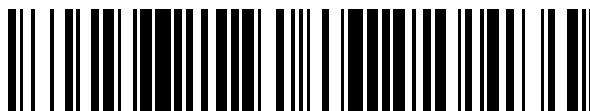


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 335**

51 Int. Cl.:
C07D 471/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08731839 .0**
96 Fecha de presentación: **10.03.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2137183**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.12.2009**

54 Título: **AMINOPYRIMIDINAS ÚTILES COMO INHIBIDORES DE PROTEÍNA QUINASAS.**

30 Prioridad:
09.03.2007 US 905929 P
31.07.2007 US 953024 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.02.2012

73 Titular/es:
VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED
130 WAVERLY STREET
CAMBRIDGE, MA 02139, US

72 Inventor/es:
PIERCE, Albert;
COME, Jon;
COURT, John;
GAO, Huai;
HENKEL, Gregory;
LIU, Michael y
NEUBERGER, Timothy

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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).

ES 2 374 335 T3

DESCRIPCIÓN

Aminopirimidinas útiles como inhibidores de proteína quinasas.

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a compuestos útiles como inhibidores de proteína quinasas. La invención también proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden los compuestos de la invención y el uso de las composiciones en el tratamiento de diversos trastornos. La invención también proporciona procedimientos para preparar los compuestos de la invención.

Antecedentes de la invención

La glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3) es una proteína serina/treonina quinasa compuesta por las isoformas α y β que están codificadas, cada una, por genes distintos [Coghlan y col., Chemistry & Biology 2000, 7, 793-803; y Kim y Kimmel, Curr. Opin. Genetics Dev., 2000 10, 508-514]. Las proteína quinasas, particularmente la GSK-3, se han implicado en diversas enfermedades, trastornos y afecciones incluyendo diabetes, Alzheimer, Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, Parkinson, trastorno bipolar, esquizofrenia, ictus cerebral e hipertrofia cardíaca. [Solicitudes PCT N°: WO 99/65897 y WO00/38675; Haq y col., J. Cell Biol. 2000, 151, 117-130; Hirotsu y col., Circulation Research 101, 2007, pág. 1164-1174].

La inhibición de la GSK-3 es el enfoque deseado para tratar estas enfermedades, trastornos y afecciones. En la hipertrofia cardíaca, la GSK-3 activa puede ser importante para inhibir la hipertrofia. Sin embargo, el bloqueo de la GSK-3 parece ser importante para proteger contra la apoptosis en miocitos cardíacos con hipertrofia [Haq y col., J. Cell Biol. 2000, 151, 117-130; Hirotsu y col., Circulation Research 101, 2007, pág. 1164-1174].

La GSK-3 regula múltiples efectores aguas abajo asociados con una diversidad de rutas de señalización. Estas proteínas incluyen la glucógeno sintasa, que es la enzima limitante de la velocidad necesaria para la síntesis de glucógeno, la proteína Tau asociada a microtúbulos, el factor de transcripción génica β -catenina, el factor de iniciación de la traducción eIF2B, así como la ATP citrato liasa, axina, factor de choque térmico-1, c-Jun, c-myc, c-myc, CREB y CEPB α . Estas diversas proteínas diana implican a la GSK-3 en muchos aspectos del metabolismo, proliferación, diferenciación y desarrollo celular.

En una ruta mediada por GSK-3 que es relevante para el tratamiento de la diabetes de tipo II, la señalización inducida por insulina conduce a la captación celular de glucosa y la síntesis de glucógeno. A lo largo de esta ruta, la GSK-3 es un regulador negativo de la señal inducida por insulina. Normalmente, la presencia de insulina produce inhibición de la fosforilación mediada por GSK-3 y la desactivación de la glucógeno sintasa. La inhibición de la GSK-3 conduce a un aumento de la síntesis de glucógeno y a la captación de glucosa [Klein y col., PNAS 1996, 93, 8455-8459; Cross y col., Biochem. J. 1994, 303, 21-26; Cohen, Biochem. Soc. Trans. 1993, 21, 555-567; y Massillon y col., Biochem J. 1994, 299, 123-128]. Sin embargo, en un paciente diabético, en el que está alterada la respuesta a la insulina, la síntesis de glucógeno y la captación de glucosa no pueden aumentar a pesar de la presencia de niveles en sangre relativamente elevados de insulina. Esto conduce a niveles de glucosa en sangre anormalmente elevados con efectos agudos y a largo plazo que finalmente pueden ocasionar enfermedad cardiovascular, insuficiencia renal y ceguera. En dichos pacientes, no se puede producir la inhibición normal de la GSK-3 inducida por la insulina. También se ha notificado que en pacientes con diabetes de tipo II, está sobreexpresada la GSK-3 [véase la solicitud PCT: WO 00/38675]. Por lo tanto, los inhibidores terapéuticos de la GSK-3 son potencialmente útiles para tratar a pacientes diabéticos que padecen una respuesta alterada a la insulina.

La actividad de la GSK-3 está asociada con la enfermedad de Alzheimer. Los rasgos característicos de esta enfermedad son las placas extracelulares formadas por péptidos β -amiloides agregados y la formación de ovillos neurofibrilares intracelulares por medio de la proteína tau.

En un modelo animal de enfermedad de Alzheimer, se ha demostrado que la inhibición de la GSK-3 reduce los péptidos β -amiloides. Véanse las páginas 435, 438. Phiel y col., Nature 423, 435-439 (2003). Los ratones que sobreexpresaban proteína precursora amiloide (APP) tratados con litio (un inhibidor de la GSK-3 α) durante un periodo de tres semanas mostraron una reducción mayor del 50% en los niveles tisulares de péptido β -amiloide.

Los ovillos neurofibrilares contienen proteína Tau hiperfosforilada, en los que Tau está fosforilada en sitios anómalos. Se sabe que la GSK-3 fosforila estos sitios anómalos en modelos celulares y animales. Los ratones transgénicos condicionales que sobreexpresan GSK-3 desarrollan aspectos de EA que incluyen la hiperfosforilación de tau, apoptosis neuronal y déficit de aprendizaje espacial. La desactivación de GSK-3 en estos ratones restaura el comportamiento normal, y reduce la hiperfosforilación de Tau y la apoptosis neuronal. (Engel T y col., J Neuro Sci, 2006, 26, 5083-5090 y Lucas y col., EMBO J, 2001, 20, 27-39). También se ha demostrado que los inhibidores de GSK-3 previenen la hiperfosforilación de Tau en las células [Lovestone y col., Current Biology 1994, 4, 1077-86; y Brownlee y col., Neuroreport 1997, 8, 3251-55].

En la bibliografía se ha informado sobre la GSK-3 como una diana para la psicosis y trastornos del estado de ánimo tales como esquizofrenia y enfermedad bipolar, respectivamente. En una subserie de pacientes esquizofrénicos, se

identificó deficiencia de haplotipo AKT que estaba correlacionada con un aumento de la actividad de la GSK-3. Un knockout de un solo alelo de GSK-3 β dio como resultado una hiperactividad atenuada en respuesta a anfetaminas en un modelo de comportamiento de manía.

Se ha mostrado que varios fármacos antipsicóticos y estabilizadores del estado de ánimo usados para tratar tanto a

5 pacientes esquizofrénicos como a pacientes bipolares inhiben la GSK-3 (Emamian y col, Nat Genet, 2004, 36, 131-137; O'Brien y col, J Neurosci, 2004, 24, 6791-6798; Beaulieu y col, PNAS, 2004, 101, 5099-5104; Li y col, Int J Neuropsychopharmacol, 2006, pág. 1-13; Gould TD, Expert Opin Ther Targets, 2006, 10, 377-392). Además, una patente reciente, el documento US 2004/0039007 describe inhibidores de GSK-3 que muestran efectos antiesquizofrénicos y ansiolíticos en modelos de comportamiento relevantes en ratón.

10 La actividad de la GSK-3 está asociada con el ictus. Wang y col. Mostraron que el IGF-1 (factor de crecimiento de insulina-1), un inhibidor de GSK-3 conocido, reducía el tamaño del infarto en cerebros de rata después de una oclusión transitoria de arteria cerebral media (MCAO), un modelo de ictus en ratas. [Wang y col., Brain Res 2000, 859, 381-5; Sasaki y col., Neurol Res 2001, 23, 588-92; Hashimoto y col., J. Biol. Chem 2002, 277, 32985-32991]. El documento US 2004/0039007 describe el efecto de inhibidores de GSK-3 en MCAO, un modelo de ictus en ratas.

15 Estos inhibidores de GSK-3 redujeron significativamente la lesión isquémica estriatal y redujeron la formación de edema en ratas. Además, las ratas "demostraron una notable mejoría en la función neurológica durante el transcurso del experimento".

Por todas las razones anteriores, existe una gran necesidad de desarrollar compuestos útiles como inhibidores de proteína quinasas. En particular, sería deseable desarrollar compuestos que fueran útiles como inhibidores de la

20 GSK-3, particularmente dados los tratamientos inadecuados actualmente disponibles para la mayoría de los trastornos implicados en su activación.

El documento WO 2008/057940 se refiere a aminopiridinas y aminopirimidinas y a composiciones farmacéuticas de estos compuestos, para su uso en la inhibición de proteína quinasas tales como la GSK-3.

El documento WO 2004/013140 se refiere a compuestos de pirazol y a composiciones farmacéuticas de estos compuestos, para su uso en la inhibición de proteína quinasas tales como la GSK-3.

25

El documento WO 02/50065 se refiere a compuestos de pirazol y a composiciones farmacéuticas de estos compuestos, para su uso en la inhibición de proteína quinasas tales como Aurora-2, y en el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer.

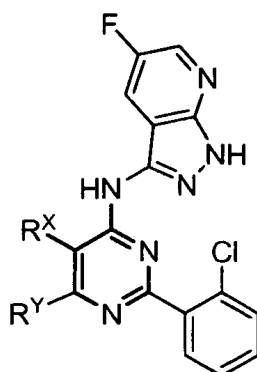
El documento US 2003/078166 se refiere a compuestos de pirazol y a composiciones farmacéuticas de estos compuestos, para su uso en la inhibición de proteína quinasas tales como GSK-3 y Aurora-2, y en el tratamiento de enfermedades tales como la diabetes, el cáncer y la enfermedad de Alzheimer.

30

Sumario de la invención

La presente invención proporciona compuestos y composiciones farmacéuticamente aceptables de los mismos que son útiles como inhibidores de proteína quinasas GSK-3.

35 Estos compuestos se representan por la fórmula I:



I

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la que las variables son como se definen en el presente documento.

Estos compuestos tienen una selectividad sorprendente en el bloqueo de la forma de autofosforilación de tirosina de la enzima GSK-3 con respecto a la forma de serina/treonina quinasa. Estos compuestos también son

40

sorprendentemente eficaces para aumentar la ramificación axonal y dendrítica en células neuronales, lo cual es útil en el tratamiento de afecciones degenerativas tales ictus, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM), lesión de la médula espinal, lesión traumática cerebral, Charcot-Marie-Tooth, leucocitopenia, diabetes, neuropatía diabética y osteoporosis.

- 5 Estos compuestos también son eficaces como quimiomoduladores de reparación, regeneración y diferenciación celular.

La presente invención también proporciona procedimientos para preparar estos compuestos, composiciones, composiciones farmacéuticas y procedimientos para usar dichos compuestos y composiciones para inhibir proteína quinasas. Estos compuestos son particularmente útiles como inhibidores de la GSK-3.

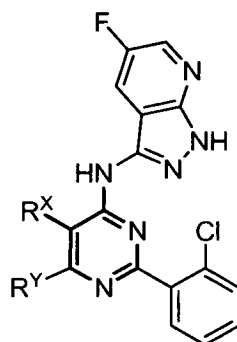
- 10 Estos compuestos y las composiciones farmacéuticamente aceptables de los mismos también son útiles para tratar o prevenir una diversidad de enfermedades, trastornos o afecciones que incluyen, pero sin limitación, una enfermedad autoinmune, inflamatoria, proliferativa o hiperproliferativa, una enfermedad neurodegenerativa o una enfermedad mediada inmunológicamente.

Los compuestos proporcionados por la presente invención son útiles para inhibir quinasas *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*.

- 15 Estos compuestos también son útiles para el estudio de quinasas en fenómenos biológicos y patológicos; el estudio de rutas de transducción de señales intracelulares mediadas por dichas quinasas; y la evaluación comparativa de nuevos inhibidores de quinasa.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona compuestos de Fórmula I:



I

20

o una sal farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la que:

R^x es alquilo C₁₋₃ y
R^y es alquilo C₁₋₃.

- 25 En algunas realizaciones, R^x es metilo o etilo. En algunas realizaciones, R^x es metilo. En algunas realizaciones R^y es metilo. En algunas realizaciones, R^x y R^y son ambos metilo. En algunas realizaciones, R^x es etilo y R^y es metilo.

Una realización proporciona los compuestos de la Tabla 1 que se muestra a continuación.

Tabla 1

I-1	I-2

Los compuestos de la presente invención incluyen aquellos descritos de forma general anteriormente, y que se ilustran adicionalmente mediante las clases, subclases y especies desveladas en el presente documento. Como se usa en el presente documento, deben aplicarse las siguientes definiciones a menos que se indique otra cosa. Para los propósitos de la presente invención, los elementos químicos se identifican de acuerdo con la Tabla periódica de los elementos, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75ª Ed. Además, se describen principios generales de química orgánica en "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, y en "March's Advanced Organic Chemistry", 5ª Ed., Ed.: Smith, M.B. y March, J., John Wiley & Sons, Nueva York: 2001, la totalidad del contenido de los mismos se incorpora en el presente documento como referencia.

Como se describe en el presente documento, un intervalo numérico específico de átomo incluye cualquier número entero de átomos del mismo. Por ejemplo, un grupo que tiene de 1-4 átomos, podría tener 1, 2, 3 ó 4 átomos.

Como se describe en el presente documento, los compuestos de la invención pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes, tales como los que se han ilustrado de forma general anteriormente o como se ilustran mediante las clases, subclases y especies particulares de la invención de la invención. Se apreciará que la frase "opcionalmente sustituido" se usa de forma intercambiable con la frase "sustituido o sin sustituir". En general, el término "sustituido", tanto si va precedido por el término "opcionalmente" como si no, se refiere al reemplazo de los radicales hidrógeno en una estructura dada con el radical de un sustituyente específico. A menos que se indique otra cosa, un grupo opcionalmente sustituido puede tener un sustituyentes en cada posición adecuada del grupo, y cuando más de una posición en una estructura dada puede estar sustituida con más de un sustituyente con más seleccionado entre un grupo específico, el sustituyentes puede ser igual o diferente en cada posición. Las combinaciones de sustituyentes previstos por la invención son preferentemente aquellas que dan como resultado la formación de compuestos estables o químicamente factibles.

El término "estable", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos que no se alteran sustancialmente cuando se someten a condiciones para permitir su producción, detección, recuperación, purificación y uso para uno o más de los propósitos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, un compuesto estable o químicamente factibles es uno que no se altera sustancialmente cuando se mantiene a una temperatura de 40 °C o menos, en ausencia de humedad u otras condiciones químicamente reactivas, durante al menos una semana.

El término "alifático" o "grupo alifático", como se usa en el presente documento, se refiere a una cadena de hidrocarburo de cadena lineal (es decir, sin ramificar), ramificada o sin ramificar, sustituida o sin sustituir que está completamente insaturada o que contiene una o más unidades de insaturación, que tiene un solo punto de unión con el resto de la molécula. A menos que se indique lo contrario, los grupos alifáticos contienen 1-20 átomos de carbono alifáticos. En algunas realizaciones, los grupos alifáticos contienen 1-10 átomos de carbono alifáticos. En otras realizaciones, los grupos alifáticos contienen 1-8 átomos de carbono alifáticos. En otras realizaciones más, los grupos alifáticos contienen 1-6 átomos de carbono alifáticos y en otras realizaciones más, los grupos alifáticos contienen 1-4 átomos de carbono alifáticos. Los grupos alifáticos adecuados incluyen, pero sin limitación, grupos alquilo, alquenilo o alquinilo lineales o ramificados, sustituidos o sin sustituir. los ejemplos específicos incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, isopropilo, n-propilo, sec-butilo, vinilo, n-butenilo, etinilo y terc-butilo.

El término "alquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a una cadena de hidrocarburo de cadena lineal (es decir, sin ramificar), ramificada o sin ramificar, sustituida o sin sustituir, que está completamente saturada y que tiene un solo punto de unión con el resto del a molécula. A menos que se indique lo contrario, los grupos alquilo contienen 1-6 alquilo átomos de carbono. En algunas realizaciones, los grupos alquilo contienen 1-4 alquilo átomos de carbono. En otras realizaciones, los grupo alquilo contienen 1-3 alquilo átomos de carbono. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, isopropilo, n-propilo, sec-butilo, n-butilo y n-pentilo.

El término "cicloalifático" (o "carbociclo" o "carbociclilo" o "cicloalquilo") se refiere a un hidrocarburo C₃-C₈ monocíclico o hidrocarburo C₈-C₁₂ bicíclico que está completamente saturado o que contiene una o más unidades de insaturación, pero que no es aromático, que tiene un solo punto de unión con el resto de la molécula, en el que cualquier anillo individual en dicho sistema de anillos bicíclico tiene 3-7 miembros. Los grupos cicloalifáticos incluyen, pero sin limitación, grupos cicloalquilo y cicloalquenilo. Los ejemplos específicos incluyen, pero sin limitación, ciclohexilo, ciclopropenilo y ciclobutilo.

El término "heterociclo", "heterociclilo" o "heterocíclico", como se usa en el presente documento, se refiere a un sistema de anillos no aromáticos, monocíclico, bicíclico o tricíclico, en el que uno o más de los miembros del anillo son un heteroátomo seleccionado independientemente. En algunas realizaciones, el grupo "heterociclo", "heterociclilo" o "heterocíclico" tiene de tres a catorce miembros, en el que uno o más de los miembros del anillo es un heteroátomo seleccionado independientemente entre oxígeno, azufre, nitrógeno o fósforo, y cada anillo en el sistema contiene de 3 a 7 miembros del anillo.

Los heterociclos adecuados incluyen, pero sin limitación, 3-1H-benzoimidazol-2-ona, 3-(1-alquil)-benzoimidazol-2-ona, 2-tetrahidrofuranóilo, 3-tetrahidrofuranóilo, 2-tetrahidrotiofenilo, 3-tetrahidrotiofenilo, 2-morfolino, 3-morfolino, 4-morfolino, 2-tiomorfolino, 3-tiomorfolino, 4-tiomorfolino, 1-pirrolidinilo, 2-pirrolidinilo, 3-pirrolidinilo, 1-tetrahidropiperazinilo, 2-tetrahidropiperazinilo, 3-tetrahidropiperazinilo, 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 1-pirazolinilo, 3-pirazolinilo, 4-pirazolinilo, 5-pirazolinilo, 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-piperidinilo, 2-

tiazolidinilo, 3-tiazolidinilo, 4-tiazolidinilo, 1-imidazolidinilo, 2-imidazolidinilo, 4-imidazolidinilo, 5-imidazolidinilo, indolinilo, tetrahydroquinolinilo, tetrahydroisoquinolinilo, benzotiolano, benzoditiano y 1,3-dihidro-imidazol-2-ona.

Los grupos cíclicos, (por ejemplo, cicloalifáticos y heterociclos), pueden estar linealmente condensados, puenteados o ser espirocíclicos.

- 5 El término "heteroátomo" se refiere a uno o más de oxígeno, azufre, nitrógeno o fósforo, (incluyendo, cualquier forma oxidada de nitrógeno, azufre o fósforo; la forma cuaternizada de cualquier nitrógeno básico; un nitrógeno sustituible de un anillo heterocíclico, por ejemplo N (como en 3,4-dihidro-2H-pirrolilo), NH (como en pirrolidinilo) o NR⁺ (como en pirrolidinil N-sustituido)).

- 10 El término "insaturado", como se usa en el presente documento, se refiere a que un resto tiene una o más unidades de insaturación.

El término "alcoxi" o "tioalquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo, como se ha definido previamente, unido a la cadena de carbono principal a través de un átomo de oxígeno ("alcoxi") o azufre ("tioalquilo").

- 15 Los términos "haloalquilo", "haloalquenilo", "haloalifático" y "haloalcoxi" se refieren a alquilo, alquenilo o alcoxi, como puede ser el caso, sustituido con uno o más átomos de halógeno. Los términos "halógeno", "halo" y "hal" significan F, Cl, Br o I.

- 20 El término "arilo" usado solo o como parte de un resto más largo, como en "aralquilo", "aralcoxi" o "ariloxialquilo", se refiere un sistema de anillos monocíclico, bicíclico y tricíclico que tiene un total de cinco a catorce miembros, en el que al menos un anillo en el sistema de anillos es aromático, y en el que cada anillo el sistema de anillos contiene de 3 a 7 ring miembros. El término "arilo" puede usarse de forma intercambiable con la expresión "anillo arilo". El término "arilo" también se refiere a sistemas de anillo heteroarilo como se definen más adelante en el presente documento.

- 25 El término "heteroarilo", usado solo o como parte de un resto más, como en "heteroaralquilo" o "heteroarilalcoxi", se refiere a un sistema de anillos monocíclico, bicíclico o tricíclico que tiene un total de cinco a catorce miembros, en el que al menos un anillo en el sistema de anillos es aromático, al menos un anillo en el sistema de anillos contiene uno o más heteroátomos, y en el que cada anillo en el sistema contiene de 3 a 7 miembros en el anillo. El término "heteroarilo" puede usarse de forma intercambiables con la expresión "anillo heteroarilo" o el término "heteroaromático". Los anillos heteroarilo adecuados incluyen, pero sin limitación, 2-furanilo, 3-furanilo, N-imidazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, 5-imidazolilo, benzoimidazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 5-oxazolilo, N-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo, piridazinilo (por ejemplo, 3-piridazinilo), 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, tetrazolilo (por ejemplo, 5-tetrazolilo), triazolilo (por ejemplo, 2-triazolilo y 5-triazolilo), 2-tienilo, 3-tienilo, benzofurilo, benzotiofenilo, indolilo (por ejemplo, 2-indolilo), pirazolilo (por ejemplo, 2-pirazolilo), isotiazolilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,3-tiadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, 1,2,5-tiadiazolilo, purinilo, pirazinilo, 1,3,5-triazinilo, quinolinilo (por ejemplo, 2-quinolinilo, 3-quinolinilo, 4-quinolinilo) e isoquinolinilo (por ejemplo, 1-isoquinolinilo, 3-isoquinolinilo o 4-isoquinolinilo).

- 40 Las expresiones "grupo protector" y "grupo protector", como se usan en el presente documento, son intercambiables y se refieren a un agente usado para bloquear temporalmente uno o más sitios reactivos deseados en un compuesto multifuncional. En ciertas realizaciones, un grupo protector tiene uno o más, o preferentemente todas, las siguientes características: a) se añade de forma selectiva a un grupo funcional con buen rendimiento para dar un sustrato protegido que es b) estable a las reacciones que ocurren en uno o más de los otros sitios reactivos; y c) se retira de forma selectiva con buen rendimiento con reactivos que no atacan el grupo funcional desprotegido regenerado. Los grupos protectores ejemplares de detallan en Greene, T.W., Wuts, P. G en "Protective Groups in Organic Synthesis", Tercera edición, John Wiley & Sons, Nueva York: 1999 (y las otras ediciones del libro), la totalidad de los contenidos de los mismos se incorporan en el presente documento por referencia. La expresión "grupo protector de nitrógeno", como se usa en el presente documento, se refiere a un agente usado para bloquear temporalmente uno o más sitios reactivos de nitrógeno deseados en un compuesto multifuncional. Los grupos protectores de nitrógeno preferidos también poseen las características ilustradas anteriormente, y ciertos grupos protectores de nitrógeno ejemplares también se detallan en el Capítulo 7 en Greene, T.W., Wuts, P. G en "Protective Groups in Organic Synthesis", Tercera edición, John Wiley & Sons, Nueva York: 1999, la totalidad de los contenidos del mismo se incorpora en el presente documento por referencia.

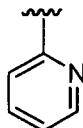
A menos que se indique lo contrario, si el reemplazo ocurre en el extremo terminal, el átomo reemplazado se enlaza a un H en el extremo terminal. Por ejemplo, si -CH₂CH₂CH₃ estuvieran opcionalmente reemplazado con -O-, el compuesto resultante podría ser -OCH₂CH₃, -CH₂OCH₃ o -CH₂CH₂OH.

- 55 A menos que se indique otra cosa, las estructuras representadas en el presente documento también pretenden incluir todas las formas isoméricas (por ejemplo, enantioméricas, diastereoméricas y geométricas (o conformacionales)) de la estructura; por ejemplo, las configuraciones R y S para cada centro asimétrico, isómeros de doble enlace (Z) y (E) e isómeros configuracionales (Z) y (E). Por lo tanto, los isómeros estereoquímicos sencillos así

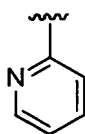
como mezclas enantioméricas, diastereoméricas y geométricas (o conformacionales) de los compuestos de la presente invención están dentro del alcance de la invención.

A menos que se indique otra cosa, todas las formas tautoméricas de los compuestos de la invención están dentro del alcance de la invención.

- 5 A menos que se indique otra cosa, un sustituyente puede girar libremente en torno a cualquiera de los enlaces que pueden girar. Por ejemplo, un sustituyente representado como



también representa



- 10 Además, a menos que se indique otra cosa, las estructuras representadas en el presente documento también pretenden incluir compuestos que se diferencian únicamente en la presencia de uno o más átomos enriquecidos isotópicamente. Por ejemplo, los compuestos que tienen las estructuras de la presente invención excepto por el reemplazo de hidrógeno por deuterio o tritio, o el reemplazo de un carbono por un carbono enriquecido con ^{13}C o ^{14}C , están dentro del alcance de la presente invención. Dichos compuestos son útiles, por ejemplo, como
- 15 herramientas analíticas o sondas en ensayos biológicos.

También se apreciará que los compuestos de la presente invención pueden existir en forma libre para el tratamiento, o cuando sea adecuado, como una sal o sales farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos.

- Como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales de un compuesto que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similar, y son coherentes con una proporción beneficio/riesgo razonable.
- 20

- Las sales farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, S. M. Berge y col., describen en detalle sales farmacéuticamente aceptables en J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66,1-19, que se incorpora en el presente documento por referencia. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención incluyen las obtenidas a partir de ácidos y bases orgánicas e inorgánicas. Estas sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos. Las sales de adición de ácidos pueden prepararse 1) haciendo reaccionar el compuesto purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y 2) aislando la sal obtenida de esta forma.
- 25

- Los ejemplos de sales de adición de ácidos, no tóxicas, farmacéuticamente aceptables son sales de un grupo amino formadas con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico, o con ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico, o mediante el uso de otros procedimientos usados en la técnica, tales como intercambio iónico. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, canforato, canforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, glicolato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, yodhidrato, 2-hidroxiitanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, lauril sulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, palmoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, salicilato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, p-toluenosulfonato, undecanoato, valerato y similares. Las sales obtenidas a partir de bases adecuadas incluyen sales de metales alcalinos, metales alcalinotérreos, amonio y $\text{N}^+(\text{alquil } \text{C}_{1-4})_4$. La presente invención también prevé la cuaternización de cualquiera de los grupos básicos que contienen nitrógeno descritos en el presente documento. Pueden obtenerse productos dispensables en agua o aceite mediante dicha cuaternización.
- 30
- 35
- 40

- Pueden prepararse sales de adición de base 1) haciendo reaccionar el compuesto purificado en su forma de ácido con una base orgánica o inorgánica adecuada y 2) aislando la sal formada de esta manera. Las sales de adición de base incluyen sales de metales alcalinos o alcalinotérreos. Las sales representativas de metales alcalinos o alcalinotérreos incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares. Además, las sales farmacéuticamente
- 45

aceptables incluyen, cuando es adecuado, cationes no tóxicos de amonio, amonio cuaternario y amina formados usando contraiones, tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, sulfonato de alquilo inferior y aril sulfonato. Pueden emplearse otros ácidos y bases, aunque no sean en sí mismos farmacéuticamente aceptables, en la preparación de sales útiles como intermedios en la obtención de los compuestos de la invención y sus sales de adición de ácidos o bases farmacéuticamente aceptables.

Se usan las siguientes abreviaturas:

	DCM	diclorometano
	EtOAc	acetato de etilo
	DMSO	dimetilsulfóxido
10	ATP	adenosin trifosfato
	DTT	ditiotreitól
	RMN	resonancia magnética nuclear
	HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
	CLEM;	cromatografía líquida-espectrometría de masas
15	TLC	cromatografía de capa fina
	T _r	tiempo de retención
	HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etano-ácido sulfónico
	FBS	suero bovino fetal
	PVDF	fluoruro de polivinilideno
20	PBST	solución salina con Tween 20 tamponada con fosfato
	TCF/LEF	Factor de células T/factor potenciador linfóide
	DIPEA	diisopropiletilamina

La presente invención proporciona compuestos y composiciones que son útiles como inhibidores de proteína quinasas. En algunas realizaciones, las proteína quinasas son quinasas GSK-3.

25 Como inhibidores de proteína quinasas, los compuestos y composiciones de la presente invención son particularmente útiles para tratar o reducir la gravedad de una enfermedad, afección o trastorno cuando está implicada una proteína quinasa en la enfermedad, afección o trastorno. En un aspecto, la presente invención proporciona compuestos y composiciones para su uso en el tratamiento o reducción de la gravedad de una enfermedad, afección o trastorno cuando está implicada una proteína quinasa en el estado de enfermedad. En otro

30 aspecto, la presente invención proporciona compuestos y composiciones para su uso en el tratamiento o reducción de la gravedad de una enfermedad, afección o trastorno, cuando la inhibición de la actividad enzimática está implicada en el tratamiento de la enfermedad. En otro aspecto, la presente invención proporciona compuestos y composiciones para su uso en el tratamiento o reducción de la gravedad de una enfermedad, afección o trastorno con compuestos que inhiben la actividad enzimática por unión a la proteína quinasa. Otro aspecto proporciona

35 compuestos y composiciones para su uso en el tratamiento o reducción de la gravedad de una enfermedad, afección o trastorno de quinasa mediante la inhibición de la actividad enzimática de la quinasa con un inhibidor de proteína quinasa.

En algunas realizaciones, dicho inhibidor de proteína quinasa es un inhibidor de GSK-3.

40 Como inhibidores de proteína quinasas, los compuestos y composiciones de la presente invención también son útiles en muestras biológicas. Un aspecto de la invención se refiere a la inhibición de la actividad proteína quinasa en una muestra biológica, comprendiendo el procedimiento poner en contacto dicha muestra biológica con un compuesto de fórmula I o una composición que comprende dicho compuesto. La expresión "muestra biológica", como se usa en el presente documento, significa una muestra *in vitro* o *ex vivo*, incluyendo, sin limitación, cultivos celulares o extractos de los mismos; material de biopsia obtenido a partir de un mamífero o extractos del mismo; y

45 sangre, saliva, orina, heces, semen, lágrimas u otros fluidos corporales o extractos de los mismos. La expresión "muestra biológica" no se refiere a muestras *in vivo*.

La inhibición de la actividad de proteína quinasas en una muestra biológica es útil para una diversidad de fines conocidos por un experto en la materia. Los ejemplos de dichos fines incluyen, pero sin limitación, transfusión de sangre, transplante de órganos y almacenamiento de muestras biológicas.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al estudio de proteína quinasas en fenómenos biológicos y patológicos; el estudio de rutas de transducción de señales intracelulares mediadas por dichas proteína quinasas; y la evaluación comparativa de nuevos inhibidores de proteína quinasa. Los ejemplos de dichos usos incluyen, pero sin limitación, ensayos biológicos tales como ensayos enzimáticos y ensayos basados en células.

- 5 La actividad de los compuestos como inhibidores de proteína quinasas puede ensayarse *in vitro*, *in vivo* o en una línea celular. Los ensayos *in vitro* incluyen ensayos que determinan la inhibición de la actividad quinasa o la actividad ATPasa de la quinasa activada. Otros ensayos *in vitro* alternativos cuantifican la capacidad del inhibidor de unirse a la proteína quinasa y ésta puede medirse por radiomarcaje del inhibidor antes de la unión, aislamiento del complejo inhibidor/quinasa y determinación de la cantidad de radiomarcador unido, o realización de un experimento de competición en el que se incuban nuevos inhibidores con la quinasa unida a radioligandos conocidos.

10 La inhibición de la actividad de la GSK-3 se ha asociado a la proliferación de células madre, diferenciación y plasticidad neuronal de células madre, y a la angiogénesis. Estas diversas funciones están implicadas en la reparación y regeneración. Se ha mostrado que los inhibidores de GSK-3 sostienen la autorrenovación de células madre embrionarias, y promueven la diferenciación de neuronas, células beta, la diferenciación mieloide y la diferenciación de osteoblastos. (Sato y col, Nature Medicine 10, 55-63, 2004; Ding y col PNAS 100, 7632-37, 2003; Branco y col J Cell Science 117, 5731-37, 2004; Trowbridge y col, Nature Medicine 12, 89-98, 2006; Mussmann y col, JBC (publicación en línea previa a la publicación impresa) 2007; Kulkarni y col, Journal of Bone and Mineral Res. 21, 910-920, 2006). Con respecto a la plasticidad neuronal, se ha mostrado que la inhibición de GSK-3 es importante para regular la polaridad, la potenciación a largo plazo (LTP) y el crecimiento de neuritas/axones (Hooper y col, European J of Neuroscience 25, 81-86, 2007; Kim y col, Neuron 52, 981-996, 2006; Jiang y col Cell 120, 123-135, 2005). También se ha mostrado que la inhibición de la GSK-3 induce la angiogénesis en células endoteliales (Skurk y col, Circulation Research 96, 308-318, 2005).

25 Por consiguiente, un aspecto de la presente invención proporciona compuestos que son útiles en la reparación y regeneración celular. En algunas realizaciones, dichos compuestos se usan para promover la proliferación celular, diferenciación celular, plasticidad neuronal o angiogénesis. En algunas realizaciones, dichos compuestos son quimiomoduladores de la diferenciación celular. En otras realizaciones, dichos compuestos son quimiomoduladores de la reparación y regeneración.

30 En algunas realizaciones, los compuestos se usan para aumentar la ramificación axonal y dendrítica en células neuronales. En algunas realizaciones, los compuestos se usan para promover la neuroplasticidad. En otras realizaciones, los compuestos se usan para promover la angiogénesis. En otras realizaciones adicionales, los compuestos se usan para promover la neurogénesis. En otras realizaciones, los compuestos se usan para tratar trastornos neuropsiquiátricos tales como manía y depresión.

Otra realización proporciona compuestos que se usan para tratar la diabetes promoviendo la regeneración de células beta.

- 35 Otra realización proporciona compuestos que se usan para tratar la osteoporosis por osteoblastogénesis.

40 La GSK-3 funciona como una tirosina y como una serina/treonina quinasa, de forma similar a la familia de quinasas DYRK. De la misma manera que la familia de quinasas DYRK, la GSK-3 autofosforila un resto de tirosina clave en su dominio quinasa (GSK-3a, Tyr 279 y GSK-3b, Tyr 216). Se ha mostrado que esta fosforilación de tirosina es importante para modular positivamente la actividad quinasa. Locheed y col, demostraron que esta autofosforilación se produce intramolecularmente en una etapa intermedia posterior a la traducción antes de la maduración y es dependiente de chaperonas (Locheed y col, Molecular Cell 24, (2006), pág. 627-633). Después de la maduración, la GSK-3 pierde su actividad tirosina quinasa y actúa exclusivamente como una serina y treonina quinasa sobre sustratos exógenos.

45 La β -catenina es uno de los sustratos de serina/treonina exógenos que fosforila la GSK-3. La inhibición de la fosforilación de la β -catenina conduce a un aumento en los niveles de β -catenina que, a su vez, se transloca al núcleo y controla transcripcionalmente a muchos genes implicados en la respuesta y función celular. Un problema de seguridad potencial para los inhibidores de GSK-3 es que el uso de los inhibidores podría ocasionar una hiperproliferación mediante la inducción de β -catenina, ya que principalmente la serina/treonina quinasa GSK-3 es central para muchas rutas de señalización que controlan múltiples actividades celulares tales como la proliferación, diferenciación y metabolismo.

50 Por consiguiente, un aspecto de la presente invención proporciona compuestos que pueden atenuar parcialmente la actividad de la GSK-3 sin bloquear completamente la enzima y afectar a múltiples sustratos tales como la β -catenina. Una realización proporciona compuestos que inhiben selectivamente la forma de autofosforilación de tirosina de la enzima con respecto a la forma de serina/treonina quinasa.

- 55 En algunas realizaciones, dicha enzima es GSK-3 α ; en otras realizaciones es GSK-3 β . En algunas realizaciones, dichos compuestos tienen una ventana de β -catenina:GSK-3 β de al menos 25 veces y de hasta 100 veces. En algunas realizaciones, los compuestos tienen una ventana de β -catenina:GSK-3 β de al menos 30 veces. En otras

realizaciones, dichos compuestos tienen una ventana de β -catenina:GSK-3 α de al menos 400 veces y de hasta 500 veces.

Sorprendentemente, los compuestos que inhiben selectivamente la autofosforilación de la forma de tirosina de la enzima GSK-3 con respecto a la forma de serina/treonina quinasa, promueven el crecimiento neuronal y la formación de dendritas, tal como mediante el aumento de la ramificación axonal y dendrítica en células neuronales. El aumento del crecimiento de neuronas y la formación de dendritas es ventajoso y proporciona una eficacia terapéutica inesperada y mejorada cuando se tratan muchos tipos de afecciones degenerativas tales como ictus, situación posterior a un ictus, lesión de la médula espinal, lesión traumática cerebral, Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, neuropatía diabética, Charcot-Marie-Tooth, leucocitopenia, diabetes y osteoporosis.

Los compuestos que inhiben selectivamente la autofosforilación de la forma de tirosina de la enzima GSK-3 con respecto a la forma de serina/treonina quinasa también promueven la angiogénesis, lo cual es ventajoso y proporciona una eficacia terapéutica inesperada y mejorada cuando se tratan muchos tipos de afecciones degenerativas tales como las indicadas en el presente documento.

Otro aspecto de la presente invención proporciona compuestos que son útiles para el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones que incluyen, pero sin limitación, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades proliferativas e hiperproliferativas, enfermedades mediadas inmunológicamente, trastornos de inmunodeficiencia, trastorno inmunomodulador o inmunosupresor, enfermedades óseas, enfermedades metabólicas, enfermedades neurológicas y neurodegenerativas, factor neurotrófico, enfermedades cardiovasculares, enfermedades relacionadas con hormonas, diabetes, alergias, asma y enfermedad de Alzheimer. Otro aspecto de la presente invención proporciona compuestos que son inhibidores de proteína quinasas y, por lo tanto, son útiles para el tratamiento de las enfermedades, trastornos y afecciones, junto con otros usos descritos en el presente documento.

Otro aspecto proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden cualquiera de los compuestos descritos en el presente documento y que opcionalmente comprenden un vehículo, adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, estas composiciones opcionalmente comprenden además uno o más agentes terapéuticos adicionales.

Un aspecto de la presente invención proporciona una cantidad eficaz de un compuesto, o una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un compuesto, para su uso en el tratamiento o reducción de la gravedad de una enfermedad, trastorno o afección seleccionada entre una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad proliferativa o hiperproliferativa tal como cáncer, una enfermedad mediada inmunológicamente, un trastorno de inmunodeficiencia, una enfermedad ósea, una enfermedad metabólica, una enfermedad neurológica o neurodegenerativa, una enfermedad cardiovascular, alergias, diabetes, asma, enfermedad de Alzheimer o una enfermedad relacionada con hormonas.

El término "cáncer" incluye, pero sin limitación, los siguientes cánceres: epidermoide, oral: cavidad bucal, labios, lengua, boca, faringe; cardíaco: sarcoma (angiosarcoma, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma), mixoma, rabdomioma, fibroma, lipoma y teratoma; pulmón: carcinoma broncogénico (células escamosas o epidermoide, células pequeñas indiferenciadas, células grandes indiferenciadas, adenocarcinoma), carcinoma alveolar (bronquiolar), adenoma bronquial, sarcoma, linfoma, hamartoma condromatoso, mesotelioma; gastrointestinal: esófago (carcinoma de células escamosas, laringe, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma, linfoma), estómago (carcinoma, linfoma, leiomiomasarcoma), páncreas (adenocarcinoma ductal, insulinooma, glucagonoma, gastrinooma, tumores carcinoides, vipoma), intestino delgado (adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Kaposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma), intestino grueso (adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma vellosa, hamartoma, leiomioma), colon, colon-recto, colorectal; recto, tracto genitourinario: riñón (adenocarcinoma, tumor de Wilm [nefroblastoma], linfoma, leucemia), vejiga y uretra (carcinoma de células escamosas, carcinoma de células transicionales, adenocarcinoma), próstata (adenocarcinoma, sarcoma), testículo (seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoides, lipoma); hígado: hepatoma (carcinoma hepatocelular), colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, hemangioma, conductos biliares; hueso: sarcoma osteogénico (osteosarcoma), fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma de células del retículo), mieloma múltiple, tumor maligno de células gigantes, cordoma, osteocondroma (exostosis osteocartilaginosa), condroma benigno, condroblastoma, condromixofibroma, osteoma osteoide y tumores de células gigantes; sistema nervioso: cráneo (osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, osteítis deformante), meninges (meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis), cerebro (astrocitoma, meduloblastoma, glioma, ependimoma, germinoma [pinealoma], glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, tumores congénitos), neurofibroma de médula espinal, meningioma, glioma, sarcoma); ginecológico: útero (carcinoma endometrial), cuello del útero (carcinoma cervical, displasia cervical pretumoral), ovarios (carcinoma de ovario [cistadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma mucinoso, carcinoma no clasificado], tumores de granulosa-células tecales, tumores de células de Sertoli-Leydig, disgerminoma, teratoma maligno), vulva (carcinoma de células escamosas, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma), vagina (carcinoma de células claras, carcinoma de células escamosas, sarcoma botrioide

(rhabdomyosarcoma embrionario), trompas de falopio (carcinoma), mama; hematológico: sangre (leucemia mieloide [aguda y crónica], leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, enfermedades mieloproliferativas, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico), enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin [linfoma maligno], células pilosas; trastornos linfoides; piel: melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, queratoacantoma, lunares, nevi displásicos, lipoma, angioma, dermatofibroma, queloides, psoriasis, glándula tiroides: carcinoma papilar de tiroides, carcinoma folicular de tiroides; carcinoma medular de tiroides, cáncer indiferenciado de tiroides, neoplasia endocrina múltiple tipo 2A, neoplasia endocrina múltiple tipo 2B, cáncer medular de tiroides familiar, feocromocitoma, paraganglioma; y glándulas suprarrenales: neuroblastoma. De esta manera, la expresión “célula cancerosa”, como se proporciona en el presente documento, incluye una célula afectada por una cualquiera de las afecciones identificadas anteriormente. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona entre cáncer colorectal, de tiroides o de mama.

En ciertas realizaciones, una “cantidad eficaz” del compuesto o composición farmacéuticamente aceptable es la cantidad eficaz para tratar dicha enfermedad. Los compuestos y composiciones, de acuerdo con la presente invención, pueden administrarse usando cualquier cantidad y cualquier vía de administración eficaz para tratar o reducir la gravedad de dicha enfermedad. En algunas realizaciones, dicha enfermedad se elige entre reacciones alérgicas o de hipersensibilidad de tipo I, asma, diabetes, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, demencia asociada con el SIDA, trastorno bipolar, esclerosis lateral amiotrófica (ELA, enfermedad de Lou Gehrig), esclerosis múltiple (EM), esquizofrenia, leucocitopenia, hipertrofia de cardiomiocitos, reperfusión/isquemia, ictus, ceguera, rechazo de trasplantes, enfermedad de injerto contra huésped, artritis reumatoide y malignidades sólidas y hematológicas. En algunas realizaciones, dicha enfermedad se elige entre diabetes, trastorno bipolar, esquizofrenia, ictus, enfermedad de Huntington, leucocitopenia e hipertrofia de cardiomiocitos. En algunas realizaciones de la presente invención, dicha enfermedad es una afección mediada por proteína-quinasa. En algunas realizaciones, dicha proteína quinasa es GSK-3.

La expresión “afección mediada por proteína quinasa”, como se usa en el presente documento, significa cualquier enfermedad u otro estado perjudicial en el que interviene una proteína quinasa. Dichas afecciones incluyen, sin limitación, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades proliferativas e hiperproliferativas, enfermedades mediadas inmunológicamente, trastornos de inmunodeficiencia, trastorno inmunomodulador o inmunosupresor, enfermedades óseas, enfermedades metabólicas, enfermedades neurológicas y neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades relacionadas con hormonas, diabetes, alergias, asma y enfermedad de Alzheimer.

La expresión “afección mediada por GSK-3”, como se usa en el presente documento, significa cualquier enfermedad u otro estado perjudicial en el que interviene la GSK-3. Dichas afecciones incluyen, sin limitación, diabetes, neuropatía diabética, osteoporosis, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, demencia asociada con el SIDA, trastorno bipolar, esclerosis lateral amiotrófica (ELA, enfermedad de Lou Gehrig), esclerosis múltiple (EM), esquizofrenia, leucocitopenia, hipertrofia de cardiomiocitos, ictus, lesión de la médula espinal, lesión traumática cerebral, Charcot-Marie-Tooth y artritis reumatoide.

En algunas realizaciones, dicha enfermedad es una afección degenerativa. En algunas realizaciones, dicha afección degenerativa se elige entre ictus, recuperación después de un ictus, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM), lesión de la médula espinal, lesión traumática cerebral, Charcot-Marie-Tooth, leucocitopenia, diabetes, neuropatía diabética y osteoporosis.

En algunas realizaciones, dicha enfermedad es una afección neurodegenerativa. En otra realización, dicha afección neurodegenerativa se selecciona entre ictus, recuperación después de un ictus, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM), lesión de la médula espinal, lesión traumática cerebral y Charcot-Marie-Tooth.

Una realización proporciona un compuesto descrito en el presente documento, para su uso para aumentar la ramificación axonal y dendrítica en células neuronales. Otra realización proporciona un compuesto descrito en el presente documento para su uso para promover la neuroplasticidad, que comprende la etapa de poner en contacto dichas células. Otra realización proporciona un compuesto descrito en el presente documento, para su uso para promover la angiogénesis, que comprende la etapa de poner en contacto dichas células. Otra realización más proporciona un compuesto descrito en el presente documento, para su uso para tratar trastornos neuropsiquiátricos, tales como manía y depresión, en un paciente.

De acuerdo con un aspecto de la invención, dicha enfermedad neurodegenerativa es ictus. En algunas realizaciones, los compuestos se usan para tratar a pacientes con ictus durante la recuperación de un ictus. En algunos casos, los compuestos se usan en la administración posterior a un ictus. La duración del tratamiento puede variar de 1 mes a un año. En algunas realizaciones, el compuesto se administra después de que se haya producido el ictus. En algunas realizaciones, dicha administración se realiza inmediatamente después de la isquemia. En otras realizaciones, dicha administración se realiza de 48 horas después de la isquemia hasta 6 meses después de la isquemia. En algunas realizaciones, los compuestos se usan en combinación con otras formas de tratamiento de recuperación de un ictus, tal como terapia física.

Otra realización proporciona un compuesto descrito en el presente documento para su uso en el tratamiento de la diabetes, que comprende la etapa de poner en contacto una célula beta. En algunas realizaciones, el compuesto promueve la regeneración de células beta.

- 5 Otra realización proporciona un compuesto descrito en el presente documento para su uso en el tratamiento de la osteoporosis, que comprende la etapa de poner en contacto una célula ósea. En algunas realizaciones, dicho compuesto promueve la osteoblastogénesis en la célula.

También se apreciará que ciertos de los compuestos de la presente invención pueden existir en forma libre para el tratamiento o, cuando sea apropiado, como una sal farmacéuticamente aceptable o un derivado farmacéuticamente aceptable de los mismos.

- 10 Debe entenderse que la presente invención incluye mezclas/combinaciones de diferentes sales farmacéuticamente aceptables y también mezclas/combinaciones de compuestos en forma libre y sales farmacéuticamente aceptables.

- Como se describe en el presente documento, las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención además comprenden un vehículo, adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable que, como se usa en el presente documento, incluye todos y cada uno de los disolventes, diluyentes, u otros vehículos líquidos, adyuvantes de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, adecuados para la forma de dosificación particular deseada. Remington's Pharmaceutical Sciences, Decimosexta Edición, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) desvela diversos vehículos usados en la formulación de composiciones farmacéuticamente aceptables y técnicas conocidas para su preparación. Excepto cuando cualquier medio de vehículo convencional sea incompatible con los compuestos de la invención, tal como por la producción de algún efecto biológico indeseable o por la interacción de otra manera de una forma perjudicial con cualquier otro componente de la composición farmacéuticamente aceptable, se contempla su uso dentro del alcance de la presente invención.

- Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas tales como albúmina de suero humano, sustancias tamponantes tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico o sorbato potásico, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrólitos tales como sulfato de protamina, fosfato ácido disódico, fosfato ácido potásico, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxipropileno, lanolina, azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetil celulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorios; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón; aceite de cártamo; aceite de sésamo; aceite de oliva; aceite de maíz y aceite de soja; glicoles; tales como propilenglicol o polietilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua sin pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico y soluciones tampón fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos tales como lauril sulfato sódico y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de revestimiento, edulcorantes, saporíferos y agentes de perfume, conservantes y antioxidantes, que también puede estar presentes en la composición, de acuerdo con el criterio del formulador.

- 40 Los inhibidores de proteína quinasa o sales farmacéuticas de los mismos pueden formularse en composiciones farmacéuticas para la administración a animales o seres humanos. Estas composiciones farmacéuticas, que comprenden una cantidad del inhibidor de proteína eficaz para tratar o prevenir una afección mediada por proteína quinasa y un vehículo farmacéuticamente aceptable son otra realización de la presente invención.

- 45 En algunas realizaciones, dicha afección mediada por proteína quinasa es una afección mediada por GSK-3. En algunas realizaciones, una afección mediada por GSK-3.

- La cantidad exacta de compuesto necesaria para el tratamiento variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, edad y estado general del sujeto, la gravedad de la infección, el agente particular, su modo de administración y similares. Los compuestos de la invención preferentemente se formulan en una forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y conseguir la uniformidad de la dosificación. La expresión "forma de dosificación unitaria", como se usa en el presente documento, se refiere a una unidad físicamente discreta de agente apropiada para el paciente a tratar. Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención se decidirá por el médico a cargo del caso dentro del alcance de un criterio médico razonable. El nivel de dosis eficaz específico para cualquier paciente u organismo particular dependerá de una diversidad de factores que incluyen el trastorno a tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el momento de administración, la vía de administración y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o de forma coincidente con el compuesto específico empleado y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. El término "paciente", como se usa en el presente documento, significa un animal, preferentemente un mamífero y, más preferentemente,

un ser humano.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden administrarse a seres humanos y a otros animales por vía oral, rectal parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (tal como polvos, pomadas o gotas), bucal, como una pulverización oral o nasal, o similares, dependiendo de la gravedad de la infección a tratar. En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención pueden administrarse por vía oral o parenteral a niveles de dosificación de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg y, preferentemente, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal del sujeto por día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico deseado.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen, pero sin limitación, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceite de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, edulcorantes, saporíferos y agentes de perfume.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes de dispersión o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico aceptable para la vía parenteral, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran agua, solución de Ringer, y solución de cloruro sódico U.S.P. e isotónica. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite fijo insípido incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, en la preparación de inyectables se usan ácidos grasos tales como ácido oleico.

Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias o por la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes del uso.

Para prolongar el efecto de un compuesto de la presente invención, con frecuencia es deseable ralentizar la absorción del compuesto desde la inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede conseguirse mediante el uso de una suspensión líquida de un material cristalino o amorfo con baja solubilidad en agua. La velocidad de absorción del compuesto entonces depende de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Como alternativa, la absorción retardada de una forma de compuesto administrada por vía parenteral se consigue disolviendo o suspendiendo el compuesto en un vehículo oleoso. Las formas de depósito inyectables se fabrican formando matrices de microencapsulación del compuesto en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la reacción entre compuesto y polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la velocidad de liberación del compuesto. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el compuesto en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

Las composiciones para administración rectal o vaginal preferentemente son supositorios que pueden prepararse mezclando los compuestos de la presente invención con excipientes o vehículos no irritantes adecuados, tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio, que son sólidos a la temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura corporal y, por lo tanto, se funden en el recto o cavidad vaginal y liberan el compuesto activo.

Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, el compuesto activo está mezclado con al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable inerte, tal como citrato sódico o fosfato dicálcico y/o a) cargas o diluyentes tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábica, c) humectantes tales como glicerol, d) agentes disgregantes tales como agaragar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido alginico, ciertos silicatos y carbonato sódico, e) agentes para retrasar la disolución tales como parafina, f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, h) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita, e i) lubricantes tales como talco, estearato cálcico, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato sódico y mezclas de los mismos. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación también puede comprender agentes tamponantes.

También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso

molecular y similares. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con revestimientos y cubiertas tales como revestimientos entéricos y otros revestimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Opcionalmente, pueden contener agentes opacificadores y también pueden ser de una composición tal que liberen el principio o principios activos únicamente, o preferentemente, en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de una forma retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada con uno o más excipientes como se ha indicado anteriormente. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con revestimientos y cubiertas tales como revestimientos entéricos, revestimientos de control de la liberación y otros revestimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. En dichas formas de dosificación sólidas, el compuesto activo puede mezclarse con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Dichas formas de dosificación también puedan comprender, como en la práctica normal, sustancias adicionales distintas de diluyentes inertes, por ejemplo, lubricantes para formar comprimidos y otros adyuvantes de la formación de comprimidos tales como estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de las cápsulas, los comprimidos y las píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes tamponantes. Opcionalmente pueden contener agentes opacificadores y también pueden ser de una composición tal que liberen el principio o principios activos sólo o, preferentemente, en cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

Las formas de dosificación para administración tópica o transdérmica de un compuesto de la presente invención incluyen, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, pulverizaciones, inhalantes o parches. El componente activo se mezcla en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y cualquier conservante o tampón necesario que pueda requerirse. También se contemplan dentro del alcance de la presente invención formulaciones oftálmicas, gotas para los oídos y gotas para los ojos. Además, la presente invención contempla el uso de parches transdérmicos, que tienen la ventaja añadida de proporcionar una liberación controlada de un compuesto en el cuerpo. Dichas formas de dosificación pueden fabricarse disolviendo o dispensando el compuesto en el medio apropiado. También pueden usarse potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad puede controlarse proporcionando una membrana de control de la velocidad o dispersando el compuesto en una matriz polimérica o gel.

Además de los compuestos de la presente invención, también pueden emplearse sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención en composiciones para tratar o prevenir los trastornos identificados anteriormente.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" de un compuesto de la presente invención, tras la administración a un receptor, puede proporcionar, directa o indirectamente, un compuesto de la presente invención o un metabolito activo como inhibidor o residuo del mismo. Son sales particularmente preferidas las que aumentan la biodisponibilidad de los compuestos de la presente invención cuando dichos compuestos se administran a un paciente (por ejemplo, permitiendo que un compuesto administrado por vía oral se absorba más fácilmente en la sangre) o las que aumentan la liberación del compuesto parental en un compartimento biológico (por ejemplo, el cerebro o el sistema linfático) con respecto a la especie parental.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención incluyen, sin limitación, ésteres, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, sales metálicas y ésteres de sulfonato.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en estas composiciones farmacéuticas incluyen, pero sin limitación, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas del suero tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato potásico, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos tales como sulfato de protamina, fosfato ácido disódico, fosfato ácido potásico, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinil pirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliácridatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y lanolina.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse por vía oral, parenteral, por pulverización de inhalación, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un depósito implantado. El término "parenteral", como se usa en el presente documento, incluye, pero sin limitación, técnicas de infusión o inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. Preferentemente, las composiciones se administran por vía oral, intraperitoneal o intravenosa.

Las formas inyectables estériles de las composiciones de la presente invención pueden ser suspensiones acuosas u oleaginosas. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas en este campo usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico aceptable para la vía

parenteral, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite fijo insípido incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos tales como el ácido oleico y sus derivados de glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, como también lo son aceites farmacéuticamente aceptables naturales, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, tal como carboximetil celulosa o agentes dispersantes similares que se usan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables incluyendo emulsiones y suspensiones. También pueden usarse para los fines de formulación otros tensioactivos usados comúnmente, tales como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquidas u otras formas de dosificación farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por vía oral en cualquier forma de dosificación aceptable para la vía oral incluyendo, pero sin limitación, cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas. En el caso de los comprimidos para uso oral, los vehículos usados comúnmente incluyen, pero sin limitación, lactosa y almidón de maíz. Típicamente también se añaden agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para la administración oral en una forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se necesitan suspensiones acuosas para uso oral, el principio activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, también pueden añadirse ciertos agentes edulcorantes, saporíferos o colorantes.

Como alternativa, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse en forma de supositorios para administración rectal. Éstos pueden prepararse mezclando el agente con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a la temperatura ambiente pero líquido a la temperatura rectal y, por lo tanto, se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Dichos materiales incluyen, pero sin limitación, manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden administrarse tópicamente, especialmente cuando la diana del tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles por aplicación tópica, incluyendo enfermedades del ojo, la piel o el tracto intestinal inferior. Para cada una de estas áreas u órganos se preparan fácilmente formulaciones tópicas adecuadas.

La aplicación tópica para el tracto intestinal inferior puede realizarse en una formulación de supositorio rectal (véase anteriormente) o en una formulación de enema adecuada. También pueden usarse parches transdérmicos para la vía tópica.

Para aplicaciones tópicas, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en una pomada adecuada que contiene el componente activo suspendido o disuelto en uno o más vehículos. Los vehículos para administración tópica de los compuestos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno, compuesto de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Como alternativa, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en una loción o crema adecuada que contiene los componentes activos suspendidos o disueltos en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos adecuados incluyen, pero sin limitación, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

Para uso oftálmico, las composiciones farmacéuticas pueden formularse como suspensiones micronizadas en solución salina estéril isotónica con el pH ajustado o, preferentemente, como soluciones en solución salina estéril, isotónica, con el pH ajustado, con o sin un conservante tal como cloruro de bencilalconio. Como alternativa, para usos oftálmicos, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en una pomada tal como vaselina.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden administrarse por aerosol nasal o inhalación. Dichas composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en el campo de la formulación farmacéutica y pueden prepararse como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para aumentar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/u otros agentes de dispersión o solubilizantes convencionales.

La cantidad inhibidor de proteína quinasa que puede combinarse con los materiales de vehículo para producir una sola forma de dosificación variará dependiendo del huésped tratado y el modo particular de administración. Preferentemente, las composiciones deben formularse de forma que pueda administrarse una dosificación comprendida entre 0,01 y 100 mg/kg de peso corporal/día del inhibidor a un paciente que recibe estas composiciones.

También debe entenderse que una dosificación y régimen de tratamiento específico para cualquier paciente particular dependerá de una diversidad de factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, momento de administración, velocidad de excreción, combinación de

fármacos y el criterio del médico a cargo del tratamiento y la gravedad de la enfermedad particular a tratar. La cantidad de inhibidor también dependerá del compuesto particular en la composición.

De acuerdo con otra realización, la invención proporciona una de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente para su uso en el tratamiento o prevención de una afección mediada por proteína quinasa (en algunas realizaciones, una afección mediada por GSK-3) en un paciente. El término "paciente", como se usa en el presente documento, significa un animal, preferentemente un ser humano.

Preferentemente, ese uso es para tratar o prevenir una afección seleccionada entre cánceres tales como cánceres de mama, colon, próstata, piel, páncreas, cerebro, tracto genitourinario, sistema linfático, estómago, laringe y pulmón, incluyendo adenocarcinoma de pulmón y cáncer de pulmón de células pequeñas; ictus, diabetes, mieloma, hepatomegalia, cardiomegalia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (ME), lesión de la médula espinal, lesión traumática cerebral, Charcot-Marie-Tooth, leucocitopenia, neuropatía diabética, osteoporosis, fibrosis quística y enfermedad viral, o cualquier enfermedad específica descrita anteriormente.

Otro aspecto de la invención se refiere a la inhibición de la actividad proteína quinasa en un paciente, comprendiendo dicho uso administrar al paciente un compuesto de fórmula I o una composición que comprende dicho compuesto.

Dependiendo de las afecciones mediadas por proteína quinasa particulares a tratar o prevenir, junto con los inhibidores de la presente invención pueden administrarse fármacos adicionales que normalmente se administran para tratar o prevenir esa afección. Por ejemplo, pueden combinarse agentes quimioterapéuticos u otros agentes antiproliferativos con los inhibidores de proteína quinasa de la presente invención para tratar enfermedades proliferativas.

Estos agentes adicionales pueden administrarse por separado, como parte de un régimen de dosificación múltiple, del compuesto o composición que contiene el inhibidor de proteína quinasa. Como alternativa, estos agentes pueden ser parte de una sola forma de dosificación, al mezclarse con el inhibidor de proteína quinasa en una sola composición.

En algunas realizaciones, dicho inhibidor de proteína quinasa es un inhibidor de la quinasa GSK-3.

La presente invención también puede ser para usos distintos de los que implican la administración a un paciente.

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse, en general, por procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Estos compuestos pueden analizarse por procedimientos conocidos que incluyen, pero sin limitación, CLEM (cromatografía líquida/espectrometría de masas) y RMN (resonancia magnética nuclear). Los compuestos de la presente invención también pueden ensayarse de acuerdo con estos ejemplos. Debe entenderse que las condiciones específicas mostradas a continuación son sólo ejemplos y no pretenden limitar el alcance de las condiciones que pueden usarse para fabricar, analizar o ensayar los compuestos de la presente invención. En su lugar, la presente invención también incluye condiciones conocidas por los expertos en la materia para fabricar, analizar y ensayar los compuestos de la presente invención.

Ejemplos

Como se usa en el presente documento, el término "Tr (min)" se refiere tanto a tiempo de retención de HPLC como de LCMS, en minutos, asociado con el compuesto.

A menos que se indique otra cosa, el procedimiento de HPLC utilizado para obtener el tiempo de retención indicado es como se indica a continuación:

Columna: ACE C8, 4,6 x 150 mm

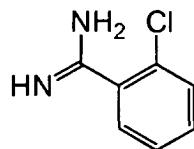
Gradiente: acetonitrilo al 0-100% + metanol 60:40 (Tris fosfato 20 mM)

Caudal: 1,5 ml/minuto

Detección: 225 nm.

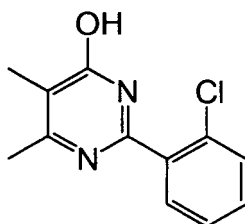
Se analizaron muestras de CLEM (Cromatografía líquida, espectrometría de masas) en un espectrómetro de masas MicroMass Quattro Micro que funcionaba en modo MS sencillo con ionización por electronebulización. Las muestras se introdujeron en el espectrómetro de masas usando cromatografía. Fase móvil para todos los análisis de espec. de masas. consistió en mezclas de acetonitrilo-agua con ácido fórmico al 0,2% o TFA al 0,1% como modificador. Las condiciones de gradiente en la columna son acetonitrilo al 10%-90% durante un tiempo de gradiente de 3 min y un tiempo de operación de 5 min en una columna Waters YMC Pro-C18 4, 6 x 50mm. Caudal fue 1,5 ml/min.

Los espectros de RMN ¹H se registraron a 400 MHz usando un instrumento Bruker DPX 400. Los siguientes compuestos de fórmula I se prepararon y se analizaron como se indica a continuación.

Intermedio 1**2-clorobenzoimidamida**

5 Se añadió 2-clorobenzonitrilo (26,84 g, 195 mmol) en 6 porciones durante 25 min a una solución agitada de LHMDs (1 M en THF, 400 ml, 400 mmol) en éter (400 ml) con refrigeración con hielo-agua, en una atmósfera de nitrógeno. Después de 5 min, el baño de refrigeración se retiró y se continuó agitando durante una noche. Después de la indicación de que la reacción se había completado (supervisado por CLEM), se añadió cuidadosamente HCl acuoso (3 M, 400 ml) con refrigeración en un baño de hielo, seguido de éter (600 ml) y agua (600 ml). Después, se realizó una extracción. La fase orgánica se extrajo de nuevo con HCl ac. (400 ml). Las fases acuosas combinadas se basificaron cuidadosamente con NaOH sólido a pH 14 y después se extrajo con DCM (x 3). Después, la fase orgánica se secó (K₂CO₃), se filtró y se concentró al vacío, dando la amidina en forma de un sólido de color blanco (26,93 g, 89,3%).

RMN ¹H (DMSO) 6,34 (3H, s), 7,32-7,40 (3H, m), 7,46 (1H, dd).

Intermedio 2

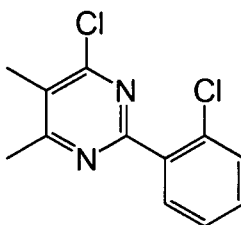
15

2-(2-clorofenil)-5,6-dimetilpirimidin-4-ol

A 2-clorobenzoimidamida (34,07 g, 220 mmol) y trietilamina (44,50 g, 440 mmol) en etanol (750 ml) se les añadió 2-metil-3-oxobutanoato de etilo (38,13 g, 264 mmol). La reacción se calentó a 90 °C durante 4 h. Se añadió una porción adicional (6,36 g) del éster y la reacción se agitó durante 3 h. La reacción se concentró a aproximadamente 500 ml y se dejó reposar durante una noche. Sucedió la precipitación del pirimidinol deseado (22,7 g). Las aguas madre se concentraron y se añadieron DCM y HCl 1 M. La fase acuosa se extrajo 7 veces con DCM para dar cultivos adicionales del producto deseado (total: 28,9 g, 56%) en concentración en forma de un sólido de color blanco.

20

RMN ¹H (DMSO) 1,97 (3H, s), 2,26 (3H, s), 7,44-7,47 (1H, m), 7,51-7,59 (3H, m), 12,70 (1H, s a).

25 Intermedio 3**4-cloro-2-(2-clorofenil)-5,6-dimetilpirimidina**

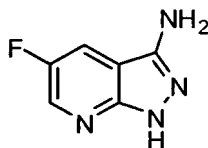
La siguiente reacción se dividió en dos y se cargó de forma simultánea en dos recipientes de reacción idénticos:

30 Se añadió cuidadosamente POCl₃ (50 ml) al pirimidinol (14,45 g, 61,6 mmol), la reacción se agitó durante 5 min. Después, se añadió una porción adicional de f POCl₃ (100 ml) y la reacción se calentó a 105 °C. Después de 1 h a esta temperatura, la reacción se concentró. Se añadió hielo y los desarrollos de las reacciones por duplicado se combinaron con la ayuda de DCM. La fase orgánica se lavó con salmuera y agua, se secó (MgSO₄), se filtró y se

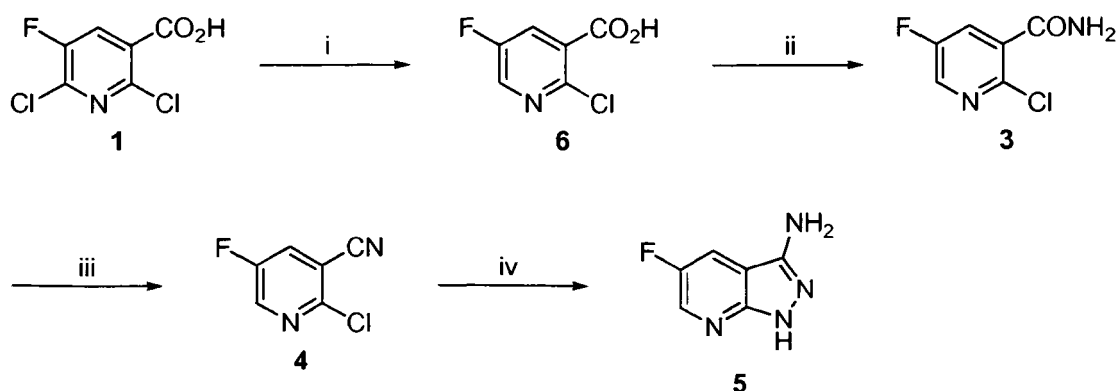
concentró al vacío para dar la cloropirimidina (31,14 g, 99,8%) en forma de un aceite incoloro.

RMN ^1H (CDCl_3) 2,45 (3H, s), 2,65 (3H, s), 7,36-7,39 (2H, m), 7,49-7,51 (1H, m), 7,71-7,73 (1H, m).

Intermedio 4



- 5 Esquema sintético general para la síntesis de 5-fluoro-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-3-amina **5** se representa a continuación.



Reactivos y condiciones: i. $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, PPh_3 , Et_3N , H_2CO_2 ; ii. 1) $(\text{COCl})_2$, CH_2Cl_2 , cat. DMF; 2) NH_3 (g), dioxano, iii. TFAA, Et_3N , CH_2Cl_2 , 0°C ; iv. $\text{H}_2\text{NNH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, n-butanol, reflujo

10 Ácido 2-cloro-5-fluoronicotínico (6)

En un matraz de fondo redondo en una atmósfera de N_2 , se añadieron DMF desgasificada (270 ml), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,05 equiv., 2,7 g, 11,9 mmol), PPh_3 (0,1 equiv., 6,2 g, 23,8 mmol) y Et_3N desgasificado (6 equiv., 200 ml, 1428,6 mmol). La mezcla se agitó durante 20 minutos, después se añadió HCOOH (3 equiv., 28 ml, 714,3 mmol). 5 minutos después, se añadió ácido 2,6-dicloro-5-fluoronicotínico (50 g, 238,1 mmol). La mezcla se agitó a 50°C .

- 15 La reacción se siguió de análisis (RMN ^1H) de una alícuota tratada. Cuando todo el material de partida se consumió (24 h), la mezcla se enfrió a 0°C y se añadió agua (500 ml). Después de 20 minutos, la mezcla se filtró a través de una capa de Celite que se aclaró con agua. La mezcla se basificó a pH 9 con NaOH ac. al 30% y se lavó con EtOAc (2 x). Se añadió lentamente HCl (12 N) a pH 1 y la solución se saturó con NaCl . La mezcla se extrajo con EtOAc (3 x). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron a presión reducida, dando 37 g (88%) de un sólido de color beige, usado en la siguiente etapa sin purificación adicional. RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ 8,16 (dd, 1H); 8,58 (d, 1H).

2-Cloro-5-fluoronicotinamida (3)

- 25 A una solución de ácido 2-cloro-5-fluoronicotínico **6** (50 g, 285 mmol) y DMF (2 ml, 28 mmol) en DCM (400 ml) a 0°C se le añadió gota a gota cloruro de oxalilo (64 ml, 741 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche y se concentró al vacío. El líquido de color amarillo resultante se disolvió en 1,4-dioxano (600 ml), se enfrió a 0°C y se burbujó NH_3 (g) a través de la solución durante 30 minutos. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla resultante se filtró y el filtrado se concentró, dando el compuesto **3** (44 g, 89%) en forma de un sólido de color beige. RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ 7,84 (s, 1H), 7,96 (dd, 1H), 8,09 (s, 1H), 8,49 (d, 1H).

30 2-Cloro-5-fluoronicotinonitrilo (4)

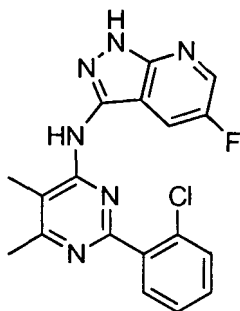
Una suspensión del compuesto **3** en bruto (65 g, 372,4 mmol) y Et_3N (114 ml, 819,2 mmol) en DCM (700 ml) se enfrió a 0°C y se añadió gota a gota TFAA (57 ml, 409,6 mmol). La solución de color amarillo resultante se agitó durante 90 minutos a 0°C , se diluyó con DCM, se lavó con NaHCO_3 ac. sat. y salmuera, y se secó (Na_2SO_4). La

mezcla se filtró y se concentró. La destilación Kugel Rohr del residuo (~ 70 °C/1 mbar) dio 50 g (86%) del compuesto 4 en forma de un sólido de color beige. El compuesto 4 también puede purificarse por cromatografía en columna (SiO₂ 8:1 heptano: EtOAc). RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 7,78 (dd, 1H) ; 8,49 (d, 1H).

5-Fluoro-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-3-amina (5)

- 5 A una solución del compuesto 4 (50 g, 321,7 mmol) en 1-butanol (1 l) se le añadió hidrazina monohidrato (150 ml, 3,2 mol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 4 h. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El precipitado se lavó sucesivamente en el filtro con agua (2 x) y Et₂O (2 x), y se secó al vacío durante una noche, dando el compuesto 5 (44 g, 88%) en forma de un sólido de color amarillo. RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) : 8 5,53 (s, 2H); 7,94 (dd, 1H); 8,35 (dd, 1H); 12,02 (s, 1H).

10 Ejemplo 1 (I-1)



N-(2-(2-clorofenil)-5,6-dimetilpirimidin-4-il)-5-fluoro-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-3-amina

- 15 Una mezcla de 4-cloro-2-(2-clorofenil)-5,6-dimetilpirimidina (31,14 g, 123 mmol) y 5-fluoro-1H-pirazolo [3,4-b]piridin-3-amina (19,65 g, 129 mmol) en NMP (200 ml) se calentó a 135 °C durante 3 h 30 min. Después, la mezcla se concentró al vacío a aproximadamente 100 ml. Después, se añadió NaHCO₃ ac.sat, agua y EtOAc pero apareció un precipitado en la fase orgánica. La totalidad de esta mezcla se retiró por filtración y el residuo se lavó con NaHCO₃ ac.sat, agua, EtOAc y éter. Se añadió etanol en ebullición al residuo con agitación y el compuesto diana puro se filtró. Los licores se concentraron y este procedimiento de trituración se repitió 4 veces, dando el compuesto diana (25 g,55%) en forma de un sólido de color blanco.

- 20 RMN ¹H (DMSO) 2,28 (3H, s), 2,43 (3H, s), 7,28-7,37 (2H, m), 7,40-7,46 (2H, m), 7,93 (1H, dd), 8,49 (1H, s), 9,28 (1H, s a), 13,39 (1H, s a).

El compuesto I-2 se fabricó de una manera similar al procedimiento descrito para la fabricación del compuesto I-1. La Tabla 2 posterior describe los datos analíticos asociados con los compuestos que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

I-1	I-2

Tabla 2

Nº de Comp.	M+1 (obser.)	Tr de CLEM (min)	RMN
I-1	369,3	1,8	DMSO d6: 2,28 (3H, s), 2,43 (3H, s), 7,28-7,37 (2H, m), 7,40-7,46 (2H, m), 7,93 (1H, dd), 8,49 (1H, s), 9,28 (1H, s a), 13,39 (1H, s a).
I-2	383,1	1,83	DMSO d6: 1,23(t, 3H), 2,53(s, 3H), 2,85(c, 2H), 7,40(dd, 1H), 7,45(dd, 1H), 7,48(dd, 1H), 7,56(d, 1H), 7,96(dd, 1H), 8,51(s, 1H)

Ejemplo 2: Ensayo de inhibición de GSK-3:

Se exploraron compuestos de la presente invención con respecto a su capacidad de inhibir la actividad de la GSK-3 β (AA 1-420) usando un sistema enzimático acoplado convencional (Fox y col., Protein Sci. 1998, 7, 2249). Las reacciones se realizaron en una solución que contenía HEPES 100 mM (pH 7,5), MgCl₂ 10 mM, NaCl 25 mM, NADH 300 μ M, DTT 1 mM y DMSO al 1,5%. Las concentraciones finales de sustrato en el ensayo fueron ATP 20 μ M (Sigma Chemicals, St Louis, MO) y péptido 300 μ M (American Peptide, Sunnyvale, CA). Las reacciones se realizaron a 30 °C y GSK-3 β 20 nM. Las concentraciones finales de los componentes del sistema enzimático acoplado fueron fosfoenolpiruvato 2,5 mM, NADH 300 μ M, 30 μ g/ml de piruvato quinasa y 10 μ g/ml de lactato deshidrogenasa.

Se preparó una solución tampón de reserva de ensayo que contenía los todos los reactivos indicados anteriormente con la excepción de ATP y el compuesto de ensayo de la presente invención. La solución de tampón de reserva de ensayo (175 μ l) se incubó en una placa de 96 pocillos con 5 μ l del compuesto de ensayo de la presente invención a concentraciones finales que abarcaban de 0,002 μ M a 30 μ M a 30 °C durante 10 min. Típicamente, se realizó una titulación de 12 puntos preparando diluciones en serie (a partir de soluciones de reserva de compuesto 10 mM) con DMSO de los compuestos de ensayo de la presente invención en placas hijas. La reacción se inició por la adición de 20 μ l de ATP (concentración final 20 μ M). Las velocidades de reacción se obtuvieron usando un lector de placas Molecular Devices Spectramax (Sunnyvale, CA) durante 10 min a 30 °C. Los valores de K_i se determinaron a partir de los datos de velocidad como una función de la concentración de inhibidor. Se descubrió que los compuestos de la invención inhibían la GSK-3.

Se descubrió que los compuestos I-1 y I-2 inhibían la GSK-3 a un valor de K_i < 5 nM.

Ejemplo 3: Ensayo de inhibición de GSK-3 α y GSK3 β p-TYR

Los compuestos se exploraron con respecto a su capacidad para inhibir la fosforilación de restos de tirosina (TYR) mediante el uso de transferencia de western de células Jurkat a las que se habían administrado los compuestos. La fosforilación de los restos de TYR específicos ensayados son GSK3 α TYR 279 y GSK3 β TYR 216.

Preparación de células y lisados

Se siembran células Jurkat a una densidad de 2x10⁵ células/pocillo en una placa de 12 pocillos en medio de privación de nutrientes (RPMI+1-FBS+P/S). Después de la privación de nutrientes durante 16 horas, se dosifica el compuesto en cada pocillo a una concentración final de DMSO de 0,3 y las células se incuban durante una noche a 37 °C con un 5% de CO₂. Al día siguiente, las células se centrifugan a 1500 rpm, se lavan con PBS y se lisan en 100 μ l de tampón de muestra de Laemli con β -mercaptoetanol.

Protocolo de transferencia de Western

Se cargan 15 microlitros (μ l) de lisados celulares en gel de tris-glicina al 10% y se procesan a 120 v durante 2 horas o hasta que el frente de colorante desaparece del gel. La proteína después se transfiere a una membrana de PVDF a 100 v durante 60 min. Después se prepara PBST (PBS que contiene Tween 20 0,1, tal como 1 ml de Tween por 1 l de PBS) y se usa para todos los lavados e incubaciones con anticuerpo. La transferencia se bloquea en PBST con leche desnatada al 5% durante una hora.

Después se añade el anticuerpo primario (GSK-3 α / β pTYR 279/216 a una dilución 1:1000, Upstate, nº de cat 05-413) en PBST con leche desnatada al 5% durante una noche a 4 °C con agitación suave. La mancha de transferencia después se lava en PBST durante 5 min. Esto después se repite 4 veces. Se añade un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP (dilución 1:5000) durante 60 min en PBST con leche al 5%. La mancha de transferencia después se lava en PBST durante 5 min. Esto también se repite 4 veces. Se preparan 3,0 ml de la solución de revelado (ECL más Sistema de Detección de Transferencia de Western de Amersham/GE, nº de cat RPN2132) y después se añaden. La solución se remueve sobre la mancha de transferencia durante ~30 s. Después se revela la mancha de transferencia usando la película de rayos X azul transparente CL-Xposure. El nivel de expresión de GAPDH se usa como control de carga (anticuerpo GAPDH: santa cruz 25-778) a una dilución de

1:10000.

Para la determinación del valor de CI50 de GSK-3 α y GSK-3 β pTYR se compara la densidad de las bandas respectivas para cada proteína a la concentración de compuesto específica con una muestra de células de control tratadas con DMSO sin compuesto presente en cada exposición. Los valores de CI50 se definen como la concentración de compuesto en la que la densidad de la banda de GSK-3 α o GSK-3 β es un 50% del control sin compuesto.

Ejemplo 4: Protocolo de estabilización de β -catenina

La fosforilación por GSK-3 de la β -catenina la dirige al proteosoma para su degradación. La inhibición de la GSK-3 da como resultado una acumulación de β -catenina en el citosol de las células que, mediante la interacción con el factor de transcripción TCF/LEF, se transloca al núcleo y dirige la transcripción de genes dependientes de Wnt. El ensayo está diseñado para determinar el nivel de β -catenina dependiente de la actividad transcripcional de TCF/LEF de una manera cuantitativa mediante el uso de un ensayo indicador de β -lactamasa en células Jurkat a las que se ha administrado un compuesto.

Se dejan en condiciones de privación de nutrientes células Jurkat β -catenina durante una noche en un medio de ensayo (FBS al 1%, Penstrep 1x, RPMI) en el matraz. Al día siguiente, las células Jurkat β -catenina se siembran en placas de fondo plano de 96 pocillos a una densidad de 50.000 células/pocillo en medio de ensayo en un volumen de 100 μ l. El compuesto se añade al pocillo a una concentración final de DMSO del 0,75% y se incuba a 37 °C durante una noche. Al día siguiente, se añaden 20 μ l de colorante CCF4 6x a los pocillos y se incuban a temperatura ambiente durante 1-2 horas. Las placas se leen en el lector de placas de multipocillo de la serie Cytofluor 4000 y se determina la relación 460/530. El valor de CI50 de GSK-3 para la inducción de la β -catenina se determina representando la relación 460/530 frente a la concentración de compuesto (escala logarítmica) y usando la ecuación de la pendiente para calcular el punto en el que la relación es un 50% del efecto máximo.

Las ventanas de β -catenina:GSK-3 se calcularon dividiendo el valor de CI50 de β -catenina obtenido en el Ejemplo 4 por el valor de CI50 de GSK-3 α o GSK3 β p-TYR obtenido en el Ejemplo 3.

Se descubrió que los compuestos I-1 e I-2 tenían una ventana de β -catenina:GSK-3 α de entre 400 y 500 veces. Se observó que el compuesto I-1 tenía una ventana de β -catenina:GSK-3 β de entre 75 y 100 veces y se observó que el compuesto 2 tenía una ventana de β -catenina:GSK-3 β de entre 25 y 50 veces.

La Tabla 3 muestra los datos de CI50 de GSK-3 α p-TYR, GSK-3 β pTYR y β -catenina para compuestos seleccionados del Tabla 1.

Tabla 3

Compuesto Número	GSK3a pTYR 279: CI50: (uM)	GSK3b pTYR 216: CI50: (uM)	Beta Catenina CI50: (uM)
I-1	< 0,0005	0,003	0,23
I-2	0,002	0,03	0,94

Ejemplo 5: Colección de fracciones citoplásmicas de tejidos

El tampón de Lisis Hipotónico consiste en HEPES 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 1,0 mM, DTT 1,0 mM, cóctel inhibidor de proteasa de Roche 1x y cóctel inhibidor de proteasa de AEBSF Calbiochem 1,0 mM (nº de cat 539134). Todas las concentraciones son finales y se diluyen en agua.

En primer lugar, se añade tampón de lisis hipotónico al tejido a 5 veces el peso. El tejido después se rompe en hielo usando el extremo del émbolo de una jeringa. A continuación, las muestras se descongelan cinco veces. Después, los lisados se transfieren a tubos de ultracentrífuga y se centrifugan a 100.000 g durante 35 min a 4 °C. Después se recogen los sobrenadantes y se toma una alícuota para medir la proteína con el kit de ensayo de proteínas de Pierce BCA (nº de cat 23225), usando una curva patrón de BSA. Los lisados de proteína restantes se diluyen 1:1 con tampón de muestra de Laemmli que contiene β -mercaptoetanol. Después se normaliza la concentración de proteína. Las muestras se hierven durante 5 min a 95 °C seguido de una centrifugación a 14.000 rpm en una minicentrífuga durante 1 min. Las muestras después se congelan inmediatamente con hielo seco y se almacenan a -20 °C.

Protocolo de Western

Las muestras primero se cargan en gel de Tris-glicina al 10% (10 μ l/pocillo). El gel después se procesa a 120 V hasta que el marcador del colorante desaparece del gel. La membrana de PVDF se corta y se empapa en metanol durante 5 min antes del uso. La proteína después se transfiere a una membrana de PVDF a 100 V durante 75 min

(el equipo de transferencia se mantiene en hielo). La membrana después se bloquea con leche desnatada en polvo al 5% disuelta en PBS, Tween 20 al 0,1% durante 1 h a TA (temperatura ambiente). Se añade un anticuerpo primario (anticuerpo policlonal de conejo anti- β -catenina humana, SC-7199, Santa Cruz) a una dilución de 1:2000 en tampón de bloqueo. Opcionalmente, se puede realizar un control de carga de Beta tubulina (SC-9104) a 1:2000 en la misma mancha de transferencia. Esto después se incuba durante una noche a 4 °C.

Le membrana se lava 4 veces durante 5 min cada vez con PBS, Tween al 0,1%. Después se añade anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con HRP (dilución 1:5000 en tampón de bloqueo). La membrana se lava 4 veces durante 5 min cada vez con PBS, Tween al 0,1%. A continuación, se añade el reactivo ECL (Pierce). Finalmente, la película se expone. La inducción de β -catenina se determina por comparación de la densidad de la banda de proteína en muestras obtenidas a partir de animales tratados con compuesto con la de animales tratados con vehículo.

Ejemplo 6: Aislamiento de proteínas de tejidos para transferencia de Western de pTYR

RIPA consiste en 0,5 ml de SDS al 10%, 2,5 ml de Desoxicolato Sódico al 10%, 0,5 ml de NP40 y 46,5 ml de PBS. El tampón de Lisis consiste en 8,3 ml de RIPA, 1,0 ml de β -glicerolfosfato (500 mM), 0,1 ml de NaF (500 mM), 0,1 ml de Vanadato Sódico (200 mM), 0,4 ml de inhibidor de proteasa (comprimidos de cóctel de inhibidor de proteasa de Roche: disolver 1 comprimido en 2 ml de agua para obtener una solución de reserva 25x. N° de cat 11873580001) y 0,1 ml de PBS.

Se añaden 10 ml de tampón de lisis (RIPA modificado) al tejido (1 ml/1/2 cerebro) y se homogeneiza en hielo. Los lisados después se centrifugan a 10000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante después se transfiere a un nuevo tubo y se mantiene en hielo. Las muestras de sobrenadante se vuelven a centrifugar a 10000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante después se transfiere a un nuevo tubo y se mantiene en hielo. Se toma una alícuota del sobrenadante y la proteína se mide con el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (n° de cat 23225) usando curva patrón de BSA (hacer una dilución de 1:25 en PBS).

El sobrenadante restante se diluye a 1 μ g/ μ l con tampón de Muestra Biorad Laemmli (n° de cat 161-0737) con β -mercaptoetanol añadido. Las muestras se hierven durante 5 min a 95 °C y se centrifugan en una microcentrífuga durante 1 minuto. Las muestras se congelan inmediatamente en hielo seco y se almacenan a -20 °C. Después se cargan 10 μ g de proteína/calle (10 μ l) y la transferencia de Western se realiza de acuerdo con el Ejemplo 3. La inhibición de GSK-3 α/β pTYR se determina comparando la densidad de la banda de proteína en las muestras obtenidas a partir de animales tratados con compuesto con la de muestras de animales tratados con vehículo.

Ejemplo 7: Ensayo de ramificación axonal

Los compuestos se ensayan con respecto a la capacidad de aumentar la ramificación axonal en neuronas corticales o de hipocampo de rata E16.

Día 1:

Preparación de Placas de Células

Una solución de reserva de 1 mg/ml de PDL se diluye en 100 μ g/ml en agua DI. Los cubreobjetos de vidrio se recubren durante al menos 1 hora a 37 °C antes de realizar la disección. Se aspira el PDL y las placas se aclaran con PBS y se secan al aire en una campana.

Disociación de células corticales de rata E-16

Se combinan lóbulos corticales o de hipocampo con 9 ml de **medio Base** (Neurobasal + Pen/Estrep) y se ponen en hielo. Se añade 1 ml de solución de tripsina 10X y la mezcla se remueve suavemente. El tejido después se digiere por incubación en un baño de agua a 37 °C durante 20 minutos. Después de 20 minutos, se añaden 10 μ l/ml de DNasa (100 μ l de DNasa) y la mezcla se incuba durante otros 5 minutos.

Las células se centrifugan a 1000 rpm durante 1 minuto. La solución enzimática después se retira sin retirar ninguno de los fragmentos cerebrales depositados en el fondo. El sólido se lava 3 veces con **medio de lavado** (Neurobasal + 10% y Pen/Estrep). Después del 3^{er} lavado, las células se resuspenden en 5 ml de **Medio de Cultivo** (Neurobasal + B27 + L-Glutamina y Pen/Estrep). La disociación mecánica se realiza pipeteando suavemente varias veces a través de una pipeta de vidrio estrechada a la llama, teniendo cuidado de no formar burbujas. Después, las células se filtran a través de un filtro celular de 70 μ m. Las células se cuentan en un hemocitómetro y se siembran a 5000-10000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos con insertos de cubreobjetos de vidrio revestidos con PDL. Las células se incuban a 37 °C durante una noche.

Día 2: Mantenimiento de las células

Al día siguiente, se cambia la mitad del medio por **Medio de Cultivo** limpio que contiene ácido retinoico (AR). Los compuestos se añaden a la concentración deseada a una concentración final de DMSO del 0,3%. La mitad del

medio se cambia y se añade compuesto nuevo cada 3 días. Las células se incuban con compuestos durante 6 días en cultivo.

Día 7: *Fijación y tinción*

Materiales:

- 5 1. Solución salina tamponada con fosfato (PBS)- Gibco 14190-144
2. Tampón de lavado = PBS-T
 - PBS
 - Tween-20 al 0,1% (Bio Rad, 170-6531)
3. Tampón de bloqueo = PBS-T + suero normal de burro al 5% o HBSS-T + suero normal de burro al 5%
 - 10 ■ 10 ml de PBS
 - Tween-20 al 0,1% (Bio Rad, 170-6531)
 - 0,5 ml de suero normal de burro (Jackson Immuno, nº 017-000-121)
4. Gel Mount Citi-Fluortm (Ted Pella AF-1)
5. Anticuerpo de neurofilamento 1:250 Abcam, anticuerpo MAP2 1:250 Abcam
- 15 6. Anticuerpo secundario 1:500 para Alexa 488 anti-conejo (neurofilamento) y Alexa 568 anti-ratón (MAP2)

Procedimientos

Las células se lavan dos veces con PBS si el medio contiene suero. No se necesita lavado si las células se cultivan en medio sin suero.

Fijación

- 20 Primero se retira el medio o PBS. Después, se añaden 500 ul de HistoChoice para cubrir las células. Las células se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después se lavan 2 veces con PBS, con una incubación de 5 minutos después de cada lavado. Las cantidades se muestran a continuación:
 - 100 ul de PBS por pocillo en formato de 96 pocillos
 - 200 ul de PBS por pocillo en formato de 48 pocillos
 - 25 ■ 400 ul de PBS por pocillo en formato de 24 pocillos

- 30 Las células se incuban con tampón de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente. El tejido después se incubaba con tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se diluyen en PBS + Tween al 0,1% + suero de burro al 5%. Se retira la solución de bloqueo y se añade suficiente volumen de anticuerpo primario en tampón de bloqueo para cubrir las células. El anticuerpo primario se incubaba a 4 °C durante una noche. Al día siguiente, se retira el anticuerpo primario y los cubreobjetos se lavan dos veces con PBS-T con una incubación de 5 minutos entre cada lavado. El PBS-T se retira y se añade el tampón de bloqueo. Las células se incuban durante 30 minutos.

- 35 El anticuerpo secundario se diluye en PBS + Tween al 0,1% + suero de burro al 5%. La mezcla se incubaba durante 30 min a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavan tres veces con PBS-T y una vez con PBS. Se añade medio de montaje para reducir la inactivación de los fluorocromos. Los cubreobjetos de vidrio se retiran y se ponen en un portaobjetos para la visualización.

Análisis

- 40 Las imágenes se capturan a 10x y 20x en un microscopio vertical y la ramificación axonal se determina por la cuantificación del área bajo el umbral de fluorescencia de Alexa 488 de neurofilamento por célula. La ramificación dendrítica se determina por cuantificación del área bajo el umbral de fluorescencia de MAP2 Alexa 568 por célula. Como alternativa, la ramificación puede determinarse por recuento manual de puntos de ramificación por célula. Los efectos del compuesto se evalúan comparando el área bajo el umbral de fluorescencia en los cultivos tratados con compuesto con la de un control de DMSO en el mismo punto de tiempo. El tratamiento de neuronas de hipocampo de E16 con una concentración 10 nM de Compuesto I-1 durante 7 días dio como resultado un aumento de la ramificación axonal y dendrítica. Cuando se trataron neuronas del hipocampo de E16 a concentraciones que habían mostrado inducir la β -catenina, el crecimiento de los axones se inhibió, confirmando adicionalmente un papel
- 45

terapéutico para la ventana entre GSK-3 α/β pTYR y β -catenina.

Ejemplo 8: ensayo de fosforilación de CRMP2

La fosforilación de GSK-3 regula CRMP2, que está implicada en el control del crecimiento y la ramificación de los axones (Yoshimura y col. 2005 Cell, Kim y col. 2006 Neuron). La fosforilación de CRMP2 por GSK-3 reduce la unión de CRMP2 a microtúbulos y, de esta forma, reduce el alargamiento y la ramificación de los axones. Por el contrario, la inhibición de GSK-3, especialmente a niveles que afectan selectivamente a la autofosforilación del resto TYR, aumenta estos fenotipos. Los compuestos se ensayan en neuronas corticales o de hipocampo de rata E16 para determinar la capacidad de aumentar el nivel de la ramificación axonal.

Día 1:

Preparación de placas de células

Una solución de reserva de 1 mg/ml de PDL se diluye en 100 μ g/ml de agua DI. Los cubreobjetos de vidrio se revisten durante al menos 1 hora a 37 °C antes de realizar la disección. Se aspira el PDL y las placas se aclaran con PBS y se secan al aire en una campana.

Disociación de células corticales de rata E-16

Se combinan lóbulos corticales o de hipocampo con 9 ml de **medio Base** (Neurobasal + Pen/Estrep) y se ponen en hielo. Se añade 1 ml de solución de tripsina 10X y la mezcla se remueve suavemente. El tejido después se digiere por incubación en un baño de agua a 37 °C durante 20 minutos. Después de 20 minutos, se añaden 10 μ l/ml de DNasa (100 μ l de DNasa) y la mezcla se incuba durante otros 5 minutos.

Las células se centrifugan a 1000 rpm durante 1 minuto. La solución enzimática después se retira sin retirar ninguno de los fragmentos cerebrales depositados en el fondo. El sólido se lava 3 veces con **medio de lavado** (Neurobasal + 10% y Pen/Estrep). Después del 3^{er} lavado, las células se resuspenden en 5 ml de **Medio de Cultivo** (Neurobasal + B27 + L-Glutamina y Pen/Estrep). La disociación mecánica se realiza pipeteando suavemente varias veces a través de una pipeta de vidrio estrechada a la llama, teniendo cuidado de no formar burbujas. Después, las células se filtran a través de un filtro celular de 70 μ m. Las células se cuentan en un hemocitómetro y se siembran a 50.000 células/pocillo en una placa de 12 pocillos. Las células se incuban a 37 °C durante una noche.

Día 2: Mantenimiento de las células

Al día siguiente, se cambia la mitad del medio por **Medio de Cultivo** limpio que contiene ácido retinoico (AR). Los compuestos se añaden a la concentración deseada a una concentración final de DMSO del 0,3%. La mitad del medio se cambia y se añade compuesto nuevo cada 3 días. Las células se incuban con compuestos durante 6 días en cultivo.

Día 7: Colección de lisados y transferencia de Western

Los cultivos se lavan con PBS y se lisan directamente en 100 μ l de tampón de muestra de Laemli con β -mercaptoetanol añadido.

Protocolo de transferencia de Western

Se cargan 7 microlitros (μ l) de lisados celulares en gel de tris-glicina al 10% y se procesan a 120 v durante 2 horas o hasta que el frente de colorante desaparece del gel. La proteína después se transfiere a una membrana de PVDF a 100 v durante 60 min. Después se prepara PBST (PBS que contiene Tween 20 al 0,1%, tal como 1 ml de Tween por 1 l de PBS) y se usa para todos los lavados e incubaciones con anticuerpo. La transferencia se bloquea en PBST con leche desnatada al 5% durante una hora.

Después se añade el anticuerpo primario (anticuerpo policlonal de conejo CRMP2 279/216 1:10.000, Abcam, nº Ab36201) en PBST con leche desnatada al 5% durante una noche a 4 °C con agitación suave. La mancha de transferencia después se lava en PBST durante 5 min. Esto después se repite 4 veces. Se añade un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP (dilución 1:5000) durante 60 min en PBST con leche al 5%. La mancha de transferencia después se lava en PBST durante 5 min. Esto también se repite 4 veces.

Se preparan 3,0 ml de la solución de revelado (ECL más Sistema de Detección de Transferencia de Western de Amersham/GE, nº de cat RPN2132) y después se añaden. La solución se remueve sobre la mancha de transferencia durante ~30 s. Después se revela la mancha de transferencia usando la película de rayos X azul transparente CL-Xposure. El nivel de expresión de GAPDH se usa como control de carga (anticuerpo GAPDH: santa cruz 25-778) a una dilución de 1:10000. El anticuerpo CRMP2 detecta tanto la forma no fosforilada de CRMP2 como la forma fosforilada de CRMP2 (T514) que es el resto fosforilado por GSK-3 (Kim y col. 2006 Neuron). El valor de CI50 de los compuestos para pCRMP2 se define como la concentración de compuesto en la que la densidad de la banda de pCRMP2 superdesplazada es el 50% del control sin compuesto.

Resultados

La inhibición de la fosforilación por GSK-3 del sustrato CRMP-2 se correlacionaba con la inhibición de GSK-3 pTYR en neuronas de hipocampo de E-16 tratadas con durante 7 días con compuesto I-1. El axón en crecimiento está enriquecido en CRMP-2, y CRMP-2 no fosforilada se une a microtúbulos y promueve la ramificación axonal.

5 Ejemplo 9: Modelo *in vitro* de angiogénesis usando HUVEC y fibroblastos de piel

Los compuestos se exploran con respecto a la capacidad de aumentar la angiogénesis en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). Este procedimiento, adaptado a partir de Nakatsu y col. Microvas. Res. 2003, describe un protocolo que recapitula los acontecimientos principales esenciales para el nuevo crecimiento de vasos: formación de brotes, migración celular, proliferación celular, formación de lumen, ramificación y anastomosis.

10 Protocolo:

Se usan HUVEC entre P3 y P4. Las HUVEC se mezclan con 3 microsoportes cytodex revestidos con dextrano (Amserham Pharmacia) a una concentración de 400 HUVEC por perla en 1 ml de medio EGM-2 (FBS al 2%) (Clonetics). Las perlas con células después se agitan suavemente cada 20 min durante 4 h a 37 °C y con un 5% de CO₂. Después de la incubación, las perlas con las células se transfieren a un matraz de cultivo de tejidos T-25 y se dejan durante 12-16 h en 5 ml de EGM-2 a 37 °C con 5% de CO₂.

Al día siguiente, las perlas con células se lavan tres veces con EGM-2 y se resuspenden a una concentración de 200 perlas recubiertas con células/ml en 2,5 mg/ml de fibrinógeno (Sigma) con 0,15 U/ml de aprotinina (Sigma) a un pH de 7,4.

Después se añaden 500 ul de solución de fibrinógeno/perlas a 0,625 U de trombina (Sigma) en un pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos. Se deja coagular la solución de Fibrinógeno/Perlas durante 5 min a temperatura ambiente y después a 37 °C con un 5% de CO₂ durante 20 min. Después se añade 1 ml de EGM-2 con 0,15 U/ml de aprotinina a cada pocillo y se equilibra con el coágulo de fibrina durante 30 min a 37 °C y con un 5% de CO₂.

A continuación, se retira el medio del pocillo y se reemplaza por 1 ml de medio limpio. Se cultivan 20.000 fibroblastos de piel (SF ATCC Detroit 551) en la parte superior del coágulo y el medio se cambia un día sí y otro no.

Para los estudios de inhibición por el compuesto, se realiza una dosis-respuesta de 6 puntos (concentración superior 1 uM, diluciones 1:3) en la que el compuesto se añade al coágulo después del equilibrio.

La angiogénesis se evalúa por cuantificación de las imágenes capturadas en un microscopio invertido a 10 y 20 aumentos para la longitud de los vasos, el número de vasos y ramificaciones por perla usando el software NIH Image J. Opcionalmente, antes del ensayo, las HUVEC pueden transducirse por centrifugación con un vector retroviral que expresa proteína fluorescente amarilla (YFP) bajo el control de un promotor TK mínimo constitutivamente activo, y clasificarse con respecto a la expresión de YFP para mejorar la visualización. Las HUVEC positivas para YFP después se cultivan como se ha descrito anteriormente y la cuantificación de la formación de vasos se determina calculando el área bajo el umbral de fluorescencia usando el software NIH Image J. En ambos casos, se determina un aumento de la angiogénesis comparando los cultivos tratados con compuesto con un cultivo de control de DMSO en el mismo punto de tiempo.

El tratamiento de cultivos de HUVEC con Compuesto I-1 (10 nM) durante 7 días dio como resultado un aumento de la formación de vasos y de redes. Cuando los cultivos de HUVEC se trataron a concentraciones que habían mostrado inducir la β -catenina, la formación de vasos se inhibió y se observó un aumento de la proliferación celular, confirmando adicionalmente un papel terapéutico para la ventana entre GSK-3 α/β pTYR y β -catenina.

Ejemplo 10: Recuperación posterior a un ictus, Modelo MCAO

I. Procedimientos generales

Se entrenan previamente ratas Wistar macho adultas en una serie de ensayos de comportamiento que incluyen: alcance de bandeja, caminar en rejilla, asimetría de miembros anteriores (agarre de cilindro), inhibición de miembro anterior (ensayo de natación) (véase más adelante para la descripción detallada de los ensayos). Después de la evaluación del comportamiento antes del ictus, las ratas se someten a cirugía durante la cual se induce un ictus. Las ratas se dividen pseudoaleatoriamente en 5 grupos iguales (n = 12) asegurando un número igual de ictus en el lado derecho e izquierdo dentro de cada grupo de tratamiento. El primer grupo se somete a una cirugía simulada con vehículo como tratamiento. La administración del compuesto de ensayo y vehículo (dosis, vía, tiempo) se determina por el patrocinador. La temperatura corporal central se mantiene a 37 °C (+/- 1°).

Después de la cirugía, se evalúa el comportamiento de todos los animales 1, 7 y 14 días después del ictus. En la conclusión de la evaluación del comportamiento, todas las ratas se someten a un MRI para determinar el volumen del infarto. El comportamiento del grupo y el volumen de infarto se comparan entre grupos usando un análisis de

varianza de una vía para determinar el efecto terapéutico beneficioso del compuesto en la velocidad y grado de recuperación de función después de ictus MCAO.

II. Oclusión de arteria cerebral media

- 5 Cada animal se pesa (los pesos medios fueron de 340 g) y después se anestesia con isoflurano (isoflurano al 4% en 21/min de oxígeno de calidad médica para inducir el plano quirúrgico y después al 2% con 21/min de oxígeno para mantener el plano quirúrgico. Después de la inducción de la anestesia, cada rata se marca individualmente con un perforador de oreja y se administra una dosis subcutánea de buprenorfina (0,025 mg/kg). La temperatura rectal se controla y se mantiene a 37 °C +/- 1 °C durante la cirugía y hasta que la rata está consciente y se puede mover (aproximadamente 3 h).
- 10 La rata después se pone en un aparato estereotáxico colocado de tal forma que el aspecto lateral de la cabeza esté dirigido hacia arriba. Se afeita la piel entre el ojo izquierdo y la oreja y se lava frotando con antiséptico quirúrgico. Se realiza una incisión vertical a medio camino entre el canal orbital derecho y el canal auditivo externo. Se realiza una incisión en el músculo temporal subyacente, se separa del cráneo y se retrae con cuidado de conservar el nervio facial. Dos suturas mantienen el músculo temporal alejado del aspecto lateral del cráneo. Se realiza una
- 15 craneotomía desde el cigoma posterior y a lo largo del borde temporal del cráneo que se extiende ventralmente para exponer la arteria cerebral media (ACM) y el tracto olfatorio. Se abre la dura y la base de la ACM y la parte anterior de la primera ramificación se electrocoagula en posición ventral con respecto al tracto olfatorio, dando como resultado un infarto en la corteza cerebral dorsolateral derecha.
- 20 El tiempo en el que se produjo el ictus se anota después de finalizar la electrocoagulación de la ACM. Una vez controlada la hemorragia, se reemplaza el músculo temporal y se sutura la piel. La rata después se retira del aparato estereotáxico y se traslada a la sala de recuperación. Se administra una segunda dosis subcutánea de buprenorfina (0,025 mg/kg) junto con 2 cc de solución de Ringer. Se proporciona agua, comida de rata húmeda y una manta calefactora debajo de una mitad de la jaula mientras que las ratas están en la sala de recuperación. Una vez que la rata es consciente y se ve que come y bebe, se traslada de nuevo a su jaula de la colonia de animales.

25 III. Procedimientos para el ensayo de comportamiento

Alcance de bandeja

- El uso de las patas anteriores se mide con un procedimiento que está adaptado a partir del procedimiento previsto por Whishaw, O'Connor y Dunnett (1986). Cada animal se alimenta de forma restringida de tal forma que el momento de la alimentación tiene lugar después del ensayo cada día. Los animales se ponen en jaulas de ensayo
- 30 (10 X 18 X 10 cm de altura) con los suelos y las paredes construidas de barras de 2 mm, cuyos bordes están separados por 9 mm. En el exterior de cada jaula se monta una bandeja de 4 cm de anchura y 5 cm de profundidad, que contiene gránulos de pienso de pollo. Las ratas tienen que extender un miembro anterior a través del hueco entre las barras, sujetar y retirar el pienso.
- 35 Los animales se entrenan durante 20-30 min al día durante un mínimo de 10 días, o hasta que se alcanza un criterio de un 50% de aciertos (nota: esto se refiere al 50% para las dos patas combinadas). La mayoría de las ratas tienden a usar exclusivamente la pata dominante para alcanzar el pienso. Si una rata no alcanza un criterio del 50% de aciertos en los 14 días de entrenamiento, se excluye del estudio. También se excluye del estudio cualquier rata que parezca ser ambidiestra. Las ratas ambidiestras usan cualquier pata para alcanzar el alimento o alcanzan el pienso con la misma frecuencia y con un éxito igual con las dos patas).
- 40 Un "acierto" se define como el agarre y la recuperación satisfactoria de un gránulo de pienso que da como resultado el consumo del gránulo. Un "fallo" se define como la recuperación no satisfactoria de un gránulo de pienso (no pudo agarrar de forma apropiada el gránulo o perdió el gránulo durante la recuperación de tal forma que el gránulo no se consumió). El porcentaje de aciertos se calcula como el número total de aciertos durante una sesión dividido por el número total de alcances. Esto se calcula por separado para la pata izquierda y derecha (o afectada y no afectada
- 45 después del ictus). Una vez que se alcanza el criterio de éxito del 50% (que implica el alcance con las dos patas), cada rata se graba en vídeo durante una sesión de alcance de 5 min.
- Los resultados de esta sesión sirven como valor basal pre-quirúrgico. La sesión de ensayo pre-quirúrgica también se usa para determinar la dominancia de mano de cada rata. La lesión del ictus se realiza dentro del hemisferio cerebral que es contralateral a la mano dominante usada para alcanzar el pienso. El ensayo post quirúrgico consiste
- 50 en un ensayo de alcance de 5 min cada semana que los animales se someten a ensayo.
- Cada sesión se observa en un monitor usando un análisis de fotograma a fotograma de cada alcance. Cada sesión se evalúa por 2 evaluadores diferentes. El cálculo final del porcentaje de aciertos para cada puntuador está dentro de un intervalo del 5% entre sí. Si se produce una mayor disparidad entre las evaluaciones finales, entonces la sesión se vuelve a evaluar por los dos observadores.
- 55 El porcentaje de aciertos para la pata afectada y no afectada para cada grupo se compara entre grupos usando un análisis de varianza de una vía.

El compuesto I-1 se ensayó en el modelo anterior. El ictus produjo de forma fiable un déficit en el comportamiento de alcance a los 7 y 14 días después de la cirugía. La adición del compuesto I-1 mejoró significativamente este déficit a los 7 y 14 días después del ictus en comparación con el tratamiento con vehículo.

Caminar en rejilla

- 5 La coordinación de los miembros anteriores y los miembros posteriores se mide usando un aparato que consiste en dos paneles de Plexiglas de 1 m de longitud y 25 cm de anchura (5 mm de espesor), con agujeros perforados a una distancia de 1 cm a lo largo de un borde largo. Los paneles están colocados a una distancia de 2,5 cm y conectados a través de varias barras metálicas (3 mm de diámetro) a través de los agujeros. Las barras están colocadas aleatoriamente con una distancia de 1, 2 ó 3 cm. El aparato está suspendido y orientado de tal manera que se forma un pasillo estrecho (2,5 cm de anchura) de 1 m de longitud con paredes de 25 cm de altura. Las barras forman el suelo.

- 15 Cada animal se introduce en el aparato usando 3 experimentos en los que la rata se pone cada vez a mayor distancia de la caja de meta. Es decir, en la primera prueba, la rata se pone en el extremo de la rejilla cerca y mirando a la caja de meta. Una vez que la rata ha entrado en la caja de meta, se pone en el punto medio en la rejilla, de nuevo mirando a la caja de meta. En el tercer y último experimento, la rata se pone en la entrada y se deja que atraviese la rejilla entera para alcanzar la caja de meta.

Este procedimiento de entrenamiento se realiza sólo una vez para cada rata antes de la cirugía. En todos los experimentos posteriores, los animales se colocan individualmente en la entrada del aparato y se necesita que atraviesen la rejilla entera hasta la caja de meta.

- 20 Antes del ictus se realiza una sesión de ensayo de 3 experimentos. Cada sesión de ensayo después del ictus incluye 3 experimentos. Cada experimento se graba en vídeo desde cerca desde un plano horizontal. Las cintas se evalúan por 2 observadores usando un análisis de fotograma a fotograma. Se cuenta el número de errores de colocación de miembro anterior y miembro posterior derecho e izquierdo (afectado y no afectado) a lo largo del 80% medio de la rejilla. El 80% medio de la rejilla se marca en el exterior del aparato con cinta adhesiva protectora. Un error es cuando un miembro se extiende (parcial o completamente, es decir, la almohadilla de la pata o la pata entera) a través del plano horizontal de las barras. Los errores del miembro anterior y posterior se suman por separado para los miembros ipsilateral y contralateral en los tres experimentos y se analizan independientemente. Las puntuaciones se comparan entre grupos usando un análisis de varianza de una vía.

- 30 El compuesto I-1 se ensayó en el modelo anterior. El ictus produjo de forma fiable un déficit en el comportamiento a 7 y 14 días después de la cirugía. El compuesto I-1 mejoró significativamente este déficit a 7 y 14 días después del ictus.

Asimetría de las patas delanteras (ensayo en cilindro)

- 35 La asimetría de las patas delanteras de los animales se mide poniendo una rata en un cilindro acrílico transparente de 25 cm de diámetro. El cilindro se pone en una mesa transparente con un espejo colocado de tal forma que el animal pueda grabarse desde abajo. Este punto panorámico proporciona una clara imagen de las patas delanteras del animal según explora el cilindro.

- 40 Durante la exploración, las ratas tienden a levantarse mucho. Cada vez que se levanta, la rata pone sus patas delanteras contra el lado del cilindro para proporcionar equilibrio y soporte mientras investiga el cilindro. La investigación implica inclinaciones (mientras se levanta) tanto en la parte izquierda como en la parte derecha del cuerpo, así como enderezamientos. Una rata normal usa igualmente las dos patas delanteras izquierda y derecha para agarrarse a la pared. Cuando se investiga el enderezamiento de la pared, la rata usa las dos patas para agarrarse. Durante los 20 primeros levantamientos se anota la pata con la que se agarra. Se anota la primera pata que toca la pared del cilindro durante el levantamiento. El ensayo continúa hasta que se han registrado 20 levantamientos. La grabación de vídeo se evalúa por 2 observadores. Se cuentan los contactos con la pared de la pata izquierda y derecha. De esta manera, para cada agarre, la puntuación debe ser I o D o I y D.

- 45 Se realiza una sesión de ensayo antes de la cirugía y después en las fechas de ensayo posquirúrgicas designadas. El ensayo previo a la cirugía se usa para determinar que las ratas no tienen una desviación preexistente en las patas (es decir, más de 15/20 contactos de la pared con un lado). Si muestran una desviación lateral, se retiran del estudio. Las puntuaciones posquirúrgicas se expresan como porcentajes de los contactos usando la pata afectada (contralateral a la lesión por ictus). Los grupos se comparan en esta puntuación usando un análisis de varianza de una vía.

El compuesto I-1 se ensayó en el modelo anterior. El ictus produjo fiablemente un déficit en el comportamiento en los 7 y 14 días después de la cirugía. El compuesto I-1 a una dosis baja mejoró significativamente este déficit 14 días después del ictus.

- 55 Inhibición del miembro posterior (ensayo de natación)

En ratas normales, la natación se realiza por golpes de propulsión de los miembros posteriores. Los miembros anteriores normalmente están inhibidos de cualquier impulso y se mantienen inmóviles y juntos debajo de la barbilla del animal. La inhibición de los miembros anteriores se evalúa grabando a los animales durante la natación. Los animales se introducen en un extremo de un acuario (30 cm de anchura x 90 cm de longitud x 43 cm de altura) relleno hasta una profundidad de 25 cm con agua a temperatura ambiente (~25 °C) y se graban mientras nadan hasta una plataforma visible de 9,5 cm cuadrados que se proyecta 2 cm por encima de la superficie del agua colocada en el extremo opuesto. La evaluación de la inhibición se realiza contando el número de impulsos de los miembros posteriores izquierdo y derecho durante tres colocaciones en el acuario. Sólo se puntúa el 80% medio de la longitud. El 80% medio se marca en el exterior del acuario usando cinta adhesiva protectora.

Una natación se considera evaluable únicamente si el animal no toca los lados del acuario durante el experimento de natación. Los grupos se comparan basándose en el número total de impulsos de los miembros posteriores izquierdo y derecho (afectado y no afectado después del ictus) usando un análisis de varianza de una vía.

El compuesto I-1 se ensayó en el modelo anterior. El ictus produjo fiablemente un déficit en el comportamiento a los 7 y 14 días después de la cirugía. El compuesto I-1 mejoró significativamente este déficit a los 7 y 14 días después del ictus.

Análisis de biomarcador pTYR

Para rastrear la actividad del compuesto I-1 en el SNC de ratas sometidas a MCAO, se extrajeron los cerebros y se obtuvo lisado de proteínas (como se describe en el Ejemplo 6 de la presente memoria) a partir de animales tratados con vehículo y tratados con compuesto, al final del estudio. Los lisados se analizaron por transferencia de Western (véase el Ejemplo 3) y se sondaron para determinar los niveles de GSK-3 α/β pTYR. El compuesto I-1 mostró una reducción significativa en la señal de pTYR a todas las dosis en el cerebro en comparación con las ratas tratadas con vehículo sin inducción de β -catenina.

Ensayo de retirada de adhesivo

Las ratas se ensayan con respecto a los déficits somatosensoriales de los miembros anteriores con el ensayo de retirada de adhesivo (Schallert T, y col., 1984 nº 3). Cada animal se somete a tres experimentos poniendo a su alrededor tiras de cinta de embalar (de aproximadamente 1,2 cm de diámetro) cada día de ensayo y se registra el tiempo medio (segundos) transcurrido hasta el estímulo de retirada del miembro anterior izquierdo.

IV. Procedimientos de análisis molecular e histológico

Análisis molecular

Se obtiene lisado de proteínas a partir de los cerebros de todos los animales tratados con vehículo y compuesto y se procesa para el análisis de biomarcador de GSK3 α/β pTYR y β -catenina por ensayo de transferencia de Western para asegurar la actividad del compuesto en la diana.

Se obtiene líquido cefalorraquídeo a partir de todos los animales tratados con vehículo y compuesto y se analizan con respecto a los niveles de BDNF por ELISA como marcador sustituto de la **plasticidad neuronal**.

Análisis histológico

Se obtienen muestras cerebrales incluidas en parafina a partir de Neuroinvestigaciones y se cortan en secciones de 6 μ m en portaobjetos de vidrio y se analizan por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia para marcadores/fenotipos que se correlacionan con resultados beneficiosos en la recuperación posterior al ictus:

Movilización/proliferación de células madre: tinción para BrdU y análisis usando el sistema Aperio para la cuantificación de células positivas para BrdU en la zona subventricular (SVZ).

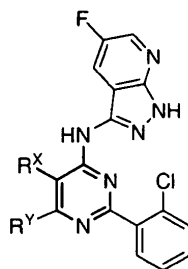
Neurogénesis: tinción inmunofluorescente para doblecortina (DCX) junto BrdU en la SVZ usando recuento manual para la cuantificación.

Angiogénesis: tinción para el factor de von Willebrand VIII (vWF) y análisis usando el sistema Aperio para la cuantificación de células positivas para vWF en el peri-ictus.

Aunque se han descrito varias realizaciones de la presente invención, es evidente que los ejemplos básicos pueden alterarse para proporcionar otras realizaciones que utilizan o incluyen los compuestos, procedimientos y procesos de la presente invención. Por lo tanto, se apreciará que el alcance de la presente invención se definirá por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

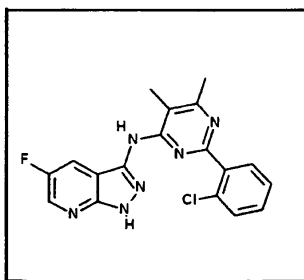
1. Un compuesto de fórmula I:



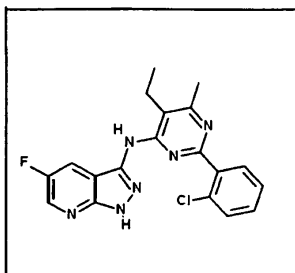
I

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

- 5 R^X es alquilo C_{1-3} y R^Y es alquilo C_{1-3}
2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R^X es metilo o etilo.
3. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que R^Y es metilo.
4. El compuesto de la reivindicación 1 seleccionado del siguiente:



- 10 5. El compuesto de la reivindicación 1 seleccionado del siguiente:



6. Una composición que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y un excipiente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende además un producto terapéutico seleccionado entre un agente quimioterapéutico o antiproliferativo, un agente antiinflamatorio, un agente inmunomodulador o inmunosupresor, un factor neurotrófico, un agente para tratar enfermedades cardiovasculares, un agente para tratar diabetes o un agente para tratar trastornos de inmunodeficiencia.
8. Un procedimiento para inhibir la actividad de la GSK-3 en una muestra biológica *ex vivo* o *in vitro* con un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
9. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una composición de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, para su uso en el tratamiento o reducción de la gravedad de una enfermedad o afección seleccionada entre diabetes, osteoporosis, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, demencia asociada con el SIDA, trastorno bipolar, esclerosis lateral amiotrófica (ELA, enfermedad de Lou Gehrig), esclerosis múltiple (EM), esquizofrenia, leucocitopenia, ictus y artritis reumatoide.

- 5 10. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una composición de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, para su uso en el tratamiento o reducción de la gravedad de una enfermedad o afección seleccionada entre ictus, lesión de la médula espinal, lesión traumática cerebral, Charcot-Marie-Tooth y neuropatía diabética; para su uso después de que se haya producido una isquemia; o para su uso en la recuperación posterior a un ictus.
- 10 11. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una composición de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende un agente terapéutico adicional seleccionado entre un agente para tratar la diabetes, un agente para tratar la osteoporosis, una gente para tratar la enfermedad de Alzheimer, un agente para tratar la enfermedad de Huntington, un agente para tratar la enfermedad de Parkinson, un agente para tratar la demencia asociada con el SIDA, un agente para tratar el trastorno bipolar, un agente para tratar la esclerosis lateral amiotrófica (ELA, enfermedad de Lou Gehrig), un agente para tratar la esclerosis múltiple (EM), un agente para tratar la esquizofrenia, un agente para tratar la leucocitopenia, un agente para tratar el ictus y un agente para tratar la artritis reumatoide, en el que:
15 dicho agente terapéutico adicional es para su uso junto con dicha composición como una sola forma de dosificación o por separado de dicha composición como parte de una forma de dosificación múltiple.
- 20 12. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una composición de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende un agente terapéutico adicional seleccionado entre un agente para tratar el ictus, un agente para tratar la lesión de la médula espinal, un agente para tratar la lesión traumática cerebral, un agente para tratar Charcot-Marie-Tooth o un agente para tratar la neuropatía diabética.
- 25 13. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una composición de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en combinación con terapia física.
14. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso para aumentar la ramificación axonal y dendrítica en células neuronales; para aumentar la neurogénesis en células neuronales; para aumentar la angiogénesis en células neuronales; y para aumentar la plasticidad de células neuronales.