4 g, 4,3 mmol) em metanol (10 mL) adicionou-se metóxido de sódio (0,5 M em metanol, 25 mL) a 0°C. Agitou-se a solução à t.a.

durante 15 minutos. A reacção foi rapidamente arrefecida por adição de HCl 1 N (30 mL) e foi extraída com EtOAc (3 X 30 mL). Os extractos orgânicos combinados foram secos em MgSO₄ e concentrados, dando origem ao éster de dimetilo do ácido 3-hidroxi-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico (1,2 g, 95%) na forma de um sólido amarelo: ¹H NMR (CDCl₃) δ 3,43 (s, 3H), 3,93 (s, 3H), 6,79 (dd, *J* = 7,5, 0,9 Hz, 1H), 7,04 (dd, *J* = 7,5, 0,9 Hz, 1H), 7,43 (m, 3H), 7,93 (m, 1H), 8,02 (dm, *J* = 7,0 Hz, 1H), 10,8 (s, 1H).

Éster de dimetilo do ácido 3-trifluorometanossulfoniloxi-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico

A uma solução de éster de dimetilo do ácido 3-hidroxi-1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico (1,1 g, 3,8 mmol) em diclorometano (15 mL) adicionaram-se piridina (1,00 mL, 12,3 mmol) e anidrido trifluorometanossulfónico (0,90 mL, 5,4 mmol) a 0°C. Agitou-se a solução a 0°C durante 2 horas. Adicionou-se HCl 1 N aquoso (20 mL) e extraiu-se a mistura com diclorometano (3 X 20 mL). Os extractos orgânicos combinados foram lavados com água e solução salina, foram secos em MgSO₄, filtrados e concentrados, dando origem ao éster de dimetilo do ácido 3-trifluorometanossulfoniloxi-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico (1,4 g, 87%) na forma de um sólido amarelo: ¹H NMR (CDCl₃) δ 3,72 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 7,38-7,62 (m, 5H), 8,08 (m, 2H).

Éster de dimetilo do ácido 3-etenil-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico

Uma mistura de éster de dimetilo do ácido 3-trifluorometanossulfoniloxi-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico (1,3 g, 3,1 mmol), tetraquis(trifenilfosfina)paládio (0,36 g, 0,31 mmol), LiCl (0,94 g, 22,2 mmol), trietilamina (0,6 mL, 4,3 mmol) e tri-n-butil(vinil)estanho (1,0 mL, 3,4 mmol) em

1,4-dioxano (30 mL) foi aquecida no refluxo sob N₂ durante 4 horas. Após arrefecimento para a t.a., a mistura foi filtrada num tampão de sílica gel e o filtrado foi concentrado. Purificação por cromatografia "flash" (EtOAc/hexanos 1:10) deu origem ao éster de dimetilo do ácido 3-etenil-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico (0,91 g, 99%) na forma de um sólido branco: ¹H NMR (CDCl₃) δ 3,61 (s, 3H), 3,92 (s, 3H), 5,40 (d, *J* = 11,1 Hz, 1H), 5,79 (d, *J* = 17,5 Hz, 1H), 6,87 (dd, *J* = 17,4, 11,0 Hz, 1H), 7,31 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,44-7,49 (m, 2H), 7,56 (dm, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,62 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 8,03 (dm, *J* = 7,5 Hz, 1H), 8,08 (t, 1, *J* = 1,5 Hz, 1H).

Éster de dimetilo do ácido 3-[2-(acetiltio)etil]-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico

A uma solução de éster de dimetilo do ácido 3-etenil-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico (0,85 g, 2,9 mmol) em benzeno (10 mL) adicionou-se ácido tioacético (2,1 mL, 29,4 mmol) seguido de AIBN (0,053 g, 0,32 mmol). A solução foi desoxigenada durante 30 minutos fazendo borbulhar azoto na solução e depois foi aquecida no refluxo durante 4 horas. Adicionou-se à solução NaHCO₃ aquoso saturado (20 mL) e extraiu-se a mistura com EtOAc (2 X 20 mL). Os extractos orgânicos combinados foram lavados com água e solução salina, foram secos em MgSO₄, filtrados e concentrados. O resíduo foi purificado por cromatografia "flash" (EtOAc/hexanos 1:12), dando origem ao éster de dimetilo do ácido 3-[2-(acetiltio)etil]-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico (0,51 g, 48%) na forma de um sólido quase branco: ¹H NMR (CDCl₃) δ 2,35 (s, 3H), 2,93 (m, 2H), 3,14 (m, 2H), 3,62 (s, 3H), 3,93 (s, 3H), 7,29 (dd, *J* = 7,6, 0,9 Hz, 1H), 7,35 (dd, *J* = 7,5, 0,8 Hz, 1H), 7,44 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,48

(d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,55 (dt, $J = 8,0, 1,5$ Hz, 1H), 8,03 (dt, $J = 7,9, 1,5$ Hz, 1H), 8,07 (t, $J = 1,5$ Hz, 1H).

Éster de 2-metilo do ácido 3-(2-mercaptopoetil)-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico

A uma solução desoxigenada de éster de dimetilo do ácido 3-[2-(acetiltio)etil]-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico (0,50 g, 1,34 mmol) em THF (3,5 mL) adicionou-se uma solução desoxigenada de NaOH (0,38 g, 9,4 mmol) em água (3,5 mL). Agitou-se a mistura durante a noite e adicionou-se HCl 1 N (20 mL). Extraiu-se a mistura com EtOAc (3 X 20 mL). Os extractos orgânicos combinados foram lavados com água e solução salina, foram secos em $MgSO_4$, filtrados e concentrados, dando origem ao éster de 2-metilo do ácido 3-(2-mercaptopoetil)-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico (0,35 g, 83%) na forma de um sólido quase branco: 1H NMR ($CDCl_3$) δ 1,46 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 2,83 (m, 2H), 3,00 (m, 2H), 3,60 (s, 3H), 7,33-7,31 (m, 2H), 7,46 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H), 7,52 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H), 7,61 (dm, $J = 7,9$ Hz, 1H), 8,10 (dm, $J = 7,9$ Hz, 1H), 8,14 (m, 1H).

Ácido 3-(2-mercaptopoetil)-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico (10)

A uma suspensão desoxigenada de etanotiolato de sódio (0,135 g, 1,60 mmol) em DMF (0,5 mL) adicionou-se uma solução de éster de 2-metilo do ácido 3-(2-mercaptopoetil)-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico (0,10 g, 0,32 mmol) em DMF (0,5 mL). Fez-se borbulhar árgon na mistura durante 10 minutos. Aqueceu-se a reacção a 100°C durante 1 hora e a 200°C durante outra hora. Depois da mistura ter arrefecido para a t.a., a reacção foi rapidamente arrefecida com HCl 1 N (20 mL) e foi extraída com EtOAc (3 X 20 mL). Os extractos orgânicos combinados foram lavados com água e

solução salina, foram secos em $MgSO_4$, filtrados e concentrados, dando origem ao ácido 3-(2-mercaptopoetil)-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico (0,055 g, 57%) na forma de um sólido branco: 1H NMR ($CDCl_3$) δ 1,51 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 2,87-2,93 (m, 2H), 3,12-3,08 (m, 2H), 7,37 (m, 2H), 7,57-7,47 (m, 2H), 7,70 (dm, J = 7,9 Hz, 1H), 7,98 (dm, J = 7,8 Hz, 1H), 8,30 (m, 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 26,2, 38,8, 128,1, 129,3, 129,7, 129,8, 129,9 (2C), 130,5, 133,3, 134,4, 137,7, 139,1, 141,2, 172,3, 176,9. Análise Calculada para $C_{16}H_{14}O_4S$: C, 63,56; H, 4,67; S, 10,61. Experimental: C, 63,65; H, 4,88; S, 10,33.

EXEMPLO 2

Procedimento Para A Síntese Do Ácido 2-[(4-Carboxifenil)Metoxi]-6-(2-Mercaptopoetil)Benzóico (7) (Esquema II)

5-Etenil-2,2-dimetil-4H-1,3-benzodioxino-4-ona

Uma mistura de 2,2-dimetil-5-trifluorometanossulfonil-oxi-4H-1,3-benzodioxino-4-ona (9,90 g, 30,3 mmol), tributil (vinil)estanho (10,10 g, 31,9 mmol), cloreto de lítio (8,70 g, 205 mmol) e trietilamina (5,0 mL, 36,0 mmol) em 1,4-dioxano (300 mL) foi desoxigenada fazendo borbulhar azoto na mistura durante 1 hora. Adicionou-se à mistura tetraquis (trifenilfosfina)paládio (3,40 g, 2,90 mmol) e aqueceu-se a mistura a 100°C for 3 horas. Deixou-se a mistura arrefecer para a t.a. e depois foi filtrada. O filtrado foi concentrado e purificado por cromatografia "flash" (1:12, EtOAc/hexanos), dando origem a 5-etenil-2,2-dimetil-4H-1,3-benzodioxino-4-ona (5,00 g, 81%) na forma de um óleo amarelo: 1H NMR: ($CDCl_3$) δ 1,72 (s, 6H), 5,43 (dd, J = 11,0, 1,3 Hz, 1H), 5,72 (dd, J = 17,5, 1,3 Hz, 1H), 6,89

(d, $\mathcal{J} = 8,0$ Hz, 1H), 7,27 (d, $\mathcal{J} = 8,0$ Hz, 1H), 7,47 (t, $\mathcal{J} = 8,0$ Hz, 1H), 7,73 (dd, $\mathcal{J} = 17,5, 11,0$ Hz, 1H).

Éster de metilo do ácido 2-etenil-6-hidroxibenzóico

A 5-etenil-2,2-dimetil-4H-1,3-benzodioxino-4-ona (4,01 g, 19,6 mmol) adicionou-se metóxido de sódio 0,5 M em metanol (85 mL, 42,5 mmol) à t.a. Passados 15 minutos adicionou-se à solução HCl 1 N aquoso (100 mL). Extraiu-se a solução turva com éter (2 X 100 mL). Os extractos orgânicos combinados foram lavados com H_2O (50 mL) e solução salina (50 mL), foram secos em Na_2SO_4 , filtrados e concentrados, dando origem ao éster de metilo do ácido 2-etenil-6-hidroxibenzóico (2,0 g, 57%) na forma de um óleo amarelo. Este material foi utilizado no passo seguinte sem purificação suplementar: ^1H NMR (CDCl_3) δ 3,96 (s, 3H), 5,26 (dd, $\mathcal{J} = 10,8, 1,5$ Hz, 1H), 5,49 (dd, $\mathcal{J} = 17,3, 1,5$ Hz, 1H), 6,95 (m, 2H), 7,23-7,39 (m, 2H), 11,12 (s, 1H).

Éster de metilo do ácido 2-etenil-6-[4-(metoxicarbonil)fenil]metoxibenzóico

A uma solução agitada do material acima (0,500 g, 2,8 mmol) em acetona (10 mL) adicionaram-se K_2CO_3 (1,50 g, 10,9 mmol) e 4-(bromometil)benzoato de metilo (0,71 g, 3,10 mmol) à t.a. A mistura foi agitada sob azoto durante 3 horas e foi filtrada. O filtrado foi concentrado e o resíduo foi purificado por cromatografia "flash" ($\text{EtOAc}/\text{hexanos}$ 1:10), dando origem ao éster de metilo do ácido 2-etenil-6-[4-(metoxicarbonil)fenil]metoxibenzóico (0,73 g, 80%) na forma de um sólido branco: ^1H NMR (CDCl_3) δ 3,92 (s, 6H), 5,17 (s, 2H), 5,37 (dd, $\mathcal{J} = 11,1, 1,0$ Hz, 1H), 5,78 (dd, $\mathcal{J} = 17,6, 0,9$ Hz, 1H), 6,70 (dd, 1, $\mathcal{J} = 17,4, 11,1$ Hz, 1H), 6,83 (d, $\mathcal{J} = 7,8$ Hz, 1H), 7,20 (d, $\mathcal{J} = 8,0$

Hz, 1H) 7,29 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 7,46 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 8,04 (d, J = 8,3 Hz, 2H).

Éster de metilo do ácido 2-[2-(acetiltio)etil]-6-[4-(metoxicarbonil)fenil]metoxibenzóico

A uma solução de éster de metilo do ácido 2-etenil-6-[4-(metoxicarbonil)fenil]metoxibenzóico (0,71 g, 2,18 mmol) em benzeno (10 mL) adicionou-se ácido tioacético (1,80 mL, 25,2 mmol) seguido de AIBN (37 mg, 0,23 mmol). Depois de se ter feito borbulhar azoto na solução durante 30 minutos, aqueceu-se a solução no refluxo durante 4 horas. Deixou-se a reacção arrefecer para a t.a. e adicionou-se NaHCO_3 saturado (20 mL). Extraiu-se a mistura com EtOAc (3 X 20 mL). Os extractos orgânicos combinados foram lavados com água e solução salina, foram secos em MgSO_4 , filtrados e concentrados *in vacuo*. O resíduo foi purificado por cromatografia "flash" (EtOAc/hexanos 1:10), dando origem ao éster de metilo do ácido 2-[2-(acetiltio)etil]-6-[4-(metoxicarbonil)fenil]metoxibenzóico (0,50 g, 60%) na forma de um óleo límpido:

^1H NMR (CDCl_3) δ 2,34 (s, 3H), 2,85-2,82 (m, 2H), 3,07-3,10 (m, 2H), 3,92 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 5,16 (s, 2H), 6,81 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 6,92 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,28 (t, J = 8,2 Hz, 1H), 7,46 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 8,04 (d, J = 8,3 Hz, 2H).

Ácido 2-[(4-carboxifenil)metoxi]-6-(2-mercaptopetil)benzóico (7)

A uma solução desoxigenada de éster de metilo do ácido 2-[2-(acetiltio)etil]-6-[4-(metoxicarbonil)fenil]metoxibenzoico (0,20 g, 0,50 mmol) em EtOH 95% (3 mL) adicionou-se uma solução desoxigenada de KOH (0,463 g, 8,3 mmol) em EtOH 95% (3 mL) sob azoto. A solução foi aquecida no

refluxo durante a noite e foi rapidamente arrefecida por adição de HCl 1 N (20 mL). A mistura foi extraída com EtOAc (3 X 20 mL) e os extractos orgânicos combinados foram lavados com água e solução salina, depois foram secos em MgSO₄, filtrados e concentrados. Purificação por cromatografia "flash" (diclorometano/hexanos 1:1 com ácido acético 1%) deu origem ao ácido 2-[(4-carboxifenil)metoxi]-6-(2-mercaptopetyl)benzóico (0,077 g, 46%) na forma de um sólido branco: ¹H NMR (CD₃OD) δ 2,75 (m, 2H), 2,92 (m, 2H), 5,22 (s, 2H), 6,93 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 6,98 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,30 (t, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,55 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 8,02 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H); ¹³C NMR (CD₃OD) δ 26,5, 39,8, 71,1, 112,4, 123,9, 126,9, 128,3, 131,3, 131,7, 131,8, 139,9, 144,2, 156,7, 170,0, 172,3. Análise Calculada para C₁₇H₁₆O₅S: C, 61,43; H, 4,85; S, 9,65. Experimental: C, 61,16; H, 4,95; S, 9,44.

EXEMPLO 3

Procedimento Para A Síntese Do Ácido 4-Mercaptometil-[1,1'-Bifenil]-2,3'-Dicarboxílico (26) (Esquema III)

Ácido 4-metil-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico

A uma solução de ácido 2-bromo-5-metilbenzóico (5,00 g, 23,3 mmol) em DME (100 mL) adicionaram-se ácido 3-carboxifenilborónico (3,86 g; 23,3 mmol), uma solução de Na₂CO₃ (9,90 g, 93 mmol) em H₂O e tetraquis(trifenilfosfina) paládio. Agitou-se a mistura a 90°C durante 4 dias. Deixou-se a mistura arrefecer para a t.a., foi diluída com EtOAc (50 mL) e lavada com uma solução saturada de NaHCO₃. A camada aquosa foi separada, foi acidificada com HCl 10% e extraída com EtOAc (3 X 20 mL). Os extractos combinados foram secos em MgSO₄ e concentrados. O material em bruto foi purificado por cromatografia em coluna (hexanos/EtOAc

9:1 ácido acético 1%), dando origem ao ácido 4-metil-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico (2,20 g, 37%) na forma de um sólido: ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 2,40 (s, 3H), 7,30 (m, 1H), 7,42 (m, 1H), 7,52-7,57 (m, 2H), 7,60 (s, 1H), 7,85 (s, 1H), 7,91-7,92 (m, 1H).

Éster de dimetilo do ácido 4-metil-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico

A uma solução de ácido 4-metil-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico (2,20 g, 8,6 mmol) em metanol (150 mL) adicionou-se H_2SO_4 concentrado (1,6 mL) e aqueceu-se a mistura no refluxo durante a noite. Removeu-se o solvente sob pressão reduzida e o resíduo foi submetido a partição entre solução aquosa saturada de NaHCO_3 e EtOAc (20 mL). A camada orgânica foi seca em MgSO_4 e foi concentrada, dando origem ao éster de dimetilo do ácido 4-metil-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico (2,26 g, 92%) na forma de um material em bruto. Utilizou-se este produto na reacção seguinte sem purificação suplementar: ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 2,41 (s, 3H), 3,58 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 7,36-7,38 (m, 1H), 7,47-7,48 (m, 1H), 7,56-7,58 (m, 2H), 7,62 (s, 1H), 7,82 (s, 1H), 7,94-7,96 (m, 1H).

Éster de dimetilo do ácido 4-bromometil-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico

A uma solução de éster de dimetilo do ácido 4-metil-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico (2,26 g, 7,9 mmol) em CCl_4 (50 mL) adicionaram-se peróxido de benzoílo (0,010 g, 0,04 mmol) e NBS (1,42 g, 8,0 mmol) e a mistura refluiu durante 3 dias. Deixou-se a mistura reaccional arrefecer para a t.a., foi filtrada e concentrada. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (hexanos/EtOAc 95:5 até 90:10), dando origem ao éster de dimetilo do ácido 4-

bromometil-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico (1,71 g, 60%):
¹H NMR (DMSO-d₆) δ 3,61 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 4,84 (s, 2H), 7,48-7,50 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,59-7,60 (m, 2H), 7,72-7,75 (m, 1H), 7,85 (s, 1H), 7,90 (m, 1H), 7,97-7,99 (m, 1H).

Éster de dimetilo do ácido 4-acetiltiometil-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico

A uma solução de éster de dimetilo do ácido 4-bromometil-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico (1,59 g, 4,4 mmol) em acetona (75 mL) adicionou-se tioacetato de potássio (0,60 g, 5,3 mmol) e a mistura refluuiu durante 1 hora. Deixou-se a mistura arrefecer para a t.a., foi filtrada e concentrada. O produto residual foi purificado por cromatografia em coluna (hexanos/EtOAc, 9/1), dando origem ao éster de dimetilo do ácido 4-acetiltiometil-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico (1,21 g, 76%): ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 2,39 (s, 3H), 3,60 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 4,23 (s, 2H), 7,42-7,44 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,57-7,60 (m, 3H), 7,74 (s 1H), 7,83 (s, 1H), 7,96-7,99 (m, 1H).

Ácido 4-mercaptometil-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico (26)

A uma solução de éster de dimetilo do ácido 4-acetiltiometil-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico (0,27 g, 0,75 mmol) em THF desoxigenado adicionou-se uma solução desgaseificada de hidróxido de sódio (0,12 g, 3,0 mmol) em H₂O (5 mL) à t.a. Após 24 horas, adicionou-se à mistura reaccional solução adicional de hidróxido de sódio (0,09 g) em H₂O (2 mL) e agitou-se a mistura durante 24 horas. A mistura foi acidificada com HCl 10% e foi extraída com EtOAc. O extracto foi seco em MgSO₄ e foi concentrado. O material em bruto foi purificado por cromatografia em

coluna com (9:1 diclorometano/EtOAc com ácido acético 1%), dando origem ao ácido 4-mercaptometil-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico (0,20 g, 92%) na forma de um sólido branco: ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 3,10 (t, J = 8,03 Hz, 1H), 3,89 (d, J = 8,03 Hz, 2H), 7,43 (d, J = 7,53 Hz, 1H), 7,58-7,65 (m, 3H), 7,83 (d, J = 2,01 Hz, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,97-8,00 (m, 1H). Análise Calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4\text{S} \cdot 0,5\text{AcOH}$: C, 60,37; H, 4,43; O, 25,13; S, 10,07. Experimental: C, 60,28; H, 4,45; S, 10,15.

EXEMPLO 4

Procedimento Para A Síntese Do Ácido 2-Carboximetil-6-(2-Mercaptoetil)Benzóico (48) (Esquema IV)

Éster de metilo do ácido 2-hidroxi-6-metoxicarbonilmetilbenzóico

A uma solução de ácido 2-carboximetil-6-hidroxi-benzóico (5,021 g, 25,6 mmol) em DMF (100 mL) a 0°C adicionaram-se K_2CO_3 (3,567 g, 25,9 mmol) e CH_3I (7,9 mL, 51,9 mmol). Após agitação sob azoto a 0°C durante 4 horas, a reacção foi submetida a partição entre H_2O (100 mL) e éter (150 mL). A camada aquosa foi acidificada com HCl 1 N e foi extraída com EtOAc (200 mL). A camada de EtOAc foi seca em MgSO_4 e concentrada *in vacuo*, dando origem ao composto em bruto éster de metilo do ácido 2-hidroxi-6-metoxicarbonilmetilbenzóico na forma de um óleo incolor (3,2 g, 56%): ^1H NMR (CDCl_3) δ 3,69 (s, 3H), 3,89 (s, 5H), 6,72 (d, J = 6,7 Hz, 1H), 6,96 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,33-7,38 (m, 1H).

Éster de metilo do ácido 2-metoxicarbonilmetil-6-trifluorometanossulfoniloxibenzóico

A uma solução de éster de metilo do ácido 2-hidroxi-6-metoxicarbonilmethylbenzóico (2,51 g, 11,2 mmol) em CH_2Cl_2 (50 mL) a 0°C adicionaram-se anidrido triflico (3,0 mL, 17,8 mmol) e piridina (2,40 mL, 29,7 mmol). Deixou-se a solução aquecer para a t.a. durante a noite e foi concentrada *in vacuo*. O resíduo foi diluído com EtOAc (100 mL) e foi lavado com HCl 1 N (25 mL), NaHCO_3 aquoso saturado (25 mL), H_2O (25 mL) e solução salina (25 mL). A camada orgânica foi seca em MgSO_4 e foi concentrada. O resíduo foi purificado por cromatografia "flash" (10% EtOAc/hexanos), dando origem ao éster de metilo do ácido 2-metoxicarbonilmethyl-6-trifluorometanossulfoniloxibenzóico na forma de um óleo (3,5 g, 90%): ^1H NMR (CDCl_3) δ 3,86 (s, 3H), 4,06 (s, 2H), 4,10 (s, 3H), 7,4 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,50 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,67 (t, $J = 8,2$ Hz, 1H).

Éster de metilo do ácido 2-metoxicarbonilmethyl-6-vinilbenzóico

Uma mistura de éster de metilo do ácido 2-metoxicarbonilmethyl-6-trifluorometanossulfoniloxibenzóico (2,705 g, 7,6 mmol), LiCl (2,355 g, 55,6 mmol), NEt_3 (1,5 mL, 10,8 mmol), $\text{Pd}[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3]_4$ (1,09 g, 0,94 mmol) e tributil(vinil)estanho (2,85 mL, 9,75 mmol) em dioxano (50 mL) foi aquecida no refluxo. Passadas 3 horas deixou-se a reacção arrefecer para a t.a., tendo sido filtrada numa almofada de sílica gel e concentrada. O produto em bruto foi purificado por cromatografia "flash" em SiO_2 (13% EtOAc/hexanos), dando origem ao éster de metilo do ácido 2-metoxicarbonilmethyl-6-vinilbenzóico na forma de um sólido amarelo (1,50 g, 84%): ^1H NMR (CDCl_3) δ 3,67 (s, 3H), 3,89 (s, 5H), 5,32 (d, $J = 10,9$ Hz, 1H), 5,68 (d, $J = 17,4$ Hz, 1H), 6,82 (dd, $J = 17,4, 10,9$ Hz, 1H), 7,20 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 7,36 (m, 1H), 7,50 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H).

Éster de metilo do ácido 2-(2-acetilsulfaniletil)-6-metoxicarbonilmethylbenzóico

Fez-se borbulhar azoto numa solução de éster de metilo do ácido 2-metoxicarbonilmethyl-6-vinilbenzóico (1,31 g, 5,60 mmol), ácido tioacético (4,00 mL, 56,0 mmol) e AIBN (0,184 g, 1,10 mmol) em benzeno (30 mL) durante 3 horas à t.a., para remover oxigénio. Aqueceu-se a mistura no refluxo durante 3 horas. Deixou-se a solução arrefecer para a t.a. e adicionou-se NaHCO_3 aquoso saturado (100 mL). Extraiu-se a mistura com EtOAc (100 mL); a camada orgânica foi lavada com H_2O (100 mL) e solução salina (100 mL), depois foi seca em MgSO_4 e concentrada *in vacuo*. Cromatografia "flash" em SiO_2 (10% EtOAc/hexanos) deu origem ao éster de metilo do ácido 2-(2-acetilsulfaniletil)-6-metoxicarbonilmethylbenzóico na forma de um sólido amarelo (0,555 g, 33%): ^1H NMR (CDCl_3): δ 2,40 (s, 3H), 2,94-2,99 (m, 2H), 3,13-3,18 (m, 2H), 3,75 (s, 3H), 3,78 (s, 2H), 3,99 (s, 3H), 7,25 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,32 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,42 (t, J = 7,6 Hz, 1H).

Ácido 2-carboximetil-6-(2-mercaptopoetil)benzóico (48)

Uma mistura desoxigenada de éster de metilo do ácido 2-(2-acetilsulfaniletil)-6-metoxicarbonilmethylbenzóico (0,555 g, 1,77 mmol) e KOH 6 N (3 mL) em EtOH (7 mL) foi aquecida no refluxo durante 18 horas. Depois de deixada arrefecer para a t.a., a mistura foi submetida a partição entre HCl 1 N (75 mL) e EtOAc (100 mL). A camada orgânica foi lavada com H_2O (100 mL) e solução salina (100 mL), foi seca em MgSO_4 e concentrada *in vacuo*. O produto em bruto foi dissolvido em éter (100 mL), foi filtrado para remover algum material sólido não identificado e foi concentrado, dando origem ao ácido 2-carboximetil-6-(2-mercaptopoetil)benzóico na forma de um sólido branco (0,310 g, 73%): ^1H

NMR (CDCl₃) δ 1,37 (t, *J* = 8,2 Hz, 1H), 2,76 (m, 2H), 3,06 (m, 2H), 3,90 (s, 2H), 7,10 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,21 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H), 7,34 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H): ¹³C NMR (CDCl₃) δ 27,25, 40,43, 41,83, 131,58, 131,64, 132,45, 132,55, 134,66, 141,41, 176,14, 179,40. Análise Calculada para C₁₁H₁₂O₄S: C, 54,99; H, 5,03; S, 13,35. Experimental: C, 55,20; H, 5,26; S, 13,32.

EXEMPLO 5A

Inibição In Vitro da Actividade da NAALADase

Testaram-se vários compostos da invenção quanto à inibição *in vitro* da actividade da NAALADase; os resultados estão apresentados abaixo na Tabela II.

TABELA II

Composto Nº	IC ₅₀
1	613
2	9170
3	71,5
4	380
5	215
6	84,5
7	89,8
8	11,5
9	28,8
10	84,8
11	188
12	2580
13	266
14	160
15	23,7
16	4,28
17	7
18	10,5
19	2,65
20	18
21	1150
26	24,3
27	85
28	3200
30	3780
32	25
33	95

Composto Nº	IC ₅₀
34	0,9
35	1,2
36	100
37	70
38	0,8
39	40
40	1
41	1250
42	300
43	104
44	954
45	35200
46	12200
47	75400
48	43

Protocolo para Avaliar a Inibição In Vitro da Actividade da NAALADase

Combinaram-se os seguintes em tubos de ensaio: 100 μ L de CoCl_2 10 mM, 250 μ L de Tris cloreto 200 mM, 100 μ L de tecido, 100 μ L de inibidor da NAALADase 10 mM em H_2O Bakers e H_2O Bakers para perfazer um volume total de 950 μ L. Em seguida, cada tubo de ensaio foi incubado durante 10 minutos num banho de água a 37°C. Depois adicionaram-se a cada tubo de ensaio 50 μ L de 3-H-NAAG, tendo sido incubados durante mais 15 minutos num banho de água a 37°C. Terminou-se o ensaio adicionando 1,0 mL de fosfato de sódio 0,1 M.

O glutamato libertado pela acção da enzima NAALADase foi separado da solução de ensaio utilizando uma resina de permuta aniónica. A resina foi equilibrada para 25°C, adicionaram-se 2,0 mL da resina a uma pipeta Pasteur pré-carregada com uma única esférula de vidro e cada coluna foi lavada duas vezes com H_2O destilada. Colocou-se uma coluna sobre um frasco de cintilação e carregou-se a coluna com 200 μ L de uma amostra de ensaio. Após a drenagem, o glutamato eluiu utilizando duas lavagens de 1,0 mL de ácido fórmico 1 M. Após a adição de 10 mL de "cocktail" de

cintilações, cada amostra foi contada durante 2 minutos num contador de cintilações.

EXEMPLO 5B

Ensaio In Vitro em Isquemia

Para examinar o efeito *in vitro* dos compostos da invenção em isquemia, culturas de células corticais foram tratadas com vários compostos da invenção durante um insulto isquémico utilizando cianeto de potássio e 2-desoxiglucose, e seguidamente durante uma hora. Para uma descrição do método experimental utilizado ver Vornov *et al.*, *J. Neurochem.*, Volume 65, Nº 4, páginas 1681-1691 (1995). Os resultados estão apresentados na Tabela III abaixo. O efeito neuroprotector está expresso em EC₅₀, a concentração do composto que é necessária para causar uma redução de 50% da toxicidade do glutamato após um insulto isquémico.

TABELA III

Composto Nº	EC ₅₀
1	846
3	10000
4	9600
6	84
7	96
8	29
9	19
25	2000
26	151
27	728
30	619

EXEMPLO 6

Efeito da Inibição da NAALADase no TGF-β num Modelo de Isquemia In Vitro

Adicionou-se Composto C a culturas de células com isquemia para determinar o seu efeito nos níveis de TGF-β

durante acidente vascular cerebral. Os dados experimentais, apresentados nas FIGs. 1 e 2, mostram concentrações aumentadas de TGF- β 1 (FIG. 1) e TGF- β 2 (FIG. 2) em culturas de células isquémicas tratadas com o Composto C. os resultados indicam que a inibição da NAALADase promove a libertação de TGF- β endógeno a partir de células gliais, o que por sua vez confere neuroprotecção a neurónios vizinhos.

Seguidamente adicionaram-se anticorpos neutralizadores do TGF- β às culturas de células isquémicas. A FIG. 3 mostra que os anticorpos neutralizadores do TGF- β bloquearam o efeito neuroprotector do Composto C no modelo de isquemia *in vitro*. Em contraste, a FIG. 4 mostra que a adição de um anticorpo para outro factor de crescimento, anticorpo para o FGF, não bloqueou o efeito neuroprotector do Composto C. Os resultados indicam que a inibição da NAALADase afecta especificamente os níveis do TGF- β durante acidente vascular cerebral.

EXEMPLO 7

Efeito da Inibição da NAALADase no TGF- β num Modelo de Isquemia In Vivo

O efeito de anticorpos neutralizadores do TGF- β no efeito neuroprotector do Composto C também foi estudado em ratos após MCAO. A FIG. 6 mostra que o tratamento de ratos com MCAO com Composto C causou um aumento significativo dos níveis de TGF- β 1 durante a oclusão e reperfusão, avaliado por microdiálise. Os resultados indicam que a inibição da NAALADase confere neuroprotecção, pelo menos em parte, por regulação do TGF- β endógeno.

Adicionalmente, a FIG. 5 mostra que anticorpos neutralizadores do TGF- β attenuaram significativamente o efeito neuroprotector do Composto C *in vivo*. O profissional pode apreciar que a regulação de TGF- β por inibidores da NAALADase pode ter implicações não só em acidente vascular cerebral, mas também noutras doenças, perturbações e estados, incluindo, sem limitação, doenças neurológicas, doenças psiquiátricas, doenças desmielinizantes, cancro da próstata, inflamação, diabetes e angiogénesse.

EXEMPLO 8

Ensaio In Vivo de Inibidores da NAALADase em Dor Neuropática no Modelo de STZ

Ratos Sprague-Dawley machos (200 - 225 g) tornaram-se diabéticos por administração intravenosa de estreptozotocina ("STZ", 70 mg/kg em solução salina tamponada com fosfato). Os animais diabéticos foram divididos em cinco grupos. Um grupo recebeu Composto A (10 mg/kg ou 1 mg/kg), Composto D (10 mg/kg ou 1 mg/kg) ou veículo. Outro grupo de animais (não tratados com STZ) serviu de controlo não diabético. O tratamento com fármaco/veículo foi iniciado em animais diabéticos aos 45 dias pós-administração de STZ. Testaram-se os ratos diabéticos devido a STZ quanto à sensibilidade a uma fonte de calor assim que os níveis de glucose subiram para 320 mg/dL ou superiores (30 dias pós-STZ). Em seguida, os ratos foram aclimatados a um aparato de Hargreaves e monitorizou-se a nocicepção térmica utilizando uma fonte de calor de infravermelhos dirigida para a superfície dorsal da pata traseira, e o tempo que o animal demorou a remover a sua pata foi registado com a precisão de 0,1 segundos (ver Hargreaves *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1988) 263(36): 19392-7 para uma descrição do método experimental). Ajustou-se a

intensidade da fonte do feixe de modo que a latência média para animais de controlo (não tratados com STZ) fosse aproximadamente 10 segundos. Cada animal foi testado 8 vezes, e a pontuação das diferenças médias (entre latência média de controlo de não diabético e latência média de diabético) está representada graficamente nas FIGs. 7A e 7B. Os ratos diabéticos exibiram uma hiperalgésia (menor latência da resposta) em comparação com controlos não diabéticos, começando aos 30 dias pós-tratamento com STZ e piorando progressivamente em ratos tratados com veículo. Esta resposta hiperalgésica foi completamente revertida em ratos diabéticos que receberam tratamento com Composto D ou A (10 mg/kg i.p. por dia). Assim, os resultados mostram que a inibição da NAALADase atenua dor neuropática.

EXEMPLO 9

Ensaio In Vivo de Inibidores da NAALADase em Dor Neuropática no Modelo CCI

Efectuou-se em ratos ligação do nervo ciático, que consiste em 4 ligaduras presas de forma frouxa em redor do nervo ciático em intervalos de 1 mm próximo da trifurcação do nervo. Após a ligação do nervo ciático, os ratos exibiram uma hiperalgésia térmica e alodinia. Os ratos foram habituados a um aparato de Hargreaves. Uma fonte de calor de infravermelhos foi dirigida para a superfície dorsal de cada uma das patas traseiras dos ratos e registrou-se o tempo que o rato demorou a remover as suas patas. Determinou-se a diferença das pontuações entre a latência da resposta para a pata no lado operado *versus* a pata no lado não operado de controlo.

Composto C

Os ratos receberam Composto C (50 mg/kg i.p. por dia) ou um veículo começando aos 10 dias pós-cirurgia. O tratamento com o Composto C normalizou dramaticamente as pontuações de diferença entre as duas patas, em comparação com os controlos tratados com veículo que continuaram hiperalgésicos. Ratos normais (não operados) exibiram latências aproximadamente iguais para ambas as patas. Este efeito foi significativo começando aos 11 dias de tratamento com fármaco e persistiu até ao final do estudo (durante 21 dias de dosagem diária). As pontuações de diferença estão representadas graficamente na FIG. 8. Os resultados mostram que a inibição da NAALADase atenua hiperalgesia associada a CCI.

Composto 9

Os ratos foram tratados com Composto 9 (10, 1 ou 0,1 mg/kg) ou um veículo durante 15 dias após ligação do nervo ciático. Mediram-se as respostas de dor térmica nos dias 0, 1, 5, 8, 12 e 15. As diferenças das pontuações para os ratos tratados com um veículo e os ratos tratados com Composto 9 estão representadas graficamente na FIG. 13. Os resultados mostram que o tratamento com Composto 9 normalizou a diferença das pontuações entre as patas operadas e não operadas comparativamente aos ratos tratados com veículo que continuaram hiperalgésicos.

Composto 10

Os ratos foram tratados com Composto 10 (0,1 mg/kg) ou um veículo durante 18 dias após ligação do nervo ciático. Mediram-se as respostas de dor térmica nos dias 0, 1, 5, 12 e 18. As diferenças das pontuações para os ratos tratados com um veículo e os ratos tratados com Composto 10 estão representadas graficamente na FIG. 14. Os resultados

mostram que o tratamento com Composto 10 normalizou a diferença das pontuações entre as patas operadas e não operadas comparativamente aos ratos tratados com veículo que continuaram hiperalgésicos.

EXEMPLO 10

Ensaio In Vitro de Inibidores da NAALADase na Progressão de Dor Neuropática em Modelos BB/W

Ratos BB/W machos (BRI, Mass) desenvolvem espontaneamente uma destruição autoimune mediada por células de células B pancreáticas, o que origina o aparecimento de diabetes dependente de insulina (Tipo I) (Awata, Guberski, *Endocrinology* (1995) 136(12): 5731-5). Estes ratos foram caracterizados e foi mostrado que exibem neuropatias com deficiências neuronais concomitantes, como perda e degeneração de fibras, alterações que estão correlacionadas com as observadas no nervo periférico de pacientes humanos diabéticos (Yagihashi, *J. Peripher. Nerv. Syst.* (1997) 2(2): 113-32). Isto torna-os valiosos para ensaios experimentais de novos compostos para tratamentos futuros desta grande perturbação. No presente estudo examinaram-se o Composto A e Composto D quanto à sua capacidade para alterar a progressão de neuropatia diabética. Os ratos receberam uma injecção diária de Composto A ou Composto D (10 mg/kg i.p.) ou veículo, começando no surgimento de diabetes (hiperglicemia) e até aos 6 meses seguintes. Testou-se outro grupo de ratos não diabéticos que também receberam veículo. Todos os animais foram monitorizados continuamente quanto ao peso do corpo, volume de urina, açúcar no sangue e hemoglobina glicada. No primeiro mês do estudo, todos os animais foram testados quanto à nocicepção térmica num aparato de Hargreaves, semanalmente. Passado o primeiro mês, este procedimento foi

conduzido uma vez em cada duas semanas e depois mensalmente. O teste consiste em dirigir uma fonte de calor de infravermelhos para a superfície dorsal da pata traseira do rato e registar o tempo que o animal demora a remover a sua pata (ver Hargreaves *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1988) 263(36): 19392-7, para uma descrição do método experimental). Cada animal foi testado 8 vezes e registou-se a latência média da remoção.

Os resultados estão representados graficamente na FIG. 11. Os resultados mostram que ratos diabéticos exibiram uma hiperalgésia (menor latência da resposta) em comparação com controlos não diabéticos. Os ratos diabéticos tratados com fármaco (Composto A e Composto D) exibiram latências de remoção mais longas do que ratos diabéticos tratados com veículo, começando após 4 semanas de tratamento e persistindo ao longo dos seis meses de tratamento.

Também se mediu a velocidade da condução dos nervos de duas em duas semanas durante as primeiras oito semanas do tratamento e depois uma vez por mês ao longo dos seis meses de tratamento (ver De Koning *et al.*, *Peptides*, Volume 8, Nº 3, páginas 415-22 (1987), quanto a uma descrição do método experimental). Os resultados estão apresentados graficamente na FIG. 12. Os animais diabéticos exibiram geralmente uma redução da velocidade de condução dos nervos em comparação com controlos não diabéticos. No entanto, os animais diabéticos que receberam injeções diárias de inibidor da NAALADase (Composto A ou Composto D numa dose de 10 mg/kg) exibiram deficiências significativamente menores da condução dos nervos do que os controlos diabéticos que receberam tratamento com veículo. Isto foi claro começando às 8 semanas de tratamento e persistiu num

grau semelhante até ao ponto de terminação do estudo de seis meses. Por outro lado, os veículos diabéticos exibiram uma deterioração progressiva da velocidade de condução dos nervos desde as 6 até às 16 semanas após o início da administração do veículo, que se manteve durante seis meses.

EXEMPLO 11

Ensaio In Vivo de Inibidores da NAALADase em Neuropatia Diabética no Modelo de STZ

Também se mediu a velocidade da condução dos nervos motor e sensorial em animais diabéticos devido a STZ após 4, 8 e 12 semanas de tratamento (ver De Koning et al., *supra*, para uma descrição do método experimental). Em resumo, inseriram-se eléctrodos estimuladores de agulha próximo dos nervos ciático e tibial, com eléctrodos de registo tendo sido colocados subcutaneamente sobre os músculos das patas distais, em ratos anestesiados. Os resultados estão representados graficamente nas FIGs. 9A, 9B, 10A e 10B. Os animais diabéticos que receberam veículo exibiram uma redução significativa da condução dos nervos motor e sensorial em comparação com animais não diabéticos. O tratamento com 10 mg/kg de Composto A por dia durante 4, 8 e 12 semanas tendeu a melhorar (aumentar) as velocidades de condução dos nervos motor e sensorial, observando-se uma melhoria significativa após 12 semanas e 8 semanas para a velocidade de condução dos nervos motor e sensorial, respectivamente (FIGs. 9A e 9B). A dose mais baixa testada de Composto A (1 mg/kg) teve efeitos semelhantes. O tratamento de animais com Composto D a qualquer uma das doses também aumentou as velocidades de condução dos nervos motor e sensorial acima dos controlos diabéticos, significativamente após 12 semanas de tratamento para o

grupo de tratamento de 10 mg/kg (FIGs. 10A e 10B) e nos períodos de tempo iniciais após tratamento com a dose de 1 mg/kg. Assim, os resultados mostram que a inibição da NAALADase altera a progressão de neuropatia diabética.

EXEMPLO 11A

Ensaio In Vivo de Inibidores da NAALADase - Reversão de Neuropatia Diabética no Modelo de STZ

Método Geral do Modelo de STZ - Dosagem Retardada

Ratos (200 - 225 gramas) foram injectados com STZ (70 mg/kg) na veia da cauda. Confirmou-se a ocorrência de diabetes (> 350 mg/dL) em todos os ratos às 4 semanas após a administração de STZ. Os ratos não foram tratados até aos 35 - 49 dias após STZ. Administraram-se dosagens diárias *p.o.* de Composto D (1, 3 ou 10 mg/kg), Composto E (10 mg/kg) ou veículo após confirmação de hiperalgésia e/ou deficiências na velocidade de condução dos nervos. Em experiências separadas, o início do tratamento foi retardado até aos 60 até 90 dias após a administração de STZ. Mediu-se a velocidade de condução dos nervos ou resposta de remoção a estimulação térmica das patas traseiras em intervalos de tempo, habitualmente de duas em duas semanas para a resposta térmica e uma vez por mês para a velocidade de condução dos nervos.

Método Geral do Estudo de Ratinhos db/db

Obtiveram-se da Jackson Labs ratinhos espontaneamente diabéticos (ratinhos db/db) e ratinhos da mesma ninhada não diabéticos. Os ratinhos não foram tratados até aos 7-8 meses de idade (ou após 4-5 meses de diabetes crónica) e depois receberam doses diárias de composto F (1 mg/kg) *p.o.*

Mediu-se a velocidade da condução dos nervos antes do início e após oito semanas de tratamento.

Medições da velocidade de condução dos nervos

Avaliaram-se as velocidades de condução dos nervos sensorial e motor utilizando o método de De Koning e Gispert (*Peptides* 8: 415-422, 1987). Efectuou-se uma avaliação electrofisiológica num período de uma hora da dosagem. Os animais foram anestesiados com isoflurano e inseriram-se eléctrodos estimuladores de agulha perto do nervo ciático na chanfradura ciática e no nervo tibial perto do tornozelo. Colocaram-se eléctrodos de registo sobre os músculos das patas. Aplicaram-se estímulos e registaram-se as respostas. Calcularam-se velocidades de condução dos nervos motor e sensorial medindo a distância entre os sítios da chanfradura ciática e tornozelo e a latência entre a onda M e o reflexo H.

Hiperalgesia térmica

Os animais foram aclimatados ao aparato durante pelo menos 5 minutos. Colocou-se uma fonte de infravermelhos sob a superfície plantar da pata traseira do rato. Ajustou-se a intensidade da fonte de modo que a latência para ratos normais fosse cerca de 10 segundos. Testaram-se os animais quanto à latência da resposta térmica de acordo com o método de Hargreaves *et al.* (*Pain* 77-88, 1988). Cada animal foi testado 8 vezes (4 em cada membro traseiro) e a latência da resposta foi registada automaticamente com a precisão de 0,1 segundos. Calculou-se uma média das últimas 4 medições para cada pata (8 medições no total), que foi registada para cada rato.

A FIG. 22 mostra o efeito do tratamento com o inibidor da NAALADase (Composto D e Composto E) nas anormalidades de dor neuropática em ratos diabéticos devido a STZ. Todos os ratos exibiram hiperalgesia aparente, em comparação com os não diabéticos, antes do tratamento com o inibidor da NAALADase (5 semanas pós-STZ). No entanto, num período de duas semanas de tratamento, a hiperalgesia neuropática foi revertida para o normal em ambos os grupos tratados com um inibidor da NAALADase. Esta reversão persistiu ao longo da fase hipoalgésica subsequente habitualmente observada em ratos diabéticos devido a STZ prolongados, com uma fase hipoalgésica reduzida exibida em ratos tratados com NAALADase.

A FIG. 23 mostra as medições da velocidade de condução do nervo motor em ratos diabéticos devido a STZ e controlos não diabéticos antes e em determinados instantes após o tratamento com o inibidor da NAALADase. Num período de 8 semanas de dosagem, ambos os inibidores da NAALADase Composto D e Composto E reverteram a velocidade de condução do nervo motor para o normal (valores de não diabéticos). Este efeito persistiu ao longo de 12 semanas de tratamento.

A FIG. 24 ilustra deficiências na velocidade de condução do nervo sensorial, testado de modo semelhante. O tratamento com um inibidor da NAALADase reverteu de modo semelhante deficiências na velocidade de condução do nervo sensorial, de modo significativo depois de apenas 2 semanas de tratamento.

A FIG. 25 mostra anormalidades de dor neuropática noutra experiência onde se testaram doses menores (1 e 3 mg/kg) do inibidor da NAALADase Composto D iniciado após 7

semanas de tratamento com STZ. Mais uma vez foi clara uma redução significativa das anormalidades de dor com ambas as doses do Composto D.

As FIGs. 26 e 27 mostram a velocidade de condução dos nervos sensorial e motor, respectivamente, nestes ratos cronicamente diabéticos devido a STZ tratados com as doses mais baixas de Composto D. A condução do nervo sensorial foi significativamente melhorada para o normal num período de 4 semanas de tratamento, ao passo que a condução do nervo motor não melhorou com estas doses baixas, mesmo às 8 semanas após a dosagem.

As FIGs. 28 e 29 mostram medições da velocidade de condução dos nervos sensorial e motor geradas de um CRO externo num modelo de STZ cronicamente diabético semelhante, em que os ratos não foram tratados até aos 60 dias após o tratamento com STZ. O tratamento com o Composto D produziu novamente reversão parcial de ambas as deficiências. A FIG. 30 mostra o mesmo caso em que o tratamento foi ainda mais retardado, até aos 90 dias após STZ.

A FIG. 31 mostra as medições da velocidade de condução dos nervos num modelo de ratinho genético de diabetes aos 6-7 meses de idade (após cerca de 4 meses de diabetes crónica). Nesta altura foi claro um enfraquecimento significativo da NCV sensorial. A FIG. 32 mostra a velocidade de condução dos nervos nestes ratinhos após 8 semanas de tratamento com outro inibidor da NAALADase, mais potente, administrado a 1 mg/kg por dia. Após o tratamento com o fármaco foi clara uma melhoria significativa da condução do nervo sensorial.

EXEMPLO 12**Efeito de Inibidores da NAALADase no Surgimento de ALS**

Testou-se o efeito de inibidores da NAALADase no surgimento de ALS utilizando o modelo de ratinhos transgénicos de esclerose lateral amiotrófica familiar ("FALS"), que está pormenorizado em Gurney, M., *Annals of Neurology* (1996) 39: 147-157, e que é bem conhecido na área. Ratinhos G1H transgénicos com um mês de idade foram tratados com injecções intraperitoneais diárias de um veículo (solução salina tamponada com HEPES 50 mM) ou de um inibidor da NAALADase (50 mg/kg de Composto A). Os sintomas clínicos dos ratinhos foram monitorizados diariamente. O surgimento da doença clínica foi pontuado examinando cada rato quanto a tremuras dos membros quando suspensos no ar pela sua cauda, disseminação cruzada de reflexos espinais, paralisia dos membros traseiros, peso do corpo e actividade de corrida numa roda.

Os resultados, apresentados abaixo na Tabela IV, mostram que o surgimento da doença foi retardado em ratinhos tratados com um inibidor da NAALADase.

TABELA IV

<u>Efeito do Inibidor da NAALADase no Surgimento de Doença Clínica</u>			
ESTUDO	SURGIMENTO DA DOENÇA COMPOSTO A (dias)	SURGIMENTO DA DOENÇA VEÍCULO (dias)	DIFERENÇA
Estudo 1	221	189	32
Estudo 2	166	141	25

EXEMPLO 13**Efeito de Inibidores da NAALADase na Sobrevida e Sintomas Clínicos de ALS**

Testou-se o efeito de inibidores da NAALADase na sobrevivência e sintomas clínicos de ALS utilizando novamente o modelo de ratinhos transgénicos de FALS. Ratinhos G1H transgénicos com um mês de idade foram tratados diariamente com um veículo (solução salina tamponada com HEPES 50 mM) ou Composto B *p.o.* (por administração oral). Os sintomas clínicos dos ratinhos foram monitorizados duas vezes por semana. Esses sintomas incluíram tremuras dos membros, porte, arrastamento dos membros traseiros, cruzamento dos membros, reflexo de endireitamento e mortalidade. O porte e o cruzamento dos membros foram classificados segundo uma escala arbitrária que variou desde 0 até 3, em que 0 representa muito normal e 3 representa pouco normal, por exemplo, grandes dificuldades em andar ou cruzar os membros. Mediu-se o reflexo de endireitamento pelo tempo (segundos) que os ratinhos demoraram a endireitar-se quando deitados de lado numa superfície plana.

Os resultados, apresentados nas FIGs. 15-21, mostram que a sobrevivência foi prolongada e os sintomas clínicos foram atenuados em ratinhos tratados com um inibidor da NAALADase.

EXEMPLO 14

Efeito Protector de Inibidores da NAALADase em Glaucoma Experimental em Ratos

Protocolo Experimental

Todas as experiências estiveram de acordo com a Declaração para Uso de Animais em Investigação Oftálmica e da Visão ("Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research") da Association for Research in Vision

and Ophthalmology. Oitenta e duas ratazanas castanhas (*Rattus norvegicus*) machos, cada uma pesando aproximadamente 250 gramas, foram tratadas utilizando procedimentos aprovados pelo Animal Care Committee da School of Medicine da Johns Hopkins University. Os ratos foram alojados com um ciclo de 12 horas de luz/12 horas de escuridão e foram alimentados *ad libitum*.

GLAUCOMA EXPERIMENTAL. Em 56 ratos provocou-se aumento unilateral da pressão intra-ocular ("IOP") por microinjecção de solução salina hipertónica em veias episclerais, seguindo procedimentos descritos em Morrison, J. et al., IOVS (Março 1998) 39: 526-531. Começando no dia do aumento da IOP, os ratos foram tratados diariamente com injecções intraperitoneais de um veículo (23 ratos com solução salina tamponada com HEPES 50 mM) ou um inibidor da NAALADase (11 ratos com 10 mg/kg de Composto A e 22 ratos com 10 mg/kg de Composto B). Onze ratos tratados com solução salina, 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 o aumento inicial da IOP.

CORTE TRANSVERSAL DO NERVO ÓPTICO. O nervo óptico foi submetido a corte transversal unilateral em 26 ratos sob anestesia intraperitoneal com pentobarbital. A conjuntiva foi aberta com tesouras e o nervo óptico foi exposto por tracção sobre músculos extra-oculares. O corte transversal foi realizado com micro-tesouras a uma distância de 5 mm posterior ao globo ocular, com atenção específica para evitar lesionar os principais vasos sanguíneos oculares. Imediatamente após o corte transversal examinou-se a retina de forma oftalmoscópica para assegurar que o fornecimento

de sangue arterial retiniano não tinha sido interrompido. A conjuntiva foi fechada com uma sutura absorvível e fez-se um curativo no olho com unguento antibiótico. Começando no dia do corte transversal, os ratos foram tratados diariamente com injecções intraperitoneais de um veículo (9 ratos com solução salina tamponada com HEPES 50 mM) ou um inibidor da NAALADase (8 ratos com 10 mg/kg de Composto A e 9 ratos com 10 mg/kg de Composto B). Cinco ratos tratados com solução salina, 3 ratos tratados com Composto A e 4 ratos tratados com Composto B foram sacrificados às 2 semanas, e os restantes ratos às 4 semanas, após o corte transversal.

CONTAGEM DO NERVO ÓPTICO. Os ratos foram sacrificados por exsanguinação sob anestesia profunda com pentobarbital. Foram submetidos a perfusão, através do coração, com paraformaldeído 2%/glutaraldeído 2% em tampão de fosfato 0,1 M, pH 7,2, e removeram-se os olhos com os nervos ópticos acoplados. Removeu-se uma secção transversal do nervo óptico de olhos experimentais (glaucoma ou corte transversal) e de controlo a uma distância de 1,5 mm posterior ao globo ocular, com 1 mm de espessura, que foi pós-fixada em tetróxido de ósmio 2% em tampão. Estas foram processadas em resina epoxi, seccionadas a 1 micron e coradas com azul de toluidina.

Mediu-se a área da secção transversal do nervo óptico delineando a sua fronteira exterior, a uma ampliação de 10 x, num sistema de análise de imagens (Universal Imaging Corp., Westchester, PA) com uma câmara digital Synsys e "software" Metamorph. Registaram-se três medições da área e determinou-se o valor médio. Para medir as distribuições de densidade e diâmetro de fibras recolheram-se imagens com

uma objectiva de contraste de fase 100 x de 10 áreas diferentes de cada nervo. Estas foram editadas, para eliminar objectos não neurais, e calculou-se, para cada imagem e nervo, a dimensão de cada axónio no interior da bainha de mielina (o seu diâmetro mínimo) e a densidade de axónios/mm quadrados. A densidade média foi multiplicada pela área total do nervo, para originar o número de fibras para cada nervo. Comparou-se o número total de fibras em nervos de glaucoma ou corte transversal com o outro olho normal de cada rato, para originar um valor da perda percentual. O número de axónios contados entre as 10 imagens foi uma amostra de aproximadamente 20% dos 80 - 90 000 axónios em nervos de ratos normais. A pessoa que mediu o número de axónios foi cega para o protocolo conduzido nos nervos.

Resultados

GLAUCOMA EXPERIMENTAL. A diferença média percentual de fibras nos ratos de controlo tratados com solução salina foi significativamente mais baixa nos seus olhos com glaucoma em comparação com os seus olhos normais, com uma perda média de fibras de $14,44 \pm 5,75\%$ ($n = 11$ ratos; Tabela V) no grupo de pós-observação de 8 semanas, e $8,15 \pm 7,84\%$ no grupo de pós-observação de 12 semanas ($n = 12$ ratos; Tabela VI).

Em contraste, não ocorreu perda significativa de fibras nos ratos tratados com inibidor da NAALADase às 8 semanas ou 12 semanas. A perda média percentual de fibras em cada grupo tratado com inibidor da NAALADase foi estatisticamente inferior à perda nos grupos de controlo tratados com solução salina (às 8 semanas, $p = 0,05$ para o Composto A e $p = 0,02$ para o Composto B).

TABELA V

Resultados do Glaucoma Experimental				
GRUPO DE 8 SEMANAS	N	DIFERENÇA INTEGRAL IOP^a	NÚMERO DE FIBRAS	DIFERENÇA PERCENTUAL^b
Composto A	11	85 ± 37,5	79156 ± 2436*	-1,82 ± 2,92
Composto B	11	116 ± 33,2	80785 ± 2121**	-0,82 ± 2,97
Controlo	11	104 ± 26,4	68295 ± 4617	14,44 ± 5,75

^aDiferença Integral IOP = diferença da exposição da pressão intra-ocular (IOP) entre o olho com glaucoma e olho normal de cada rato (mm Hg - dias)

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

TABELA VI

Resultados do Glaucoma Experimental				
GRUPO DE 12 SEMANAS	N	DIFERENÇA INTEGRAL IOP^a	NÚMERO DE FIBRAS	DIFERENÇA PERCENTUAL^b
Composto B	11	109 ± 45,2	90504 ± 1718	-3,21 ± 2,86
Controlo	12	158 ± 66,5	79827 ± 6783	8,15 ± 7,84

^aDiferença Integral IOP = diferença da exposição da pressão intra-ocular (IOP) entre o olho com glaucoma e olho normal de cada rato (mm Hg - dias)

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

As diferenças da Diferença Integral IOP não são significativas ($p > 0,05$). As diferenças da Diferença Percentual entre os ratos tratados com fármaco e de controlo tratados com solução salina às 8 semanas pós-insulto são significativas ($p = 0,05^*$ e $p = 0,02^{**}$).

CORTE TRANSVERSAL DO NERVO ÓPTICO. Os dados experimentais do corte transversal sugerem um abrandamento

ou salvamento de morte final de RGC em ratos tratados com inibidores da NAALADase às 2 semanas após o corte transversal. Às 2 semanas após o corte transversal, ambos os grupos tratados com fármaco tinham mais axónios de RGC remanescentes do que o grupo de controlo tratado com solução salina, avaliado pelo número absoluto de fibras ou diferença percentual entre o olho submetido ao corte transversal e o olho normal de cada rato (Tabela VII). Os ratos tratados com Composto A e Composto B tinham, respectivamente, 3 vezes e duas vezes o número de axónios dos ratos tratados com solução salina. Todas ou quase todas as RGC morreram nos primeiros 2 meses após o corte transversal, independentemente de qualquer tratamento farmacológico. Assim, às 4 semanas após o corte transversal, mais de 80% dos axónios de RGCs tinham desaparecido em todos os grupos (Tabela VIII). Às 4 semanas após o corte transversal não se observaram diferenças significativas entre os ratos tratados com fármaco e os ratos tratados com solução salina.

TABELA VII

Corte Transversal do Nervo Óptico			
SOBREVIVÊNCIA DE 2 SEMANAS	N	NÚMERO DE FIBRAS	DIFERENÇA PERCENTUAL^a
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

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

TABELA VIII

<u>Corte Transversal do Nervo Óptico</u>			
SOBREVIVÊNCIA DE 4 SEMANAS	N	NÚMERO DE FIBRAS	DIFERENÇA PERCENTUAL^a
Composto A	5	13 599 ± 7 868	82,4 ± 8,9
Composto B	5	5 162 ± 5 017	93,4 ± 6,2
Controlo	4	10 449 ± 8 157	86,9 ± 10,6

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

As diferenças da Diferença Percentual entre ratos tratados com fármaco e de controlo tratados com solução salina não são estatisticamente significativas ($p = 0,05$).

EXEMPLO 15

Efeito Neuroprotector de Inibidores da NAALADase no Modelo de Ratinho Transgénico de Doença de Huntington

Teste Comportamental (Haste Rotativa ("Rotarod"))

Ratinhos transgénicos com HD da estirpe N171-82Q e ratinhos da mesma ninhada não transgénicos foram tratados com o inibidor da NAALADase Composto B (30 mg/kg) ou um veículo desde as 10 semanas de idade. Os ratinhos foram colocados numa haste rotativa ("rotarod"). Registou-se a extensão temporal em que o rato caiu da haste rotativa como medida da coordenação motora. A FIG. 33 mostra que ratinhos transgénicos com HD tratados com Composto B permaneceram mais tempo na haste rotativa do que ratinhos transgénicos com HD semelhantes tratados com um veículo. O tratamento com Composto B não teve nenhum efeito no desempenho na haste rotativa de ratinhos normais não HD.

Também se registou a distância total percorrida pelos ratinhos como medida da locomoção global. A FIG. 34 mostra que, enquanto os ratinhos com HD tratados com veículo exibiram a menor pontuação de locomoção, o tratamento com inibidor da NAALADase não teve nenhum efeito aparente na locomoção global.

Sobrevivência

Avaliaram-se os efeitos do Composto B e veículo na sobrevivência de ratinhos transgénicos com HD (N171-82Q). Treze ratinhos (seis machos e sete fêmeas) foram atribuídos ao grupo de tratamento com o Composto B, e catorze ratinhos (seis machos e oito fêmeas) foram atribuídos ao grupo de tratamento com veículo. Continuou-se o tratamento até todos os ratinhos terem morrido.

A FIG. 35 mostra as distribuições da sobrevivência ao longo do tempo por grupo de tratamento. O tempo mediano da sobrevivência é 184 dias para o grupo de tratamento com o Composto B e 158,5 dias para o grupo de tratamento com veículo. Apesar do grupo de tratamento com o Composto B ter exibido um tempo mediano da sobrevivência mais longo do que o grupo de tratamento com veículo, a diferença não é estatisticamente significativa (valor $p = 0,07$).

As FIGs. 36 e 37 mostram as distribuições de sobrevivência ao longo do tempo por grupo de tratamento e sexo. Quando se analisam os resultados específicos do sexo, os ratinhos fêmeas tratados com Composto B exibiram um tempo de sobrevivência significativamente prolongado (valor $p = 0,03$) em comparação com os seus correspondentes tratados com veículo. No grupo de tratamento com veículo, os machos exibiram melhores tempos de sobrevivência do que

as fêmeas, apesar de não se ter observado esta tendência no grupo de tratamento com o Composto B. os dados sugerem que o sexo poderá influenciar as distribuições de sobrevivência ao longo do tempo.

EXEMPLO 16

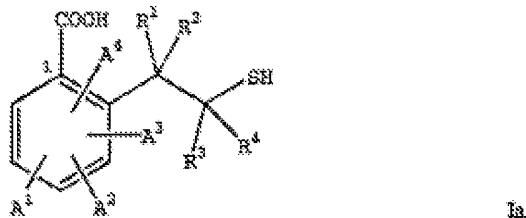
Um paciente sofre de qualquer doença, perturbação ou estado no qual os níveis da NAALADase estão alterados, incluindo qualquer uma das doenças, perturbações ou estados descritos acima. Pode então administrar-se ao paciente uma quantidade eficaz de um composto da invenção. É esperado que, após esse tratamento, o paciente não sofra qualquer lesão significativa devido à doença, perturbação ou estado, fique protegido de outras lesões devido à doença, perturbação ou estado ou recupere da doença, perturbação ou estado.

Estando assim descrita a invenção, será claro para o profissional que a mesma pode ser variada de muitas maneiras. Essas variações estão incluídas no âmbito das reivindicações seguintes.

Lisboa, 17 de Fevereiro de 2009

REIVINDICAÇÕES

1. Composto de fórmula Ia, ou respectivo sal ou hidrato farmaceuticamente aceitável:



em que:

R^1 , R^2 , R^3 e R^4 , independentemente, são hidrogénio ou C_1-C_3 alquilo, e

A^1 , A^2 , A^3 e A^4 , independentemente, são hidrogénio, C_1-C_9 alquilo, C_2-C_9 alcenilo, C_2-C_9 alcinilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterociclo-alquilo, halo, hidroxi, sulfidrilo, nitro, amino, ciano, isociano, tiociano, isotiociano, formamido, tioformamido, sulfo, sulfino, C_1-C_9 alquil-sulfonilo, C_1-C_9 alcoxi, C_2-C_9 alcenoxi, fenoxi ou benziloxi,

em que o referido alquilo, alcenilo, alcinilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterociclo-alquilo, alcoxi, alcenoxi, fenoxi e benziloxi, independentemente, não estão substituídos ou estão substituídos com um ou mais substituinte(s).

2. Composto de acordo com a Reivindicação 1, em que:

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , A^2 , A^3 e A^4 são hidrogénio; e

A^1 é hidrogénio, $-(CH_2)_n-W$, ou $-Y-(CH_2)_n-W$,

em que: n é 0 - 3; Y é O, S ou NR em que R é hidrogénio ou C_1-C_4 alquilo; e W é C_1-C_6 alquilo ou fenilo, em que W não está substituído ou está

substituído com C₁-C₄ alquilo, C₁-C₄ alcoxi, carboxi ou halo.

3. Composto de acordo com a Reivindicação 2, em que:

A¹ é -(CH₂)_n-W, ou -Y-(CH₂)_n-W,

n é 1 ou 2 e

Y é O.

4. Composto de acordo com a Reivindicação 2, em que o composto é:

ácido 2-(2-mercaptopoetil)benzóico;

ácido 5-[(4-carboxifenil)metoxi]-2-(2-mercaptopoetil)benzóico;

ácido 2-(2-mercaptopoetil)-5-(fenilmetoxi)benzóico;

ácido 2-(carboximetoxi)-6-(2-mercaptopoetil) benzóico;

ácido 5-[(3-carboxifenil)metoxi]-2-(2-mercaptopoetil)benzóico;

ácido 2-(2-mercaptopoetil)-6-(fenilmetoxi)benzóico;

ácido 2-[(2-carboxifenil)metoxi]-6-(2-mercaptopoetil)benzóico;

ácido 2-[(4-carboxifenil)metoxi]-6-(2-mercaptopoetil)benzóico;

ácido 3-(2-mercaptopoetil)-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico;

ácido 2-(3,3-dimetilbutoxi)-6-(2-mercaptopoetil) benzóico;

ácido 2-(2-mercaptopoetil)-6-(2-feniletoxi) benzóico;

ácido 2-[(2-clorofenil)metoxi]-6-(2-mercaptopoetil)benzóico;

ácido 2-[3-carboxi-5-(1,1-dimetiletil)fenil]

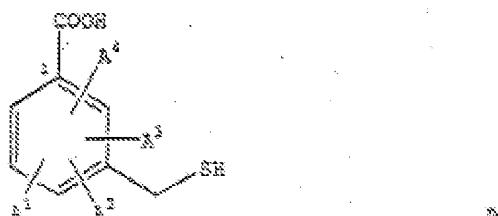
metoxi]-6-(2-mercptoetil)benzóico;
ácido 3-(2-mercptoetil)-[1,1'-bifenil]-2,4'-dicarboxílico;
ácido 2-[(4-carboxi-2-metoxifenil)metoxi]-6-(2-mercptoetil)benzóico;
ácido 2-[(4-carboxi-3-metoxifenil)metoxi]-6-(2-mercptoetil)benzóico;
ácido 2-[(2-bromo-4-carboxifenil)metoxi]-6-(2-mercptoetil)benzóico;
ácido 2-[(3-bromo-4-carboxifenil)metoxi]-6-(2-mercptoetil)benzóico;
ácido 2-(2-mercptoetil)-6-fenoxibenzóico;
ácido 2-(2-mercptoetil)-6-fenilaminobenzóico;
ácido 2-(2-mercptoetil)-6-(feniltio)benzóico;
ácido 5'-(1,1-dimetiletil)-3-(2-mercptoetil)-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico;
ácido 2-[(4-clorofenil)metoxi]-6-(2-mercptoetil)benzóico;
ácido 2-(bifenil-2-ilmetoxi)-6-(2-mercptoetil)benzóico;
ácido 2-[(3-bromo-5-carboxifenil)metoxi]-6-(2-mercptoetil)benzóico;
ácido 2-[(2-bromo-5-carboxifenil)metoxi]-6-(2-mercptoetil)benzóico;
ácido 2-(2-mercptoetil)-6-[(4-metoxifenil)metoxi]benzóico;
ácido 2-(2-mercptoetil)-6-[(4-metilfenil)metoxi]benzóico;
ácido 2-[(4-bromo-3-carboxifenil)metoxi]-6-(2-mercptoetil)benzóico;
ácido 2-[(2-carboxi-5-metoxifenil)metoxi]-6-(2-mercptoetil)benzóico;

ácido 2-(3-carboxibenziloxi)-6-(2-mercaptopoetil)benzóico;
ácido 2-(4-bromobenziloxi)-6-(2-mercaptopoetil)benzóico;
ácido 2-(4-tert-butilbenziloxi)-6-(2-mercaptopoetil)benzóico;
ácido 2-(3-bromobenziloxi)-6-(2-mercaptopoetil)benzóico;
ácido 2-(2-mercaptopoetil)-6-metoxibenzóico;
ácido 2-(3-clorobenziloxi)-6-(2-mercaptopoetil)benzóico;
ácido 3-(2-mercaptopoetil)bifenil-2-carboxílico; ou
ácido 2-carboximetil-6-(2-mercaptopoetil)benzóico;
ou respectivo sal farmaceuticamente aceitável.

5. Composto de acordo com a Reivindicação 4, em que o composto é:

ácido 2-(2-mercaptopoetil)-6-(fenilmetoxi)benzóico;
ácido 3-(2-mercaptopoetil)-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico, ou
ácido 2-carboximetil-6-(2-mercaptopoetil)benzóico;
ou respectivo sal farmaceuticamente aceitável.

6. Composto de fórmula Ib, ou respectivo sal ou hidrato farmaceuticamente aceitável:



em que A^1 , A^2 , A^3 e A^4 , independentemente, são hidrogénio, C_1-C_9 alquilo, C_2-C_9 alcenilo, C_2-C_9 alcinilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, halo, hidroxi, sulfidrilo, nitro, amino, ciano, isociano, tiociano, isotiociano, formamido, tioformamido, sulfo, sulfino, C_1-C_9 alquilsulfonilo, C_1-C_9 alcoxi, C_2-C_9 alcenoxi, fenoxi ou benziloxi, em que o referido alquilo, alcenilo, alcinilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alcoxi, alcenoxi, fenoxi e benziloxi, independentemente, não estão substituídos ou estão substituídos com um ou mais substituinte(s), em que, se A^1 for cloro, fluoro, amino ou tiometilo, então A^2 , A^3 e A^4 poderão não ser todos hidrogénio, e em que pelo menos um dos A^1 , A^2 , A^3 e A^4 não é hidrogénio.

7. Composto de acordo com a Reivindicação 6, em que:

A^2 , A^3 e A^4 são hidrogénio, e A^1 é $-(CH_2)_n-Ar$ ou $-Y-(CH_2)_n-Ar$, em que n é 0 - 3, Y é O, S ou NR em que R é hidrogénio ou C_1-C_4 alquilo, e Ar é fenilo, não substituído ou substituído com C_1-C_4 alquilo, carboxi ou halo.

8. Composto de acordo com a Reivindicação 7, em que o composto é:

ácido 5-(mercaptometil)-2-(2-feniletoxi) benzóico; ácido 4-(mercaptometil)-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico;

ácido 5-(mercaptometil)-2-(fenilmetoxi)benzóico, ou ácido 4-bromo-3-(mercaptometil)benzóico;
ou respectivo sal farmaceuticamente aceitável.

9. Composto de acordo com a Reivindicação 8, em que o composto é:
ácido 4-(mercaptometil)-[1,1'-bifenil]-2,3'-dicarboxílico ou respectivo sal farmaceuticamente aceitável.
10. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o composto é um enantiómero ou parte de uma mistura enriquecida em enantiómero.
11. Utilização de um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes no fabrico de um medicamento para inibir a actividade da enzima NAALADase, tratar uma anormalidade do glutamato, realizar uma actividade neuronal, tratar uma doença da próstata, tratar cancro, inibir a angiogénesis ou realizar uma actividade do TGF- β .
12. Utilização da Reivindicação 11, em que o referido medicamento se destina a tratar uma anormalidade do glutamato seleccionada do grupo que consiste em perturbação compulsiva, acidente vascular cerebral, doença desmielinizante, esquizofrenia, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, ansiedade, perturbação de ansiedade, enfraquecimento da memória e glaucoma.
13. Utilização da Reivindicação 11, em que o referido medicamento se destina a realizar uma actividade neuronal seleccionada do grupo que consiste em

estimulação de neurónios danificados, promoção da regeneração neuronal, prevenção de neurodegenerescência e tratamento de uma perturbação neurológica.

14. Utilização da Reivindicação 13, em que a referida actividade neuronal consiste em tratamento de uma perturbação neurológica e a referida perturbação neurológica é dor, neuropatia diabética, neuropatia periférica causada por lesão física ou estado de doença, lesão cerebral traumática, danos físicos na espinhal-medula, acidente vascular cerebral associado a danos cerebrais, uma doença desmielinizante ou uma perturbação neurológica relacionada com neurodegenerescência.
15. Utilização da Reivindicação 11, em que o referido medicamento se destina ao tratamento de cancro.
16. Utilização da Reivindicação 11, em que o referido medicamento se destina a inibir a angiogénesis.
17. Utilização da Reivindicação 11, em que o referido medicamento se destina a tratar uma anormalidade do TGF- β seleccionada do grupo que consiste em perturbação neurodegenerativa, perturbação da formação da matriz extracelular, doença relacionada com o crescimento celular, doença infecciosa, doença relacionada com o sistema imunológico, formação de escaras de tecido epitelial, doença vascular associada ao colagénio, perturbação fibroproliferativa, perturbação do tecido conjuntivo, inflamação, doença inflamatória, síndroma da dificuldade respiratória, infertilidade e diabetes.

18. Método *in vitro* para detectar uma doença, perturbação ou estado no qual os níveis da NAALADase estão alterados, que compreende:

- (i) contactar uma amostra de tecido ou fluido corporal com um composto de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-10, em que o referido composto se liga a qualquer NAALADase presente na referida amostra, e
- (ii) medir a quantidade de qualquer NAALADase ligada à referida amostra, em que a quantidade de NAALADase é um diagnóstico da referida doença, perturbação ou estado.

19. Utilização de um composto de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-10 que está etiquetado com um marcador para preparar um agente de diagnóstico *in vivo* com a finalidade de detectar uma doença, perturbação ou estado no qual os níveis da NAALADase estão alterados.

20. Estojo de diagnóstico para detectar uma doença, perturbação ou estado no qual os níveis da NAALADase estão alterados, que compreende um composto de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-10 etiquetado com um marcador.

21. Composição farmacêutica que compreende:

- (i) uma quantidade eficaz de um composto de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-10, e
- (ii) um transportador farmaceuticamente aceitável.

FIG. 1

TGF- β 1 em Culturas de Células Tratadas com Composto C
Durante 20 Minutos de Isquemia

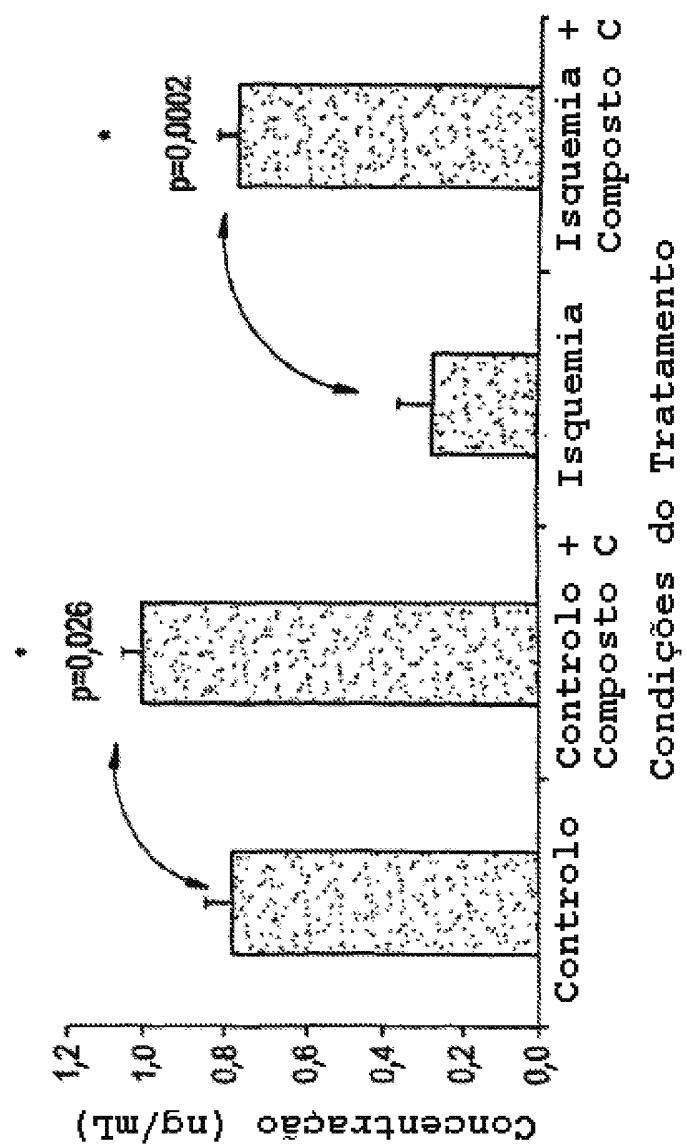


FIG. 2

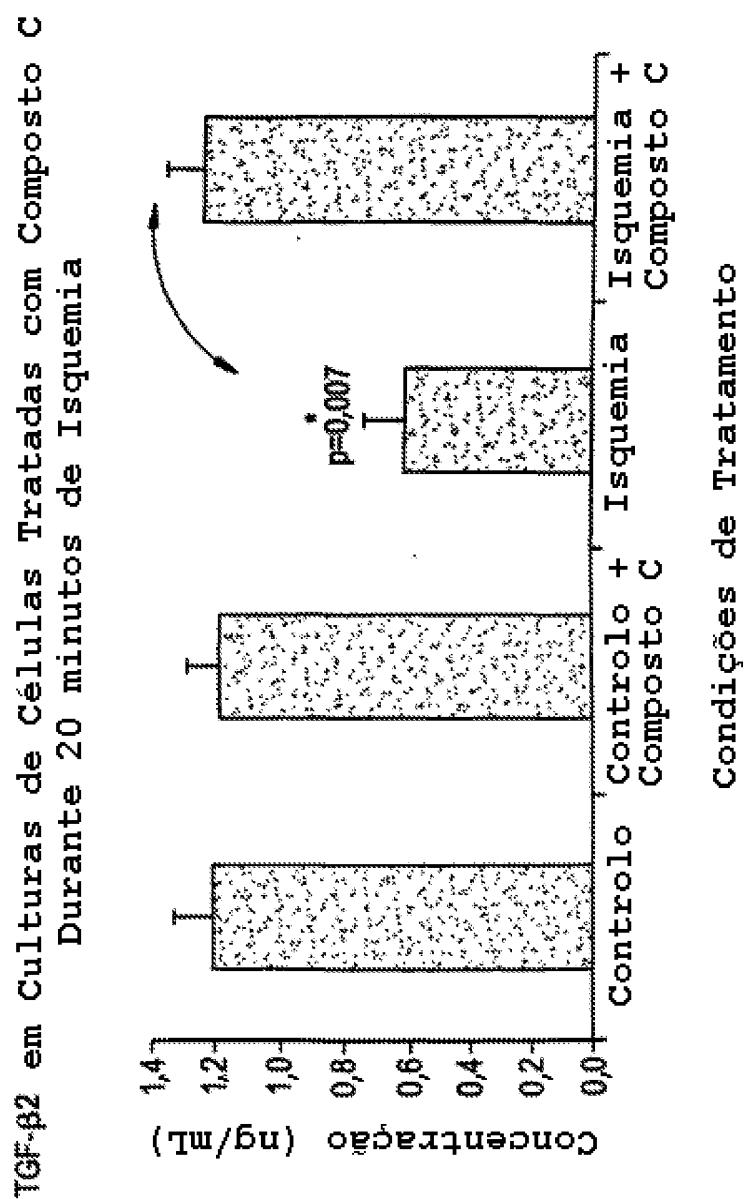


FIG. 3

Anticorpo Neutralizador do TGF- β Bloqueia o
Efeito Neuroprotector do Composto C

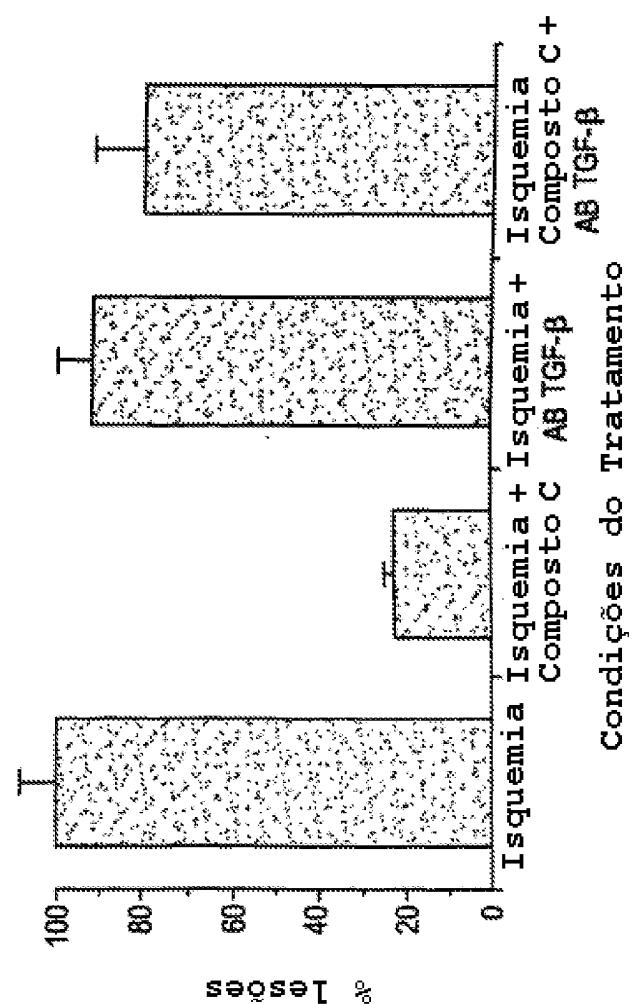


FIG. 4

Anticorpo Neutralizador do FGF Não Bloqueia
Efeitos Neuroprotectores do Composto C in vitro

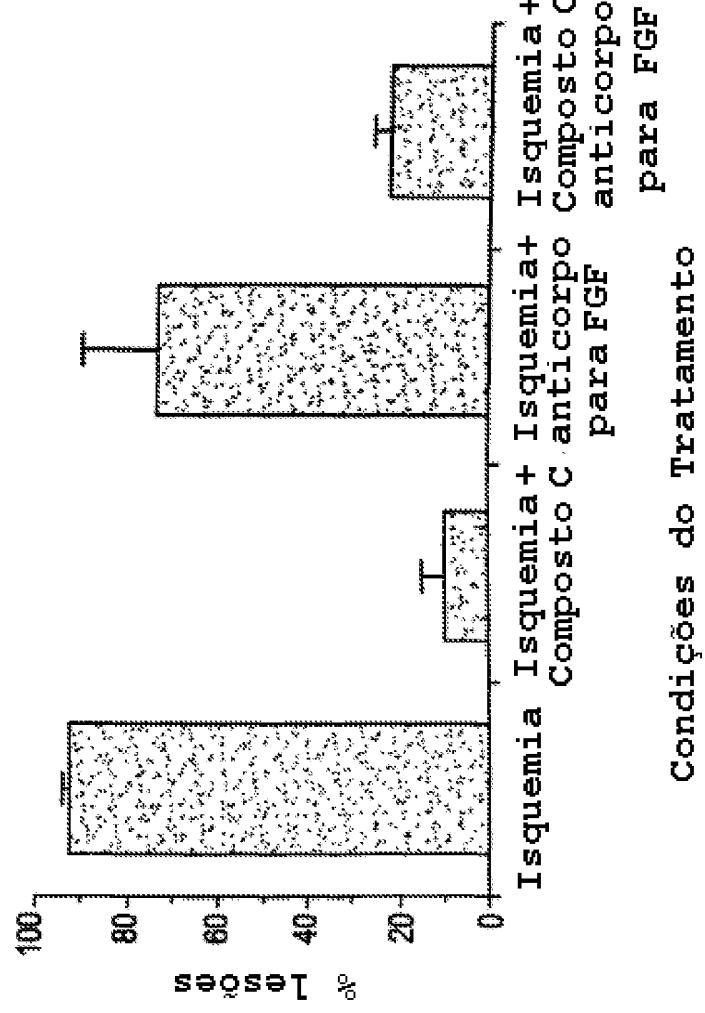


FIG. 5

Anticorpo Neutralizador do TGF- β Bloqueia o Efeito
Neuroprotector do Composto C Contra 2 horas de MCAO

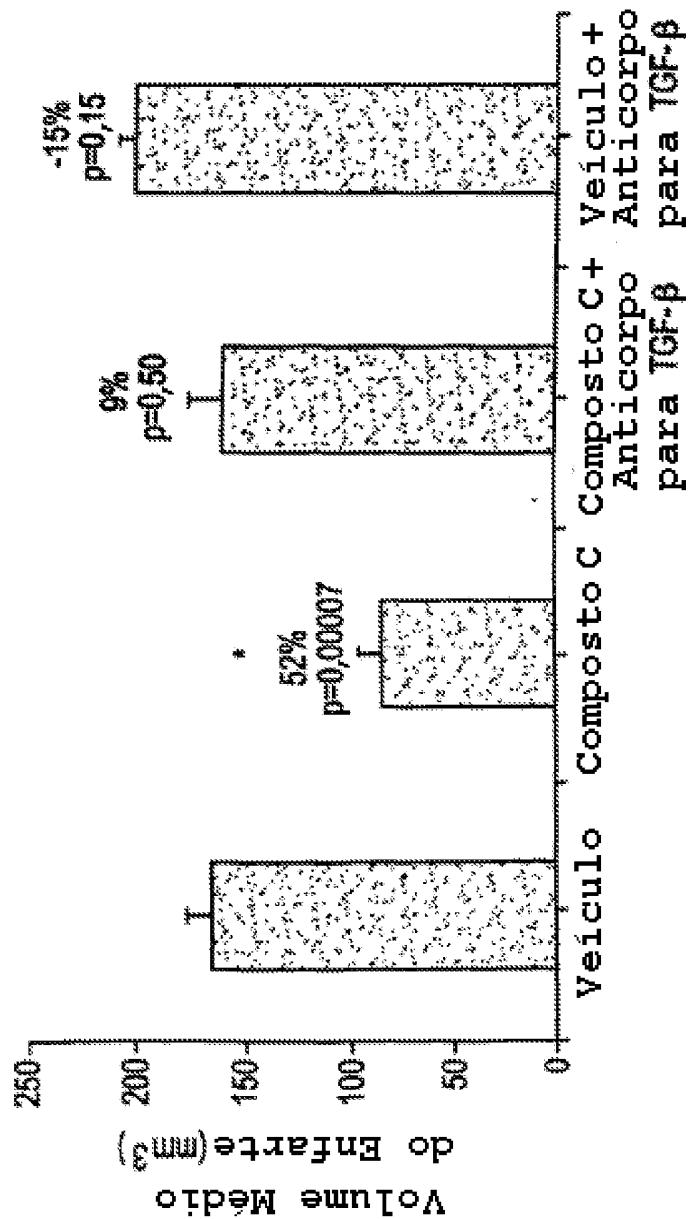
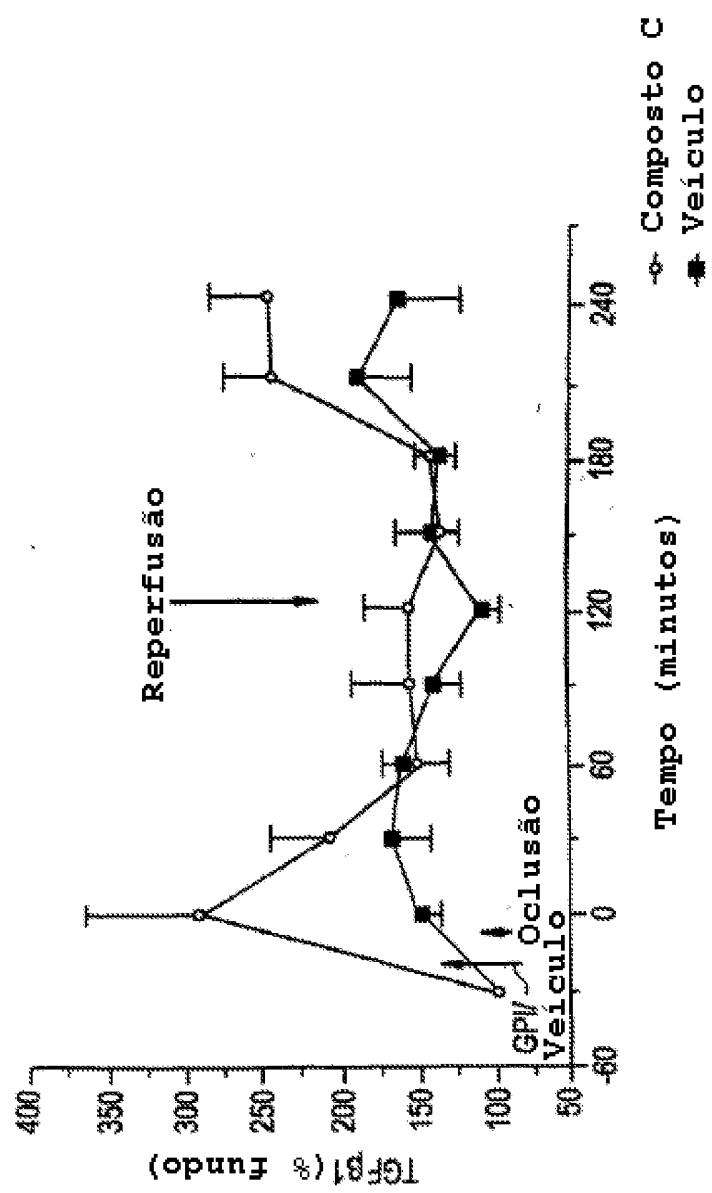
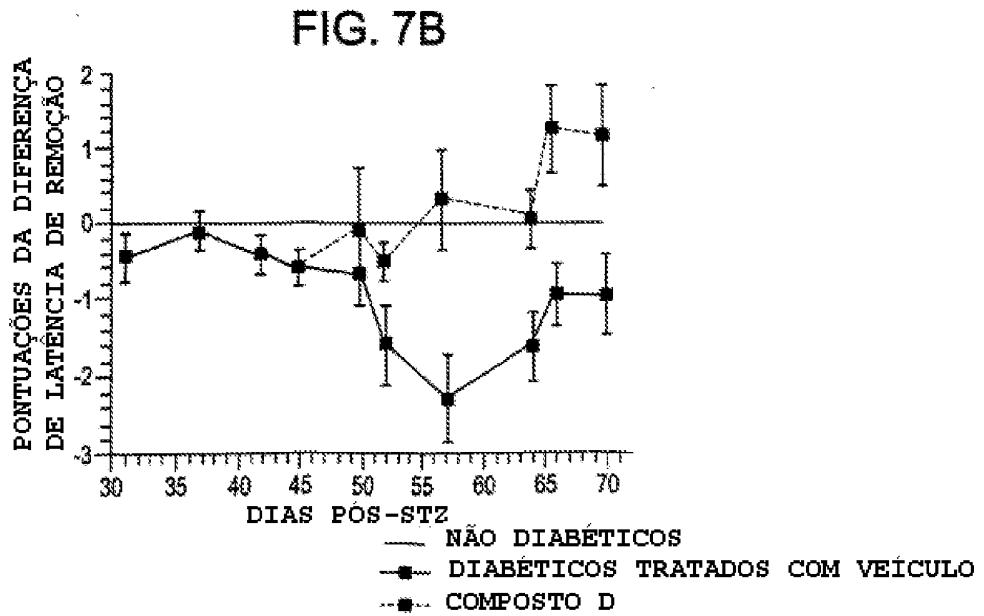
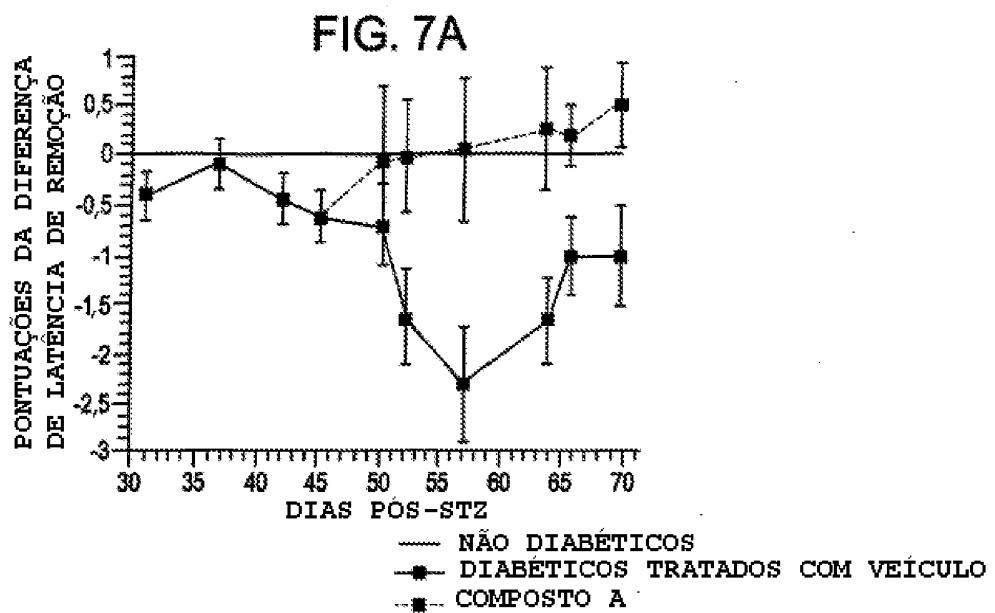


FIG. 6

TCF-β1 em Dializado de Ratos Tratados com Composto C
Durante Isquemia e Reperfusão





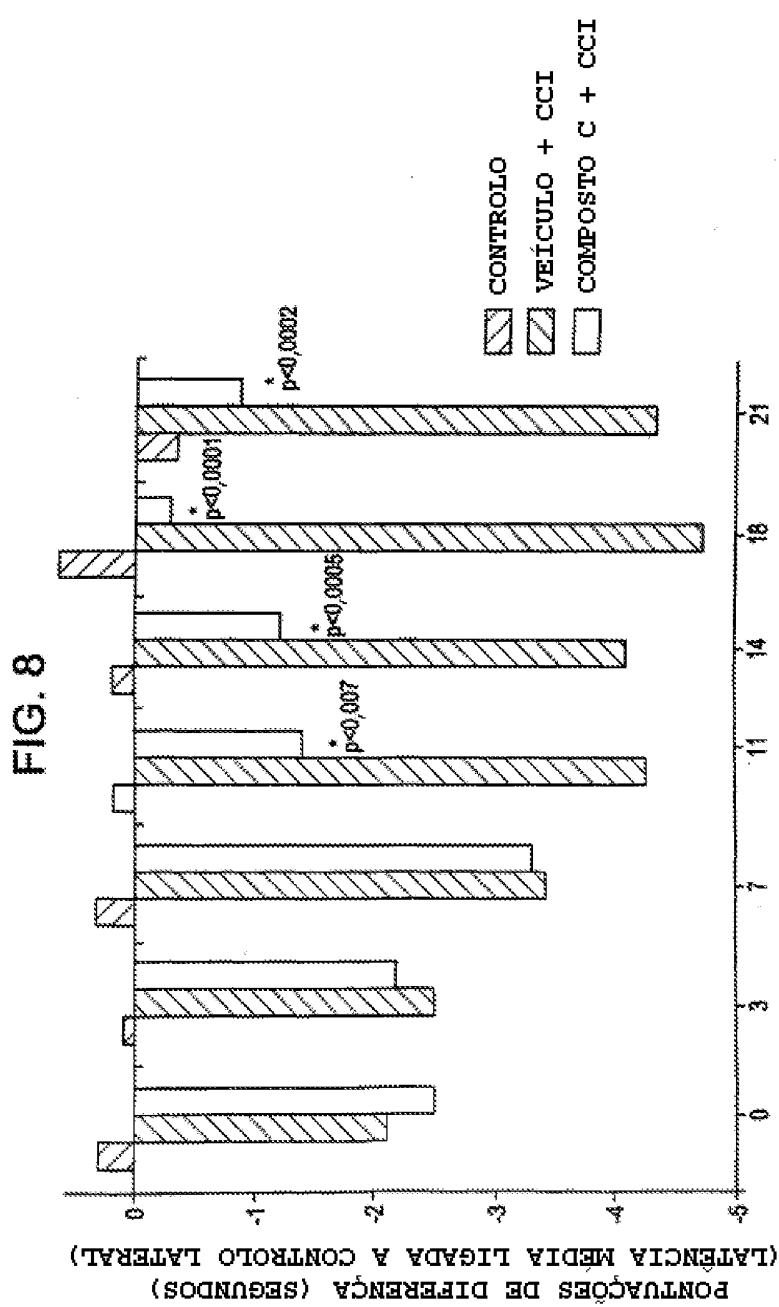


FIG. 9A

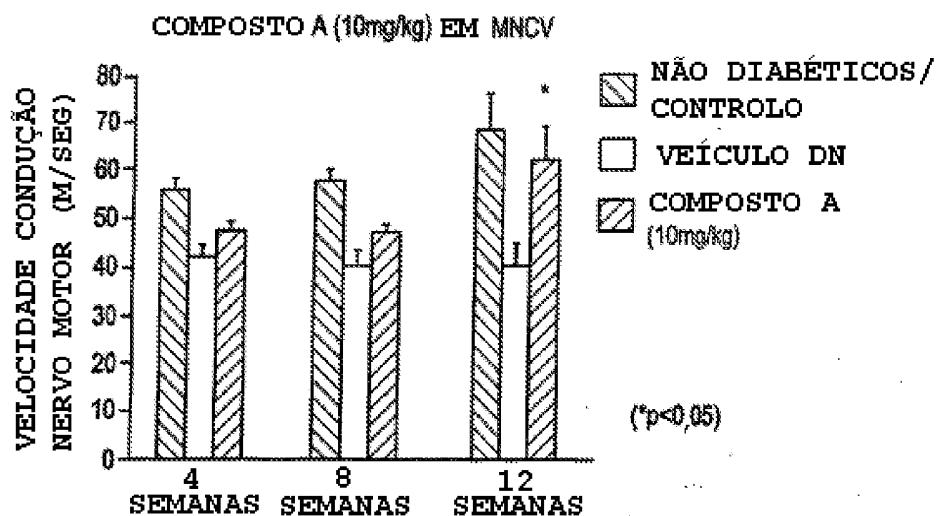


FIG. 9B

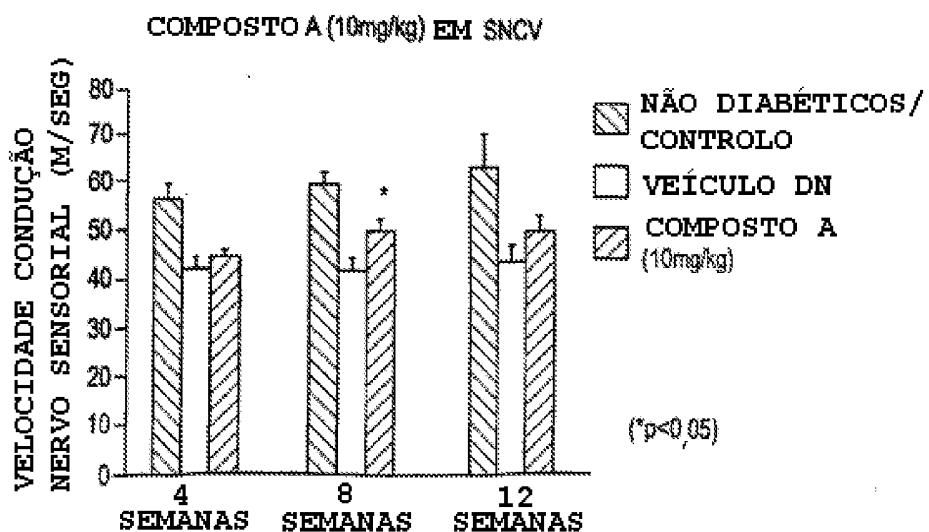


FIG. 10A

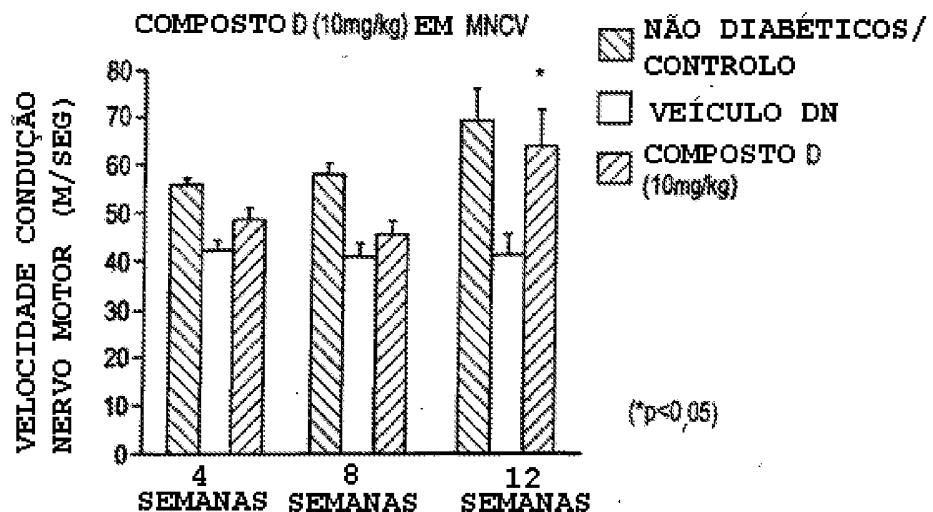


FIG. 10B

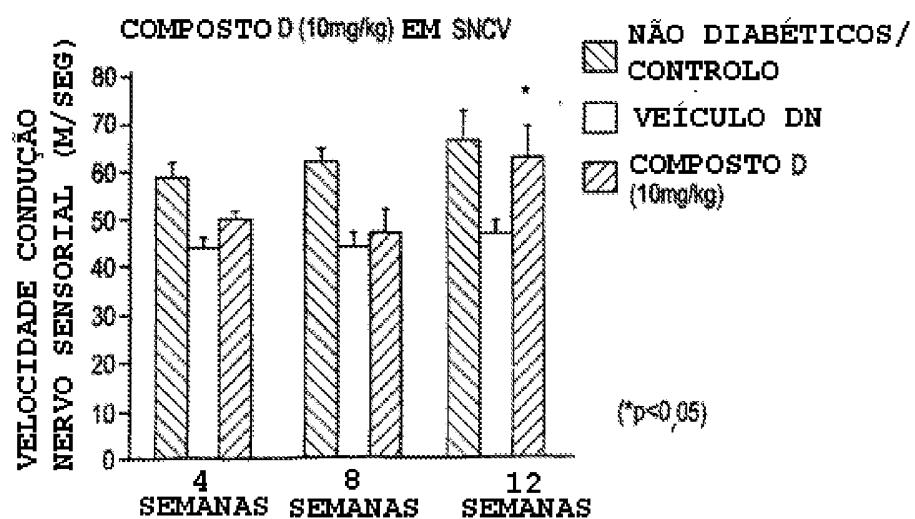
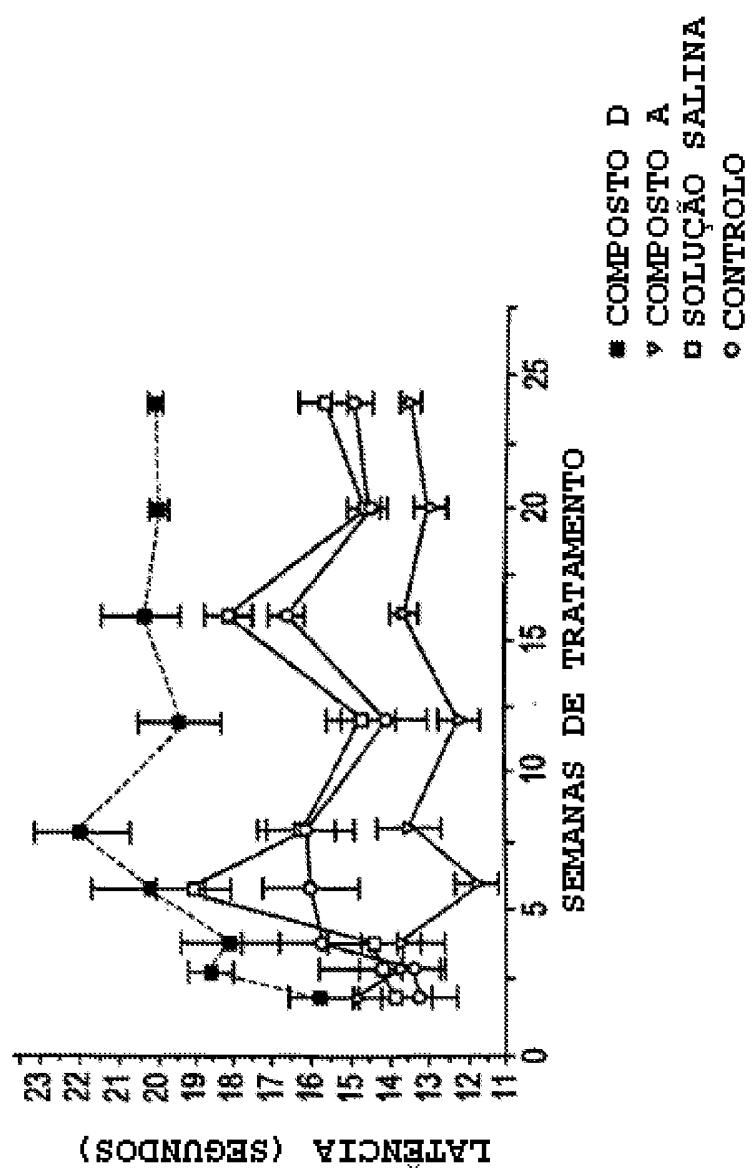


FIG. 11
TESTE DE HARGREAVES



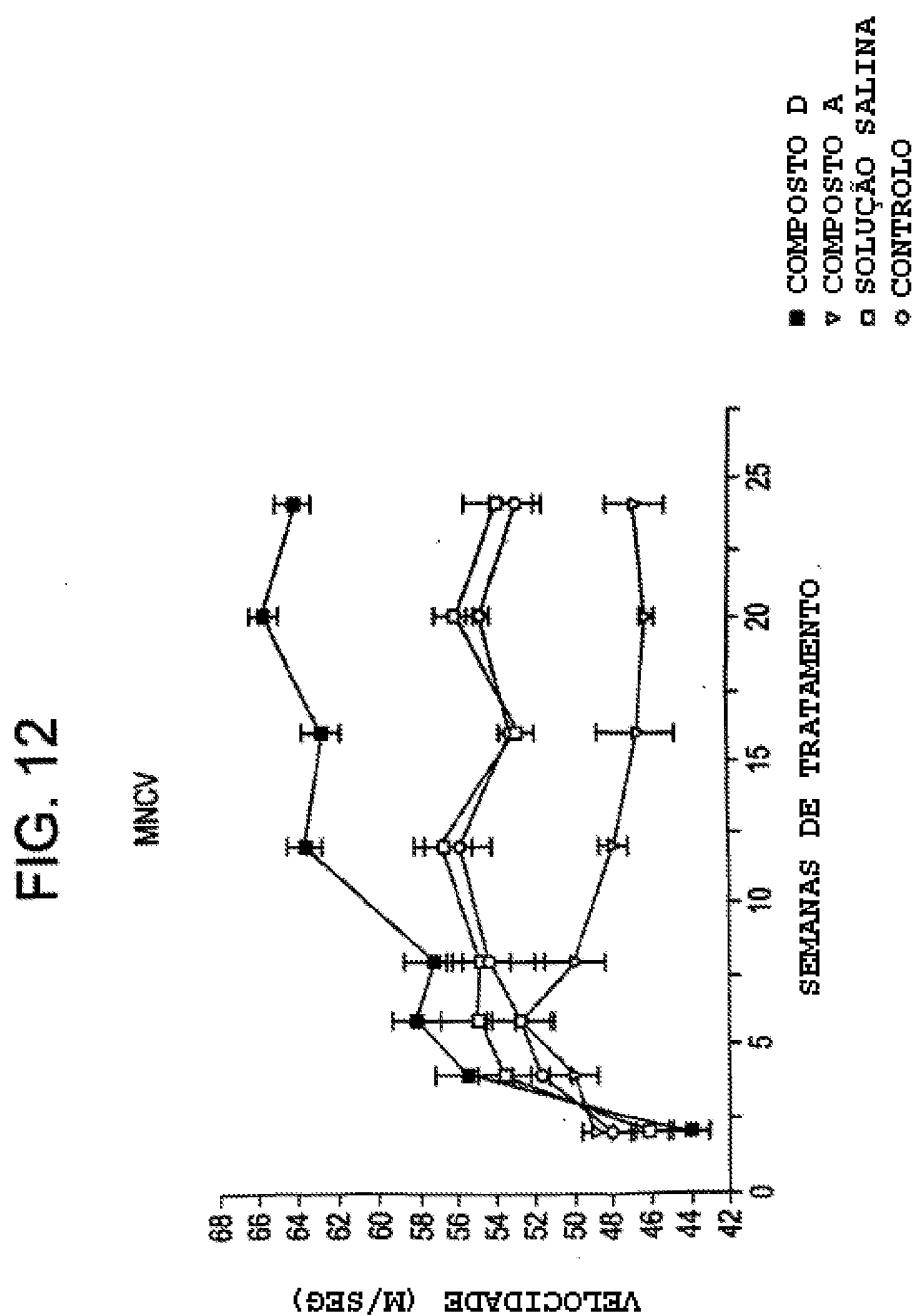


FIG. 13

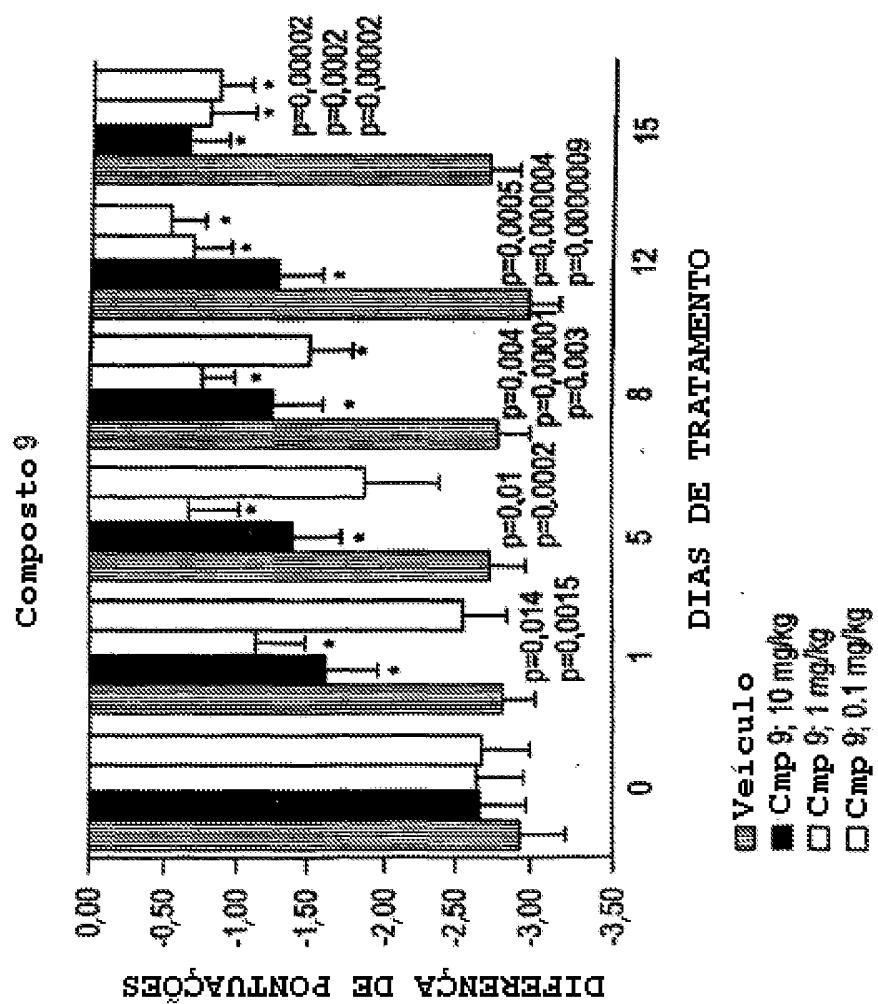


FIG. 14

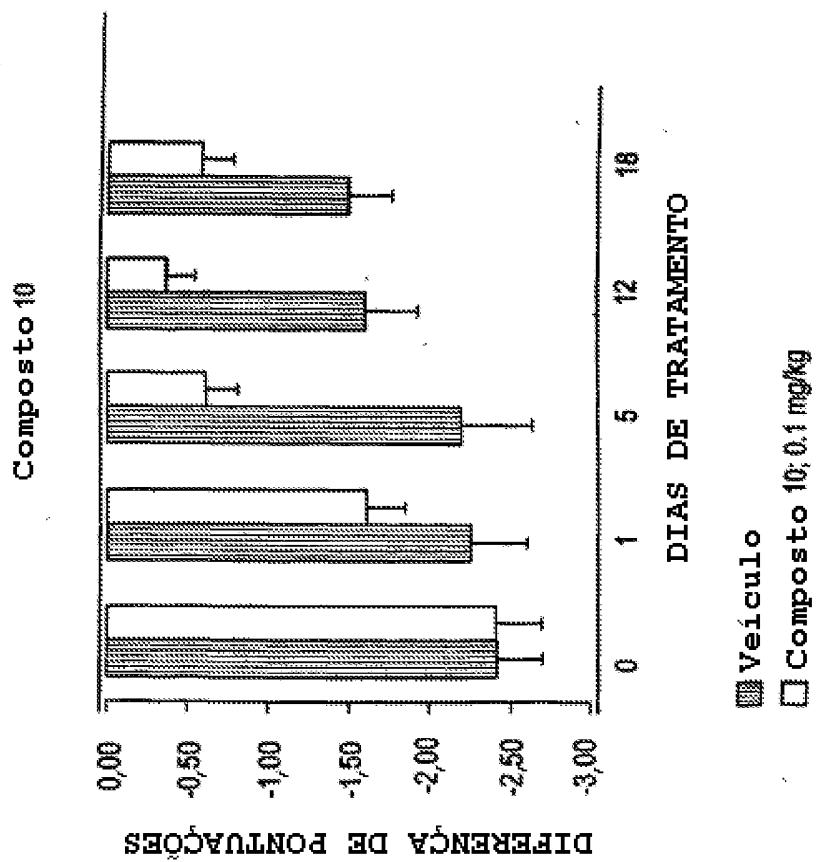


FIG. 15

Presença de Tremuras nos Membros aos 210 Dias

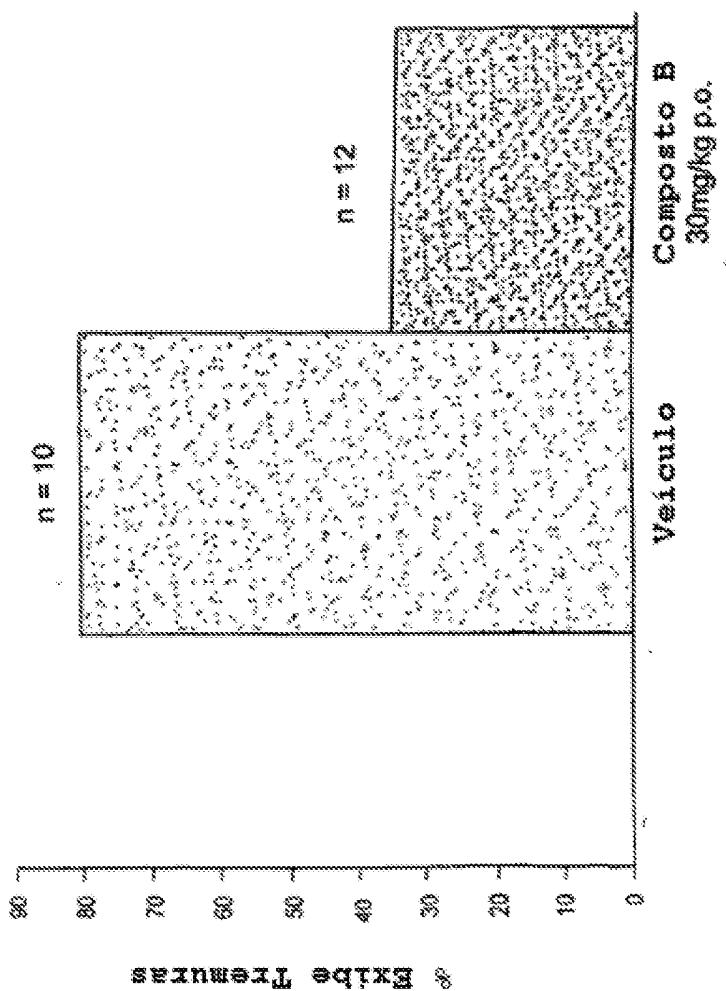


FIG. 16

Porte de Ratinhos SOD Transgénicos aos 210 Dias

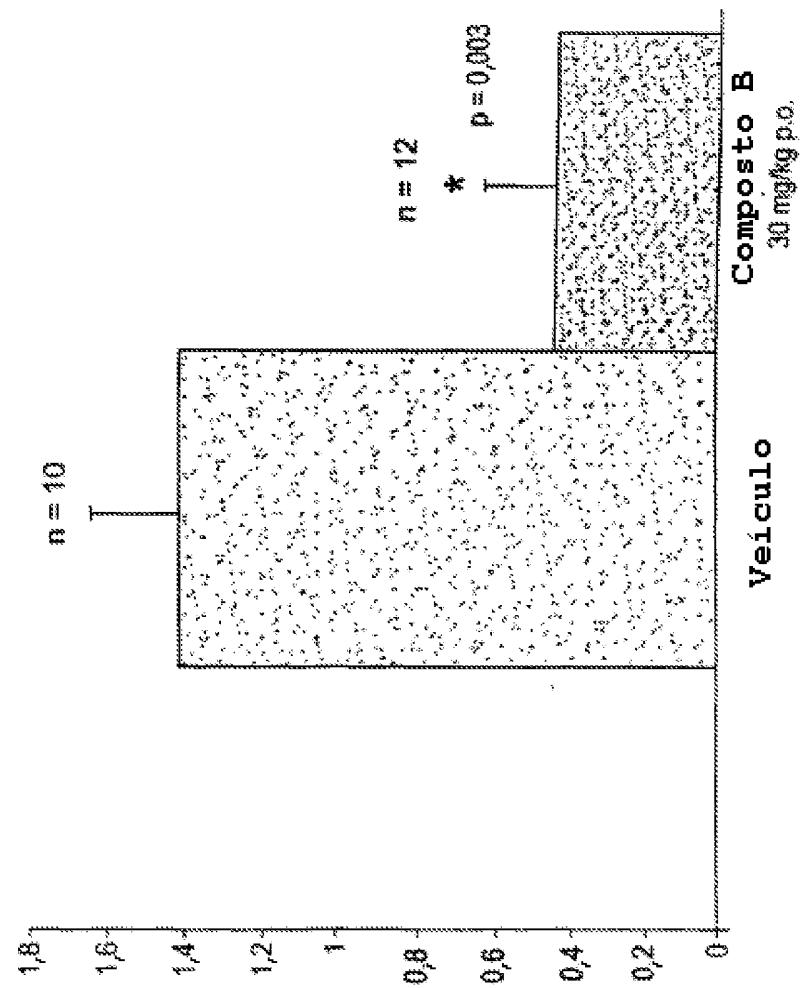


FIG. 17

Arrastamento dos Membros Traseiros em
Ratinhos SOD transgénicos aos 210 Dias

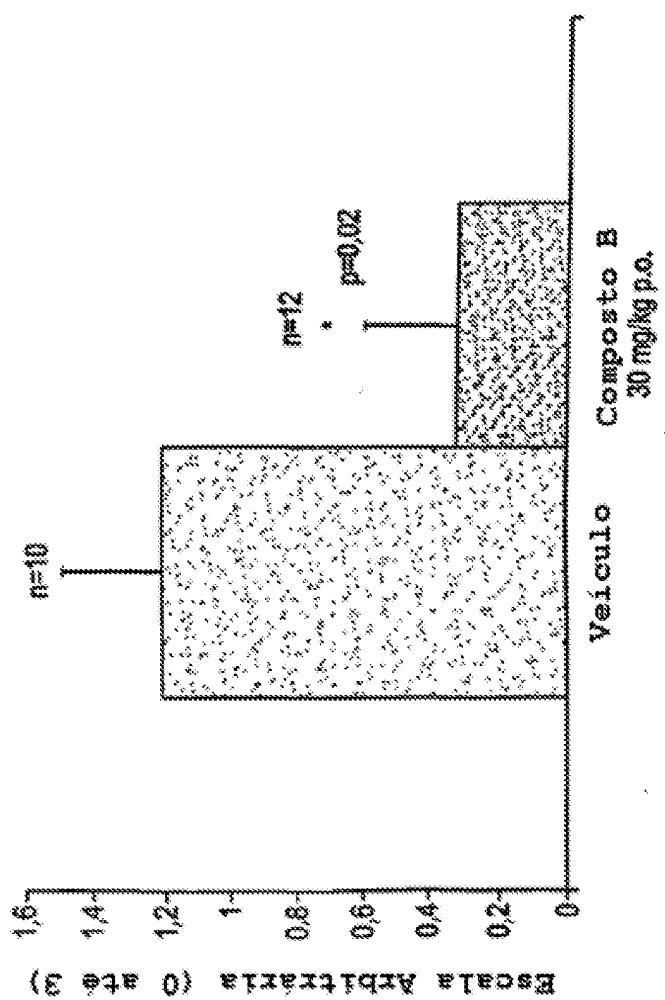


FIG. 18

Cruzamento dos Membros em Ratinhos
SOD Transgénicos aos 210 Dias

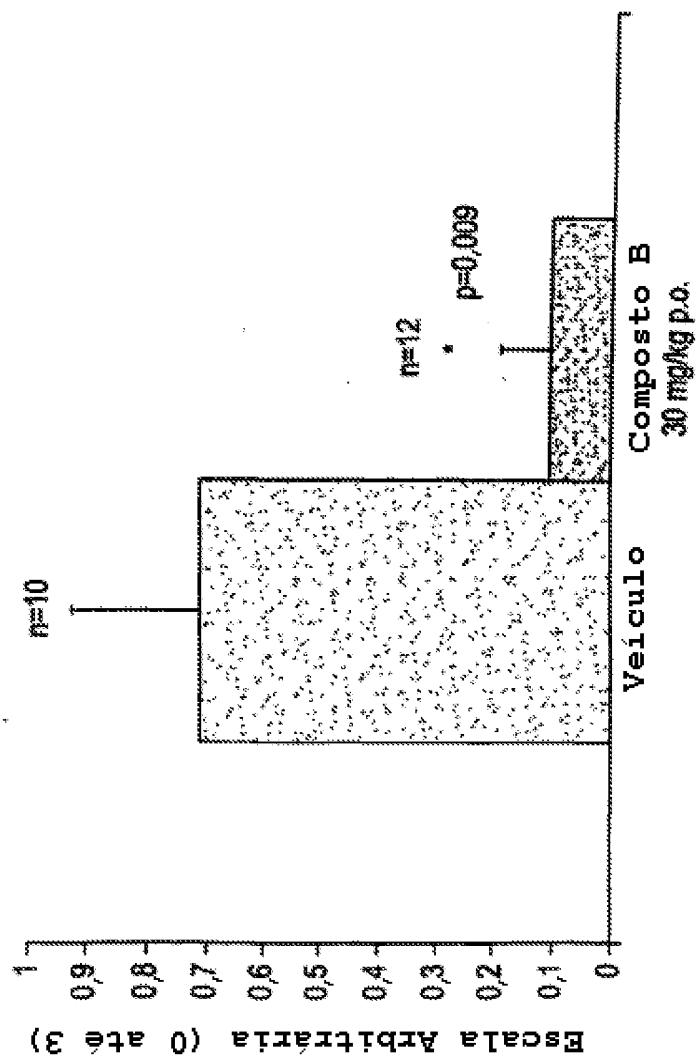


FIG. 19

Reflexo de Endireitamento em Ratinhos
SOD Transgénicos aos 210 Dias

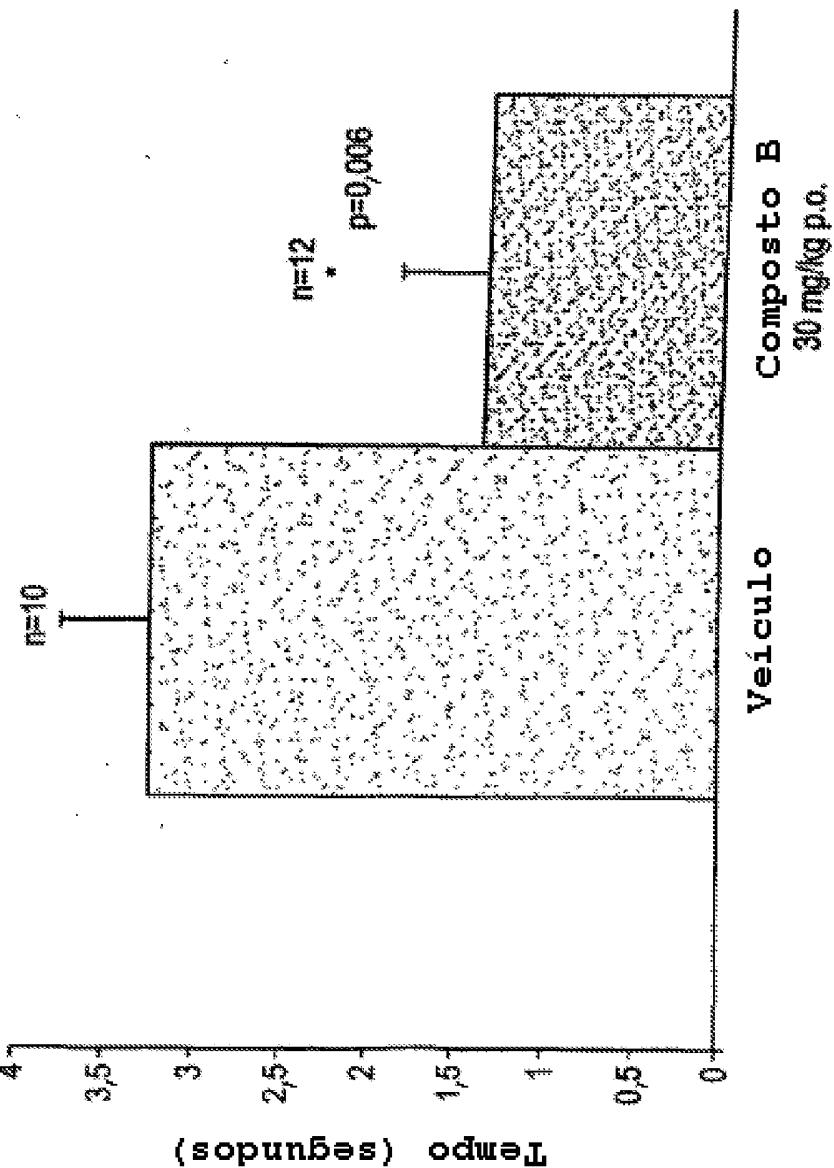


FIG. 20
Mortalidade em Ratinhos SOD

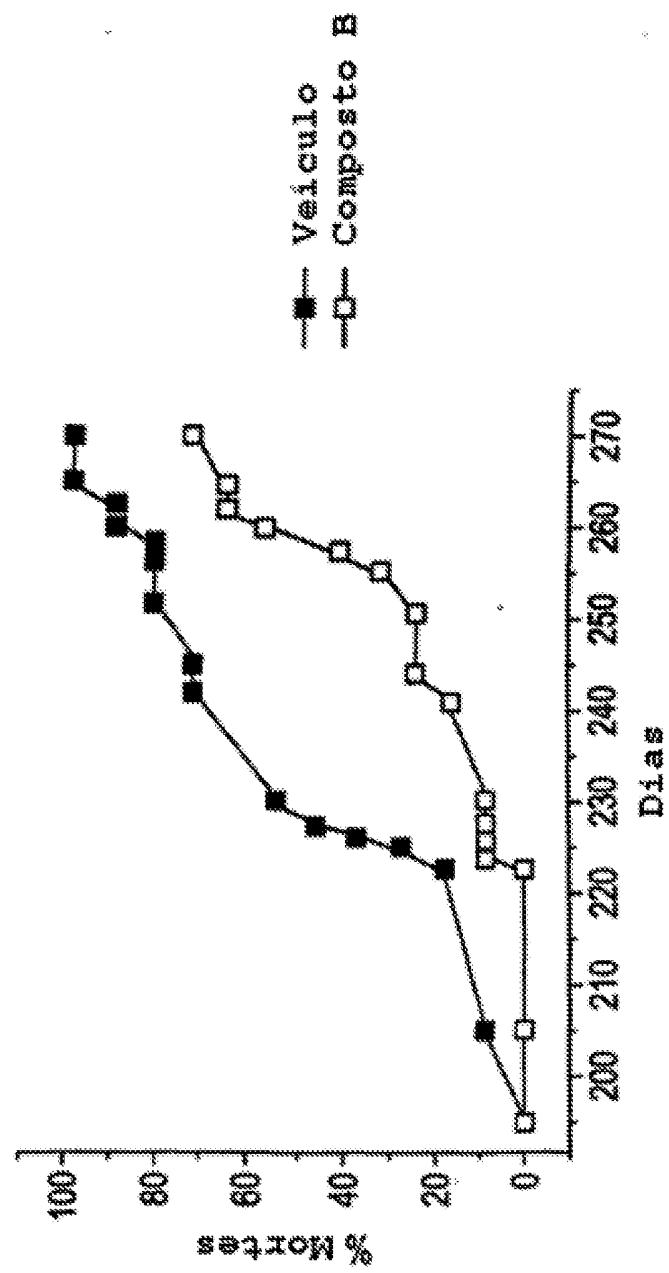


FIG. 21

Curva de Sobrevida de Kaplan-Meier de Ratinhos
Após Tratamento com Composto B e Veículo

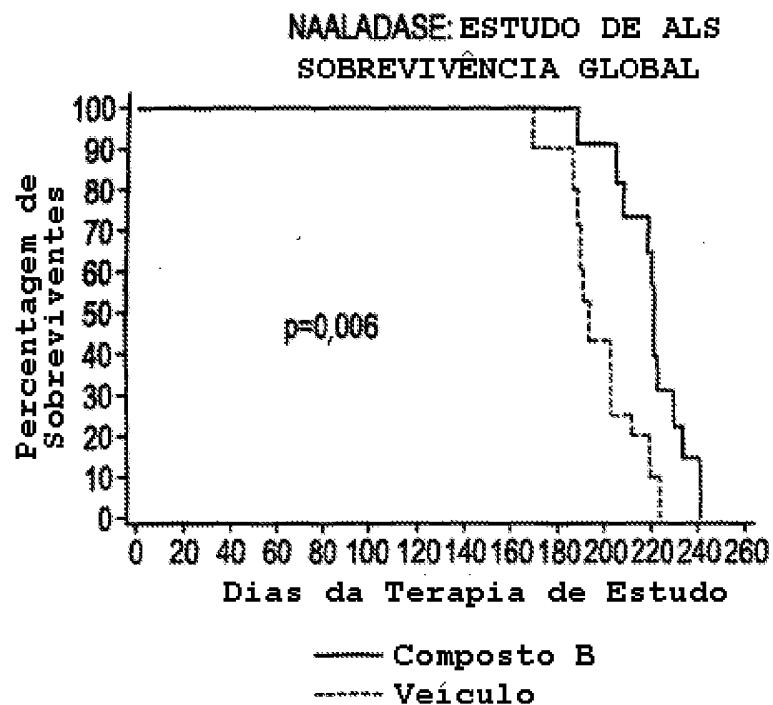


FIG. 22

Inibidores da NAALADase Revertem Hiperalgésia e Hipoalgésia em Doença Bem Estabelecida (internos)

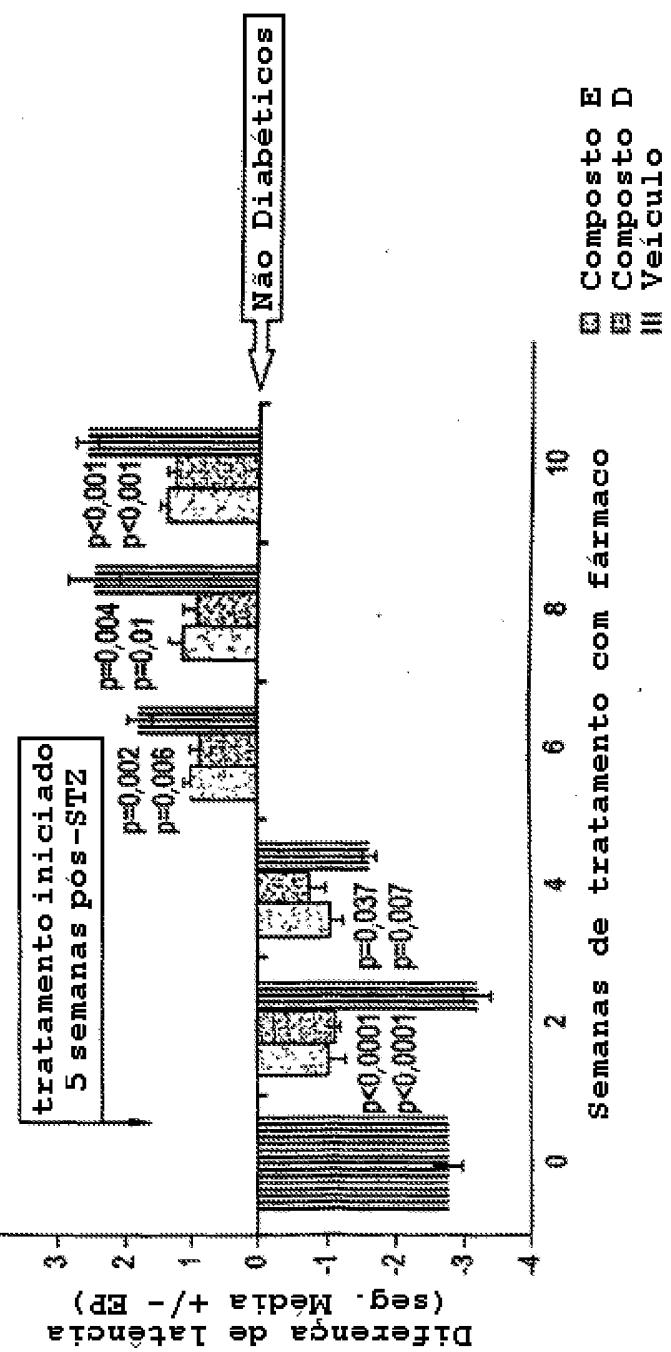


FIG. 23
 Inibição da NAAADase Reverte Deficiência de Condução
 do Nervo Motor em Diabetes Bem Estabelecida

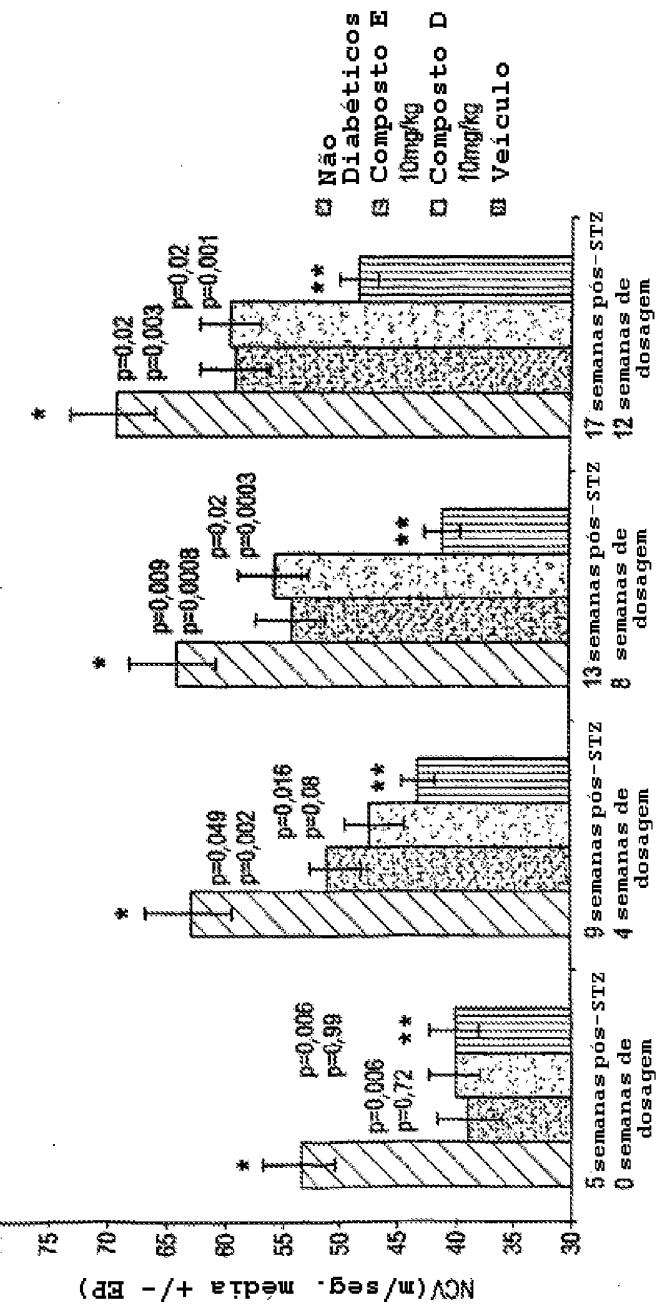


FIG. 24
Inibição da NALDADase Reverte Deficiência de Condução
do Nervo Sensorial em Diabetes Bem Estabelecida

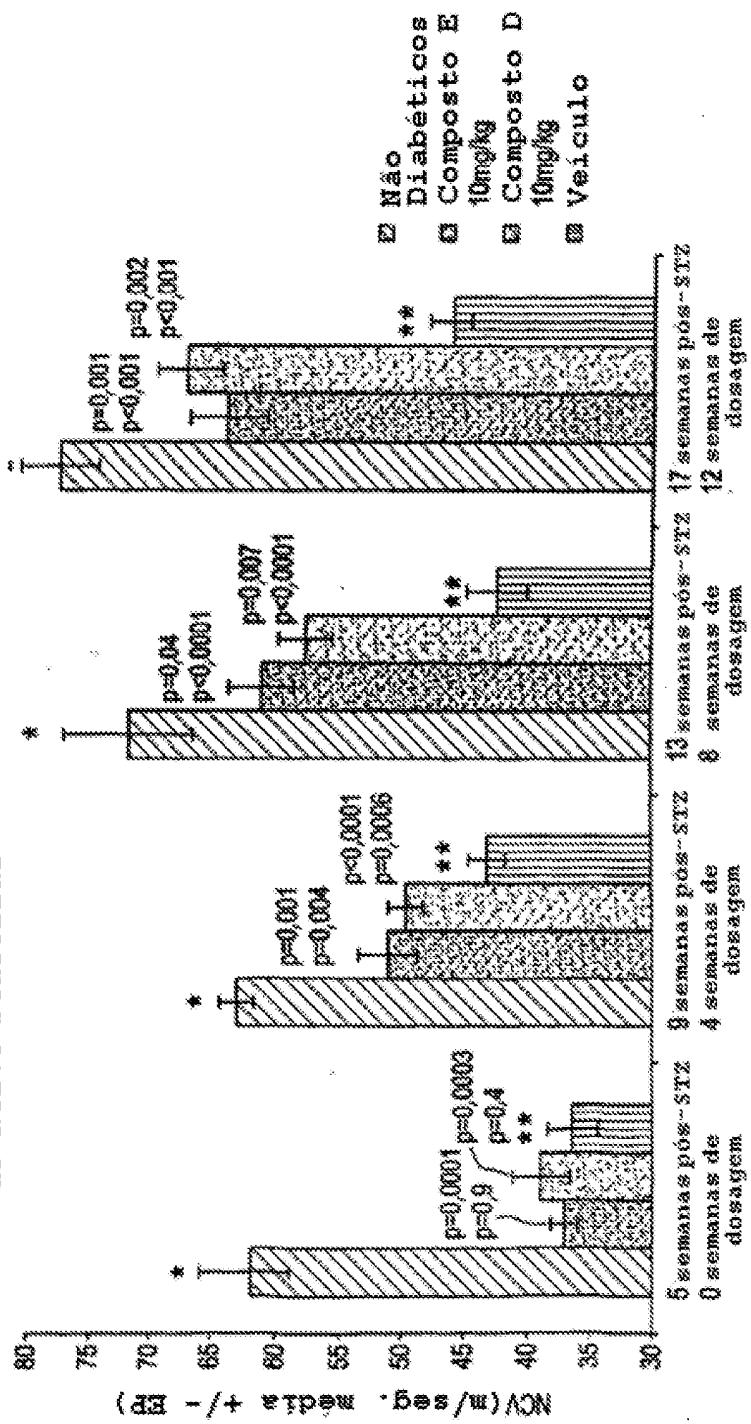


FIG. 25

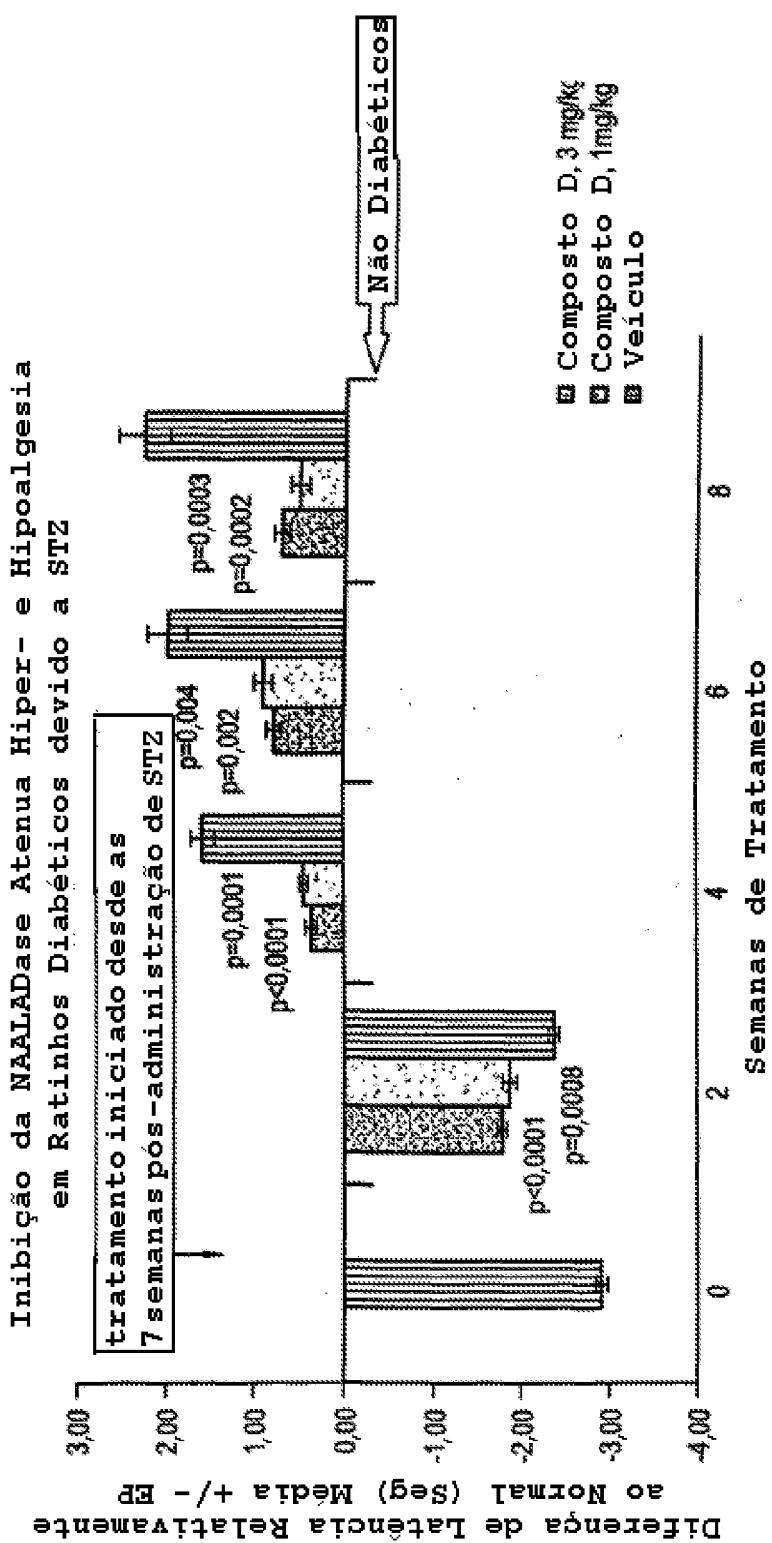


FIG. 26
MNCV em Ratos STZ Tratados com Composto D/Veículo

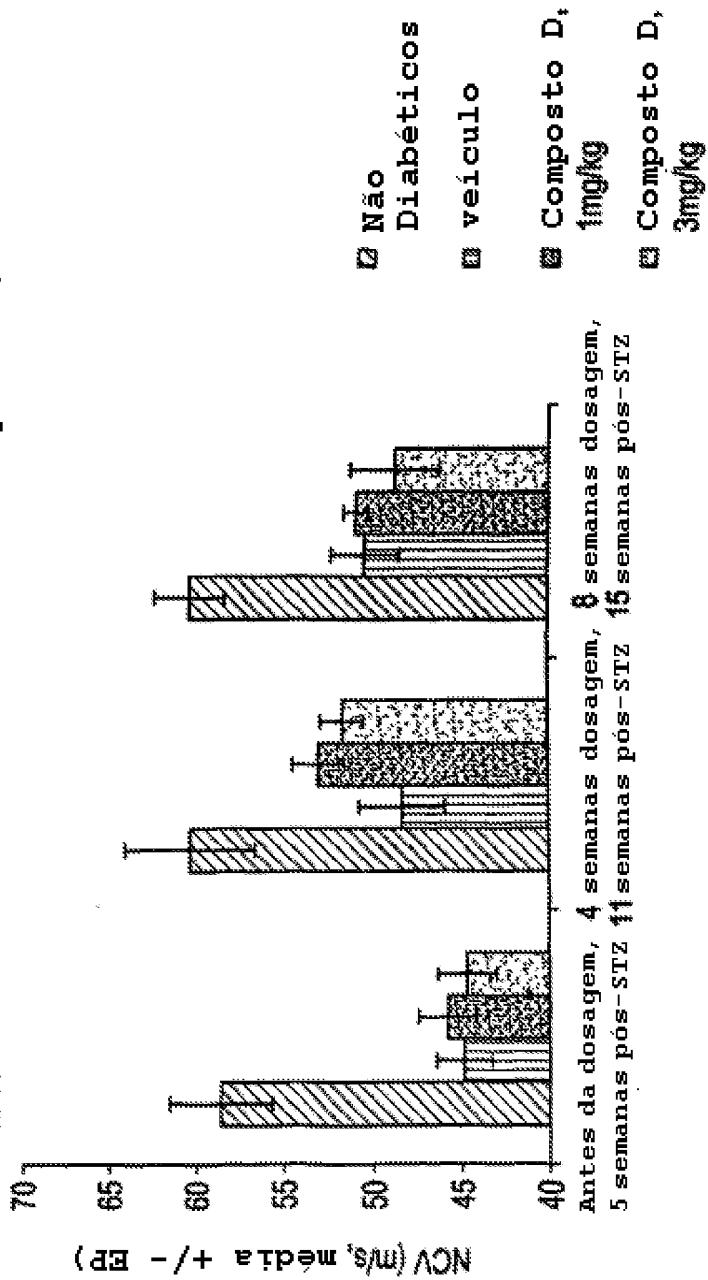


FIG. 27
SNCV em Ratos STZ Tratados com Composto D/Veículo

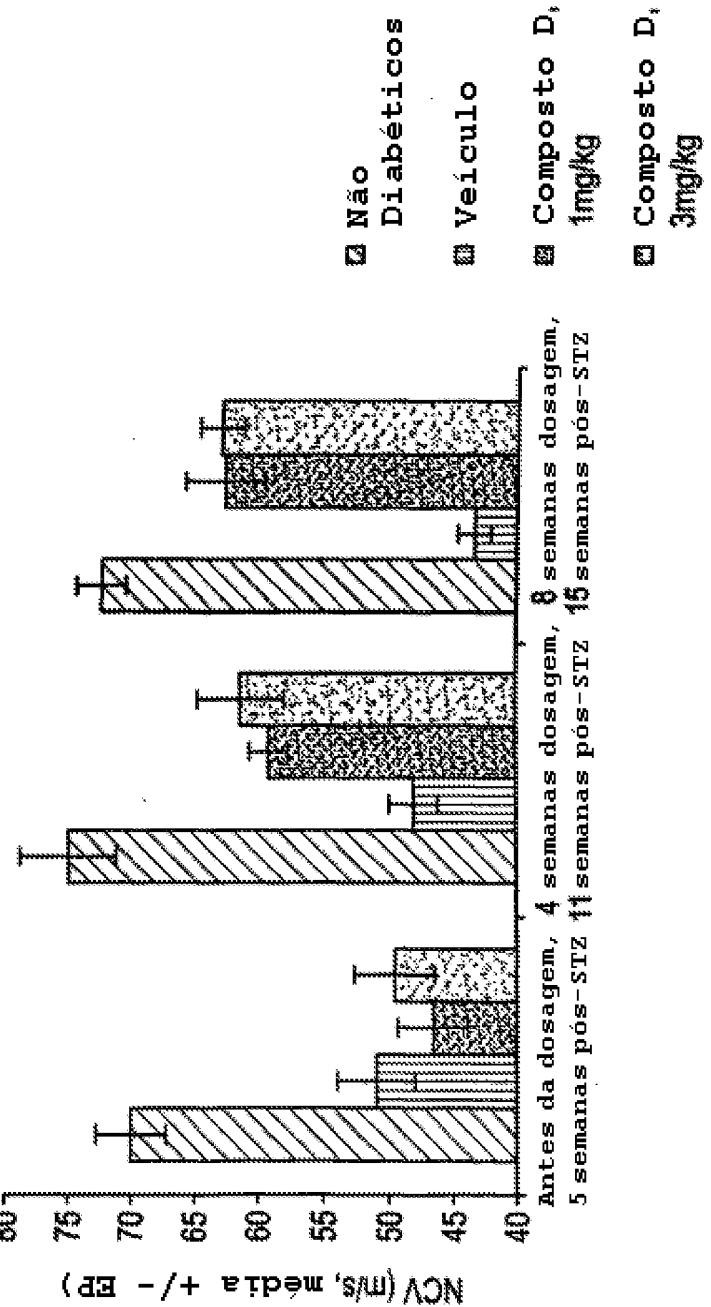


FIG. 28

Composto D Reverte Deficiência da Velocidade de Condução
do Nervo Sensorial em Diabetes Estabelecida

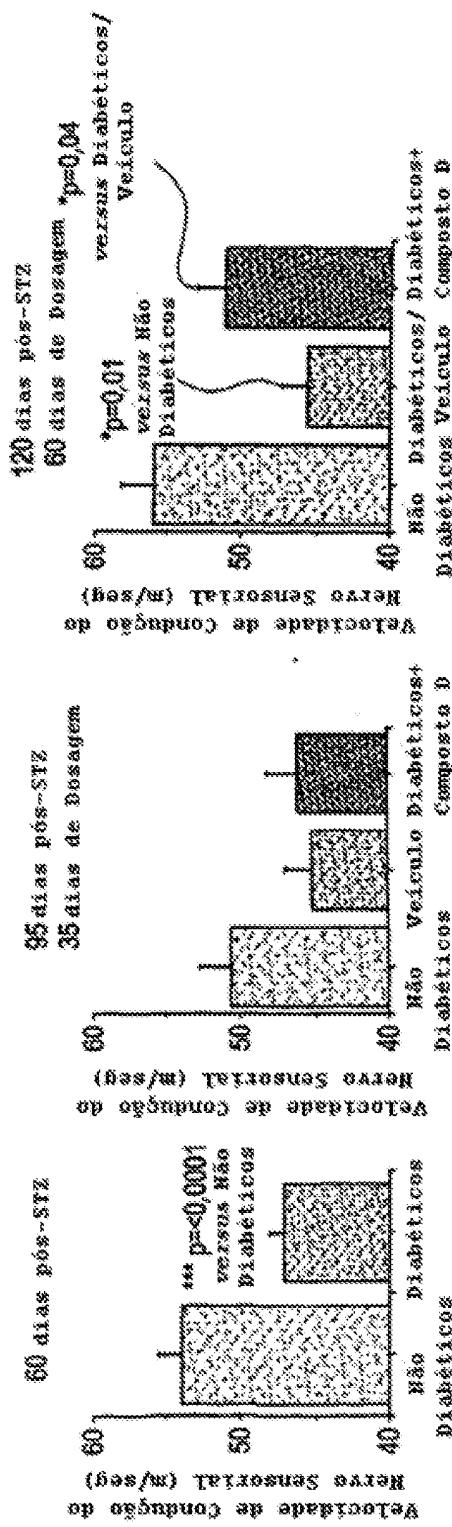


FIG. 29
 Composto D Reverte Deficiência da Velocidade de Condução
 do Nervo Motor em Diabetes Estabelecida

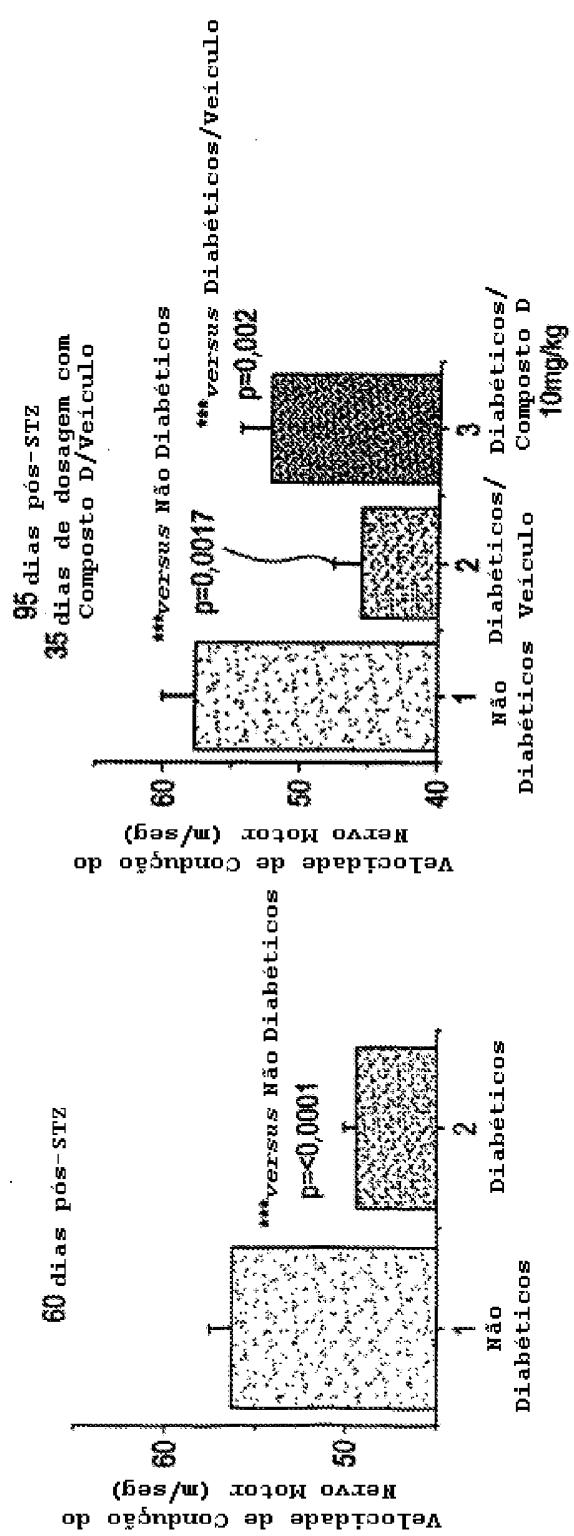


FIG. 30

Deficiência da Velocidade de Condução do Nervo Sensorial
Revertida pelo Composto D desde os 90 dias pós-STZ

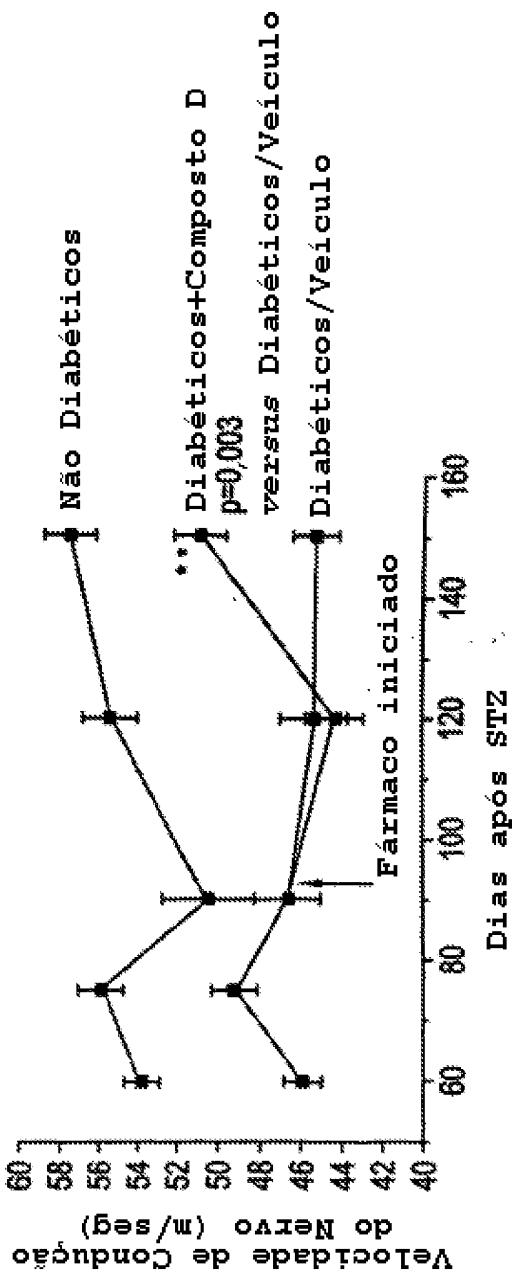


FIG. 31
 NCV no Modelo de Ratinhos Genéticos db/db de Diabetes
 4 meses de diabetes (pré-tratamento com fármaco)

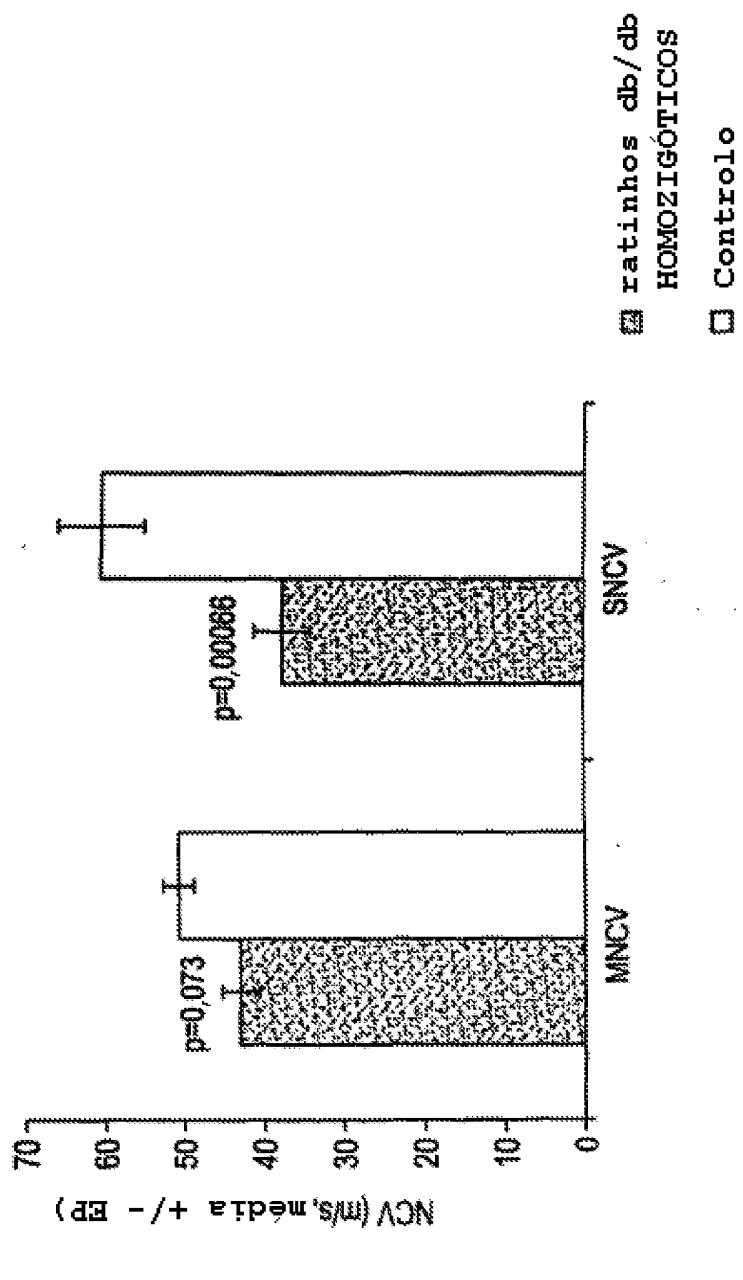


FIG. 32
 NCVsem ratinhos db/db
 tratados com Composto F (1mg/kg)/veículo

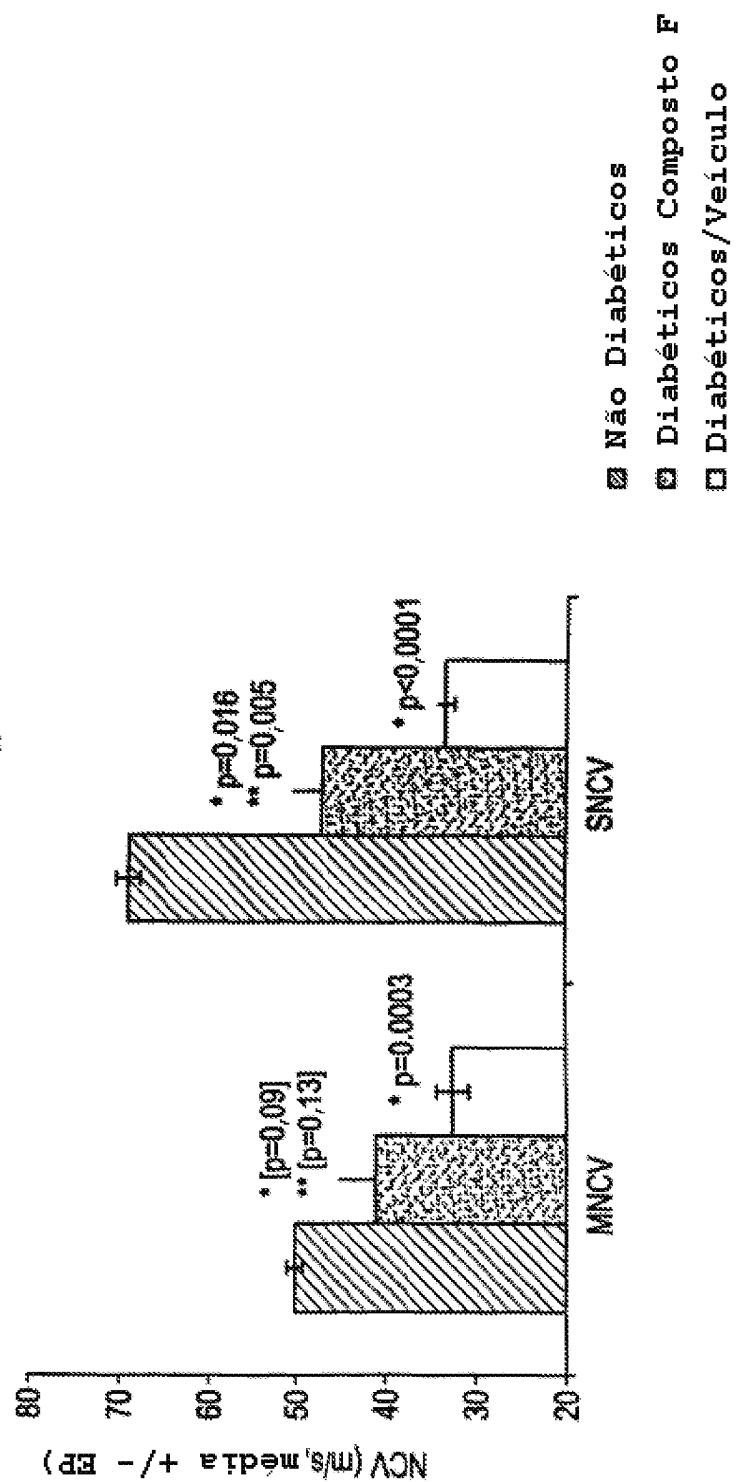


FIG.33

Testes de Haste Rotativa em Ratinhos HD Transgénicos Após os Tratamentos com Composto B (30 mg/kg/dia, oralmente)

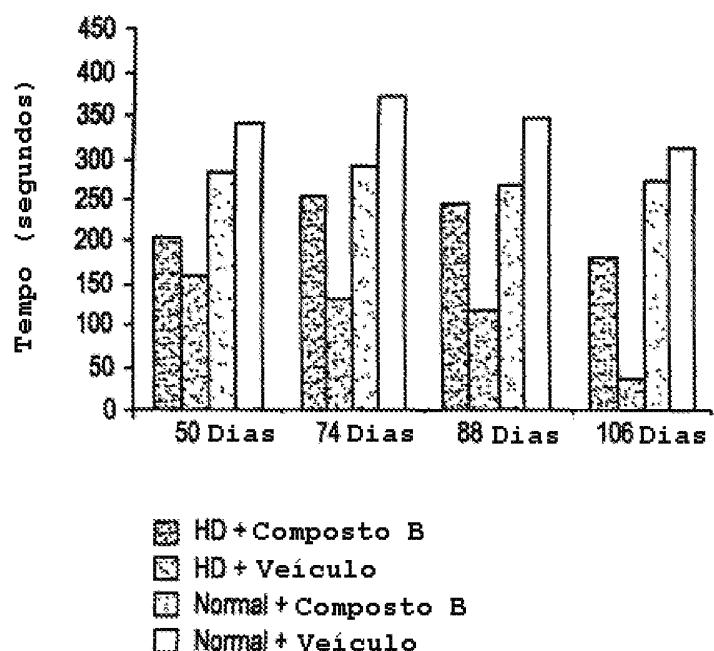


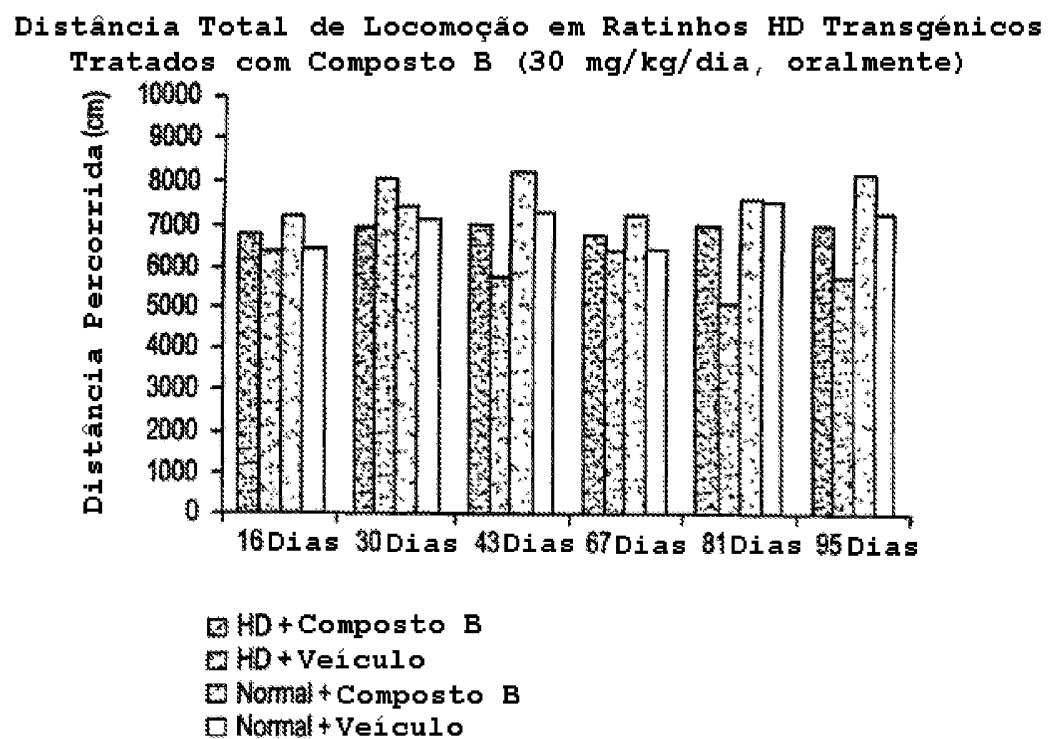
FIG. 34

FIG. 35

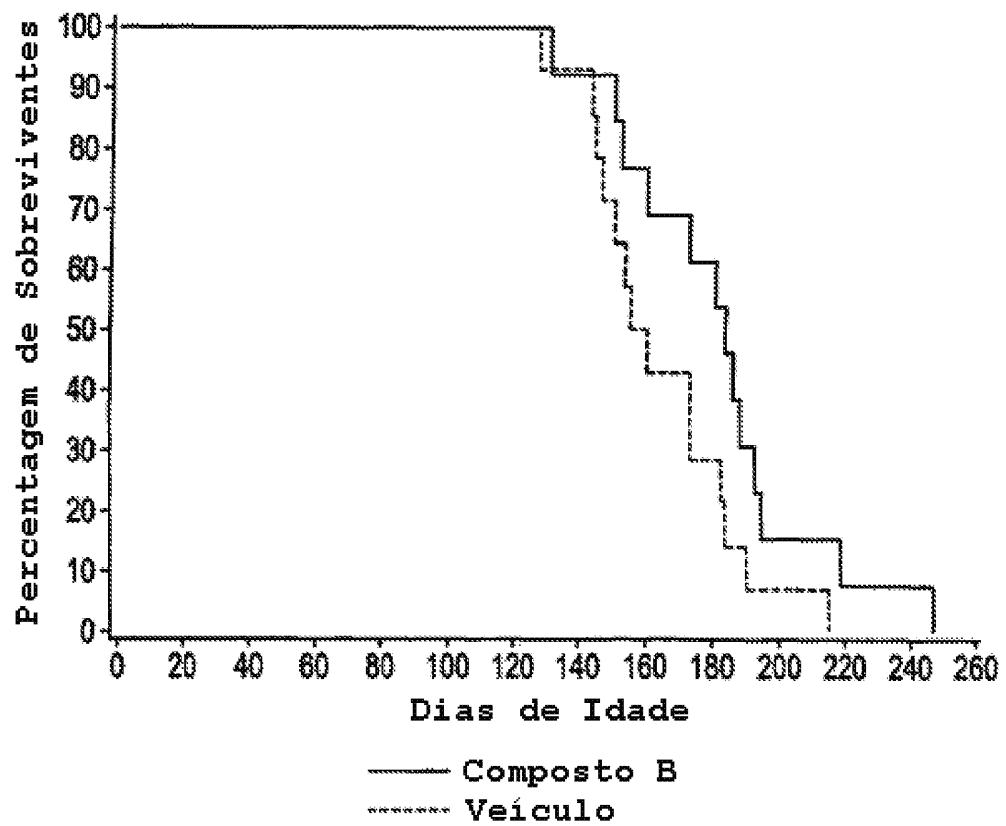


FIG. 36

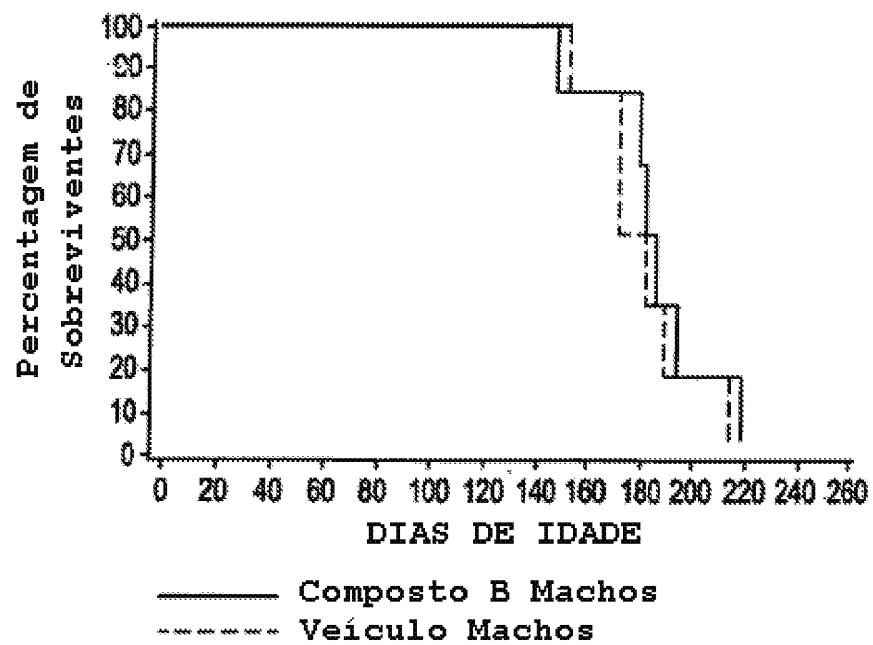


FIG. 37

