



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 756**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/00** (2006.01)  
**A61K 31/404** (2006.01)  
**A61P 19/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03729222 .4**  
96 Fecha de presentación : **07.01.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1465610**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.10.2004**

54 Título: **Uso de un inhibidor de GSK-3 $\beta$  en la fabricación de un medicamento para incrementar la formación ósea.**

30 Prioridad: **10.01.2002 US 348055 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2009**

73 Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**  
**Grenzacherstrasse 124**  
**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es: **Day-Lollini, Patricia Ann y**  
**Gong, Leyi**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

**ES 2 316 756 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Uso de un inhibidor de GSK-3 $\beta$  en la fabricación de un medicamento para incrementar la formación ósea.

5 La presente invención se refiere al uso de inhibidores de la sintasa quinasa-3 $\beta$  de glucógeno (GSK-3 $\beta$ ) según la fórmula (I) para promover la formación ósea y tratar las enfermedades metabólicas óseas como ser la osteoporosis.

La invención se refiere especialmente al uso de un inhibidor de GSK-3 $\beta$  para la preparación de medicamentos para aumentar la formación ósea en mamíferos.

10 La sintasa quinasa de glucógeno (GSK) es una serina/treonina quinasa para la cual se han identificado dos isoformas,  $\alpha$  y  $\beta$ . La sintasa quinasa-3 $\beta$  de glucógeno (GSK-3 $\beta$ ) fue originariamente identificada como una proteína quinasa la cual fosforilaba e inactivaba a la glucógeno sintasa, una enzima clave que regula la síntesis de glucógeno estimulada por insulina ((véase Embi y otros, Eur. J. Biochem. 107, 519-527, (1980); Rylatt y otros, Eur. J. Biochem. 107, 529-537 (1980); y Vandenheede y otros, J. Biol. Chem. 255, 11768-11774, (1980)). Posteriormente, se descubrió que GSK-3 $\beta$  es inhibida luego de la activación por insulina permitiendo así la activación de la sintasa de glucógeno. Por lo tanto, la inhibición de GSK-3 $\beta$  estimula los procesos dependientes de insulina y es útil en el tratamiento de la diabetes tipo 2 la cual es caracterizada por sensibilidad disminuida a la insulina y por un aumento en el nivel de glucosa en sangre. Se han utilizado una serie de fármacos tal como 5-yodotubercidina, metformina, troglitazonem, para tratar la diabetes. Sin embargo, estos fármacos tienen una aplicación limitada debido a que metformina puede causar hipoglucemia, troglitazonem puede causar hepatotoxicidad y 5-yodotubercidina, un inhibidor de GSK-3 conocido, inhibe otras serina/treonina y tirosina quinasas.

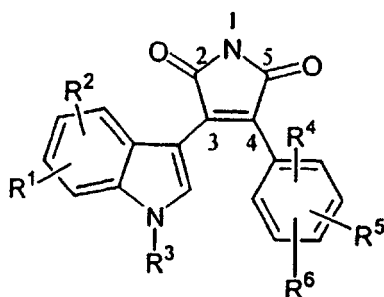
25 Recientemente, se ha descubierto que GSK-3 $\beta$  juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer ((véase Lovestone y otros, Current Biology, 4, 1077-86 (1994), Brownlee y otros, Neuroreport, 8, 3251-3255 (1997), Takashima y otros, PNAS 95, 9637-9641 (1998), y Pei y otros, J. Neuropathol. Exp., 56, 70-78 (1997)) y trastorno bipolar (véase Chen y otros, J. Neurochemistry, 72, 1327-1330 (1999)). También se ha descubierto que GSK-3 $\beta$  está involucrada en el bloqueo de la activación genética de respuesta inmune temprana por medio de NF-AT y en la regulación de apoptosis (véase Beals y otros, Science, 275, 1930-33 (1997) y Pap, M. y otros J. Biochem. 273, 19929-19932, (1998)). Adicionalmente, se informó que GSK-3 $\beta$  es necesaria para la respuesta de supervivencia mediada por NF- $\kappa$ B en la ruta de señalamiento de TNF- $\alpha$  involucrada en la respuesta proinflamatoria a la infección (Hoefflich y otros, Nature, 406, 86-90 (2000)).

35 Además, también se sabe que GSK-3 $\beta$  regula la degradación de una proteína ( $\beta$ -catenina) la cual controla la actividad de la familia TCF de factores de transcripción (véase Dale, T. C., Biochem. J. 329, 209-223 (1998); Clevers, H. & van de Wetering, M., Trends in Genetics 13, 485-489 (1997); Staal, F.J.T. y otros, International Immunology 11, 317-323 (1999)). Se ha demostrado que la ruta regula la transformación de células epiteliales colónicas.

40 Los inhibidores de GSK-3 $\beta$  se describen en las siguientes referencias: WO99/65897 (Chiron), WO 01/20727A1 (Sanofi-Synthelabo), EP 1 136 493 A1 (Sanofi-Synthelabo), EP 1 136 489 A1 (Sanofi-Synthelabo), EP 1 136 486 A1 (Sanofi-Synthelabo), EP 1 136 483 A1 (Sanofi-Synthelabo), EP 1 136 099 A1 (Sanofi-Synthelabo), WO 2000/021927 (SKB), WO 2001/049709, WO 2001/056567 (Novo Nordisk), WO 2001/081345, WO 2001/085685, WO 2001/009106 (SKB) y WO2001/52862 (Isis), WO2001/37819, WO2001/60374, EP 1 106 180A1 (CNRS), WO2000/38675 (SKB).

45 La presente invención se refiere al uso de inhibidores de la sintasa quinasa-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) de glucógeno según la fórmula (I) para promover la formación ósea.

50 En un aspecto, la invención se refiere al uso de inhibidores de GSK-3 $\beta$  para aumentar la densidad mineral ósea en un paciente. En otro aspecto, la invención se refiere al uso de inhibidores de GSK-3 $\beta$  para reducir el índice de fractura y/o incrementar el índice de curación de fracturas en un paciente. En otro aspecto, la invención se refiere al uso de inhibidores de GSK-3 $\beta$  para incrementar la formación ósea cancelosa y/o la nueva formación ósea en un paciente. En otro aspecto, la invención se refiere al uso de inhibidores de GSK-3 $\beta$  para tratar la osteoporosis. Por consiguiente, esta invención se refiere al uso de derivados de 3-indolil-4-fenil-1H-pirrol-2,5-diona representados por la Fórmula (I) para incrementar la formación ósea en un mamífero:



## ES 2 316 756 T3

en la cual:

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> representan independientemente hidrógeno, alquilo, halo, haloalquilo, alquiltio, hidroxilo, alcoxi, ciano, nitro, amino, acilamino, monoalquilamino, o dialquilamino;

R<sup>3</sup> representa hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, -COR<sup>7</sup> (en donde R<sup>7</sup> es hidrógeno o alquilo), o fenilo optativamente sustituido por uno o dos sustituyentes independientemente seleccionados entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, haloalquilo, alquiltio, hidroxilo, alcoxi, ciano, nitro, amino, acilamino, monoalquilamino y dialquilamino;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> representan independientemente hidrógeno, alquilo, halo, haloalquilo, alquiltio, hidroxilo, alcoxi, ciano, nitro, amino, acilamino, monoalquilamino o dialquilamino;

R<sup>6</sup> es heteroalquilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heterociclilo sustituido con heteroalquilo, cicloalquilo sustituido con heteroalquilo, cicloalquilo heterosustituido, -OR<sup>8</sup>, -S(O)<sub>n</sub>R<sup>8</sup> (en donde n es 0 a 2; y R<sup>8</sup> es heteroalquilo, heteroalquilalquilo, heterociclilo o heterociclilalquilo), -NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup> (en donde R<sup>9</sup> es hidrógeno o alquilo y R<sup>10</sup> es heteroalquilo, heteroalquilalquilo, cicloalquilo heterosustituido, heterociclilo o heterociclilalquilo) o -X-(alquilen)-Y-Z (en donde X es un enlace covalente, -O-, -NH- ó -S(O)<sub>n1</sub>- donde n1 es 0 a 2, e Y es -O-, -NH- ó -S- y Z es heteroalquilo o SiR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>R<sup>13</sup> donde R<sup>11</sup>, R<sup>12</sup> y R<sup>13</sup> son independientemente hidrógeno o alquilo) o R<sup>6</sup> junto con R<sup>4</sup> forma un grupo metilendioxi o etilendioxi cuando son adyacentes entre sí; o

su sal farmacéuticamente aceptable.

Los siguientes términos utilizados con respecto a la descripción de los compuestos de fórmula (I) en la memoria descriptiva y reivindicaciones tienen los significados proporcionados a continuación.

“Alquilo” significa un radical de hidrocarburo monovalente saturado lineal de uno a seis átomos de carbono o un radical de hidrocarburo monovalente saturado ramificado de tres a seis átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, 2-propilo, n-butilo, iso-butilo, ter-butilo, pentilo, y similares.

“Alquilen” significa un radical de hidrocarburo divalente saturado lineal de uno a seis átomos de carbono o un radical de hidrocarburo divalente saturado ramificado de tres a seis átomos de carbono, por ejemplo, metileno, etileno, 2,2-dimetiletileno, propileno, 2-metilpropileno, butileno, pentileno y similares.

“Alcoxi” significa un radical -OR donde R es un alquilo según lo definido anteriormente, por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi y similares.

“Alquiltio” significa un radical -SR donde R es un alquilo según lo definido anteriormente, por ejemplo, metiltio, etiltio, propiltio, butiltio y similares.

“Acilo” significa un radical -C(O)R, donde R es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, fenilo o fenilalquilo en donde alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo y fenilalquilo son según lo definido en la presente. Ejemplos representativos incluyen, pero sin limitación, formilo, acetilo, ciclohexilcarbonilo, ciclohexilmetilcarbonilo, benzoílo, bencilcarbonilo y similares.

“Acilamino” significa un radical -NR'C(O)R, donde R' es hidrógeno o alquilo, y R es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, fenilo o fenilalquilo en donde alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo y fenilalquilo son según lo definido en la presente. Ejemplos representativos incluyen, pero sin limitación, formilamino, acetilamino, ciclohexilcarbonilamino, ciclohexilmetilcarbonilamino, benzoilamino, bencilcarbonilamino y similares.

“Cicloalquilo” se refiere a un radical de hidrocarburo cíclico monovalente saturado de tres a siete carbonos en el anillo, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexilo, 4-metilciclohexilo y similares.

“Cicloalquilalquilo” significa un radical -R<sup>a</sup>R<sup>b</sup> donde R<sup>a</sup> es un grupo alquilen y R<sup>b</sup> es un grupo cicloalquilo según lo definido en la presente, por ejemplo, ciclohexilmetilo y similares.

“Dialquilamino” significa un radical -NRR' donde R y R' representan independientemente un grupo alquilo, cicloalquilo o cicloalquilalquilo según lo definido en la presente. Ejemplos representativos incluyen, pero sin limitación, dimetilamino, metiletilamino, di(1-metiletil)amino, (ciclo-hexil)(metil)amino, (ciclohexil)(etil)amino, (ciclohexil)(propil)amino, (ciclohexilmetil)(metil)amino, (ciclohexilmetil) (etil)amino y similares.

“Inhibidor de GSK-3β” significa un compuesto que tiene una IC<sub>50</sub> contra GSK-3β de menos de 100nM, preferentemente menos de 50 nM, más preferentemente menos de 10 nM cuando se mide por el ensayo de GSK-3β *in vitro* descrito en el Ejemplo Biológico 1 en la presente invención. Preferentemente, el inhibidor de GSK-3β es una molécula orgánica de peso molecular inferior a 1000 daltons. Particularmente útiles son los inhibidores de GSK-3β que muestran selectividad para GSK-3β con respecto a otras quinasas, como ser, por ejemplo, PKC, cdk1, cdk2, cdk4 y c-SRC.

## ES 2 316 756 T3

“Halo” significa fluoro, cloro, bromo o yodo, preferentemente fluoro y cloro.

“Haloalquilo” significa alquilo sustituido con uno o más átomos halo iguales o diferentes, por ejemplo,  $-\text{CH}_2\text{Cl}$ ,  $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CCl}_3$  y similares.

5 “Heteroalquilo” significa un radical alquilo según lo definido en la presente en donde uno, dos o tres átomos de hidrógeno han sido reemplazados con un sustituyente seleccionado independientemente entre el grupo que consiste en  $-\text{OR}^a$ ,  $-\text{NR}^b\text{R}^c$ , y  $-\text{S}(\text{O})_n\text{R}^d$  (donde n es un número entero de 0 a 2), con el entendimiento de que el punto de unión del radical heteroalquilo es a través de un átomo de carbono, en donde  $\text{R}^a$  es hidrógeno, acilo, alquilo, cicloalquilo, o cicloalquilalquilo;  $\text{R}^b$  y  $\text{R}^c$  son independientemente entre sí hidrógeno, acilo, alquilo, cicloalquilo, o cicloalquilalquilo; y cuando n es 0,  $\text{R}^d$  es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, o cicloalquilalquilo y cuando n es 1 ó 2,  $\text{R}^d$  es alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, amino, acilamino, monoalquilamino, o dialquilamino. Ejemplos representativos incluyen, pero sin limitación, 2-hidroxietilo, 3-hidroxipropilo, 2-hidroxi-1-hidroximetiletilo, 2,3-dihidroxipropilo, 1-hidroximetiletilo, 3-hidroxibutilo, 2,3-dihidroxibutilo, 2-hidroxi-1-metil-propilo, 2-aminoetilo, 3-aminopropilo, 2-metilsulfoniletilo, 15 aminosulfonilmetilo, aminosulfoniletilo, aminosulfonilpropilo, metilaminosulfonilmetilo, metilaminosulfoniletilo, metilaminosulfonilpropilo y similares.

20 “Hidroalquilo” significa un radical alquilo según lo definido en la presente, sustituido con uno o más, preferentemente uno, dos o tres grupos hidroxilo, siempre que el mismo átomo de carbono no porte más de un grupo hidroxilo. Ejemplos representativos incluyen, pero sin limitación, 2-hidroxietilo, 2-hidroxipropilo, 3-hidroxipropilo, 1-(hidroximetil)-2-metilpropilo, 2-hidroxibutilo, 3-hidroxibutilo, 4-hidroxibutilo, 2,3-dihidroxipropilo, 2-hidroxi-1-hidroximetiletilo, 2,3-dihidroxibutilo, 3,4-dihidroxibutilo y 2-(hidroximetil)-3-hidroxipropilo, preferentemente 2-hidroxietilo, 2,3-dihidroxipropilo y 1-(hidroximetil)-2-hidroxietilo. Por consiguiente, como se utiliza en la presente, el término “hidroalquilo” se utiliza para definir un subconjunto de grupos heteroalquilo.

25 “Cicloalquilo hetero sustituido” significa un radical cicloalquilo según lo definido en la presente en donde uno, dos o tres átomos de hidrógeno en el radical cicloalquilo han sido reemplazados con un sustituyente seleccionado independientemente entre el grupo que consiste en hidroxilo, alcoxi, amino, acilamino, monoalquilamino, dialquilamino, o  $-\text{S}(\text{O})_n\text{R}$  (donde n es un número entero entre 0 y 2) de modo que cuando n es 0, R es hidrógeno, alquilo, cicloalquilo o cicloalquilalquilo, y cuando n es 1 ó 2, R es alquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, amino, acilamino, monoalquilamino o dialquilamino. Ejemplos representativos incluyen, pero sin limitación, 2-, 3- ó 4-hidroxiciclohexilo, 2-, 3- ó 4-aminociclohexilo, 2-, 3- ó 4-sulfonamidociclohexilo y similares, preferentemente 4-hidroxiciclohexilo, 2-aminociclohexilo, 4-sulfonamidociclohexilo.

30 “Cicloalquilo sustituido con heteroalquilo” significa un radical cicloalquilo según lo definido en la presente en donde uno, dos o tres átomos de hidrógeno en el radical cicloalquilo han sido reemplazados con un grupo heteroalquilo con el entendimiento de que el radical heteroalquilo está unido al radical cicloalquilo mediante un enlace carbono-carbono. Ejemplos representativos incluyen, pero sin limitación, 1-hidroximetilciclopentilo, 2-hidroximetilciclohexilo y similares.

35 “Heteroarilo” significa un radical monocíclico o bicíclico monovalente de 5 a 12 átomos en el anillo que tiene al menos un anillo aromático que contiene uno, dos o tres heteroátomos en el anillo seleccionados entre N, O ó S, siendo C los átomos del anillo remanentes, con el entendimiento de que el punto de unión del radical heteroarilo estará en un anillo aromático. El anillo heteroarilo está optativamente sustituido independientemente con uno o más sustituyentes, preferentemente uno o dos sustituyentes, seleccionados entre alquilo, haloalquilo, heteroalquilo, hidroxilo, alcoxi, halo, nitro, ciano. Más específicamente, el término heteroarilo incluye, aunque no se limita a, piridilo, furanilo, tienilo, tiazolilo, isotiazolilo, triazolilo, imidazolilo, isoxazolilo, pirrolilo, pirazolilo, pirimidinilo, benzofuranilo, tetrahydrobenzofuranilo, isobenzofuranilo, benzotiazolilo, benzoisotiazolilo, benzotriazolilo, indolilo, isoindolilo, benzoxazolilo, quinolilo, tetrahydroquinolinilo, isoquinolilo, bencimidazolilo, bencisoxazolilo o benzotienilo y derivados de los mismos.

40 “Heteroalquilo” significa un radical  $-\text{R}^a\text{R}^b$  donde  $\text{R}^a$  es un grupo alquileo y  $\text{R}^b$  es un grupo heteroarilo según lo definido en la presente, por ejemplo, piridin-3-ilmetilo, imidazoliletilo, piridiniletilo, 3-(benzofuran-2-il)propilo y similares.

45 “Heterociclilo” significa un radical cíclico saturado de 5 a 8 átomos en el anillo en donde uno o dos átomos en el anillo son heteroátomos seleccionados entre NR (donde R es independientemente hidrógeno, alquilo o heteroalquilo), O, ó  $\text{S}(\text{O})_n$  (donde n es un número entero entre 0 y 2), siendo C los átomos del anillo remanentes, donde uno o dos átomos de C pueden ser optativamente reemplazados por un grupo carbonilo. El anillo de heterociclilo puede ser optativamente sustituido independientemente por uno, dos o tres sustituyentes seleccionados entre alquilo, haloalquilo, heteroalquilo, halo, nitro, ciano, hidroxilo, alcoxi, amino, monoalquilamino, dialquilamino,  $-\text{COR}$  (donde R es alquilo). Más específicamente, el término heterociclilo incluye, pero sin limitación, tetrahidropirani- 50 lo, 2,2-dimetil-1,3-dioxolano, piperidino, N-metilpiperidin-3-ilo, piperazino, N-metilpirrolidin-3-ilo, 3-pirrolidino, morfolino, tiomorfolino, tiomorfolino-1-óxido, tiomorfolino-1,1-dióxido, pirrolinilo, imidazolinilo y derivados de los mismos.

55 “Heterociclilo sustituido por heteroalquilo” significa un radical heterociclilo según lo definido en la presente en donde uno, dos o tres átomos de hidrógeno en el radical heterociclilo han sido reemplazados por un grupo heteroalquilo

## ES 2 316 756 T3

con el entendimiento de que el radical heteroalquilo está unido al radical heterociclilo mediante un enlace carbono-carbono. Ejemplos representativos incluyen, pero sin limitación, 4-hidroximetilpiperidin-1-ilo, 4-hidroximetilpiperazin-1-ilo, 4-hidroxietilpiperidin-1-ilo, 4-hidroxietilpiperazin-1-ilo y similares.

5 “Heterociclilalquilo”, “cicloalquilalquilo” o “fenilalquilo” significa un radical  $R^aR^b$  donde  $R^a$  es un grupo alquileo y  $R^b$  es fenilo o un grupo heterociclilo o cicloalquilo según lo definido en la presente, por ejemplo, tetrahidropirano-2-ilmetilo, 4-metilpiperazin-1-iletilo, 3-piperidinilmetilo, 2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-ilmetilo, bencilo, ciclohexilmetilo, y similares.

10 “Monoalquilamino” significa un radical -NHR donde R es un grupo alquilo, cicloalquilo o cicloalquilalquilo según lo definido anteriormente, por ejemplo, metilamino, (1-metiletil)amino, ciclohexilamino, ciclohexilmetilamino, ciclohexiletilamino y similares.

15 “Opcional” u “optativamente” significa que el evento o circunstancia posteriormente descrito puede ocurrir pero no necesariamente, y que la descripción incluye casos en donde el evento o circunstancia se produce y casos en los que no se produce. Por ejemplo, “grupo heterociclo optativamente mono- o di- sustituido con un grupo alquilo” significa que el alquilo puede estar presente pero no lo está necesariamente, y la descripción incluye situaciones en las que el grupo heterociclo está mono- o disustituido por un grupo alquilo y situaciones en las que el grupo heterociclo no está sustituido por el grupo alquilo.

20 “Fenilalquilo” significa un radical  $-R^aR^b$  donde  $R^a$  es un grupo alquileo y  $R^b$  es un grupo fenilo según lo definido en la presente, por ejemplo, bencilo y similares.

25 “Grupo protector hidroxilo o amino” se refiere a aquellos grupos orgánicos que tienen el propósito de proteger a los átomos de oxígeno y nitrógeno contra reacciones indeseables durante procedimientos sintéticos. Los grupos protectores de oxígeno y nitrógeno adecuados son bien conocidos en la técnica por ejemplo, trimetilsililo, dimetil-terbutilsililo, bencilo, benciloxycarbonilo (CBZ), ter-butoxicarbonilo (Boc), trifluoroacetilo, 2-trimetilsiletansulfonilo (SES), y similares. Otros se pueden encontrar en el libro de T. W. Greene y G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Segunda Edición, Wiley, Nueva York, 1991, y las referencias citadas en el mismo.

30 Los compuestos que tienen la misma fórmula molecular aunque difieren en la naturaleza o secuencia de unión de sus átomos o en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan “isómeros”. Los isómeros que se diferencian en la disposición de sus átomos en el espacio son denominados “estereoisómeros”. Los estereoisómeros que no son imágenes espejo entre sí son denominados “diastereómeros” y aquellos que son imágenes espejo que no se pueden superponer entre sí se denominan “enantiómeros”. Cuando un compuesto tiene un centro asimétrico, por ejemplo, está unido a cuatro grupos diferentes, un par de enantiómeros es posible. Un enantiómero puede ser caracterizado por la configuración absoluta de su centro asimétrico y se describe por las reglas de secuenciamiento R y S de Cahn y Prelog, o por la forma en que la molécula rota el plano de luz polarizada y se designa como dextrorrotatorio o levorotatorio (es decir, como isómeros (+) o (-) respectivamente). Un compuesto quiral puede existir como enantiómero individual o como una mezcla del mismo. Una mezcla que contiene proporciones iguales de los enantiómeros se denomina una “mezcla racémica”.

35 Los compuestos de Fórmula (I) pueden poseer uno o más centros asimétricos; tales compuestos pueden por ende ser producidos como estereoisómeros (R) ó (S) individuales o como sus mezclas. Por ejemplo, si el sustituyente  $R^6$  en un compuesto de fórmula (I) es 2-hidroxietilo, entonces el carbono al cual el grupo hidroxilo está unido es un centro asimétrico y, por lo tanto, el compuesto de fórmula (I) puede existir como un estereoisómero (R) ó (S). A menos que se indique lo contrario, la descripción o cuando se nombra un compuesto en particular en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones se tiene el propósito de incluir tanto los enantiómeros individuales como las mezclas, racémicas o no, de los mismos. Los métodos para la determinación de la estereoquímica y la separación de estereoisómeros son bien conocidos en la técnica (véase la descripción en el Capítulo 4 de “Advanced Organic Chemistry”, 4ª edición, J. March, John Wiley and Sons, Nueva York, 1992).

40 Un “excipiente farmacéuticamente aceptable” significa un excipiente que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y ni biológica ni de otro modo indeseable e incluye un excipiente que es aceptable para uso veterinario como así también para uso farmacéutico en humanos. Un “excipiente farmacéuticamente aceptable” como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones incluye tanto uno como más de un excipiente de ese tipo.

45 Una “sal farmacéuticamente aceptable” de un compuesto significa una sal que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto progenitor. Tales sales incluyen:

50 (1) sales de adición de ácidos, formadas con ácidos inorgánicos tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares; o formadas con ácidos orgánicos tal como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metansulfónico, ácido etansulfónico, ácido 1,2-etandisulfónico, ácido 2-hidroxietansulfónico, ácido bencensulfónico, ácido 4-clorobencensulfónico, ácido 2-naftalensulfónico, ácido 4-toluensulfónico, ácido canforsulfónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido

## ES 2 316 756 T3

butilacético terciario, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico y similares; o

(2) sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto progenitor está reemplazado por un ion de metal, por ejemplo, un ion de metal alcalino, un ion alcalinotérreo, o un ion de aluminio; o coordina con una base orgánica tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina y similares.

Un compuesto de Fórmula (I) puede actuar como un profármaco. Profármaco significa cualquier compuesto el cual libera un fármaco progenitor activo de acuerdo con la Fórmula (I) *in vivo* cuando tal profármaco es administrado a un sujeto mamífero. Los profármacos de un compuesto de Fórmula (I) son preparados modificando grupos funcionales presentes en el compuesto de Fórmula (I) en forma tal que las modificaciones pueden ser disociadas *in vivo* para liberar al compuesto progenitor. Los profármacos incluyen compuestos de Fórmula (I) en donde un grupo hidroxilo, amino o sulfhidrilo en el compuesto (I) está unido a cualquier grupo que puede ser disociado *in vivo* para regenerar el grupo hidroxilo, amino o sulfhidrilo libre, respectivamente. Ejemplos de profármacos incluyen, aunque no se limitan a ésteres (por ejemplo, derivados de acetato, formato y benzoato), carbamatos (por ejemplo, N,N-dimetilamino-carbonilo) de grupos funcionales hidroxilo en compuestos de Fórmula (I) y similares.

“Tratar” o “tratamiento” de una enfermedad incluye:

(1) evitar la enfermedad, es decir hacer que no se desarrollen los síntomas clínicos de la enfermedad en un mamífero que puede estar expuesto a, o predispuesto a la enfermedad aunque aun no experimenta o exhibe síntomas de la enfermedad,

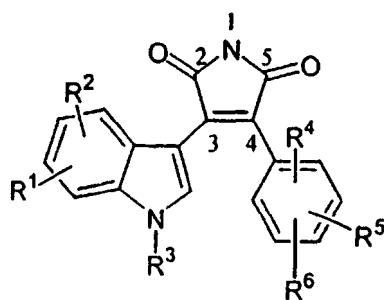
(2) inhibir la enfermedad, es decir, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o sus síntomas clínicos, o

(3) aliviar la enfermedad, es decir, causar la regresión de la enfermedad o de sus síntomas clínicos.

Una “cantidad terapéuticamente efectiva” significa la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un mamífero para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar tal tratamiento para la enfermedad. La “cantidad terapéuticamente efectiva” varía dependiendo del compuesto, la enfermedad y su gravedad y de la edad, peso, etc., del mamífero a ser tratado.

### Nomenclatura

La denominación y numeración de los compuestos de Fórmula (I) se ilustra a continuación.



La nomenclatura utilizada en esta solicitud se basa en general en las recomendaciones de IUPAC. Puesto que una estricta adherencia a estas recomendaciones daría como resultado que los nombres cambien sustancialmente cuando solo se cambia un único sustituyente, los compuestos han sido denominados en una forma que mantiene la consistencia de la nomenclatura para la estructura básica de la molécula. Por ejemplo,

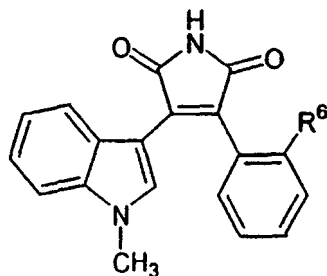
un compuesto de Fórmula (I) donde R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> son hidrógeno, R<sup>3</sup> es metilo, R<sup>6</sup> es 2-hidroxietilamino y es meta al carbono que adhiere el anillo de fenilo al anillo de pirrol-2,5-diona se denomina 3-(1-metilindolil)-4-[4-(2-hidroxietilaminofenil)-1H-pirrol-2,5-diona].

un compuesto de Fórmula (I) donde R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> son hidrógeno, R<sup>3</sup> es metilo, R<sup>6</sup> es 2-hidroxietilamino y es para el carbono que adhiere el anillo de fenilo al anillo de pirrol-2,5-diona se denomina 3-(1-metilindolil)-4-[4-(2-hidroxietilaminofenil)-1H-pirrol-2,5-diona].

Los compuestos preferidos de Fórmula (I) son seleccionados entre

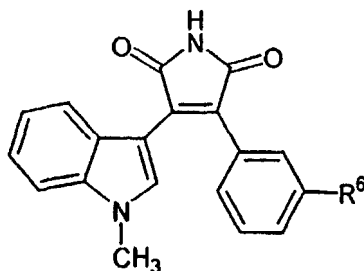
## ES 2 316 756 T3

I. Los compuestos de Fórmula (I) donde R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> = hidrógeno, R<sup>3</sup> = metilo, y R<sup>6</sup> es según lo definido a continuación son:



Comp. #	R <sup>6</sup>	pt. de F. °C	Espec. de Masas	EJ
I-1	2,3-dihidroxi- propoxi	245- 247,1	392 M <sup>+</sup>	1
I-2	2,2-dimetil- 1,3-dioxolan-4- ilmetiloxi	220,8- 221,2	432 M <sup>+</sup>	2

II. Otros compuestos preferidos de la invención son los compuestos de Fórmula (I) donde R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> = hidrógeno, R<sup>3</sup> = metilo, y R<sup>6</sup> es según lo definido a continuación son:



Comp. #	R <sup>6</sup>	pt. de F. °C	Espec. de Masas	EJ
II-1	Clorhidrato de 2-amino- etiloxi	182,4- 187	362 M <sup>+</sup>	6
II-2	Clorhidrato de 3-amino- propiloxi		375 M <sup>+</sup>	5
II-3	2(R),3-di-	177,7- 178	392 M <sup>+</sup>	2

## ES 2 316 756 T3

5		hidroxipro- poxi			
10	II-4	2-morfolin- 4-iletiloxi	197,7- 199	431 M <sup>+</sup>	3
15	II-5	2(S),3- dihidroxi- propoxi	176,9- 178,1	392 M <sup>+</sup>	2
20	II-6	(R)-2,2- dimetil- 1,3-dioxo- lan-4-ilme- tiloxi		432 M+	1
25					
30	II-7	(S)-2,2- dimetil- 1,3-dioxo- lan-4-ilme- tiloxi	186,8- 187,4	432 M+	1
35					
40					
45	II-8	(RS)-2,2- dimetil- 1,3-dioxo- lan-4-il- metilamino		431 M+	7
50					
55	II-9	2,3-dihi- droxi pro- pilamino	160- 163,5	392 (M+H) <sup>+</sup>	7
60	II-10	2,2-dime- til-1,3- dioxan-5- ilamino	201- 203	431 M <sup>+</sup>	9
65					



## ES 2 316 756 T3

5		nilsililo- xi)etilami- no			
10	II-18	Clorhidrato de 3-hidro- xipropil- amino	180- 192	376 (M+H) <sup>+</sup>	13
15					
20	II-19	Clorhidrato de 2-hidro- xietilamino	170,3- 170,6	362 (M+H) <sup>+</sup>	13
25					
30	II-20	3-hidroxi- propiloxi	150,2- 152,6	377 (M+H) <sup>+</sup>	13
35					
40	II-21	3-(ter-bu- til-dime- tilsililoxi )propiloxi	151,2- 151,7	491 (M+H) <sup>+</sup>	6
45					
50	II-22	(RS)-1-hi- droximetil- etil-amino	203,1- 205,8	376 (M+H) <sup>+</sup>	15
55					
60	II-23	3-hidroxi- 1-metilpro- pilamino		389 M <sup>+</sup>	14
65					
	II-24	(RS)-bis- (2,3-dihi- droxipro- pil)amino		466 (M+H) <sup>+</sup>	7

ES 2 316 756 T3

5	II-25	pirrolidin- 1-ilo		372 M <sup>+</sup>	4
10	II-26	(S)-2-hi- droxi-2- hidroximetri letilamino		392 (M+H) <sup>+</sup>	7
15	II-27	2(R),3-di- hidroxi- propilami- no. HCl		392 (M+H) <sup>+</sup>	7
20	II-28	4-hidroxi- ciclohexil- amino		415 M <sup>+</sup>	8
25	II-29	4-hidroxi- piperidin- 1-ilo	136,0- 141,0	402 (M+H) <sup>+</sup>	23
30	II-30	(R)-2,2- dimetil- 1,3-dioxo- lan-4-il- metilsulfan ilo		448 M <sup>+</sup>	18
35	II-31	(R)-2,3- dihidroxi- propilsulfa nilo		408 M <sup>+</sup>	21
40					
45					
50					
55					
60					
65					

## ES 2 316 756 T3

5 10 15	II-32	(R)-2,2- dimetil- 1,3-dioxo- lan-4-il- metilsulfin ilo	465 (M+H) <sup>+</sup>	19
20 25	II-33	(R)-2,3- dihidroxi- propilsulfi nilo	425 (M+H) <sup>+</sup>	21
30 35 40	II-34	(R)-2,2- dimetil- 1,3-dioxo- lan-4-il- metilsul- fonilo	481 (M+H) <sup>+</sup>	20
45 50	II-35	(R)-2,3- dihidroxi- propilsul- fonilo	411 (M+H) <sup>+</sup>	21

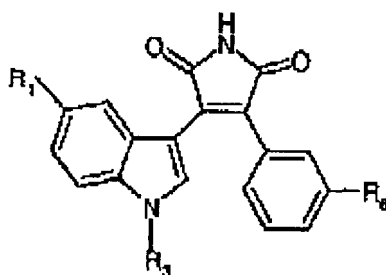
55

60

65

ES 2 316 756 T3

III. Otros compuestos preferidos de Fórmula (I) son aquellos en donde R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> = hidrógeno, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>6</sup> son según lo definido a continuación:

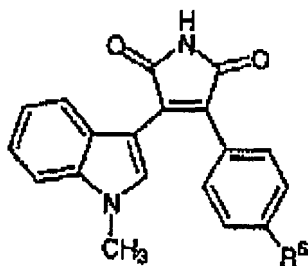


Comp. #	R <sup>1</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>6</sup>	P. de F. °C	Espec. de Masas	EJ
III-1	Cloro	metilo	(RS)-2,3-dihidroxi-propil amino	224,5- 225,7	426 (M+H) <sup>+</sup>	16
III-2	fluoro	metilo	clorhidrato de 3-amino-propiloxi	223,2- 225,0	410 (M+H) <sup>+</sup>	17
III-3	H	H	2-(morfolin-4-il)-etoxi		417 (M+H) <sup>+</sup>	3
III-4	cloro	metilo	((R)-2-hidroxi-2-hidroxi-metil) etiloxi		427 (M+H) <sup>+</sup>	24
III-5	fluoro	metilo	((R)-2-hidroxi-2-hidroxi-metil) etiloxi		411 (M+H) <sup>+</sup>	24
III-6	fluoro	3-hidroxi-propilo	(RS)-2,3-dihidroxi-propilamino		454 (M+H) <sup>+</sup>	22

ES 2 316 756 T3

5	III-7	metoxi	metilo	2,3-dihidroxi-propil-amino	421	25
10	III-8	metilo	metilo	2,3-dihidroxi-propil-amino	405	25
15	III-9	isopropoxi	metilo	2,3-dihidroxi-propil-amino	449	26

IV. También se prefieren los compuestos de Fórmula (I), en donde R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> = hidrógeno, R<sup>3</sup> = metilo, y R<sup>6</sup> es como se define a continuación:



45	Comp. #	R <sup>6</sup>	P. de F. °C	Espec. de Masas	EJ
50	IV-1	(R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il-metiloxi		432 M <sup>+</sup>	1
55	IV-2	(RS)-2,3-dihidroxi-propilamino	212- 213,5		7

ES 2 316 756 T3

5	IV-3	(RS)-2,2-dimetil- 1,3-dioxolan-4- il-metilamino	85- 87, 8		7
10	IV-4	3- hidroxibutilamino	58- 61, 5	389 M+	13
15	IV-5	(RS)-1-metil-2- hidroxietilamino		375	15
20	IV-6	2(R), 3- dihidroxiopoxi	220, 3- 222, 7	392 M+	1

25 V. Otros compuestos preferidos de Fórmula (I) son aquellos, en donde solamente uno de R<sup>4</sup>-R<sup>6</sup> es hidrógeno y los cuales se seleccionan entre

3-(1-metil-indol-3-il)-4-{3-((R)-2,3-dihidroxiopoxil)-2-metilfenil}-1H-pirrol-2,5-diona;

30 3-(1-metil-indol-3-il)-4-{3-((R)-2,3-dihidroxiopoxil)-2-nitrofenil}-1H-pirrol-2,5-diona; y

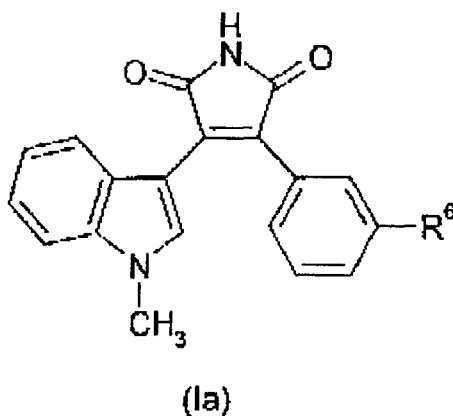
3-(1-metilindol-3-il)-4-[5-((R)-2,3-dihidroxiopoxi)-2-nitrofenil]-1H-pirrol-2,5-diona.

35 Los compuestos de Fórmula (I) están preparados mediante los métodos de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos copendiente Serie No. 09/916.706 presentada el 27 de julio, 2001 que se incorpora como referencia a la presente.

40 Otros compuestos que son útiles en los métodos descritos en la presente incluyen clorhidrato de N<sup>6</sup>-{2-[4-(2,4-dicloro-fenil)-5-(1H-imidazol-2-il)-pirimidin-2-ilamino]-etil}-3-nitro-piridin-2,6-diamina preparado según lo descrito en WO99/65897.

Se prefiere particularmente el uso o el método de tratamiento según lo mencionado anteriormente, en donde el inhibidor de GSK-3β se selecciona entre

45 a) un compuesto de fórmula



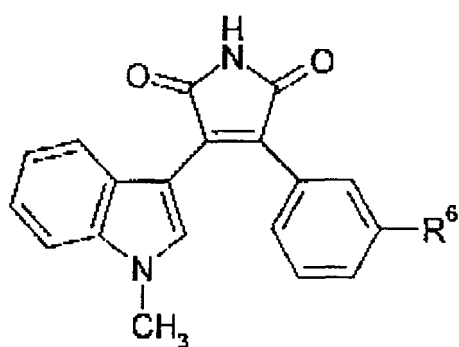
65 en donde R<sup>6</sup> es 2(R) 3-dihidroxiopoxi;

b) un compuesto de fórmula

5

10

15



(Ia)

20

en la cual R<sup>6</sup> es 2,3-dihidroxi-propilamino;

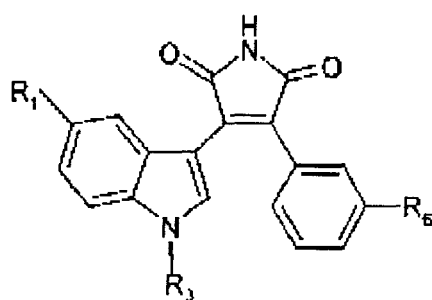
25

c) un compuesto de fórmula

30

35

40



(Ib)

45

en la cual R<sup>1</sup> es fluoro, R<sup>2</sup> es metilo y R<sup>6</sup> es 3-aminopropiloxi; y

50

d) N<sup>6</sup>-{2-[4-(2,4-dicloro-fenil)-5-(1H-imidazol-2-il)-pirimidin-2-ilamino]-etil}-3-nitro-piridin-2,6-diamina.

Se prefiere el uso de un inhibidor de GSK-3 $\beta$  para la preparación de medicamentos para aumentar la formación ósea en mamíferos.

55

Se prefiere adicionalmente el uso antes mencionado, en donde los medicamentos aumentan la densidad mineral ósea en un mamífero.

Otro aspecto preferido de la presente invención es el uso antes mencionado, en donde los medicamentos reducen la incidencia de fractura en un mamífero.

60

También se prefiere el uso antes descrito, en donde los medicamentos aumentan la curación de fracturas en un mamífero.

Se prefiere adicionalmente el uso antes mencionado de un inhibidor de GSK-3 $\beta$  para la preparación de medicamentos para la profilaxis y tratamiento de la osteoporosis en un mamífero.

65

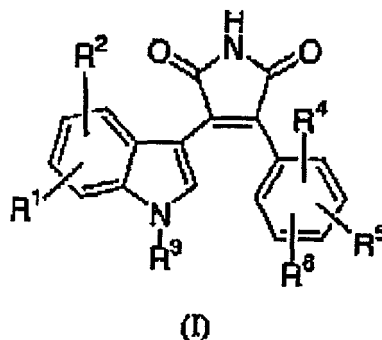
También se prefiere el método de tratamiento o prevención de la osteoporosis en un mamífero administrando al mamífero una cantidad efectiva de un inhibidor de GSK-3 $\beta$ .

## ES 2 316 756 T3

Se prefiere particularmente el uso antes mencionado o método, en donde el mamífero es un ser humano.

Se prefiere muy especialmente el uso o método antes mencionado, en donde el mamífero es una hembra.

5 Se prefiere el uso o método antes mencionado, en donde el inhibidor de GSK-3 $\beta$  es un compuesto representado por la Fórmula (I):



en la cual:

25 R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> representan independientemente hidrógeno, alquilo, halo, haloalquilo, alquiltio, hidroxilo, alcoxi, ciano, nitro, amino, acilamino, monoalquilamino, o dialquilamino;

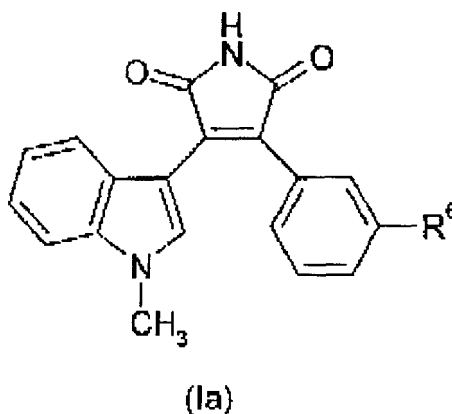
30 R<sup>3</sup> representa hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, -COR<sup>7</sup> (en donde R<sup>7</sup> es hidrógeno o alquilo), o fenilo optativamente sustituido con uno o dos sustituyentes independientemente seleccionados entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, haloalquilo, alquiltio, hidroxilo, alcoxi, ciano, nitro, amino, acilamino, monoalquilamino y dialquilamino;

35 R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> representan independientemente hidrógeno, alquilo, halo, haloalquilo, alquiltio, hidroxilo, alcoxi, ciano, nitro, amino, acilamino, monoalquilamino o dialquilamino;

40 R<sup>6</sup> es heteroalquilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heterociclilo sustituido con heteroalquilo, cicloalquilo sustituido con heteroalquilo, cicloalquilo heterosustituido, -OR<sup>8</sup>, -S(O)<sub>n</sub>R<sup>8</sup> (en donde n es 0 a 2; y R<sup>8</sup> es heteroalquilo, heteroalquilo, heterociclilo o heterociclilalquilo), -NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup> (en donde R<sup>9</sup> es hidrógeno o alquilo y R<sup>10</sup> es heteroalquilo, heteroalquilo, cicloalquilo heterosustituido, heterociclilo o heterociclilalquilo) o -X- (alquilen)-Y-Z (en donde X es un enlace covalente, -O-, -NH- ó -S(O)<sub>n1</sub>- donde n1 es 0 a 2, e Y es -O-, -NH- ó -S- y Z es heteroalquilo o SiR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>R<sup>13</sup> donde R<sup>11</sup>, R<sup>12</sup> y R<sup>13</sup> son independientemente hidrógeno o alquilo) o R<sup>6</sup> junto con R<sup>4</sup> forma un grupo metilendioxi o etilendioxi cuando son adyacentes entre sí; o su sal farmacéuticamente aceptable.

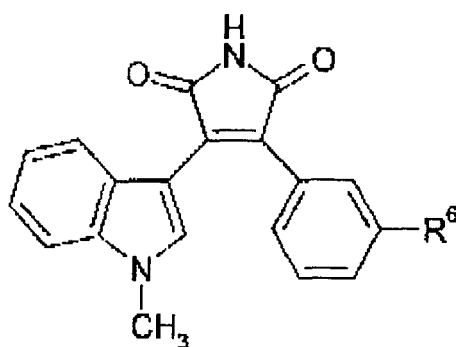
45 Se prefiere especialmente el uso o método antes mencionado, en donde el inhibidor de GSK-3 $\beta$  es seleccionado entre

a) un compuesto de fórmula



65 en la cual R<sup>6</sup> es 2(R) 3-dihidroxiopropoxi;

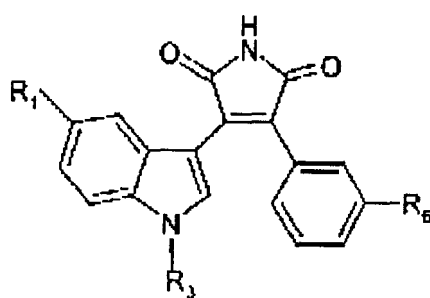
b) un compuesto de fórmula



(Ia)

20 en la cual R<sup>6</sup> es 2,3-dihidroxiopropilamino;

c) un compuesto de fórmula



(Ib)

40 en la cual R<sup>1</sup> es fluoro, R<sup>3</sup> es metilo y R<sup>6</sup> es 3-aminopropiloxi; y

45 d) N<sup>6</sup>-{2-[4-(2,4-dicloro-fenil)-5-(1H-imidazol-2-il)-pirimidin-2-ilamino]-etil}-3-nitro-piridin-2,6-diamina.

Se prefiere adicionalmente el uso o método antes mencionado, en el cual el inhibidor de GSK-3 $\beta$  es administrado por vía oral.

50 Otro aspecto preferido de la invención es el uso o método antes mencionado, en el cual el tratamiento con el inhibidor de GSK-3 $\beta$  es seguido por tratamiento con un agente antireabsorbedor.

También se prefiere el uso o método antes mencionado, en el cual el inhibidor de GSK-3 $\beta$  tiene una IC<sub>50</sub> contra GSK-3 $\beta$  de menos de 50 nM.

55 Se prefiere especialmente el uso o método antes mencionado, en el cual el inhibidor de GSK-3 $\beta$  tiene una IC<sub>50</sub> contra GSK-3 $\beta$  de menos de 10 nM.

60 Además se prefiere especialmente el uso o método antes mencionado, en el cual el inhibidor de GSK-3 $\beta$  tiene un peso molecular de menos de 1000 daltons.

### Utilidad, Ensayos y Administración

#### Utilidad

65 Los solicitantes han descubierto inesperadamente que una variedad de compuestos estructuralmente disímiles que comparten la característica en común de ser inhibidores de GSK-3 $\beta$  son efectivos para incrementar la formación de los huesos. Por consiguiente, los métodos descritos en la presente proporcionan tratamientos para incrementar la densidad

## ES 2 316 756 T3

mineral de los huesos, para formar huesos nuevos, aumentar el índice de curación de fracturas, mejorar las propiedades mecánicas de los huesos (es decir, formar hueso cortical y trabecular) y tratar la osteoporosis, osteoporosis yatrogénica y senil y enfermedades metabólicas de los huesos.

- 5 El tratamiento con los inhibidores de GSK-3 $\beta$  es útil en el tratamiento de la osteoporosis Tipo I (posmenopáusicas), Tipo II (yatrogénica) y Tipo III (senil), incluyendo aquella asociada con el tratamiento con corticoesteroides (por ejemplo, para el asma), con quimioterapia, como así también en el tratamiento de osteodistrofia debido a diálisis renal e hiperparatiroidismo.
- 10 El tratamiento con los inhibidores de GSK-3 $\beta$  según lo descrito en la presente da como resultado una incrementada densidad mineral ósea y a diferencia de los tratamientos convencionales provee huesos de buena calidad. Por lo tanto, los tratamientos descritos en la presente pueden reducir la incidencia de fractura y dar como resultado una más rápida curación de fracturas pre-existentes. Tales tratamientos son especialmente útiles para pacientes que sufren de falta de estrógenos (por ejemplo, mujeres mayores) quienes de otro modo correrían riesgo de un índice de fractura incrementado. Los tipos de fracturas tratables incluyen tanto las fracturas traumáticas como las osteoporóticas, por
- 15 ejemplo, fracturas de la cadera, cuello del fémur, muñeca, vértebra, espina dorsal, costillas, esternón, laringe y tráquea, radio/ulna, tibia, rótula, clavícula, pelvis, húmero, pierna inferior, dedos de las manos y de los pies, cara y rodilla.

### Ensayos

- 20 La identificación de los compuestos que inhiben GSK-3 $\beta$  puede realizarse mediante ensayos *in vitro* tal como ensayo de unión de ligandos y ensayo de inhibición de la degradación de catenina  $\beta$  según lo descrito en detalle en el Ejemplo Biológico 1 y 2 que aparecen a continuación.

### 25 Administración y Composición Farmacéutica

- En general, los inhibidores de GSK-3 $\beta$  serán administrados en una cantidad terapéuticamente efectiva mediante cualquiera de las modalidades de administración aceptadas para agentes que son utilizados para aumentar la formación ósea. La cantidad real del inhibidor dependerá de numerosos factores como la severidad de la enfermedad a ser tratada,
- 30 la edad y la salud relativa del sujeto, la potencia del compuesto utilizado, la vía y forma de administración y de otros factores. El inhibidor puede ser administrado más de una vez por día, preferentemente una vez o dos veces al día.

- Las cantidades terapéuticamente efectivas de los inhibidores de GSK-3 $\beta$  pueden oscilar entre aproximadamente 1 mg y 50 mg por kilogramo de peso corporal del receptor por día; preferentemente alrededor de 3 mg/kg/día. Por
- 35 consiguiente, para la administración a una persona de 70 kg, el rango de dosis sería de aproximadamente 70 a 3500 mg/día, más preferentemente sería de aproximadamente 200 mg por día.

- En general, los inhibidores de GSK-3 $\beta$  serán administrados como composiciones farmacéuticas mediante cualquiera de las siguientes rutas: oral, sistémica (por ejemplo, transdérmica, intranasal o por supositorio), o por vía parenteral (por ejemplo, intramuscular, intravenosa o subcutánea). La forma preferida de administración es la oral utilizando un régimen de dosificación diaria conveniente el cual se puede ajustar de acuerdo con el grado de enfermedad. Las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, semisólidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, soluciones, suspensiones, elixires, aerosoles o cualquier otra composición apropiada.

- 45 Un aspecto relacionado de esta invención se refiere a terapias de combinación de inhibidores de GSK-3 $\beta$  para una formación ósea incrementada con otros agentes activos tal como bisfosfonatos, estrógeno, SERMS (moduladores de los receptores de estrógeno selectivos), calcitoninas o terapias con anabólicos. Ejemplos de bisfosfonatos incluyen alendronato, ibandronato, pamidronato, etidronato y risedronato. Ejemplos de SERMS incluyen raloxifeno, dihidroraloxifeno y lasofoxifeno. Las calcitoninas incluyen calcitonina humana y de salmón. Los agentes anabólicos incluyen
- 50 hormonas paratiroideas (PTH) por ejemplo hPTH (1-34), PTH (1-84) y proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) y sus análogos. Los análogos en particular de PTHrP son descritos en "Mono- y Bicyclic Analogs of Parathyroid Hormone-Related Protein. 1. Synthesis and Biological Studies", Michael Chorev y otros *Biochemistry*, 36:3293-3299 (1997) y "Cyclic analogs of PTH and PTHrP", WO 96/40193 y Patente de los Estados Unidos No. 5.589.452 y WO 97/07815. El otro agente activo puede ser administrado concurrentemente, antes o después del inhibidor de GSK-3 $\beta$  y se puede administrar por un método de administración diferente. Preferentemente, el inhibidor de GSK-3 $\beta$  es administrado en primer lugar. El período de administración puede ser de cualquier longitud, aunque típicamente oscila entre seis y veinticuatro meses. Luego, este tratamiento es seguido por tratamiento con un agente anti-reabsorbedor por ejemplo, un bisfosfonato, SERM, calcitonina o terapia de reemplazo de hormonas.

- 60 Recientemente, se han desarrollado formulaciones farmacéuticas especialmente para fármacos que muestran poca biodisponibilidad en base al principio de que la biodisponibilidad puede ser aumentada aumentando el área superficial, es decir, disminuyendo el tamaño de partícula. Por ejemplo, la Pat. estadounidense No. 4.107.288 describe una formulación farmacéutica que tiene partículas en el rango de tamaño entre 10 y 1000 nm en donde el material activo es soportado en una matriz entrecruzada de macromoléculas. La Pat. estadounidense No. 5.145.684 describe la producción de una formulación farmacéutica en la cual la sustancia farmacológica es pulverizada a nanopartículas (tamaño de partícula promedio de 400 nm) en presencia de un modificador de superficie y luego dispersado en un medio líquido para dar una formulación farmacéutica que exhibe biodisponibilidad notablemente alta.
- 65

## ES 2 316 756 T3

Las composiciones farmacéuticas de los inhibidores de GSK  $3\beta$  contienen en general al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes aceptables son no tóxicos, ayudan a la administración y no afectan adversamente el beneficio terapéutico del inhibidor. Ese tipo de excipiente puede ser cualquier sólido, líquido, semisólido o, en el caso de una composición en aerosol, excipiente gaseoso que esté generalmente disponible para un experto en la técnica.

Los excipientes farmacéuticos sólidos incluyen almidón, celulosa, talco, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, cloruro de sodio, leche descremada secada y similares. Los excipientes líquidos y semisólidos pueden ser seleccionados entre glicerol, propilenglicol, agua, etanol y diversos aceites, incluyendo aquellos de origen animal, vegetal, sintético o de petróleo, por ejemplo, aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, etc. Los portadores líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables, incluyen agua, solución salina, dextrosa acuosa y glicoles.

Pharmaceutical Sciences, editado por E. W. Martin (Mack Publishing Company, 18 ed., 1990).

La cantidad del compuesto en una formulación puede variar dentro del rango completo empleado por los expertos en la técnica. Típicamente, la formulación contiene, en base al porcentaje en peso (% en peso), entre aproximadamente 0,01- 99,99% en peso de un inhibidor de GSK  $3\beta$  en base a la formulación total, siendo el resto uno o más excipientes farmacéuticos adecuados. Preferentemente, el compuesto está presente en un nivel de aproximadamente 1-80% en peso. ow.

### Ejemplos

Las siguientes preparaciones y ejemplos son proporcionados para permitir al experto en la técnica entender más claramente y llevar a la práctica la presente invención. No deben ser interpretados como limitaciones del alcance de la invención, sino meramente ilustrativos y representativos de la misma.

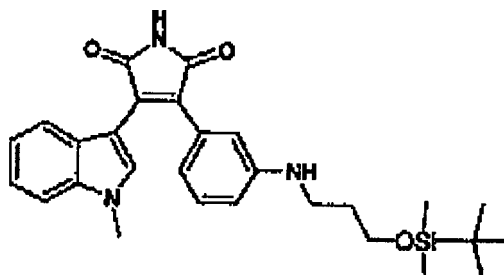
Las abreviaturas utilizadas en los ejemplos son definidas de la siguiente manera: "HCl" para ácido clorhídrico, "DMF" para dimetilformamida, "NaOH" para hidróxido de sodio, "KOH" para hidróxido de potasio, "DMSO" para dimetilsulfóxido, "NaHCO<sub>3</sub>" para bicarbonato de sodio, "NaCl" para cloruro de sodio, "K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>" para carbonato de potasio, "Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>" para carbonato de sodio, "LiOH" para hidróxido de litio, "Et<sub>3</sub>N" para trietilamina, "NH<sub>3</sub> (ac)" para hidróxido de amonio, "CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>" para cloruro de metileno, "MeOH" para metanol, "EtOH" para etanol, "Ph<sub>3</sub>P" para trifenilfosfina, "CsCO<sub>3</sub>" para carbonato de cesio, "BINAP" para 2,2-bis-(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo, "Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>" para tris(dibencilidenacetona)-dipaladio, "NaCNBH<sub>3</sub>" para cianoborohidruro de sodio, "THF" para tetrahydrofurano, "Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>" para sulfato de sodio, "RT" para temperatura ambiente, "PTLC" para cromatografía de capa delgada preparatoria, "SiO<sub>2</sub>" para gel de sílice, "EtOAc" para acetato de etilo, "APMA" para acetato aminofenil-mercúrico, "IL-1" para interleucina-1 y "RPMI" para Roswell Park Memorial Institute.

### Ejemplos Sintéticos

Los Ejemplos 1-3 muestran métodos para preparar compuestos específicos de Fórmula (I).

#### Ejemplo 1

*Síntesis de 3-(1-metilindol-3-il)-4-[3-(3-ter-butildimetilsililoxipropilamino)fenil]-1H-pirrol-2,5-diona*



#### Paso 1

Se agregó perrutenato de tetrapropilamonio (0,18 g, 5,3 mmol) a una mezcla de cloruro de metileno (20 ml) y acetonitrilo (2 ml) que contenía 3-(ter-butildimetilsililoxi)-propanol (2 g, 0,01 mmol), N-óxido de N-metilmorfolina (1,76 g) y tamices moleculares de 4Å. La mezcla de reacción se agitó a TA durante toda la noche y luego se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice. El filtrado se concentró bajo vacío para dar 3-(ter-butildimetilsililoxi)-propionaldehído (1,3 g, 66%).

## ES 2 316 756 T3

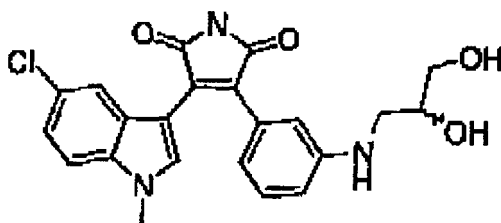
### Paso 2

Una mezcla de 3-(1-metilindol-3-il)-4-(3-aminofenil)-1H-pirrol-2,5-diona (0,2 g, 6 mmol) y 3-(ter-butildimetilsililoxi)propionaldehído (0,25 g, 13 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml) y MeOH (5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 15 min y luego se agregó  $\text{NaCNBH}_3$  (57 mg, 1,5 eq). La mezcla de reacción se agitó a TA durante toda la noche y luego se concentró bajo vacío. El residuo se purificó mediante TLC preparatoria para dar 98 mg de 3-(1-metilindol-3-il)-4-[3-(3-ter-butildimetilsililoxipropilamino)fenil]-1H-pirrol-2,5-diona (32%) EM (LSIMS):  $(\text{M}+\text{H})^+$  490, PF: 58-65°C.

Procediendo según lo descrito en el ejemplo 1 anterior, aunque sustituyendo el 3-(ter-butildimetilsililoxi)propanol con 2-(ter-butildifenilsililoxi)etanol se obtuvo la 3-(1-metilindol-3-il)-4-[3-(3-ter-butildifenilsilioxietilamino)-fenil]-1H-pirrol-2,5-diona.

### Ejemplo 2

*Síntesis de 3-(1-metil-5-cloroindol-3-il)-4-{3-[[((RS)-2,3-dihidroxi)propilamino]fenil]-1H-pirrol-2,5-diona*



### Paso 1

A una solución a temperatura ambiente de 5-cloroindol (4,97 g) en DMF seco (40 ml) se agregó pellas de hidróxido de potasio (2,76 g) y se agitó durante 1 h hasta que la mayor parte del sólido se disolvió. La mezcla resultante se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se agregó por goteo yodometano (2,45 ml) y luego se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente bajo argón. La mezcla de reacción se volcó en agua y se extrajo dos veces con EtOAc. Las porciones de EtOAc combinadas se combinaron, se lavaron con agua, se secaron sobre sulfato de magnesio, se concentraron, y se sometieron a cromatografía flash con 10% EtOAc/Hexano para dar 1-metil-5-cloroindol como un líquido rosado (5,43 g).

### Paso 2

Se preparó cloruro de 1-metil-5-cloroindol-3-glioxililo procediendo según lo descrito en el Ejemplo 1, Paso 1, aunque sustituyendo el 1-metil-5-cloroindol por 1-metilindol.

### Paso 3

Se preparó la 3-(1-metil-5-cloroindol-3-il)-4-(3-nitrofenil)furan-2,5-diona procediendo según lo descrito en el Ejemplo 1, Paso 2, aunque sustituyendo el cloruro de 1-metil-5-cloroindol-3-glioxililo por el cloruro de 1-metilindol-3-glioxililo.

### Paso 4

Se preparó la 3-(1-metil-5-cloroindol-3-il)-4-(3-nitrofenil)-1H-pirrol-2,5-diona procediendo según lo descrito en el Ejemplo 1, Paso 3, aunque sustituyendo la 3-(1-metil-5-cloroindol-3-il)-4-(3-nitrofenil)furan-2,5-diona por la 3-(1-metilindol-3-il)-4-(3-nitrofenil)furan-2,5-diona.

### Paso 5

Una mezcla de 3-(1-metil-5-cloroindol-3-il)-4-(3-nitrofenil)-1H-pirrol-2,5-diona (865 mg), paladio al 10% sobre carbón (90 mg) y HOAc glacial (35 ml) se agitó e hidrogenó a presión atmosférica utilizando un balón (2 h). La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de celite, se enfrió hasta 0°C y se agregaron pellas de KOH hasta lograr un pH 8. La solución se extrajo con EtOAc, se secó (sulfato de magnesio) y se separó. El producto crudo se sometió a cromatografía flash con 10% a 20% EtOAc-Hexano para proporcionar la 3-(1-metil-5-cloroindol-3-il)-4-(3-amino-fenil)-1H-pirrol-2,5-diona (495 mg).

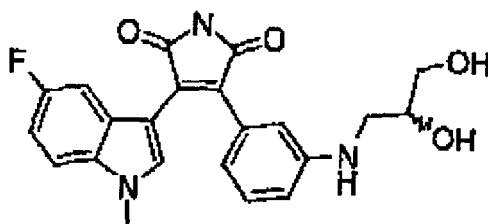
## ES 2 316 756 T3

### Paso 6

A una solución a temperatura ambiente de 3-(1-metil-5-cloroindol-3-il)-4-(3-aminofenil)-1H-pirrol-2,5-diona (492 mg) en metanol (250 ml) se agregó dímero de DL-gliceraldehído disuelto en agua (15 ml) seguido por cianoborohidru-  
ro de sodio (110 mg) y la mezcla de reacción se agitó durante toda la noche bajo argón. La reacción resultó completada  
en solo el 30% según TLC. Se agregaron más dímero (150 mg) y cianoborohidruro (100 mg). Después de otras 6 h, la  
reacción resultó completada en el 50%. El disolvente se eliminó y el residuo crudo se sometió a cromatografía flash  
con 5% a 7% hasta 10% MeOH/diclorometano. Se obtuvo 3-(1-metil-5-cloroindol-3-il)-4-{3-[(RS)-2,3-dihidroxi-  
propilamino]fenil}-1H-pirrol-2,5-diona en forma de un sólido de color rojo oscuro (220 mg). EM (EI): (M+H)<sup>+</sup> 426. P.  
de F. 224,8-226,1°C.

### Ejemplo 3

*Síntesis de 3-(1-metil-5-fluoroindol-3-il)-4-{3-[(RS)-2,3-dihidroxi-propilamino]fenil}-1H-pirrol-2,5-diona*



### Paso 1

Se preparó 1-metil-5-fluoroindol procediendo según lo descrito en el Ejemplo 2, Paso 1, aunque sustituyendo el 5-fluoroindol por 5-cloroindol.

### Paso 2

Se preparó el cloruro de 1-metil-5-fluoroindol-3-glioxililo procediendo según lo descrito en el Ejemplo 2, Paso 2, aunque sustituyendo el 1-metil-5-fluoroindol por 1-metil-cloroindol.

### Paso 3

Se preparó la 3-(1-metil-5-fluoroindol-3-il)-4-(3-nitrofenil)furan-2,5-diona procediendo según lo descrito en el Ejemplo 2, Paso 3, aunque sustituyendo el cloruro de 1-metil-5-fluoroindol-3-glioxililo por el cloruro de 1-metil-5-cloroindol-3-glioxililo.

### Paso 4

Se preparó la 3-(1-metil-5-fluoroindol-3-il)-4-(3-nitrofenil)-1H-pirrol-2,5-diona procediendo según lo descrito en el Ejemplo 2, Paso 3, aunque sustituyendo la 3-(1-metil-5-fluoroindol-3-il)-4-(3-nitrofenil)furan-2,5-diona por la 3-(1-metil-5-cloroindol-3-il)-4-(3-nitrofenil)furan-2,5-diona.

### Paso 5

Se preparó la 3-(1-metil-5-fluoroindol-3-il)-4-(3-aminofenil)-1H-pirrol-2,5-diona procediendo según lo descrito en el Ejemplo 2, Paso 5, aunque sustituyendo la 3-(1-metil-5-fluoroindol-3-il)-4-(3-nitrofenil)-1H-pirrol-2,5-diona por la 1-metil-5-cloroindol-3-il)-4-(3-nitrofenil)-1H-pirrol-2,5-diona.

### Paso 6

Se preparó la 3-(1-metil-5-fluoroindol-3-il)-4-{3-[(RS)-2,3-dihidroxi-propilamino]fenil}-1H-pirrol-2,5-diona procediendo según lo descrito en el Ejemplo 2, Paso 5, aunque sustituyendo la 3-(1-metil-5-fluoroindol-3-il)-4-(3-aminofenil)-1H-pirrol-2,5-diona por la 3-(1-metil-5-cloroindol-3-il)-4-(3-aminofenil)-1H-pirrol-2,5-diona. EM (EI) (M+H)<sup>+</sup> 410, PF: 223,2°C-225°.

## ES 2 316 756 T3

### Ejemplos de Formulación

Lo que sigue son formulaciones farmacéuticas representativas que contienen un compuesto de Fórmula (I).

5

#### Ejemplo 1

##### *Formulación de comprimidos*

10

Se mezclan los siguientes ingredientes íntimamente y se presionan en comprimidos con una única entalla.

15

20

25

30

Cantidad por Ingrediente	comprimido, mg
compuesto de esta invención	400
almidón de maíz	50
croscarmelosa sódica	25
lactosa	120
estearato de magnesio	5

#### Ejemplo 2

35

##### *Formulación de cápsulas*

Los siguientes ingredientes son mezclados íntimamente y cargados en una cápsula de gelatina de vaina dura.

40

45

50

55

60

65

Cantidad por Ingrediente	cápsula, mg
compuesto de esta invención	200
lactosa, secada por pulverización	148
estearato de magnesio	2

## ES 2 316 756 T3

### Ejemplo 3

#### *Formulación de suspensión*

5 Los siguientes ingredientes son mezclados para formar una suspensión para administración oral.

	Ingrediente	Cantidad
10	compuesto de esta invención	1,0 g
	Acido fumárico	0,5 g
15	cloruro de sodio	2,0 g
	metilparabeno	0,15 g
20	propilparabeno	0,05 g
	azúcar granulada	25,0 g
25	sorbitol (70% solución)	13,00 g
	Veegum K (Vanderbilt Co.)	1,0 g
30	saborizante	0,035 ml
	colorantes	0,5 mg
35	agua destilada	c.s. hasta 100 ml

### 40 Ejemplo 4

#### *Formulación de inyectable*

45 Los siguientes ingredientes son mezclados para formar una formulación inyectable.

	Ingrediente	Cantidad
50	compuesto de esta invención	0,2 mg- 20 mg
	solución tampón de acetato de sodio, 0,4 M	2,0 ml
55	HCl (1N) ó NaOH (1N)	c.s. hasta pH adecuado
60	agua (destilada, estéril)	c.s. hasta 20 ml

65

## ES 2 316 756 T3

### Ejemplo 5

#### *Formulación de supositorio*

5 Se prepara un supositorio de peso total 2,5 g mezclando el compuesto de la invención con Witepsol® H-15 (triglicéridos de ácido graso vegetal saturado; Riches-Nelson, Inc., Nueva York) y tiene la siguiente composición:

Compuesto de la invención	500 mg
10 Witepsol® H-15	resto

### **Ejemplos Biológicos**

#### 15 Ejemplo 1

#### *Inhibición de la Sintasa Quinasa -3β de glucógeno - ensayo in vitro*

20 La actividad inhibitoria de GSK-3β *in vitro* de los compuestos de esta invención se determinó con una forma truncada de enzima de GSK-3β de conejo recombinante.

#### *Aislación de GSK-3β*

25 La construcción fue clonada en el vector pGEX-3X de acuerdo con el procedimiento descrito en Wang, Q. M. y otros, J. Biol. Chem. 269, 14566- 14574 (1994). Diez aminoácidos en la terminal N fueron deletionados para obtener GSK-3β constitutivamente activa ((véase Murai H. y otros, FEBS Lett. 392, 153-50, (1996)). GSK-3β fue expresada en células BL21 DE3. Las células fueron cultivadas a 37°C hasta que alcanzaron la fase log media y luego inducidas con isopropil-beta-(D)-tiogalactopiranosido (concentración final 0,4 mM) a 30°C durante 2 h. Las células fueron homogeneizadas y el extracto celular se cargó en una columna de glutatona sefarosa 4B. GSK-3β fue eluida con tampón de glutatona (50 mM Tris pH 8 y 10 mM glutatona reducida). El eluido se recogió en fracciones de 3 minutos y se ensayó para determinar el contenido de GSK-3β en un SDS PAGE al 10% (electroforesis en gel de poliacrilamida). Las fracciones por encima de una altura pico de 20% fueron agrupadas, distribuidas en alícuotas, y almacenadas a -80°C hasta ser utilizadas.

#### *Inhibición de GSK-3β*

40 Se llevó a cabo el ensayo de unión de GSK-3β en reacciones de 50 μl en una placa de polipropileno de 96 pocillos, conteniendo cada reacción cloruro de magnesio 20 mM, ATP 40 μM, DTT 2 mM, 88,5 uM de sustrato de CREB-péptido fosforilado y biotilado (biotina-KRREILSRRPS (PO<sub>4</sub>)YR-OH, véase Wang, Q. M. y otros, J. Biol. Chem. 269, 14566- 14574 (1994), [γ-<sup>33</sup>P] ATP (1uCi) y 2 μl de compuestos de esta invención en DMSO (diversas concentraciones). Se agregaron 15 ul de GSK-3β (diversas concentraciones) y la mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 45 1 h. La reacción se detuvo transfiriendo 25 μl de la mezcla de reacción a una placa de fosfoceulosa que contenía 130 μl de ácido fosfórico 1,85%. Los radionucleótidos libres en la membrana se lavaron bajo vacío con ácido fosfórico al 1,85% (5 veces). Después del último lavado, la placa se transfirió a una placa aceptora y se agregaron 50 ul de cóctel de centelleo (Microscint-20, Packard, cat. # 20-133) a cada pocillo y la cantidad de radioactividad se contó en un contador superior.

50 Los compuestos de esta invención eran activos en este ensayo.

Las actividades inhibitorias de GSK-3β (expresadas como IC50, la concentración de inhibidor que causa un 50% de inhibición de la actividad en el control) de algunos compuestos de la invención descritos en la Tabla I-IV eran 55 menos de 2 μm. Las actividades de ciertos compuestos específicos se muestran a continuación

60

65

## ES 2 316 756 T3

Compuesto	IC <sub>50</sub> $\mu$ M
I-1	0,194
II-1	0,02
II-2	0,0264
II-3	0,0032
II-4	0,0296
II-9	0,0015
III-2	0,0007
III-3	0,23
IV-1	0,1334

### Ejemplo 2

#### *Inhibición de la degradación de catenina $\beta$ - ensayo *in vitro**

Se determinó la actividad de GSK-3 $\beta$  a base de células de los compuestos de esta invención midiendo los niveles de catenina  $\beta$  en células T Jurkat después del tratamiento con los compuestos de esta invención utilizando ELISA de la siguiente manera.

Las células Jurkat (5 x 10<sup>5</sup> células/ml) se colocaron en placas de 6 pocillos (6 ml/pocillo) y luego se trataron con diversas concentraciones de los compuestos de esta invención (preferentemente 1 nM- 10  $\mu$ M) durante 24 h. AL final de la incubación, las células fueron recogidas y lavadas una vez con PBS. Luego, las células fueron suspendidas en 0,3 ml de tampón de lisis de RadioImmuno Precipitation Assay (RIPA) (Boehringer Mannheim, cat.# 1 920 693). Después de 3 ciclos de congelación-descongelación, los extractos celulares fueron centrifugados a 15.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue recogido y analizado utilizando ensayo ELISA según lo descrito a continuación.

Se recubrieron placas de 96 micropocillos durante la noche con anticuerpo de captura (anti-catenina- $\beta$  monoclonal de ratón, Zymed La., cat. # 13-8400, 100  $\mu$ l por pocillo, que contenían 250 ng de anticuerpo) diluido en buffer de recubrimiento (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,5). Los pocillos fueron aspirados y lavados 3 veces con 300  $\mu$ l de tampón de lavado (PBS que contenía 0,05% Tween 20) y bloqueados con 200  $\mu$ l de diluyente de ensayo (PBS, RBS al 10%, pH 7; PharMingen) y luego se incubaron a temperatura ambiente durante por lo menos 72 h. Los pocillos fueron lavados nuevamente según lo descrito anteriormente. 100  $\mu$ l del sobrenadante de células Jurkat y diversas concentraciones de un patrón de catenina  $\beta$  (Behrens y otros, Nature, Vol. 382, p 638 (1996)) se agregaron a los pocillos y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Tras la incubación, los pocillos fueron lavados y se agregaron 100  $\mu$ l de anticuerpo anti-catenina  $\beta$  (Santa Cruz, catenina  $\beta$  H-102, sc-7199, IgG de conejo) diluido en diluyente de ensayo (1:1250) a cada pocillo y las células se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h. Después de lavado, se agregaron 100  $\mu$ l de detector de trabajo (Sigma B5283, IgG-Biotina anti-conejo monoclonal de ratón) diluido en diluyente de ensayo (1:2000) en cada pocillo y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Se utilizó 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (PharMingen, Cat. # 2642KK) para el desarrollo del color. La reacción se detuvo agregando 50  $\mu$ l de solución stop (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N) a cada pocillo. Las placas se leyeron con un lector de placas ELISA a 570 nm dentro de los 30 min., de la interrupción de la reacción.

El nivel de inhibición de GSK-3 $\beta$  se calculó trazando la concentración del compuesto contra los niveles de catenina  $\beta$ . Los resultados se muestran en la Figura 1, confirmando el efecto de los compuestos de esta invención sobre los niveles de catenina  $\beta$ .

## ES 2 316 756 T3

### Ejemplo 3

#### *Estudio GSK8 - Formación Osea en Ratas tratadas con el Compuesto II-3*

5 Se utilizaron ratas Brown-Norway sensibilizadas con ovalbúmina. Las mismas fueron sensibilizadas i.p. con 100 ug de OA (ovalbúmina) en 0,2 ml de alumbre una vez cada semana durante tres semanas (Día 0, 7 y 14). Siete días después de la sensibilización final (Día 21), las ratas fueron sometidas a OA 1% durante 45 minutos y sacrificadas 72hrs después (día 24). Se administró el compuesto II-3 dos veces al día por cebadura oral los Días 6-8 y los Días 13-23. El compuesto fue preparado como una formulación de liposomas - 8 mg/ml solución de liposomas en una  
10 composición de liposomas de 1,44 gramos de compuesto y 54 gramos de L-alfa-fosfatidilcolina en 160 ml de agua estéril para inyección.

Las muestras de fémur fueron descalcificadas en ácido fórmico al 10%, incrustadas en parafina, seccionadas a un espesor de cinco micrones y coloreadas con hematoxilina y eosina. Los animales tuvieron aumentos moderados en  
15 huesos cancelosos bajo la placa de crecimiento del fémur según lo evaluado por microscopía luminosa.

### Ejemplo 4

#### *Estudio de Formación de Huesos MT021 en Ratas con Compuesto II-9*

El compuesto fue formulado como una solución en 10% p/v Solutol. Ratas Wistar machos fueron dosificadas por cebadura oral, una vez por día durante 14 días a 25, 75 ó 150 mg/kg/día y se comparó con el control vehículo (10% Solutol, 10 ml/kg/día). Se efectuaron necropsopías completas y los tejidos se conservaron en formalina al 10%. El  
25 fémur, esternón y la vértebra fueron procesados y analizados según lo descrito en el Ejemplo 3. Se observó hueso canceloso incrementado en todos los grupos - solamente un animal en el grupo de 25 mg/kg. Cinco de seis ratas en el grupo de 150 mg/kg tuvieron formación ósea nueva incrementada, un efecto más intenso y activo.

### Ejemplo 5

#### *Anabolismo Oseo en la Rata*

Dos inhibidores de GSK-3 $\beta$  estructuralmente disímiles III-2 y N<sup>6</sup>-{2-[4-(2,4-dicloro-fenil)-5-(1H-imidazol-2-il)-pirimidin-2-ilamino]-etil}-3-nitro-piridin-2,6-diamina (Compuesto X) fueron ensayados para determinar la actividad anabólica ósea en el modelo de rata osteopénica. Ratas de tres meses de edad fueron sometidas a ovariectomía (Ovx) y se les administró hormona paratiroidea bovina (Aminoácidos <sup>1-34</sup>) (bPTH en la Tabla) o uno de los compuestos de la presente invención una vez por día por boca comenzando al menos 4 semanas luego de la ovariectomía y continuando hasta el sacrificio final después de tres semanas de tratamiento diario. Los grupos control, tanto las ratas que no  
40 fueron ovariectomizadas o "Sustitutas" y las sometidas a Ovx, recibieron vehículo solamente. La hormona paratiroidea bovina, bPTH, fue analizada a 40  $\mu$ g/kg (dosis óptima) como un control positivo interno para determinar la actividad anabólica. El efecto en III-2 también fue ensayado en animales que no fueron sometidos a ovariectomía intactos. Se recogieron muestras de orina y sangre a 2-3 semanas después del inicio del tratamiento y se determinó la cantidad de calcio en suero y orina.

La densidad mineral ósea del fémur derecho se determinó utilizando el Software de Alta Resolución en un Densitómetro Oseo QDR-4500W Bone Densitometer<sup>TM</sup> (Hologic, Waltham, MA). Los animales fueron examinados colocándolos en un bloque de plexiglass en una posición supina de modo que la pierna derecha estaba perpendicular al cuerpo principal y la tibia estaba perpendicular al fémur. El aumento en la densidad mineral ósea y la cantidad de  
50 calcio en la orina y en el suero para los compuestos se proporcionan en la tabla que aparece a continuación. Se observó la eficacia para ambos compuestos a dosis que no estaban asociadas con hipercalcemia o hipercalciuria. Se observaron resultados similares en la tibia.

55

60

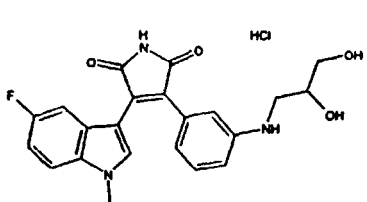
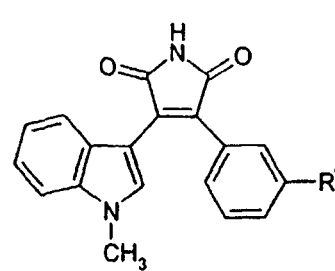
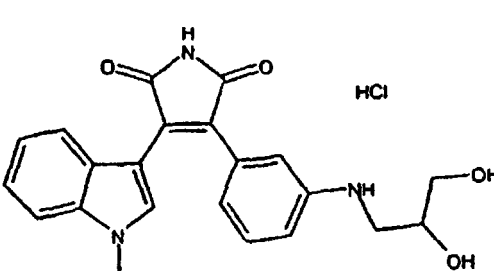
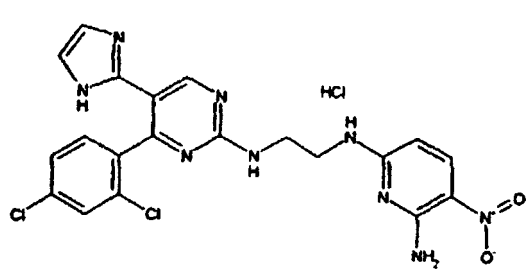
65

ES 2 316 756 T3

Comp. #	Cirugía	Tratamiento	Dosis mg/kg/día	ESPINA LUMBAR % Cambio 3 sem. BMD	FÉMUR ENTERO % Cambio 3 sem. BMD	Suero Calcio mg/dl	Orina Calcio/Creatinina mg/mmol
5							
10							
15	III-2	Sustituto Vehículo	0	3,2 ± 2,0	6,0 ± 0,8	10,5+ 0,1	0,230+ 0,035
		Ovx Vehículo	0	3,4 ± 1,4	4,5 ± 1,1	10,1+0,1++	0,145+ 0,026
20		Ovx bPTH	0,04	12,2± 1,5	16,6± 0,9	10,2+ 0,1	0,171+ 0,013
				++++	++++	++	
25		Ovx Ro330-3544	30	7,9 ± 1,8	11,6± 0,9	10,1+ 0,1	0,109+ 0,056
					++++	++	++
30	III-2	Sustituto Vehículo	0	7,6 ± 1,7	7,8 ± 1,5	10,3+ 0,2	0,070+ 0,013
		Sustituto bPTH	0,04	15,7± 0,8	11,7± 1,0	10,1+ 0,3	0,085+ 0,013
35				++++			
40		Sustituto Ro330-3544	30	9,5 ± 1,8	13,1 ± 1,3	10,2 + 0,1	0,041 + 0,005
					++		+
45		Sustituto Vehículo	0	-2,3± 0,8	0,4 ± 1,0	11,0+ 0,1	0,169+ 0,011
						**	**
50	X	Ovx Vehículo	0	-3,5± 1,6	-0,9± 0,7	10,4+ 0,1	0,083+ 0,010
		Ovx bPTH	0,04	8,6 ± 1,8	7,0 ± 1,1	11,0+ 0,2	0,108+ 0,015
55				++++	++++	**	++
60		Ovx Ro43874-92	75	3,0 ± 1,3	3,0 ± 1,4	10,4+ 0,1	0,045+ 0,006
				+++	*	++	+++
65							

# ES 2 316 756 T3

La Tabla que aparece a continuación muestra los inhibidores de GSK-3 $\beta$  utilizados en los Ejemplos 3-5 y sus IC50 en el ensayo de GSK-3 $\beta$  del Ejemplo Biológico 1

5	Número de Comp.	Estructura	IC50 (nM)
10	III-2		0,7
20	II-3		3,2
	R <sup>6</sup> es 2(R) 3-dihidroxipropoxi		
35	II-9		1,5
50	Compuesto X		1,7

## ES 2 316 756 T3

La invención que antecede ha sido descrita con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo, para los propósitos de claridad y entendimiento. Será obvio para el experto en la técnica que se pueden efectuar cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Por lo tanto, debe entenderse que la descripción que antecede tiene fines ilustrativos y no restrictivos. El alcance de la invención, por ende, debe ser determinado no con referencia a la descripción que antecede, sino que debería ser determinado con referencia a las siguientes reivindicaciones adjuntas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

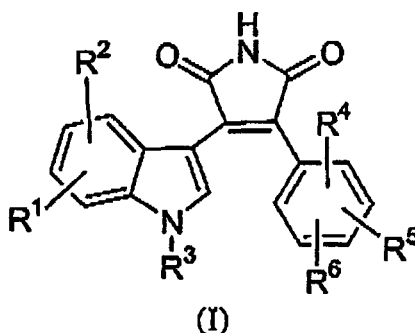
55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. El uso de un inhibidor de GSK-3 $\beta$  para la preparación de medicamentos para aumentar la formación ósea en mamíferos, en el cual el inhibidor de GSK-3 $\beta$  es un compuesto representado por la Fórmula (I):



en la cual:

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> representan independientemente hidrógeno, alquilo, halo, haloalquilo, alquiltio, hidroxilo, alcoxi, ciano, nitro, amino, acilamino, monoalquilamino, o dialquilamino;

R<sup>3</sup> representa hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, -COR<sup>7</sup> (en donde R<sup>7</sup> es hidrógeno o alquilo), o fenilo optativamente sustituido con uno o dos sustituyentes independientemente seleccionados entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, haloalquilo, alquiltio, hidroxilo, alcoxi, ciano, nitro, amino, acilamino, monoalquilamino y dialquilamino;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> representan independientemente hidrógeno, alquilo, halo, haloalquilo, alquiltio, hidroxilo, alcoxi, ciano, nitro, amino, acilamino, monoalquilamino o dialquilamino;

R<sup>6</sup> es heteroalquilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heterociclilo sustituido con heteroalquilo, cicloalquilo sustituido con heteroalquilo, cicloalquilo heterosustituido, -OR<sup>8</sup>, -S(O)<sub>n</sub>R<sup>8</sup> (en donde n es 0 a 2; y R<sup>8</sup> es heteroalquilo, heteroalquilo, heterociclilo o heterociclilalquilo), -NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup> (en donde R<sup>9</sup> es hidrógeno o alquilo y R<sup>10</sup> es heteroalquilo, heteroalquilo, cicloalquilo heterosustituido, heterociclilo o heterociclilalquilo) o -X- (alquilen)-Y-Z (en donde X es un enlace covalente, -O-, -NH- ó -S(O)<sub>n1</sub>- donde n1 es 0 a 2, e Y es -O-, -NH- ó -S- y Z es heteroalquilo o SiR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>R<sup>13</sup> donde R<sup>11</sup>, R<sup>12</sup> y R<sup>13</sup> son independientemente hidrógeno o alquilo) o R<sup>6</sup> junto con R<sup>4</sup> forma un grupo metilendioxi o etilendioxi cuando son adyacentes entre sí; o

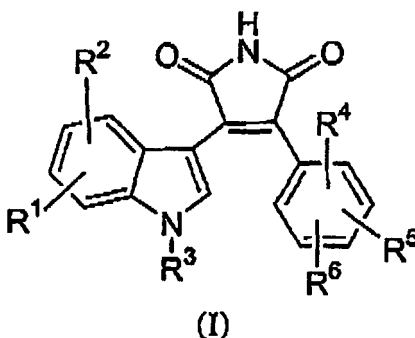
su sal farmacéuticamente aceptable.

2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los medicamentos aumentan la densidad mineral ósea en un mamífero.

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde los medicamentos reducen la incidencia de fractura en un mamífero.

4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde los medicamentos aumentan la curación de fracturas en un mamífero.

5. El uso de un inhibidor de GSK-3 $\beta$  para la preparación de medicamentos para la profilaxis y tratamiento de osteoporosis en un mamífero, en el cual el inhibidor de GSK-3 $\beta$  es un compuesto representado por la Fórmula (I):



## ES 2 316 756 T3

en la cual:

$R^1$  y  $R^2$  representan independientemente hidrógeno, alquilo, halo, haloalquilo, alquiltio, hidroxilo, alcoxi, ciano, nitro, amino, acilamino, monoalquilamino, o dialquilamino;

$R^3$  representa hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, heteroalquilo,  $-\text{COR}^7$  (en donde  $R^7$  es hidrógeno o alquilo), o fenilo optativamente sustituido con uno o dos sustituyentes independientemente seleccionados entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, haloalquilo, alquiltio, hidroxilo, alcoxi, ciano, nitro, amino, acilamino, monoalquilamino y dialquilamino;

$R^4$  y  $R^5$  representan independientemente hidrógeno, alquilo, halo, haloalquilo, alquiltio, hidroxilo, alcoxi, ciano, nitro, amino, acilamino, monoalquilamino o dialquilamino;

$R^6$  es heteroalquilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, heterociclilo sustituido con heteroalquilo, cicloalquilo sustituido con heteroalquilo, cicloalquilo heterosustituido,  $-\text{OR}^8$ ,  $-\text{S(O)}_n\text{R}^8$  (en donde  $n$  es 0 a 2; y  $R^8$  es heteroalquilo, heteroalquilo, heterociclilo o heterociclilalquilo),  $-\text{NR}^9\text{R}^{10}$  (en donde  $R^9$  es hidrógeno o alquilo y  $R^{10}$  es heteroalquilo, heteroalquilo, cicloalquilo heterosustituido, heterociclilo o heterociclilalquilo) o  $-\text{X}-$  (alquilen)- $\text{Y}-\text{Z}$  (en donde  $\text{X}$  es un enlace covalente,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{NH}-$  ó  $-\text{S(O)}_{n1}-$  donde  $n1$  es 0 a 2, e  $\text{Y}$  es  $-\text{O}-$ ,  $-\text{NH}-$  ó  $-\text{S}-$  y  $\text{Z}$  es heteroalquilo o  $\text{SiR}^{11}\text{R}^{12}\text{R}^{13}$  donde  $R^{11}$ ,  $R^{12}$  y  $R^{13}$  son independientemente hidrógeno o alquilo) o  $R^6$  junto con  $R^4$  forma un grupo metilendioxi o etilendioxi cuando son adyacentes entre sí; o

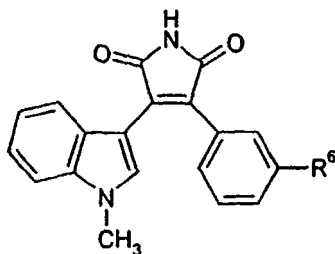
su sal farmacéuticamente aceptable.

6. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual el mamífero es un ser humano.

7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual el mamífero es una hembra.

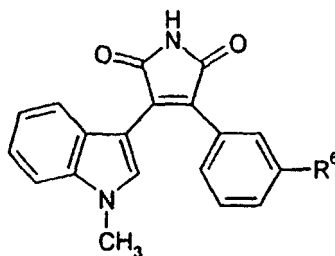
8. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el inhibidor de  $\text{GSK-3}\beta$  es elige entre

a) un compuesto de fórmula



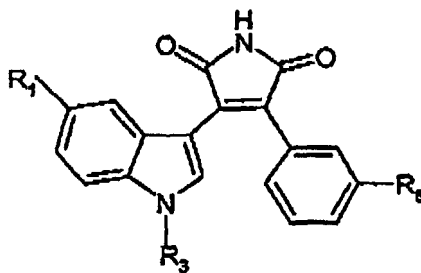
en la cual  $R^6$  es 2(R) 3-dihidroxipropoxi;

b) un compuesto de fórmula



en la cual  $R^6$  es 2,3-dihidroxipropilamino:

c) un compuesto de fórmula



(Ib)

20 en la cual R<sup>1</sup> es fluoro, R<sup>3</sup> es metilo y R<sup>6</sup> es 3-aminopropiloxi; y

d) N<sup>6</sup>-{2-[4-(2,4-dicloro-fenil)-5-(1H-imidazol-2-il)-pirimidin-2-ilamino]-etil}-3-nitro-piridin-2,6-diamina.

25 9. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el cual el inhibidor de GSK-3 $\beta$  es administrado por vía oral.

10. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el cual el tratamiento con el inhibidor de GSK-3 $\beta$  es seguido por tratamiento con un agente antireabsorbedor.

30 11. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el cual el inhibidor de GSK-3 $\beta$  tiene una IC<sub>50</sub> contra GSK-3 $\beta$  de menos de 50 nM.

35 12. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el cual el inhibidor de GSK-3 $\beta$  tiene una IC<sub>50</sub> contra GSK-3 $\beta$  de menos de 10 nM.

13. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el cual el inhibidor de GSK-3 $\beta$  tiene un peso molecular de menos de 1000 daltons.

40

45

50

55

60

65