



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11) Número de publicación: **2 296 667**

51) Int. Cl.:

C07D 241/20 (2006.01)

C07D 241/18 (2006.01)

C07D 401/12 (2006.01)

A61K 31/4965 (2006.01)

A61K 31/497 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86) Número de solicitud europea: **00988123 .6**

86) Fecha de presentación : **14.12.2000**

87) Número de publicación de la solicitud: **1237880**

87) Fecha de publicación de la solicitud: **11.09.2002**

54) Título: **Inhibidores basados en pirazina de glicógeno sintasa quinasa-3.**

30) Prioridad: **17.12.1999 US 172333 P**

45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

73) Titular/es: **Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc.**
4560 Horton Street
Emeryville, California 94608, US

72) Inventor/es: **Nuss, John, M. y**
Ramurthy, Savithri

74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 296 667 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

Inhibidores basados en pirazina de glicógeno sintasa quinasa-3.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a compuestos de pirazina que inhiben la actividad de la glicógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), a composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos y al uso de los compuestos y composiciones, solos o en combinación con otros agentes farmacéuticamente activos. Los compuestos y composiciones proporcionados en la presente invención tienen utilidad en el tratamiento de trastornos mediados por la actividad de GSK3, tales como la diabetes, la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos, la obesidad, la enfermedad cardiovascular aterosclerótica, la hipertensión esencial, el síndrome del ovario policístico, el síndrome X, la isquemia, especialmente la isquemia cerebral, el daño traumático del cerebro, el trastorno bipolar, la inmunodeficiencia y el cáncer.

15 **Antecedentes de la invención**

Compuestos bicíclicos que están relacionados estructuralmente con los compuestos de fórmula (I) definidos a continuación se describen en Benincori *et al.* (Journal of the Chemical Society, Perkin Trans I, 1991, p. 2139-45) y el documento de patente internacional WO99/03838. Sin embargo, la técnica anterior no proporciona ninguna indicación de que estos compuestos puedan usarse para inhibir la glucógeno sintasa quinasa 3.

El documento de patente internacional WO98/16528 describe inhibidores de la glucógeno sintasa quinasa 3 que difieren considerablemente de los compuestos de fórmula (I) como se describen a continuación.

La glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) es una serina/treonina quinasa para la que se han identificado dos isoformas, α y β . Woodgett, *Trends Biochem. Sci.*, **16**:177-81 (1991). Ambas isoformas de GSK3 son constitutivamente activas en células en reposo. La GSK3 se identificó originalmente como una quinasa que inhibe la glucógeno sintasa por fosforilación directa. Con la activación de la insulina, se inactiva la GSK3, permitiendo así la activación de la glucógeno sintasa y posiblemente otros eventos dependientes de la insulina, tales como el transporte de la glucosa. Subsecuentemente, se ha mostrado que la actividad GSK3 es también inactivada por otros factores de crecimiento que, como la insulina, señalizan a través de tirosina quinasas receptoras (RTKs). Ejemplos de dichas moléculas señalizadoras incluyen IGF-1 y EGF. Saito *et al.*, *Biochem. J.*, **303**:27-31 (1994); Welsh *et al.*, *Biochem. J.*, **294**:625-29 (1993); y Cross *et al.*, *Biochem. J.*, **303**:21-26 (1994).

Los agentes que inhiben la actividad de GSK3 son útiles en el tratamiento de trastornos que están mediados por la actividad de GSK3. Además, la inhibición de GSK3 mimetiza la activación del factor de crecimiento que señala las vías y consecuentemente los inhibidores de GSK3 son útiles en el tratamiento de enfermedades en las que dichas vías no son suficientemente activas. Ejemplos de enfermedades que pueden tratarse con inhibidores de GSK3 se describen a continuación.

Diabetes

La diabetes tipo 2 es una enfermedad cada vez más prevalente del envejecimiento. Está caracterizada inicialmente por una sensibilidad disminuida a la insulina y una elevación compensatoria de las concentraciones de insulina en la circulación, lo último se requiere para mantener concentraciones sanguíneas normales de glucosa. Las mayores concentraciones de insulina están causadas por una mayor secreción de las células beta pancreáticas, y la hiperinsulinemia resultante está asociada con las complicaciones cardiovasculares de la diabetes. A medida que empeora la resistencia a la insulina, la demanda sobre las células β pancreáticas aumenta de forma estable hasta que el páncreas no puede ya proporcionar concentraciones adecuadas de insulina, lo que resulta en concentraciones altas de glucosa en la sangre. Por último lo que sucede es la hiperglucemia e hiperlipidemia claras, lo que conduce a las complicaciones devastadoras a largo plazo asociadas con la diabetes, incluyendo la enfermedad cardiovascular, fracaso renal y ceguera. El (los) mecanismo(s) exacto(s) que causan la diabetes tipo 2 son desconocidos, pero ocasionan un transporte de glucosa al músculo esquelético deteriorado y una producción mayor de glucosa hepática, además de una respuesta de insulina inadecuada. Las modificaciones dietéticas a menudo no son eficaces, por lo tanto la mayoría de los pacientes requieren últimamente intervención farmacéutica en un esfuerzo por prevenir y/o retardar la progresión de las complicaciones de la enfermedad. Muchos pacientes pueden ser tratados con uno o más de los muchos agentes orales antidiabéticos disponibles, incluyendo las sulfonilureas, para aumentar la secreción de insulina. Ejemplos de fármacos de sulfonilureas incluyen la metformina para la supresión de la producción de glucosa hepática, y la troglitazona, una medicación que sensibiliza a la insulina. A pesar de la utilidad de estos agentes, el 30-40% de los diabéticos no están controlados adecuadamente usando estas medicaciones y requieren inyecciones subcutáneas de insulina. Además, cada una de estas terapias tiene efectos secundarios asociados. Por ejemplo, las sulfonilureas pueden causar hipoglucemia y la troglitazona puede causar hepatotoxicidad severa. Actualmente, hay necesidad de fármacos nuevos y mejorados para el tratamiento de pacientes prediabéticos y diabéticos.

Como se describió anteriormente, la inhibición de GSK3 estimula los procesos dependientes de la insulina y consecuentemente es útil en el tratamiento de la diabetes tipo 2. Datos recientes obtenidos usando sales de litio proporcionan evidencia para esta noción. Se ha descrito recientemente que el ión de litio inhibe la actividad de GSK3. Klein *et al.*,

PNAS 93:8455-9 (1996). Desde 1924 se ha descrito que el litio posee efectos antidiabéticos incluyendo la habilidad de reducir las concentraciones plasmáticas de glucosa, aumentar la captación de glucógeno, potenciar a la insulina, regular aumentando la actividad de la glucosa sintasa y estimular la síntesis de glucógeno en las células de la piel, músculo y grasa. Sin embargo, el litio no ha sido ampliamente aceptado para uso en la inhibición de la actividad de GSK3, posiblemente por sus efectos documentados en dianas moleculares distintas a GSK3. El análogo de purina 5-yodotubercidina, que es también un inhibidor de GSK3, estimula igualmente la síntesis de glucógeno y antagoniza la inactivación de la glucógeno sintasa por el glucagón y la vasopresina en las células de hígado de rata. Fluckiger-Isler *et al.*, *Biochem. J.*, **292**:85-91 (1993); y Massillon *et al.*, *Biochem. J.*, **299**:123-8 (1994). Sin embargo, se ha descrito que este compuesto inhibe también otras serina/treonina y tirosina quinasas. Massillon *et al.*, *Biochem. J.*, **299**:123-8 (1994).

Enfermedad de Alzheimer

La GSK3 está también envuelta en las vías biológicas relacionadas con la enfermedad de Alzheimer (AD). Los aspectos patológicos característicos de AD son placas extracelulares de una forma de la proteína precursora amiloide (APP) procesada anormalmente, el llamado β -péptido amiloide (β -AP) y el desarrollo de marañas neurofibrilares intracelulares que contienen filamentos helicoidales apareados (PHF) que consisten principalmente en proteína tau hiperfosforilada. GSK3 es una de varias quinasas que se ha descubierto que fosforilan la proteína tau *in vitro* en los lugares anormales característicos de la PHF tau, y es la única quinasa que se ha demostrado también que hace esto en células vivas y en animales. Lovestone *et al.*, *Current Biology* **4**:1077-86 (1994); y Brownless *et al.*, *Neuroreport* **8**: 3251-3255 (1997). Además, el LiCl, inhibidor de la GSK3 quinasa, bloquea la hiperfosforilación de tau en las células. Stambolic *et al.*, *Current Biology* **6**:1664-8 (1996). Así la actividad de GSK3 puede contribuir a la generación de marañas neurofibrilares y consecuentemente a la progresión de la enfermedad. Recientemente se ha descrito que GSK3 β se asocia con otra proteína clave en la patogénesis de AD, la presenilina 1 (PS1). Takashima *et al.*, *PNAS* **95**:9637-9641 (1998). Las mutaciones en el gen PS1 conducen a una mayor producción de β -AP, pero los autores también demuestran que las proteínas PS1 mutantes se unen más fuertemente con GSK3 β y potencian la fosforilación de tau, que se une a la misma región de PS1.

Interesantemente se ha descrito también que otro sustrato de GSK3, β -catenina, se une a PS1. Zhong *et al.*, *Nature* **395**:698-702 (1998). La β -catenina citosólica está marcada para su degradación después de la fosforilación con GSK3 y la actividad reducida de β -catenina está asociada con mayor sensibilidad de las células neuronales a la apoptosis neuronal inducida por β -AP. Consecuentemente, la mayor asociación de GSK3 β con PS1 mutante puede explicar los niveles reducidos de β -catenina que se han observado en los cerebros de pacientes de AD PS1 mutante y al aumento de la mortalidad de las células neuronales relacionado con la enfermedad. Consistentemente con estas observaciones, se ha descrito que la inyección de GSK3 antisentido pero no la de GSK3 sentido, bloquea los efectos patológicos de β -AP en las neuronas *in vitro*, originando un retraso de 24 horas en la aparición de la muerte celular y un aumento en la supervivencia de las células de 12 a 35% después de 1 hora. Takashima *et al.*, *PNAS* **90**:7789-93 (1993). En estos últimos estudios, los efectos sobre la muerte celular están precedidos (dentro de 3-6 horas de la administración de β -AP) de un doblamiento de la actividad intracelular de GSK3, sugiriendo que además de los mecanismos genéticos que aumentan la cercanía de GSK3 a sus sustratos, β -AP pueda actualmente aumentar la actividad de GSK3. Evidencia adicional de un papel para GSK3 en AD está proporcionada por la observación de que el nivel de expresión de la proteína (pero, en este caso, no actividad específica) de GSK3 está aumentado en un 50% en sobrenadantes postsinápticos de AD en comparación con tejido cerebral normal. Pei *et al.*, *J Neuropathol Exp* **56**:70-78 (1997). Así, se cree que los inhibidores específicos de GSK3 actuarán ralentizando la progresión de la enfermedad de Alzheimer.

Otros trastornos del SNC

Además de los efectos del litio descritos anteriormente, hay una larga historia sobre el uso del litio para tratar el trastorno bipolar (síndrome maníaco depresivo). Esta respuesta clínica al litio puede reflejar una relación de la actividad de GSK3 con la etiología del trastorno bipolar, en cuyo caso los inhibidores de GSK3 podrían ser relevantes en esa indicación. Soportando esta noción se describió recientemente que el valproato, otro fármaco usando corrientemente en el tratamiento del trastorno bipolar, es también un inhibidor de GSK3. Chen *et al.*, *J Neurochemistry* **72**:1327-1330 (1999). Un mecanismo por el que el litio y otros inhibidores de GSK3 pueden actuar para tratar el trastorno bipolar es aumentar la supervivencia de neuronas sometidas a niveles aberrantemente altos de excitación inducida por el neurotransmisor, glutamato. Nonaka *et al.*, *PNAS* **95**:2642-2647 (1998). Se cree también que la toxicidad por excitación neuronal inducida por el glutamato es una causa importante de la neurodegeneración asociada con el daño agudo, tal como en la isquemia cerebral, el daño traumático al cerebro y la infección bacteriana. Además se cree que la señalización excesiva del glutamato es un factor en el daño crónico neuronal que se ve en enfermedades tales como la de Alzheimer, Huntington, Parkinson, demencia asociada con el SIDA, esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y esclerosis múltiple (MS). Thomas, *J. Am. Geriatr. Soc.* **43**: 1279-89 (1995). Consecuentemente se cree que los inhibidores de GSK3 son un tratamiento útil para estos y otros trastornos neurodegenerativos.

Potenciación inmune

GSK3 fosforila el factor de transcripción NF-AT y promueve su exportación fuera del núcleo, en oposición al efecto de la calcineurina. Beals *et al.*, *Science* **275**:1930-33 (1997). Así, GSK3 bloquea la activación del gen de respuesta inmune temprana vía NF-AT, y los inhibidores de GSK3 pueden tender a permitir o prolongar la activación de las respuestas inmunes. Así se cree que los inhibidores de GSK3 prolongan y potencian los efectos inmunoestimulatorios

de ciertas citoquinas, y dicho efecto puede mejorar el potencial de esas citoquinas en la inmunoterapia tumoral o realmente en la inmunoterapia en general.

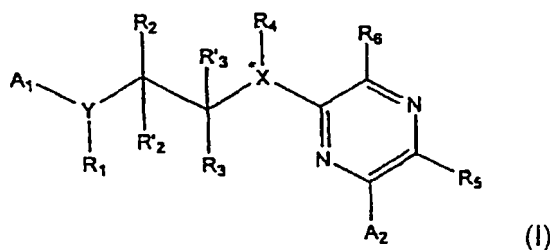
Otros trastornos

El litio tiene también otros efectos biológicos. Es un potente estimulante de la hematopoyesis, tanto *in vitro* como *in vivo*. Hammond *et al.*, *Blood* **55**:26-28 (1980). En perros, el carbonato de litio eliminó la neutropenia recurrente y normalizó otros contajes de células sanguíneas. Doukas *et al Exp Hematol* **14**: 215-221 (1986). Si estos efectos del litio están mediados por la inhibición de GSK3, entonces los inhibidores específicos de GSK3 pueden tener aplicaciones terapéuticas incluso más amplias.

Puesto que los inhibidores de GSK3 son útiles en el tratamiento de muchas enfermedades, la identificación de inhibidores nuevos de GSK3 sería muy deseable.

15 Compendio de la invención

Se ha descubierto sorprendentemente ahora que la actividad de la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) puede ser inhibida *in vitro* o *in vivo* por ciertos derivados basados en la pirazina proporcionados por la presente invención. Se ha descubierto que los derivados de pirazina de la invención poseen especificidad para GSK3. Según esto, la presente invención proporciona compuestos nuevos, composiciones y métodos para inhibir la actividad de GSK3 *in vitro* y para tratar los trastornos mediados por GSK3 *in vivo*. En un aspecto, la presente invención proporciona compuestos nuevos que tienen inhibición de la actividad de GSK3 de la siguiente fórmula (I):



en donde:

X e Y son nitrógeno:

A₁ y A₂ son aril o heteroaril opcionalmente sustituidos;

R₁, R₂, R₃ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, y alquil de cadena corta, cicloalquil de cadena corta, alquilaminoalquil, alcoxi de cadena corta, amino, alquilamino, alquilcarbonil, arilcarbonil, aralquilcarbonil, heteroarilcarbonil, heteroaralquilcarbonil, aril y heteroaril, todos opcionalmente sustituidos;

R'₂, y R'₃ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, y un alquil de cadena corta opcionalmente sustituido;

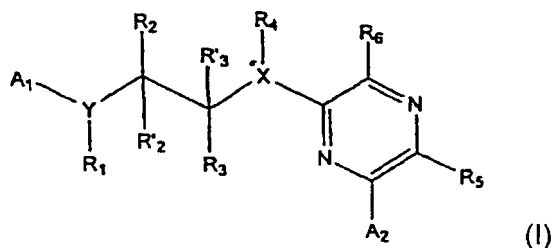
R₅ y R₆ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, halo, carboxilo, nitro, amino, amido, amidino, imido, imidino, ciano y los grupos sustituidos o no sustituidos alquil de cadena corta, alcoxi de cadena corta, alquilcarbonil, arilcarbonil, aralquilcarbonil, heteroarilcarbonil, heteroaralquilcarbonil, alquilcarboniloxi, arilcarboniloxi, aralquilcarboniloxi, alquilaminocarboniloxi, arilaminocarboniloxi, formil, alquilcarbonil de cadena corta, alcocarbonil de cadena corta, aminocarbonil, aminoaril, alquilsulfonil, sulfonilamino, sulfonamido, aminoalcoxi, alquilamino, arilamino, aralquilamino, heteroarilamino, heteroaralquilamino, alquilcarbonilamino, alquilaminocarbonilamino, arilaminocarbonilamino, aralquilcarbonilamino, heteroaralquilcarbonilamino, aminocarbonilamino, arilcarbonilamino, heteroarilcarbonilamino, amidino, cicloalquil, cicloamido, cicloamido, cicloamidino, heterocicloamidino, cicloimidino, heterocicloimidino, guanidil, cianoguanidil, aril, biaril, heteroaril, heterobiaril, heterociclo, heterocicloalquil, arilsulfonil y arilsulfonamido;

y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los métodos, compuestos y composiciones de la invención pueden emplearse solos, o en combinación con otros agentes farmacológicamente activos en el tratamiento de trastornos mediados por la actividad de GSK3, tales como en el tratamiento de la diabetes, enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos, obesidad, enfermedad cardiovascular aterosclerótica, hipertensión esencial, síndrome de ovario policístico, síndrome X, isquemia, especialmente isquemia cerebral, daño traumático cerebral, trastorno bipolar, inmunodeficiencia o cáncer.

Descripción detallada de la invención

Según la presente invención, se proporcionan compuestos, composiciones y métodos para la inhibición de la actividad de la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), o *in vitro* o *in vivo*. En un aspecto, la presente invención proporciona compuestos nuevos que tienen inhibición de la actividad de GSK3 de la fórmula siguiente (I):



en donde:

X e Y son nitrógeno;

A₁ y A₂ son aril o heteroaril opcionalmente sustituidos;

R₁, R₂, R₃ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, y alquil de cadena corta, cicloalquil de cadena corta, alquilaminoalquil, alcoxi de cadena corta, amino, alquilamino, alquilcarbonil, arilcarbonil, aralquilcarbonil, heteroarilcarbonil, heteroaralquilcarbonil, aril y heteroaril, todos opcionalmente sustituidos;

R'₂ y R'₃ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, y un alquil de cadena corta opcionalmente sustituido;

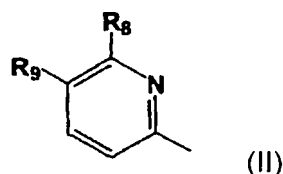
R₅ y R₆ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, halo, carboxi, nitro, amino, amido, amidino, imido, imidino, ciano y grupos sustituidos o no sustituidos de alquil de cadena corta, alcoxi de cadena corta, alquilcarbonil, arilcarbonil, aralquilcarbonil, heteroarilcarbonil, heteroaralquilcarbonil, alquilcarboniloxi, arilcarboniloxi, aralquilcarboniloxi, alquilaminocarboniloxi, arilaminocarboniloxi, formil, alquilcarbonil de cadena corta, alcocarbonil de cadena corta, aminocarbonil, aminoaril, alquilsulfonil, sulfonilamino, sulfonamido, aminoalcoxi, alquilamino, arilamino, aralquilamino, heteroarilamino, heteroaralquilamino, alquilcarbonilamino, alquilaminocarbonilamino, arilaminocarbonilamino, aralquilcarbonilamino, heteroaralquilcarbonilamino, aminocarbonilamino, arilcarbonilamino, heteroarilcarbonilamino, amidino, cicloalquil, cicloamido, ciclotioamido, cicloamidino, heterocicloamidino, heterocicloimido, guanidinil, cianoguanidinil, aril, biaril, heteroaril, heterobiaril, heterociclo, heterocicloalquil, arilsulfonil y arilsulfonamido;

y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En una realización actualmente preferida de la invención, al menos uno de X e Y es nitrógeno. Compuestos representativos de este grupo incluyen aquellos compuestos en los que uno de X e Y es nitrógeno y el otro de X e Y es oxígeno o un carbono opcionalmente sustituido. Preferiblemente ambos X e Y son nitrógeno.

Los constituyentes A₁ y A₂ pueden ser independientemente un anillo aromático que tiene de 3 a 10 átomos de carbono en el anillo y opcionalmente uno o más heteroátomos en el anillo. Así, en una realización A₁ y/o A₂ pueden ser un aril carbocíclico opcionalmente sustituido. Alternativamente, A₁ y/o A₂ son un heteroaril opcionalmente sustituido, tal como, por ejemplo, un grupo sustituido o no sustituido piridil, pirimidinil, tiazolil, indolil, imidazolil, oxadiazolil, tetrazolil, pirazinil, triazolil, tiofenil, furanil, quinolinil, purinil, naftil, benzotiazolil, benzopiridil, y benzimidazolil, que pueden estar sustituidos con al menos uno y no más de 3 grupos de sustitución. Grupos de sustitución representativos pueden seleccionarse independientemente del grupo que consiste en, por ejemplo, nitro, amino, ciano, halo, tioamido, amidino, oxamidino, alcóxiamidino, imidino, guanidino, sulfonamido, carboxi, formil, alquil de cadena corta, haloalquil de cadena corta, alcoxi de cadena corta, haloalcoxi de cadena corta, alquilalcoxi de cadena corta, alquilamino de cadena corta-alcoxi de cadena corta, alquilcarbonil de cadena corta, aralquilcarbonil de cadena corta, heteroaralquilcarbonil de cadena corta, alquiltio, aminoalquil y cianoalquil.

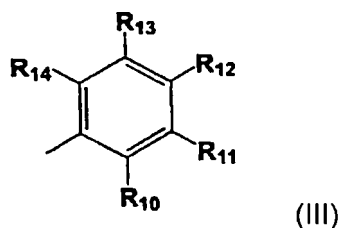
En una realización actualmente particularmente preferida de la invención, A₁ y/o A₂ tienen la fórmula:



10 en donde R₈ y R₉ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, nitro, amino, ciano, halo, tioamido, amidino, oxamidino, alcoxiamidino, imidino, guanidil, sulfonamido, carboxi, formil, alquil de cadena corta, haloalquil de cadena corta, alcoxi de cadena corta, haloalcoxi de cadena corta, alcoxialquil de cadena corta, alquilamino de cadena corta-alcoxi de cadena corta, alquilcarbonil de cadena corta, aralquilcarbonil de cadena corta, heteroaralquilcarbonil de cadena corta, alquiltio, aril y aralquil. Lo más preferible es que A se seleccione del grupo que consiste en nitropiridil, aminonitropiridil, cianopiridil, cianotiazolil, aminocianopiridil, trifluorometilpiridil, metoxipiridil, metoxinitropiridil, metoxicianopiridil y nitrotiazolil.

20 En otras realizaciones de la invención al menos uno de R₁, R₂, R₃ y R₄ pueden ser hidrógeno, o un alquil de cadena corta no sustituido o sustituido seleccionado del grupo que consiste en haloalquil de cadena corta, heterocicloaminoalquil, y alquilamino de cadena corta-alquil de cadena corta; o alquilamino de cadena corta-alquil de cadena corta. Realizaciones actualmente preferidas de la invención incluyen compuestos en donde R₁, R₂ y R₃ son hidrógeno y R₄ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metil, etil, aminoetil, dimetilaminoetil, piridiletil, piperidinil, pirrolidiniletil, piperaziniletil y morfoliniletil.

25 Otros compuestos de la invención actualmente preferidos incluyen compuestos de fórmula (I) en donde al menos uno de R₅ y R₆ se selecciona del grupo que consisten en aril, heteroaril y biaril sustituidos y no sustituidos. En las realizaciones actualmente preferidas, al menos uno de R₅ y R₆ es un resto sustituido o no sustituido de la fórmula:



35 en donde R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃ y R₁₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, nitro, amino, ciano, halo, tioamido, carboxi, hidroxil, y grupos opcionalmente sustituidos de alquil de cadena corta, alcoxi de cadena corta, alcoxialquil de cadena corta, haloalquil de cadena corta, haloalcoxi de cadena corta, aminoalquil, alquilamino, alquiltio, alquilcarbonilamino, aralquilcarbonilamino, heteroaralquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, heteroarilcarbonilamino, aminocarbonil, alquilaminocarbonil de cadena corta, aminoalquil, alquilaminoalquil de cadena corta, aril, heteroaril, cicloheteroalquil, aralquil, alquilcarboniloxil, arilcarboniloxil, aralquilcarboniloxil, arilcarboniloxialquil, alquilcarboniloxialquil, heteroarilcarboniloxialquil, arilalquilcarboniloxialquil, y heteroaralquilcarboniloxialquil. Actualmente se obtienen compuestos particularmente preferidos cuando R₁₀, R₁₁, R₁₃ y R₁₄ son hidrógeno y R₁₂ se selecciona del grupo que consiste en halo, alquil de cadena corta, hidroxil, alcoxi de cadena corta, haloalquil de cadena corta, aminocarbonil, alquilaminocarbonil, morfolino, piperidino y ciano; R₁₁, R₁₃ y R₁₄ son hidrógeno y R₁₀ y R₁₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en halo, alquil de cadena corta, hidroxil, alcoxi de cadena corta, haloalquil de cadena corta, morfolino, piperidino y ciano; R₁₀, R₁₁, R₁₃ y R₁₄ son hidrógeno y R₁₂ es heteroaril; R₁₀, R₁₁, R₁₃ y R₁₄ son hidrógeno y R₁₂ es un heterocicloalquil; y en donde al menos uno de R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃ y R₁₄ son halo, y el resto de R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃ y R₁₄ son hidrógeno. Preferiblemente, al menos uno de R₅ y R₇ se selecciona del grupo que consiste en clorofenil, diclorofenil, fluorofenil, difluorofenil, bromofenil, diclorofluorofenil, trifluorometilfenil, clorofluorofenil, bromoclorofenil, bromofluorofenil, etilfenil, metilclorofenil, etilclorofenil, imidazolilfenil, cianofenil, morfolinofenil y cianoclorofenil.

40 En realizaciones representativas de la invención, R₅ y R₆ pueden ser alquil sustituido, tal como aralquil, hidroxialquil, aminoalquil, aminoalquil, carbonilaminoalquil, alquilcarbonilaminoalquil, arilcarbonilaminoalquil, aralquilcarbonilaminoalquil, aminoalcoxialquil y arilaminoalquil; amino sustituido tal como alquilamino, alquilcarbonilamino, alcoxycarbonilamino, arilalquilamino, arilcarbonilamino, alquiltiocarbonilamino, arilsulfonilamino, heteroarilamino alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, heteroarilcarbonilamino, aralquilcarbonilamino, y heteroaralquilcarbonilamino; o carbonil sustituido tal como grupos no sustituidos o sustituidos aminocarbonil, alquiloxicarbonil, ariloxicarbonil, aralquilocarbonil y alquilaminoalquilocarbonil. En otras realizaciones, R₆ puede seleccionarse del grupo que consiste en amidino, guanidino, cicloimido, heterocicloimido, cicloamido, heterocicloamido, ciclotiamido y heterocicloalquil de cadena corta. En todavía otras realizaciones, R₆ puede ser aril o heteroaril, tal como, por ejemplo, grupos sustituidos o no sustituidos de piridil, pirimidinil, pirrolidinil, tiazolil, indolil, imidazolil, oxadiazolil, oxazolidinil, oxazolidinonil, tetrazolil, pirazinil, triazolil, tienil, furanil, quinolinil, pirroliopiridil, pirazoloniil, piridazinil, benzotiazolil, benzopiridil, benzotriazolil, y bencimidazolil. Como se usa aquí, grupos heterociclo representativos incluyen

ES 2 296 667 T3

aquellos mostrados a continuación (donde el punto de unión del grupo sustituyente, y los otros grupos sustituyentes mostrados a continuación, es a través del enlace superior izquierdo). Estos grupos heterociclo pueden ser adicionalmente sustituidos y pueden estar unidos en varias posiciones como será aparente a aquellos versados en la técnica de química orgánica y medicinal junto con la descripción de este documento.

5

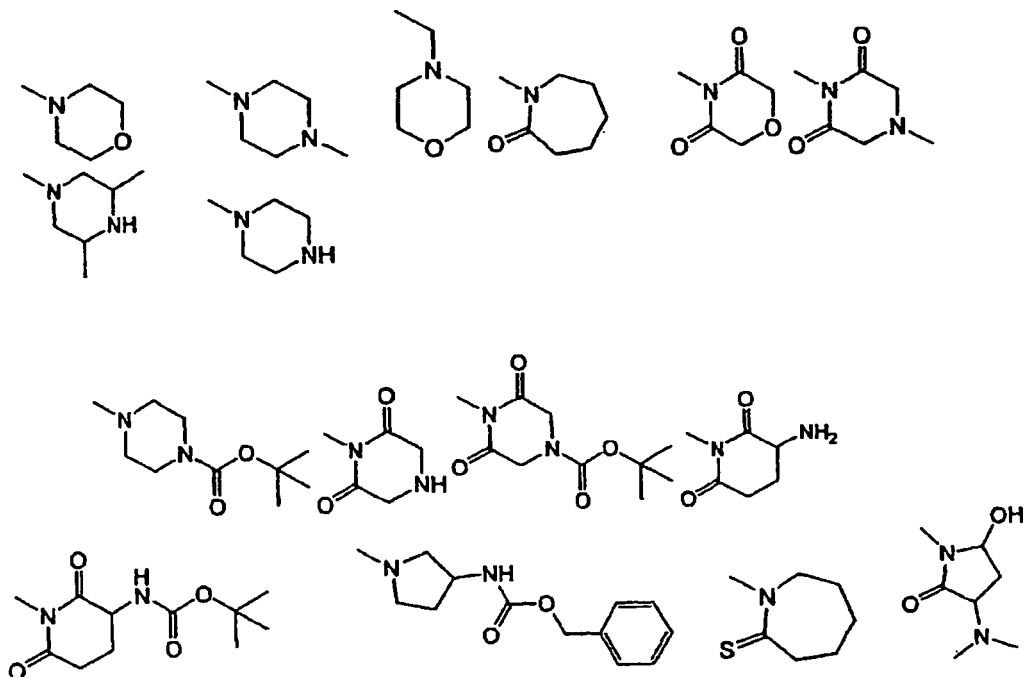
10

15

20

25

30



35

Grupos heteroaril representativos incluyen aquellos mostrados a continuación. Estos grupos heteroaril pueden ser adicionalmente sustituidos y pueden estar unidos en varias posiciones como será aparente a aquellos versados en la técnica de química orgánica y medicinal junto con la descripción de este documento.

40

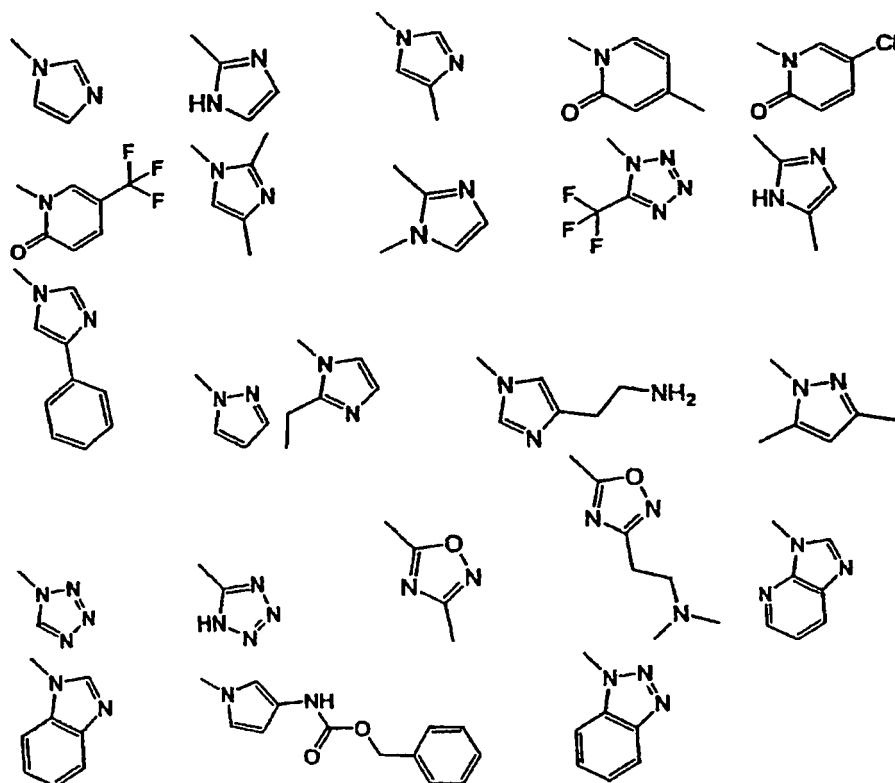
45

50

55

60

65



ES 2 296 667 T3

Grupos cicloimido y heterocicloimido representativos incluyen aquellos mostrados a continuación. Estos grupos cicloimido y heterocicloimido pueden ser adicionalmente sustituidos y pueden estar unidos en varias posiciones como será aparente a aquellos versados en la técnica de química orgánica y medicinal junto con la descripción de este documento.

5

10

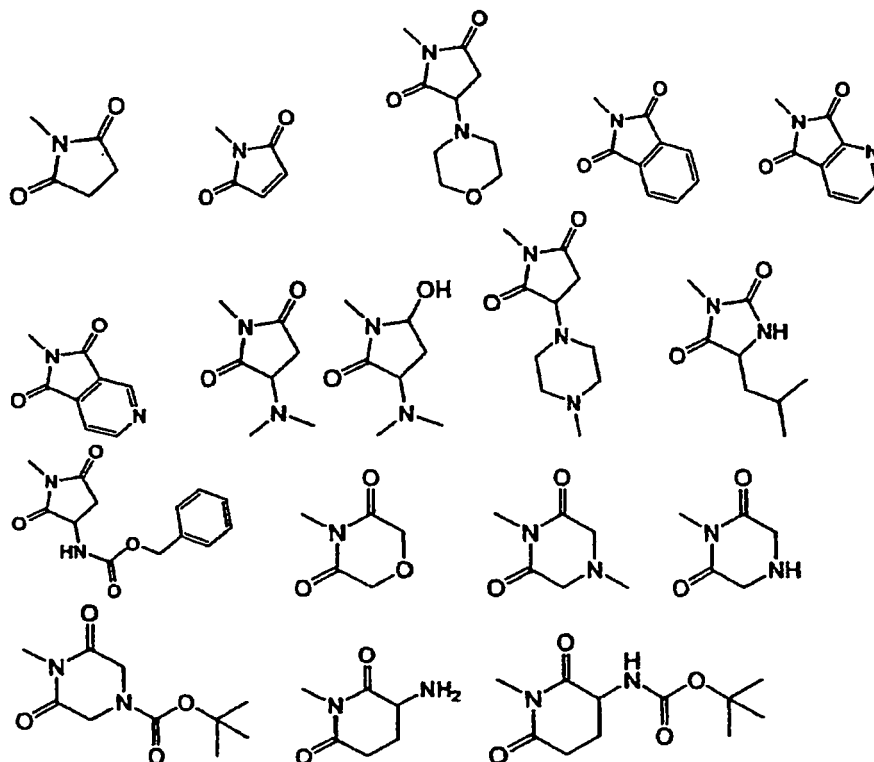
15

20

25

30

35

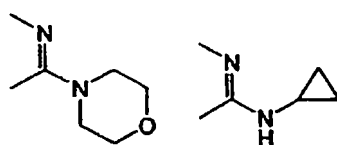


Grupos amidino y heterocicloamidino sustituidos representativos incluyen aquellos mostrados a continuación. Estos grupos amidino y heterocicloamidino pueden ser adicionalmente sustituidos como será aparente a aquellos versados en la técnica de química orgánica y medicinal junto con la descripción de este documento.

40

45

50

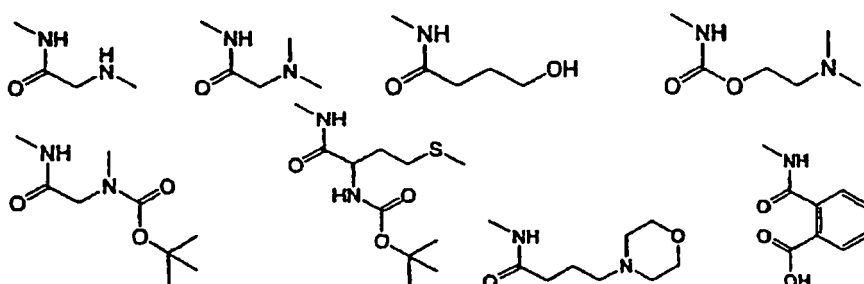


55

Grupos alquilcarbonilamino, alquiloxicarbonilamino, aminoalquiloxicarbonilamino, y arilcarbonilamino sustituidos representativos incluyen aquellos mostrados a continuación. Estos grupos pueden ser adicionalmente sustituidos como será aparente a aquellos versados en la técnica de química orgánica y medicinal junto con la descripción de este documento.

60

65



ES 2 296 667 T3

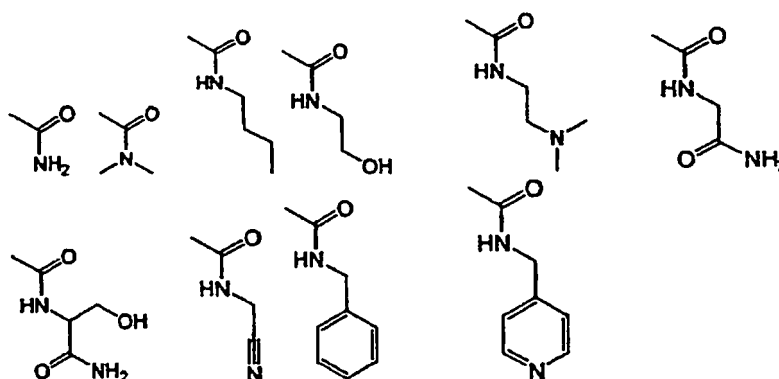
Grupos aminocarbonil sustituidos representativos incluyen aquellos mostrados a continuación. Estos grupos heterocíclicos pueden estar adicionalmente sustituidos como será aparente a aquellos versados en la técnica de química orgánica y medicinal junto con la descripción de este documento.

5

10

15

20



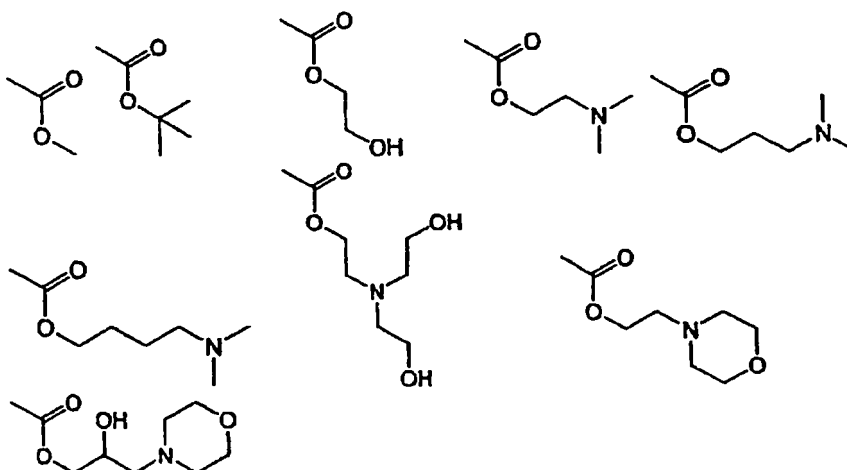
Grupos alcóxicarbonil sustituidos representativos incluyen aquellos mostrados a continuación. Estos grupos alcóxicarbonil pueden ser adicionalmente sustituidos como será aparente a aquellos versados en la técnica de química orgánica y medicinal junto con la descripción de este documento.

25

30

35

40



45

50

Compuestos representativos de este grupo actualmente preferidos incluyen {2-[(3-amino-4-nitrofenil)amino]etil} [6-(2,4-diclorofenil)-5-nitropirazin-2-il]-amina, {6-(2,4-diclorofenil)-5-nitropirazin-2-il}{2-[(4-nitrofenil)amino]etil}-amina, 4-[(2-[[6-(2,4-diclorofenil)-5-nitropirazin-2-il]amino]etil)amino]bencenocarbonitrilo, [6-(2,4-diclorofenil)-5-nitropirazin-2-il]metil{2-[(4-nitrofenil)amino]etil}amina, N-[5-({2-[(6-amino-5-nitro(2-piridil)amino]etil)-amino]-3-(2,4-diclorofenil)pirazin-2-il]acetamida, N-(2-[[6-(2,4-diclorofenil)-5-nitropirazin-2-il]amino]etil)terc-butoxi)carboxamida, [5-amino-6-(2,4-diclorofenil)pirazin-2-il]{2-[(6-amino-5-nitro(2-piridil)amino]etil}amina y N-[5-({2-[(6-amino-5-nitro(2-piridil)amino]etil)-amino]-3-(2,4-diclorofenil)pirazin-2-il}-2-(metilamino)acetamida.

55

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden una cantidad de un compuesto de fórmula (I) eficaz en modular la actividad de GSK3 en un sujeto que puede ser un ser humano o animal cuando se administra al mismo, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60

En todavía otras realizaciones, la invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) para la preparación de una composición farmacéutica para la inhibición de la actividad de GSK3 en un sujeto que puede ser un ser humano o animal, que comprende administrar al sujeto que puede ser un ser humano o animal una cantidad inhibitoria de GSK3 de un compuesto de la estructura (I).

65

La presente invención proporciona además el uso de un compuesto de fórmula (I) para la preparación de una composición farmacéutica para tratar a sujetos que pueden ser un ser humano o animal que sufren un trastorno mediado por GSK3 en un ser humano o animal, que comprende administrar al sujeto que puede ser un ser humano o animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la fórmula (I) anterior, tanto solo como en combinación con otros agentes terapéuticamente activos.

ES 2 296 667 T3

En todavía otras realizaciones, la presente invención proporciona compuestos de la fórmula (I), como se describió anteriormente, para uso como un fármaco, así como métodos para el uso de estos compuestos en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes, enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos, obesidad, enfermedad cardiovascular aterosclerótica, hipertensión esencial, síndrome de ovario polístico, síndrome X, isquemia, especialmente isquemia cerebral, daño traumático cerebral, trastorno bipolar, inmunodeficiencia o cáncer.

Como se usan aquí y en toda la memoria los siguientes términos tienen los significados definidos a continuación:

“Glucógeno sintasa quinasa 3” y “GSK3” se usan intercambiamente aquí para referirse a cualquier proteína que tenga más del 60% de homología de secuencia en los aminoácidos entre las posiciones 56 y 340 de la secuencia beta de aminoácidos de la GSK3 humana (Genbank Accesoión N° L33801). Para determinar el porcentaje de homología de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, se alinean las secuencias a fin de obtener una comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse cortes en la secuencia de un polipéptido o ácido nucleico para obtener una alineación óptima con el otro polipéptido o ácido nucleico). Los restos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácido correspondientes o posiciones de nucleótido se comparan entonces. Cuando una posición en una secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la otra secuencia, entonces las moléculas son homólogas en esa posición (o sea, como se usa aquí la “homología” de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a la “identidad” del aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de homología entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (o sea, % de homología = número de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100). La GSK3 fue originalmente identificada por su fosforilación de la glucógeno sintasa como se describe en Woodget *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, **16**:177-81 (1991). Por medio de la modulación de la actividad de quinasa de GSK3, las actividades que suceden después de la actividad de GSK3 pueden ser inhibidas, o, alternativamente, estimuladas. Por ejemplo, cuando se inhibe la actividad de GSK3, puede ser activada la glucógeno sintasa, obteniéndose una mayor producción de glucógeno. Se sabe también que GSK3 actúa como una quinasa en una variedad de otros contextos, incluyendo, por ejemplo, la fosforilación de c-jun, β -catenina y la proteína tau. Se entiende que la inhibición de la actividad de quinasa de GSK3 puede conducir a una variedad de efectos en una variedad de contextos biológicos. La invención, sin embargo, no está limitada por ninguna teoría o mecanismo en relación a como funciona la invención.

“Inhibidor de GSK3” se usa aquí para referirse a un compuesto que muestra una IC_{50} en relación a GSK3 de no más de alrededor de 100 μM y más típicamente no más de alrededor de 50 μM , como se mide en el ensayo libre de células de actividad de inhibición de GSK3 descrito en general aquí más tarde. La “ IC_{50} ” es la concentración de inhibidor que reduce la actividad de un enzima (por ejemplo, GSK3) a la mitad del nivel máximo. Se ha descubierto que compuestos representativos de la presente invención muestran actividad inhibitoria de GSK3. Los compuestos de la presente invención preferiblemente muestran una IC_{50} en relación a GSK3 de no más de alrededor de 10 μM , más preferiblemente, no más de alrededor de 5 μM , incluso más preferiblemente de no más de alrededor de 1 μM , y lo más preferible, de no más de alrededor de 200 nM, medida en el ensayo libre de células de GSK3 quinasa.

“Opcionalmente sustituido” se refiere al reemplazamiento de hidrógeno con un radical monovalente o divalente. Grupos adecuados de sustitución incluyen hidroxil, nitro, amino, imino, ciano, halo, tio, tioamido, amidino, imidino, oxo, oxamidino, metoxamidino, imidino, guanidino, sulfonamido, carboxil, formil, alquil de cadena corta, haloalquil de cadena corta, alcoxi de cadena corta, haloalcoxi de cadena corta, alcoxialquil de cadena corta, alquilcarbonil, arilcarbonil, aralquilcarbonil, heteroarilcarbonil, heteroaralquilcarbonil, alquiltio, aminoalquil y cianoalquil.

El grupo sustituyente puede así mismo estar sustituido. El grupo sustituido en el grupo sustituyente puede ser carboxil, halo, nitro, amino, ciano, hidroxil, alquil de cadena corta, alcoxi de cadena corta, aminocarbonil, -SR, tioamido, -SO₃H, -SO₂R o cicloalquil, en donde R es típicamente hidrógeno, hidroxil o alquil de cadena corta.

Cuando el sustituyente sustituido incluye un grupo de cadena lineal, la sustitución puede ocurrir tanto en la cadena (por ejemplo, 2-hidroxipropil, 2-aminobutil, y similares) o al final de la cadena (por ejemplo, 2-hidroxietil, 3-cianopropil, y similares). Los sustituyentes sustituidos pueden ser de cadena lineal, ramificada o arreglos cíclicos de carbonos unidos covalentemente o heteroátomos unidos covalentemente.

“Alquil de cadena corta” se usa aquí para referirse a grupos alquil ramificados o de cadena lineal que comprende de uno a diez átomos de carbono que están no sustituidos o sustituidos, por ejemplo, con uno o más halógenos, hidroxil u otros grupos, incluyendo, por ejemplo, metil, etil, propil, isopropil, *n*-butil, *t*-butil, neopentil, trifluorometil y pentafluoroetil.

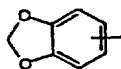
“Alquilenil” se refiere a un radical alifático saturado divalente de cadena lineal o ramificada que tienen de 1 a 20 átomos de carbono. Grupos alquilenil típicos empleados en los compuestos de la presente invención son grupos alquilenil de cadena corta que tienen de 1 a alrededor de 6 átomos de carbono en su esqueleto. “Alqueniil” se refiere aquí a radicales de cadena lineal, ramificada o cíclica que tienen uno o más enlaces dobles y de 2 a 20 átomos de carbono. “Alquinil” se refiere aquí a radicales de cadena lineal, ramificada o cíclica que tienen uno o más enlaces triples y de 2 a 20 átomos de carbono.

“Alcoxi de cadena corta” como se usa aquí se refiere a RO- en donde R es un alquil de cadena corta. Ejemplos representativos de grupos alcoxi de cadena corta incluyen metoxil, etoxil, *t*-butoxil y trifluorometoxil.

ES 2 296 667 T3

“Cicloalquil” se refiere a un sustituyente alquil mono o policíclico, heterocíclico o carbocíclico. Sustituyentes cicloalquil típicos tienen de 3 a 8 átomos en el esqueleto (o sea anillo) en el que cada átomo del esqueleto es o carbono o un heteroátomo. El término “heterocicloalquil” se refiere aquí a sustituyentes cicloalquil que tienen de 1 a 5, y más típicamente de 1 a 4 heteroátomos en la estructura del anillo. Heteroátomos adecuados empleados en los compuestos de la presente invención son nitrógeno, oxígeno y azufre. Restos heterocicloalquil representativos incluyen morfolino, piperazinil y piperadinil. Grupos carbocicloalquil son grupos cicloalquil en los que todos los átomos del anillo son carbono. Cuando se usa en conexión con sustituyentes cicloalquil, el término “policíclico” se refiere aquí a estructuras alquil cíclicas fusionadas y no fusionadas.

“Halo” se refiere aquí a un radical halógeno, tal como flúor, cloro, bromo o yodo. “Haloalquil” se refiere aquí a un radical alquil sustituido con uno o más átomos de halógeno. El término “haloalquil” de cadena corta se refiere a un radical alquil de cadena corta sustituido con uno o más átomos de halógeno. El término “haloalcoxi” se refiere a un radical alcoxi sustituido con uno o más átomos de halógeno. El término “haloalcoxi de cadena corta” se refiere a un radical alcoxi de cadena corta sustituido con uno o más átomos de halógeno.

“Aril” se refiere a grupos aromáticos monocíclicos y policíclicos que tienen de 3 a 14 átomos de carbono o heteroátomos en el esqueleto, y que incluyen tanto grupos aril carbocíclicos como grupos aril heterocíclicos. Grupos aril carbocíclicos son grupos aril en los que todos los átomos del anillo en el anillo aromático son carbono. El término “heteroaril” se refiere aquí a grupos aril que tienen de 1 a 4 heteroátomos como átomos del anillo en el anillo aromático y el resto de los átomos del anillo son carbono. Cuando se usa en conexión con sustituyentes aril, el término “policíclico” se refiere aquí a estructuras cíclicas fusionadas y no fusionadas en las que al menos una estructura cíclica es aromática, tal como benxodioxazol (que tiene una estructura heterocíclica fusionada con un grupo fenil, o sea  o naftil.

Restos aril ejemplarizantes empleados como sustituyentes en los compuestos de la presente invención incluyen fenil, piridil, pirimidinil, tiazolil, indolil, imidazolil, oxadiazolil, tetrazolil, pirazinil, triazolil, tiofenil, furanil, quinolinil, purinil, naftil, benzotiazolil, benzopiridil, y bencimidazolil.

“Aralquil” se refiere a un grupo alquil sustituido con un grupo aril. Típicamente, grupos aralquil empleados en los compuestos de la presente invención tienen de 1 a 6 átomos de carbono incorporados en la parte alquil del grupo aralquil. Grupos aralquil adecuados empleados en los compuestos de la presente invención incluyen, por ejemplo, bencil y picolil.

“Amino” se refiere aquí al grupo $-NH_2$. El término “alquilamino” se refiere aquí al grupo $-NRR'$ donde R y R' se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno o un alquil de cadena corta. El término “arilamino” se refiere aquí al grupo $-NRR'$ donde R es aril y R' es hidrógeno, un alquil de cadena corta, o un grupo aril. El término “aralquilamino” se refiere aquí al grupo $-NRR'$ donde R es un grupo aralquil de cadena corta y R' es hidrógeno, un alquil de cadena corta, un aril o un aralquil de cadena corta.

El término “arilcicloalquilamino” se refiere aquí al grupo aril-cicloalquil-NH donde el cicloalquil es un grupo cicloalquil divalente. Típicamente, el cicloalquil tiene de 3 a 6 átomos de carbono en el esqueleto, de los que, opcionalmente de 1 a alrededor de 4 son heteroátomos. El término “aminoalquil” se refiere a un grupo alquil que está sustituido en la parte terminal con un grupo amino.

El término “alcoxialquil” se refiere al grupo $-alquil_1-O-alquil_2$ donde $alquil_1$ es un grupo alquilenil o alquenil, y $alquil_2$ es un grupo alquil o alquenil. El término “alcoxialquil de cadena corta” se refiere a un alcoxialquil donde $alquil_1$ es un grupo alquilenil de cadena corta o alquenil de cadena corta, y $alquil_2$ es un grupo alquil de cadena corta o alquenil de cadena corta. El término “ariloxialquil” se refiere al grupo $-alquilenil-O-aril$. El término “aralcoxialquil” se refiere al grupo $-alquilenil-O-aralquil$, donde aralquil es un grupo aralquil de cadena corta.

El término “alcoxialquilamino” se refiere aquí al grupo $-NR-(alcoxialquil)$, donde R es típicamente hidrógeno, aralquil de cadena corta o alquil de cadena corta. El término “aminoalcoxi de cadena corta alquil” se refiere aquí a un grupo aminoalcoxialquil en el que el alcoxialquil es un alcoxialquil de cadena corta.

El término “aminocarbonil” se refiere aquí al grupo $-C(O)-NH_2$. “Aminocarbonil sustituido” se refiere aquí al grupo $-C(O)-NRR'$ donde R es alquil de cadena corta y R' es hidrógeno o alquil de cadena corta. El término “arilaminocarbonil” se refiere aquí al grupo $-C(O)-NRR'$ donde R es un grupo aril y R' es hidrógeno, alquil de cadena corta, o aril. “Aralquilaminocarbonil” se refiere aquí al grupo $-C(O)-NRR'$ donde R es alquil de cadena corta y R' es hidrógeno, alquil de cadena corta, aril, o aralquil de cadena corta.

“Aminosulfonil” se refiere aquí al grupo $-S(O)_2-NH_2$. “Aminosulfonil sustituido” se refiere aquí al grupo $-S(O)_2-NRR'$ donde R es un alquil de cadena corta y R' es hidrógeno o un alquil de cadena corta. El término “aralquilaminosulfonilaril” se refiere aquí al grupo $-aril-S(O)_2-NH-aralquil$, donde el aralquil es aralquil de cadena corta.

“Carbonil” se refiere al grupo divalente $-C(O)-$.

“Carboniloxi” se refiere generalmente al grupo $-C(O)-O-$. Dichos grupos incluyen ésteres, $-C(O)-O-R$, donde R es alquil de cadena corta, cicloalquil, aril o aralquil de cadena corta. El término “carboniloxicicloalquil” se refiere aquí

generalmente tanto a un “carboniloxicarbocicloalquil” como a un “carboniloxiheterocicloalquil”, o sea, donde R es un carbocicloalquil o heterocicloalquil, respectivamente. El término “arilcarboniloxi” se refiere aquí al grupo -C(O)-O-aril, donde el aril es un mono o policíclico, carbocicloaril o heterocicloaril. El término “aralquilcarboniloxi” se refiere aquí al grupo -C(O)-O-aralquil, donde el aralquil es aralquil de cadena corta.

El término “sulfonil” se refiere aquí al grupo -SO₂-. “Alquilsulfonil” se refiere a un grupo sulfonil sustituido de estructura -SO₂R en la que R es alquil. Grupos alquilsulfonil empleados en los compuestos de la presente invención son típicamente grupos alquilsulfonil de cadena corta que tienen de 1 a 6 átomos de carbono en su estructura. Así, grupos alquilsulfonil típicos empleados en los compuestos de la presente invención incluyen metilsulfonil (o sea, cuando R es metil), etilsulfonil (o sea, cuando R es etil), y propilsulfonil (o sea, cuando R es propil). El término “arilsulfonil” se refiere aquí al grupo -SO₂-aril. El término “aralquilsulfonil” se refiere aquí al grupo -SO₂-aralquil, en el que el aralquil es aralquil de cadena corta. El término “sulfonamido” se refiere aquí a -SO₂NH₂.

Como se usa aquí, el término “carbonilamino” se refiere al grupo divalente -NH-C(O)- en el que el átomo de hidrógeno del nitrógeno del amido del grupo carbonilamino puede ser reemplazado con un grupo alquil de cadena corta, aril o aralquil de cadena corta. Dichos grupos incluyen restos como ésteres carbamatos (-NH-C(O)O-R) y amidas -NH-C(O)-NR'-R, donde R y R' son alquil de cadena corta lineal o ramificada, cicloalquil, o aril o aralquil de cadena corta. El término “alquilcarbonilaminoalquil de cadena corta” se refiere a un alquilcarbonilamino donde R es un alquil de cadena corta que tiene de 1 a alrededor de 6 átomos de carbono en su esqueleto. El término “arilcarbonilamino” se refiere al grupo -NH-C(O)-R donde R es un aril. De forma similar, El término “aralquilcarbonilamino” se refiere al carbonilamino donde R es un aralquil de cadena corta.

Como se usa aquí, el término “guanidino” o “guanidil” se refiere a restos derivados de la guanidina, NH₂-C(=NH)-NH₂. Dichos restos incluyen aquellos unidos al átomo de nitrógeno que lleva el enlace doble principal (la posición “2” de la guanidina, por ejemplo diaminometilnamino, (NH₂)₂-C=NH- y aquellos unidos a cualquiera de los átomos de nitrógeno que llevan un enlace sencillo principal (las posiciones “1” y/o “3” de la guanidina, por ejemplo NH₂-C(=NH)-NH-). Los átomos de hidrógeno de cualquiera de los nitrógenos pueden ser reemplazados con un sustituyente adecuado, tal como un alquil de cadena corta, aril o aralquil de cadena corta.

Como se usa aquí, el término “amidino” se refiere a los restos R-C(=N)-NR'- (el radical está unido al nitrógeno “N¹”) y R-(NR')C=N (el radical está unido al nitrógeno “N²”), donde R y R' pueden ser hidrógeno, alquil de cadena corta, aril o aralquil de cadena corta.

Los compuestos de la presente invención pueden ser fácilmente sintetizados usando los métodos descritos aquí, u otros métodos, que son bien conocidos en la técnica.

Los compuestos inhibidores de GSK3 de la presente invención pueden purificarse usando métodos conocidos, tales como, por ejemplo, cromatografía, cristalización, y similares.

Los compuestos de la presente invención muestran preferiblemente una actividad inhibitoria que es relativamente sustancialmente selectiva en relación a la GSK3, cuando se la compara con al menos otro tipo de quinasa. Como se usa aquí, el término “selectivo” se refiere a una potencia de inhibición relativamente mayor frente a GSK3, cuando se la compara con al menos otro tipo de quinasa. Preferiblemente, los inhibidores de GSK3 de la presente invención son selectivos en relación a GSK3, cuando se la compara con al menos otros dos tipos de quinasas. Ensayos de actividad de quinasa para quinasas diferentes de GSK3 son en general conocidos. Véase, por ejemplo, Havlicek *et al.*, *J. Med. Chem.*, **40**:408-12 (1997), incorporado aquí como referencia. La selectividad de GSK3 puede ser cuantificada según la siguiente ecuación: selectividad de GSK3 = IC₅₀ (de otra quinasa) + IC₅₀ (GSK3), donde un inhibidor es selectivo para GSK3 cuando IC₅₀ (de otra quinasa) > IC₅₀(GSK3). Así, un inhibidor que es selectivo para GSK3 muestra una selectividad para GSK3 mayor de una vez en relación a la inhibición de una quinasa distinta de GSK3. Como se usa aquí, el término “otras quinasas” se refiere a una quinasa distinta de GSK3. Dichas selectividades se miden generalmente en el ensayo libre de células descrito en el Ejemplo 20.

Típicamente, los inhibidores de GSK3 de la presente invención muestran una selectividad de al menos alrededor de 2 veces (o sea, IC₅₀ (de otra quinasa) ÷ IC₅₀ (GSK3)) para GSK3, cuando se compara con otra quinasa y más típicamente muestran una selectividad de al menos alrededor de 5 veces. Usualmente, los inhibidores de GSK3 de la presente invención muestran una selectividad para GSK3, cuando se la compara con al menos otra quinasa, de al menos alrededor de 10 veces, deseablemente al menos alrededor de 100 veces y más preferiblemente, al menos alrededor de 1000 veces.

La actividad inhibitoria de GSK3 puede ser fácilmente detectada usando los ensayos descritos aquí, así como los ensayos conocidos generalmente por aquellos con habilidad ordinaria de la técnica. Métodos ejemplarizantes para identificar inhibidores específicos de GSK3 incluyen tanto ensayos de GSK3 quinasa libres de células como ensayos de GSK3 quinasa basados en células. Un ensayo de GSK3 quinasa libre de células detecta inhibidores que actúan por interacción directa con el polipéptido GSK3, mientras que un ensayo de GSK3 quinasa basado en células puede identificar inhibidores que funcionan tanto por interacción directa con GSK3 misma, o interfiriendo con la expresión de GSK3 o con el procesamiento post-translacional requerido para producir GSK3 madura activa.

En general, un ensayo de GSK3 quinasa libre de células puede llevarse a cabo fácilmente por medio de: (1) incubar GSK3 con un sustrato péptido, ATP radiomarcado (tal como, por ejemplo, $\gamma^{33}\text{P}$ - o $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, ambos comercializados

ES 2 296 667 T3

por Amersham, Arlington Heights, Illinois), iones de magnesio, y opcionalmente, uno o más inhibidores candidatos; (2) incubar la mezcla durante un periodo de tiempo para permitir la incorporación del fosfato radiomarcado al sustrato péptido por la actividad de GSK3; (3) transferir todo o una parte de la mezcla de reacción enzimática a un reactor separado, típicamente un pocillo de microtítulo que contiene una cantidad uniforme de un ligando de captura que es capaz de unirse con un ligando ancla en el sustrato péptido; (4) lavar para eliminar ATP radiomarcado no reaccionado; después (5) cuantificar la cantidad de ^{33}P o ^{32}P que permanece en cada pocillo. Esta cantidad representa la cantidad de fosfato radiomarcado incorporado al sustrato péptido. Se observa la inhibición como una reducción en la incorporación de fosfato radiomarcado al sustrato péptido.

Sustratos de péptido adecuados para uso en el ensayo libre de células puede ser cualquier péptido, polipéptido o derivado sintético de péptido que puede ser fosforilado por GSK3 en presencia de una cantidad apropiada de ATP. Sustratos de péptido adecuados pueden estar basados en partes de las secuencias de varios sustratos naturales de proteína de GSK3, y pueden también contener modificaciones o extensiones en el nitrógeno terminal o el carbono terminal incluyendo secuencias de espaciamiento y ligandos ancla. Así, el sustrato de péptido puede residir en un polipéptido más grande, o puede ser un péptido aislado diseñado para fosforilación por GSK3.

Por ejemplo, puede diseñarse un sustrato de péptido basado en una subsecuencia de la proteína de unión al ADN CREB, tal como la secuencia de péptido CREB unida a SGSG en la proteína de unión al ADN CREB descrita en Wang *et al.*, *Anal. Biochem.*, **220**:397-402 (1994), incorporada aquí como referencia. En el ensayo descrito por Wang *et al.*, el carbono terminal de la serina en el motivo SXXXX del péptido CREB es prefosforilado enzimáticamente por una proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA), una etapa que es requerida para hacer a la serina en la parte terminal de nitrógeno en el motivo capaz de ser fosforilada por GSK3. Como alternativa, puede emplearse un sustrato péptido CREB modificado que tiene el mismo motivo SXXXX y que también contiene un ligando ancla del nitrógeno terminal, pero que se sintetiza con su serina del carbono terminal prefosforilada (dicho sustrato está comercializado por Chiron Technologies PTY Ltd., Clayton, Australia). La fosforilación de la segunda serina en el motivo SXXXX durante la síntesis del péptido elimina la necesidad de fosforilar enzimáticamente este resto con PKA en una etapa separada, y la incorporación de un ligando ancla facilita la captura del sustrato de péptido después de su reacción con GSK3.

Generalmente, un sustrato de péptido usado en un ensayo de actividad de quinasa puede contener uno o más sitios que pueden ser fosforilados por GSK3, y uno o más sitios que pueden ser fosforilados por otras quinasas, pero no por GSK3. Así, estos otros sitios pueden ser prefosforilados para crear un motivo que puede ser fosforilado por GSK3. El término "prefosforilado" se refiere aquí a la fosforilación de un sustrato de péptido con fosfato no radiomarcado antes de llevar a cabo un ensayo de quinasa usando este sustrato de péptido. Dicha prefosforilación puede realizarse convenientemente durante la síntesis del sustrato de péptido.

El péptido CREB unido a SGSG puede unirse a un ligando ancla, tal como la biotina, donde la serina cerca del terminal de carbono entre P e Y está prefosforilada. Como se usa aquí, el término "ligando ancla" se refiere a un ligando que puede unirse a un sustrato de péptido para facilitar la captura del sustrato de péptido en un ligando de captura, y que funciona para mantener el sustrato de péptido en su sitio durante las etapas de lavado, pero que permite la eliminación de ATP radiomarcado no reaccionado. Un ligando ancla ejemplarizante es la biotina. El término "ligando de captura" se refiere aquí a una molécula que puede unirse a un ligando ancla con afinidad alta, y que está unida a una estructura sólida. Ejemplos de ligandos de captura unidos incluyen, por ejemplo, pocillos de microtítulo recubiertos de avidina o estreptavidina o cuentas de agarosa recubiertas de avidina o estreptavidina. Las cuentas que llevan los ligandos de captura pueden además combinarse con un centelleador para proporcionar un medio para detectar sustrato de péptido radiomarcado capturado, o puede añadirse centelleador al péptido capturado en una etapa posterior.

El sustrato de péptido radiomarcado capturado puede cuantificarse en un contador de centelleo usando métodos conocidos. La señal detectada en el contador de centelleo será proporcional a la actividad de GSK3 si la reacción enzimática se ha llevado a cabo en condiciones tales que solo una porción limitada (por ejemplo, menos del 20%) del sustrato de péptido es fosforilado. Si un inhibidor está presente durante la reacción, la actividad de GSK3 se reducirá, y una cantidad menor de fosfato radiomarcado se incorporará así al sustrato péptido. Por lo tanto, se detectará una señal de centelleo menor. Consecuentemente, la actividad inhibitoria de GSK3 se detectará como una reducción en la señal de centelleo, comparada a la observada en un control negativo donde no hay inhibidor durante la reacción. Este ensayo se describe en más detalle en el Ejemplo 265 aquí a continuación.

Un ensayo de actividad de quinasa GSK3 utiliza típicamente una célula que puede expresar tanto GSK3 como un sustrato de GSK3, tal como, por ejemplo, una célula transformada con genes que codifican GSK3 y su sustrato, incluyendo secuencias de control regulatorio para la expresión de genes. Al realizar el ensayo basado en células, la célula capaz de expresar los genes se incuba en presencia de un compuesto de la presente invención. Se lisa la célula, y se determina la proporción de sustrato en la forma fosforilada, por ejemplo, observando su movilidad en SDS PAGE con relación a la forma no fosforilada o determinando la cantidad de sustrato que es reconocido por un anticuerpo específico para la forma fosforilada del sustrato. La cantidad de fosforilación del sustrato es una indicación de la actividad inhibitoria del compuesto, o sea, se detecta la inhibición como una disminución en la fosforilación comparada con el ensayo realizado sin inhibidor. La actividad inhibitoria de GSK3 detectada en un ensayo basado en células puede ser debida, por ejemplo, a la inhibición de la expresión de GSK3 o a la inhibición de la actividad de quinasa de GSK3.

Así, los ensayos basados en células pueden también usarse para ensayar específicamente actividades que están implicadas en la inhibición de GSK3, tales como la inhibición de la fosforilación de la proteína tau, potenciación de la señalización de insulina, y similares. Por ejemplo, para evaluar la capacidad de un inhibidor de GSK3 de inhibir la fosforilación tipo Alzheimer de la proteína tau asociada al microtúbulo, pueden co-transfectarse las células con GSK3 β y proteína tau humana, después incubar las células con uno o más inhibidores candidatos. Pueden usarse varias líneas celulares de mamíferos y vectores de expresión en este tipo de ensayo. Por ejemplo, pueden transfectarse células COS tanto con un plásmido GSK3 β de expresión humana según el protocolo descrito en Stambolic *et al.*, 1996, *Current Biology* **6**:1664-68, como con un plásmido de expresión tal como pSG5 que contiene la secuencia codificadora de la proteína tau humana en un promotor temprano SV40. Véase también Goedert *et al.*, *EMBO J.*, **8**:393-399 (1989). La fosforilación tipo Alzheimer de tau puede detectarse fácilmente con un anticuerpo específico tal como, por ejemplo, AT8, que está comercializado por Polymedco Inc. (Cortland Manor, New York) después de lisar las células. Este ensayo se describe aquí en más detalle en los ejemplos a continuación.

Así mismo, la habilidad de los compuestos inhibidores de GSK3 para potenciar la señalización de insulina activando la glucógeno sintasa puede ser fácilmente investigada usando un ensayo de actividad de glucógeno sintasa basado en células. Este ensayo emplea células que responden a la estimulación de la insulina aumentando la actividad de la glucógeno sintasa, tal como la línea celular CHO-HIRC, que sobreexpresa el receptor de insulina tipo silvestre (≈ 100.000 lugares de unión/célula). La línea celular CHO-HIRC puede generarse como se describió en Moller *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **265**:14979-14985 (1990) y Moller *et al.*, *Mol. Endocrinol.*, **4**:1183-1191 (1990). El ensayo puede llevarse a cabo incubando células CHO-HIRC hambrientas de suero en presencia de varias concentraciones de compuestos de la presente invención en el medio, seguido por la lisis celular al final del periodo de incubación. La actividad glucógeno sintasa puede detectarse en el lisado como se describe en Thomas *et al.*, *Anal. Biochem.*, **25**:486-499 (1968). La actividad glucógeno sintasa se computa para cada muestra como un porcentaje de la máxima actividad glucógeno sintasa, como se describe en Thomas *et al.*, *supra*, y se representa gráficamente como una función de la concentración del candidato inhibidor de GSK3. La concentración de inhibidor del candidato de GSK3 que aumenta la actividad glucógeno sintasa a la mitad de su nivel máximo (o sea, la EC₅₀) puede calcularse calculando una curva sigmoideal de 4 parámetros usando métodos rutinarios de ajuste de curvas que son bien conocidos a aquellos de habilidad ordinaria en la técnica. Esto se describe en más detalle en el Ejemplo 266, aquí a continuación.

Los inhibidores de GSK3 pueden fácilmente cribarse en cuanto a su actividad *in vivo* tal como, por ejemplo, usando métodos que son bien conocidos a aquellos de habilidad ordinaria en la técnica. Por ejemplo, compuestos candidatos que tienen actividad terapéutica potencial en el tratamiento de la diabetes tipo 2 pueden identificarse fácilmente detectando una capacidad para mejorar la tolerancia a la glucosa en modelos animales de diabetes tipo 2. Específicamente, el compuesto candidato puede dosificarse usando cualquiera de varias rutas antes de la administración de un bolo de glucosa tanto en ratones diabéticos (por ejemplo, KK, db/db, ob/ob) o ratas diabéticas (por ejemplo, Zucker Fa/Fa o GK). Después de la administración del compuesto candidato y la glucosa, se toman muestras de sangre a intervalos de tiempo preseleccionados y se evalúan en cuanto a la glucosa sérica y las concentraciones de insulina. Una mejoría en la disposición de la glucosa en ausencia de concentraciones de secreción elevadas de insulina endógena puede considerarse como una sensibilización a la insulina y puede ser indicativa de la eficacia del compuesto. Una descripción detallada de este ensayo se proporciona aquí en los ejemplos a continuación.

Los compuestos de la presente invención pueden usarse en forma de sales derivadas de ácidos inorgánicos u orgánicos. Estas sales incluyen pero no están limitadas a las siguientes: acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, canforato, canforsulfonato, digluconato, ciclopentanopropionato, dodecilsulfato, etanosulfonato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, hidrocloreto, hidrobromuro, hidroyoduro, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, pamoato, pectinato, sulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, p-toluenosulfonato y undecanoato. También, los grupos que contienen un nitrógeno básico pueden ser cuaternizados con tales agentes como haluros de alquilo de cadena corta, tales como cloruros bromuros, y yoduros de metilo, etilo, propilo, y butilo, sulfatos de dialquilo tales como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo, y diamilo, haluros de cadena larga tales como cloruros bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de aralquilo como bromuro de bencilo y fenitilo, y otros. De esta forma se obtienen productos solubles en agua o aceite o dispersables.

Ejemplos de ácidos que pueden emplearse para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen tales ácidos inorgánicos como el ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico y tales ácidos orgánicos como el ácido oxálico, ácido maleico, ácido succínico y ácido cítrico. Pueden prepararse sales de adición de bases *in situ* durante el aislamiento y purificación final de los compuestos de fórmula (I), o separadamente haciendo reaccionar restos de ácidos carboxílicos con una base adecuada tales como hidróxido, carbonato o bicarbonato o un catión metálico farmacéuticamente aceptable o con amoniaco, o una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen cationes basados en los metales alcalinos y alcalinotérreos, tales como sales de sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y aluminio, así como cationes no tóxicos de amonio, amonio cuaternario, y aminas, incluyendo, amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina y etilamina. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de bases incluyen dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina y piperazina.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse en una variedad de formas incluyendo vías de administración entérica, parenteral y tópica. Por ejemplo, modos adecuados de administración incluyen oral, subcutánea, transdérmica, transmucosal, iontoforética, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, subdural y rectal.

Según otras realizaciones de la presente invención, se proporciona una composición que comprende el compuesto inhibidor de GSK3 de la presente invención, junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptables.

Excipientes adecuados farmacéuticamente aceptables incluyen agentes de procesamiento y modificadores de administración de fármacos y mejoradores, tales como fosfato cálcico, estearato magnésico, talco, monosacáridos, disacáridos, almidón, gelatina, celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, dextrosa, hidroxipropil- β -ciclodextrina, polivinilpirrolidona, ceras de bajo punto de fusión, resinas de intercambio de iones, y similares, así como combinaciones de cualquiera de dos o más de los mismos. Otros excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Pub. Co., New Jersey (1991).

Las composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos inhibidores de GSK3 de la presente invención pueden estar en cualquier forma adecuada para el método de administración planeado, incluyendo, por ejemplo, una solución, suspensión, o emulsión. Típicamente se usan vehículos líquidos para preparar soluciones, suspensiones y emulsiones. Vehículos líquidos contemplados para uso en la práctica de la invención incluyen, por ejemplo, agua, solución salina, disolvente(s) orgánico(s) farmacéuticamente aceptables, aceites o grasas farmacéuticamente aceptables, así como combinaciones de dos o más de los mismos. El vehículo líquido puede contener otros aditivos adecuados farmacéuticamente aceptables tales como solubilizantes, emulsificantes, nutrientes, tampones, conservantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, reguladores de la viscosidad y estabilizantes. Disolventes orgánicos adecuados incluyen alcoholes monohídricos, tales como etanol y alcoholes polihídricos, tales como los glicoles. Aceites adecuados incluyen, por ejemplo, aceite de soja, aceite de coco, aceite de oliva, aceite de flor de safrán y aceite de semilla de algodón. En la administración parenteral, el vehículo puede ser también un éster aceitoso tal como oleato de etilo y miristato de isopropilo. Las composiciones de la presente invención pueden estar también en forma de micropartículas, microcápsulas, encapsulados liposómicos, y similares, así como combinaciones de dos o más de los mismos.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse oralmente, parenteralmente, sublingualmente, por inhalación de un pulverizado, rectalmente o tópicamente en formulaciones de dosificación unitaria que contienen vehículos no tóxicos convencionales farmacéuticamente aceptables, adyuvantes, y vehículos como se desee. La administración tópica puede también envolver el uso de la administración transdérmica tal como parches transdérmicos o dispositivos de ionoforesis. El término parenteral se usa aquí para incluir la inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraesternal, o las técnicas de infusión.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas o oleaginosas estériles inyectables pueden formularse según la técnica conocida usando agentes adecuados dispersantes o humectantes y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico aceptable parenteralmente, por ejemplo, como una solución en 1,3-propanodiol. Entre los vehículos aceptables y disolventes que pueden emplearse está el agua, la solución de Ringer, y la solución isotónica de cloruro sódico. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos, estériles como un medio disolvente o de suspensión. Para este propósito cualquier aceite fijo sin sabor puede emplearse incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, ácidos grasos tales como el ácido oleico tienen uso en la preparación de inyectables.

Los supositorios para administración rectal del fármaco pueden prepararse mezclando el fármaco con un excipiente adecuado no irritante tal como manteca de cacao y glicoles de polietileno que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura rectal y por lo tanto se derretirán en el recto y liberarán el fármaco.

Formas de dosificación sólidas para administración oral pueden incluir cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, el compuesto activo puede ser mezclado con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Dichas formas de dosificación pueden también comprender, como es práctica normal, sustancias adicionales distintas a los diluyentes inertes, por ejemplo, agentes lubricantes tales como el estearato de magnesio. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación puede también comprender agentes tamponantes. Los comprimidos y píldoras pueden adicionalmente prepararse con recubrimiento entérico.

Formas de dosificación líquidas para administración oral pueden incluir emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires, todos ellos farmacéuticamente aceptables, que contienen diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, tal como agua. Dichas composiciones pueden también comprender adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsificantes y de suspensión, ciclodextrinas, y agentes edulcorantes, saborizantes y aromatizantes.

Según todavía otras realizaciones, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir la actividad de GSK3 en un sujeto que es un ser humano o animal, dicho método comprende administrar a un sujeto una cantidad del compuesto inhibidor de GSK3 que tiene la estructura (I); (IV) o (V) (o composición que comprende dicho compuesto) eficaz para inhibir la actividad de GSK3 en el sujeto. Otras realizaciones proporcionan el uso de un compuesto de fórmula (I) para la preparación de una composición farmacéutica para tratar una célula o un trastorno mediado por GSK3 en un sujeto que es un ser humano o animal, que comprende administrar a la célula o al sujeto que es un ser humano o animal una cantidad de un compuesto o composición de la invención eficaz para inhibir la actividad de GSK3 en la célula o el sujeto. Preferiblemente el sujeto será un ser humano o un animal. La inhibición de la actividad de GSK3 incluye la supresión detectable de la actividad de GSK3 tanto comparada con un control como comparada con la actividad de GSK3 esperada.

Las cantidades eficaces de los compuestos de la invención generalmente incluyen cualquier cantidad suficiente para inhibir la actividad de GSK3 de forma detectable por cualquiera de los ensayos aquí descritos, por otros ensayos de actividad de la GSK3 quinasa conocido por aquellos que tienen habilidad ordinaria en la técnica o detectando una mejora de los síntomas en un sujeto afectado por un trastorno mediado por GSK3.

Los trastornos mediados por GSK3 que pueden tratarse según la invención incluyen cualquier trastorno biológico o médico en el que está implicada la actividad de GSK3 o en el que la inhibición de GSK3 potencia la señalización a través de una vía que característicamente es defectiva en la enfermedad que se trata. La condición o trastorno puede ser causado o caracterizado por una actividad de GSK3 anormal. Trastornos representativos mediados por GSK3 incluyen, por ejemplo, la diabetes tipo 2, la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos, la obesidad, la enfermedad cardiovascular aterosclerótica, la hipertensión esencial, el síndrome del ovario policístico, el síndrome X, la isquemia, especialmente la isquemia cerebral, el daño traumático del cerebro, el trastorno bipolar, la inmunodeficiencia, el cáncer y similares.

El tratamiento exitoso de un sujeto según la invención puede originar desde la inducción de una reducción o alivio de los síntomas en un sujeto afectado por un trastorno médico o biológico a, por ejemplo, detener la progresión del trastorno, o la prevención del trastorno. Así, por ejemplo, el tratamiento de la diabetes puede originar una reducción de las concentraciones de glucosa o HbA1c en el paciente. De la misma manera, el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer puede originar una reducción de la velocidad de la progresión de la enfermedad, detectada, por ejemplo, midiendo una reducción en la velocidad del aumento de la demencia.

La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con los materiales vehículo para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del sujeto tratado y la forma particular de administración. Será entendido, sin embargo, que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, estado general de salud, sexo, dieta, tiempo de administración, ruta de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos, y severidad de la enfermedad particular para la que se administra la terapia. La cantidad terapéuticamente eficaz en una situación dada puede ser fácilmente determinada con experimentación rutinaria y está dentro de la habilidad y juicio del médico clínico ordinario.

Para los propósitos de la presente invención, una cantidad terapéuticamente eficaz generalmente será de alrededor de 0,1 mg/kg/día a alrededor de 100 mg/kg/día, preferiblemente de alrededor de 1 mg/kg/día a alrededor de 20 mg/kg/día, y lo más preferible de alrededor de 2 mg/kg/día a alrededor de 10 mg/kg/día de un compuesto inhibidor de GSK3 de la presente invención, que puede ser administrado en una dosis o dosis múltiples.

Los compuestos de la presente invención pueden también administrarse como liposomas. Como se conoce en la técnica, los liposomas generalmente se derivan de los fosfolípidos u otras sustancias lípidas. Los liposomas se forman con cristales líquidos hidratados mono o multilamelares que son dispersados en un medio acuoso. Puede usarse cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas. Las composiciones presentes en forma de liposomas pueden contener, además de un compuesto de la presente invención, estabilizantes, conservantes, excipientes, y similares. Los lípidos preferidos son los fosfolípidos y las fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticas. Los métodos para formar liposomas son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volumen XIV, Academic Press, New York, N.W., página 33 *et seq* (1976).

Mientras que los compuestos de la invención pueden administrarse como único agente farmacéutico activo, pueden también usarse en combinación con uno o más agentes distintos usados en el tratamiento de los trastornos. Agentes representativos útiles en combinación con los compuestos de la invención para el tratamiento de la diabetes tipo 2 incluyen la insulina, troglitazona, rosiglitazona, pioglitazona, glipizida, metformina, acarbosa y similares. Agentes representativos útiles en combinación con los compuestos de la invención para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer incluyen donepezil y tacrina. Agentes representativos útiles en combinación con los compuestos de la invención para el tratamiento de la enfermedad bipolar incluyen las sales de litio, el valproato y la carbamazepina. Un agente representativo útil en combinación con los compuestos de la invención para el tratamiento de la angina es, por ejemplo, el activador plasminogénico tisular.

Cuando se usan agentes activos adicionales en combinación con los compuestos de la presente invención, los agentes activos adicionales pueden generalmente emplearse en cantidades terapéuticas como se indica en el PHYSICIANS' DESK REFERENCE (PDR) 53ª edición (1999), o dichas cantidades terapéuticamente útiles como serían conocidas a una persona de habilidad ordinaria en la técnica.

Los compuestos de la invención y los otros agentes terapéuticamente activos pueden administrarse a la dosis clínica máxima recomendada o a dosis más bajas. Los niveles de dosificación de los compuestos activos en las composiciones de la invención pueden variarse para obtener una respuesta terapéutica deseada dependiendo de la vía de administración, severidad de la enfermedad y respuesta del paciente. La combinación puede administrarse como composiciones separadas o como una forma de dosificación única que contiene ambos agentes. Cuando se administra como una combinación, los agentes terapéuticos pueden formularse como composiciones separadas que se dan al mismo tiempo o tiempos distintos, o los agentes terapéuticos pueden darse como una composición única.

ES 2 296 667 T3

Lo anterior y otros aspectos de la invención pueden ser entendidos mejor en conexión con los siguientes ejemplos representativos.

5 Ejemplos

Ejemplo 1

Métodos de caracterización y purificación

10

Los compuestos de la presente invención se caracterizaron por cromatografía de alta resolución (HPLC) usando un sistema de cromatografía Millennium de Waters con Modulo de separación 2690 (Milford, Massachussets). Las columnas analíticas fueron fase reversa Alltima C-18, 4,6 x 250 mm de Alltech (Deerfield, Illinois). Se usó la elución en gradiente, típicamente comenzando con 5% de acetonitrilo/95% de agua y progresando a 100% de acetonitrilo en un periodo de 40 minutos. Todos los disolventes contenían 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA). Los compuestos se detectaron por absorción de luz ultravioleta (UV) a 220 o 254 nm. Los disolventes de HPLC fueron de Burdick y Jackson (Muskegan, Michigan), o Fisher Scientific (Pittsburg, Pensilvania). En algunos casos, la pureza se evaluó por cromatografía en capa fina (CCF) usando placas de vidrio o plástico recubiertas de gel de sílice, tales como, por ejemplo, láminas flexibles de Baker-Flex Silica Gel IB2-F. Los resultados de CCF fueron fácilmente detectados visualmente bajo luz ultravioleta, o empleando vapor de yodo y otras técnicas varias de teñido bien conocidas.

15

20

El análisis espectrométrico de masas se llevó a cabo en un espectrofotómetro de masas Electrospray VG de Fisons. Todas las masas se describen como las de los iones moleculares protonados.

25

Los análisis por resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron con un aparato Varian de 300 MHz (Palo Alto, California). La referencia espectral fue o TMS o el desplazamiento químico conocido del disolvente. Algunas muestras del compuesto se realizaron a temperaturas elevadas (por ejemplo 75°C) para promover el aumento de solubilidad de la muestra.

30

La pureza de algunos compuestos de la invención se evaluó por análisis elemental (Desert Analitics, Tucson, Arizona).

35

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Mel-Temp de Laboratory Devices (Holliston, Massachussets).

40

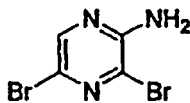
Las separaciones preparativas se llevaron a cabo usando o un sistema cromatográfico Flash 40 y KP-Sil, 60^a (Biotage, Charlottesville, Virginia), o un aparato cromatográfico radial Chromatotron (Harrison Research, Palo Alto, California), o por HPLC usando una columna de fase reversa C-18. Los disolventes típicos empleados fueron diclorometano, metanol, acetato de etilo y trietilamina.

45

Ejemplo 2

Síntesis de 3,5-dibromopirazinil-2-amina

45



50

Se añadieron lentamente a 15°C 11,2 ml de bromo en 38 ml de ácido acético, con agitación a una solución de 2-aminopirazina (9,5 g, 100 mmoles) y acetato sódico trihidrato (32,6 g) en 150 ml de ácido acético. La adición requirió alrededor de 1-2 horas y se llevó a cabo en la oscuridad. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La solución se concentró a vacío y el residuo viscoso marrón se vertió en agua helada (150 ml) con agitación. Se añadió hidróxido sódico acuoso al 20% para obtener un pH de 8 y se extrajo con acetato de etilo (4x75 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (2x50 ml) y salmuera (1x50 ml), secaron y concentraron. El producto bruto se purificó por cromatografía de columna (2:1 hexanos y acetato de etilo) para proporcionar el compuesto deseado.

55

60

HPLC: 8,7 minutos (98% puro).

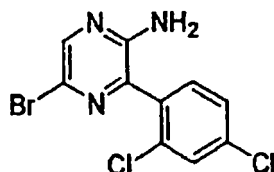
65

MS: MH⁺=251,8 C₄H₃Br₂N₃ = 250,8 g/mol.

ES 2 296 667 T3

Ejemplo 3

Síntesis de 3-(2,4-diclorofenil)-5-bromopirazinil-2-amina



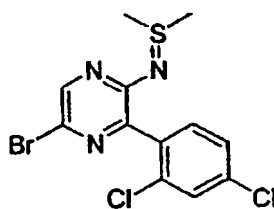
A una solución de dibromopirazinilamina (1 g, 3,95 mmoles) en benceno (25 ml), se añadieron Pd(PPh₃)₄ (230 mg, 0,02 mmoles), carbonato sódico (840 mg, 7,9 mmoles) en 4 ml de agua y ácido diclorofenilborónico (830 mg, 4,3 mmoles) en 1 ml de etanol. La mezcla se reflujoó con agitación vigorosa durante la noche. La solución se concentró y extrajo con acetato de etilo (50 ml) y agua (20 ml). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2x50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (1x25 ml) y salmuera (1x30 ml), secaron, y concentraron. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (4:1 hexanos y acetato de etilo) para proporcionar el compuesto deseado como un isómero único.

HPLC: 13,6 minutos (98% puro).

MS: MH⁺=317,9 C₁₀H₆BrCl₂N₃ = 316,9 g/mol.

Ejemplo 4

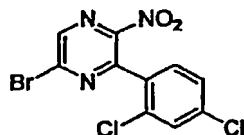
Síntesis de (1Z)-1-aza-1-[3-(2,4-diclorofenil)-5-bromopirazin-2-il]-2-metil-2-tia-1-propeno



A una solución de dimetilsulfóxido (1,6 ml, 22,3 mmoles) en cloruro de metileno seco (16 ml) a -78°C en atmósfera de nitrógeno se añadió anhídrido sulfónico de trifluorometano (3,6 ml, 20,8 mmoles) gota a gota para obtener un precipitado blanco. A esto se añadió una solución de bromoaminopirazina (4,7 g, 14,9 mmoles) en cloruro de metileno (30 ml) y dimetilsulfóxido (15 ml) y la solución resultante se calentó a temperatura ambiente y agitó durante 1 hora. La mezcla de reacción se paró con hidróxido sódico 1N y agitó a 0°C durante 15 minutos. La solución se extrajo con cloruro de metileno (3X30 ml) y las capas orgánicas se lavaron con agua (2x30 ml), salmuera (30 ml), secaron y concentraron.

Ejemplo 5

Síntesis de 3-(2,4-diclorofenil)-5-bromo-2-nitropirazina



A una solución de sulfilimina en cloruro de metileno (15 ml) se añadió una solución de ácido m-cloroperbenzoico (5,1 g, 29,8 mmoles) en 15 ml de cloruro de metileno a 0°C. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y después se añadieron 2 ml de sulfuro de dimetilo con agitación durante otros 10 minutos. La solución se filtró rápidamente para dar una solución clara del derivado nitroso. Esta solución se enfrió a 0°C y se barboteó ozono durante 20 minutos y la solución resultante se lavó con solución saturada de bicarbonato sódico, agua y salmuera, se secó, concentró y purificó utilizando cromatografía de columna para dar el compuesto con el grupo nitro.

HPLC: 15,2 min (88% puro).

MS: MH⁺= 347,7 C₁₀H₄BrCl₂N₃O₂ = 346,9 g/mol.

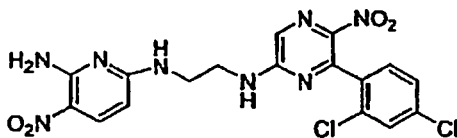
ES 2 296 667 T3

Ejemplo 6

Síntesis de {2-[(3-amino-4-nitropiridil)amino]etil}[6-(2,4-diclorofenil)-5-nitropirazin-2-il]amina

5

10



15

A una solución de 3-(2,4-diclorofenil)-5-bromo-2-nitropirazina (20 mg, 0,057 mmoles) en DMF (1 ml), se añadieron (2-aminoetil)(6-amino-5-nitro(2-piridil)amina (12,3 mg, 0,06 mmoles) y diisopropiletilamina (40 μ l, 0,228 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 12 horas a 80°C. La mezcla bruta se concentró a vacío y se sometió a cromatografía en columna (5% metanol en cloruro de metileno) para dar el compuesto del epígrafe como un sólido amarillo brillante.

20

HPLC: 13,0 min (99% puro).

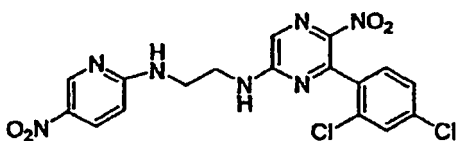
MS: MH⁺=465,2 C₁₇H₁₄Cl₂N₈O₄ = 464,0 g/mol.

Ejemplo 7

25

Síntesis de [6-(2,4-diclorofenil)-5-nitropirazin-2-il]{2-[4-nitropiridil]amino}etil}amina

30



35

A una solución de 3-(2,4-diclorofenil)-5-bromo-2-nitropirazina (20 mg, 0,057 mmoles) en DMF (1 ml), se añadieron (2-aminoetil)(5-nitro(2-piridil)amina (11,3 mg, 0,06 mmoles) y diisopropiletilamina (40 μ l, 0,228 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 12 horas a 80°C. La mezcla bruta se concentró a vacío y se sometió a cromatografía de columna (5% metanol en cloruro de metileno) para producir el compuesto del epígrafe como un sólido amarillo brillante.

40

HPLC: 14,0 min (99% puro).

MS: MH⁺=450,9 C₁₇H₁₃Cl₂N₇O₄=449,0 g/mol.

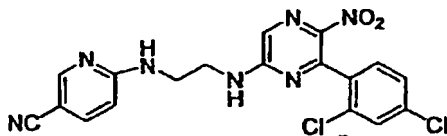
45

Ejemplo 8

Síntesis de 4-[(2-[[6-(2,4-diclorofenil)-5-nitropirazin-2-il]amino]etil)amino]piridilcarbonitrilo

50

55



60

A una solución de 3-(2,4-diclorofenil)-5-bromo-2-nitropirazina (20 mg, 0,057 mmoles) en DMF (1 ml), se añadieron 6-[(2-aminoetil)amino]piridin-3-carbonitrilo (10,0 mg, 0,06 mmoles) y diisopropiletilamina (40 μ l, 0,228 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 12 horas a 80°C. La mezcla bruta se concentró a vacío y se sometió a cromatografía de columna (5% metanol en cloruro de metileno) para producir el compuesto del epígrafe como un sólido amarillo brillante.

65

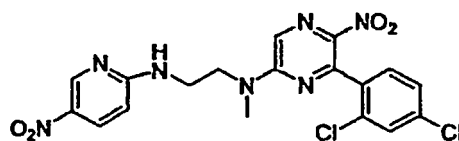
HPLC: 12,9 min (90% puro).

MS: MH⁺=430,2 C₁₈H₁₃Cl₂N₇O₂=429,0 g/mol.

ES 2 296 667 T3

Ejemplo 9

Síntesis de [6-(2,4-diclorofenil)-5-nitropirazin-2-il]metil[2-[(4-nitropiridil)amino]etil]amina



A una solución de 3-(2,4-diclorofenil)-5-bromo-2-nitropirazina (20 mg, 0,057 mmoles) en DMF (1 ml), se añadieron (2-aminoetil)metil[5-nitro(2-piridil)]amina (12,0 mg, 0,06 mmoles) y diisopropilamina (40 μ l, 0,228 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 12 horas a 80°C. La mezcla bruta se concentró a vacío y se sometió a cromatografía de columna (5% metanol en cloruro de metileno) para producir el compuesto del epígrafe como un sólido amarillo brillante.

HPLC: 14,3 min (95% puro).

MS: MH^+ =464,2 $C_{18}H_{15}Cl_2N_7O_4$ =463,0 g/mol.

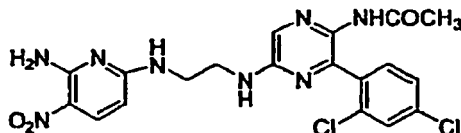
Ejemplo 10

Síntesis de N-acetil-N-[3-(2,4-diclorofenil)-6-bromopirazin-2-il]acetamida

Una solución de 3-(2,4-diclorofenil)-5-bromopirazin-2-ilamina (200 mg, 0,63 mmoles) en anhídrido acético (3 ml), se mantuvo a reflujo durante 2 días. La mezcla se concentró a vacío para producir el compuesto del epígrafe.

Ejemplo 11

Síntesis de N-[5-({2-[(6-amino-5-nitro(2-piridil))amino]etil}amino)-3-(2,4-diclorofenil)pirazin-2-il]acetamida



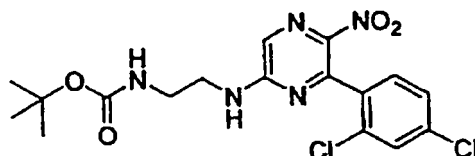
A una solución de N-acetil-N-[3-(2,4-diclorofenil)-6-bromopirazin-2-il]acetamida (57 mg, 0,14 mmoles) en DMF (2 ml), se añadió (2-aminoetil)(6-amino-5-nitro(2-piridil))amina (28 mg, 0,141 mmoles), terc-butóxido sódico (20 mg, 0,21 mmoles), BINAP (38 mg, 0,06 mmoles) y acetato de paladio (10 mg, 0,04 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a 80°C durante la noche. La solución se enfrió a temperatura ambiente, se extrajo con acetato de etilo y agua. Se separaron las capas y la capa orgánica se lavó con agua y salmuera, secó, concentró y purificó para dar el compuesto del epígrafe.

HPLC: 3,3 min (98% puro).

MS: MH^+ =476,1 $C_{19}H_{18}Cl_2N_8O_3$ =477,3 g/mol.

Ejemplo 12

Síntesis de N-(2-[[6-(2,4-diclorofenil)-5-nitropirazin-2-il]amino]etil)(terc-butoxi)carboxamida



A una solución de 3-(2,4-diclorofenil)-5-bromo-2-nitropirazina (1,4 g, 4,0 mmoles) en DMF (10 ml), se añadió Boc-etilendiamina (960 mg, 6,0 mmoles) y DIPEA (1,5 ml). La solución se agitó a 80°C durante la noche. La solución se enfrió a temperatura ambiente, se extrajo con acetato de etilo y agua. Se separaron las capas y la capa orgánica se lavó con agua y salmuera, secó, concentró y purificó para dar el compuesto del epígrafe.

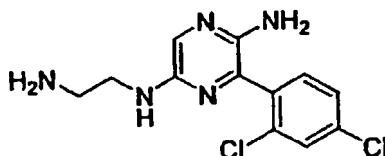
ES 2 296 667 T3

HPLC: 12,9 min (95% puro).

MS: MH^+ =428,0 $C_{17}H_{19}Cl_2N_5O_4$ =427,0 g/mol.

5 Ejemplo 13

Síntesis de [5-amino-6-(2,4-diclorofenil)pirazin-2-il](2-aminoetil)amina



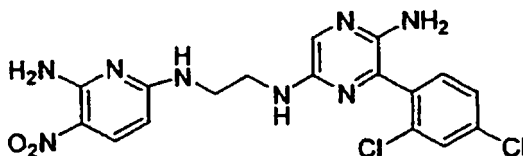
A una solución de N-(2-[[6-(2,4-diclorofenil)-5-nitropirazin-2-il]amino]etil)(terc-butoxi)carboxamida (170 mg, 0,39 mmoles) en etanol (2 ml), se añadió paladio al 5% en carbono e hidrazina (250 mg, 7,9 mmoles), y se agitó a 70°C. La solución se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con etanol, filtró para eliminar el paladio sobre carbono, concentró a vacío. La amina correspondiente se extrajo con TFA al 10% en cloruro de metileno (2 ml) y se agitó a 35°C durante 6 horas. La solución se concentró a vacío para proporcionar el compuesto deseado.

HPLC: 6,0 min (99% puro).

MS: MH^+ =298,0 $C_{12}H_{13}Cl_2N_5$ =297,0 g/mol.

Ejemplo 14

Síntesis de [5-amino-6-(2,4-diclorofenil)pirazin-2-il]{2-[(6-amino-5-nitro(2-piridil))amino]etil}amina



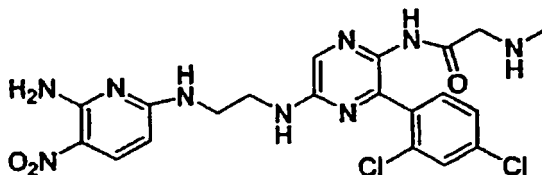
El compuesto se preparó a partir de [5-amino-6-(2,4-diclorofenil)pirazin-2-il](2-aminoetil)amina y 6-cloro-3-nitro-2-piridilamina según el procedimiento descrito para el ejemplo 6.

HPLC: 8,9 minutos (98% puro).

MS: MH^+ =435,2 $C_{17}H_{16}Cl_2N_8O_2$ =434,0 g/mol.

Ejemplo 15

Síntesis de N-[5-({2-[(6-amino-5-nitro(2-piridil))amino]etil}amino)-3-(2,4-diclorofenil)pirazin-2-il]-2-(metilamino)acetamida



A una solución de [5-amino-6-(2,4-diclorofenil)pirazin-2-il]{2-[(6-amino-5-nitro(2-piridil))amino]etil}amina (30 mg, 0,068 mmoles) en THF (2 ml) se añadió sarcosina (26 mg, 0,138 mmoles), HBTU (104,5 mg, 0,2756 mmoles) y DIPEA (60 μ l) y se agitó durante la noche a 80°C. la mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente, concentró y extrajo en acetato de etilo y agua. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con agua y salmuera, secó, concentró y purificó para dar el compuesto del epígrafe. HPLC: 7,2 minutos (98% puro)

MS: MH^+ =506,3 $C_{20}H_{18}Cl_2N_8O_3$ =505,1 g/mol.

ES 2 296 667 T3

Ejemplo 16

Cribado para actividad inhibitoria de GSK3 usando un ensayo libre de células

5 Los compuestos de piridina y pirimidina de la presente invención se disolvieron en DMSO, después se probaron en cuanto a la inhibición de GSK3 β humana (la secuencia de nucleótidos para GSK3 β humana aparece en GenBank bajo el n° de acceso N° L33801). La expresión de GSK3 β se describe, por ejemplo, en Hughes *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **203**: 305-11 (1992).

10 Una alícuota de 300 μ l de tampón de sustrato (30 mM tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 3 μ g/ml GSK3 β y 0,5 μ M de péptido de CREB unido a SGSG prefosforilado biotilado (Chiron Technologies PTY Ltd., Clayton, Australia) se dispensó dentro de pocillos de una placa de microtítulo de polipropileno de 96 pocillos. Se dispensaron 3,5 μ l/pocillo de DMSO que contenía concentraciones variables de cada compuesto a ensayar o estaurosporina (un inhibidor de quinasa conocido usado como control positivo, o un control negativo (por ejemplo DMSO solo), y se
15 mezcló completamente. Las reacciones se iniciaron después por adicción de 50 μ l/pocillo de 1 μ M de ATP no marcado y 1-2 x10⁷ cpm γ ³³P-ATP marcado, y la reacción se dejó proceder durante tres horas a temperatura ambiente.

Mientras que la reacción estaba procediendo, placas de captura "Combiplate 8" de Labsystems recubiertas de estreptavidina (Labsystems, Helsinki, Finlandia) se bloquearon por medio de incubarlas con 300 μ l/pocillo de PBS
20 conteniendo 1% de albúmina de suero bovino durante al menos una hora a temperatura ambiente. La solución de bloqueo fue después eliminada por aspiración, y las placas de captura se llenaron con 100 μ l/pocillo de reactivo de frenado (50 μ M ATP/20 mM EDTA).

25 Cuando terminó la reacción enzimática a las tres horas, alícuotas de 100 μ l por triplicado de cada mezcla de reacción se transfirieron a tres pocillos que contenían solución de frenado, un pocillo de cada una de las tres placas de captura, y el contenido del pocillo fue bien mezclado. Después de una hora a temperatura ambiente, los pocillos de las placas de captura se vaciaron por aspiración y lavaron cinco veces usando PBS y el lavador de placas ELISA 430474 de Corning de 12 canales. Finalmente, 200 μ l de líquido de centelleo Microscint-20 se añadió a cada pocillo de la
30 placa. Las placas se recubrieron con selladores de placa, después se dejaron en un agitador durante 30 minutos. Cada placa de captura se contó en un contador de centelleo TopCount de Packard (Meridian, Connecticut) y los resultados se representaron gráficamente como una función de la concentración del compuesto.

Los compuestos de la presente invención fueron después cribados por actividad inhibitoria frente a GSK3 según este ensayo. Los compuestos de los ejemplos 3-14 mostraron IC₅₀s de 1 μ M o menor con respecto a GSK3 en este
35 ensayo libre de células.

Por consiguiente, estos resultados demuestran que los compuestos de la presente invención muestran actividad inhibitoria frente a GSK3.

40 Ejemplo 17

Cribado para actividad inhibitoria de GSK3 usando un ensayo de Glucógeno sintasa basado en células

45 Células CHO-HIRC se mantienen en placas de cultivo tisular de 10 cm en medio F12 de Ham/suero bobino fetal dializado al 10%. Las células de una placa de 10 cm confluyente se recogen y dividen en los 6 pocillos de una placa tisular de 6 pocillos a un volumen final de 2 ml de medio. Las células se dejan crecer a 37°C durante 24 horas. Las células se lavan después tres veces en medio F12 de Ham que no contiene suero bovino fetal, y finalmente las células se dejan durante 24 horas a 37°C en 2 ml de medio libre de suero.

50 Al final de este tiempo, se añade 20 μ l del compuesto disuelto en DMSO a cada pocillo e incuban a 37°C. Después de 20 minutos el medio se elimina y las células se lavan una vez en PBS a temperatura ambiente y después rápidamente se congelan en las placas con nitrógeno líquido. Después las células se descongelan sobre hielo en presencia de 140 μ l de tampón de lisis (50 mM Tris pH 7,8; 1 mM EDTA, 100 mM NaF, 25 μ g/ml leupeptina, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) por pocillo. Las células se rascan de las placas y congelan en tubos Eppendorf sobre hielo seco. Después los lisados se derriten y se recongelan sobre hielo seco.

Después del nuevo descongelado, los lisados se centrifugan a 14.000 g durante 15 minutos. Los sobrenadantes se eliminan después y guardan con hielo. Cada sobrenadante (45 μ l) se añade a 45 μ l de tampón de reacción (65 mM Tris pH 7,8; 26 mM EDTA, 32,5 mM KF, 9,3 mM UDP-Glucosa; 11 mg/ml glucógeno; 500 nCi/ml ¹⁴C-UDP-glucosa) y se añade adicionalmente 45 μ l a 45 μ l del tampón de reacción/20 mM glucosa-6-fosfato. Las reacciones se incuban a 30°C durante 30 minutos y después se aplican a un papel de cromatografía cuadrado de 2 cm 31ET (Whatman). Los papeles de filtro se lavan dos veces durante 20 minutos en etanol del 66%, enjuagan brevemente en acetona y se secan durante 1 hora a temperatura ambiente.

65 Se añaden los filtros a 5 ml de líquido de centelleo y se cuentan en un contador de centelleo líquido. El porcentaje de glucógeno sintasa total que es activo en cualquier lisado se expresa como 100X (cpm menos glucosa-6-fosfato)/(cpm más glucosa-6-fosfato). Dichos valores se determinaron por duplicado para 5 concentraciones diferentes del

ES 2 296 667 T3

compuesto y para DMSO solo, y los valores se representaron gráficamente después frente al logaritmo de la concentración. La concentración del compuesto que estimula la actividad de la glucógeno sintasa al 50% del nivel máximo se determinó ajustando una curva sigmoideal a los datos representados. El nivel máximo se define como el nivel al que la actividad de la glucógeno sintasa tiende asintóticamente a medida que la concentración del compuesto de prueba aumenta sustancialmente más allá de la EC₅₀.

Ejemplo 18

10 Cribado para la inhibición de la fosforilación de la proteína Tau

A. Tranfección pasajera de células COS con el plásmido de expresión de GSK3 y expresión de Tau

15 Construcción del plásmido

Células COS se mantienen en matraces de cultivo de tejidos T25 en medio MEM de alta concentración de glucosa/5% suero bovino fetal. Las células de un matraz T25 confluyente se recolectan y se siembran 80.000 células/pocillo en placas de cultivo celular de 6 pocillos de Corning en un volumen final de 2 ml/pocillo de medio. Las células se dejan crecer a 37°C durante 48 horas. Las células se lavan después dos veces en Opti-MEM que no contiene suero bovino fetal, y finalmente las células se dejan en 1 ml de Opti-MEM.

El polinucleótido que codifica la proteína tau se subclona en el plásmido pSG5 bajo un promotor SV40 temprano para generar un plásmido de expresión tau. El clonado del cADN que codifica la proteína tau se describe en general por Goedert *et al.*, *EMBO Journal*, 8(2); 393-399 (1989), que se incorpora aquí como referencia. Un plásmido de expresión de GSK3 se prepara subclonando el polinucleótido que codifica GSK3 β en pCG, que es un derivado de ApEVRF descrito por Giese *et al.*, *Genes & Development*, 9:995-1008 (1995) y Matthias *et al.*, *Nuclei Acid Research*, 17:6418 (1989).

Las soluciones siguientes se preparan en tubos de Eppendorf de 1,5 ml: Solución A: para cada tranfección, 2 μ g de ADN (plásmido de expresión de tau) y 0,7 μ g de ADN (plásmido de expresión de GSK3) se diluyen en 100 μ l de Opti-MED (Gibco BRL); Solución B: para cada transfección, 8 μ l de reactivo de Lipofectamina se diluye en 100 μ l de Opti-MEM. Las dos soluciones se combinan, se mezclan suavemente, y se incuban a temperatura ambiente durante 45 minutos para permitir que los complejos ADN-liposoma se formen. Para cada transfección, se añade 0,8 ml de Opti-MEM al tubo que contiene los complejos. La solución diluida se mezcla suavemente y deposita sobre las células lavadas. Las células se incuban con el complejo de ADN/Lipofectamina durante 6 horas a 37°C en un incubador de CO₂. A continuación de la incubación, se añade 1 ml de medio de crecimiento (MEM de alta concentración de glucosa) con FBS al 20% a cada pocillo e incuba a 37°C durante la noche. El medio se reemplaza con uno nuevo, medio completo a las 18 horas después de comenzar la transfección, y las células se dejan crecer a 37°C durante otras 48 horas.

40 B. Ensayo de inhibición de la fosforilación de tau

Dos horas antes de la recolección, 2 μ l del compuesto de prueba (Inhibidor de GSK3) disuelto en DMSO se añade a cada pocillo e incuba a 37°C. Después de 2 horas se elimina el medio y las células se congelan rápidamente en las placas sobre hielo seco y se guardan a -70°C. Las células se descongelan sobre hielo en presencia de 200 μ l de tampón de lisado (1% Triton® X-100, 20 mM Tris pH 7,5, 137 mM NaCl, 15% glicerol, 25 μ g/ml leupeptina, 1 μ g/ml pepstatina-A, 1 μ M PMSF, 21 μ g/ml aprotinina, 50 mM NaF, 50 mM β -glicerofosfato, 15 mM pirofosfato sódico, 1 mM ortovanadato sódico). Los contenidos de cada pocillo se centrifugan a 14.000 g, 4°C durante 5 minutos y los sobrenadantes se transfirieren a tubos limpios. En este punto los lisados deben guardarse a -20°C.

50 C. ELISA para detectar el tau fosforilado en los lisados de células

Tiras de Immulon 4 (Dynatech) se recubren con tau anti-fosforilada monoclonal (AT8, Polimedco, Inc.) a 5 μ g/ml en PBS que contiene Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺, 100 μ l/pocillo. Después de la incubación durante la noche a 4°C, las tiras se lavan dos veces con tampón de lavado (PBS que contiene 0,05% Tween® 20) y bloquean con PBS que contiene 1% BSA, 5% suero de ratón normal y 0,05% Tween® 20 a temperatura ambiente durante 1 hora. Las tiras se lavan 5 veces con tampón de lavar. El lisado (100 μ l) diluido 1:10 en PBS que contiene 1% de BSA, y 0,1% NaN₃ se añade a cada pocillo e incuba a temperatura ambiente durante 1 hora. Después del lavado, se añade a cada pocillo 100 μ l de 0,5 μ g/ml anti-(no-fosforilada)tau monoclonal biotinilada (HT7, Polimedco, Inc) en PBS-BSA. Las tiras se lavan 5 veces y se añade estreptavidina HRP-conjugada, incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos y lavan extensivamente con tampón de lavado. El sustrato de TMB (Pierce) se usa para el desarrollo del color y la reacción se para añadiendo un volumen igual de ácido sulfúrico 0,8 M. Las tiras se leen en un lector de placas ELISA usando un filtro de 450 nm. La concentración del compuesto que inhibe la fosforilación de tau al 50% del nivel máximo (o sea IC₅₀) se determina ajustando una curva sigmoideal a los datos representados gráficamente.

65

ES 2 296 667 T3

Ejemplo 19

Comprobación del potencial de los inhibidores de GSK3 para proteger las células primarias del hipocampo de la excitotoxicidad del glutamato

5 El hipocampo de ratas embrionarias de 18-19 días se diseccionó. Los tejidos se recogieron en medio Hibernate TM (Gibco BRL) y trocearon en piezas de 1 mm aproximadamente. Los tejidos se disociaron usando el sistema Papain Dissociation System (Worthington Biochemical Corporation). Después del aislamiento las células se resuspendieron en medio libre de suero de Neurobasal TM (Gibco BRL), suplementado de B27 al 2% (Gibco BRL), L-glutamina y antibiótico. Las células se colocaron en placas de cultivo de tejidos de 35 mm recubiertas con poli-L-lisina a una concentración de $7,5 \times 10^4$ células por placa.

15 Después de 10-14 días a 37°C en CO₂ al 5% las células se lavaron y alimentaron con medio fresco. Al día siguiente los compuestos representativos de la invención se añadieron al medio de cultivo a una concentración final de entre 1 nM y 100 μ M. De cuatro a ocho horas después de la adición del compuesto el medio de acondicionamiento se eliminó de las células y se guardaron a 37°C. Los cultivos se lavaron dos veces con una solución salina tamponada con HEPES equilibrada (HBSS) que contenía 10 μ M glicina. Grabb y Choi, *J. Neuroscience* **19**:1657-62 (1999). Los cultivos se expusieron después durante 5 minutos a temperatura ambiente a 200 μ M de ácido glutámico en el mismo HBSS. Después de la exposición, los cultivos se lavaron tres veces con el tampón y después se devolvieron a su medio condicionado original que contenía los compuestos. Veinte a veinticuatro horas después de la exposición al ácido glutámico, los cultivos se lavaron con HBSS y expusieron durante 10 minutos a Azul de tripán. Este tinte es incorporado por las células muertas. Los cultivos se lavaron y después se fijaron durante 30 minutos en 4% paraformaldehído. Se contaron el número de neuronas grandes vivas y muertas (núcleos azules) (al menos 200 células de cada cultivo) por microscopía de contraste de fase y se fotografiaron. Usando este método, se ha mostrado que los compuestos de esta invención son capaces de reducir significativamente el potencial del glutamato para inducir la muerte de la célula neuronal.

Ejemplo 20

30 *Evaluación de la eficacia en roedores diabéticos (Prueba de tolerancia a la glucosa)*

Formulación del compuesto para dosis oral

35 Los compuestos de prueba fueron típicamente formulados para administración oral como soluciones en agua o suspensiones en carboximetilcelulosa al 1%/tween-80 al 0,1% (ambos de Sigma Chem., MO) el día antes de la administración. Algunos de los primeros compuestos se formularon como soluciones en captisol al 15% (una ciclodextrina modificada de CyDex Co., IL) siguiendo los procedimientos comunes a estos que siguen a continuación. Para las soluciones acuosas, polvo del compuesto de prueba liofilizado y seco se solubilizó en agua destilada y se mezcló bien por agitación con vortex y sonificación. Si fuera necesario, el pH de la solución de prueba se ajusta con NaOH 1N o HCl 1N y finalmente se esteriliza filtrando a través de una jeringa adicionada con una membrana de acetato de celulosa de 0,2 micrones (Millipore Co., MA). Para suspensiones orales, el polvo del compuesto de prueba se mezcla con suspensión reciente de carboximetilcelulosa al 1%/tween-80 al 0,1% y se sonica extensivamente, el pH se ajusta si es necesario como se describió anteriormente, y se agita con vortex hasta que el tamaño de partícula es homogéneo y menor de 10 micrones.

45 *Prueba de tolerancia de glucosa del ratón diabético*

50 Ratonos (hembra C57B1Ks/J) db/db obesos se obtuvieron de Jackson Labs (Bar Harbor, ME) de 8 semanas de edad y se utilizaron para la prueba de eficacia 1-2 semanas más tarde. En la mañana de una prueba, se retiró la comida por la mañana temprano (7-8 horas antes del bolo de glucosa). Se aplicó anestesia local (crema de EMLA, Astra Pharm., MA) al extremo de la cola y se obtuvieron muestras de 50-100 μ l de sangre de la vena del extremo de la cola y se recogió en tubos eppendorf que contenían 5 μ l de 500 U/ml de heparina sódica (Elkins-Sinn, NJ) con subsiguiente aislamiento del plasma. Las muestras se obtuvieron a varios intervalos a lo largo del día para un total de 6-8 puntos de tiempo. Los ratones se distribuyeron al azar en grupos de tratamiento y se administró la primera dosis oral del compuesto de prueba (0,2 ml) 4,5 horas antes de la glucosa y otra vez 0,5 horas antes de la administración de 0,2 ml de dextrosa al 50% (Abbott Lab., IL) vía dosificación oral (oGTT, prueba de la tolerancia a la glucosa oral) o por inyección intraperitoneal. Después de la muestra de sangre final después de 2 horas de la administración de la glucosa, se retornó la comida a los animales.

60 *Regulación de la glucemia basal y la insulinemia basal*

65 Los compuestos de prueba típicamente fueron administrados por vía oral a ratones db/db (véase anteriormente) o ratas ZDF (Genetic Models, Inc.; Indianápolis, IN) en el contexto de un régimen multi-día multi-dosis o como un bolo único. Las ratas ZDF se recibieron con 8 semanas de edad y se utilizaron para la prueba de eficacia 1-2 semanas más tarde. La comida se retiró alrededor de 30 minutos antes de la dosificación y se administró un bolo único del compuesto de prueba (volumen de dosificación oscilando de 1 a 8 mg/ml). La sangre se muestreó como se describió anteriormente 1-6 puntos de tiempo en las próximas 2-3 horas. La comida se retornó a las jaulas de los animales después del muestreo de sangre.

Puntos finales primarios

Las concentraciones de insulina y glucosa se midieron de las muestras de plasma y/o sangre. Las concentraciones de glucosa se midieron de sangre completa por el glucómetro de One-Touch (Lifescan Co., CA) y del plasma por el analizador de glucosa de Beckman. Los resultados de glucosa típicamente reflejan los valores de la sangre para los estudios del ratón y los valores del plasma para los estudios de la rata. Las medidas de las concentraciones de insulina fueron vía ELISA (Crystal Chem. Co., IL) siguiendo el protocolo del suministrador.

Cuantificación de resultados

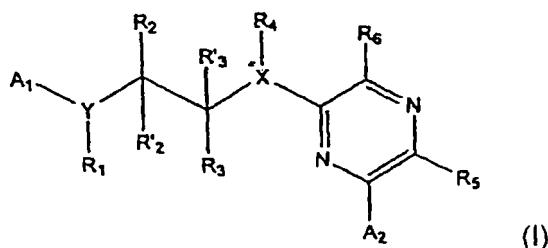
La eficacia puede expresarse como mg/dl glucosa o ng/ml insulina o representarse como el área bajo la curva (AUC) para la glucosa del plasma (tomada por encima de la línea base normoglucémica de 100 mg/dl) e insulina (tomada por encima de la línea de base normoinsulinémica de 1 ng/ml). Típicamente, cuando se expresa como AUC, los resultados se representan actualmente como AUC reducida ($[(AUC \text{ del vehículo control} - AUC \text{ del grupo de prueba})/AUC \text{ del vehículo control} \times 100]$). Dicha expresión proporciona una expresión cuantitativa única de la magnitud de la eliminación de glucosa mejorada y/o hiperglucemia basal reducida o conservación de insulina en relación con el grupo control del placebo.

Resultados

Los compuestos representativos de la invención mostraron buena potencia *in vitro*, y cuando se formularon en captisol y administraron por vía subcutánea a ratones (30 mg/kg), mostraron alta biodisponibilidad y penetración del tejido *in vivo*. Se observó una reducción significativa en la hiperglucemia basal justo antes de la prueba de tolerancia a la glucosa, y significativamente una eliminación de glucosa mejorada siguiendo el enfrentamiento de la glucosa. Se observó una reducción del 45-50% en la AUC con relación al grupo control si la respuesta de la glucosa se cuantifica determinando el área bajo la curva de glucosa de la sangre (AUC) desde -60 minutos a +120 minutos. Esto es comparable a la eficacia obtenida con Troglitazona (cuando se dosifica oralmente por al menos varios días a 60 o 100 mg/kg/día). También significativa fue la observación de que las concentraciones de insulina en animales tratados permanecieron más bajas que las de los ratones control.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la estructura



en donde:

X e Y son nitrógeno;

A₁ y A₂ son aril o arilamino, ariloxi o heteroaril opcionalmente sustituidos;

R₁, R₂, R₃ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, y alquil de cadena corta, cicloalquil de cadena corta, alquilaminoalquil, alcoxi de cadena corta, amino, alquilamino, alquilcarbonil, arilcarbonil, aralquilcarbonil, heteroarilcarbonil, heteroaralquilcarbonil, aril y heteroaril, todos opcionalmente sustituidos;

R'₂ y R'₃ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, y un alquil de cadena corta opcionalmente sustituido;

R₅ y R₆ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, halo, carboxi, nitro, amino, amido, amidino, imido, imidino, ciano y grupos sustituidos o no sustituidos de alquil de cadena corta, alcoxi de cadena corta, alquilcarbonil, arilcarbonil, aralquilcarbonil, heteroarilcarbonil, heteroaralquilcarbonil, alquilcarboniloxi, arilcarboniloxi, aralquilcarboniloxi, alquilaminocarboniloxi, arilaminocarboniloxi, formil, alquilcarbonil de cadena corta, alcocicarbonil de cadena corta, aminocarbonil, aminoaril, alquilsulfonil, sulfonilamino, sulfonamido, aminoalcoxi, alquilamino, arilamino, aralquilamino, heteroarilamino, heteroaralquilamino, alquilcarbonilamino, alquilaminocarbonilamino, aminocarbonilamino, arilaminocarbonilamino, aralquilcarbonilamino, heteroaralquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, heteroarilcarbonilamino, amidino, cicloalquil, cicloamido, ciclotioamido, cicloamidino, heterocicloamidino, cicloimidino, heterocicloimidino, guanidino, aril, biaril, heteroaril, heterobiaril, heterocicloalquil, arilsulfonil y arilsulfonamido;

y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismo; en donde

“cicloalquil” se refiere a un sustituyente alquil mono o policíclico, heterocíclico o carbocíclico, en donde los sustituyentes cicloalquil tienen de 3 a 8 átomos en el esqueleto (o sea anillo) en el que cada átomo del esqueleto es o carbono o un heteroátomo;

“heterocicloalquil” se refiere a sustituyentes cicloalquil que tienen de 1 a 5 heteroátomos en la estructura del anillo;

“aril” se refiere a grupos aromáticos monocíclicos o policíclicos que tienen de 3 a 14 átomos de carbono o heteroátomos en el esqueleto;

“heteroaril” se refiere a grupos aril que tienen de 1 a 4 heteroátomos como átomos del anillo en el anillo aromático y el resto de los átomos del anillo son carbono;

el término “de cadena corta” se refiere a grupos que comprenden de uno a diez átomos de carbono que no están sustituidos o están sustituidos; y “opcionalmente sustituido” se refiere al reemplazamiento de hidrógeno con un radical monovalente o divalente seleccionado de hidroxilo, nitro, amino, imino, ciano, halo, tio, tioamido, amidino, oxo, oxamidino, metoxamidino, imidino, guanidino, sulfonamido, carboxi, formil, alquil de cadena corta, haloalquil de cadena corta, alcoxi de cadena corta, haloalcoxi de cadena corta, alcocalquil de cadena corta, alquilcarbonil, arilcarbonil, aralquilcarbonil, heteroarilcarbonil, heteroaralquilcarbonil, alquiltio, aminoalquil, cianoalquil y en donde el grupo sustituyente puede así mismo estar sustituido con un grupo que puede ser carboxi, halo, nitro, amino, ciano, hidroxilo, alquil de cadena corta, alcoxi de cadena corta, aminocarbonil, -SR, tioamido, -SO₃H, -SO₂R o cicloalquil, en donde R es hidrógeno, hidroxilo o alquil de cadena corta, donde los sustituyentes sustituidos pueden ser de cadena lineal, ramificada o arreglos cíclicos de carbonos unidos covalentemente o heteroátomos unidos covalentemente.

2. Un compuesto de la reivindicación 1, en donde al menos uno de A₁ y A₂ es un anillo aromático que tiene de 3 a 10 átomos de carbono en el anillo y opcionalmente 1 o más heteroátomos en el anillo.

ES 2 296 667 T3

3. Un compuesto de la reivindicación 2, en donde al menos uno de A_1 y A_2 es un aril carbocíclico, arilamino o ariloxi todos opcionalmente sustituidos.

4. Un compuesto de la reivindicación 2, en donde al menos uno de A_1 y A_2 es un heteroaril opcionalmente sustituido.

5. Un compuesto de la reivindicación 2, en donde al menos uno de A_1 y A_2 se seleccionan del grupo sustituido o no sustituido que consiste en fenilamina, feniloxi, piridil, pirimidinil, tiazolil, indolil, imidazolil, oxadiazolil, tetrazolil, pirazinil, triazolil, tiofenil, furanil, quinolinil, purinil, naftil, benzotiazolil, benzopiridil, y bencimidazolil.

6. Un compuesto de la reivindicación 2, en donde al menos uno de A_1 y A_2 está sustituido con al menos uno y no más de 3 grupos sustituyentes.

7. Un compuesto de la reivindicación 6, en donde dichos grupos sustituyentes se seleccionan independientemente del grupo que consiste en nitro, amino, ciano, halo, tioamido, amidino, oxamidino, alcoxiamidino, imidino, guanidino, sulfonamido, carboxi, formil, alquil de cadena corta, haloalquil de cadena corta, alcoxi de cadena corta, haloalcoxi de cadena corta, alcoxi alquil de cadena corta, alquilamino de cadena corta-alcoxi de cadena corta, alquilcarbonil de cadena corta, aralquilcarbonil de cadena corta, heteroaralquilcarbonil de cadena corta, alquiltio, aminoalquil y cianoalquil.

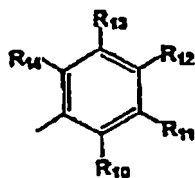
8. Un compuesto de la reivindicación 1, en donde al menos uno de R_1 , R_2 , R_3 y R_4 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, y alquil de cadena corta, haloalquil de cadena corta, heterocicloaminoalquil y alquilamino de cadena corta-alquil de cadena corta, todos no sustituidos o sustituidos.

9. Un compuesto de la reivindicación 8, en donde al menos uno de R_1 , R_2 , R_3 y R_4 es alquilamino de cadena corta-alquil de cadena corta.

10. Un compuesto de la reivindicación 8, en donde R_1 , R_2 y R_3 son hidrógeno y R_4 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metil, etil, aminoetil, dimetilaminoetil, piridiletal, piperidinil, pirrolidiniletal, piperaziniletal y morfoliniletal.

11. Un compuesto de la reivindicación 1, en donde al menos uno de R_5 y R_6 se selecciona del grupo que consisten en aril, heteroaril y biaril sustituidos y no sustituidos.

12. Un compuesto de la reivindicación 11, en donde al menos uno de R_5 y R_6 es un resto sustituido o no sustituido de la fórmula:



en donde R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} y R_{14} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, nitro, amino, ciano, halo, tioamido, carboxi, hidroxil, y grupos opcionalmente sustituidos de alquil de cadena corta, alcoxi de cadena corta, alcoxi alquil de cadena corta, haloalquil de cadena corta, haloalcoxi de cadena corta, aminoalquil, alquilamino, alquiltio, alquilcarbonilamino, aralquilcarbonilamino, heteroaralquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, heteroarilcarbonilamino, aminocarbonil, alquilaminocarbonil de cadena corta, aminoaralquil, alquilaminoalquil de cadena corta, aril, heteroaril, cicloheteroalquil, aralquil, alquilcarboniloxil, arilcarboniloxil, aralquilcarboniloxil, arilcarboniloxialquil, alquilcarboniloxialquil, heteroarilcarboniloxialquil, aralquilcarboniloxialquil, y heteroaralquilcarboniloxialquil.

13. Un compuesto de la reivindicación 12, en donde R_{10} , R_{11} , R_{13} y R_{14} son hidrógeno y R_{12} se selecciona del grupo que consiste en halo, alquil de cadena corta, hidroxil, alcoxi de cadena corta, haloalquil de cadena corta, aminocarbonil, alquilaminocarbonil, morfolino, piperidino y ciano.

14. Un compuesto de la reivindicación 12, en donde R_{11} , R_{13} y R_{14} son hidrógeno y R_{10} y R_{12} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en halo, alquil de cadena corta, hidroxil, alcoxi de cadena corta, haloalquil de cadena corta, morfolino, piperidino y ciano.

15. Un compuesto de la reivindicación 12, en donde R_{10} , R_{11} , R_{13} y R_{14} son hidrógeno y R_{12} es heteroaril.

16. Un compuesto de la reivindicación 12, en donde R_{10} , R_{11} , R_{13} y R_{14} son hidrógeno y R_{12} es heterocicloalquil.

17. Un compuesto de la reivindicación 12, en donde al menos uno de R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} y R_{14} son halo, y el resto de R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} y R_{14} son hidrógeno.

ES 2 296 667 T3

18. Un compuesto de la reivindicación 12, en donde al menos uno de R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} , y R_{14} se seleccionan del grupo que consiste en morfolino, piperidino, y el resto de R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} y R_{14} son hidrógeno.

5 19. Un compuesto de la reivindicación 12, en donde al menos uno de R_5 y A_2 se selecciona del grupo que consiste en clorofenil, diclorofenil, fluorofenil, difluorofenil, bromofenil, diclorofluorofenil, trifluorometilfenil, clorofluorofenil, bromoclorofenil, bromofluorofenil, etilfenil, metilclorofenil, etilclorofenil, imidazolilfenil, cianofenil, morfolinofenil y cianoclorofenil.

10 20. Un compuesto de la reivindicación 1, en donde R_6 es alquil sustituido, seleccionado del grupo que consiste en aralquil, hidroxialquil, aminoalquil, aminoaralquil, carbonilaminoalquil, alquilcarbonilaminoalquil, arilcarbonilaminoalquil, aralquilcarbonilaminoalquil, aminoalcoxialquil y arilaminoalquil.

15 21. Un compuesto de la reivindicación 1, en donde R_6 es amino sustituido seleccionado del grupo que consiste en alquilamino, alquilcarbonilamino, alcoxycarbonilamino, arilalquilamino, arilcarbonilamino, alquiltiicarbonilamino, arilsulfonilamino, heteroarilamino, alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, heteroarilcarbonilamino, aralquilcarbonilamino, y heteroaralquilcarbonilamino.

20 22. Un compuesto de la reivindicación 1, en donde R_6 se selecciona del grupo que consiste en aminocarbonil, alquiloxicarbonil, ariloxycarbonil, aralquiloxicarbonil y alquilaminoalquiloxicarbonil no sustituidos o sustituidos.

23. Un compuesto de la reivindicación 1, en donde R_6 se selecciona del grupo que consiste en amidino, guanidino, cicloimido, heterocicloimido, cicloamido, heterocicloamido, ciclotiamido y heterocicloalquil de cadena corta.

25 24. Un compuesto de la reivindicación 1, en donde R_6 es aril.

25. Un compuesto de la reivindicación 1, en donde R_6 es heteroaril.

30 26. Un compuesto de la reivindicación 25, en donde R_6 se selecciona del grupo que consiste en piridil, pirimidinil, tiazolil, indolil, imidazolil, oxadiazolil, tetrazolil, pirazinil, triazolil, tienil, furanil, quinolinil, pirrolilpiridil, benzotiazolil, benzopiridil, benzotriazolil, y bencimidazolil.

35 27. Una composición que comprende una cantidad de un compuesto de la reivindicación 1, eficaz para modular la actividad de GSK3 en un sujeto que puede ser un ser humano o animal cuando se administra al mismo, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

28. El uso de una composición de la reivindicación 27, para preparar una composición farmacéutica para inhibir la actividad de GSK3 en un sujeto que puede ser un ser humano o animal, que comprende administrar la composición al sujeto que puede ser un ser humano o animal.

40 29. El uso de un compuesto de la reivindicación 1, para preparar una composición farmacéutica para tratar una célula que comprende administrar a la célula una cantidad del compuesto eficaz para inhibir la actividad de GSK3 en la célula.

45 30. El uso de una composición de la reivindicación 27, para preparar una composición farmacéutica para tratar un trastorno mediado por GSK3 en un sujeto que puede ser un ser humano o animal, que comprende administrar al sujeto que puede ser un ser humano o animal una cantidad de la composición eficaz para inhibir la actividad de GSK3 en el sujeto.

50 31. El uso de la reivindicación 30, en donde la composición se administra por una forma de administración seleccionada del grupo que consiste en administración oral, subcutánea, transdérmica, transmucosal, iontoforética, intravenosa, intratecal, bucal, sublingual, intranasal, y rectal.

55 32. El uso de la reivindicación 30, en donde dicho trastorno mediado por GSK3 se selecciona del grupo que consiste en diabetes, enfermedad de Alzheimer, obesidad, enfermedad cardiovascular aterosclerótica, hipertensión esencial, síndrome del ovario policístico, síndrome X, isquemia, daño traumático del cerebro, trastorno bipolar, inmunodeficiencia y cáncer.

60 33. El uso de la reivindicación 30, que comprende además administrar al sujeto uno o más agentes activos adicionales.

34. El uso de la reivindicación 33, en donde el trastorno mediado por GSK3 es la diabetes y el agente activo adicional se selecciona del grupo que consiste en insulina, troglitazona, rosiglitazona, pioglitazona, glicipizida y metformina.

65 35. Un compuesto de la reivindicación 1, para uso como un fármaco.