

(11) Número de Publicação: **PT 1286964 E**

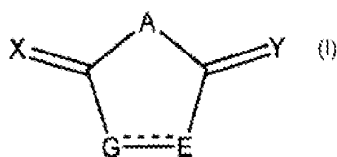
(51) Classificação Internacional:
C07D 207/44 (2006.01) **C07D 285/08** (2006.01)
C07D 209/48 (2006.01) **C07C 49/597** (2006.01)
A61K 31/433 (2006.01) **A61P 25/28** (2006.01)

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

(22) Data de pedido: 2001.05.11	(73) Titular(es): CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES SERRANO 117 28006 MADRID ES UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID ES
(30) Prioridade(s): 2000.05.11 ES 200001185 2000.12.12 GB 0030284	
(43) Data de publicação do pedido: 2003.03.05	(72) Inventor(es): ANA MARTINEZ GIL ES ISABEL DORRONSORO DIAZ ES ANA CASTRO MORERA ES MARIA CONCEPCIÓN PEREZ MARTIN ES MERCEDES ALONSO CASCON ES
(45) Data e BPI da concessão: 2007.07.04 054/2007	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **INIBIDORES HETEROCÍCLICOS DA GLICOGÉNIO SINTASE CINASE GSK-3**

(57) Resumo:

RESUMO**"INIBIDORES HETEROCÍCLICOS DA GLICOGÉNIO
SINTASE CINASE GSK-3"**

Compostos de fórmula (I) em que A, E, G, X, Y e a ligação --- têm vários significados são úteis na preparação de uma formulação farmacêutica, por exemplo no tratamento de uma doença na qual está envolvida a GSK-3, incluindo a doença de Alzheimer ou diabetes mellitus não-insulino dependente, ou doença hiperproliferativa tais como cancro, displasias ou metaplasias do tecido, psoríase, arteriosclerose ou reestenose.

DESCRIÇÃO**"INIBIDORES HETEROCÍCLICOS DA GLICOGÉNIO
SINTASE CINASE GSK-3"****Área da Invenção**

A presente invenção relaciona-se com inibidores heterocíclicos da glicogénio sintase cinase GSK-3 e com a sua utilização para o tratamento de uma doença na qual esteja envolvida a GSK-3.

Antecedentes da Invenção

A doença de Alzheimer (AD) é um processo neurodegenerativo caracterizado por distúrbios cognitivos associados a uma deterioração progressiva da função colinérgica e lesões neuropatológicas como placas senis, formadas por feixes de β -amilóide fibrilar, e emaranhados neurofibrilares, de filamentos helicoidais emparelhados.

Falando duma maneira geral, a AD restringe-se a grupos com 60 ou mais anos de idade e é a causa mais comum de demência na população idosa. Hoje em dia, a AD afecta 23 milhões de pessoas em todo o mundo. À medida que a longevidade aumenta, estima-se que pelo ano 2050 o número de casos de AD mais do que triplicará [Amaduci, L.;

Fratiglioni, L. "Epidemiology of AD: Impact on the treatment", em *Alzheimer Disease: Therapeutic Strategies*, E. Giacobini e R. Becker, Eds., Birhäuser, EEUU, 1994, pág. 8].

Observa-se duas lesões histológicas principais em cérebros da AD associadas à perda neuronal: os emaranhados neurofibrilares e as placas senis ao nível intracelular e extracelular respectivamente ["Alzheimer Disease: From molecular biology to therapy", E. Giacobini e R. Becker, Eds., Birhäuser, EEUU, 1996].

Os emaranhados neurofibrilares são estruturas formadas por filamentos helicoidais emparelhados (PHFs). Eles são constituídos principalmente pela proteína associada aos microtúbulos (MAP) tau num estado anormalmente hiperfosforilado [Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Tung, Y.C.; Quinlan, M.; Wisniewski, H.M.; Binder, L.I., "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 4913-4917; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Quinlan, M.; Tung, Y.C.; Zaidi, M.S.; Wisniewski, H.M., "Microtubule-associated protein tau. A component of the Alzheimer paired helical filaments", *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 6084-6089; Greenberg, S.G.; Davies, P.; Schein, J.D.; Binder, L.I., "Hidrofluoric acid-treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau.", *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 564-569]. Esta fosforilação aberrante da

tau, determinada pelos efeitos de várias proteínas cinases e fosfatases, surge para comprometer a sua capacidade para ligar e estabilizar microtúbulos, o que contribui para a patologia da AD [Moreno, F.J.; Medina, M.; Perez, M.; Montejo de Garcini, E.; Avila, J., "Glycogen sintase kinase 3 phosphorylation of different residues in the presence of different factors: Analysis on tau protein", *FEBS Lett.*, 1995, 372, 6568]. Deste modo, o bloqueio deste passo de hiperfosforilação pode ser um alvo primário para interromper a cascata patogénica. Os inibidores selectivos das tau cinases podem ser novos fármacos eficazes para o tratamento da AD.

A pesquisa de inibidores de tau cinases é uma área de grande interesse. A tau pode ser fosforilada por várias proteína cinases orientadas para a prolina (PDKs) e não PDKs. No entanto, na AD o papel exacto de qualquer uma destas cinases na hiperfosforilação anormal da tau ainda não foi compreendido até à data; a actividade destas cinases não se encontra regulada positivamente. Não há qualquer dúvida que a glicogénio sintase cinase 3 β (GSK-3 β) é uma tau cinase *in vivo* no cérebro [Lovestone, S.; Hartley, C.L.; Pearce, J.; Anderton, B.H., "Phosphorylation of tau by glycogen synthase-3 in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules", *Neuroscience*, 1996, 73, 1145-1157; Wagner, U.; Utton, M.; Gallo, J.M.; Miller, C.C., "Cellular phosphorylation of tau by GSK-3 β influences tau binding to microtubules and microtubule organisation", *J. Cell.Sci.*,

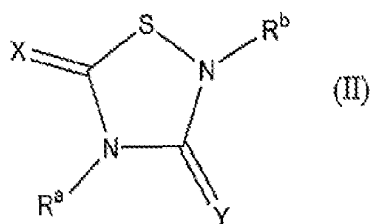
1996, 109, 1537-1543; Ledesma, M.; Moreno, F.J.; Perez, M.M.; Avila, J., "Binding of apolipoprotein E3 to tau protein: effects on tau glycation, tau phosphorylation and tau-microtubule binding, in vitro", *Alzheimer Res.*, 1996, 2, 85-88]. Estas descobertas abrem a porta à utilização de inibidores da GSK-3 β como agentes terapêuticos no tratamento da AD. Presentemente conhece-se poucos compostos com esta propriedade inibidora enzimática. O lítio comporta-se como um inibidor específico da família GSK-3 de proteína cinases *in vitro* e em células intactas Munoz-Montano, J.R.; Moreno, F.J.; Avila, J.; Diaz-Nido, J., "Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons", *FEBS Lett.*, 1997, 411, 183-188]. Martinez et al. [*Bioorganica & Medicinal Chemistry*, 5, 1275-1283, 1197] relaciona-se com arilimino-1,2,4-tiadiazolidinonas; uma nova família de controladores do canal de potássio.

Finalmente, observa-se que a insulina inactiva a GSK-3 e demonstra-se que a diabetes mellitus não-insulino dependente se desenvolve com a activação desta enzima. Assim sendo, os inibidores da GSK-3 seriam uma nova terapia para a diabetes mellitus não-insulino dependente.

No nosso trabalho de equipa nós inventamos recentemente uma nova família de moléculas heterocíclicas sintéticas pequenas com propriedades inibidoras da GSK-3 β ao nível micromolar.

Descrição da Invenção

A invenção é dirigida para a utilização de um composto com a fórmula geral (II):



em que:

R^a e R^b são independentemente seleccionados de hidrogénio, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo, arilo, $-(Z)_n$ -arilo, heteroarilo, $-OR^3$, $-C(O)R^3$, $-C(O)OR^3$, $-(Z)_n-C(O)OR^3$ e $-S(O)_t$;

Z é independentemente seleccionado de $-C(R^3)(R^4)-$, $-C(O)-$, $-O-$, $-C(=NR^3)-$, $-S(O)_t$ e $N(R^3)-$;

n é zero, um ou dois;

t é zero, um ou dois;

R^3 e R^4 são independentemente seleccionados de hidrogénio, alquilo, arilo e heterocíclico;

X e Y são independentemente seleccionados de $=O$, $=S$, $=N(R^3)$ e $=C(R^1)(R^2)$; e

R^1 e R^2 são independentemente seleccionados de hidrogénio, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo, arilo, $-(Z)_n$ -arilo, heteroarilo, $-OR^3$, $-C(O)R^3$, $-C(O)OR^3$, $-(Z)_n-C(O)OR^3$ e $-S(O)_t$

na preparação de uma composição farmacêutica para um método para o tratamento de uma doença na qual está envolvida a GSK-3, em que o método compreende a administração de uma quantidade eficaz de um composto de fórmula (II) a um ser humano necessitado desse tratamento.

Descrição Pormenorizada da Invenção

Como utilizados nesta especificação e nas reivindicações apenas, a menos que especificado em contrário, os termos seguintes têm os significados indicados:

"Alquilo" refere-se a um radical de cadeia hidrocarbonada linear ou ramificada consistindo de átomos de carbono e hidrogénio, não contendo qualquer saturação, possuindo um até oito átomos de carbono, e o qual está ligado ao resto da molécula por uma ligação simples, e.g., metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo, etc. Os radicais alquilo podem estar opcionalmente substituídos com um ou mais substituintes independentemente seleccionados do grupo consistindo de um halo, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcoxicarbonilo, amino, nitro, mercapto e alquiltio.

"Alcoxilo" refere-se a um radical da fórmula $-OR_a$ em que R_a é um radical alquilo como definido acima, e.g., metoxilo, etoxilo, propoxilo, etc.

"Alcoxicarbonilo" refere-se a um radical da fórmula $-C(O)OR_a$ em que R_a é um radical alquilo como se definiu acima, e.g., metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, propoxicarbonilo, etc.

"Alquiltio" refere-se a um radical da fórmula $-SR_a$ em que R_a é um radical alquilo como se definiu acima, e.g., metiltio, etiltio, propiltio, etc.

"Amino" refere-se a um radical da fórmula -NH_2 .

"Arilo" refere-se a um radical fenilo ou naftilo, preferencialmente um radical fenilo. O radical arilo pode estar opcionalmente substituído com um ou mais substituintes seleccionados do grupo consistindo de hidroxilo, mercapto, halo, alquilo, fenilo, alcoxilo, haloalquilo, nitro, ciano, dialquilamino, aminoalquilo, acilo e alcoxycarbonilo, como aqui definidos.

"Aralquilo" refere-se a um grupo arilo ligado a um grupo alquilo. Os exemplos preferidos incluem benzilo e fenetilo.

"Acilo" refere-se a um radical da fórmula -C(O)-R_c e -C(O)-R_d em que R_c é um radical alquilo como se definiu acima e R_d é um radical arilo como se definiu acima, e.g., acetilo, propionilo, benzoilo e semelhantes.

"Aroilalquilo" refere-se a um grupo alquilo substituído com -C(O)-R_d . Os exemplos preferidos incluem benzoilmetilo.

"Carboxilo" refere-se a um radical da fórmula -C(O)OH .

"Ciano" refere-se a um radical da fórmula -CN .

"Cicloalquilo" refere-se a um radical monocíclico ou bicíclico de 3 até 10 membros estável o qual está saturado ou parcialmente saturado e o qual é constituído apenas por átomos de carbono e hidrogénio. A menos que especificamente indicado de outro modo na especificação, o termo "cicloalquilo" destina-se a incluir radicais cicloalquilo que estão opcionalmente substituídos com um ou mais substituintes independentemente seleccionados do grupo consistindo de alquilo,

halo, hidroxilo, amino, ciano, nitro, alcoxilo, carboxilo e alcoxycarbonilo.

"Arilo fundido" refere-se a um grupo arilo, especialmente um grupo fenilo ou heteroarilo, fundido com o anel de cinco membros.

"Halo" refere-se a bromo, cloro, iodo ou fluoro.

"Haloalquilo" refere-se a um radical alquilo, como se definiu acima, que está substituído com um ou mais radicais halo, como se definiu acima, e.g., trifluorometilo, triclorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 1-fluorometil-2-fluoroetilo e semelhantes.

"Heterociclo" refere-se a um radical heterociclilo. O heterociclo refere-se a um anel de 3 até 15 membros estável o qual é constituído por átomos de carbono e desde um até cinco heteroátomos seleccionados do grupo consistindo de azoto, oxigénio e enxofre, preferencialmente um anel de 4 até 8 membros com um ou mais heteroátomos, mais preferencialmente um anel de 5 ou 6 membros com um ou mais heteroátomos. Para os efeitos desta invenção, o heterociclo pode ser um sistema monocíclico, bicíclico ou tricíclico, o qual pode incluir anéis fundidos; e os átomos de azoto, carbono ou enxofre no radical heterociclilo podem estar opcionalmente oxidados; o azoto átomo pode estar opcionalmente quaternizado; e o radical heterociclilo pode ser parcial ou totalmente saturado ou aromático. Os exemplos de tais heterociclos incluem, mas não se limitam a azepinas, benzimidazole, benzotiazole, furano, isotiazole, imidazole, indole, piperidina,

piperazina, purina, quinolina, tiadiazole, tetra-hidrofurano. O heterociclo pode estar opcionalmente substituído como R^3 e R^4 como se definiu acima no resumo da invenção.

"Heteroarilo" refere-se a um heterociclo aromático

"Mercapto" refere-se a um radical da fórmula -SH

"Nitro" refere-se a um radical da fórmula $-NO_2$

De acordo com uma forma de realização preferida, a doença na qual a GSK-3 está envolvida é a Doença de Alzheimer ou a diabetes mellitus não-insulino dependente. De acordo com outra forma de realização preferida, a doença é uma doença hiperproliferativa, tal como cancro, displasias e metaplasias de tecido, psoríase, arteriosclerose ou reestenose.

De acordo com uma forma de realização preferida, na fórmula (II), X e Y são preferencialmente seleccionados de oxigénio, enxofre e $-NR^3-$ em que R^3 é heterocíclico, especialmente um heterociclo de 6 membros o qual tem um heteroátomo que é azoto, sendo opcionalmente aromático e estando opcionalmente oxidado ou quaternizado. Preferencialmente, X é oxigénio. Mais preferencialmente, X e Y são ambos oxigénio.

Preferencialmente, R^a e R^b são independentemente seleccionados de hidrogénio, alquilo, cicloalquilo, arilo (opcionalmente substituído com um grupo seleccionado de alquilo, halo e alcóxido), $-C(R^3)(R^4)arilo$ (estando a parte

de arilo opcionalmente substituída com um grupo seleccionado de alquilo, halo e alcoxilo), $-\text{OR}^3$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^3$ e $-\text{C}(\text{R}^3)(\text{R}^4)-\text{C}(\text{O})\text{OR}^3$, e R^3 e R^4 são independentemente seleccionados de hidrogénio, alquilo e heterocíclico.

Mais preferencialmente R^a e R^b são independentemente seleccionados de alquilo, arilo (opcionalmente substituído com um grupo seleccionado de alquilo, halo e alcoxilo), $-\text{CH}_2$ -arilo (estando a parte de arilo opcionalmente substituída com um grupo seleccionado de alquilo, halo e alcoxilo) e $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{OR}^3$ em que R^3 é hidrogénio ou alquilo.

Ainda mais preferencialmente, R^a e R^b são independentemente seleccionados de metilo, etilo, propilo, benzilo, fenilo (opcionalmente substituído com um grupo seleccionado de metilo, fluoro, cloro, bromo e metoxilo) e $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{O}$ -etilo.

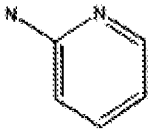
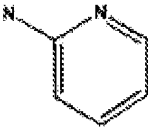
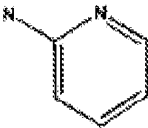
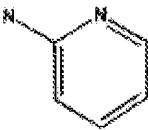
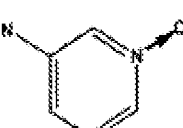
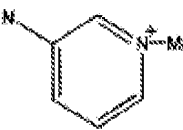
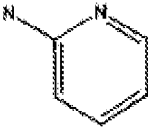
Outro grupo preferido de compostos são aqueles em que R^a e R^b são independentemente seleccionados de hidrogénio, alquilo, cicloalquilo, arilo (opcionalmente substituído com um grupo seleccionado de alquilo, halo e alcoxilo), $-\text{C}(\text{R}^3)(\text{R}^4)$ arilo (estando a parte de arilo opcionalmente substituída com um grupo seleccionado de alquilo, halo e alcoxilo), $-\text{OR}^3$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^3$ e $-\text{C}(\text{R}^3)(\text{R}^4)-\text{C}(\text{O})\text{OR}^3$, em que R^3 e R^4 são independentemente seleccionados de hidrogénio, alquilo e heterocíclico, e X e Y são independentemente seleccionados de $=\text{O}$, $=\text{S}$ e $=\text{NR}^3$.

Preferencialmente, R^a e R^b são independentemente seleccionados de hidrogénio, alquilo, cicloalquilo, arilo (opcionalmente substituído com um grupo seleccionado de alquilo, halo e alcoxilo), $-C(R^3)(R^4)\text{arilo}$ (estando a parte de arilo opcionalmente substituída com um grupo seleccionado de alquilo, halo e alcoxilo), $-OR^3$, $-C(O)OR^3$ e $-C(R^3)(R^4)-C(O)OR^3$, em que R^3 e R^4 são independentemente seleccionados de hidrogénio e alquilo, e X é $=O$.

Mais preferencialmente, R^a e R^b são independentemente seleccionados de metilo, etilo, propilo, benzilo, fenilo (opcionalmente substituído com um grupo seleccionado de metilo, fluoro, cloro, bromo e metoxilo) e $-\text{CH}_2-\text{C}(O)\text{O}-$ etilo; em que X é $=O$ e Y é $=O$.

Numa forma de realização preferida, o composto de fórmula (II) condiz com uma das possibilidades seguintes:

R^a	R^b	X	Y
CH_2Ph	Me	O	O
Et	Me	O	O
Et	nPr	O	O
Et	ciclo-hexilo	O	O
Ph	Me	O	O
$\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$	Me	O	O
4-OMePh	Me	O	O
CH_2Ph	Et	O	O
Et	iPr	O	O
CH_2Ph	Et	O	S
CH_2Ph	CH_2Ph	O	S
Ph	Ph	O	S

Et	Et	O	S
Ciclo-hexilo	Me	O	O
4-MePh	Me	O	O
4-BrPh	Me	O	O
4-FPh	Me	O	O
4-ClPh	Me	O	O
Et	Me		O
Et	Et		O
Et	H		O
Me	Me		O
Et	Me		O
Et	Me		O
Et	Me		O
Et	Me		S

Os compostos mais preferidos de fórmula (II) são aqueles no grupo seguinte:

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

Um outro aspecto da presente é uma formulação farmacêutica contendo como substância activa um composto de fórmula (II) como se definiu acima.

Noutro aspecto, a presente invenção refere-se a um composto de fórmula (II) em que o referido composto é um dos seguintes:

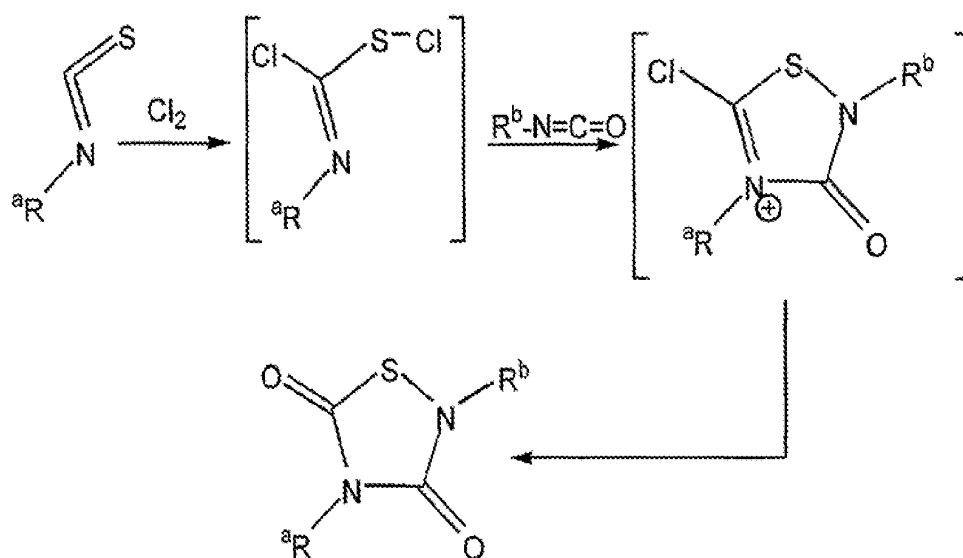
R^a	R^b	X	Y
CH ₂ Ph	Me	O	O
CH ₂ CO ₂ Et	Me	O	O
4-OMePh	Me	O	O
4-MePh	Me	O	O
4-BrPh	Me	O	O

Síntese dos Compostos da Invenção:

Os compostos da invenção podem ser sintetizados por procedimentos disponíveis.

Para compostos de fórmula (II) preferidos encontra-se disponível um procedimento geral [Martinez, A.; Castro, A.; Cardels, I.; Llenas, J.; Palacios, J.M. *Bioorg. Med. Chem.*, 1997, 5, 1275-1283].

Concretamente, os compostos de fórmula geral (II) e coligidos no Quadro I foram preparados seguindo o procedimento de síntese representado no Esquema 1, e utilizando a reactividade de cloretos de N-alquil-S-[N'-clorocarbamoil)amino]isotiocarbamoilo com vários isocianatos de alquilo. A cloração de isotiocianatos é realizada através da adição de uma quantidade equimolar de cloro sobre uma solução em hexano do isotiocianato mencionado a - 15 °C. A reacção do cloreto de iminocloroalquilsulfenilo preparado com alquilo ou arilisocianato sob atmosfera inerte e a hidrólise subsequente, produziu as tiadiazolidindionas descritas no Quadro I.



Esquema 1

Os compostos típicos desta invenção inibem selectivamente a GSK-3 β sem que ocorra a inibição de outras proteína cinases tais como PKA, PKC, CK-2 e Cdk2, a qual poderia eliminar os efeitos disseminados. A GSK-3 β está envolvida na etiopatogénese da AD e é responsável pela hiperfosforilação anormal da proteína tau. Os inibidores selectivos aqui descritos podem ser utilizados na preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de doenças neurodegenerativas associadas à patologia da proteína tau, especialmente para a AD a qual faz parte desta invenção. A acção inibidora destes compostos contra a GSK-3 β motiva para a concepção de fármacos capazes de parar a formação de emaranhados neurofibrilares, uma das marcas presentes neste processo neurodegenerativo.

Estes compostos podem ser úteis na preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de outras patologias nas quais está envolvida a GSK-3 β , tal como a diabetes mellitus não-insulino dependente.

Adicionalmente, estes compostos podem ser úteis na preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de doenças hiperproliferativas tais como displasias e metaplasias de vários tecidos, psoríase, arteriosclerose, reestenose e cancro, devido à sua inibição do ciclo celular que faz parte desta invenção.

Assim sendo, a presente invenção proporciona ainda composições farmacêuticas compreendendo um composto desta invenção em conjunto com um veículo ou diluente

farmaceuticamente aceitável. As formas de dosagem e posologias apropriadas podem ser inventadas e adoptadas de acordo com a prática clínica convencional.

Exemplos

Exemplo 1.- Inibição enzimática dos compostos da invenção

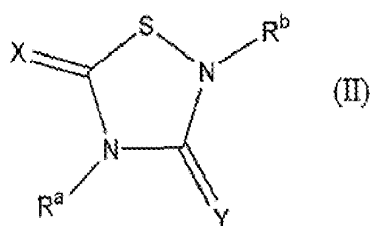
Inibição da GSK-3 β : A actividade da GSK-3 foi determinada por incubação de uma mistura da enzima GSK-3 (Sigma), uma fonte de fosfato e um substrato da GSK-3 na presença e na ausência do composto de ensaio correspondente e medindo a actividade GSK-3 desta mistura.

Concretamente, a actividade GSK-3 é determinada incubando a enzima a 37 °C durante 20 minutos num volume final de 12 μ l de tampão (tris 50 mM, pH = 7,5, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, Cl₂Mg 10 mM) suplementado com 15 μ M (concentração final) do péptido sintético GS 1 [Woodgett, J.R. "Use of peptides for affinity purification of protein-serine cinases", *Anal. Biochem.*, 1989, 180, 237-241] como substrato, 15 μ M de ATP, 0,2 μ Ci de [γ -³²P]ATP e várias concentrações do composto de ensaio. A reacção é desactivada pela adição de uma alíquota da mistura reaccional em papéis de fosfocelulose p81.

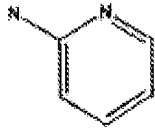
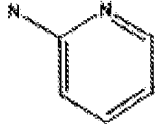
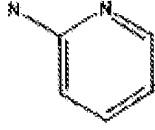
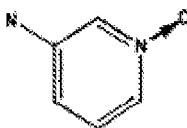
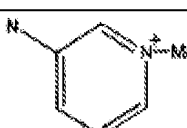
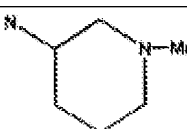
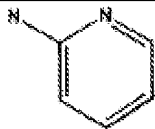
Estes papéis são lavados três vezes com ácido fosfórico a 1% e a radioactividade incorporada no péptido GS 1 é medida num contador de cintilação líquida.

Os compostos apresentados no Quadro I são representativos da actividade inibidora GSK-3 objecto desta invenção. Os valores de IC₅₀ (concentração à qual ocorre 50% de inibição da enzima) estão coligidos no Quadro 3 abaixo.

Quadro 3



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

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

Inibição da GSK-3: As experiências de inibição também foram realizadas a várias concentrações de ATP (até 50 μM) e em todos os casos obteve-se os mesmos valores de IC_{50} . Assim poderia sugerir que as tiadiazolindionas não competem com o ATP na ligação à GSK-3.

Os primeiros quatro compostos foram avaliados para a inibição de outras enzimas.

Inibição da proteína cinase A (PKA): A inibição potencial desta enzima é avaliada determinando a

fosforilação da estatmina pela proteína cinase A (PKA). A estatmina foi purificada seguindo o procedimento descrito por Belmont e Mitchinson (Belmont, L.D.; Mitchinson, T.J. "Identification of a protein that interact with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubule", *Cell*, 1996, 84, 623-631).

Concretamente, utilizou-se PKA purificada (Sigma, subunidade catalítica de coração de bovino (p 2645)) e 10-15 µg de substrato (estatmina) num volume total de 25 µl de solução tampão contendo (γ -³²P)ATP 20 µM. A proteína cAMP cinase (100 ng/reacção) foi feita em 50 µl de hepes 25 mM, pH 7,4, MgCl₂ 20 mM, EGTA 2 mM, ditiotreitól 2 mM, Na₃VO₄ 0,5 mM. Depois de ter ocorrido a reacção, adicionou-se um tampão de desactivação, levou-se a mistura reaccional à ebulição a 100 °C durante 5 minutos e caracterizou-se a proteína fosforilada por electroforese de gel e quantificou-se por autorradiografia.

Nestas condições nenhum dos compostos avaliados exibiu qualquer inibição da PKA.

Inibição da proteína cinase C (PKC): A inibição potencial desta enzima é avaliada determinando a fosforilação do péptido PANKTPPKSPGEPAK (Woodgett, J.R. "Use of peptides for affinity purification of protein-serine cinases", *Anal. Biochem.*, 1989, 180, 237-241) pela proteína cinase C (PKC) utilizando fosfatidilserina como agente estimulante. O método seguido é o mesmo que o descrito acima para a GSK-3.

Concretamente, utilizou-se PKC purificada de cérebros de ratazana seguindo o método descrito por Walsh (Walsh, M.P.; Valentine, K.A.; Nagi, P.K.; Corruthers, C.A.; Hollenberg, M.D. *Biochem. J.*, 1984, 224, 117-127) e 1-10 mM de substrato num volume total de 25 μ l de solução tampão adequada contendo (γ - 32 P)ATP 10 μ M.

Nestas condições nenhum dos compostos avaliados exibiu qualquer inibição da PKC.

Inibição da caseína cinase 2 (CK-2): A actividade de fosforilação desta enzima para a estatmina foi medida utilizando CK-2 purificada de cérebros de bovino, seguindo o método descrito por Alcazar (Alcazar, A.; Marin, E.; Lopez-Fando, J.; Salina, M. "An improved purification procedure and properties of casein kinase II from brain", *Neurochem. Res.*, 1988, 13, 829-836), com 3,6 M de substrato num volume total de 25 μ l de uma solução tampão adequada contendo (γ - 32 P)ATP 20 μ M. Os ensaios de CK-2 foram realizados com estatmina como substrato (ver determinação de PKA) em 50 μ l de Hepes 25 mM, pH 7,4, $MgCl_2$ 20 mM, EGTA 2 mM, ditiotreitol 2 mM, Na_3VO_4 0,5 mM, e 100 ng de CK-2 purificada. Depois de ter ocorrido a reacção, seguiu-se o mesmo método que o descrito para a PKA.

Nestas condições nenhum dos compostos avaliados exibiu qualquer inibição da CK-2.

Inibição da proteína cinase 2 dependente de ciclina (Cdc2): A actividade de fosforilação desta enzima para a histona H1 foi medida utilizando Cdc2 (Calbiochem) seguindo o método descrito por Kobayashi (Kobayashi, H.; Stewart, E.; Poon, R.Y.; Hunt, T. "Cyclin A and cyclin B dissociate from p34cdc2 with half-times of 4 and 15 h, respectively, regardless of the phase of the cell cycle", *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 29153-29160), com 1 µg/µl de substrato num volume total de 25 µl da solução tampão adequada contendo (γ-³²P)ATP 20 µM. Os ensaios de Cdc2 foram realizados com histona H1 como substrato (ver determinação de PKA) em 50 µl de tampão pH 7,5, Tris-HCl 50 mM, Cl₂Mg 10 mM, DTT 1 mM, EGTA 1mM, ATP 100 µM, 0,01% de BRIJ-35. Depois de ter ocorrido a reacção, seguiu-se o mesmo método que o descrito para a PKA.

Nestas condições nenhum dos compostos avaliados exibiu qualquer inibição da Cdc2.

Exemplo 2.- Análise do crescimento de neurites após tratamento com fármaco.

Manteve-se as células num meio de Dulbecco (DEMEM) com 10 % de soro fetal bovino, glutamina (2 mM) e antibióticos. Para a análise da inibição potencial da GSK-3 in vivo, utilizou-se culturas de neuroblastomas N₂A de ratinhos (Garcia-Perez, J.; Avila, J.; Diaz-Nido, J. "Lithium induces morphological differentiation of mouse neuroblastome", *J. Neurol. Res.*, 1999, 57, 261-270). Adicionou-se os compostos de ensaio a estas culturas

celulares. Esta linha celular tem a particularidade de expressar um certo tipo de fenótipo neuronal (extensões nevríticas) após a adição de cloreto de lítio (10 mM), um inibidor conhecido da GSK-3. Após 2-3 dias de cultura, verificou-se o efeito dos compostos de ensaio coligidos no Quadro I. Observou-se a produção de extensões nevríticas na mesma extensão que quando se adicionou lítio. Este facto confirma a inibição *in vivo* da GSK-3 pelos compostos da invenção.

Exemplo 3.- Bloqueio do ciclo celular.

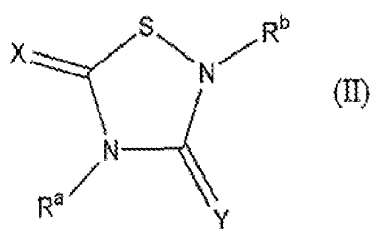
Em paralelo, estudou-se a interferência potencial destes compostos com o ciclo celular em células N₂A. Manteve-se a cultura de células num meio de Dulbecco (DEMEM) com 10% de soro fetal bovino, glutamina (2 mM) e antibióticos.

Os primeiros quatro compostos da fórmula geral (II) coligidos no Quadro 3 foram analisados nas condições descritas e mostraram aptidão para inibir o ciclo celular a uma concentração de inibidor compreendida entre 100 nM e 1 µM. O bloqueio celular foi inicialmente observado a concentrações compreendidas entre 100-200nM e foi totalmente eficaz a 1 µM.

Os compostos de ensaio foram não tóxicos em cultura estacionária de fibroblastos MRC-5 após 10 dias de exposição contínua aos inibidores.

Exemplo 5.- Bloqueio do ciclo celular

As IC_{50} para alguns dos compostos analisados em culturas de células N₂A estão coligidos no Quadro 5 abaixo.

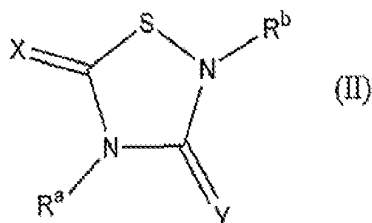
Quadro 5

R^a	R^b	X	Y	IC₅₀ (μM)
CH ₂ Ph	Me	O	O	4-8
Et	Me	O	O	40-100
Et	nPr	O	O	5-10
Et	ciclo-hexilo	O	O	6-9
Ph	Me	O	O	4-7
CH ₂ CO ₂ Et	Me	O	O	1-2
4-OMePh	Me	O	O	1-2
CH ₂ Ph	Et	O	O	4-7
CH ₂ Ph	CH ₂ Ph	O	O	2-3
Et	Et	O	O	30-80
CH ₂ Ph	CH ₂ Ph	O	S	1-2
Ph	Ph	O	S	4-8

Lisboa, 27 de Julho de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Compostos de fórmula geral (II):



em que:

R^a e R^b são independentemente seleccionados de hidrogénio, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo, arilo, $-(Z)_n$ -arilo, heteroarilo, $-OR^3$, $-C(O)R^3$, $-C(O)OR^3$ e $-(Z)_n-C(O)OR^3$;

Z é independentemente seleccionado de $-C(R^3)(R^4)-$, $-C(O)-$, $-O-$, $-C(=NR^3)-$, $-S(O)_t-$ e $N(R^3)-$;

n é zero, um ou dois;

t é zero, um ou dois;

R^3 e R^4 são independentemente seleccionados de hidrogénio, alquilo, arilo e heterocíclico;

X e Y são independentemente seleccionados de $=O$, $=S$, $=N(R^3)$ e $=C(R^1)(R^2)$; e

R^1 e R^2 são independentemente seleccionados de hidrogénio, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo, arilo, $-(Z)_n$ -arilo, heteroarilo, $-OR^3$, $-C(O)R^3$, $-C(O)OR^3$ e $-(Z)_n-C(O)OR^3$;

na preparação de uma composição farmacêutica para um método de tratamento de uma doença na qual está envolvida a GSK-3, em que o método compreende a administração de uma

quantidade eficaz de um composto de fórmula (II) a um ser humano necessitado desse tratamento.

2. Composto de acordo com a reivindicação 1, em que a doença é seleccionada de doença de Alzheimer e diabetes mellitus não-insulino dependente.

3. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a doença é uma doença hiperproliferativa tal como cancro, displasias e metaplasias de tecido, psoríase, arterioesclerose ou reestenose.

4. Utilização de acordo com qualquer reivindicação precedente, em que no composto de fórmula (II), R^a e R^b são independentemente seleccionados de hidrogénio, alquilo, cicloalquilo, arilo (opcionalmente substituído com um grupo seleccionado de alquilo, halo e alcoxilo), $-C(R^3)(R^4)$ arilo (estando a parte de arilo opcionalmente substituída com um grupo seleccionado de alquilo, halo e alcoxilo), $-OR^3$, $-C(O)OR^3$ e $-C(R^3)(R^4)-C(O)OR^3$, e R^3 e R^4 são independentemente seleccionados de hidrogénio, alquilo e heterocíclico.

5. Utilização de acordo com a reivindicação 4, em que no composto de fórmula (II), R^a e R^b são independentemente seleccionados de alquilo, arilo (opcionalmente substituído com um grupo seleccionado de alquilo, halo e alcoxilo), $-CH_2$ -arilo (estando a parte de arilo opcionalmente substituída com um grupo seleccionado de

alquilo, halo e alcoxilo) e $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{OR}^3$, e R^3 é hidrogénio ou alquilo.

6. Utilização de acordo com a reivindicação 5, em que no composto de fórmula (II), R^a e R^b são independentemente seleccionados de metilo, etilo, propilo, benzilo, fenilo (opcionalmente substituído com um grupo seleccionado de metilo, fluoro, cloro, bromo e metoxilo) e $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{O-etilo}$.

7. Utilização de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 3, em que no composto de fórmula (II), X e Y são independentemente seleccionados de $=\text{O}$, $=\text{S}$ e $=\text{NR}^3$ (em que R^3 é heterocíclico).

8. Utilização de acordo com a reivindicação 7, em que no composto de fórmula (II), X é $=\text{O}$.

9. Utilização de acordo com a reivindicação 8, em que no composto de fórmula (II), X é $=\text{O}$ e Y é $=\text{O}$.

10. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 3, em que:

R^a e R^b são independentemente seleccionados de hidrogénio, alquilo, cicloalquilo, arilo (opcionalmente substituído com um grupo seleccionado de alquilo, halo e alcoxilo), $-\text{C}(\text{R}^3)(\text{R}^4)\text{-arilo}$ (estando a parte de arilo opcionalmente substituída com um grupo seleccionado de alquilo, halo e alcoxilo), $-\text{OR}^3$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^3$ e $-\text{C}(\text{R}^3)(\text{R}^4)-\text{C}(\text{O})\text{OR}^3$,

R^3 e R^4 são independentemente seleccionados de hidrogénio, alquilo e heterocíclico, e

X e Y são independentemente seleccionados de $=O$, $=S$ e $=NR^3$.

11. Utilização de acordo com a reivindicação 10, em que:

R^a e R^b são independentemente seleccionados de hidrogénio, alquilo, cicloalquilo, arilo (opcionalmente substituído com um grupo seleccionado de alquilo, halo e alcoxilo), $-C(R^3)(R^4)$ -arilo (estando a parte de arilo opcionalmente substituída com um grupo seleccionado de alquilo, halo e alcoxilo), $-OR^3$, $-C(O)OR^3$ e $-C(R^3)(R^4)-C(O)OR^3$,

R^3 e R^4 são independentemente seleccionados de hidrogénio e alquilo; e

X é $=O$.

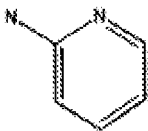
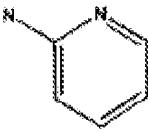
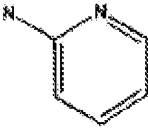
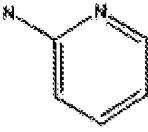
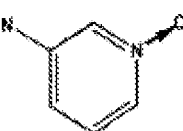
12. Utilização de acordo com a reivindicação 11, em que:

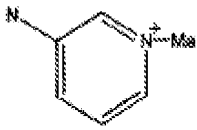
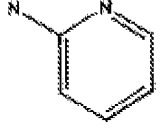
R^a e R^b são independentemente seleccionados de metilo, etilo, propilo, benzilo, fenilo (opcionalmente substituído com um grupo seleccionado de metilo, fluoro, cloro, bromo e metoxilo) e $-CH_2-C(O)O$ -etilo ;

X é $=O$; e

Y é $=O$.

13. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 até 3, em que o composto de fórmula (II) condiz com uma das possibilidades seguintes:

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

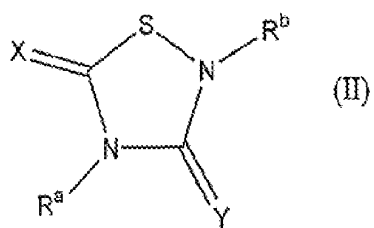
Et	Me		O
Et	Me		O
Et	Me		S

14. Utilização de acordo com a reivindicação 13, em que o composto de fórmula (II) condiz com uma das possibilidades seguintes:

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

15. Formulação farmacêutica contendo como substância activa um composto de fórmula (II) como definido em qualquer uma das reivindicações 1 até 14.

16. Composto com a fórmula geral (II):



em que o composto é um dos seguintes:

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

Lisboa, 27 de Julho de 2007