

(11) Número de Publicação: **PT 1565429 E**

(51) Classificação Internacional:

C07C 275/42 (2007.10) **C07C 309/46** (2007.10)
C07D 209/40 (2007.10) **C07D 213/72** (2007.10)
C07D 231/56 (2007.10) **C07D 257/04** (2007.10)
C07D 271/07 (2007.10) **C07D 333/36** (2007.10)
A61K 31/17 (2007.10) **A61K 31/19** (2007.10)
A61K 31/381 (2007.10) **A61K 31/416** (2007.10)
A61K 31/4245 (2007.10) **A61K 31/44**
(2007.10)

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

(22) Data de pedido: **2003.11.10**

(30) Prioridade(s): **2002.11.21 DK 200201803**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.08.24**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.05.13**
141/2009

(73) Titular(es):

NEUROSEARCH A/S
PEDERSTRUPVEJ 93 DK-2750 BALLERUP
DINAMARCA **DK**

(72) Inventor(es):

ELSEBET OSTERGAARD NIELSEN **DK**
DAN PETERS **DK**
JON VALGEIRSSON **IS**

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **DERIVADOS DE DIARIL-UREÍDO E SUA UTILIZAÇÃO MÉDICA**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

"Derivados de diaril-ureído e sua utilização médica"

O invento refere-se a novos derivados de diaril-ureia úteis como antagonistas selectivos e não competitivos do receptor GluR5 ionotrópico.

Devido à sua actividade biológica, os derivados de diaril-ureia do invento são considerados úteis para tratar doenças que são responsáveis pela modulação de um receptor aspartato ou glutamato.

Além disto, o invento proporciona compostos químicos para utilização de acordo com o invento, assim como composições farmacêuticas compreendendo os compostos químicos e métodos para tratar doenças ou perturbações ou condições responsáveis pela modulação de um receptor aspartato ou glutamato.

Arte precedente

A neurotransmissão excitatória no sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos é principalmente mediada pelo aminoácido, L-glutamato, que actua nos receptores ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos, que respondem a este aminoácido, têm sido divididos nos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), nos receptores ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole-propiónico (AMPA) e nos receptores ácido caínico (KA). Além disto, estudos biológicos moleculares estabeleceram que estes receptores são compostos de subunidades que se podem juntar para formar canais funcionais e foi identificado um certo número de tais subunidades.

Deste modo, foi estabelecido que os receptores AMPA são montados a partir de quatro subunidades de proteína conhecidas como GluR1 a GluR4, enquanto os receptores KA são montados a partir de subunidades conhecidas como GluR5 a GluR7, KA-1 e KA-2.

Devido à sua distribuição em diferentes tecidos de mamíferos, os receptores GluR5 e as substâncias que actuam nestes tiveram uma particular atenção.

O documento WO 94/22807 descreve derivados de ureia e amida úteis como agentes de abertura de canais de potássio. O documento EP 0656350 descreve derivados de biaril-ureia como agentes cardiovasculares.

Os documentos WO 97/45400, WO 97/45111, WO 98/47879 e WO 00/24707 descrevem derivados de difenil-ureia contendo um grupo ácido e a sua utilização como bloqueadores dos canais de cloretos.

O documento 02/039987 descreve a utilização de derivados de difenil-ureia como bloqueadores do canal de anião de malária para tratar a malária.

O documento WO 02/064128 descreve a utilização de derivados de difenil-ureia para a modulação da associação de caspase-9 a Apaf-1 para o tratamento de doenças caracterizadas por morte celular excessiva ou insuficiente.

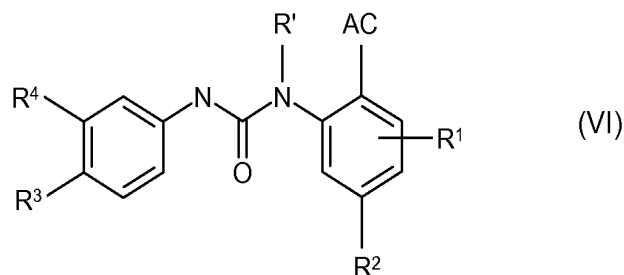
O documento WO 02/070467 descreve derivados de difenil-ureia úteis como inibidores das vias de degradação das proteínas intracelulares.

Contudo, a utilização de derivados de difenil-ureia como moduladores do receptor GluR5 ionotrópico nunca foi descrita.

Sumário do invento

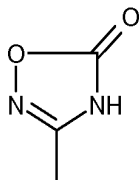
É um objecto do invento proporcionar novos compostos úteis como antagonistas selectivos e não competitivos do receptor GluR5 ionotrópico.

Este objecto é conseguido pelo fornecimento dos novos derivados de diaril-ureia representados pela Fórmula VI,



qualquer um dos seus enantiómeros ou qualquer mistura dos seus enantiómeros, ou um sal de adição farmacêuticamente aceitável, em que

AC representa um anel heterocíclico com a estrutura



R' representa hidrogénio ou alquilo C₁₋₆;

R¹ representa hidrogénio, halo, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, nitro ou ciano;

R² representa halo, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, nitro ou ciano; e

R³ e R⁴, independentemente um do outro, representam hidrogénio, halo, hidroxil, alcoxi C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆ ou fenilo; ou R³ e R⁴ em conjunto formam um anel metilenodioxil com a estrutura -O-CH₂-O-; ou R³ e R⁴ em conjunto formam um anel benzo fundido, anel fundido esse que é opcionalmente substituído uma ou mais vezes com substituintes seleccionados de halo, hidroxil, alcoxi C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆.

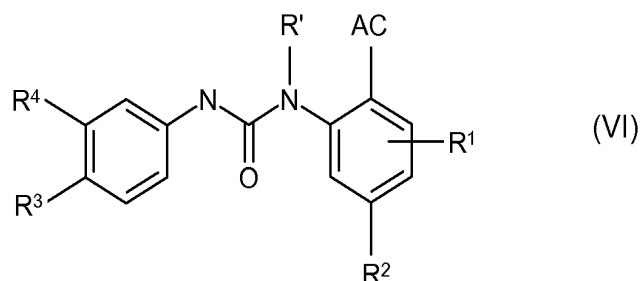
Noutro aspecto, o invento proporciona composições farmacêuticas compreendendo quantidades terapêuticamente eficazes de um composto químico do invento ou de um sal de adição farmacêuticamente aceitável deste.

Num outro aspecto o invento refere-se à utilização de um composto químico do invento, ou de um sal de adição farmacêuticamente aceitável deste, para a produção de uma/uma composição farmacêutica/medicamento.

Outros objectivos do invento serão evidentes para os especialistas na matéria a partir da descrição detalhada e exemplos seguintes.

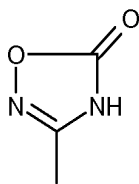
Descrição detalhada do invento

No primeiro aspecto, o invento proporciona um novo derivado de diaril-ureia representado pela Fórmula VI,



qualquer um dos seus enantiómeros ou qualquer mistura dos seus enantiómeros, ou um sal de adição farmacêuticamente aceitável deste, em que

AC representa um anel heterocíclico com a estrutura



R' representa hidrogénio ou alquilo C₁₋₆;

R¹ representa hidrogénio, halo, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, nitro ou ciano;

R² representa halo, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, nitro ou ciano; e

R³ e R⁴, independentemente um do outro, representam hidrogénio, halo, hidroxí, alcoxi C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆ ou fenilo; ou R³ e R⁴ em conjunto formam um anel metilenodioxí com a estrutura -O-CH₂-O-; ou R³ e R⁴ em conjunto formam um anel benzo fundido, anel fundido esse que é opcionalmente substituído uma ou mais vezes com substituintes seleccionados de halo, hidroxí, alcoxi C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆.

Numa forma de concretização muito preferida o derivado de diaril-ureia do invento é

1-[5-cloro-2-(5-oxo-4,5-di-hidro-[1,2,4]oxadiazol-3-il)-fenil]-3-(3-trifluorometilfenil)-ureia;

1-[5-cloro-2-(5-oxo-4,5-di-hidro-[1,2,4]oxadiazol-3-il)-fenil]-3-(3-bromofenil)-ureia; ou

1-[5-cloro-2-(5-oxo-4,5-di-hidro-[1,2,4]oxadiazol-3-il)-fenil]-3-naftalen-2-il-ureia;

ou um enantiómero ou uma mistura de enantiómeros, ou um sal de adição farmacêuticamente aceitável deste.

Qualquer combinação de duas ou mais formas de concretização aqui descritas é considerada como estando dentro do domínio do presente invento.

Definição de substituintes

No contexto deste invento halo representa um átomo de flúor, cloro, bromo ou iodo.

No contexto deste invento um grupo alquilo designa uma cadeia de hidrocarboneto univalente saturada, linear ou ramificada. A cadeia de hidrocarboneto contém de um a seis átomos de carbono (alquilo C₁₋₆; alquilo de cadeia curta), incluindo pentilo, isopentilo, neopentilo, pentilo terciário, hexilo e iso-hexilo. Numa forma de concretização preferida alquilo representa um grupo alquilo C₁₋₄, incluindo butilo, isobutilo, butilo secundário e butilo terciário. Noutra forma de concretização preferida deste invento, alquilo representa um grupo alquilo C₁₋₃, que pode ser, em particular, metilo, etilo, propilo ou isopropilo.

No contexto deste invento um grupo haloalquilo designa um grupo alquilo tal como aqui definido, grupo alquilo esse que é substituído uma ou mais vezes com halo, tal como definido atrás. Grupos haloalquilo preferidos do invento incluem tri-halometilo, em particular, trifluorometilo e tri-halometilo, em particular 2,2,2-trifluoroetilo.

No contexto deste invento um grupo cicloalquilo designa um grupo alquilo cíclico contendo de três a sete átomos de carbono (cicloalquilo C_{3-7}), incluindo ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclo-hexilo e ciclo-heptilo.

No contexto deste invento um grupo alcoxi designa um grupo "alquil-O-" em que alquilo é tal como definido atrás. Exemplos de grupos alcoxi preferidos do invento incluem metoxi e etoxi.

Sais farmaceuticamente aceitáveis

Os derivados de diaril-ureia do invento podem ser proporcionados em qualquer forma adequada para a administração pretendida. Formas adequadas incluem sais farmaceuticamente aceitáveis (*i.e.* fisiologicamente) e formas de pré- ou pró-drogas do composto químico do invento.

Exemplos de sais de adição farmaceuticamente aceitáveis incluem, sem limitação, sais de adição ácida inorgânicos e orgânicos não tóxicos, tais como cloridrato, bromidrato, nitrato, perclorato, fosfato, sulfato, formato, acetato, aconato, ascorbato, benzenossulfonato, benzoato, cinamato, citrato, embonato, enantato, fumarato, glutamato, glicolato, lactato, maleato, malonato, madelato, metanossulfonato, o derivado naftaleno-2-sulfonato, ftalato, salicilato, sorbato, estearato, succinato, tartarato, tolueno-p-sulfonato e outros do género. Tais sais podem ser formados através de procedimentos bem conhecidos e descritos na arte.

Sais metálicos dos derivados de diaril-ureia do invento incluem sais de metais alcalinos, tais como o sal de sódio de um composto químico do invento contendo um grupo carboxi.

Estereoisómeros

Os derivados de diaril-ureia do invento podem existir nas formas (+) e (-) assim como em formas racémicas (\pm). Os racematos destes isómeros e os próprios isómeros individuais estão dentro do domínio do presente invento.

As formas racémicas podem ser resolvidas nos antípodas ópticos através de métodos e técnicas conhecidos. Uma maneira para separar os sais diastereoméricos é através da utilização de um ácido opticamente activo e libertação do composto de amina opticamente activo através do tratamento com uma base. Outro método para resolver os racematos nos antípodas ópticos é baseado na cromatografia de uma matriz activa óptica. Os compostos racémicos do invento podem ser assim resolvidos nos seus antípodas ópticos, e.g. através de cristalização fraccionada dos sais d- ou l- (tartaratos, mandelatos ou canforsulfonatos), por exemplo.

Os derivados de diaril-ureia do invento podem ser também resolvidos pela formação de amidas diastereoméricas por reacção dos compostos químicos do presente invento com um ácido carboxílico activado opticamente activo, tal como o derivado de (+) ou (-)fenilalanina, (+) ou (-)fenilglicina, ácido (+) ou (-) canfânico ou através da formação de carbamatos diastereoméricos, por reacção do composto químico do invento com um cloroformato opticamente activo ou similares.

Métodos adicionais para resolver os isómeros ópticos são conhecidos na arte. Tais métodos incluem os descritos por *Jaques J, Collet A, Wilen S* em "*Enantiomers, Racemates, and Resolutions*", John Wiley and Sons, New York (1981).

Compostos activos ópticos podem ser também preparados a partir de materiais de partida opticamente activos.

Métodos de preparação

Os derivados de diaril-ureia do invento podem ser preparados através de métodos convencionais para síntese química, e.g. os descritos nos exemplos de trabalho. Os materiais de partida para os processos descritos no presente pedido de patente são conhecidos ou podem ser rapidamente preparados através de métodos convencionais a partir de produtos químicos comercialmente disponíveis.

Um composto do invento pode ser também convertido noutro composto do invento utilizando métodos convencionais.

Os produtos finais das reacções aqui descritas podem ser isolados através de técnicas convencionais, *e.g.* por extracção, cristalização, destilação, cromatografia, etc.

Actividade biológica

Verificou-se que os derivados de diaril-ureia do presente invento eram moduladores dos receptores glutamato ionotrópicos e, em particular, do receptor GluR5 ionotrópico. Numa forma de concretização preferida do invento os derivados de diaril-ureia são úteis como antagonistas selectivos não competitivos do receptor GluR5 ionotrópico.

Acredita-se correntemente que os compostos que modificam a neurotransmissão por interacção com os receptores aspartato e glutamato são úteis no tratamento de uma variedade de doenças do SNC e do SNP e de doenças de outra origem, incluindo dor crónica ou aguda, dor neuropática, dor intratável, enxaquecas da cabeça, doenças neurológicas e psiquiátricas, depressão, ansiedade, psicose, esquizofrenia, psicose excitatória dependente de aminoácidos, problemas cognitivos, demência, demência senil, demência induzida por SIDA, doenças psiquiátricas relacionadas com o stress, acidente vascular cerebral, acidente isquémico ou hemorrágico global e focal, hipoxia/isquemia cerebral, enfarte cerebral ou isquemia cerebral que resultam de acidente tromboembólico ou hemorrágico, enfarte cardíaco, traumatismo cerebral, edema cerebral, traumatismo cranial/cerebral, traumatismo da espinal medula, lesões da medula óssea, hipoglicemia, anoxia, dano neuronal devido a hipoglicemia, hipotonia, hipoxia, hipoxia perinatal, paragem cardíaca, doenças ou perturbações neurodegenerativas agudas e crónicas e isquemia cerebral de várias origens, doenças degenerativas do SNC, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Huntington, doença de Parkinson idiopática e induzida por fármacos, esclerose lateral amiotrófica (ALS), lesões cerebrais em fase pós-aguda ou doenças crónicas do sistema nervoso, deficiências cerebrais subsequentes a cirurgia de *by-pass* e enxerto cardíaco, asfixia perinatal, anoxia de afogamento, cirurgia pulmonar e trauma cerebral, danos nas células nervosas induzido por hipoxia (*e.g.* na paragem cardíaca ou na operação de *by-pass*, ou insuficiências neonatais), epilepsia, estado

epiléptico, ataques epilépticos, vasoespasma cerebral, espasmos mediados pelo SNC, problemas de motilidade, espasmos musculares, incontinência urinária, convulsões, problemas de resposta a anti-convulsivos, doenças auto-imunes, emese, náuseas, obesidade, dependências e toxicomanias químicas, sintomas de dependência e desintoxicação, deficiências induzidas por fármacos ou álcool, toxicodependência, danos oculares, retinopatia, neuropatia retinal, zumbidos, disquinesia tardia.

Numa concretização mais preferida os derivados de diaril-ureia do invento são utilizados no tratamento de problemas cognitivos e neurodegenerativos, perturbações do movimento, depressão, AD, ADHD, psicose e deficiências cognitivas associadas, psicose induzida por fármacos, sintomas de desintoxicação de fármacos, acidentes vasculares cerebrais, dor e em particular dor crónica ou aguda, dor neuropática, dor intratável ou enxaqueca e enxaquecas da cabeça, epilepsia e retinopatia.

Numa concretização particular os derivados de diaril-ureia do invento são utilizados no tratamento da dor, em particular da dor crónica ou aguda, da dor neuropática e da dor intratável, enxaqueca, enxaquecas da cabeça.

Noutra concretização particular os derivados de diaril-ureia do invento são utilizados no tratamento da epilepsia, estado epiléptico ou ataques epilépticos.

Composições farmacêuticas

Noutro aspecto o invento proporciona novas composições farmacêuticas compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz do derivado de diaril-ureia do invento.

Embora o derivado de diaril-ureia do invento para utilização em terapia possa ser administrado sob a forma de um composto químico em bruto, é preferido introduzir o ingrediente activo, opcionalmente sob a forma de um sal fisiologicamente aceitável, numa composição farmacêutica em conjunto com um ou mais auxiliares, excipientes, portadores, tampões, diluentes e/ou outros auxiliares farmacêuticos correntes.

Numa concretização preferida, o invento proporciona composições farmacêuticas compreendendo o derivado de diaril-ureia do invento, ou um sal ou derivado farmacêuticamente aceitável deste, em conjunto com um ou mais portadores farmacêuticamente aceitáveis e, opcionalmente, outros ingredientes terapêuticos e/ou profiláticos, conhecidos e utilizados na arte. O(s) portador(es) deve(m) ser "aceitável(is)" no sentido de serem compatíveis com os outros ingredientes da formulação e não sendo perigosos para quem a recebe.

A composição farmacêutica do invento pode ser administrada através de qualquer via adequada, que se ajuste à terapia desejada. As vias preferidas de administração incluem administração oral, em particular em comprimidos, em cápsulas, em drageias, em pó, ou em forma líquida e administração parentérica, em particular em injeção cutânea, subcutânea, intramuscular ou intravenosa. A composição farmacêutica do invento pode ser produzida por qualquer especialista através da utilização de métodos e técnicas convencionais adequadas para a formulação desejada. Quando desejado, podem ser empregues composições adaptadas para originarem libertação sustentada do ingrediente activo.

Outros detalhes acerca das técnicas de formulação e administração podem ser encontrados na última edição *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Maack Publishing Co., Easton, PA).

A dosagem depende da natureza e gravidade da doença a ser tratada e está dentro do domínio da avaliação do médico assistente, e pode variar por ajuste da dosagem às circunstâncias particulares deste invento para produzir o efeito terapêutico desejado. Contudo, está presentemente contemplado que composições farmacêuticas contendo de cerca de 0,1 até cerca de 500 mg do ingrediente activo por dose individual, preferencialmente de cerca de 1 até cerca de 100 mg, muito preferencialmente de cerca de 1 até cerca de 10 mg, são adequadas para tratamentos terapêuticos.

O ingrediente activo pode ser administrado numa ou várias doses por dia. Um resultado satisfatório pode ser obtido, em

certos casos, com uma dosagem tão baixa quanto 0,1 µg/kg i.v. e 1 µg/kg p.o. O limite superior da gama de dosagem é, presentemente, considerado como sendo cerca de 10 mg/kg i.v. e 100 mg/kg p.o. As gamas preferidas são de cerca de 0,1 µg/kg até cerca de 10 mg/kg/dia i.v. e de cerca de 1 µg/kg até cerca 100 mg/kg/dia p.o.

Exemplos

O invento é ainda ilustrado com referência aos exemplos seguintes, que não pretendem limitar de qualquer modo o domínio do invento tal como reivindicado.

Exemplo 1

Exemplo Preparatório

Materiais de partida

Ácido 2-amino-4-cloro-benzenossulfónico

Ácido sulfúrico concentrado (densidade 1,84) (13,9 ml, 250 mmol) foi diluído com 100 ml de água. 3-Cloro-anilina (31,9 g, 250 mmol) foi adicionada ao longo de 30 minutos enquanto a temperatura foi mantida a 85°C. Durante a adição ocorreu alguma precipitação. A suspensão foi deixada a arrefecer até à temperatura ambiente e formou-se uma forte precipitação. O sólido é filtrado com sucção para originar um sólido cristalino branco. O sólido foi aquecido lentamente até 200°C sob vácuo (bomba de água) e com montagem de uma ratoeira para água. O sólido foi mantido a 200°C durante 7 horas. Foi retirada a água do material cristalino. O sólido foi deixado a arrefecer e então dissolveu-se em NaOH aquoso diluído e precipitou-se com ácido clorídrico. Originou-se 25 g (48%) do composto do título sob a forma de um sólido cristalino branco (p.f. >250°C).

2-Amino-4-cloro-N-hidroxi-benzamida

2-Amino-4-cloro-benzonitrilo (5,3 g, 35 mmol) foi dissolvido em etanol (180 ml) auxiliando com aquecimento. Uma solução aquosa de cloridrato de hidroxilamina (4,9 g, 70 mmol) e bicarbonato de sódio (11,1 g, 105 mmol) foi

adicionado e a mistura foi refluxada durante 8 horas. O solvente foi então reduzido e o produto suspenso em água (100 ml) e removido por filtração para originar 5,6 g (86%) de um pó branco (p.f. 131-133°C).

3-(2-Amino-4-cloro-fenil)-4H-[1,2,4]oxadiazol-5-ona

Sódio metálico (0,92 g, 40 mmol) foi dissolvido em 70 ml de etanol absoluto e foi adicionada 2-amino-4-cloro-N-hidroxi-benzamida (3,71 g, 20 mmol) e então foi adicionado carbonato de dietilo (9,44 g, 80 mmol). A mistura foi refluxada durante 18 horas e então reduzida até à secura sob vácuo e triturada com HCl aquoso 0,5 M, filtrada e então triturada com tolueno e filtrada para originar 3,4 g (80%) de um sólido vermelho-acastanhado. (p.f. 159-161°C)

Método D

1-[5-cloro-2-(5-oxo-4,5-di-hidro-[1,2,4]oxadiazol-3-il)-fenil]-3-(3-trifluorometilfenil)-ureia (Composto D1)

3-(2-Amino-4-clorofenil)4H-[1,2,4]oxadiazol-5-ona (400 mg, 1,92 mmol) foi dissolvida e foi adicionado 20 ml de THF seco e isocianato de 3-trifluorometilfenilo (450 mg, 2,40 mmol) e a mistura reaccional foi agitada durante 16 horas. O solvente foi reduzido sob vácuo e o produto foi recristalizado a partir de acetato de etilo e heptano para originar 480 mg (63%) de um sólido cristalino branco (p.f. 246-248; decomp.).

1-[5-cloro-2-(5-oxo-4,5-di-hidro-[1,2,4]oxadiazol-3-il)-fenil]-3-(3-bromofenil)-ureia (Composto D2)

Foi produzida utilizando o método D (p.f. 210-211°C; decompõe-se).

Método E

Ácido 4-cloro-2-(3-piridin-2-il-ureído)benzóico (Composto E1)

Ácido piridino-2-carboxílico (369 mg, 3 mmol) foi suspenso em 15 ml de tolueno seco e foi adicionada difenilfosforilazida (958 mg, 3,5 mmol). Foi então adicionada gota a gota trietilamina (354 mg, 3,6 mmol) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 0,5 horas. A solução

foi aquecida a 80°C e após 2 h, foi adicionado ácido 2-amino-4-clorobenzoico (463 mg, 2,7 mmol) em 20 ml de THF e foi também adicionada trietilamina (0,354 g, 3,6 mmol). A mistura foi agitada durante 1 h a 80°C e então à temperatura ambiente durante a noite. A mistura foi deixada a arrefecer e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo foi retomado em acetato de etilo e precipitado em heptano e filtrado com sucção. O rendimento após recristalização a partir de acetato de etilo/heptano foi de 640 mg (73%) do sólido cristalino branco (p.f. 222-224°C).

1-[5-cloro-2-(5-oxo-4,5-di-hidro-[1,2,4]oxadiazol-3-il)-fenil]-3-naftalen-2-il-ureia (Composto E8)

Foi preparada utilizando o método E (p.f. 245°C; decomposição).

Exemplo 2

Ensaio funcional de GluR5 e GluR6

Este exemplo descreve ensaios com células realizados utilizando células HEK 293 embrionárias humanas expressando os receptores GluR5 e GluR6, respectivamente, ensaios esses em que a inibição do aumento de Ca_i induzido pelo domoato é utilizado como a medida da actividade antagonista do glutamato das substâncias em ensaio.

A concentração de cálcio livre intracelular (Ca_i) regula a maioria dos processos metabólicos das células dos mamíferos. Aumentos de Ca_i em tecidos excitáveis, tais como os neurónios são verificados após activação específica dos canais de cálcio operados pelo receptor (e.g. receptores glutamato), ou após despolarização e abertura dos canais de cálcio operados por voltagem. Alguns neurotransmissores e neuro-moduladores aumentam a Ca_i ao activar os ionóforos ligados à proteína G ou através da libertação da Ca_i a partir de armazenamentos intracelulares através do segundo mensageiro IP_3 .

A Ca_i é determinada através de métodos fluorométricos num Leitor de Imagem em Placa Fluorescente (FLIPR). Os fluorocromos de quelação de cálcio (ácidos tetracarboxílicos)

são carregados para as células como ésteres acetoximetílicos e, subsequentemente, libertados através de uma estearase intracelular não específica. Os ácidos livres, que são impermeáveis para a membrana celular, são mantidos na célula durante horas. O espectro de fluorescência (o EX_{max} , EX_{max} ou ambos) é alterado pela ligação do cálcio e a fluorescência é directamente proporcional ao Ca_i .

O presente método utiliza os fluorocromos Fluo-3 ou Fluo-4 como quelante de cálcio. Fluo-3/Fluo-4 é virtualmente não fluorescente sem cálcio, mas os complexos cálcio-Fluo-3/Fluo-4 mostram uma fluorescência brilhante ($EX_{max} = 526$ nm) após excitação à volta de 500 nm ($EX_{max} = 505$ nm). Este espectro de fluorescência é semelhante ao espectro da fluoresceína. Uma vez que a excitação e a emissão estão na região de luz visível do espectro, pode ser utilizado equipamento corrente sem sistemas ópticos de quartzo.

O subtipo cainato dos receptores glutamato ionotrópicos existe em duas subunidades de alta afinidade - KA1 e KA2, e três subunidades de baixa afinidade - GluR5-7. O canal de iões no subtipo do receptor GluR5 pode ser tornado permeável ao cálcio por substituição de uma arginina (R) por uma glutamina (Q) na região do poro. Os receptores GluR5 humanos estavelmente expressos aqui utilizados são permeáveis ao cálcio (Q), o que os torna ideais para medições de fluorescência.

Cultura de células

Células HEK 293 expressando respectivamente GluR5, GluR6 são desenvolvidas em cultura em DMEM contendo 10% de soro de vitela fetal, em balões de cultura de poliestireno (175 cm²) numa atmosfera humidificada de 5% de CO₂ no ar, a 37°C. A confluência das células deve ser de 80-90% no dia da introdução das placas. As células GluR5 são enxaguadas com 10 ml de PBS, então adiciona-se 1,5 ml de Tripsina-EDTA e deixa-se no incubador durante 5 min. Após a adição de 10 ml meio de desenvolvimento as células são ressuspensas por titulação com uma pipeta de 10 ml durante 15 vezes.

Os células são cultivadas com uma densidade de $0,5-1 \times 10^6$ células/ml (100 μ l/poço) em placas de 96 poços de paredes negras e fundo transparente pré-tratadas com uma solução 0,001% PEI (75 μ l/poço durante ≥ 30 min). As células plaqueadas foram deixadas a proliferar durante 24 h antes de se carregar o corante.

Carregamento de Fluo-4-AM

É adicionado fluo-4-AM (1 mg, Molecular Probes) a 912 μ l de DMSO contendo 25 mg/150 μ l Pluoronic F-127 (Molecular Probes). A solução mãe de Fluo-4-AM (1 mM) é diluída com DMEM até uma concentração final de 2 μ M de Fluo-4-AM.

O meio é removido dos poços e é adicionado 50 μ l de uma solução de Fluo-4-AM a cada poço. A placa é selada e incubada à temperatura ambiente durante 60 min.

Medições do cálcio

Após o período de carga, o meio de carga é aspirado e as células são lavadas duas vezes com 100 μ l de solução de Ringer livre de Na^+ (NN: HEPES 10 mM, cloreto de colina 140 mM, KCl 5 mM, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 10 mM, pH 7,4) para remover corante extracelular. Foi adicionado 100 μ l de NN a cada poço e a fluorescência é medida no FLIPR.

As células são pré-incubadas durante 1,5 min com o composto de teste (50 μ l) antes da adição do domoato (50 μ l) até uma concentração final de 2 μ M quando determinada para o GluR5 e 0,2 μ M quando determinada para o GluR6.

As soluções-mãe das substâncias de teste são feitas em etanol a 48%, DMSO a 50% ou DMSO a 100%. A concentração final de etanol ou DMSO no poço não deve exceder 0,1%. As diluições são realizadas em NN em placas com o fundo em V.

Ajustes do FLIPR

Temperatura:	25°C
Pré-incubação:	50 μ l de solução de teste com um caudal de 30 μ l/s e uma altura inicial de 100 μ l

Fase antagonista: 50 µl de solução de domoato (8 µM)
com um caudal de 35 µl/s e uma
altura inicial de 150 µl

Intervalos leitura: Pré-incubação - 10sX7 e 3sX3
Fase antagonista - 3sX17 e 10sX12

Placas adicionais (placa de composto diluído e placa de domoato) são colocadas na extremidade direita e esquerda da bandeja do FLIPR. As placas das células são colocadas na posição intermédia. Desenvolve-se a fase de teste de pré-incubação utilizando primeiro os ajustes anteriores. O FLIPR retirará a quantidade desejada da placa de composto e a pipetará para a placa das células. O FLIPR fará as medições adequadas de acordo com os intervalos atrás indicados.

Resultados

A fluorescência na estimulação com o domoato ou a substância em teste é corrigida em relação à fluorescência basal média (em NN).

A fluorescência do domoato na presença da substância em teste é expressa em relação à resposta só do domoato.

Deve ser obtida 25-75% da estimulação do domoato antes de calcular o IC₅₀.

O valor do teste será dado como IC₅₀ (a concentração (µM) da substância de teste, que inibe 50% da elevação de Ca_i induzida pelo domoato), calculada quer a partir de uma curva de concentração/resposta quer a partir da fórmula:

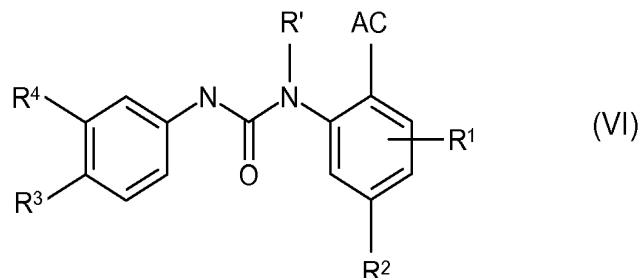
$$IC_{50} = (\text{Conc. subst. de teste aplicada, } \mu\text{M}) \times 1 / [(C_o / C_x) - 1]$$

em que C_o é a acumulação de Ca_i estimulada com domoato em ensaios de controlo e C_x é a Ca_i estimulada com domoato na presença do composto de teste.

Lisboa, 2009-07-17

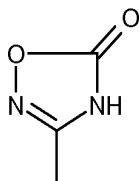
REIVINDICAÇÕES

1. Derivado de diaril-ureia representado pela Fórmula VI,



qualquer um dos seus enantiómeros ou qualquer mistura dos seus enantiómeros, ou um seu sal de adição farmacêuticamente aceitável, em que

AC representa um anel heterocíclico com a estrutura



R' representa hidrogénio ou alquilo C₁₋₆;

R¹ representa hidrogénio, halo, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, nitro ou ciano;

R² representa halo, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, haloalquilo C₁₋₆, nitro ou ciano; e

R³ e R⁴, independentemente um do outro, representam hidrogénio, halo, hidroxí, alcoxi C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆ ou fenilo; ou

R³ e R⁴ em conjunto formam um anel metilenodioxí com a estrutura -O-CH₂-O-; ou R³ e R⁴ em conjunto formam um anel benzo-fundido, anel fundido esse que é opcionalmente substituído uma ou mais vezes com substituintes seleccionados de halo, hidroxí, alcoxi C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆.

2. Derivado de diaril-ureia de acordo com a reivindicação 1 que é

1-[5-cloro-2-(5-oxo-4,5-di-hidro-[1,2,4]oxadiazol-3-il)-fenil]-3-(3-trifluorometilfenil)-ureia;

1-[5-cloro-2-(5-oxo-4,5-di-hidro-[1,2,4]oxadiazol-3-il)-fenil]-3-(3-bromofenil)-ureia; ou

1-[5-cloro-2-(5-oxo-4,5-di-hidro-[1,2,4]oxadiazol-3-il)-fenil]-3-naftalen-2-il-ureia;

ou um seu enantiômero ou uma mistura de enantiômeros, ou um seu sal de adição farmacêuticamente aceitável.

3. Composição farmacêutica que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do derivado de diaril-ureia de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-2, ou um seu sal de adição farmacêuticamente aceitável.

4. Utilização do derivado de diaril-ureia de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-2, ou de um seu sal de adição farmacêuticamente aceitável para a produção de uma composição farmacêutica/medicamento.

5. Utilização do derivado de diaril-ureia de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-2, ou de um seu sal de adição farmacêuticamente aceitável para a produção de uma composição farmacêutica/medicamento para o tratamento, prevenção ou alívio de uma doença, perturbação ou condição de um mamífero, incluindo um humano, cuja doença, perturbação ou condição responde à modulação do receptor GluR5 ionotrópico.

6. Utilização de acordo com a reivindicação 5, em que a doença, perturbação ou condição é a dor crónica ou aguda, dor neuropática, dor intratável, enxaquecas da cabeça, perturbações neurológicas e psiquiátricas, depressão, ansiedade, psicose, esquizofrenia, psicose excitatória dependente de aminoácidos, problemas cognitivos, demência, demência senil, demência induzida por SIDA, perturbações psiquiátricas relacionadas com o stress, acidente vascular cerebral, acidente isquémico ou hemorrágico global e focal,

hipoxia/isquemia cerebral, enfarte cerebral ou isquemia cerebral que resultam de acidente tromboembólico ou hemorrágico, enfarte cardíaco, traumatismo cerebral, edema cerebral, traumatismo cranial/cerebral, traumatismo da espinal medula, lesões da medula óssea, hipoglicemia, anoxia, dano neuronal devido a hipoglicemia, hipotonia, hipoxia, hipoxia perinatal, paragem cardíaca, doenças ou perturbações neurodegenerativas agudas e crónicas e isquemia cerebral de várias origens, doenças degenerativas do SNC, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Huntington, doença de Parkinson idiopática e induzida por fármacos, esclerose lateral amiotrófica (ALS), lesões cerebrais em fase pós-aguda ou doenças crónicas do sistema nervoso, deficiências cerebrais subsequentes a cirurgia de *by-pass* e enxerto cardíaco, asfixia perinatal, anoxia de afogamento, cirurgia pulmonar e trauma cerebral, danos nas células nervosas induzido por hipoxia (e.g. na paragem cardíaca ou na operação de *by-pass*, ou insuficiências neonatais), epilepsia, estado epiléptico, ataques epilépticos, vasoespasma cerebral, espasmos mediados pelo SNC, perturbações de motilidade, espasmos musculares, incontinência urinária, convulsões, perturbações de resposta a anti-convulsivos, doenças auto-imunes, emese, náusea, obesidade, dependências e toxicomanias químicas, sintomas de dependência e desintoxicação, deficiências induzidas por fármacos ou álcool, toxicodependência, danos oculares, retinopatia, neuropatia retinal, zumbido, disquinesia tardia.

7. Utilização de acordo com a reivindicação 5, em que a doença, perturbação ou condição é dor crónica ou aguda, dor neuropática, dor intratável, enxaqueca ou dores de cabeça de enxaqueca.

8. Utilização de acordo com a reivindicação 5, em que a doença, perturbação ou condição é epilepsia, estado epiléptico ou ataque epiléptico.

Lisboa, 2009-07-17

RESUMO

"Derivados de diaril-ureído e sua utilização médica"

Este invento refere-se a novos derivados aril-ureído de ácido benzóico úteis como antagonistas selectivos e não competitivos do receptor GluR5 ionotrópico. Devido à sua actividade biológica, os derivados aril-ureído do invento são considerados úteis para tratar doenças que são responsáveis pela modulação de um receptor aspartato ou glutamato. Além disso o invento proporciona compostos químicos para utilização de acordo com o invento, assim como composições farmacêuticas compreendendo os compostos químicos e métodos para tratar doenças ou perturbações ou condições responsáveis pela modulação de um receptor aspartato ou glutamato.