

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 473 581**

51 Int. Cl.:

C07C 49/83	(2006.01)	C07D 213/84	(2006.01)
C07C 39/15	(2006.01)	C07D 295/08	(2006.01)
C07C 49/835	(2006.01)	C07D 487/04	(2006.01)
C07C 215/50	(2006.01)	C07D 207/16	(2006.01)
C07C 235/34	(2006.01)	C07D 217/26	(2006.01)
C07C 39/17	(2006.01)	C07D 263/18	(2006.01)
C07C 43/23	(2006.01)	C07D 333/16	(2006.01)
A61P 25/28	(2006.01)	C07D 213/30	(2006.01)
A61K 31/05	(2006.01)	C07D 498/08	(2006.01)
C07D 231/06	(2006.01)	C07D 471/04	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2003 E 12166370 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 2527315**

54 Título: **Compuestos, composiciones y métodos para el tratamiento de amiloidosis y sinucleinopatías tales como la enfermedad de Alzheimer, la diabetes de tipo 2 y la enfermedad de Parkinson**

30 Prioridad:

31.05.2002 US 385144 P
 09.09.2002 US 409100 P
 20.09.2002 US 412272 P
 20.12.2002 US 435880 P
 14.04.2003 US 463104 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.07.2014

73 Titular/es:

PROTEOTECH INC. (100.0%)
12026, 115th Avenue N.E.
Kirkland, WA 98034, US

72 Inventor/es:

SNOW ALAN D.;
NGUYEN, BETH P.;
CASTILLO, GERARDO M.;
SANDERS, VIRGINIA J.;
LAKE, THOMAS P.;
LARSEN, LESLEY;
LARSEN, DAVID S.;
WEAVERS, REX T.;
LORIMER, STEPHEN D. y
COFFEN, DAVID L.

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 473 581 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos, composiciones y métodos para el tratamiento de amiloidosis y sinucleinopatías tales como la enfermedad de Alzheimer, la diabetes de tipo 2 y la enfermedad de Parkinson

5

Campo técnico

Esta invención se refiere a: compuestos de bis-dihidroxifenilo novedosos y sus sales farmacéuticamente aceptables, composiciones farmacéuticas que los contienen y su uso en el tratamiento de amiloidosis, especialmente amiloidosis A β , tal como las observadas en la enfermedad de Alzheimer, amiloidosis IAPP, tal como la observada en la diabetes de tipo 2, y sinucleinopatías, tales como las observadas en la enfermedad de Parkinson, y a la fabricación de medicamentos para dicho tratamiento.

10

Antecedentes de la invención

15

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la acumulación de un péptido de 39-43 aminoácidos denominado la proteína β -amiloidea o A β , en forma fibrilar, que se presenta como placas de amiloide extracelular y como amiloide dentro de las paredes de los vasos sanguíneos del cerebro. Se cree que la deposición de amiloide A β fibrilar en la enfermedad de Alzheimer es perjudicial para el paciente y que eventualmente provoca toxicidad y la muerte de células neuronales, sellos característicos de la enfermedad de Alzheimer. Las pruebas acumuladas implican a amiloide y, más específicamente, a la formación, la deposición, la acumulación y/o la persistencia de fibrillas de A β como un factor causante de la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer principal. Además, aparte de la enfermedad de Alzheimer, una serie de otras amiloidosis implican la formación, la deposición, la acumulación y la persistencia de fibrillas de A β , incluidas el síndrome de Down, trastornos que implican angiopatía congénica, tales como, pero sin limitación, hemorragia cerebral hereditaria de tipo holandés, miositosis por cuerpos de inclusión, demencia pugilística, angiopatía β -amiloidea cerebral, demencia asociada con parálisis supranuclear progresiva, demencia asociada con la degeneración basal cortical y deterioro cognitivo leve.

20

25

30

La enfermedad de Parkinson es otro trastorno humano caracterizado por la formación, la deposición, la acumulación y/o la persistencia de depósitos de proteínas fibrilares anómalas que muestran muchas de las características de los amiloides. En la enfermedad de Parkinson se cree que las acumulaciones de cuerpos de Lewy citoplásmicos que consisten en filamentos de α -sinucleína/NAC (un componente no A β) son importantes en la patogénesis y como dianas terapéuticas. Se considera que los nuevos agentes o compuestos capaces de inhibir la formación, la deposición, la acumulación y/o la persistencia de la α -sinucleína y/o el NAC, o que rompan las fibrillas de α -sinucleína/NAC preformadas (o porciones de las mismas), son productos terapéuticos potenciales para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y sinucleinopatías relacionadas. El NAC es un fragmento de 35 aminoácidos de la α -sinucleína que tiene la capacidad para formar fibrillas de tipo amiloide *in vitro* o como se observa en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Parkinson. El fragmento NAC de la α -sinucleína es una diana terapéutica relativamente importante, ya que se cree que esta porción de la α -sinucleína es crucial para la formación de cuerpos de Lewy, como se observa en todos los pacientes con enfermedad de Parkinson, sinucleinopatías y trastornos relacionados.

35

40

45

Una diversidad de otras enfermedades humanas también muestran deposición de amiloide y habitualmente implican a órganos sistémicos (es decir, órganos o tejidos que se encuentran fuera del sistema nervioso central), provocando la acumulación de amiloide la disfunción o el fallo de órganos. Estas amiloidosis (que se abordan a continuación) que provocan una acumulación significativa de amiloide en una serie de órganos y tejidos diferentes se conocen como amiloidosis sistémicas. En otras amiloidosis pueden verse afectados órganos individuales tales como el páncreas en el 90 % de los pacientes con diabetes de tipo 2. En este tipo de amiloidosis, se cree que se destruyen las células beta en los islotes de Langerhans del páncreas por la acumulación de depósitos de amiloide fibrilar que consisten principalmente en una proteína conocida como polipéptido amiloide de los islotes (IAPP). Se cree que la inhibición o la reducción de esta formación, deposición, acumulación y persistencia de fibrillas de amiloides IAPP conducirá a nuevos tratamiento eficaces contra la diabetes de tipo 2. Para la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la amiloidosis "sistémica" no existen actualmente curas ni tratamientos eficaces, y el paciente muere habitualmente en un periodo de 3 a 10 años desde la aparición de la enfermedad.

50

55

Las amiloidosis se clasifican según el tipo de proteína amiloidea presente, así como según la enfermedad subyacente. Las amiloidosis tienen una serie de características comunes que incluyen cada amiloide que consiste en un tipo único de proteína amiloidea. Las amiloidosis incluyen, pero sin limitación, los amiloides asociados con la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés, la demencia pugilística, la miositosis por cuerpos de inclusión (Askanas y col., Ann. Neurol., 43:521-560, 1993) y el deterioro cognitivo leve (en que el amiloide específico se denomina proteína beta-amiloide o A β), el amiloide asociado con inflamación crónica, diversas formas de tumores malignos y la fiebre mediterránea familiar (en la que el amiloide específico se denomina amiloide AA o amiloidosis asociada a la inflamación), el amiloide asociado con mieloma múltiple y otras discrasias de linfocitos B (en las que el amiloide específico se denomina amiloide AL), el amiloide asociado con la diabetes de tipo 2 (en el que la proteína amiloide se denomina amilina o polipéptido

60

65

amiloideo de los islotes o IAPP), el amiloide asociado con las enfermedad priónicas, incluida la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, el síndrome de Gerstmann-Straussler, el kuru y la tembladera animal (en las que el amiloide específico se denomina amiloide PrP), el amiloide asociado con hemodiálisis a largo plazo y el síndrome del túnel carpiano (en el que el amiloide específico se denomina amiloide de α_2 -microglobulina), el amiloide asociado con la amiloidosis cardíaca senil y la polineuropatía amiloidótica familiar (en la que el amiloide específico se denomina transtiretina o prealbúmina) y el amiloide asociado con tumores endocrinos tales como el carcinoma medular de la tiroides (en el que el amiloide específico se denomina variantes de procalcitonina). Además, la proteína α -sinucleína que forma fibrillas de tipo amiloide y es positiva al rojo Congo y a la tioflavina S (tintes específicos usados para detectar los depósitos fibrilares de amiloide) se encuentra como parte de los cuerpos de Lewy en el cerebro de pacientes con enfermedad de Parkinson, enfermedad de los cuerpos de Lewy (Lewy en Handbuch der Neurologie, M. Lewandowski, ed., Springer, Berlín, páginas 920-933, 1912; Pollanen y col., J. Neuropath. Exp. Neurol., 52:183-191, 1993; Spillantini y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:6469-6473, 1998; Arai y col., Neurosci. Lett., 259:83-86, 1999), la atrofia multisistémica (Wakabayashi y col., Acta Neuropath., 96:445-452, 1998), la demencia con cuerpos de Lewy y la variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer. Para los fines de la presente divulgación, la enfermedad de Parkinson, debido al hecho de que las fibrillas se desarrollan en el cerebro de pacientes con esta enfermedad (que son positivas al rojo Congo y a la tioflavina S y que contienen una estructura secundaria predominante de lámina beta plegada), se considera ahora como una enfermedad que también presenta las características de una enfermedad de tipo amiloide.

Se sabe que las amiloidosis sistémicas, que incluyen, como ejemplos, el amiloide asociado con la inflamación crónica, diversas formas de tumores malinos y la fiebre mediterránea familiar (es decir, el amiloide AA o la amiloidosis asociada con la inflamación) (Benson y Cohen, Arth. Rheum., 22:36-42, 1979; Kamei y col., Acta Path. Jpn., 32:123-133, 1982; McAdam y col., Lancet, 2:572-573, 1975; Metaxas, Kidney Int., 20:676-685, 1981) y el amiloide asociado con mieloma múltiple y otras discrasias de linfocitos B (es decir, el amiloide AL) (Harada y col., J. Histochem. Cytochem., 19:1-15, 1971), implican la deposición de amiloide en una diversidad de órganos y tejidos diferentes que, en general, se encuentran fuera del sistema nervioso central. La deposición de amiloides en estas enfermedades puede producirse, por ejemplo, en el hígado, el corazón, el bazo, el sistema gastrointestinal, el riñón, la piel y/o los pulmones (Johnson y col., N. Engl. J. Med., 321:513-518, 1989). Para la mayor parte de estas amiloidosis no existen curas ni tratamientos eficaces aparentes y las consecuencias de la deposición de amiloide pueden ser perjudiciales para el paciente. Por ejemplo, la deposición de amiloide en el riñón puede provocar una insuficiencia renal, mientras que la deposición de amiloide en el corazón puede provocar una insuficiencia cardíaca. Para estos pacientes, la acumulación de amiloide en órganos sistémicos es causante, en último término, de la muerte, en general en 3-5 años. Otras amiloidosis pueden afectar a un único órgano o tejido, como se observa con los depósitos de amiloide A β encontrados en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down; los depósitos de amiloide PrP en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, el síndrome de Gerstmann-Straussler y el kuru; los depósitos de amiloide de los islotes (IAPP) encontrados en los islotes de Langerhans en el páncreas del 90 % de los pacientes con diabetes de tipo 2 (Jonson y col., N. Engl. J. Med., 321:513-518, 1989; Lab. Invest., 66:522-535, 1992); los depósitos de amiloide de α_2 -microglobulina en el nervio medio que son causantes del síndrome de túnel carpiano, como se observa en pacientes sometidos a hemodiálisis a largo plazo (Geyjo y col., Biochem. Biophys. Res. Comm., 129:701-706, 1985; Kidney Int., 30:385-390, 1986); el amiloide de prealbúmina/transtiretina observado en el corazón de pacientes con amiloidosis cardíaca senil; y el amiloide de prealbúmina/transtiretina observado en los nervios periféricos de pacientes que tienen polineuropatía amiloidótica familiar (Skinner y Cohen, Biochem. Biophys. Res. Comm., 99:1326-1332, 1981; Saraiva y col., J. Lab. Clin. Med., 102:590-603, 1983; J. Clin. Invest., 74:104-119, 1984; Tawara y col., J. Lab. Clin. Med., 98:811-822, 1989).

La enfermedad de Alzheimer también representa una carga económica considerable para la sociedad. Un estudio reciente ha estimado que el coste de atender a un único paciente con enfermedad de Alzheimer con deterioros cognitivos graves en casa o en una residencia es superior a 47.000 dólares anuales (*A Guide to Understanding Alzheimer's Disease and Related Disorders*). Para una enfermedad que puede durar de 2 a 20 años, el coste general de la enfermedad de Alzheimer para las familias y para la sociedad es enorme. La carga económica anual de la enfermedad de Alzheimer en EEUU, en términos de gastos en cuidados sanitarios y pérdidas de salarios de los pacientes y de sus cuidadores se estima que es de 80 a 100 mil millones de dólares (*2003 Progress Report on Alzheimer's Disease*).

El clorhidrato de tacrina ("Cognex"), el primer fármaco aprobado por la FDA para la enfermedad de Alzheimer, es un inhibidor de la acetilcolinesterasa (Cutler y Sramek, N. Engl. J. Med. 328:808-810, 1993). No obstante, este fármaco ha mostrado un éxito limitado en el logro de una mejora cognitiva en pacientes con la enfermedad de Alzheimer e, inicialmente, tuvo efectos secundarios importantes tales como toxicidad hepática. El segundo fármaco aprobado por la FDA, donepezilo ("Aricept"), que es también un inhibidor de la acetilcolinesterasa, es más eficaz que la tacrina, demostrando una ligera mejora cognitiva en pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Barner and Gray, Ann. Pharmacotherapy 32:70-77, 1998; Rogers y Friedhoff, Eur. Neuropsych. 8:67-75, 1998), pero no se cree que sea una cura. Por lo tanto, está claro que existe la necesidad de tratamientos más eficaces para pacientes con la enfermedad de Alzheimer.

Amiloide como diana terapéutica para la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la deposición y la acumulación de un péptido de 39-43 aminoácidos denominado proteína beta-amiloide, A β o β /A4 (Glenner y Wong, Biochem. Biophys. Res. Comm., 120:885-890, 1984; Masters y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4245-4249, 1985; Husby y col., Bull. WHO, 71:105-108, 1993).

5 La A β se deriva, mediante la escisión con proteasas de proteínas precursoras más grandes denominadas proteínas precursoras de β -amiloide (APP), de las que existen varias variantes empalmadas alternativamente. Las formas más abundantes de APP incluyen proteínas que consisten en 695, 751 y 770 aminoácidos (Tanzi y col., Nature, 31:528-530, 1988).

10 El péptido A β pequeño es un componente principal que forma los depósitos de amiloide de "placas" en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer. Además, la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la presencia de numerosas "madejas" neurofibrilares, que consisten en filamentos helicoidales apareados que se acumulan de una forma anormal en el citoplasma de las neuronas (Grundke-Iqbal y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:4913-4917, 1986; Kosik y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:4044-4048, 1986; Lee y col., Science, 251:675-678, 1991). Por lo
15 tanto, la característica patológica de la enfermedad de Alzheimer es la presencia de "placas" y "madejas", estando el amiloide depositado en el núcleo central de las placas. El otro tipo de lesión principal encontrada en cerebros con la enfermedad de Alzheimer es la acumulación de amiloide en las paredes de los vasos sanguíneos, tanto dentro del parénquima cerebral como en las paredes de los vasos meníngeos que se encuentran fuera del cerebro. Los depósitos de amiloide localizados en las paredes de los vasos sanguíneos se denominan amiloide cerebrovascular o
20 angiopatía congofílica (Mandybur, J. Neuropath. Exp. Neurol., 45:79-90, 1986; Pardridge y col., J. Neurochem., 49:1394-1401, 1987).

25 Durante muchos años ha habido un debate científico continuo sobre la importancia del "amiloide" en la enfermedad de Alzheimer y sobre si las "placas" y las "madejas" características de esta enfermedad eran una causa o simplemente una consecuencia de la enfermedad. Ahora, en los últimos años, los estudios indican que el amiloide es, en efecto, un factor causante de la enfermedad de Alzheimer y no debería considerarse un mero espectador inocente. Se ha demostrado que la proteína A β del Alzheimer en cultivos celulares provoca la degeneración de las células nerviosas en periodos de tiempo cortos (Pike y col., Br. Res., 563:311-314, 1991; J. Neurochem., 64:253-265, 1995). Los estudios sugieren que es la estructura fibrilar (que consiste en una estructura secundaria
30 predominante de lámina β plegada), característica de todos los amiloides, la que es responsable de los efectos neurotóxicos. También se ha descubierto que la A β es neurotóxica en cultivos de cortes de hipocampo (Harrigan y col., Neurobiol. Aging, 16:779-789, 1995) e induce la muerte de células nerviosas en ratones transgénicos (Games y col., Nature, 373:523-527, 1995; Hsiao y col., Science, 274:99-102, 1996). La inyección de la A β del Alzheimer en el cerebro de rata también provoca deterioro en la memoria y disfunción neuronal (Flood y col., Proc. Natl. Acad. Sci.
35 USA, 88:3363-3366, 1991; Br. Res., 663:271-276, 1994).

Probablemente, la prueba más convincente de que el amiloide A β está directamente implicado en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer procede de los estudios genéticos. Se ha descubierto que la producción de A β puede ser el resultado de mutaciones en el gen que codifica su precursor, la proteína precursora de β -amiloide (Van Broeckhoven y col., Science, 248:1120-1122, 1990; Murrell y col., Science, 254:97-99, 1991; Haass y col., Nature Med., 1:1291-1296, 1995). La identificación de mutaciones en el gen de la proteína precursora de beta-amiloide que
40 provoca la aparición temprana de la enfermedad de Alzheimer familiar es el argumento más potente para creer que el amiloide es fundamentales en el proceso patogenético que subyace a esta enfermedad. Se han descubierto cuatro mutaciones que provocan la enfermedad, de las que se ha informado, que demuestran la importancia de A β para provocar la enfermedad de Alzheimer familiar (publicado en Hardy, Nature Genet., 1:233-234, 1992). Todos estos estudios sugieren que proporcionar un fármaco para reducir, eliminar o prevenir la formación, la deposición, la acumulación y/o la persistencia de A β fibrilar en el cerebro de pacientes humanos servirá como un tratamiento terapéutico eficaz.

50 Enfermedad de Parkinson y sinucleinopatías

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo que se caracteriza patológicamente por la presencia de cuerpos de Lewy intracitoplásmicos (Lewy en Handbuch der Neurologie, M. Lewandowski, ed., Springer, Berlín, páginas 920-933, 1912; Pollanen y col., J. Neuropath. Exp. Neurol., 52:183-191, 1993), siendo los componentes
55 principales de los mismos filamentos que consisten en α -sinucleína (Spillantini y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:6469-6473, 1998; Arai y col., Neurosci. Lett. 259:83-86, 1999), una proteína de 140 aminoácidos (Ueda y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11282-11286, 1993). Se han descrito dos mutaciones dominantes en una α -sinucleína que son causantes de la enfermedad de Parkinson familiar de aparición temprana, lo que sugiere que los cuerpos de Lewy contribuyen mecánicamente a la degeneración de neuronas en la enfermedad de Parkinson y en trastornos relacionados (Polymeropoulos y col., Science, 276:2045-2047, 1997; Kruger y col., Nature Genet., 18:106-108, 1998). Recientemente, estudios *in vitro* han demostrado que una α -sinucleína recombinante puede, de hecho, formar fibrillas de tipo cuerpos de Lewy (Conway y col., Nature Med., 4:1318-1320, 1998; Hashimoto y col., Brain Res., 799:301-306, 1998; Nahri y col., J. Biol. Chem., 274:9843-9846, 1999). De la forma más importante, ambas mutaciones de α -sinucleína ligadas a la enfermedad de Parkinson aceleran este proceso de agregación,
65 demostrando que estos estudios *in vitro* pueden tener relevancia para la patogénesis de la enfermedad de

Parkinson. La agregación de alfa-sinucleína y formación de fibrillas cumple los criterios de un proceso de polimerización dependiente de la nucleación (Wood y col., J. Biol. Chem., 274:19509-19512, 1999). A este respecto, la formación de fibrillas de α -sinucleína se parece al de las fibrillas de proteína β -amiloidea ($A\beta$) de la enfermedad de Alzheimer. La proteína recombinante de la alfa-sinucleína y el componente no- $A\beta$ (conocido como NAC), que es un

- 5 fragmento peptídico de 35 aminoácidos de la α -sinucleína, tienen ambos la capacidad de formar fibrillas cuando se incuban a 37 °C y son positivos con tintes de amiloide tales como el rojo Congo (que muestra una birrefringencia roja/verde cuando se observa bajo luz polarizada) y la tioflavina S (que muestra fluorescencia positiva) (Hashimoto y col., Brain Res., 799:301-306, 1998; Ueda y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11282-11286, 1993).
- 10 Las sinucleínas son una familia de proteínas neuronales presinápticas pequeñas compuestas de α -, β - y γ -sinucleínas, de la que solo los agregados de α -sinucleína se han asociado con diversas enfermedades neurológicas (Ian y col., Clinical Neurosc. Res., 1:445-455, 2001; Trojanowski y Lee, Neurotoxicology, 23:457-460, 2002). El papel de las sinucleínas (y, en particular de la alfa-sinucleína) en la etiología de una serie de enfermedades neurodegenerativas y/o amiloidosis se ha desarrollado a partir de varias observaciones. Desde el punto de vista
- 15 patológico, la sinucleína se ha identificado como un componente principal de los cuerpos de Lewy, las inclusiones características de la enfermedad de Parkinson, y un fragmento de la misma se aisló a partir de placas de amiloide de otra enfermedad neurológica diferente, la enfermedad de Alzheimer. Desde el punto de vista bioquímico, se ha demostrado que la α -sinucleína recombinante forma fibrillas de tipo amiloide que recapitulan las características ultraestructurales de la alfa-sinucleína aislada de pacientes con demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad de
- 20 Parkinson y atrofia multisistémica. Además, la identificación de mutaciones dentro del gen de la sinucleína, aunque en casos raros de la enfermedad de Parkinson familiar, demostró una conexión inequívoca entre la patología de la sinucleína y enfermedades neurodegenerativas. La implicación habitual de la α -sinucleína en un espectro de enfermedades tales como la enfermedad de Parkinson, la demencia con cuerpos de Lewy, la atrofia multisistémica y la variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer ha llevado a clasificar estas enfermedades dentro del
- 25 término general de "sinucleinopatías".

Las fibrillas de α -sinucleína de la enfermedad de Parkinson, como las fibrillas de $A\beta$ de la enfermedad de Alzheimer, también consisten predominantemente en una estructura de lámina β plegada. Por lo tanto, también se prevé que los compuestos que se ha hallado que inhiben la formación de fibrillas de amiloide $A\beta$ en la enfermedad de

- 30 Alzheimer sean eficaces para la inhibición de la formación de fibrillas de α -sinucleína/NAC, como se muestra en los ejemplos de la presente invención. Por lo tanto, estos compuestos también servirían como productos terapéuticos para la enfermedad de Parkinson y otras sinucleinopatías, además de ser eficaces como productos terapéuticos para la enfermedad de Alzheimer, la diabetes de tipo 2 y otros trastornos de amiloides.
- 35 El descubrimiento y la identificación de nuevos compuestos o agentes como productos terapéuticos potenciales para detener la formación, la deposición, la acumulación y/o la persistencia de amiloides que tienen lugar en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la diabetes de tipo II y otras amiloidosis se intenta con gran vehemencia.
- 40 El documento WO 02/42429 divulga métodos para el aislamiento de compuestos que poseen actividad inhibitoria del amiloide a partir de materia vegetal del género *Uncaria*, y el uso de estos compuestos para tratar una amiloidosis o una enfermedad relacionada con la α -sinucleína.
El documento EP 0 324 521 divulga compuestos de la fórmula:

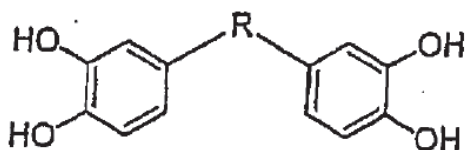


- 45 para su uso en el tratamiento de enfermedades hematopoyéticas en un ser vivo de sangre caliente.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a compuestos de la fórmula:

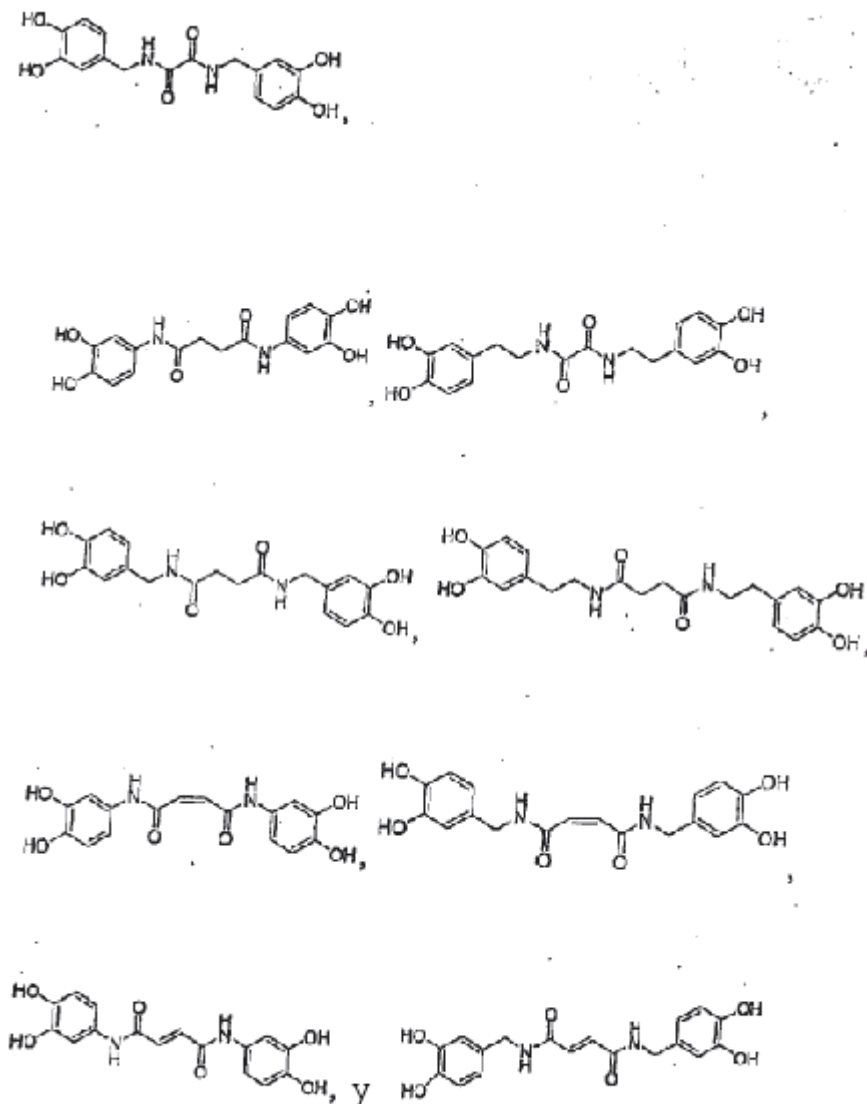
50



o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la que:
R es un grupo alquileo C_6 - C_{10} , en que hay:

- i) opcionalmente 1 o 2 dobles enlaces no adyacentes;
- ii) de 1 a 3 grupos metileno no adyacentes están reemplazados por NR', O o S, en la que R' es H, acilo C₂₋₄ o alquilo C₁₋₃; y
- iii) 2 grupos metileno están reemplazados por un grupo carbonilo o hidroximetileno

5 Preferentemente, el compuesto se selecciona entre:



10 En un segundo aspecto, esta invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto del primer aspecto de esta invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable, y composiciones farmacéuticas que comprenden un excipiente farmacéuticamente aceptable y, como único ingrediente activo, un compuesto del primer aspecto de la invención.

15 En un tercer aspecto, los compuestos del primer aspecto son para su uso en el tratamiento de una amiloidosis o una sinucleinopatía en un mamífero, especialmente un ser humano, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto del primer aspecto de esta invención, por ejemplo, como una composición farmacéutica.

20 En un cuarto aspecto, esta invención se refiere al uso de un compuesto del primer aspecto de esta invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una amiloidosis o una sinucleinopatía.

En un quinto aspecto, los compuestos del primer aspecto son para su uso en el tratamiento de la formación, la deposición, la acumulación o la persistencia de las fibrillas de amiloide o las fibrillas de sinucleína.

5 En un sexto aspecto, esta invención se refiere a un método *in vitro* para tratar la formación, la deposición, la acumulación o la persistencia de las fibrillas de amiloide o las fibrillas de sinucleína tales como A β , IAPP, otros amiloides y fibrillogénesis de NAC o α -sinucleína. El método incluye el paso de administrar al ambiente *in vitro* una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de esta invención.

10 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es cuatro espectros de difracción circular que muestran ejemplos de la ruptura de las fibrillas de A β de la enfermedad de Alzheimer mediante los compuestos 4, 12, 51 y 61.

15 La figura 2 es un espectro de difracción circular que muestra ejemplos de la ruptura de las fibrillas de A β de la enfermedad de Alzheimer mediante el compuesto 78.

La figura 3 es tres espectros de difracción circular que muestran ejemplos de la ruptura de las fibrillas de A β de la enfermedad de Alzheimer (de un modo dependiente de la dosis) mediante los compuestos 12, 51 y 61.

20 Descripción detallada de la invención

Definiciones

25 En la presente solicitud, los términos siguientes tendrán los significados siguientes, sin considerar si los términos se usan de otra forma en otro sitio de la literatura o de otro modo en la técnica conocida.

30 "Análogos de metilendioxi" se refiere a compuestos en los que cada uno de los pares de restos hidroxilo adyacentes de los grupos hidroxiarilo se han reemplazado por grupos metilendioxi. Los compuestos de metilendioxi se ilustran y se denominan compuestos N^o 1B a N^o 86B o DC-0001B a DC-0086B. Los grupos metilendioxi también son grupos protectores de intermedios convenientes para los restos dihidroxilo y, por lo tanto, se cree que estos compuestos divulgados también sirven como profármacos eficaces. Los análogos de metilendioxi N^o 1B a N^o 80B se ilustran en el ejemplo 30.

35 "Ésteres farmacéuticamente aceptables" se refiere a compuestos en los que los restos hidroxilo de los grupos dihidroxiarilo de los compuestos están esterificados con un ácido o ácidos, dando como resultado un poli(éster) farmacéuticamente aceptable. Los compuestos se muestran en el ejemplo 31 como acetilados, y estos compuestos acetilados se ilustran y se denominan compuestos N^o 1C a N^o 86C o DC-0001C a DC-0086C;

40 Se espera que los grupos éster sirvan como grupos protectores de intermedios para los restos hidroxilo y, por lo tanto, se espera que los ésteres farmacéuticamente aceptables sirvan como profármacos para sus compuestos de bis- y tris-hidroxiarilo subyacentes.

45 Se muestran las estructuras químicas de cada uno de los compuestos de la presente invención. Las denominaciones de los compuestos son diversas denominaciones de la IUPAC [denominaciones derivadas según el sistema aceptado por la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) establecido por la coalición de la Comisión de Nomenclatura de Química Orgánica y la Comisión de Química Orgánica Física, tal como pueden encontrarse en el sitio de Internet <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac>], denominaciones derivadas de las denominaciones de la IUPAC mediante la adición o la sustitución (por ejemplo, usando "3,4-metilendioxi-fenilo" derivado de "fenilo" en vez de "benzo[1,3]dioxol-5-ilo") y denominaciones derivadas de las denominaciones de reactantes (por ejemplo, usando "3,4-dihidroxanilida del ácido 3,4-dihidroxibenzoico" en vez de "N-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidroxibenzamida"). No obstante, las denominaciones usadas se equiparan explícitamente a estructuras químicas y se cree que se entienden fácilmente por parte de un experto en la técnica.

55 "Mamífero" incluye tanto mamíferos humanos como no humanos, tales como animales de compañía (gatos, perros y similares), animales de laboratorio (tales como ratones, ratas, cobayas y similares) y animales de granja (ganado vacuno, caballos, ovejas, cabras, cerdos y similares).

60 "Excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es convencionalmente útil para preparar una composición farmacéutica que, en general, es segura, no tóxica y deseable, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario o para uso farmacéutico humano. Estos excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos o, en el caso de una composición en aerosol, gaseosos.

65 "Sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal que sea farmacéuticamente aceptable y que tenga las propiedades farmacológicas deseadas. Dichas sales incluyen sales que pueden formarse cuando los protones ácidos de los compuestos sean capaces de reaccionar con bases inorgánicas u orgánicas. Las sales inorgánicas adecuadas incluyen las formadas con los metales alcalinos, por ejemplo sodio y potasio, magnesio, calcio y

aluminio. Las sales orgánicas adecuadas incluyen las formadas con bases orgánicas tales como bases de amina, por ejemplo etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina y similares. Dichas sales también incluyen sales de adición de ácidos formadas con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácidos clorhídrico y bromhídrico) y ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico y los ácidos alcanos- y areno-sulfónicos tales como ácido metanosulfónico y ácido bencenosulfónico). Cuando hay presencia de dos grupos ácidos, una sal farmacéuticamente aceptable puede ser una sal sencilla monoácida o una sal doble; y de modo similar cuando hay presencia de más de dos grupos ácidos, algunos o todos de dichos grupos pueden estar salificados.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa, en general, la cantidad que cuando se administra a un sujeto o a un animal para tratar una enfermedad, es suficiente para afectar al grado de tratamiento deseado para la enfermedad. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "dosificación terapéuticamente eficaz" inhibe, reduce, rompe o disgrega la formación, la deposición, la acumulación y/o la persistencia de fibrillas de amiloide o de sinucleína, o trata una enfermedad asociada a estas afecciones, tal como una amiloidosis o una sinucleinopatía, en al menos el 20 %, más preferentemente en al menos el 40 %, incluso más preferentemente en al menos el 60% y aún más preferentemente en al menos el 80 %, con respecto a un sujeto sin tratar. Las cantidades eficaces de un compuesto de la presente invención o composición del mismo para el tratamiento de un sujeto mamífero son de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal del sujeto/día, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/kg/día, especialmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mg/kg/día. Se cree que un amplio intervalo de dosificaciones de la composición descrita son seguras y eficaces.

"Tratar" o "tratamiento" de una enfermedad incluye prevenir que tenga lugar la enfermedad en un mamífero que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero que aún no padece o presenta síntomas de la enfermedad (tratamiento preventivo), inhibir la enfermedad (ralentizar o detener su desarrollo), proporcionar alivio frente a los síntomas o efectos secundarios de la enfermedad (incluido el tratamiento paliativo) y aliviar la enfermedad (causar la regresión de la enfermedad), tal como la ruptura de fibrillas de amiloide o sinucleína preformadas. Un tratamiento preventivo de este tipo puede ser el uso de los compuestos divulgados para el tratamiento de deterioro cognitivo leve (MCI).

El "NAC" (componente no A β) es a fragmento peptídico de 35 aminoácidos de α -sinucleína, que como la α -sinucleína, tiene la capacidad de formar fibrillas similares a amiloide a 37 °C, y es positiva con tintes de amiloides tales como rojo Congo (que muestra una birrefringencia roja/verde cuando se observa bajo luz polarizada) y tioflavina S (que muestra fluorescencia positiva) (Hashimoto y col, Brain Res. 799:301-306, 1998; Ueda y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:11282-11286, 1993). Se cree que la inhibición de la formación, la deposición, la acumulación, la agregación y/o la persistencia de fibrillas de NAC es un tratamiento eficaz para una serie de enfermedades que implican α -sinucleína, tales como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de los cuerpos de Lewy y la atrofia multisistémica.

"Fibrillogénesis" se refiere a la formación, la deposición, la acumulación y/o la persistencia de fibrillas, filamentos, inclusiones, depósitos de amiloide, así como fibrillas, filamentos, inclusiones, depósitos o similares de sinucleína (que habitualmente implica a la α -sinucleína) y/o NAC.

"Inhibición de la fibrillogénesis" se refiere a la inhibición de la formación, la deposición, la acumulación y/o la persistencia de dichas fibrillas de amiloide o depósitos similares de fibrillas de sinucleína.

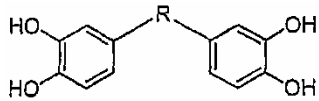
"La ruptura de fibrillas o fibrillogénesis" se refiere a la ruptura de fibrillas de amiloide o sinucleína preformadas que están presentes en una estructura secundaria predominante de lámina β plegada. Dicha ruptura mediante compuestos de la invención puede implicar una reducción o desensamblaje significativo de fibrillas de amilolide o sinucleína tal como se evalúa mediante diversos métodos tales como espectroscopia de dicroísmo circular, fluorimetría de tioflavina T, unión a rojo Congo, SDS-PAGE/inmunotransferencia Western, como se demuestra mediante los ejemplos presentados en la presente solicitud.

"Un agente farmacéutico" o "agente farmacológico" o "composición farmacéutica" se refiere a un compuesto o combinación de compuestos que se usan para el tratamiento, preferentemente en una forma pura o casi pura. En la memoria descriptiva, los agentes farmacéuticos o farmacológicos incluyen los compuestos de la presente invención. Los compuestos están purificados de forma deseable al 80 % de homogeneidad y, preferentemente, al 90 % de homogeneidad. Se cree que los compuestos y composiciones purificadas al 99,9 % de homogeneidad son ventajosos. Como prueba o confirmación, un compuesto homogéneo adecuado en HPLC rendiría, lo que los expertos en la técnica identificarían como una única banda de pico agudo.

Compuestos de la invención

Los compuestos de la presente invención son:

Compuestos de la fórmula:

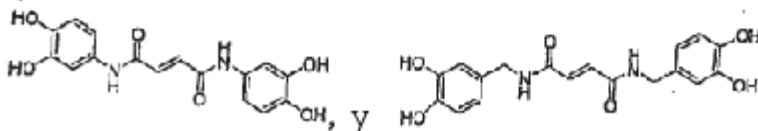
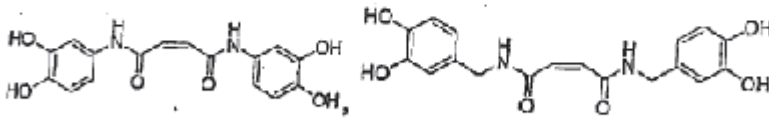
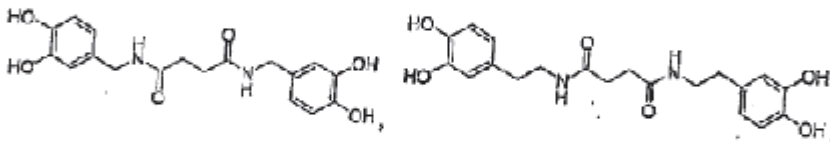
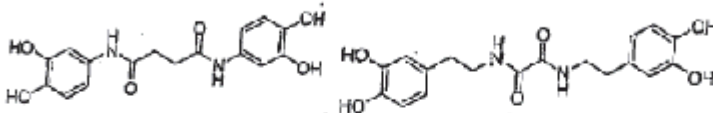
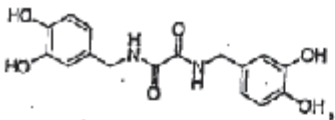


o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la que:

- 5 R es un grupo alquileo C₆-C₁₀, en el que hay:
- i) opcionalmente 1 o 2 enlaces dobles no adyacentes;
 - ii) 1 a 3 grupos metileno no adyacentes están reemplazados por NR', O o S, en la que R' es H, acilo C₂₋₄ o alquilo C₁₋₃ y
 - iii) 2 grupos metileno están reemplazados por un grupo carbonilo o hidroximetileno.

10

Compuestos de la invención particularmente preferidos incluyen:



15 Síntesis de los compuestos de la invención

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse mediante métodos conocidos, en general, por el experto en la técnica, con respecto al conocimiento y la divulgación de la presente solicitud, incluidos los ejemplos 1-24.

20

Los materiales de partida y reactivos usados en la preparación de estos compuestos o bien están disponibles de proveedores comerciales tales como Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Bachem (Torrance, CA), Sigma (St Louis, MO) or Lancaster Synthesis Inc. (Windham, NH) o bien se preparan mediante métodos bien conocidos por el experto en la técnica, siguiendo procedimientos descritos en referencias tales como Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, vol. 1-17, John Wiley and Sons, Nueva York, NY, 1991; Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, vol. 1-5 y supl., Elsevier Science Publishers, 1989; Organic Reactions, vol.1-40, John Wiley and Sons, Nueva York, NY, 1991; Marzo J.: Advanced Organic Chemistry, 4^a ed., John Wiley and Sons, Nueva York, NY; y Larock: Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, Nueva York, 1989.

En la mayor parte de los casos, se introducen grupos protectores de los grupos hidroxilo y finalmente se retiran. Grupos protectores adecuados se describen por Greene y col., Protective Groups in Organic Synthesis, segunda edición, John Wiley and Sons, Nueva York, 1991. Un grupo protector preferente es el grupo metilendioxi, como se observa en muchos de los Ejemplos 1-23, y una amplia diversidad de compuestos de metilendioxfenilo (tales como 3,4-metilendioxiacetofenona, 3,4-metilendioxiánilina, 3,4-metilendioxiacetofenona, ácido 3,4-metilendioxiacetofenico, 3,4-metilendioxiacetofenonitrilo, ácido 3,4-metilendioxiacetofenico, cloruro de 3,4-metilendioxiacetofenilo, ácido 3,4-metilendioxiacetofenico, 3,4-metilendioxiacetofenonitrilo, isocianato de 3,4-metilendioxiacetofenilo, bromuro de 3,4-metilendioxiacetofenil magnesio y 3,4-metilendioxiacetofenilmetanol) están disponibles comercialmente. También pueden usarse otros grupos protectores, tales como los grupos bencilo y metoximetilo.

Pueden prepararse otros materiales de partida o intermedios cercanos mediante la elaboración de los materiales enumerados anteriormente, por ejemplo, mediante métodos bien conocidos por un experto en la técnica.

Los materiales de partida, intermedios y compuestos de la presente invención pueden aislarse y purificarse usando técnicas convencionales, incluidas precipitación, filtración, destilación, cristalización, cromatografía y similares. Los compuestos pueden caracterizarse usando métodos convencionales, incluidas constantes físicas y métodos espectroscópicos.

Farmacología y utilidad

Los compuestos de la presente invención actúan inhibiendo o previniendo la formación de fibrillas de amiloide, inhibiendo y previniendo el crecimiento de fibrillas de amiloide y/o causando el desensamblaje, la ruptura y/o la disgregación de fibrillas de amiloide preformadas y depósitos de proteínas amiloideas. Su actividad puede medirse *in vitro* mediante métodos tales como los tratados en los Ejemplos 25-27, mientras que su actividad *in vivo* contra la amiloidosis puede medirse en modelos de animales, tales como los modelos de ratones transgénicos APP que imitan muchas de las características neuropatológicas de la enfermedad de Alzheimer en seres humanos.

"Enfermedades que implican amiloide" o "amiloidosis" adecuadas para el tratamiento con los compuestos de la presente invención son enfermedades asociadas con la formación, la deposición, la acumulación o la persistencia de fibrillas de amiloide, especialmente las fibrillas de una proteína de amiloide seleccionada del grupo de amiloide A β , amiloide AA, amiloide AL, amiloide IAPP, amiloide PrP, amiloide de α_2 -microglobulina, transtiretina, prealbúmina y procalcitonina, especialmente amiloide A β y amiloide IAPP. Dichas enfermedades adecuadas incluyen enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, demencia pugilística, atrofia multisistémica, miositosis por cuerpos de inclusión, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés, enfermedad de Nieman-Pick de tipo C, angiopatía cerebral β -amiloidea, demencia asociada con degeneración basal cortical, la amiloidosis de la diabetes de tipo 2, la amiloidosis de inflamación crónica, la amiloidosis de tumor maligno y fiebre mediterránea familiar, la amiloidosis de mieloma múltiple y discrasias de linfocitos B, la amiloidosis de las enfermedades priónicas, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, síndrome de Gerstmann-Straussler, kuru, tembladera, la amiloidosis asociada con el síndrome del túnel carpiano, amiloidosis cardíaca senil, polineuropatía amiloidótica familiar y la amiloidosis asociada con tumores endocrinos, especialmente la enfermedad de Alzheimer y la diabetes de tipo 2.

Los compuestos también actúan inhibiendo o previniendo la formación de fibrillas de α -sinucleína/NAC, inhibiendo o previniendo el crecimiento de fibrillas de α -sinucleína/NAC y/o provocando el desensamblaje, la ruptura y/o la disgregación de fibrillas de α -sinucleína/NAC preformadas y depósitos de proteínas asociadas con α -sinucleína/NAC. Su actividad puede medirse *in vitro* mediante métodos similares a los abordados en los Ejemplos 24-26, o *in vivo* en modelos de animales tales como los modelos de ratón transgénico de α -sinucleína que imitan algunas de las características neuropatológicas de la enfermedad de Parkinson y en seres humanos.

"Enfermedades que implican la sinucleína" o "sinucleinopatías" adecuadas para el tratamiento con los compuestos de la presente invención son enfermedades asociadas con la formación, la deposición, la acumulación o la persistencia de fibrillas de sinucleína, especialmente fibrillas de α -sinucleína. Dichas enfermedades adecuadas incluyen la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Parkinson familiar, enfermedad de cuerpos de Lewy, la variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica y complejo parkinsonismo-demencia de Guam.

La relación terapéutica de un compuesto puede determinarse, por ejemplo, comparando la dosis que proporciona una actividad contra las fibrillas (antiamiloides o anti- α -sinucleína/NAC) en un modelo adecuado *in vivo* en una especie animal adecuada tal como el ratón, con la dosis que da una pérdida de peso significativa (u otros efectos secundarios observables) en el ensayo en especies animales.

5

Composiciones farmacéuticas y administración

En general, los compuestos de la invención se administrarán en cantidades terapéuticamente eficaces mediante cualquiera de las maneras habituales conocidas en la técnica, bien solos o bien en combinación con al menos otro compuesto de la presente invención y/o al menos otro agente terapéutico convencional contra la enfermedad que se esta tratando. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar ampliamente dependiendo de la enfermedad, su gravedad, la edad y la salud relativa del animal que se está tratando, la potencia del compuesto o de los compuestos y otros factores. Como agentes antifibrillas, las cantidades terapéuticamente eficaces de los compuestos de la presente invención pueden variar de 0,1-1000 mg/kg de peso corporal/día, tal como de 1-100 mg/kg/día; por ejemplo, 10-100 mg/kg/día. Un experto en la técnica será capaz, de forma convencional, y sin demasiada experimentación, teniendo en cuenta su experiencia y la presente divulgación, de determinar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto para el tratamiento de una enfermedad que implique amiloide tal como una amiloidosis o formación de fibrillas de α -sinucleína/NAC.

10

15

20

Las composiciones preferentes contendrán un compuesto de la presente invención que sea al menos sustancialmente puro. En general, "puro" significa con una pureza superior al 95 %, y "sustancialmente puro" significa un compuesto sintetizado de modo que el compuesto, tanto fabricado como disponible, con respecto a una dosificación terapéutica, tiene solo las impurezas que no pueden eliminarse fácilmente de forma razonable mediante procesos de purificación convencionales.

25

30

En general, los compuestos de la presente invención se administran como composiciones farmacéuticas por una de las vías siguientes: oral, tópica, sistémica (por ejemplo, transdérmica, intranasal, o por supositorio) o parenteral (por ejemplo inyección intramuscular, subcutánea o intravenosa). Las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, semisólidos, polvos, formulaciones de liberación mantenida, soluciones, suspensiones, elixires, aerosoles o cualquier otra composición adecuada; y comprenden al menos un compuesto de la presente invención en combinación con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos, y los mismos y los métodos de formulación de las composiciones, pueden encontrarse en referencias estándar como Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, ed., 20th edition, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.. Los vehículos líquidos adecuados, especialmente para soluciones inyectables, incluyen agua, solución salina acuosa, solución de dextrosa acuosa y glicoles.

35

40

En particular, el compuesto o los compuestos (de forma óptima se administra solo un compuesto de este tipo en cualquier forma de dosificación particular) se pueden administrar por vía oral, por ejemplo, como comprimidos, trociscos, pastillas masticables, suspensión acuosa u oleosa, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, jarabes o elixires. Las composiciones destinadas al uso oral se pueden preparar según cualquier método conocido en la técnica de la fabricación de composiciones farmacéuticas y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en edulcorantes, saborizantes, colorantes y conservantes para proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y agradables al gusto.

45

50

Los comprimidos contienen el compuesto en mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables, no tóxicos, que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Esos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y disgregantes, por ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico; aglutinantes, por ejemplo, almidón de maíz, gelatina o goma acacia y lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio o ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden no recubrirse o pueden recubrirse usando técnicas conocidas para retardar su disgregación y su absorción en el tubo digestivo y proporcionar, de este modo, una acción mantenida durante un período más prolongado. Por ejemplo, puede usarse un material de retardo temporal tal como monoestearato de glicerina o diestearato de glicerina. Las formulaciones para uso oral también pueden estar presentes como cápsulas de gelatina dura en las que se mezcla el principio activo con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en las que el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

55

60

Las suspensiones acuosas contienen el compuesto en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma acacia; los dispersantes o humectantes pueden ser fosfátidos de origen natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo, heptadecaetilenoxicetanol o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos como hexitol, como monooleato de polioxietileno-sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales de ácidos grasos y un anhídrido de hexitol, por ejemplo, monooleato de polietileno-sorbitán. Las suspensiones

65

acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más colorantes, uno o más saborizantes, o uno o más edulcorantes como sacarosa o sacarina.

5 Las suspensiones oleosas se pueden formular suspendiendo el compuesto en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un espesante, por ejemplo cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden añadir edulcorantes, tales como los indicados a continuación, y saborizantes para proporcionar una preparación oral agradable al gusto. Estas composiciones se pueden conservar añadiendo un antioxidante como ácido ascórbico. Los polvos y los gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa
10 mediante la adición de agua, proporcionan al principio activo en mezcla con un dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Los dispersantes o humectantes y los agentes de suspensión adecuados están ejemplificados por los descritos ya anteriormente. También pueden estar presentes otros excipientes, por ejemplo edulcorantes, saborizantes y agentes.

15 Los compuestos de la invención pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo aceite de oliva o aceite de cacahuete, o un aceite mineral, por ejemplo parafina líquida, o mezcla de los mismos. Los emulsionantes adecuados pueden ser gomas de origen natural, por ejemplo goma acacia o goma tragacanto, fosfátidos de origen natural, por ejemplo soja, lecitina y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de sorbitán, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato de polioxietileno-sorbitán. La emulsión también puede contener edulcorantes y saborizantes. Los jarabes y elixires se pueden formular con edulcorantes, por ejemplo, glicerina, sorbitol o sacarosa. Dichas formulaciones también pueden contener un emoliente, un conservante y saborizantes y colorantes.

25 Los compuestos de la invención también se pueden administrar mediante inyección o infusión, bien por vía subcutánea o bien intravenosa, o intramuscular o intraesternal o intranasal, o mediante técnicas de infusión en forma de inyectable estéril o suspensión oleaginosas. Los compuestos también pueden estar en forma de suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles. Esas suspensiones se pueden formular según la técnica conocida usando dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados que se han descrito anteriormente. La
30 preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden usar se encuentran agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, convencionalmente se usan aceites fijos, estériles, como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito se pueden usar convencionalmente todos los aceites fijos blandos, incluidos mono o diglicéridos sintéticos. Además, se usan ácidos grasos, como el ácido oleico, en la preparación de inyectables. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar una respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar diariamente varias dosis divididas o la dosis se puede reducir proporcionalmente en función de las exigencias de la situación terapéutica.

40 Es especialmente ventajoso formular los compuestos en una forma farmacéutica unidad para facilitar la administración y la uniformidad de dosis. Forma farmacéutica unidad, tal como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos que se van a tratar, conteniendo cada una una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto y al menos un excipiente farmacéutico. Un producto farmacéutico comprenderá una forma farmacéutica unidad dentro de un envase que está etiquetado o
45 está acompañado por una etiqueta que indica el método de tratamiento pretendido, tal como el tratamiento de una amiloidosis, por ejemplo una amiloidosis tal como la enfermedad de Alzheimer o una enfermedad asociada a la formación de fibrillas de α -sinucleína/NAC tal como la enfermedad de Parkinson.

Formulaciones de liberación mantenida

50 La invención también incluye la utilización de formulaciones de liberación mantenida para suministrar los compuestos de la presente invención a la diana deseada (es decir, el cerebro u órganos sistémicos) a niveles en circulación elevados (entre 10^{-9} y 10^{-4} M) son también divulgados. En una realización preferente para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o de Parkinson, los niveles en circulación de los compuestos se mantienen hasta
55 una concentración 10^{-7} M. Los niveles están bien en circulación en el paciente de forma sistémica o bien, en una realización preferente, están presentes en el tejido cerebral, y en las realizaciones más preferentes, están ubicados en los depósitos de fibrillas de amiloide o de α -sinucleína en el cerebro u otros tejidos.

60 Se entiende que los niveles de compuestos de mantienen durante un determinado periodo de tiempo como se desee y pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica usando la divulgación y los compuestos de la invención. En una realización preferente, la invención incluye una característica única de administración que comprende una formulación de liberación mantenida de modo que se mantenga un nivel constante de compuesto terapéutico entre 10^{-8} y 10^{-6} M entre 48 y 96 horas en el suero.

65 Dichas formulaciones de liberación mantenida y/o prolongada pueden fabricarse con medios de liberación mantenida de dispositivos de administración que son bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como los descritos en

las patentes de Estados Unidos N° 3.845.770; 3.916.899; 3.536.809; 3. 598.123; 4.008.719; 4.710.384; 5.674.533; 5.059.595; 5.591.767; 5.120.548; 5.073.543; 5.639.476; 5.354.556 y 5.733.566.

5 Estas composiciones farmacéuticas pueden usarse para proporcionar una liberación lenta o mantenida de uno o más de los compuestos activos usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa, otras matrices poliméricas, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, recubrimientos de varias capas, micropartículas, liposomas, microesferas y similares. Las formulaciones de liberación mantenida conocidas por los expertos en la técnica, incluidas las descritas en el presente documento, pueden seleccionarse fácilmente para usar con las composiciones farmacéuticas de la invención. De este modo, están abarcadas por la presente invención formas de dosificación
10 unidad individuales para la administración por vía oral tales como, pero sin limitación, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gelatina, comprimidos oblongos, polvos y similares, que están adaptadas para una liberación mantenida.

15 En una realización preferente, la formulación de liberación mantenida contiene compuestos activos tales como, pero sin limitación, celulosa microcristalina, maltodextrina, etilcelulosa y estearato de magnesio. Tal como se ha descrito anteriormente, todos los métodos conocidos de encapsulación que son compatibles con las propiedades de los compuestos divulgados están abarcadas por la presente invención. La formulación de liberación mantenida se encapsula mediante partículas o gránulos de recubrimiento de la composición farmacéutica de la invención con espesor variable de polímeros de solubilización lenta o mediante microencapsulación. En una realización preferente,
20 la formulación de liberación mantenida es encapsulada con un material de recubrimiento de espesor variable (por ejemplo, aproximadamente 1 micrómetro a 200 micrómetros) que permite la disolución de la composición farmacéutica de aproximadamente 48 horas a aproximadamente 72 horas después de la administración a un mamífero. En otra realización, el material de recubrimiento es un aditivo aprobado para uso alimentario.

25 En otra realización, la formulación de liberación mantenida es un dispositivo de disolución de matriz que se prepara prensando el fármaco con un vehículo polimérico de disolución lenta dando un comprimido. En una realización preferente, las partículas recubiertas tienen un intervalo de tamaño de entre aproximadamente 0,1 a aproximadamente 300 micrómetros, como se divulga en las patentes de Estados Unidos N° 4.710.384 y 5.354.556.

30 Cada una de las partículas está en forma de una micromatriz, con el ingrediente activo distribuido uniformemente a través del polímero.

Se divulgan formulaciones de liberación mantenida, tales como las descritas en la patente de Estados Unidos N° 4.710.384, que tienen un porcentaje de plastificante en el recubrimiento para permitir una flexibilidad suficiente para prevenir la rotura sustancial durante el prensado. La cantidad específica de plastificante varía dependiendo de la naturaleza del recubrimiento y del plastificante particular usado. La cantidad puede determinarse fácilmente analizando las características de liberación de los comprimidos formados. Si el medicamento se libera de forma demasiado rápida, se usa más plastificante. Las características de liberación también son función del espesor del recubrimiento. Cuando se usan cantidades sustanciales de plastificante, la capacidad de liberación mantenida del
40 recubrimiento disminuye. De este modo, el espesor del recubrimiento puede aumentarse ligeramente para obtener un aumento de la cantidad de plastificante. El general, el plastificante, en dicha realización, estará presente en una cantidad de aproximadamente el 15 al 30 % del material de liberación mantenida en el recubrimiento, preferentemente del 20 al 25 %, y la cantidad de recubrimiento será del 10 al 25 % del peso del material activo, preferentemente del 15 al 20 %. Puede incorporarse al recubrimiento cualquier plastificante farmacéuticamente
45 aceptable convencional.

Los compuestos de la invención pueden formularse como una formulación de liberación mantenida y/o programada. Todos los productos farmacéuticos de liberación mantenida tienen el objetivo común de mejorar la terapia farmacológica con respecto a la lograda por sus homólogos de liberación no mantenida. De forma ideal, el uso de una preparación de liberación mantenida diseñada de forma óptima en un tratamiento médico se caracteriza por usar un mínimo de sustancia farmacológica para curar o controlar la afección. Las ventajas de las formulaciones de liberación mantenida pueden incluir: 1) actividad prolongada de la composición, 2) frecuencia de dosificación reducida y 3) mayor cumplimiento por parte del paciente. Además, las formulaciones de liberación mantenida pueden usarse para influir en el momento de aparición de la actividad o en otras características, tales como niveles en sangre de la composición, y pueden influir, de este modo, en la aparición de efectos secundarios.
50

Las formulaciones de liberación mantenida de la invención están diseñadas para liberar inicialmente una cantidad de composición terapéutica que produzca abruptamente el efecto terapéutico deseado y para liberar gradualmente y en continuo otras cantidades de composiciones para mantener este nivel de efecto terapéutico durante un periodo de tiempo prolongado. Con el fin de mantener este nivel constante de fármaco en el organismo, la composición farmacéutica debe liberarse de la forma de dosificación a una velocidad que reemplace la composición que se metaboliza o se excreta del organismo.
60

La liberación mantenida de un ingrediente activo puede estimularse mediante diversos inductores, por ejemplo pH, temperatura, enzimas, agua u otras condiciones fisiológicas o compuestos. La expresión "componente de liberación mantenida" en el contexto de la presente invención se define en el presente documento como un compuesto o
65

compuestos, que incluye, pero sin limitación, polímeros, matrices poliméricas, geles, membranas permeables, liposomas, microesferas o similares, o una combinación de los mismos, que facilita la liberación mantenida del ingrediente activo.

- 5 Si el complejo es soluble en agua, puede formularse en un tampón apropiado, por ejemplo solución salina tamponada con fosfatos u otras soluciones fisiológicamente compatibles. Alternativamente, si el complejo resultante tiene poca solubilidad en disolventes acuosos, entonces puede formularse con un tensioactivo no iónico tal como Tween o polietilenglicol. De este modo, los compuestos y sus disolventes fisiológicos pueden formularse para administración por inhalación o insuflación (bien a través de la boca o de la nariz) o para administración por vía oral, bucal, parenteral o rectal, por ejemplo.

15 Las preparaciones para administración por vía oral pueden formularse adecuadamente para proporcionar la liberación controlada del compuesto activo. En una realización preferente, los compuestos de la presente invención se formulan como polvos de liberación controlada de micropartículas discretas que pueden formularse fácilmente en forma líquida. El polvo de liberación mantenida comprende partículas que contienen un ingrediente activo y, opcionalmente, un excipiente con un menos un polímero no tóxico.

20 El polvo puede dispersarse o suspenderse en un vehículo líquido y mantendrá sus características de liberación mantenida durante un periodo de tiempo útil. Estas dispersiones o suspensiones tienen tanto estabilidad química como estabilidad en términos de velocidad de disolución. El polvo puede contener un excipiente que comprende un polímero, que puede ser soluble, insoluble, permeable, impermeable o biodegradable. Los polímeros pueden ser polímeros o copolímeros. El polímero puede ser un polímero natural o sintético. Los polímeros naturales incluyen polipéptidos (por ejemplo, zeína), polisacáridos (por ejemplo, celulosa) y ácido algínico. Los polímeros representativos incluyen los descritos, pero sin limitación, los descritos en la columna 3, líneas 33-45 de la patente de Estados Unidos N° 5.354.556. Los polímeros particularmente adecuados incluyen los descritos, pero sin limitación, en la columna 3, línea 46-columna 4, línea 8 de la patente de Estados Unidos N° 5.354.556.

30 Los compuestos de liberación mantenida de la invención pueden formularse para la administración por vía parenteral, por ejemplo, mediante inyecciones intramusculares o implantes para tejidos subcutáneos y diversas cavidades corporales y dispositivos de uso transdérmico. En una realización, las inyecciones intramusculares se formulan como suspensiones acuosas o en aceite. En una suspensión acuosa, el efecto de liberación mantenida se debe, en parte, a una reducción en la solubilidad del compuesto activo después de la complejación o una disminución de la velocidad de disolución. Se realiza un enfoque similar con suspensiones y soluciones en aceite, en las que la velocidad de un compuesto activo se determina repartiendo el compuesto activo fuera del aceite en el medio acuoso circundante. Solo son adecuados los compuestos activos que son solubles en aceite y tienen las características de reparto deseadas. Los aceites que pueden usarse para inyección intramuscular incluyen, pero sin limitación, aceite de sésamo, de oliva, de cacahuete, de maíz, de almendra, de soja, de semilla de algodón y de ricino.

40 Una forma muy desarrollada de administración del fármaco que imparte una liberación mantenida durante periodos de tiempo que varían de días a años es implantar un dispositivo polímero que porta el fármaco subcutáneamente o en diversas cavidades corporales. El material polimérico usado en un implante, que debe ser biocompatible y no tóxico, incluye, pero sin limitación, hidrogeles, siliconas, polietilenos, copolímeros de etileno-acetato de vinilo o polímeros biodegradables.

45

Ejemplos

Procedimientos experimentales generales

50 Todos los disolventes se destilaron antes de su uso y después se eliminaron mediante evaporación giratoria a temperaturas de hasta 35 °C. Se usó un gel de sílice funcionalizado con octadecilo (C18) para la cromatografía ultrarrápida de fase inversa (RP) y se usó para la cromatografía ultrarrápida en gel de sílice el gel de sílice de Merck 60, 200-400 de malla, 40-63 µm. La cromatografía en capa fina (TLC) se llevó a cabo usando gel de sílice en laminas de plástico DC 60 F₂₅₄, visualizado en primer lugar con una lámpara UV y después sumergiéndolo en una solución de vainillina (vainillina al 1 %, H₂SO₄ al 1 % en etanol) y calentándolo. Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro de Perkin-Elmer 241. Los espectros de masas se registraron en un instrumento Kratos MS-80. Los espectros de RMN, a 25 °C, se registraron a 500 o 300 MHz para ¹H y 125 o 75 MHz para ¹³C en espectrómetros Varian INOVA-500 o VXR-300. Los desplazamientos químicos se dan en ppm en la escala delta referenciada a los picos de disolventes CHCl₃ a 7,25 y CDCl₃ a 77,0 ppm, (CH₃)₂CO a 2,15 y (CD₃)₂CO a 30,5 ppm, o CH₃OD a 3,30 y CD₃OD a 39,0 ppm.

60

Condiciones de HPLC

65 El equipo de HPLC analítica consistió en un automuestreador Waters 717, bomba 600 y controlador y un detector UV 2487 controlado por el programa informático Omega. Las muestras se analizaron usando una columna semipreparativa RP-18 (Phenomenex Prodigy 5 mm C18 100A, 250 x 4,6 mm) con una columna de guardia

(cartucho Phenomenex SecurityGuard que contiene una columna C18 ODS 4 x 3 mm, 5 mm) adaptada a 30 °C. Las muestras (5 ml) se analizaron usando un caudal de fase móvil de 5,0 ml/min, con detección UV a 280 nm.

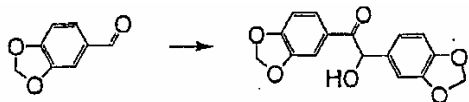
Método 1:

Tiempo (minutos)	CH ₃ CN	H ₂ O que contiene TFA al 0,1 %
0	11	89
20	11	89
30	100	0
31	11	89
40	11	89

Método 2:

Tiempo (minutos)	CH ₃ CN/H ₂ O (95:5) que contiene TFA al 0,1 %	H ₂ O que contiene TFA al 0,1 %
0	11	89
20	11	89
30	100	0
31	11	89
40	11	89

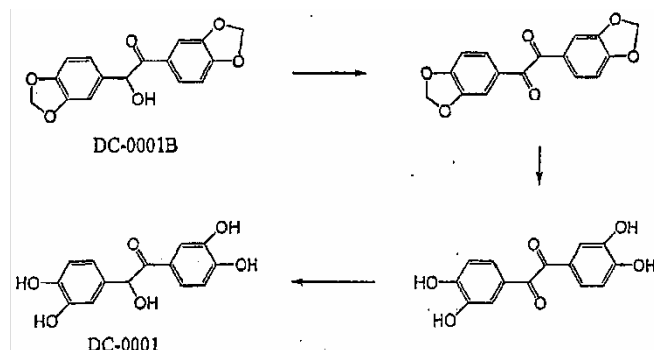
- 10 Ejemplo comparativo 1: 3,4,3',4'-Tetrahidroxibenzoína (Compuesto 1; DC-0001) Bis(3,4-metilendioxi)benzoína (compuesto 1B; DC-0001B)



- 15 Una solución de piperonal (5 g) en etanol (6,5 ml) se trató con una solución de cianuro de potasio (0,5 g) en agua (5 ml), después se sometió a reflujo durante 5 h. El precipitado resultante se separó por filtración, se lavó con agua y después se cristalizó a partir de etanol, dando DC-0001B (2,24 g, 45 %) como un sólido cristalino blancuzco.

- 20 RMN de ¹H (CDCl₃) 7,52 (1H, dd, J 2, 8Hz), 7,39 (1H, d, J 2Hz), 6,73 - 6,82 (4H, m), 6,02 (2H, s), 5,91 (2H, m), 5,76 (1H, d, J 6Hz) y 4,51 (1H, d, J 6Hz).

m/z 287 ((M - CH)-, 100 %).



- 25 Bis(3,4-metilendioxi)bencilo

- 30 Una mezcla de acetato de cobre (20 mg), nitrato de amonio (660 mg) y DC-0001B (2 g) en ácido acético ac. (80 %, 10 ml) se sometió a reflujo conjuntamente durante 90 minutos. La mezcla se enfrió, después se vertió en agua (100 ml) y el producto se extrajo en acetato de etilo (2 x 100 ml), se secó y se evaporó al vacío dando una goma amarilla. La trituración a partir de etanol dio bis(3,4-metilendioxi)bencilo (1,35 g, 68 %) como un sólido amarillo pálido.

RMN de ^1H 7,48 (2H, dd, J 2, 8Hz) 7,47 (2H, d, J 2Hz), 6,86 (2H, d, J 8Hz) y 6,08 (4H, s).

3,4,3',4'-Tetrahidroxibencilo

5 A una solución agitada de bis(3,4-metilendioxi)bencilo (500 mg) en CH_2Cl_2 seco (50 ml) en atmósfera de nitrógeno, se añadió lentamente tribromuro de boro (1,6 ml), después se continuó agitando durante otras 3,5 horas. Se añadió cuidadosamente metanol (100 ml), después el disolvente se evaporó al vacío hasta un volumen de 1 ml; esta adición y evaporación se repitió dos veces. El producto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, dando la elución con dietiléter en diclorometano 3,4,3',4'-tetrahidroxibencilo (217 mg, 47 %) como un polvo amarillo.

10 RMN de ^1H 9,35 (2H, s ancho), 8,80 (2H, s ancho), 7,48 (2H, d, J 2Hz), 7,34 (2H, dd, J 2, 8Hz) y 7,02 (2H, d, J 8Hz). m/z 273 ((M-H) $^+$, 100 %).

HPLC (método 2) 31,3 minutos.

15

3,4,3',4'-Tetrahidroxibenzoína (Compuesto 1; DC-0001)

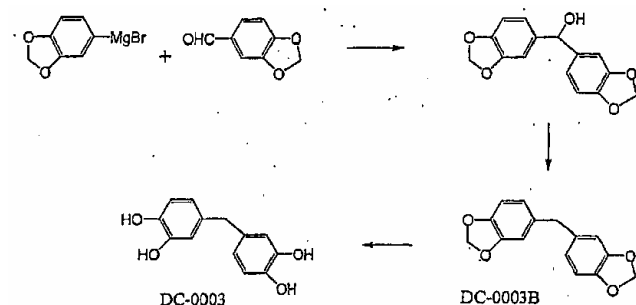
20 Una solución del tetrahidroxibencilo (200 mg) en metanol (20 ml) con hidróxido de paladio en carbono (20 %, 10 mg) se agitó en atmósfera de hidrógeno durante 5 minutos. La mezcla se filtró a través de celite y los disolventes se eliminaron al vacío dando una goma naranja. La separación mediante cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con acetato de etilo al 20 % en diclorometano dio DC-0001 como una goma blancuzca (55 mg, 27 %). La recristalización a partir de metanol/diclorometano dio DC-0001 puro como un polvo blancuzco (27 mg, 13 %).

25 RMN de ^1H ((CD_3) $_2\text{CO}$) 7,41 (1H, d, J 2Hz), 7,35 (1H, dd, J 2, 8Hz), 6,75 (1H, d, J 8Hz), 6,73 (1H, d, J 2Hz), 6,69 (1H, d, J 8Hz), 6,64 (1H, dd, J 2, 8Hz), 5,69 (1H, d ancho) y 4,60 (1H, d ancho).

RMN de ^{13}C ((CD_3) $_2\text{CO}$) 198,22, 151,41, 145,77, 145,68, 145,43, 132,79, 127,07, 123,92, 120,52, 116,69, 116,20, 115,59, 115,36 y 75,97. m/z 275 ((M-H) $^+$, 100 %).

30 HPLC (método 1) 7,1 minutos.

Ejemplo comparativo 2: 3,4,3',4'-Tetrahidroxidifenilmetano (Compuesto 3; DC-0003)



35

Bis(3,4-metilendioxfenil)metanol

40 A una solución de piperonal (0,75 g) en solución en diclorometano (25 ml) se añadió gota a gota bromuro de 3,4-(metilendioxi)fenilmagnesio (5 ml, solución 1 M en tolueno/THF). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, después se vertió en agua, se extrajo con diclorometano, se secó y se evaporó al vacío dando el alcohol bruto como una goma marrón. La purificación mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con acetato de etilo en CH_2Cl_2 (10 al 20 %) dio el alcohol puro como una goma blanca (1,18 g, 87 %).

45 RMN de ^1H (CDCl_3) 6,7-6,8 (6H, m), 5,93 (4H, s), 5,66 (1H, s ancho) y 2,18 (s ancho).

Bis(3,4-metilendioxfenil)metano (compuesto 3B; DC-0003B)

50 Una solución del alcohol (2,61 g) en metanol (25 ml)/tetrahydrofurano (30 ml) se agitó con $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (al 20 %, 100 mg) en atmósfera de hidrógeno durante 12 horas. La mezcla se filtró a través de celite, después los disolventes se eliminaron al vacío dando una goma marrón (2,4 g). La cristalización a partir de acetona dio DC-0003B como cristales blancos (1,14 g, 44 %).

RMN de ^1H (CDCl_3) 6,6-6,8 (6H, m), 5,90 (4H, s) y 3,79 (2H, s).

55 3,4,3',4'-Tetrahidroxidifenilmetano (Compuesto 3; DC-0003)

5 A una solución agitada de DC-0003B (0,214 mg) en CH_2Cl_2 seco (25 ml) en atmósfera de nitrógeno, se añadió lentamente tribromuro de boro (0,4 ml), después se continuó agitando durante otras 3,5 horas. Se añadió cuidadosamente metanol (50 ml), después el disolvente se evaporó al vacío hasta un volumen de 1 ml; esto se repitió después 2 veces más. El producto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, dando la elución con acetato de etilo DC-0003 (48 %) como un sólido blancuzco.

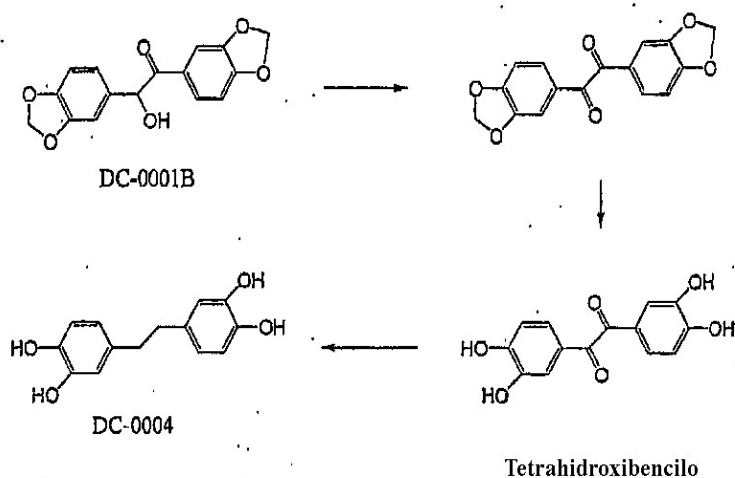
RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 7,73 (2H, s), 7,66 (2H, s), 6,74 (2H, d, J 8Hz), 6,67 (2H, d, J 2Hz), 6,56 (2H, dd, J 2, 8Hz) y 3,70 (2H, s).

10 RMN de ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 146,51, 144,80, 135,34, 121,59, 117,45, 116,64 y 41,90. m/z 232 (M^+ , 100 %).

HPLC (método 1) 31,1 minutos.

Ejemplo comparativo 3: 1,2-bis(3,4-dihidroxiifenil)etano (compuesto 4; DC-0004)

15



1,2-bis(3,4-dihidroxiifenil)etano (compuesto 4; DC-0004)

20 Una solución del tetrahidroxibencilo (véase el Ejemplo 1) (70 mg) en metanol (10 ml) con hidróxido de paladio en carbono (al 20 %, 10 mg) se agitó en atmósfera de hidrógeno durante 2 minutos. La mezcla se filtró a través de celite y los disolventes se eliminaron al vacío dando una goma naranja. La separación mediante cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con acetato de etilo al 20 % en diclorometano dio DC-0004 como una goma blancuzca (43 g, 68 %).

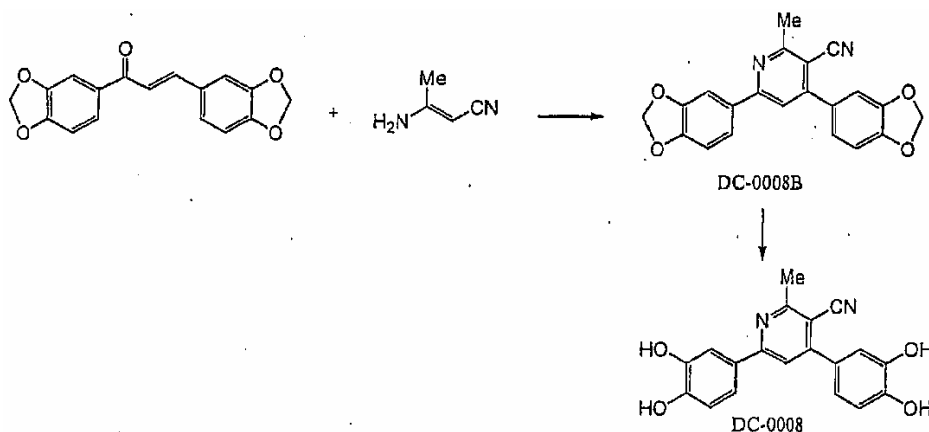
25

RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 7,73 (4H, s ancho), 6,80 (2H, d, J 8Hz), 6,79 (2H, d, J 2Hz), 6,62 (2H, dd, J 2, 8Hz) y 2,79 (4H, s). m/z 245 ($(\text{M}-\text{H})^+$, 100 %).

HPLC (método 2) 31,7 minutos.

30

Ejemplo comparativo 4: 4,6-bis(3,4-dihidroxiifenil)-3-ciano-2-metilpiridina (compuesto 8; DC-0008)



4.6-bis(3,4-metilendioxfenil)-3-ciano-2-metilpiridina (compuesto 8B: DC-0008B)

A una solución de la chalcona (véase más adelante) (300 mg, 1,0 mmol) y 3-aminocrotonitrilo (82 mg, 1,2 mmol) en acetonitrilo seco se añadió terc-butóxido de potasio (560 mg) y la mezcla se agitó durante 18 h. La mezcla se vertió después en agua, se extrajo con acetato de etilo, se secó y se evaporó al vacío. La recristalización a partir de diclorometano/éter dio DC-0008B (152 mg, 42 %) como un polvo blancuzco.

RMN de ^1H (CDCl_3) 7,60 (2H, m), 7,52 (1H, s), 7,10 (2H, m), 6,93 (2H, m), 6,07 (2H, s), 6,05 (2H, s) y 2,87 (3H, s).

m/z 359 ((M+1)⁺, 100 %).

4.6-bis(3,4-dihidroxfenil)-3-ciano-2-metilpiridina (compuesto 8: DC-0008)

A una solución agitada de DC-0008B (0,10 g) en CH_2Cl_2 seco (25 ml) en atmósfera de nitrógeno, se añadió lentamente tribromuro de boro (0,2 ml), después se continuó agitando durante otras 2 horas. Se añadió cuidadosamente metanol (50 ml), después el disolvente se evaporó al vacío hasta un volumen de 1 ml; esto se repitió después 2 veces más. El producto se recristalizó a partir de metanol/acetone dando DC-0008 puro como cristales amarillos pequeños (64 mg, 69 %).

RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 8,19 (1H, s), 7,86 (1H, d, J 2Hz), 7,75 (1H, dd, J 2, 8Hz), 7,58 (1H, d, J 2Hz), 7,45 (1H, dd, J 2, 8 Hz), 7,16 (1H, d, J 8Hz), 7,13 (1H, d, J 8Hz) y 2,73 (3H, s).

m/z 335 ((M+1)⁺, 100 %).

HPLC (método 2) 31,8 minutos.

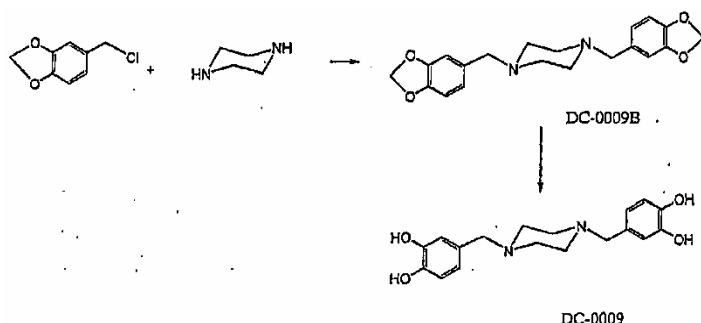
Bis(3,4-metilendioxi)chalcona (compuesto 6B: DC-0006B)

DC-0006B

Una mezcla de piperonal (460 mg) y 3,4-metilendioxiacetofenona (500 mg) en etanol (20 ml) se trató con solución 1 M de NaOH (4 ml), después la mezcla se agitó durante la noche. El sólido cristalino amarillo pálido se separó por filtración, se lavó con agua, después con etanol acuoso frío y se secó dando bis(3,4-metilendioxi)chalcona pura DC-0006B (476 mg, 53 %).

RMN de ^1H (CDCl_3) 7,72 (1H, d, J 16Hz), 7,64 (1H, dd, J 2, 8Hz), 7,52 (1H, d, J 2Hz), 7,33 (1H, d, J 16Hz), 7,16 (1H, d, J 2Hz), 7,12 (1H, dd, J 2, 8Hz), 6,89 (1H, d, J 8Hz), 6,84 (1H, d, J 8Hz), 6,06 (2H, s) y 6,03 (2H, s).

m/z 297 ((M+1)⁺, 100 %).

Ejemplo comparativo 5: 1,4-bis(3,4-dihidroxbencil)piperazina (compuesto 9: DC-0009)Método 1 - mediante compuestos protegidos con metilendioxi1,4-bis-(3,4-metilendioxbencil)piperazina (DC-0009B)

A una solución de piperazina (207 mg) en DMF seca (5 ml) en atmósfera de nitrógeno se añadió hidruro de sodio (al

80 % p/p en aceite, 250 mg), seguido por cloruro de 3,4-metilendioxicibencilo (0,90 g) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió lentamente NaOH (50 ml, 1 M), después solución saturada de NaCl (50 ml) y el producto se extrajo con diclorometano (2 x 100 ml). La capa orgánica se lavó con agua (2 x 100 ml), se secó y se evaporó al vacío dando un sólido blanco. La cromatografía en columna eluyendo con proporciones crecientes de éter en diclorometano dio DC-0009B puro (0,68 g, 80 %) como un polvo blanco.

RMN de ^1H (CDCl_3) 6,85 (2H, s), 6,70 (4H, s), 5,94 (4H, s), 3,42 (4H, s) y 2,45 (8H, a ancho). m/z 355 ((M+1) $^+$, 100 %).

10 1,4-bis-(3,4-dihidroxicibencil)piperazina (DC-0009)

A una solución agitada de DC-0009B (200 mg) en CH_2Cl_2 seco (25 ml) en atmósfera de nitrógeno, se añadió lentamente tribromuro de boro (0,6 ml), después se continuó agitando durante otras 30 minutos. Se añadió cuidadosamente metanol (50 ml), después el disolvente se evaporó al vacío hasta un volumen de 1 ml y esta adición y evaporación se repitió dos veces. La purificación mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con metanol al 20 % en cloroforma dio una fracción que contenía producto bruto DC-0009 (51 mg, 27 %) como un polvo blanco.

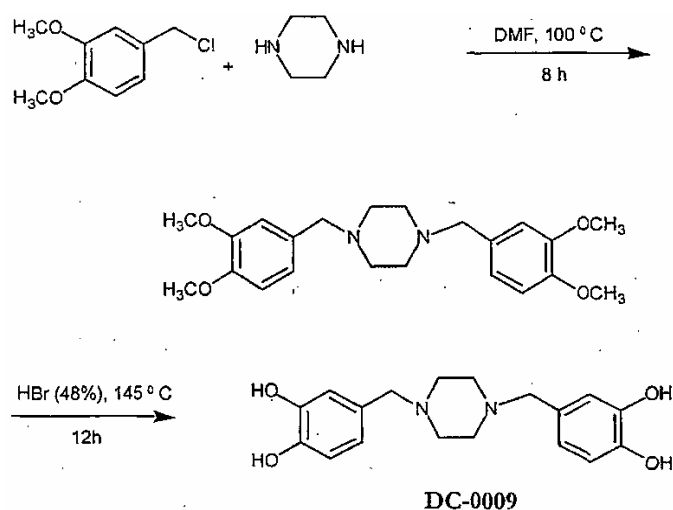
RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 6,88 (2H, d, J 2Hz), 6,78 (2H, d, J 8Hz), 6,67 (2H, dd, J 2, 8Hz), 3,36 (4H, s) y 2,50 (8H, s ancho).

RMN de ^{13}C ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 146,50, 145,85, 131,17, 122,15, 117,78, 116,44, 63,72 y 54,23. m/z 331 ((M+H) $^+$, 100 %)

HPLC (método 2) 3,79, 3,22 minutos para las formas monoprotonadas y diprotonadas.

25

Método 2 - mediante compuestos protegidos con metoxi



30 Cloruro de 3,4-dimetoxicibencilo

Se disolvió alcohol 3,4-dimetoxicibencílico (20 g, 119 mmol) en tolueno (60 ml) y se enfrió a 0 °C. Se añadió gota a gota cloruro de tionilo (7,48 g, 61,4 mmol) a la solución enfriada del alcohol durante un periodo de 30 minutos y la reacción se mantuvo a 0 °C durante 30 minutos adicionales. La reacción se inactivó vertiéndola en una mezcla de hielo/agua (100 ml) y la fase orgánica se separó. La fase acuosa se extrajo después en tolueno (2 x 20 ml) y la solución de tolueno combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El tolueno se eliminó a presión reducida proporcionando un aceite que solidificó en reposo, con un rendimiento de 21 g. El material se caracterizó como una única mancha mediante cromatografía de capa fina (TLC).

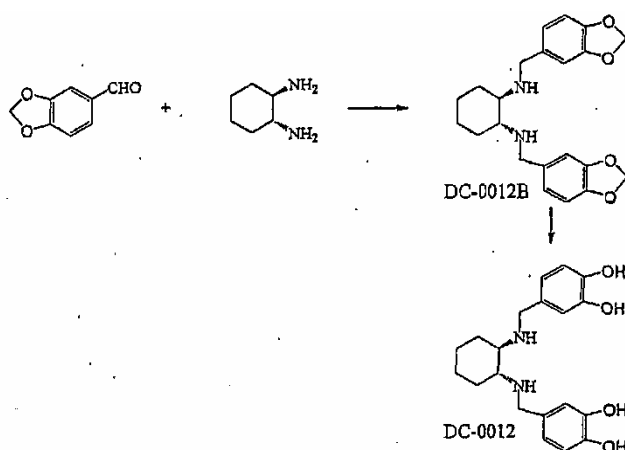
40 1,4-Bis(3,4-dimetoxicibencil)piperazina

Se combinó cloruro de 3,4-dimetoxicibencilo (10 g, 53,6 mmol) con piperazina (2,3 g, 26,8 mmol) en DMF anhidra (30 ml) y se calentó con agitación en atmósfera de nitrógeno durante 8 horas a 95-100 °C. La mezcla de reacción enfriada se diluyó con agua (100 ml) y se acidificó hasta pH 1 con ácido clorhídrico concentrado. El precipitado blanco se recogió por filtración y se lavó con agua (50 ml). El sólido se resuspendió en agua (50 ml) y el pH se ajustó a > 9 mediante la adición gota a gota de hidróxido de sodio (NaOH al 50 % en agua). El sólido blanco resultante se recogió por filtración y se secó al vacío a 50 °C, proporcionando 10 g.

1,4-bis-(3,4-dihidroxicibencil)piperazina (DC-0009)

Se combinó 1,4-bis(3,4-dimetoxibencil)piperazina (5 g, 12,95 mmol) con ácido bromhídrico (50 ml de solución al 48 % p/p en agua) y la solución se calentó lentamente en un periodo de 1 hora a 145 °C. La reacción se mantuvo a 145 °C durante 12 h, momento en el que la TLC reveló la desaparición del material de partida. La solución enfriada se diluyó con agua (200 ml), se neutralizó cuidadosamente con hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado y se añadió acetato de etilo (100 ml). La mezcla de disolventes acuosos bruta se filtró a través de celite y se separó la capa de acetato de etilo. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 50 ml) y los extractos combinados se lavaron con agua (50 ml) y se secaron (Na₂SO₄). El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se recristalizó a partir de tolueno y metiletilcetona proporcionando el producto DC-0009, 100 mg (98 % de pureza por análisis HPLC).

Ejemplo comparativo 6: N,N'-bis(3,4-dihidroxibencil)-trans-1,2-diaminociclohexano (compuesto 12; DC-0012)



15 N,N'-bis(3,4-metilendioxibencil)-trans-1,2-diaminociclohexano (compuesto 12B; DC-0012B)

A una solución de piperonal (0,8 g, 5,3 mmol) y 1,2-diaminociclohexano (0,296 g, 2,6 mmol) en metanol seco (25 ml) se añadió cianoborohidruro de sodio (0,38 g, 6 mmol) y la mezcla se agitó durante 48 h. La mezcla se filtró y los disolventes se eliminaron al vacío dando el producto bruto. La cristalización a partir de metanol dio DC-0012B como un sólido cristalino blancuzco (0,298 g, 30 %). RMN de ¹H (CDCl₃) 6,83 (2H, s), 6,75 (4H, s), 5,94 (4H, m), 3,80 (2H, d, J 13Hz), 3,56 (2H, d, J 13Hz), 2,22 (2H, m), 2,18 (2H, m), 1,74 (4H, m), 1,22 (2H, m) y 1,02 (2H, m).

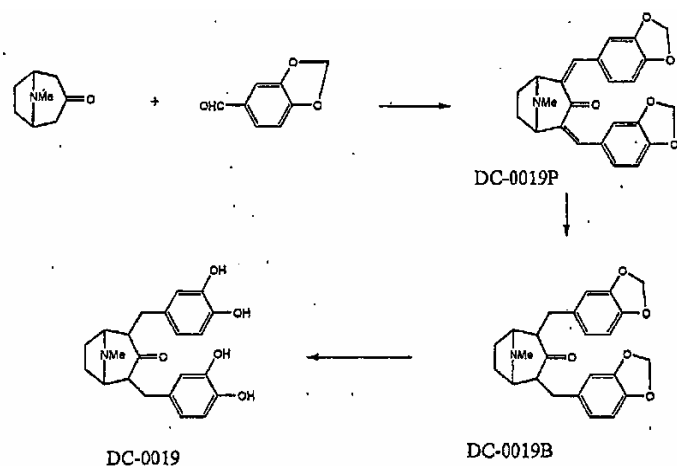
25 N,N'-bis(3,4-dihidroxibencil)-trans-1,2-diaminociclohexano (compuesto 12; DC-0012)

A una solución agitada de DC-0012B (0,25 g) en CH₂Cl₂ seco (25 ml) en atmósfera de nitrógeno, se añadió lentamente tribromuro de boro (0,31 ml), después se continuó agitando durante otras 4 horas. Se añadió cuidadosamente metanol (100 ml) y el disolvente se evaporó al vacío hasta un volumen de 1 ml; esta adición y evaporación se repitió después dos veces más y después se añadió agua (2 ml) y el producto se liofilizó, dando DC-0012 como un sólido marrón pálido (150 mg, 64 %).

35 RMN de ¹H (D₂O) 6,88 (2H, s ancho), 6,84 (2H, d, J 8Hz), 6,76 (2H, d ancho, J 8Hz), 4,20 (2H, d, J 13 Hz), 3,98 (2H, d, J 13 Hz), 3,41 (2H, s ancho), 2,24 (2H, s ancho), 1,74 (2H, s ancho), 1,63 (2H, s ancho) y 1,40 (2H, s ancho). m/z 359 ((M+1)⁺, 100 %).

HPLC (método 2) 8,2 minutos.

Ejemplo comparativo 7: 2,4-bis(3,4-dihidroxibencil)-3-tropinona (compuesto 19; DC-0019)



Una mezcla de tropinona (418 mg, 3 mmol) y 3,4-metilendioxiobenzaldehído (900 mg, 6 mmol) en etanol (20 ml) se trató con solución 1 M de NaOH (4 ml) y después la mezcla se agitó durante la noche. El sólido cristalino amarillo se separó por filtración, se lavó con agua, después con etanol acuoso frío y se secó dando DC-0019P (938 mg, 77 %).

RMN de ^1H (CDCl_3) 7,73 (2H, s), 6,88 (6H, m), 6,02 (4H, s), 4,39 (2H, m), 2,60 (2H, m), 2,31 (3H, s) y 1,98 (2H, c, J 8Hz).

m/z 404 ($(\text{M}+1)^+$, 100 %).

2,4-bis(3,4-metilendioxiobencil)-3-tropinona (compuesto 19B; DC-0019B)

Una mezcla de DC-0019P (500 mg, 1,24 mmol) y Pd/C al 10 % (100 mg) en acetato de etilo (50 ml) se agitó durante la noche en atmósfera de hidrógeno. La mezcla se filtró a través de Celite y se evaporó al vacío. La cristalización del residuo a partir de diclorometano/éter dio DC-0019B puro (366 mg, 72 %) como un sólido cristalino blanco.

RMN de ^1H (CDCl_3) 6,69 (2H, d, J 8Hz), 6,61 (2H, d, J 2Hz), 6,58 (2H, dd, J 2, 8Hz), 5,90 (4H, s), 3,17 (4H, m), 2,86 (2H, m), 2,36 (3H, s), 2,24 (2H, dd, J 8, 12Hz), 1,83 (2H, m) y 1,60 (2H, c, J 8Hz).

m/z 408 ($(\text{M}+1)^+$, 100 %).

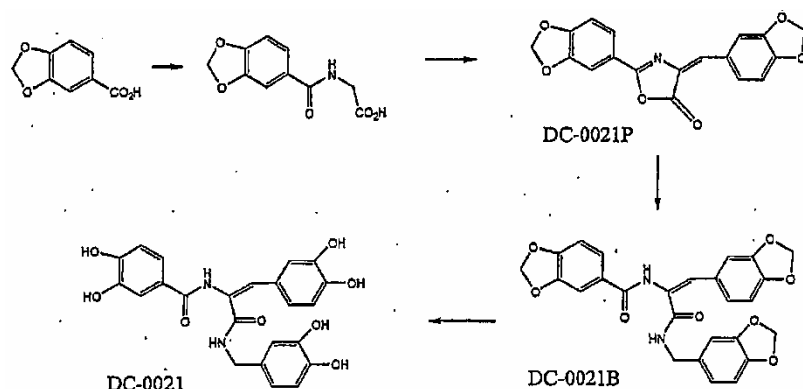
2,4-bis(3,4-dihidroxiobencil)-3-tropinona (compuesto 19; DC-0019)

A una solución agitada de DC-0019B (0,10 g) en CH_2Cl_2 seco (25 ml) en atmósfera de nitrógeno, se añadió lentamente tribromuro de boro (0,2 ml), después se continuó agitando durante otras 2 horas. Se añadió cuidadosamente metanol (50 ml), después el disolvente se evaporó al vacío hasta un volumen de 1 ml; esto se repitió 2 veces más. El producto se cristalizó a partir de metanol, dando DC-0019 puro (42 mg, 45 %) como un sólido blanco.

RMN de ^1H (D_2O) 6,75 (2H, d, J 8Hz), 6,68 (2H, d, J 2Hz), 6,59 (2H, dd, J 2, 8Hz), 3,84 (2H, s ancho), 3,31 (4H, s), 3,07 (2H, dd, 6, 14Hz), 2,82 (3H, s), 2,37 (dd, J 8, 14Hz) y 2,05 (2H, d 8Hz). m/z 384 ($(\text{M}+1)^+$, 100 %).

HPLC (método 2) 30,9 minutos.

Ejemplo comparativo 8: 3,4-dihidroxiobencilamida del ácido α -(3,4-dihidroxiobenzamido)-3,4-dihidroxicinámico (compuesto 21; DC-0021)



2-(3,4-metilendioxifenil)-4-(3,4-metilendioxibencilamino)metilen-4H-oxazol-5-ona (DC-0021P)

- 5 DC-0021P también se denomina DC-0022B y está disponible comercialmente. Se preparó a partir del ácido (3,4-metilendioxibenzoil)aminoacético [ácido 3,4-metilendioxihipúrico] (preparado mediante el método de Acheson y col., J. Chem. Soc. Abstracts, 1960:3457-3461, a partir del ácido 3,4-metilendioxibenzoico), mediante reacción con piperonaldehído usando el método descrito por Van der Eycken y col., Tet. Lett., 30(29):3873-3876, 1989.
- 10 RMN de ^1H (CDCl_3) 8,09 (1H, d, J 2Hz), 7,75 (1H, dd, J 2, 8Hz), 7,62 (1H, d, J 2Hz), 7,45 (1H, dd, J2, 8Hz), 7,12 (1H, s), 6,94 (1H, d, J 8Hz), 6,90 (1H, d, J 8Hz), 6,11(2H, s) y 6,08 (2H, s).

$m/z = 338$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

- 15 3,4-metilendioxibencilamida del ácido α -(3,4-metilendioxibenzamido)-3,4-metilendioxicinámico (compuesto 21B; DC-0021B)

Una mezcla de DC-0021P (250 mg, 0,74 mmol) y 3,4-metilendioxibencilamina (0,112 g, 0,74 mmol) en ácido acético (glacial, 3 ml) se calentó conjuntamente a reflujo durante 30 minutos. La reacción se inactivó con acetato de etilo, se lavó con bicarbonato de sodio, se secó y se evaporó al vacío dando el producto bruto. La purificación mediante cromatografía en columna, eluyendo con hexano/acetato de etilo (50/50), seguida por recristalización a partir de etanol/agua dio DC-0021B puro (218 mg, 60 %).

20

RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 9,09 (1H, s ancho), 8,06 (1H, t ancho, J 7Hz), 7,70 (1H, dd, J 2, 8Hz), 7,56 (1H, d, J 2Hz), 7,37 (1H, s), 7,16 (1H, d, J 2Hz), 7,08 (1H, dd, J 2, 8Hz), 7,00 (1H, d, J 8Hz), 6,94 (1H, d, J 2Hz), 6,86 (1H, d, J 8 Hz), 6,84 (1H, dd, J2, 8Hz), 6,77 (1H, d, J 8Hz), 6,14 (2H, s), 6,02 (2H, s), 5,98 (2H, s) y 4,43 (2H, d, J 7Hz).

25

m/z 489 ($(\text{M}+1)^+$, 100 %).

- 30 3,4-dihidroxibencilamida del ácido α -(3,4-dihidroxibenzamido)-3,4-dihidroxicinámico (compuesto 21; DC-0021)

A una solución agitada de DC-0021B (85 mg) en CH_2Cl_2 seco (20 ml) en atmósfera de nitrógeno, se añadió lentamente tribromuro de boro (0,2 ml), después se continuó agitando durante otras 2 horas. Se añadió cuidadosamente metanol (50 ml), después el disolvente se evaporó al vacío hasta un volumen de 1 ml; esto se repitió 2 veces más. La purificación mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice con metanol al 20 % en cloroformo dio DC-0021 puro (42 mg, 53 %).

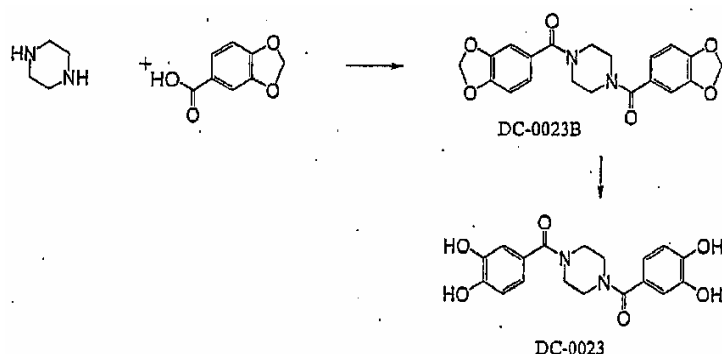
35

RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 7,75 (1H, d, J 2Hz), 7,63 (1H, dd, J 2, 8Hz), 7,50 (1H, s), 7,34 (1H, d, J 2Hz), 7,12 (1H, dd, J 2, 8 Hz), 7,00-7,04 (2H, m), 6,91 (1H, d, J 8Hz), 6,80 - 6,85 (2H, m) y 4,68 (2H, s). m/z 451 ($(\text{M}+1)^+$, 100 %).

40

HPLC (método 2) 27,1 minutos.

Ejemplo comparativo 9: 1,4-bis(3,4-dihidroxibenzoil)piperazina (compuesto 23; DC-0023)



1,4-bis(3,4-metilendioxiibenzoil)piperazina (compuesto 23B; DC-0023B)

5 Una suspensión de ácido piperonílico (0,5 g) en cloruro de tionilo (15 ml) se sometió a reflujo durante 1 h en atmósfera de nitrógeno, cuando se hubo formado una solución transparente. Los disolventes se eliminaron al vacío dando el cloruro de ácido como un sólido blanco. El sólido se disolvió en diclorometano seco (7 ml) y se añadió gota a gota a una solución agitada de piperazina (0,13 g) en diclorometano seco (20 ml) que contenía piridina (0,5 ml). La mezcla se sometió a reflujo durante 30 minutos, se diluyó con más diclorometano (50 ml), después se lavó con HCl acuoso (1 M, 50 ml) seguido por NaOH acuoso (1 M, 50 ml), se secó y se evaporó al vacío dando el producto bruto. La cristalización a partir de metanol/agua dio DC-0023B como un sólido blanco (532 mg, 92 %). RMN de ^1H (CDCl_3) 6,80-6,96 (6H, m), 6,00 (4H, s) y 3,62 (8H, s ancho).

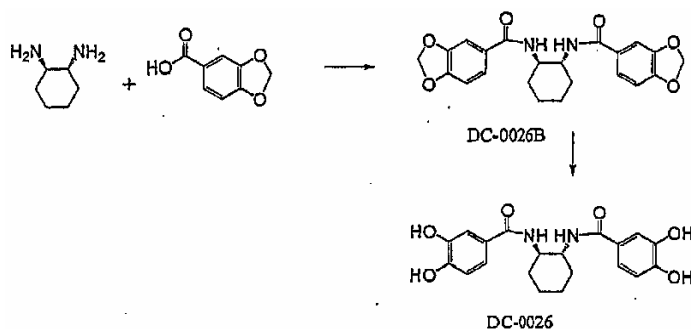
1,4-bis(3,4-dihidroxiibenzoil)piperazina (compuesto 23; DC-0023)

15 A una solución agitada de DC-0023B (0,20 g) en CH_2Cl_2 seco (25 ml) en atmósfera de nitrógeno, se añadió lentamente tribromuro de boro (0,4 ml), después se continuó agitando durante otras 2 horas. Se añadió cuidadosamente metanol (50 ml), después el disolvente se evaporó al vacío hasta un volumen de 1 ml; esto se repitió 2 veces más. El producto se cristalizó a partir de metanol/diclorometano, dando DC-0023 puro (141 mg, 75 %) como un sólido blanco.

RMN de ^1H (CD_3OD) 6,88 (2H, s), 6,81 (4H, s) y 3,66 (8H, s).

m/z 357 ($(\text{M}-\text{H})^+$, 100 %).

Ejemplo comparativo 10: N,N'-bis(3,4-dihidroxiibenzoil)-trans-1,2-diaminociclohexano (compuesto 26; DC-0026)



N,N'-bis(3,4-metilendioxiibenzoil)-trans-1,2-diaminociclohexano (compuesto 26B; DC-0026B)

30 Una suspensión de ácido piperonílico (0,5 g) en cloruro de tionilo (15 ml) se sometió a reflujo durante 1 h en atmósfera de nitrógeno, cuando se hubo formado una solución transparente. Los disolventes se eliminaron al vacío dando el cloruro de ácido como un sólido blanco. El sólido se disolvió en diclorometano seco (7 ml) y se añadió gota a gota a una solución agitada de *trans*-1,2-diaminociclohexano (0,17 g) en diclorometano seco (20 ml) que contenía piridina (0,5 ml). La mezcla se sometió a reflujo durante 30 minutos, se diluyó con más diclorometano (50 ml), después se lavó con HCl acuoso (1 M, 50 ml) seguido por NaOH acuoso (1 M, 50 ml), se secó y se evaporó al vacío dando el producto bruto. La cristalización a partir de metanol/agua dio DC-0026B como un sólido blanco (544 mg, 94 %).

40 RMN de ^1H (CDCl_3) 7,27 (2H, m), 6,77 (2H, d, J 8Hz), 6,67 (2H, s ancho), 5,98 (4H, s), 3,92 (2H, s ancho), 2,20 (2H, d ancho), 1,80 (2H, s ancho) y 1,38 (4H, m ancho).

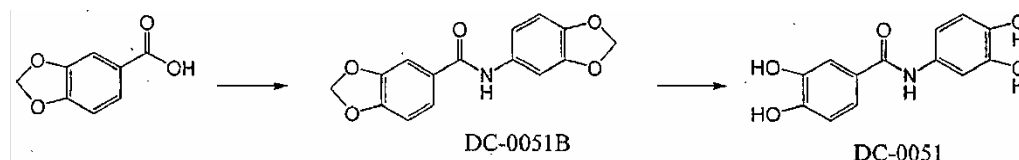
N,N'-bis(3,4-dihidroxibenzoil)-*trans*-1,2-diaminociclohexano (compuesto 26; DC-0026)

A una solución agitada de DC-0026B (0,20 g) en CH₂Cl₂ seco (25 ml) en atmósfera de nitrógeno, se añadió lentamente tribromuro de boro (0,4 ml), después se continuó agitando durante otras 2 horas. Se añadió cuidadosamente metanol (50 ml), después el disolvente se evaporó al vacío hasta un volumen de 1 ml; esta adición y evaporación se repitió dos veces. El producto se cristalizó a partir de metanol/diclorometano, dando DC-0026 puro (161 mg, 86 %) como un sólido blanco.

RMN de ¹H (CD₃OD) 7,18 (2H, s), 7,11 (2H, d, J 8Hz), 6,73 (2H, d, J 8Hz), 3,89 (2H, m), 2,06 (2H, m), 1,83 (2H, m) y 1,44 (2H, m).

m/z 385 ((M-H)⁺, 100 %).

HPLC (método 1) 30,9 minutos.

Ejemplo comparativo 11: 3,4-dihidroxianilida del ácido 3,4-dihidroxibenzoico (compuesto 51; DC-0051)Método 1 - mediante compuestos protegidos con metilendioxi3,4-metilendioxianilida del ácido 3,4-metilendioxi benzoico (compuesto 51; DC-0051B)

A una solución de ácido piperónico (500 mg, 3 mmol) en CH₂Cl₂ seco (25 ml) en atmósfera de nitrógeno se añadió cloruro de oxalilo (573 mg, 4,5 mmol) con tres gotas de DMF seca y la mezcla se agitó durante 1 hora. Los disolventes se eliminaron al vacío dando el cloruro de ácido como un sólido blanco. A una solución de cloruro de ácido en CH₂Cl₂ seco (50 ml) en atmósfera de nitrógeno, enfriada a 0 °C, se añadió gota a gota una solución hecha de 3,4-(metilendioxi)anilina (498 mg, 30,1 mmol) y piridina (0,5 ml) en CH₂Cl₂ (5 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente, después se diluyó mediante la adición de CH₂Cl₂ (100 ml), se lavó con HCl acuoso (50 ml, 10 %) y solución de bicarbonato de sodio (50 ml), después se secó. Los disolventes se eliminaron al vacío dando el producto bruto como un material cristalino marrón. La recristalización a partir de etanol acuoso dio DC-0051B como cristales plateados pequeños (0,516 g, 60 %).

RMN de ¹H (CDCl₃) 7,60 (1H, s ancho), 7,35 (3H, m), 6,88 (2H, m), 6,78 (1H, d, J 9Hz), 6,06 (2H, s) y 5,98 (2H, s).

3,4-dihidroxianilida del ácido 3,4-dihidroxibenzoico (compuesto 51; DC-0051)

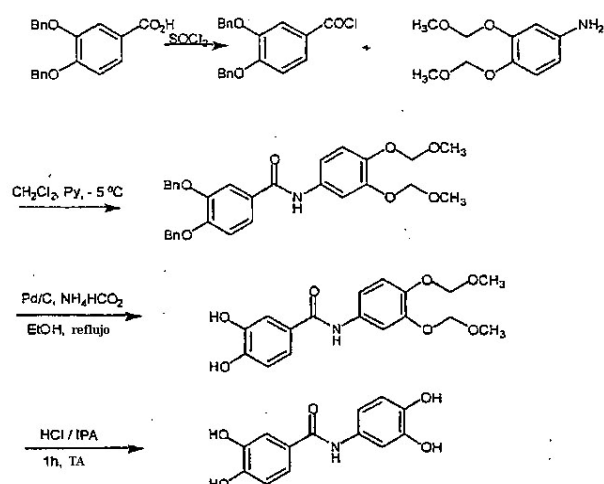
A una solución de DC-0051B (100 mg) en CH₂Cl₂ seco (25 ml) en atmósfera de nitrógeno se añadió BBr₃ (0,2 ml) y la mezcla se agitó durante 6 horas. Después de agitar, se añadió cuidadosamente HCl 3 M (25 ml) a la mezcla de reacción. El producto se extrajo en EtOAc (200 ml), se secó y se evaporó al vacío dando el producto bruto. La purificación mediante cromatografía en columna (Sílice: hexano/EtOAc 30:70) dio DC-0051 como un sólido blancuzco (71 mg, 77 %).

RMN de ¹H (CD₃OD) 7,60 (1H, s ancho), 7,38 (1H, d, J 2Hz), 7,33 (1H, dd, J 2, 8 Hz), 7,21 (1H, d, J 2Hz), 6,89 (1H, dd, J 2, 8Hz), 6,86 (1H, d, J 8Hz) y 6,76 (1H, d, J 8Hz).

m/z 262 ((M+1)⁺, 100 %).

HPLC (método 2) 15,1 minutos.

Método 2 - mediante compuestos protegidos con benciloxi y metoximetoxi



Cloruro de 3,4-dibenciloxbenzoílo

- 5 Se combinó ácido 3,4-dibenciloxibenzoico (3,1 g, 9,3 mmol) con piridina (5 gotas, catalítica) y cloruro de tionilo (15 ml, 205 mmol). La solución se calentó a reflujo durante 4 h, se enfrió y el exceso de cloruro de tionilo se eliminó a presión reducida. El producto bruto se disolvió en benceno (50 ml) y se destiló el disolvente por arrastre de vapor al vacío. El cloruro de benzoílo (rendimiento teórico de 3,4 g) se disolvió después en diclorometano y se usó directamente en la etapa siguiente.

10

3,4-di(metoximetoxi)anilida del ácido 3,4-dibenciloxibenzoico

- 15 Se disolvió 3,4-di(metoximetoxi)anilina (0,484 g, 2,2 mmol) en diclorometano (5 ml) y piridina (3 ml) y se enfrió a -5 °C, con agitación en atmósfera de nitrógeno. Se añadió gota a gota una solución de cloruro de 3,4-dibenciloxibenzoílo en diclorometano (0,8 g, 2,2 mmol de cloruro de ácido) en un periodo de 30 minutos. La reacción se dejó en agitación a 0 °C durante 30 minutos, después se calentó a temperatura ambiente en un periodo de 30 minutos. La reacción se diluyó con diclorometano (100 ml), se lavó con ácido cítrico acuoso (3 x 300 ml de una solución al 2 % p/v), hidróxido de sodio acuoso (2 x 35 ml de una solución al 2 % p/v) y se secó (Na₂SO₄). La eliminación del disolvente a presión reducida proporcionó un sólido, 0,97 g. El producto bruto se trituroó con metanol caliente (10 ml) y se filtró proporcionando el producto deseado, 0,5 g.

20

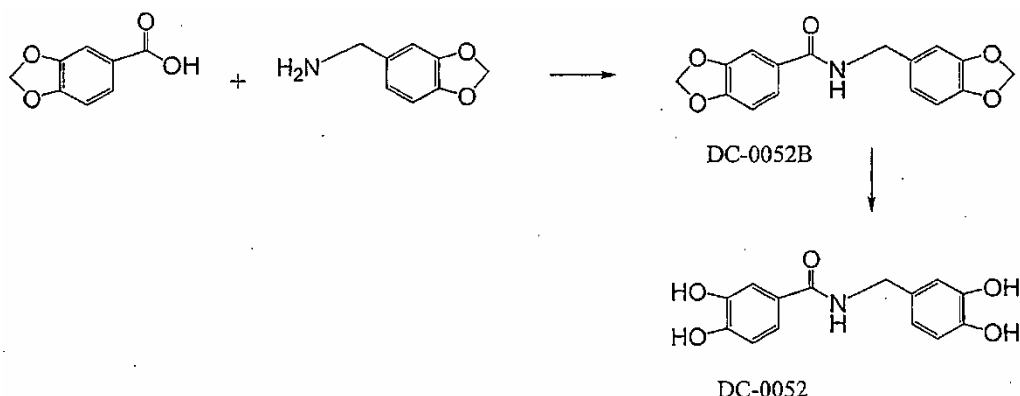
3,4-di(metoximetoxi)anilida del ácido 3,4-dihidroxiibenzoico

- 25 Se combinó 3,4-di(metoximetoxi)benzanilida del ácido 3,4-dibenciloxibenzoico (0,2 g, 0,4 mmol) con etanol (10 ml) y paladio sobre carbón (40 mg de Pd al 10 %/C). La reacción se calentó a reflujo con agitación en atmósfera de nitrógeno y se añadió formiato de amonio (0,8 g, 12,7 mmol) en porciones en un periodo de 15 min y después se mantuvo a reflujo durante dos horas. La solución de reacción enfriada se filtró para eliminar el catalizador y se concentró a presión reducida, proporcionando el producto bruto, 0,13 g.

3,4-dihidroxi-anilida del ácido 3,4-dihidroxiibenzoico (compuesto 51; DC-0051)

- 35 Se combinó 3,4-di(metoximetoxi)benzanilida del ácido 3,4-dihidroxiibenzoico (0,17 g, 0,49 mmol) con una solución al 25 % de cloruro de hidrógeno en alcohol isopropílico (15 ml) y agua (1 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y el disolvente se eliminó a presión reducida. La trituración con dietiléter (5 ml) proporcionó DC-0051 como un sólido que se secó al vacío a 30 °C, proporcionando 60 mg.

Ejemplo comparativo 12: 3,4-dihidroxi-bencilamida del ácido 3,4-dihidroxiibenzoico (compuesto 52; DC-0052)



3,4-metilendioxibencilamida del ácido 3,4-metilendioxibenzoico (compuesto 52B; DC-0052B)

- 5 Una suspensión de ácido piperonílico (0,5 g) en cloruro de tionilo (15 ml) se sometió a reflujo durante 1 h en atmósfera de nitrógeno, cuando se hubo formado una solución transparente. Los disolventes se eliminaron al vacío dando el cloruro de ácido como un sólido blanco. El sólido se disolvió en diclorometano seco (7 ml) y se añadió gota a gota a una solución agitada de piperonilamina (0,45 g) en diclorometano seco (20 ml) que contenía piridina (0,5 ml). La mezcla se sometió a reflujo durante 30 minutos, se diluyó con más diclorometano (50 ml), después se lavó con HCl acuoso (1 M, 50 ml) seguido por NaOH acuoso (1 M, 50 ml), se secó y se evaporó al vacío dando el producto bruto. La cristalización a partir de metanol/agua dio DC-0052B como un sólido blanco (733 mg, 79 %).
 10 RMN de ^1H (CDCl_3) 7,27 (2H, m), 6,79 (4H, m), 6,01 (2H, s), 5,94 (2H, s) y 4,51 (2H, d, J 5Hz).

3,4-dihidroxibencilamida del ácido 3,4-dihidroxi benzoico (compuesto 52; DC-0052)

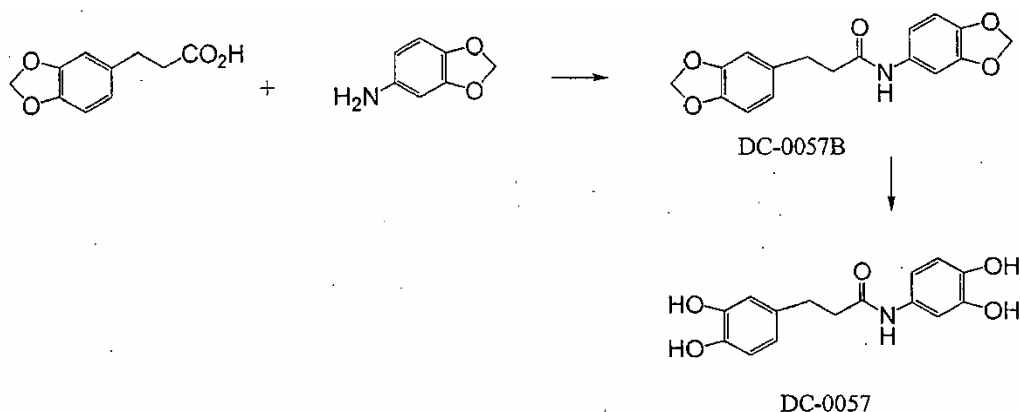
- 15 A una solución agitada de DC-0052B (0,20 g) en CH_2Cl_2 seco (25 ml) en atmósfera de nitrógeno, se añadió lentamente tribromuro de boro (0,4 ml), después se continuó agitando durante otras 2 horas. Se añadió cuidadosamente metanol (50 ml), después el disolvente se evaporó al vacío hasta un volumen de 1 ml; esto se repitió 2 veces más. El producto se cristalizó a partir de metanol/diclorometano, dando DC-0052 puro (65 mg, 35 %) como un sólido blanco.

RMN de ^1H (CD_3OD) 7,29 (2H, s), 7,22 (2H, d, J 8Hz), 6,78 (4H, m), 6,67 (4H, m) y 4,38 (4H, d, J 5Hz).

m/z 274 ((M-H) $^+$, 100 %).

- 25 HPLC (método 1) 10,4 minutos.

Ejemplo comparativo 13: 3,4-dihidroxi anilida del ácido (3-(3,4-dihidroxi fenil)propiónico (compuesto 57; DC-0057)



- 30
- 3,4-metilendioxianilida del ácido 3-(3,4-metilendioxifenil)propiónico (compuesto 57B; DC-0057B)
- 35 A una solución de ácido 3,4-(metilendioxi)dihidrocinámico (0,4 g) en CH_2Cl_2 seco (25 ml) en atmósfera de nitrógeno se añadió cloruro de oxalilo (0,5 ml) con tres gotas de DMF seca y la mezcla se agitó durante 1 hora. Los disolventes se eliminaron al vacío dando el cloruro de ácido como un sólido amarillo. A una solución de cloruro de ácido en CH_2Cl_2 seco (50 ml) en atmósfera de nitrógeno, enfriada a 0 °C, se añadió gota a gota una solución de 3,4-(metilendioxi)anilina (0,35 g) y piridina (0,2 ml) en CH_2Cl_2 (5 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente, se diluyó con CH_2Cl_2 (100 ml), se lavó con HCl acuoso (100 ml, 10 %) y solución de

bicarbonato de sodio (100 ml), después se secó y se evaporó al vacío, dando DC-0057B como un polvo marrón oscuro (0,549 g, 85 %).

5 RMN de ^1H (CDCl_3) 7,15 (1H, d, J 2Hz), 6,86 (1H, s ancho), 6,60 - 6,75 (5H, m), 5,93 (2H, s), 5,92 (2H, s), 2,95 (2H, t, J 4Hz) y 2,57 (2H, t, J 4Hz).

3,4-dihidroxianilida del ácido (3-3,4-dihidroxifenil)propiónico (compuesto 57; DC-0057)

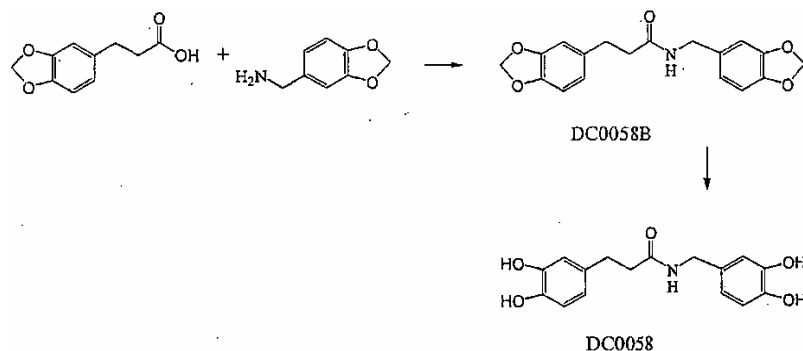
10 A una solución agitada de DC-0057B (0,20 g) en CH_2Cl_2 seco (25 ml) en atmósfera de nitrógeno, se añadió lentamente tribromuro de boro (0,4 ml), después se continuó agitando durante otras 2 horas. Se añadió cuidadosamente metanol (50 ml), después el disolvente se evaporó al vacío hasta un volumen de 1 ml; esto se repitió 2 veces más, dando DC-0057 como un sólido marrón (143 mg, 77 %).

15 RMN de ^1H ($\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 7,31 (1H, s), 6,98 (3H, m), 6,84 (1H, d, J 8Hz), 6,78 (1H, dd, J 2,8Hz), 3,24 (2H, m) y 3,16 (2H, m).

m/z 370, 368 ($\text{M}+\text{HBr}^+$), 288 ($(\text{M}-\text{H})^+$, 100 %)

HPLC (método 2) 20,6 minutos.

20 Ejemplo comparativo 14: 3,4-dihidroxibencilamida del ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)propiónico (compuesto 58; DC-0058)



25 3,4-metilendioxiobencilamida del ácido 3-(3,4-metilendioxiifenil)propiónico (compuesto 58B; DC-0058B)

A una solución de ácido 3,4-metilendioxidihidrocinámico (0,4 g) en CH_2Cl_2 seco (25 ml) en atmósfera de nitrógeno se añadió cloruro de oxalilo (0,5 ml) con tres gotas de DMF seca y la mezcla se agitó durante 1 hora. Los disolventes se eliminaron al vacío dando el cloruro de ácido como un sólido amarillo. A una solución de cloruro de ácido en CH_2Cl_2 seco (50 ml) en atmósfera de nitrógeno, enfriada a 0 °C, se añadió gota a gota una solución de 3,4-(metilendioxi)bencilamiina (0,35 g) y piridina (0,2 ml) en CH_2Cl_2 (5 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente, se diluyó con CH_2Cl_2 (100 ml), se lavó con HCl acuoso (100 ml, 10 %) y solución de bicarbonato de sodio (100 ml), después se secó y se evaporó al vacío, dando DC-0058B como un polvo blancuzco (0,536 g, 80 %).

35 3,4-dihidroxibencilamida del ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)propiónico (compuesto 58; DC-0058)

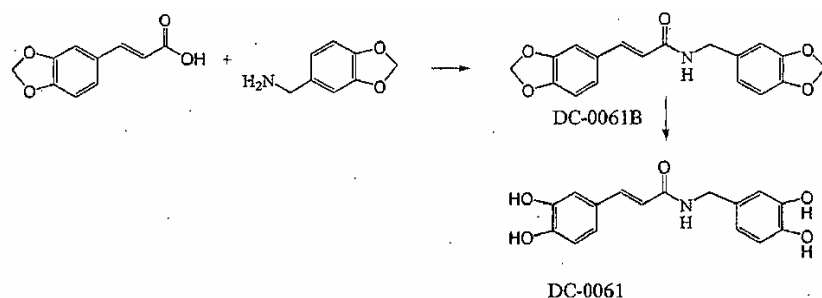
40 A una solución agitada de DC-0058B (0,20 g) en CH_2Cl_2 seco (25 ml) en atmósfera de nitrógeno, se añadió lentamente tribromuro de boro (0,4 ml), después se continuó agitando durante otras 2 horas. Se añadió cuidadosamente metanol (50 ml), después el disolvente se evaporó al vacío hasta un volumen de 1 ml; esto se repitió 2 veces más, dando DC-0058 como un sólido marrón (143 mg, 77 %).

45 RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 9,62 (1H, s ancho), 6,95 (1H, d, J 2Hz), 6,91 (1H, d, J 2Hz), 6,88 (1H, d, J 8Hz), 6,83 (1H, d, J 8Hz), 6,67 (2H, m), 6,35 (4H, s ancho) 4,47 (2H, s) y 3,00 (4H, m).

m/z 302 ($(\text{M}-\text{H})^+$, 100 %).

HPLC (método 2) 19,4 minutos.

50 Ejemplo comparativo 15: 3,4-dihidroxibencilamida del ácido 3,4-dihidroxicinámico (compuesto 61; DC-0061)



3,4-metilendioxibencilamida del ácido 3,4-metilendioxicinámico (compuesto 61B; DC-0061B)

- 5 A una solución de ácido 3,4-metilendioxicinámico (0,5 g, 2,6 mmol) en CH_2Cl_2 seco (25 ml) en atmósfera de nitrógeno se añadió cloruro de oxalilo (0,33 g, 2,6 mmol) con tres gotas de DMF seca y la mezcla se agitó durante 1 hora. Los disolventes se eliminaron al vacío dando el cloruro de ácido como un sólido amarillo. A una solución de cloruro de ácido en CH_2Cl_2 seco (50 ml) en atmósfera de nitrógeno, enfriada a 0 °C, se añadió gota a gota una solución de 3,4-(metilendioxi)bencilamina (0,393 g, 2,6 mmol) y piridina (0,205 g, 2,6 mmol) en CH_2Cl_2 (5 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente, se diluyó con CH_2Cl_2 (100 ml), se lavó con HCl acuoso (100 ml, 10 %) y solución de bicarbonato de sodio (100 ml), después se secó y se evaporó al vacío, dando DC-0061B como un polvo amarillo apagado (0,523 g, 62 %).

15 RMN de ^1H (CDCl_3) 7,58 (1H, d, J 16Hz), 6,98 (2H, m), 6,70 - 6,84 (4H, m), 6,22 (1H, d, J 16 Hz), 6,00 (2H, s), 5,96 (2H, s) y 4,47 (2H, d, J 6Hz).

m/z 326 ((M+1)⁺, 100 %).

3,4-dihidroxibencilamida del ácido 3,4-dihidroxicinámico (compuesto 61; DC-0061)

- 20 A una solución agitada de DC-0061B (0,3 g, 0,94 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 seco (25 ml) se añadió lentamente tribromuro de boro (1,16 g, 4,6 mmol), después se continuó agitando durante otras 12 horas. Se añadió cuidadosamente HCl diluido (25 ml), después 200 ml de agua y el producto se extrajo en acetato de etilo (2 x 100 ml), se secó y se evaporó al vacío dando el producto bruto. La purificación mediante cromatografía en columna eluyendo con hexano/acetato de etilo (1:4) dio DC-0061 como un sólido blancuzco (36 mg, 13 %).

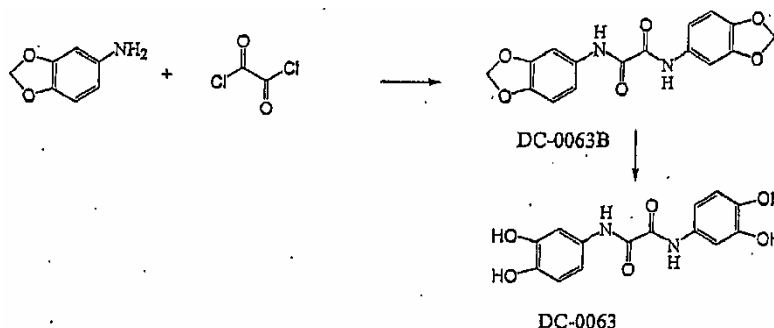
25 RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 7,54 (1H, d, J 16Hz), 7,12 (1H, d, J 2Hz), 6,96 (1H, dd, J 2, 8Hz), 6,85 - 6,94 (2H, m), 6,80 (1H, d, J 8Hz), 6,70 (1H, dd, J 2,8Hz), 6,58 (1H, d, J 16 Hz) y 4,41 (2H, s).

30 m/z 300 ((M-1)⁺, 100 %).

HPLC (método 2) 30,0 minutos.

Ejemplo comparativo 16: bis(3,4-dihydroxianilida) del ácido oxálico (compuesto 63; DC-0063)

- 35 Método 1 - mediante compuestos protegidos con metilendioxi



- 40 Bis(3,4-metilenoxianilida) del ácido oxálico (compuesto 63B; DC-0063B)

45 A una solución de cloruro de oxalilo (165 mg, 1,3 mmol) en CH_2Cl_2 seco (50 ml) en atmósfera de nitrógeno, enfriada a 0 °C, se añadió gota a gota una solución de 3,4-(metilendioxi)anilina (400 mg, 2,92 mmol) y piridina (230 mg, 2,92 mmol) en CH_2Cl_2 seco (5 ml). La mezcla de reacción se agitó durante otros 30 min a temperatura ambiente, después se lavó con HCl acuoso diluido (50 ml). La capa orgánica se separó, se secó y se evaporó al vacío dando DC-0063B

como un polvo gris (0,351 g, 82 %).

RMN de ^1H (CD_3OD) 10,78 (2H, s), 7,53 (2H, d, J 2Hz), 7,39 (2H, dd, J 2,8Hz), 6,96 (2H, d, J 8Hz) y 6,06 (4H, s).

5 Bis(3,4-dihidroxianilida) del ácido oxálico (compuesto 63: DC-0063)

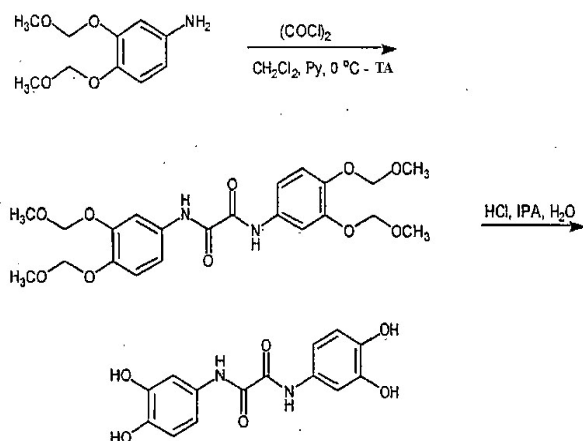
A una solución agitada de DC-0063B (0,3 g, 0,91 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 seco (25 ml) se añadió lentamente tribromuro de boro (1,14 g, 4,7 mmol), después se continuó agitando durante otras 4 horas. Se añadió cuidadosamente HCl diluido (25 ml), después agua (200 ml) y el producto se extrajo en acetato de etilo (2 x 200 ml), se secó y se evaporó al vacío dando el producto bruto. El producto bruto se disolvió en acetona (25 ml) y se filtró. La acetona se evaporó al vacío dando DC-0063 como un sólido blancuzco (171 mg, 62 %).

RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 9,72 (2H, s ancho), 8,05 (2H, s ancho), 7,89 (2H, s ancho), 7,52 (2H, d, J 2Hz), 7,20 (2H, dd, J 2, 8Hz) y 6,83 (2H, d, J 8Hz).

m/z 303 ($(\text{M}-1)^+$, 100 %).

HPLC (método 2) 29,1 minutos.

20 Método 2 - mediante compuestos protegidos con metoximetoxi



25 3,4-di(metoximetoxi)anilida del ácido oxálico

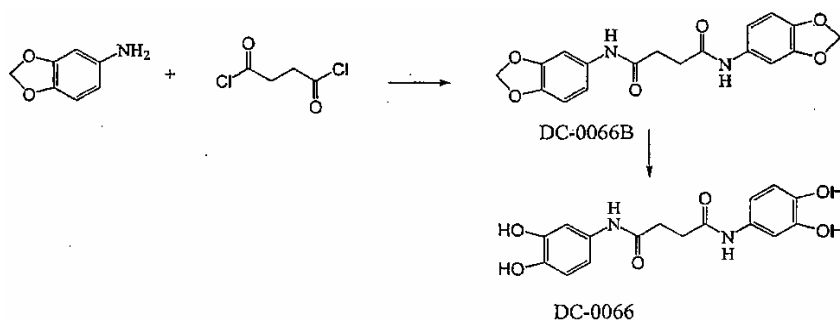
Se disolvió 3,4-di(metoximetoxi)anilina (1,5 g, 7 mmol) en diclorometano (50 ml) y se enfrió a 0 °C, con agitación en atmósfera de nitrógeno. Se añadió piridina (3,75 ml, 46 mmol) seguida por la adición gota a gota de cloruro de oxalilo (0,4 g, 3,5 mmol) en diclorometano (5 ml) en un periodo de 20 minutos. La reacción se agitó durante 10 min adicionales y se dejó calentar a temperatura ambiente. La suspensión se filtró. El residuo se lavó con hexano (5 ml) para eliminar el exceso de piridina. El producto bruto se trituró con metanol (5 ml) y se filtró proporcionando la anilida protegida pura, 420 mg.

bis(3,4-dihidroxianilida) del ácido oxálico

35 Se combinó 3,4-di(metoximetoxi)anilida del ácido oxálico (0,17 g, 0,36 mmol) con una solución al 25 % de cloruro de hidrógeno en alcohol isopropílico (1,7 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y el disolvente se eliminó a presión reducida. La trituración con dietiléter (5 ml) proporcionó DC-0063, 60 mg.

40 Ejemplo 17: bis(3,4-dihidroxianilida) del ácido succínico (compuesto 66: DC-0066)

Método 1 - mediante compuestos protegidos con metilendioxi



Bis(3,4-metilenoxianilida) del ácido succínico (compuesto 66B; DC-0066B)

- 5 A una suspensión de ácido succínico (200 mg, 1,7 mmol) en CH_2Cl_2 seco (25 ml) en atmósfera de nitrógeno se añadió cloruro de oxalilo (645 mg, 5,08 mmol) con tres gotas de DMF seca y la mezcla se agitó durante 1 hora. Los disolventes se eliminaron al vacío dando el cloruro de ácido como un sólido amarillento. A una solución agitada de 3,4-(metilendioxi)anilina (582 mg, 4,25 mmol) y piridina (400 mg, 5,08 mmol) en CH_2Cl_2 seco (50 ml) en atmósfera de nitrógeno a 0 °C se añadió gota a gota una solución del cloruro de ácido en CH_2Cl_2 seco (25 ml) y se agitó durante
- 10 otras 2 horas. Los disolventes se eliminaron al vacío dando el producto bruto. El material bruto se resuspendió en EtOAc (250 ml), después se lavó con HCl acuoso diluido (2 x 150 ml), bicarbonato de sodio saturado (2 x 150 ml) y agua (1 x 150 ml). El EtOAc se eliminó después mediante evaporación giratoria. El producto se dispuso sobre papel de filtro y se lavó con agua y se dejó secar dando DC-0066B como un sólido blanco (514 mg, 78 %).
- 15 RMN de ^1H (CD_3OD) 9,97 (2H, s), 7,34 (2H, d, J 2Hz), 6,99 (2H, dd, J 2,8Hz), 6,86 (2H, d, J 8Hz), 6,00 (4H, s) y 2,63 (4H, s).

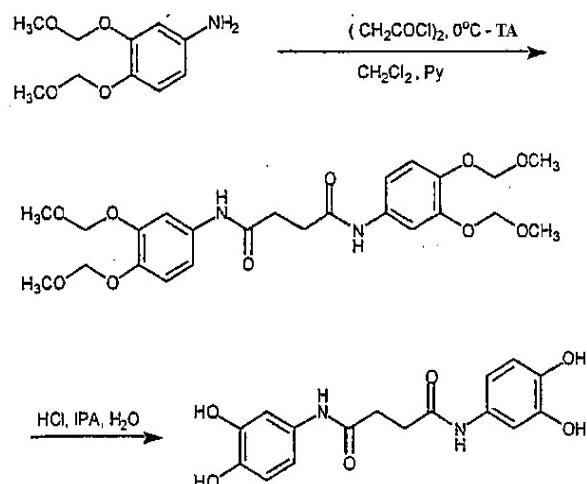
bis(3,4-dihidroxianilida) del ácido succínico (compuesto 66; DC-0066)

- 20 A una solución agitada de DC-0066B (0,3 g, 0,78 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 seco (25 ml) se añadió lentamente BBR_3 (0,978 g, 3,9 mmol), después se continuó agitando durante otras 4 horas. Se añadió cuidadosamente HCl diluido (25 ml), después 200 ml de agua y el producto se extrajo en acetato de etilo (2 x 100 ml), se secó y se evaporó al vacío dando DC-0066 como un sólido blancuzco (97 mg, 35 %).
- 25 RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 8,88 (2H, s ancho), 7,83 (2H, s ancho), 7,57 (2H, s ancho), 7,34 (2H, d, J 2Hz), 6,90 (2H, dd, J 2, 8Hz), 6,71 (2H, d, J 8Hz) y 2,65 (4H, s).

m/z 331 ($(\text{M}-1)^+$, 100 %).

- 30 HPLC (método 2) 10,6 minutos.

Método 2 - mediante compuestos protegidos con metoximetoxi



35

3,4-Di(metoximetoxi)anilida del ácido succínico

Se disolvió 3,4-di(metoximetoxi)anilina (1 g, 4,7 mmol) en diclorometano (25 ml) y se enfrió a 0 °C, con agitación en atmósfera de nitrógeno. Se añadió piridina (1 ml, 12 mmol) seguida por la adición gota a gota de cloruro de succinilo

(0,35 g, 2,3 mmol) en diclorometano (10 ml) en un periodo de 20 minutos. La reacción se agitó durante otras 2 horas y se dejó calentar a temperatura ambiente. La suspensión se filtró y el sólido blanco se recogió, se lavó con hexano (10 ml) y después metanol (4 ml) proporcionando la anilida, 350 mg.

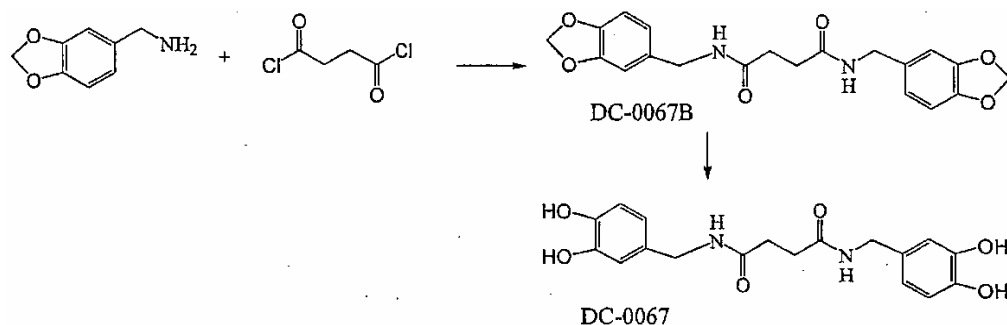
5 Bis(3,4-dihidroxianilida) del ácido succínico (compuesto 66; DC-0066)

Se combinó bis(3,9-di(metoximetoxi)anilida) del ácido succínico (0,15 g, 0,3 mmol) con una solución al 25 % de cloruro de hidrógeno en alcohol isopropílico (1,5 ml) y agua (1,5 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h y el disolvente se eliminó a presión reducida. La trituración con dietiléter proporcionó DC-0066 como un sólido, que se secó al vacío a 30 °C, proporcionando 60 mg.

Ejemplo 18: bis(3,4-dihidroxibencilamida) del ácido succínico (compuesto 67; DC-0067)

Método 1 - mediante compuestos protegidos con metilendioxi

15



bis(3,4-metilenoxibencilamida) del ácido succínico (compuesto 67B; DC-0067B)

20 A una solución de ácido succínico (200 mg, 1,7 mmol) en CH_2Cl_2 seco (25 ml) en atmósfera de nitrógeno se añadió cloruro de oxalilo (645 mg, 5,1 mmol) con tres gotas de DMF seca y la mezcla se agitó durante 1 hora. Los disolventes se eliminaron al vacío dando el cloruro de ácido como un sólido amarillo. A una solución de cloruro de ácido en CH_2Cl_2 seco (50 ml) en atmósfera de nitrógeno, enfriada a 0 °C, se añadió gota a gota una solución de 3,4-metilendioxi-bencilamina (634 mg, 4,2 mmol) y piridina (0,33 ml) en CH_2Cl_2 (50 ml). La mezcla de reacción se agitó durante otras 2 horas a temperatura ambiente, después los disolventes se eliminaron al vacío dando el producto bruto. El material bruto se resuspendió en EtOAc (250 ml), después se lavó con HCl acuoso diluido (2 x 150 ml), bicarbonato de sodio saturado (2 x 150 ml) y agua (1 x 150 ml). El EtOAc se evaporó al vacío. La recrystalización a partir de etanol y agua dio DC-0067B como cristales en copos blancos (275 mg, 42 %).

30 RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) 8,31 (2H, t, J 6Hz), 6,85 (4H, m), 6,74 (2H, dd, J 2, 8Hz), 6,01 (4H, s), 4,19 (4H, d, J 6Hz) y 2,42 (4H, s).

Bis(3,4-dihidroxibencilamida) del ácido succínico (compuesto 67; DC-0067)

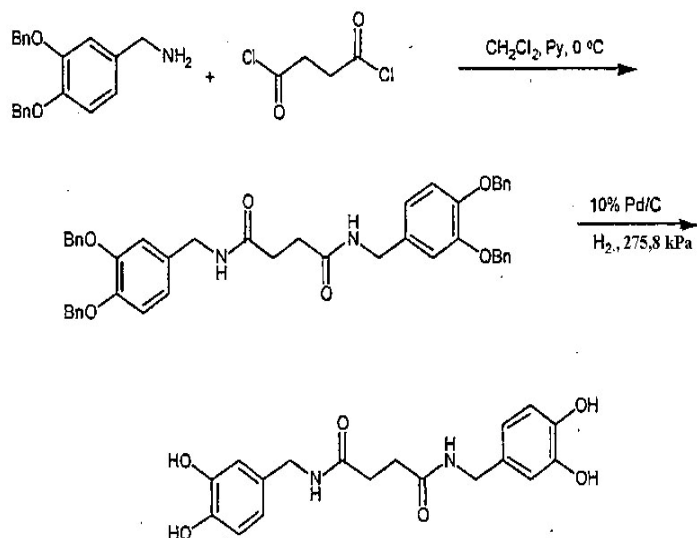
35 A una solución agitada de DC-0067B (0,25 g, 0,65 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 seco (25 ml) se añadió lentamente tribromuro de boro (0,81 g, 0,31 mmol), después se continuó agitando durante otras 4 horas. Se añadió cuidadosamente HCl diluido (25 ml), después salmuera (125 ml) y el producto se extrajo en acetato de etilo (2 x 100 ml), se secó y se evaporó al vacío dando DC-0067 como un sólido blancuzco (180 mg, 77 %).

40 RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 7,90 (2H, s ancho), 7,74 (2H, s ancho), 7,42 (2H, s ancho), 6,79 (2H, d, J 2Hz), 6,77 (2H, d, J 8 Hz), 6,62 (2H, dd, J 2, 8Hz), 4,22 (4H, d, J 7 Hz) y 2,53 (4H, s).

m/z 359 ($(\text{M}-1)^+$, 100 %).

45 HPLC (método 2) 12,3 minutos.

Método 2 - mediante compuestos protegidos con benciloxi



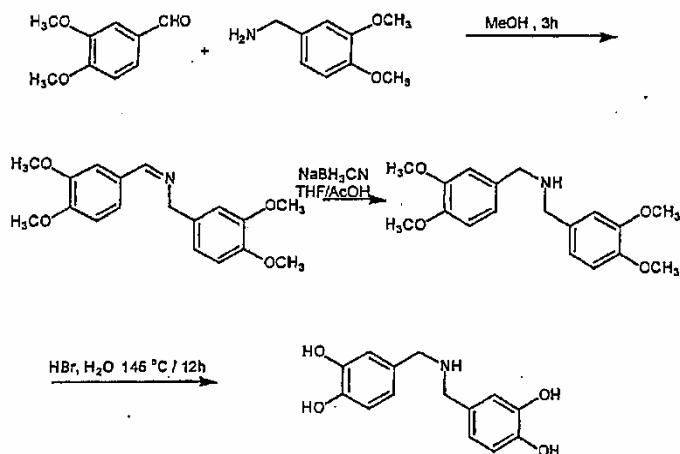
Bis(3,4-dihydroxybenzyl)amida del ácido succínico

- 5 Se disolvió 3,4-dibenciloxibencilamina (1,1 g, 3,45 mmol) en piridina anhidra (8 ml) y se enfrió a 0 °C con agitación en atmósfera de nitrógeno. A esta solución se añadió gota a gota cloruro de succinilo (0,23 g, 1,42 mmol) en un periodo de 30 minutos como una solución en diclorometano (50 ml), manteniendo mientras la mezcla de reacción a 0 °C. La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 45 minutos adicionales. La reacción se vertió en hielo triturado (70 g) y la capa de diclorometano se separó. El extracto orgánico se lavó con ácido clorhídrico acuoso diluido (2 x 20 ml de solución 0,1 M), agua (20 ml) y se secó (Na₂SO₄). La eliminación del disolvente a presión reducida proporcionó un sólido bruto que se trituró con metanol (5 ml) proporcionando después de la filtración la diamina protegida, con un rendimiento de 300 mg.

Bis(3,4-dihydroxybenzyl)amida del ácido succínico (compuesto 67; DC-0067)

- 15 Se disolvió bis(3,4-dibenciloxibencilamida) del ácido succínico (300 mg, 0,42 mmol) en THF (50 ml) en un bote a presión y se calentó a 35 °C para asegurar la disolución del sólido. Se añadió paladio sobre carbono (50 mg Pd al 10 %/C) y el recipiente se presurizó con hidrógeno (a 3 atm (304 kPa)). La reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual la TLC reveló que la reacción se había completado. Se retiró el catalizador por filtración y el disolvente se eliminó a presión reducida, proporcionando DC-0067 como un sólido bruto (20 mg). El material se recrystalizó a partir de tolueno y metanol, proporcionando DC-0067.

Ejemplo comparativo 19: Bis(3,4-dihydroxybenzyl)amina (compuesto 73; DC-00073)



25

Bis(3,4-dimetoxibencil)amina

- 30 A una solución de 3,4-dimetoxibenzaldehído (1 g, 6 mmol) en metanol anhidro (10 ml) se añadió 3,4-dimetoxibencilamina (1 g, 5,9 mmol) y la solución se agitó en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 3 horas. El metanol se eliminó a presión reducida, proporcionando la imina bruta, 1,9 g. La imina se disolvió

en THF (10 ml) y ácido acético (4 ml) y se añadió cianoborohidruro de sodio (0,38 g, 6 mmol) en porciones en un periodo de 30 minutos. La solución se agitó durante 30 minutos adicionales a temperatura ambiente y los disolventes se eliminaron a presión reducida. El residuo se neutralizó con hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado y el producto sólido bruto se aisló por filtración y se secó al vacío a 50 °C durante la noche, con un rendimiento de 0,6 g.

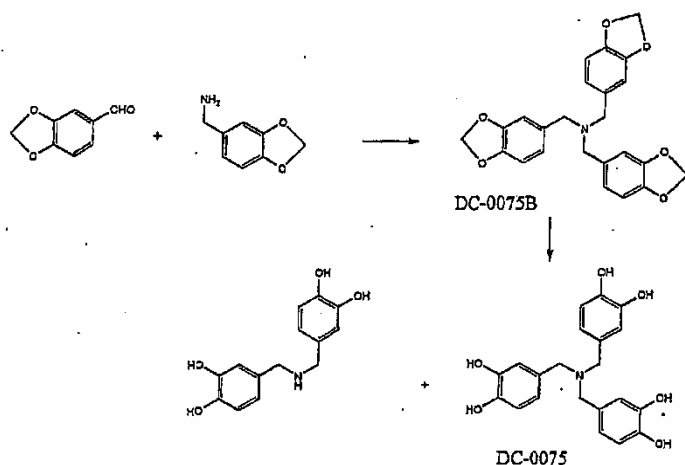
5

Bis(3,4-dihidroxi-bencil)amina (compuesto 73; DC-00073)

La bis(3,4-dimetoxibencil)amina (0,6 g) se combinó con ácido bromhídrico (6 ml de solución al 48 % p/p en agua) y se calentó lentamente con agitación a 145 °C en un periodo de 1 h. La reacción se mantuvo a 145 °C durante 12 h, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se vertió en agua (25 ml). La mezcla de reacción se neutralizó con hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado y se extrajo con acetato de etilo (25 ml). La capa orgánica se lavó en agua (2 x 25 ml), se secó (Na_2SO_4) y el disolvente se eliminó a presión reducida, proporcionando DC-0073 como un sólido, 160 mg.

10

15 Ejemplo comparativo 20: Tris(3,4-dihidroxi-bencil)amina (compuesto 75; DC-00075)



Tris(3,4-metilendioxi-bencil)amina (compuesto 75B; DC-00075B)

20

A una solución agitada de piperonal (0,9 g, 6 mmol) y acetato de amonio (0,15 g, 2 mmol) en acetonitrilo (25 ml) se añadió cianoborohidruro de sodio (0,44 g, 7 mmol) y la mezcla se agitó durante 4 días. El disolvente se eliminó al vacío, después se disolvió el residuo en diclorometano (100 ml) y se lavó con bicarbonato de sodio sat., se secó y el disolvente se eliminó al vacío dando una goma marrón. La purificación mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con diclorometano al 50 % en hexano dio el DC-0075B puro (135 mg, 5 %).

25

RMN de ^1H (CDCl_3) 6,91 (3H, m), 6,73 - 6,80 (6H, m), 5,94 (6H, s) y 3,42 (2H, m)

m/z 420 ($(\text{M}+1)^+$, 100 %).

30

Tris(3,4-dihidroxi-bencil)amina (compuesto 75; DC-00075)

A una solución agitada de DC-0075B (135 mg) en CH_2Cl_2 seco (20 ml) en atmósfera de nitrógeno, se añadió lentamente tribromuro de boro (0,2 ml), después se continuó agitando durante otras 2 horas. Se añadió cuidadosamente metanol (50 ml), después el disolvente se evaporó al vacío hasta un volumen de 1 ml; esta adición y evaporación se repitió dos veces más. La purificación mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con metanol al 20 % en cloroformo dio DC-0075 (72 mg, 58 %) puro en su mayor parte como una goma marrón pálida. La HPLC preparativa dio después el DC-0075 puro como una goma blanca (26 mg, 21 %).

35

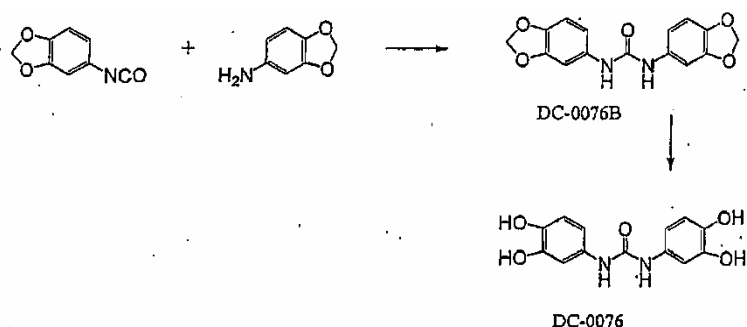
40 RMN de ^1H (CD_3OD) 6,82- 6,86 (2H, m), 6,74 (1H, dd, J 2,8 Hz) y 4,07 (2H, s).

m/z 384 ($(\text{M}+1)^+$, 100 %).

HPLC (método 2) 12,3 minutos.

45

Ejemplo comparativo 21: 1,3-bis(3,4-dihidroxi-fenil)urea (compuesto 76; DC-0076)



1,3-bis(3,4-metilendioxfenil)urea (compuesto 76B; DC-0076B)

- 5 Una solución de 3,4-metilendioxi-anilina (0,35 g) e isocianato de 3,4-metilendioxfenilo (0,4 g) en benceno (25 ml) se sometió a reflujo durante 1 hora. El precipitado formado se filtró, se lavó con benceno, después se secó dando DC-0076B puro (0,697 g, 95 %) como un sólido marrón pálido. RMN de ^1H ($\text{CDCl}_3/(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 7,35 (2H, s ancho), 6,93 (2H, s), 6,45 (4H, s) y 5,67 (4H, s).

10 1,3-bis(3,4-dihidroxfenil)urea (compuesto 76; DC-0076)

- A una solución agitada de DC-0076B (150 mg) en CH_2Cl_2 seco (20 ml) en atmósfera de nitrógeno, se añadió lentamente tribromuro de boro (0,2 ml), después se continuó agitando durante otras 2 horas. Se añadió cuidadosamente metanol (50 ml), después el disolvente se evaporó al vacío hasta un volumen de 1 ml y esta adición y evaporación se repitió dos veces. La purificación mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con metanol al 20 % en cloroformo dio DC-0076 (113 mg, 82 %) puro como un sólido marrón pálido.

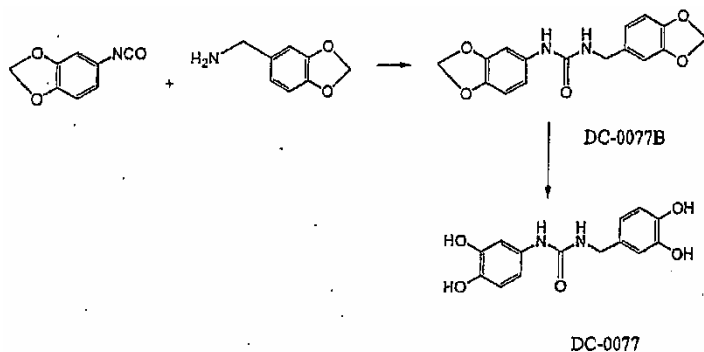
RMN de ^1H ($\text{D}_2\text{O}/(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 7,09 (2H, d, J 2Hz), 6,76 (2H, d, J 8Hz) y 6,70 (2H, dd, J 2, 8Hz).

- 20 m/z 551 ($(2\text{M}-\text{H})^+$, 100 %), 275 ($(\text{M}-\text{H})^+$, 85 %).

HPLC (método 2) 5,8 minutos.

Ejemplo comparativo 22: (1-3,4-dihidroxfenil)-3-(3,4-dihidroxbencil)urea (DC-0077)

25



(1-3,4-metilendioxfenil)-3-(3,4-metilendioxbencil)urea (DC-0077b)

- 30 Una solución de 3,4-metilendioxbencilamina (0,37 g) e isocianato de 3,4-metilendioxfenilo (0,4 g) en benceno (25 ml) se sometió a reflujo durante 1 hora. El precipitado formado se filtró, se lavó con benceno, después se secó dando DC-0077B puro (0,78 g, 98 %) como un sólido marrón pálido.

- 35 RMN de ^1H (CDCl_3) 8,42 (1H, s, NH), 7,21 (1H, d, J 2Hz), 6,88 (2H, m), 6,79 (2H, m), 6,71 (1H, dd, J 2, 8Hz), 6,49 (1H, t, J 6Hz, NH), 6,01 (2H, s), 5,97 (2H, s) y 4,21 (2H, d, J 6Hz).

m/z 315 ($(\text{M}+1)^+$, 100 %).

(1-3,4-dihidroxfenil)-3-(3,4-dihidroxbencil)urea (DC-0077)

40

- A una solución agitada de DC-0077B (200 mg) en CH_2Cl_2 seco (50 ml) en atmósfera de nitrógeno, se añadió lentamente tribromuro de boro (0,4 ml), después se continuó agitando durante otras 3 horas. Se añadió cuidadosamente metanol (50 ml), después el disolvente se evaporó al vacío hasta un volumen de 1 ml; esto se

repitió 2 veces más. La purificación mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con metanol al 20 % en cloroformo dio una fracción que contenía producto bruto. La HPLC preparativa dio DC-0077 puro (19 mg, 11 %) como un sólido marrón oscuro.

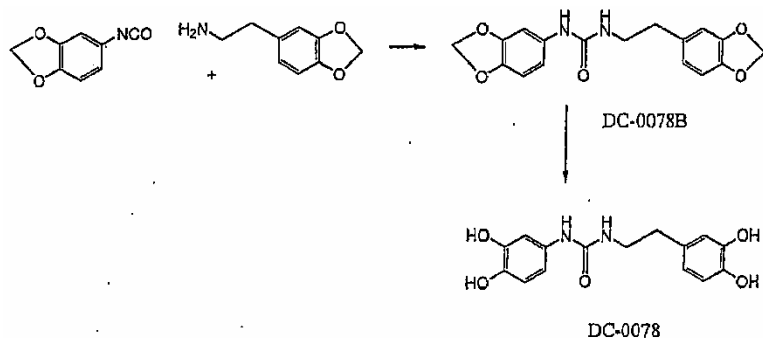
5 RMN de ^1H (D_2O) 6,55 - 6,80 (6H, m) y 4,12 (2H, s).

m/z 290 (M^+ , 100 %).

HPLC (método 2) 12,7 minutos.

10

Ejemplo comparativo 23: (1-3,4-dihidroxifenil)-3-(3,4-dihidroxifenetil)urea (compuestos 78; DC-0078)



15 (1-3,4-metilendioxifenil)-3-(3,4-metilendioxifenil)urea (compuesto 78B; DC-0078B)

Una solución de 3,4-metilendioxifeniletilamina (0,25 g, 1,5 mmol) e isocianato de 3,4-metilendioxifenilo (0,25 g, 1,5 mmol) en benceno (25 ml) se sometió a reflujo durante 1 hora. El precipitado formado se filtró, se lavó con benceno, después se secó dando DC-0078B puro (0,43 g, 85 %) como un sólido marrón pálido. RMN de ^1H (CDCl_3) 7,83 (1H, s ancho), 7,31 (1H, d, J 2Hz), 6,72 - 6,82 (5H, m), 5,99 (2H, s), 5,95 (2H, s), 5,68 (1H, t ancho, J 7Hz), 3,44 (2H, c, J 7Hz) y 2,74 (2H, t, J 7Hz). m/z 327 ($(\text{M}+1)^+$, 100 %).

20

(1-3,4-dihidroxifenil)-3-(3,4-dihidroxifenetil)urea (compuestos 78; DC-0078)

25 A una solución agitada de DC-0078B (105 mg) en CH_2Cl_2 seco (20 ml) en atmósfera de nitrógeno, se añadió lentamente tribromuro de boro (0,2 ml), después se continuó agitando durante otras 2 horas. Se añadió cuidadosamente metanol (50 ml), después el disolvente se evaporó al vacío hasta un volumen de 1 ml; esta adición y evaporación se repitió dos veces más. La purificación mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con metanol al 20 % en cloroformo dio DC-0078 puro (78 mg, 80 %) como un sólido marrón pálido.

30

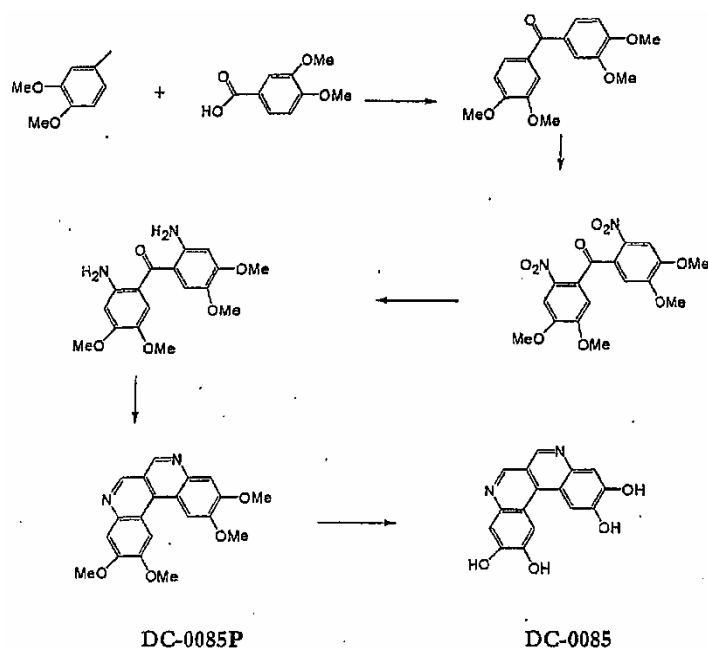
RMN de ^1H ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 6,97 (2H, m), 6,86 - 6,89 (3H, m), 6,68 (1H, dd, J 2, 8Hz), 3,66 (2H, t, J 7Hz) y 2,87 (2H, t, J 7Hz).

m/z 303 ($(\text{M}+1)^+$, 100 %).

35

HPLC (método 2) 33,7 minutos.

Ejemplo comparativo 24: Dibenzo[c,f][2,7]naftiridina-2,3,10,11-tetraol (compuesto 85; DC-0085).



2,3,10,11-Tetrametoxidibenzo[c.f][2,7]naftiridina (DC-0085P)

- 5 El DC-0085P se preparó tal como se describe por Upton y col., *J. Pharm. Pharmacol.*, 50(5):475-482, 1998. Se hizo reaccionar veratrol con ácido verátrico dando la benzofenona protegida, que se nitró dando el compuesto de dinitro, y este se redujo dando la amina mediante tratamiento con estaño en ácido clorhídrico y ácido acético. La diamina se aisló y, después, se condensó con bis(dimetilacetal) de malonaldehído dando DC-0085P.

10 Dibenzo[c.f][2,7]naftiridina-2,3,10,11-tetraol (DC-0085)

A una solución agitada de DC-0085B (100 mg) en CH_2Cl_2 seco (20 ml) en atmósfera de nitrógeno, se añadió lentamente tribromuro de boro (0,2 ml), después se continuó agitando durante otras 2 horas. Se añadió cuidadosamente metanol (50 ml), después el disolvente se evaporó al vacío hasta un volumen de 1 ml y esta adición y evaporación se repitió dos veces. La purificación mediante cristalización a partir de metanol/cloroformo dio DC-0085 (36 mg, 38 %) como un sólido cristalino naranja.

RMN de ^1H (CD_3OD) 9,63 (2H, s), 8,63 (2H, s) y 7,64 (2H, s).

20 m/z 296 (M^+), 100 %).

HPLC (método 1) 24,3 minutos.

25 Ejemplo 25: Los compuestos de la presente invención son potentes disruptores de las fibrillas de A β 1-42 de Alzheimer

Se ha hallado que los compuestos y los compuestos comparativos preparados en los Ejemplos anteriores eran en su mayor parte disruptores/inhibidores potentes de las fibrillas de proteína β -amiloidea ($\text{A}\beta$). En una serie de estudios se analizó la eficacia de los compuestos para provocar el desensamblaje/la ruptura de fibrillas de amiloides preformadas de la enfermedad de Alzheimer (es decir, que consisten en fibrillas $\text{A}\beta$ 1-42).

Parte A: datos de la fluorometría de tioflavina T

35 En un estudio, se usó fluorometría de tioflavina T para determinar los efectos de los compuestos y de EDTA (como control negativo). En este ensayo la tioflavina T se une específicamente a amiloide fibrilar, y esta unión produce una potenciación de la fluorescencia a 485 nm que es directamente proporcional a la cantidad de fibrillas de amiloide formadas. Cuanto mayor sea la fluorescencia, mayor será la cantidad de fibrillas de amiloide formada (Naki y col, *Lab. Invest.* 65:104-110, 1991; Levine III, *Protein Sci.* 2:404-410, 1993; *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* 2:1-6, 1995).

40 En este estudio, se incubaron 25 μM de $\text{A}\beta$ 1-42 prefibrilada (Bachem Inc) a 37 °C durante 3 días bien solo o bien en presencia de uno de los compuestos o de EDTA (con una relación en peso de $\text{A}\beta$:compuesto de ensayo de 1:1, 1:0,1, 1:0,01 o 1:0,001). Después de 3 días de incubación, se transfirieron 50 μl de cada mezcla de incubación a

una placa de microvaloración de 96 pocillos que contenía 150 µl de agua destilada y 50 µl de una solución de tioflavina T (es decir, tioflavina T 500 mM en tampón de fosfato 250 mM, pH 6,8). La fluorescencia se leyó a 485 nm (444 nm de longitud de onda de excitación) usando un fluorómetro de placas ELISA después de la sustracción con el tampón solo o con el compuesto solo, como blanco.

5 Los resultados de las incubaciones de 3 días se presentan a continuación. Por ejemplo, mientras que el EDTA no produjo una inhibición significativa de las fibrillas de Aβ 1-42 en todas las concentraciones analizadas, todos los compuestos produjeron en alguna medida una ruptura/un desensamblaje dependiente de la dosis de las fibrillas de Aβ 1-42 preformadas. Los compuestos más exitosos en la ruptura de fibrillas de Aβ 1-42 preformadas parecen ser los compuestos N° 3, 4, 21, 51, 73 y 78. Por ejemplo, el compuesto N° 4 produjo una inhibición significativa (p<0,01) del 97,4 ± 0,40 % cuando se usó con una relación p/p Aβ:compuesto de ensayo de 1:0,1 y una ruptura del 69,4 ± 1,17 % cuando se usó con una relación p/p de Aβ:compuesto de 1:0,01. En las mismas condiciones (es decir, relación p/p Aβ:compuesto de ensayo de 1:0,1), el compuesto N° 3 produjo una ruptura del 57,8 ± 6,36 %, el compuesto N° 21 produjo una ruptura del 81,0 ± 1,31 %, el compuesto N° 51 produjo una ruptura del 94,9 ± 0,24 %, el compuesto N° 73 produjo una ruptura del 70,9 ± 3,04 % y el compuesto N° 78 produjo una ruptura del 89,7 ± 1,8 %. Este estudio indica que los compuestos de la presente invención son disruptores/inhibidores potentes de fibrillas de tipo Aβ de la enfermedad de Alzheimer y habitualmente ejercen sus efectos de un modo dependiente de la dosis

Tabla 1: Datos de la fluorometría de tioflavina T- Ruptura de las fibrillas de Alzheimer Aβ 1-42

% de inhibición de Aβ (resultado ± D.T.) para una relación p/p de Aβ:compuesto de ensayo dada				
Compuesto de ensayo N°	1:1	1:0,1	1:0,01	1:0,001
EDTA (control)	11,3 ± 9,67	0,0 ± 7,12	0,0 ± 4,88	0,0 ± 3,01
1*	97,3 ± 0,23	64,8 ± 1,98	19,2 ± 4,31	0,0 ± 3,07
3*	99,5 ± 0,10	57,8 ± 6,36	53,1 ± 1,67	5,5 ± 1,99
4*	98,5 ± 0,77	97,4 ± 0,40	69,4 ± 1,17	26,8 ± 4,80
8*	70,8 ± 2,57	65,5 ± 0,17	24,7 ± 3,51	4,9 ± 2,27
9*	95,1 ± 0,13	34,9 ± 1,69	20 ± 10,75	10,6 ± 0,93
12*	99,7 ± 0,17	82,0 ± 1,13	10,8 ± 21,9	0,0 ± 34,9
19*	99,1 ± 0,56	91,1 ± 0,66	46,2 ± 2,98	10,8 ± 1,38
21*	98,6 ± 0,54	81,0 ± 1,31	48,2 ± 8,29	8,9 ± 2,13
23*	46,7 ± 4,62	26,2 ± 4,37	16,5 ± 4,02	0,0 ± 3,72
26*	37,8 ± 5,50	11,7 ± 3,67	0,0 ± 2,19	0,0 ± 3,24
51*	99,4 ± 0,05	94,9 ± 0,24	55,3 ± 5,23	29,0 ± 25,2
52*	93,7 ± 0,41	53,6 ± 2,42	12,1 ± 0,78	0,0 ± 6,67
57*	88,4 ± 2,73	60,2 ± 3,12	19,0 ± 6,33	17,7 ± 7,43
58*	94,8 ± 1,67	76,0 ± 2,57	33,2 ± 5,16	20,5 ± 6,27
61*	100,0 ± 0,41	80,1 ± 4,76	16,9 ± 1,39	26,0 ± 7,51
63*	85,3 ± 0,91	23,6 ± 25,75	57,5 ± 10,64	1,6 ± 9,47
66	100,0 ± 0,68	78,3 ± 4,17	42,0 ± 2,36	27,1 ± 3,51
67	98,3 ± 2,19	50,9 ± 8,32	34,0 ± 14,07	13,7 ± 6,05
73*	99,4 ± 0,42	70,9 ± 3,04	28,7 ± 10,27	0,0 ± 29,43
75*	99,0 ± 0,63	84,4 ± 0,94	31,6 ± 4,74	17,0 ± 4,20
76*	99,3 ± 1,35	86,5 ± 1,18	40,9 ± 3,76	12,2 ± 5,98
78*	100 ± 0,78	89,7 ± 1,18	57,8 ± 4,63	22,4 ± 5,63

20 *= compuesto comparativo

Parte B: Datos de SDS-PAGE/inmunotransferencia Western

La ruptura de A β 1-42, incluso en su forma monomérica, se confirmó mediante un estudio que implica el uso de métodos SDS-PAGE y de inmunotransferencia Western (no se muestran). En este último estudio, se incubaron muestras por triplicado de A β 1-42 prefibrilada (25 μ M) a 37 °C durante 3 días, solo o en presencia de los compuestos o de EDTA. Después se filtraron cinco microgramos de cada muestra a través de un filtro de 0,2 μ m. Después, la proteína recuperada del filtrado se cargó y se analizó en una SDS-PAGE con tris-tricina al 10-20 %, se transfirió a nitrocelulosa y se detectó usando un anticuerpo A β (clon 6E10; Senetek). En este estudio, se detectó A β 1-42 como una banda de ~4 kilodalton (es decir, A β monomérico) después de su incubación, solo o en presencia de EDTA, a los 3 días. Por ejemplo, no se detectaron monómeros de A β 1-42 después de la incubación de A β 1-42 con los compuestos 4, 19, 21, 51, 58, 66, 75, 76 y 78, lo que sugiere que estos compuestos eran capaces de producir la desaparición de A β 1-42 monomérico. Este estudio confirmó que estos compuestos también eran capaces de producir una ruptura/eliminación de A β 1-42 monomérico.

Parte C: Datos de unión a rojo Congo

En el ensayo de unión a rojo Congo se cuantifica la capacidad de un compuesto de ensayo para alterar la unión de amiloide (en este caso, A β) a rojo Congo. En este ensayo, se incubaron A β 1-42 y compuestos de ensayo durante 3 días y después se filtró al vacío a través de un filtro de 0,2 μ m. Después se cuantificó la cantidad de A β 1-42 retenida en el filtro después de la tinción del filtro con rojo Congo. Después de un lavado apropiado del filtro, cualquier reducción del color del rojo Congo en el filtro en presencia del compuesto de ensayo (en comparación con la tinción con rojo Congo de la proteína amiloidea en ausencia del compuesto de ensayo) fue indicativa de la capacidad del compuesto de ensayo para disminuir/alterar la cantidad de A β agregado y congófilico.

En un estudio, se determinó la capacidad de fibrillas A β para unirse al rojo Congo en ausencia o presencia de cantidades crecientes de los compuestos o de EDTA (a relaciones en peso de A β :compuestos de ensayo de 1:1, 1:0,1, 1:0,01 o 1:0,001). Los resultados de las incubaciones de 3 días se presentan en la Tabla 2, a continuación. Mientras que el EDTA no produjo una inhibición significativa de la unión de fibrillas de A β 1-42 al rojo Congo en todas las concentraciones analizadas, los compuestos produjeron una inhibición dependiente de la dosis de la unión de A β a rojo Congo. Por ejemplo, el compuesto N° 4 produjo una inhibición significativa ($p < 0,01$) de $73,0 \pm 0,90$ % de unión a rojo Congo de las fibrillas A β 1-42 cuando se usó una relación p/p de A β :compuesto de ensayo de 1:1, y una inhibición significativa ($p < 0,01$) de $46,8 \pm 1,28$ % de unión a rojo Congo de las fibrillas A β 1-42 cuando se usó una relación p/p de A β :compuesto de ensayo de 1:0,1, y una inhibición significativa ($p < 0,01$) de $16,4 \pm 2,02$ % de unión a rojo Congo de las fibrillas A β 1-42 cuando se usó una relación p/p de A β :compuesto de ensayo de 1:0,01. En otro ejemplo, el compuesto análogo sintético N° 3 produjo una inhibición significativa ($p < 0,01$) de $91,6 \pm 5,19$ % de unión a rojo Congo de las fibrillas A β 1-42 cuando se usó una relación p/p de A β :compuesto de ensayo de 1:1, y una inhibición significativa ($p < 0,01$) de $35,7 \pm 3,29$ % de unión a rojo Congo de las fibrillas A β 1-42 cuando se usó una relación p/p de A β :compuesto de ensayo de 1:0,01. Este estudio también indica que los compuestos de la presente invención son inhibidores potentes de la unión de fibrillas A β a rojo Congo y habitualmente ejercen sus efectos de un modo dependiente de la dosis

Tabla 2: Datos de unión a rojo Congo

% de inhibición de Aβ (resultado \pm D.T.) para una relación p/p de Aβ:compuesto de ensayo dada				
Compuesto de ensayo N°	1:1	1:0,1	1:0,01	1:0,001
EDTA (control)	1,1 \pm 7,02	3,6 \pm 8,68	0,0 \pm 3,91	7,91 \pm 3,61
1*	42,4 \pm 1,58	8,0 \pm 1,80	3,9 \pm 0,66	0,0 \pm 3,54
3*	91,6 \pm 5,19	35,7 \pm 3,29	7,4 \pm 1,51	1,7 \pm 4,21
4*	73,0 \pm 0,90	46,8 \pm 1,28	16,4 \pm 2,02	2,3 \pm 1,80
8*	17,7 \pm 1,86	9,7 \pm 0,69	1,1 \pm 0,96	0,0 \pm 3,55
9*	46,8 \pm 1,50	10,9 \pm 2,18	0,0 \pm 2,15	3,1 \pm 3,66
12*	63,0 \pm 1,63	20,8 \pm 2,22	17,9 \pm 7,33	4,1 \pm 6,60
19*	48,1 \pm 2,00	22,4 \pm 2,19	7,4 \pm 2,20	0,0 \pm 1,01
21*	66,2 \pm 1,26	33,9 \pm 1,02	9,3 \pm 5,68	3,6 \pm 0,58
23*	10,7 \pm 2,84	2,9 \pm 0,43	0,0 \pm 0,72	12,3 \pm 6,57
26*	4,5 \pm 2,03	0,0 \pm 1,35	6,1 \pm 4,26	0,0 \pm 2,64
51*	78,6 \pm 1,49	46,7 \pm 1,29	20,5 \pm 11,48	6,0 \pm 11,47

52*	35,4 ± 1,28	12,7 ± 2,35	0,0 ± 1,29	0,0 ± 3,68
57*	44,8 ± 0,77	14,2 ± 1,56	0,1 ± 2,09	0,0 ± 4,73
58*	52,2 ± 2,65	21,1 ± 3,67	6,6 ± 3,49	2,5 ± 4,22
61*	48,9 ± 4,69	24,6 ± 10,85	2,0 ± 2,89	0,0 ± 4,06
63*	32,5 ± 5,66	8,5 ± 8,01	20,1 ± 10,35	0,0 ± 1,93
66	55,9 ± 6,83	27,7 ± 11,26	7,7 ± 0,19	0,6 ± 6,61
67	31,5 ± 11,25	13,8 ± 11,25	8,2 ± 7,08	0,0 ± 4,98
73*	53,4 ± 1,84	22,6 ± 3,51	0,6 ± 5,04	0,0 ± 15,17
75*	59,2 ± 3,23	12,8 ± 0,59	6,8 ± 2,55	2,4 ± 2,95
76*	66,6 ± 0,68	27,8, ± 7,71	4,1 ± 2,23	0,3 ± 5,1
78*	71,1 ± 1,09	39,9 ± 3,94	15,4 ± 1,39	3,5 ± 1,33

*= compuesto comparativo

Parte D - Datos de espectroscopía de dicroísmo circular

- 5 La espectroscopía de dicroísmo circular (CD) es un método que puede usarse para determinar los efectos de los compuestos de ensayo para romper la conformación de estructura secundaria de fibrillas de amiloide. En un estudio, tal como se describe en este ejemplo, se usó la espectroscopía de dicroísmo circular para determinar los efectos de diferentes compuestos de la invención sobre la conformación de lámina β de fibrillas de A β 1-42. Para este estudio, se disolvió, en primer lugar, A β 1-42 (Bachem Inc., Torrance, CA) en una solución de NaOH 2 mM, manteniendo el
- 10 pH de estas soluciones por encima de 10. Se fabricaron péptidos A β 1-42 (a una concentración 25 μ M) en ausencia o presencia de compuestos de ensayo, en NaF 150 mM, tampón de fosfato 50 mM, pH 7,4, con trifluoroetanol al 10 %. Después se incubó A β 1-42 a 37 °C en ausencia o presencia de diferentes compuestos con relaciones p/p de A β :compuesto de ensayo de 1:0,1, 1:1 y 1:10. Después de 3 días de incubación, se registraron los espectros CD en un espectropolarímetro Jasco 810 (Easton, MD). Todos los espectros CD se registraron con células de cuarzo de
- 15 0,05 cm. Se realizó un seguimiento de las pistas de longitud de onda de 190-260 nm con incrementos de 0,5 nm con una anchura de banda de 5 nm, a una velocidad del seguimiento de 10 nm/minuto, un tiempo de respuesta de 32 segundos y una separación de datos de 0,5 nm. Todo el sistema se equilibró y se continuó purgando con nitrógeno a 10 ml/minuto. Para el procesamiento de datos, se sustrajo el promedio de 5 replicados de espectros de "compuesto de ensayo" del promedio de 5 replicados de espectros de "A β 1-42 + compuesto de ensayo" para determinar los
- 20 efectos de cada compuesto de ensayo sobre la ruptura de fibrillas A β 1-42. La elipticidad en grados se convirtió en MRE ([Q]; elipticidad de residuo molar) usando la fórmula $[Q] = 100 \cdot Q \cdot \text{RMW} / d \cdot c$; en la que Q es la elipticidad en grados; RMW es el peso molecular promedio del residuo (~107 daltons para A β 1-42); d es la longitud del trayecto en cm (es decir, 0,05 cm); y c es la concentración en mg/ml (es decir, 0,1 mg/ml).
- 25 La figura 1 muestra algunos de los espectros CD generados en este estudio. A β 1-42 solo en tampón TFE PBS al 10 % mostró habitualmente los espectros CD típicos de una proteína amiloidea con una estructura de lámina β significativa, como se demostró por medio de los mínimos observados a 218 nm. No obstante, en presencia de compuestos de ensayo (tales como los compuestos N° 4, 12, 51 y 61 mostrados en la figura 1) fue evidente una marcada ruptura de la estructura en lámina β en fibrillas A β 1-42 (con un aumento significativo en enrollado aleatorio o hélice α) como se muestra mediante la nivelación de los mínimos observados a 218 nm (en comparación con A β 1-42 solo). Esto se observó habitualmente tanto a 3 días (como se observa en la Figura 1) como a 7 días (no se
- 30 muestra) después de la coincubación de fibrillas A β 1-42 con los compuestos.
- La figura 2 muestra el efecto del compuesto N° 78 sobre la ruptura de fibrillas A β 1-42. Como se muestra en la
- 35 figura, A β 1-42 solo mostró los espectros CD típicos de una estructura en lámina β predominante con unos mínimos marcados observados a 218 nm. No obstante, en presencia del compuesto N° 78 a 3 días, hay una disminución marcada en los mínimos observados habitualmente a 218 nm (con A β 1-42 solo), lo que es indicativo de una ruptura de la estructura en lámina β de fibrillas A β 1-42.
- 40 La figura 3 muestra los efectos dependientes de la dosis de los compuestos N° 12, 51 y 61 sobre la ruptura de la estructura de lámina β de fibrillas A β 1-42. Como ejemplo, concentraciones crecientes de los compuestos de ensayo N° 12, 51 y 61 (en relaciones p/p de A β :compuestos de ensayo de 1:0,1, 1:1 y 1:10) produjeron una ruptura general de la estructura de lámina β como se demuestra mediante la disminución dependiente de la dosis en los mínimos observada a 218 nm (en comparación con los mínimos a 218 nm observados con A β 1-42 solo). El compuesto N° 51
- 45 fue particularmente eficaz cuando se usó con una relación p/p de A β :compuesto de ensayo de 1:10 y se mostró la ruptura completa de la estructura en lámina β de fibrillas A β 1-42 tal como se muestra mediante la nivelación de los

mínimos observados a 218 nm (en comparación con A β 1-42 solo) (Fig. 3).

Los estudios CD demuestran que los compuestos de la presente invención tienen la capacidad de romper/desensamblar la estructura en lamina β característica de fibrillas de A β de Alzheimer. Los resultados de los estudios también confirman los ejemplos previos usando ensayos de tipo fluorometría de tioflavina T, SDS-PAGE/ECL y de unión a rojo Congo, que los compuestos de la presente invención son agentes antiamiloides potentes.

Ejemplo 26: Los compuestos de la presente invención son disruptores potentes de fibrillas IAPP de diabetes de tipo 2

Se halló que los compuestos preparados en los Ejemplos y los Ejemplos comparativos de síntesis son disruptores/inhibidores potentes de fibrillas IAPP de diabetes de tipo 2. En una serie de estudios, se analizó la eficacia de los compuestos para producir un desensamblaje/una ruptura de fibrillas de IAPP preformadas de diabetes de tipo 2.

Parte A: datos de la fluorometría de tioflavina T

En un estudio, se usó fluorometría de tioflavina T para determinar los efectos de los compuestos y de EDTA (como control negativo). En este ensayo la tioflavina T se une específicamente al amiloide fibrilar, y esta unión produce una potenciación de la fluorescencia a 485 nm que es directamente proporcional a la cantidad de fibrillas de IAPP presentes. Cuanto mayor sea la fluorescencia, mayor será la cantidad de fibrillas de IAPP presentes (Naki y col, Lab. Invest. 65:104-110, 1991; Levine III, Protein Sci. 2:404-410, 1993; Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest. 2:1-6, 1995).

En este estudio, se incubaron 25 μ M de IAPP prefibrilado (Bachem Inc) a 37 °C durante 3 días bien solo o bien en presencia de uno de los compuestos o de EDTA (con relaciones en peso de IAPP:compuesto de ensayo de 1:1, 1:0,1, 1:0,01 o 1:0,001). Después de 3 días de incubación, se transfirieron 50 μ l de cada mezcla de incubación a una placa de microvaloración de 96 pocillos que contenía 150 μ l de agua destilada y 50 μ l de una solución de tioflavina T (es decir, tioflavina T 500 mM en tampón de fosfato 250 mM, pH 6,8). La fluorescencia se leyó a 485 nm (444 nm de longitud de onda de excitación) usando un fluorómetro de placa ELISA después de la sustracción con el tampón solo o con el compuesto solo, como blanco.

Los resultados se muestran en la tabla 3 siguiente. Por ejemplo, mientras que el EDTA no produjo una inhibición significativa de las fibrillas de IAPP en todas las concentraciones analizadas, todos los compuestos produjeron en diversas medidas una ruptura/un desensamblaje dependiente de la dosis de las fibrillas de IAPP preformadas. Los compuestos más exitosos en la ruptura de fibrillas de IAPP parecen ser los compuestos N^o 3, 4, 23, 63 y 78. Por ejemplo, el compuesto N^o 3 produjo una inhibición significativa ($p < 0,01$) del $97,7 \pm 0,19$ % cuando se usó en una relación p/p IAPP:compuesto de ensayo de 1:0,1 y una ruptura del $79,9 \pm 1,47$ % cuando se usó en una relación p/p de IAPP:compuesto de 1:0,01. En las mismas condiciones (es decir, relación p/p IAPP:compuesto de ensayo de 1:0,1), el compuesto N^o 4 produjo una ruptura del $96,0 \pm 1,00$ %, el compuesto N^o 23 produjo una ruptura del $67,2 \pm 18,35$ %, el compuesto N^o 63 produjo una ruptura del $84,2 \pm 1,16$ %, el compuesto N^o 78 produjo una ruptura del $92,4 \pm 0,27$ % y el compuesto N^o 26 produjo una ruptura del $45,9 \pm 17,73$ %. Este estudio indicó que los compuestos de la presente invención también son disruptores/inhibidores potentes de fibrillas de IAPP de diabetes de tipo 2 y habitualmente ejercen sus efectos de un modo dependiente de la dosis

Tabla 3: Datos de trifluorometría de tioflavina T - ruptura de fibrillas de IAPP de diabetes de tipo 2

% de inhibición de IAPP (resultado \pm D.T.) para una relación p/p de IAPP:compuesto de ensayo dada				
Compuesto de ensayo N^o	1:1	1:0,1	1:0,01	1:0,001
EDTA (control)	4,4 \pm 9,23	0,1 \pm 2,59	0,0 \pm 5,23	4,2 \pm 1,05
1*	99,0 \pm 0,11	93,0 \pm 1,27	57,3 \pm 0,16	6,4 \pm 4,40
3*	100 \pm 0,20	97,7 \pm 0,19	79,9 \pm 1,47	30,7 \pm 6,71
4*	99,7 \pm 0,23	96,0 \pm 0,10	63,2 \pm 2,09	17,3 \pm 4,07
8*	72,8 \pm 1,77	67,8 \pm 1,74	29,6 \pm 5,97	11,4 \pm 12,78
12*	99,9 \pm 0,19	86,0 \pm 0,76	37,5 \pm 0,76	13,0 \pm 10,34
19*	100,0 \pm 0,24	94,0 \pm 0,10	51,7 \pm 2,98	16,7 \pm 10,20
21*	98,5 \pm 0,06	85,4 \pm 0,86	25,8 \pm 3,61	5,4 \pm 15,41
23*	85,2 \pm 0,55	67,2 \pm 18,35	44,3 \pm 32,47	27,3 \pm 45,38

26*	52,5 ± 2,44	45,9 ± 17,73	24,6 ± 6,77	3,7 ± 4,67
51*	99,9 ± 0,11	96,6 ± 1,00	56,6 ± 1,69	11,8 ± 6,45
52*	97,9 ± 0,19	86,9 ± 3,09	49,2 ± 4,47	16,0 ± 8,42
57*	94,1 ± 0,46	73,2 ± 1,19	37,3 ± 0,78	1,9 ± 5,24
58*	98,1 ± 1,04	87,6 ± 1,16	48,8 ± 2,05	8,9 ± 6,87
61*	96,8 ± 0,47	83,6 ± 1,27	35,4 ± 5,68	0,5 ± 6,33
63*	94,9 ± 0,65	84,2 ± 1,16	56,2 ± 8,77	19,0 ± 0,30
66	98,5 ± 0,06	94,0 ± 2,88	47,6 ± 8,16	11,1 ± 5,28
67	98,6 ± 0,22	81,4 ± 6,96	34,8 ± 1,87	16,1 ± 12,40
75*	100 ± 0,35	90,0 ± 0,27	43,9 ± 5,34	6,0 ± 6,46
76*	99,6 ± 1,01	87,5 ± 1,89	41,5 ± 6,67	9,0 ± 0,32
78*	99,5 ± 0,26	92,4 ± 0,27	58,3 ± 1,20	15,3 ± 4,73

*= compuesto comparativo

Parte B: Datos de union a rojo Congo

- 5 En el ensayo de union a rojo Congo se cuantifica la capacidad de un compuesto de ensayo para alterar la unión de amiloide (en este caso, IAPP) a rojo Congo. En este ensayo, se incubaron IAPP y compuestos de ensayo durante 3 días y después se filtró al vacío a través de un filtro de 0,2 µm. Después se cuantificó la cantidad de IAPP retenida en el filtro después de la tinción del filtro con rojo Congo. Después de un lavado apropiado del filtro, cualquier reducción del color del rojo Congo en el filtro en presencia del compuesto de ensayo (en comparación con la tinción con rojo Congo de la proteína amiloide en ausencia del compuesto de ensayo) fue indicativa de la capacidad del compuesto de ensayo para disminuir/alterar la cantidad de IAPP agregado y congofílico.

15 En el estudio, se determinó la capacidad de fibrillas de IAPP para unirse al rojo Congo en ausencia o presencia de cantidades crecientes de los compuestos o de EDTA (a relaciones en peso de IAPP:compuestos de ensayo de 1:1, 1:0,1, 1:0,01 o 1:0,001). Los resultados de las incubaciones de 3 días se presentan en la Tabla 4, a continuación. Mientras que el EDTA no produjo una inhibición significativa de la unión de fibrillas de IAPP al rojo Congo en todas las concentraciones analizadas, los compuestos produjeron habitualmente una inhibición dependiente de la dosis de la unión de IAPP a rojo Congo. Por ejemplo, el compuesto N° 3 produjo una inhibición significativa ($p < 0,01$) del 55,5 ± 2,68 % de unión a rojo Congo de las fibrillas de IAPP cuando se usó una relación p/p de IAPP:compuesto de ensayo de 1:1, y una inhibición significativa ($p < 0,01$) del 37,9 ± 3,10 % de unión a rojo Congo de las fibrillas de IAPP cuando se usó una relación p/p de IAPP:compuesto de ensayo de 1:0,1. El compuesto N° 4 produjo una inhibición significativa ($p < 0,01$) del 68,9 ± 1,22 % de unión a rojo Congo de las fibrillas de IAPP cuando se usó una relación p/p de IAPP:compuesto de ensayo de 1:1, y una inhibición del 25,4 ± 4,68 % de unión a rojo Congo cuando se usó una relación p/p de NAC:compuesto de ensayo de 1:0,01. Este estudio indicó que los compuestos de la presente invención son también inhibidores potentes de la unión de fibrillas IAPP de diabetes de tipo 2 a rojo Congo y habitualmente ejercen sus efectos de un modo dependiente de la dosis

Tabla 4: Datos de union de rojo Congo

% de inhibición de IAPP (resultado ± D.T.) para una relación p/p de IAPP:compuesto de ensayo dada				
Compuesto de ensayo N°	1:1	1:0,1	1:0,01	1:0,001
EDTA (control)	0,0 ± 3,69	0,0 ± 1,91	3,6 ± 2,83	6,6 ± 2,27
1*	40,7 ± 2,49	10,6 ± 3,40	18,6 ± 4,05	6,4 ± 2,07
3*	55,5 ± 2,68	37,9 ± 3,10	16,3 ± 1,13	11,1 ± 5,26
4*	68,9 ± 1,22	25,4 ± 4,68	9,0 ± 0,51	0,0 ± 1,05
8*	0,0 ± 2,84	0,0 ± 2,94	7,2 ± 2,27	0,0 ± 6,46
12*	39,8 ± 0,26	8,3 ± 0,85	6,9 ± 2,45	0,0 ± 2,40
19*	49,3 ± 3,97	21,0 ± 3,70	6,0 ± 0,78	2,9 ± 4,40
21*	35,9 ± 0,21	10,4 ± 3,53	5,1 ± 4,53	0,0 ± 2,10

23*	5,5 ± 2,33	4,5 ± 4,12	9,3 ± 1,40	5,1 ± 2,45
26*	0,0 ± 1,21	7,5 ± 2,83	5,3 ± 6,14	10,8 ± 2,63
51*	55,6 ± 1,48	27,5 ± 3,49	3,6 ± 2,59	1,6 ± 1,01
52*	31,3 ± 0,27	11,5 ± 1,21	11,0 ± 3,27	10,2 ± 0,52
57*	15,7 ± 3,77	8,9 ± 3,90	8,5 ± 3,19	4,5 ± 0,64
58*	24,5 ± 0,57	0,7 ± 6,21	4,6 ± 2,35	0,0 ± 1,93
61*	23,7 ± 0,39	0,0 ± 7,07	4,0 ± 1,78	0,0 ± 3,87
63*	15,4 ± 1,34	4,5 ± 1,62	11,7 ± 2,26	0,0 ± 2,25
66	41,4 ± 3,84	15,7 ± 2,53	5,7 ± 4,23	4,8 ± 1,86
67	26,3 ± 2,76	5,5 ± 2,52	10,6 ± 1,29	0,0 ± 3,45
75*	49,0 ± 1,17	7,4 ± 0,70	11,3 ± 2,24	2,9 ± 0,69
76*	53,9 ± 5,44	16,5 ± 2,60	14,2 ± 2,25	3,4 ± 1,07
78*	56,3 ± 5,32	16,7 ± 6,80	19,9 ± 2,12	6,6 ± 3,04

*= compuesto comparativo

Ejemplo 27: Los compuestos de la presente invención son disruptores potentes de fibrillas NAC de la enfermedad de Parkinson

5 Se halló que los compuestos de la presente invención y los compuestos comparativos analizados también son disruptores/inhibidores potentes de fibrillas NAC de la enfermedad de Parkinson. El NAC es un fragmento de 35 aminoácidos de α -sinucleína que se ha demostrado que forma fibrillas de tipo amiloideo cuando se incubaba a 37 °C durante unos pocos días. Es el fragmento amiloidogénico de la α -sinucleína y se postula que tiene un papel importante en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson y otras sinucleinopatías. En una serie de estudios, se analizó la eficacia de los compuestos para producir un desensamblaje/una ruptura de fibrillas de NAC de la enfermedad de Parkinson.

Parte A: datos de la fluorometría de tioflavina T

15 En un estudio, se usó fluorometría de tioflavina T para determinar los efectos de los compuestos N° 1, 3, 23, 26, 52, 63, 66, 67 y de EDTA (como control negativo). En este ensayo, la tioflavina T se une específicamente a las fibrillas de NAC, y esta unión produce una potenciación de la fluorescencia a 485 nm que es directamente proporcional a la cantidad de fibrillas de NAC presentes. Cuanto mayor sea la fluorescencia, mayor será la cantidad de fibrillas de NAC presentes (Naki y col, Lab. Invest. 65:104-110, 1991; Levine III, Protein Sci. 2:404-410, 1993; Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest. 2:1-6, 1995).

25 En este estudio, se incubaron 25 μ M de NAC prefibrilado (Bachem Inc) a 37 °C durante 3 días bien solo o bien en presencia de uno de los compuestos análogos sintéticos de dihidroxi N° 1, 3, 23, 26, 52, 63, 66, 67 o de EDTA (con relaciones en peso de NAC:compuesto de ensayo de 1:1, 1:0,1, 1:0,01 o 1:0,001). Después de 3 días de coincubación, se transfirieron 50 μ l de cada mezcla de incubación a una placa de microvaoración de 96 pocillos que contenía 150 μ l de agua destilada y 50 μ l de una solución de tioflavina T (es decir, tioflavina T 500 mM en tampón de fosfato 250 m, pH 6,8). La fluorescencia se leyó a 485 nm (444 nm de longitud de onda de excitación) usando un fluorómetro de placas ELISA después de la sustracción con el tampón solo o con el compuesto solo, como blanco.

30 Los resultados de las incubaciones de 3 días se presentan en la Tabla 5, a continuación. Por ejemplo, mientras que el EDTA no produjo una inhibición significativa de las fibrillas NAC en todas las concentraciones analizadas, los compuestos 1, 3, 52, 63, 66 Y 67 produjeron en diversas medidas una ruptura/un desensamblaje dependiente de la dosis de las fibrillas de NAC preformadas. Por ejemplo, el compuesto N° 3 produjo una inhibición significativa ($p < 0,01$) del 91,0 ± 1,99 % cuando se usó con una relación NAC:compuesto de ensayo de 1:0,1, y una ruptura del 93,9 ± 0,77 % cuando se usó con una relación p/p de NAC:compuesto de 1:0,01. En las mismas condiciones (es decir, relación p/p NAC:compuesto de ensayo de 1:0,1), el compuesto N° 1 produjo una ruptura del 99,5 ± 0,53 %, el compuesto N° 26 produjo una ruptura del 61,3 ± 6,52 %, el compuesto N° 52 produjo una ruptura del 89,2 ± 1,49 %, el compuesto N° 66 produjo una ruptura del 82,5 ± 5,37 % y el compuesto N° 67 produjo una ruptura del 50,0 ± 7,03 %.

40 Este estudio indica que los compuestos de la presente invención son disruptores/inhibidores potentes de fibrillas de NAC de la enfermedad de Parkinson y habitualmente ejercen sus efectos de un modo dependiente de la dosis

Tabla 5: Datos de fluorometría de tioflavina T - Ruptura de fibrillas de NAC de la enfermedad de Parkinson

% de inhibición de NAC (resultado \pm D.T.) para una relación p/p de NAC:compuesto de ensayo dada				
Compuesto de ensayo N°	1:1	1:0,1	1:0,01	1:0,001
EDTA (control)	20,0 \pm 11,8	0,0 \pm 5,87	0,0 \pm 10,87	0,0 \pm 11,6
1*	100,0 \pm 1,00	99,5 \pm 0,53	68,2 \pm 2,55	0,0 \pm 7,14
3*	98,0 \pm 1,78	91,0 \pm 1,99	93,9 \pm 0,77	67,3 \pm 6,37
23*	58,0 \pm 8,43	53,3 \pm 12,02	35,6 \pm 9,73	0,0 \pm 26,42
26*	70,4 \pm 3,22	61,3 \pm 6,52	56,8 \pm 4,60	0,0 \pm 16,88
52*	99,7 \pm 1,93	89,2 \pm 1,49	79,6 \pm 6,43	13,8 \pm 10,49
63*	45,6 \pm 31,03	34,5 \pm 17,15	33,0 \pm 1,69	17,3 \pm 12,57
66	98,9 \pm 0,65	82,5 \pm 5,37	43,4 \pm 3,45	30,5 \pm 9,55
67	97,4 \pm 1,19	50,0 \pm 7,03	30,6 \pm 5,75	11,9 \pm 15,98

*= compuesto comparativo

Parte B: Datos de unión de rojo Congo

- 5 En el ensayo de unión de Congo se cuantifica la capacidad de un compuesto de ensayo para alterar la unión de amiloide (en este caso, NAC) a rojo Congo. En este ensayo, se incubaron NAC y compuestos de ensayo durante 3 días y después se filtró al vacío a través de un filtro de 0,2 μ m. Después se cuantificó la cantidad de NAC retenida en el filtro después de la tinción del filtro con rojo Congo. Después de un lavado apropiado del filtro, cualquier reducción del color del rojo Congo en el filtro en presencia del compuesto de ensayo (en comparación con la tinción con rojo Congo de la proteína amiloidea en ausencia del compuesto de ensayo) fue indicativa de la capacidad del compuesto de ensayo para disminuir/alterar la cantidad de NAC agregado y congófilico.

15 En un estudio, se determinó la capacidad de fibrillas de NAC para unirse al rojo Congo en ausencia o presencia de cantidades crecientes de los compuestos N° 1, 3, 23, 26, 63, 66, 67 o de EDTA (con relaciones en peso de NAC:compuestos de ensayo de 1:1, 1:0,1, 1:0,01 o 1:0,001). Los resultados de las incubaciones de 3 días se presentan en la Tabla 6. Mientras que el EDTA no produjo una inhibición significativa de la unión de fibrillas de NAC al rojo Congo en todas las concentraciones analizadas, los compuestos produjeron una inhibición dependiente de la dosis de la unión de NAC a rojo Congo tal como se muestra en la Tabla 6 siguiente. Por ejemplo, el compuesto N° 3 produjo una inhibición significativa ($p < 0,01$) del 94,4 \pm 2,48 % de unión a rojo Congo de las fibrillas NAC cuando se usó una relación p/p de NAC:compuesto de ensayo de 1:1, y una inhibición significativa ($p < 0,01$) del 83,2 \pm 2,48 % de unión a rojo Congo de las fibrillas NAC cuando se usó una relación p/p de NAC:compuesto de ensayo de 1:0,1. Por ejemplo, el compuesto N° 1 produjo una inhibición del 75,4 \pm 2,96 % de unión a rojo Congo de las fibrillas NAC cuando se usó una relación p/p de NAC:compuesto de ensayo de 1:1, y una inhibición del 75,9 \pm 2,48 % de unión a rojo Congo de las fibrillas NAC cuando se usó una relación p/p de NAC:compuesto de ensayo de 1:0,1. En otro ejemplo, el compuesto análogo sintético N° 67 produjo una inhibición significativa ($p < 0,01$) del 81,2 \pm 2,87 % de unión a rojo Congo de las fibrillas NAC cuando se usó una relación p/p de NAC:compuesto de ensayo de 1:1, y una inhibición significativa ($p < 0,01$) del 47,7 \pm 8,20 % de unión a rojo Congo cuando se usó una relación p/p de NAC:compuesto de ensayo de 1:0,01. En otro ejemplo, el compuesto N° 26 produjo una inhibición significativa del 34,4 \pm 10,19 % de unión a rojo Congo cuando se usó en una relación de NAC:compuesto de ensayo de 1:1, y una inhibición del 36,7 \pm 5,59 % de unión al rojo Congo cuando se usó una relación de NAC:compuesto de ensayo de 1:0,1. Este estudio también indicó que los compuestos de la presente invención son también inhibidores potentes de la unión de fibrillas de tipo NAC de la enfermedad de Parkinson a rojo Congo y habitualmente ejercen sus efectos de un modo dependiente de la dosis

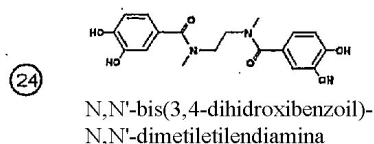
35 Tabla 6: Datos de unión a rojo Congo - Ruptura de fibrillas de NAC de la enfermedad de Parkinson

% de inhibición de NAC (resultado \pm D.T.) para una relación p/p de NAC:compuesto de ensayo dada				
Compuesto de ensayo N°	1:1	1:0,1	1:0,01	1:0,001
EDTA (control)	0,2 \pm 7,33	0,0 \pm 38,26	0,0 \pm 22,0	0,0 \pm 20,57
1	75,4 \pm 2,96	75,9 \pm 2,58	40,7 \pm 4,23	0,0 \pm 11:39
3	94,4 \pm 2,48	83,2 \pm 3,57	81,7 \pm 2,82	65,2 \pm 5,40
23	41,0 \pm 8,54	30,3 \pm 12,06	25,6 \pm 5,37	0,0 \pm 9,00
26	34,4 \pm 10,19	36,7 \pm 5,59	36,4 \pm 0,67	0,0 \pm 27,34

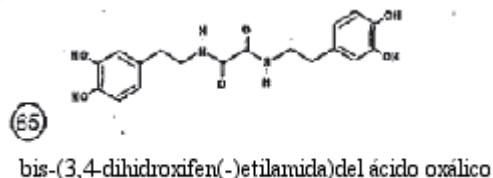
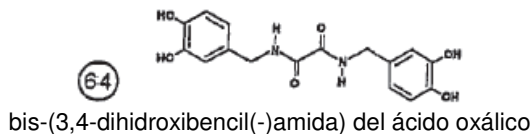
52	73,8 ± 3,15	71,2 ± 7,17	78,9 ± 4,76	0,0 ± 24,43
63	54,5 ± 7,56	9,3 ± 10,5	34,0 ± 3,66	0,0 ± 30,84
66	81,1 ± 1,74	72,4 ± 1,79	51,0 ± 9,50	19,5 ± 37,59
67	81,2 ± 2,87	47,7 ± 8,20	39,2 ± 10,25	15,5 ± 41,42

Ejemplo 28: Otros compuestos de bis-dihidroxifenilo de la invención

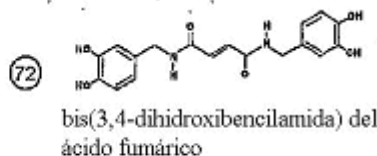
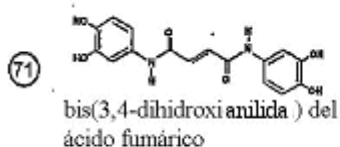
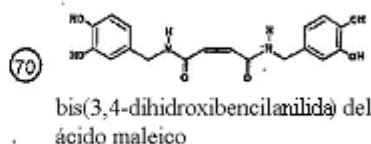
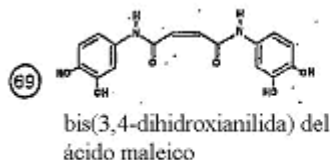
- 5 Además de los 24 compuestos descritos en detalle en los Ejemplos 1 - 24, este Ejemplo describe otros compuestos de bis-(dihidroxifenilo) que también sirven como disruptores/inhibidores potentes de fibrillas de amiloides en la enfermedad de Alzheimer (es decir, Aβ), diabetes de tipo 2 (es decir, IAPP), otras enfermedades de amiloides, así como en la enfermedad de Parkinson (es decir, α-sinucleína/NAC) y otras enfermedades de fibrillas de sinucleína.
- 10 Estos compuestos son los compuestos N^o 24, 64, 65, 68, 69, 70, 71 y 72. Estos se denominan también respectivamente DC-0024, DC-0064, DC-0065, DC-0068, DC-0069, DC-0070, DC-0071 y DC-0072, respectivamente.



15



20



25

Estos compuestos pueden prepararse mediante los métodos usados para producir los compuestos ilustrados en los Ejemplos 1 a 23 y variaciones de los mismos que pueden determinarse fácilmente por parte de una persona experta en la técnica. De este modo, por ejemplo, el compuesto 24 puede prepararse mediante el método usado para el compuesto 12, sustituyendo N,N'-dimetiletilendiamina por el *trans*-1,2-diaminociclohexano del Ejemplo 6, etc. Un

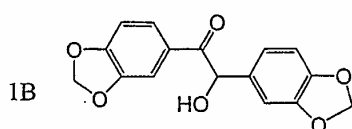
experto en la técnica no tendrá dificultad, teniendo en cuenta que su experiencia y la presente divulgación, en preparar los compuestos ilustrados anteriormente o los compuestos de la fórmula dada en la reivindicación 1.

Ejemplo comparativo 29: Análogos de metilendioxi

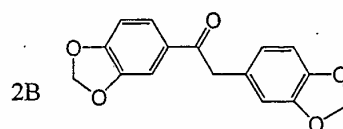
5 Una estrategia para el suministro de compuestos de dihidroxiarilo de la presente invención para mejorar y/o provocar un metabolismo y características de biodisponibilidad más favorables implica la protección de los grupos hidroxiarilo de los compuestos de hidroxiarilo con grupos metilendioxi. Esta estrategia se ejemplifica en las 80 estructuras que se muestran a continuación

10 Los análogos de metilendioxi representan estructuras protectoras de hidroxilo intermedias que se preparan para completar la síntesis de los compuestos de dihidroxiarilo descritos en la invención. Estos compuestos de anillo cerrado también tienden a ser más estables e hidrófobos (insolubles en agua) y es menos probable que se alteren o se degraden por la oxidación que podría tener lugar si estuvieran presentes grupos hidroxilo. Además, estos compuestos producen buenos profármacos especialmente para suministrar al cerebro debido a su naturaleza hidrófoba. Los compuestos hidrófobos que sean solubles en lípidos tienden a ser compuestos atractivos para suministrar al cerebro ya que habitualmente son capaces de penetrar en la barrera hematoencefálica.

20 Los análogos de metilendioxi están generalmente disponibles como intermedios en la síntesis de los compuestos de hidroxiarilo correspondientes, como puede observarse a partir de las síntesis ilustradas en los Ejemplos 1-23. Se espera que estos compuestos sean eficaces en su capacidad para producir una ruptura/un desensamblaje y la inhibición de fibrillas de amiloide y sinucleína, una vez se escindan las estructuras de metilendioxi para proporcionar grupos hidroxilo. La conversión de los grupos hidroxilo dando derivados de metilendioxi también producen profármacos que se cree que mejoran la toxicidad (es decir, son menos tóxicos), metabolismo (ya que será menos probable que los grupos OH se alteren por mutilación, glucuronidación y sulfatación) y biodisponibilidad. En este concepto de profármaco, se cree que la conversión de profármaco tiene lugar en el plasma (después de su protección a través del intestino) y más cercano a su tejido diana apropiado (órganos sistémicos y/o cerebro). Se cree que las enzimas en la sangre y tejidos apropiados son capaces de escindir el grupo de metilendioxi en estos análogos para proporcionar las estructuras de hidroxilo para lograr la eficacia observada contra las enfermedades descritas anteriormente en la solicitud tal como la enfermedad de Alzheimer, diabetes de tipo 2, enfermedad de Parkinson y otras amiloidosis y sinucleinopatías.

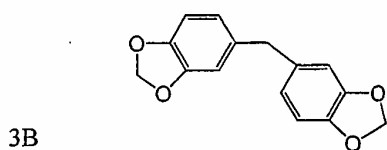


bis(3,4-metilendioxi)benzoína

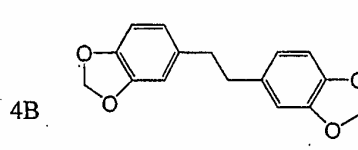


bis(3,4-metilendioxi)desoxibenzoína

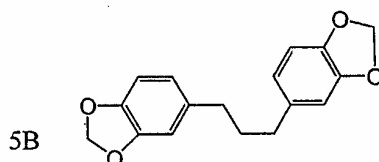
35



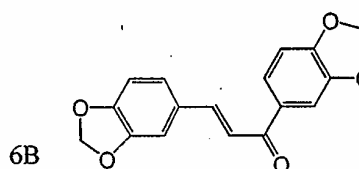
1,1-bis(3,4-metilendioxyfenil)metano



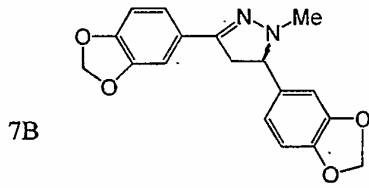
1,2-bis(3,4-metilendioxyfenil)etano



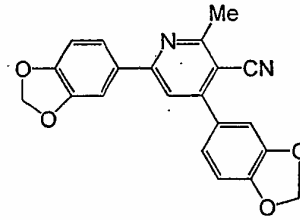
40 1,3-bis(3,4-metilendioxyfenil)propano



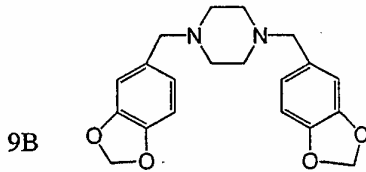
bis(3,4-metilendioxyfenil)chalcona



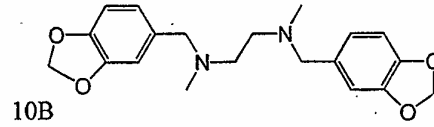
3,5-bis(3,4-metilendioxfenil)-
1-metil-2-pirazolina



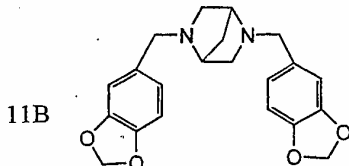
4,6-bis(3,4-metilendioxfenil)-
3-ciano-2-metilpiridina



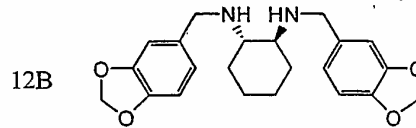
1,4-bis(3,4-metilendioxbencil)piperazina



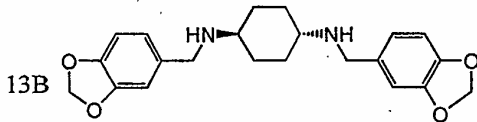
N,N'-bis(3,4-metilendioxbencil)-N,N'-dimetil-etilendiamina



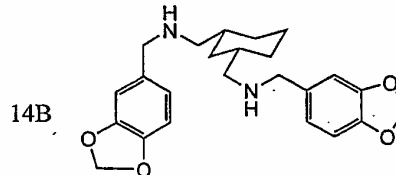
2,5-bis(3,4-metilendioxbencil)-2,5-
diaza[2,2,1]-bicioheptano



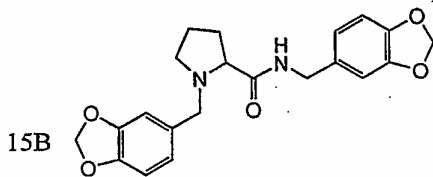
N,N'-bis(3,4-metilendioxbencil)-trans-
1,2-diaminociclohexano



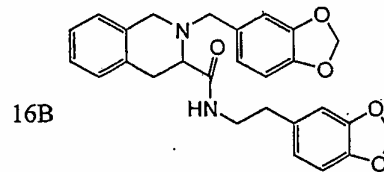
N,N'-bis(3,4-metilendioxbencil)-trans-
1,4-diaminociclohexano



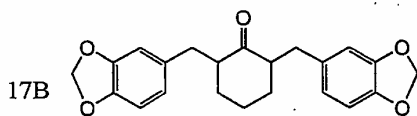
N,N'-bis(3,4-metilendioxbencil)-cis-
1,3-bis-(aminometilciclohexano)



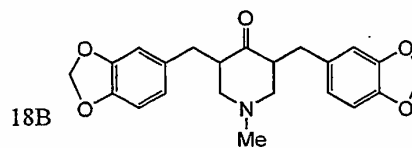
3,4-metilendioxbencilamida
de N-(3,4-metilendioxbencil)prolina



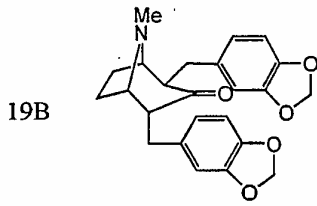
3,4-metilendioxfenetilamida
del ácido 2-(3,4-metilendioxbencil)isoquinolina-3-carboxílico



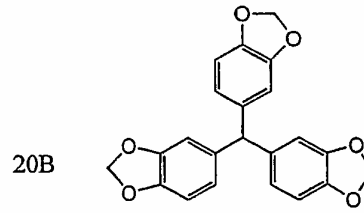
2,6-bis(3,4-metilendioxbencil)
ciclohexanona



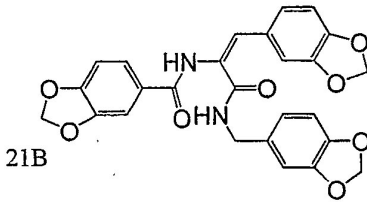
3,5-bis(3,4-metilendioxbencil)-1-metil-4-
piperidinona



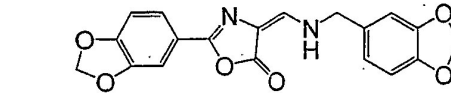
2,4-bis(3,4-metilendioxibencil)-3-tropinona



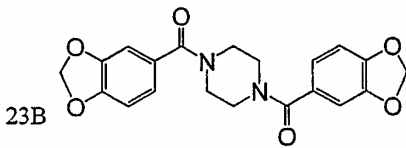
Tris-(3,4-metilendioxifenil)metano



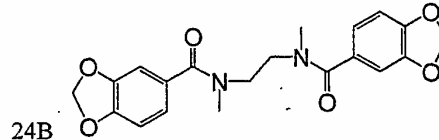
3,4-metilendioxibencilamida del ácido α-(3,4-metilendioxibenzamido)-3,4-metilendioxi(-)cinámico



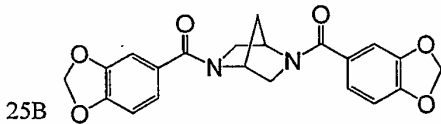
4-(3,4-metilendioxibencilaminometilen)-2-(3,4-metilendioxifenil)oxazolin-5-ona



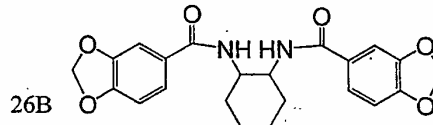
1,4-bis(3,4-metilendioxibenzoil)-piperazina



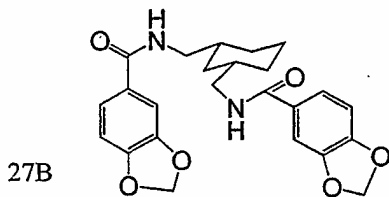
N,N'-bis(3,4-metilendioxibencil)-N,N'-dimetil(-)etilendiamina



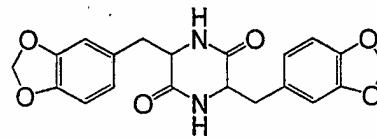
2,5-bis(3,4-metilendioxibenzoil)-2,5-diaza[2,2,1]-bicicloheptano



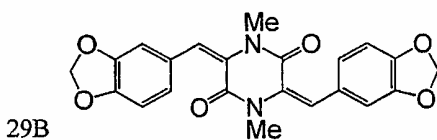
N,N'-bis(3,4-metilendioxibenzoil)-trans-diaminociclohexano



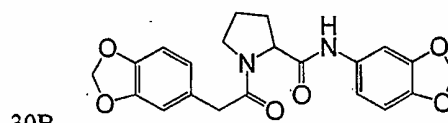
N,N'-bis(3,4-metilendioxibenzoil)-cis-1,3-bis(aminometil)ciclohexano



3,6-bis(3,4-metilendioxibencil)-2,5-dicetopiperazina



3,6-bis(3,4-metilendioxibencilideno)-1,4-dimetil-2,5-dicetopiperazina



3,4-metilendioxianilida de N-(3,4-metilendioxifenil)acetil)-prolina

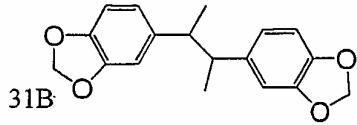
5

10

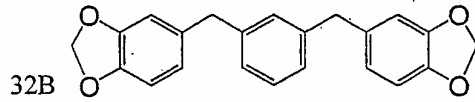
15

20

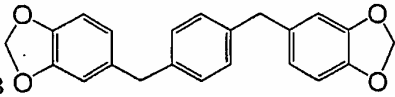
25



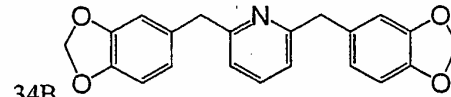
31B
2,3-bis(3,4-metilendioxfenil)-butano



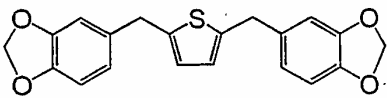
32B
1,3-bis(3,4-metilendioxbencil)-benceno



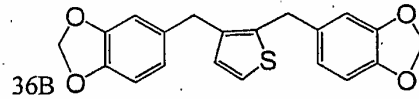
5 33B
1,4-bis(3,4-metilendioxbencil)-benceno



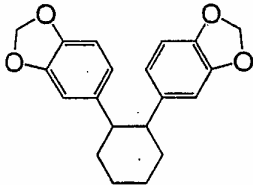
34B
2,6-bis(3,4-metilendioxbencil)piridina



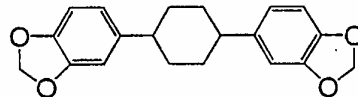
35B
2,5-bis(3,4-metilendioxbencil)-tiofeno



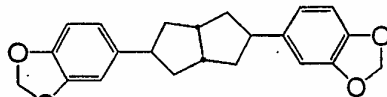
36B
2,3-bis(3,4-metilendioxbencil)-tiofeno



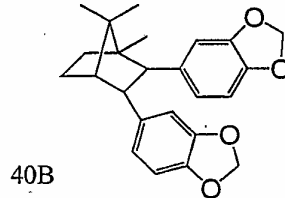
10 37B
1,2-bis(3,4-metilendioxfenil)-ciclohexano



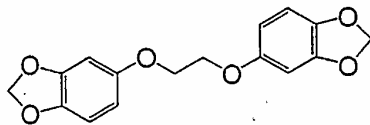
38B
1,4-bis(3,4-metilendioxfenil)-ciclohexano



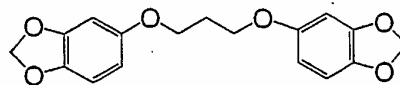
15 39B
3,7-bis(3,4-metilendioxfenil)-
bicyclo[3,3,0](-)octano



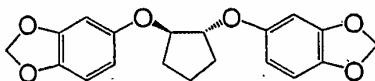
40B
2,3-bis(3,4-metilendioxfenil)-
1,7,7-trimetil-biciclo [2,2,1]heptano



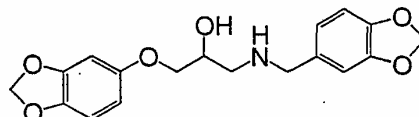
41B
1,2-bis(3,4-metilendioxfenoksi)-etano



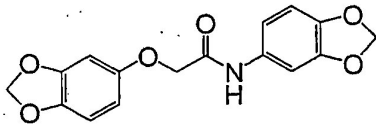
42B
1,3-bis(3,4-metilendioxfenoksi)propano



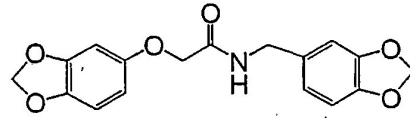
20 43B
trans-1,2-bis(3,4-metilendioxfenoksi)-
(-)ciclopentano



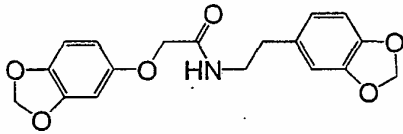
44B
N-(3,4-metilendioxbencil)-3-(3,4-
metilendioxi(-)fenoksi)-2-hidroxi-propilamina



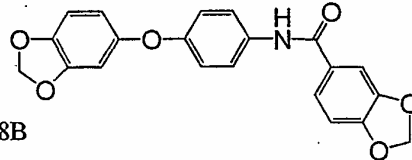
45B
3,4-metilendioxianilida del ácido
3,4-metilendioxifenoxi-acético



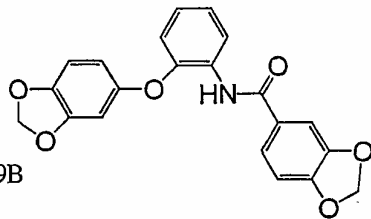
46B
3,4-metilendioxibencilamida del ácido
3,4-metilendioxifenoxi-acético



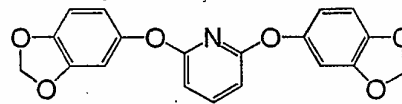
5
47B
3,4-metilendioxifenetilamida del ácido
3,4-metilendioxifenoxi-acético



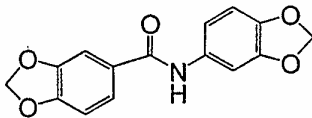
48B
p-((3,4-metilendioxifenoxi)anilida del ácido
3,4-metilendioxibenzoico



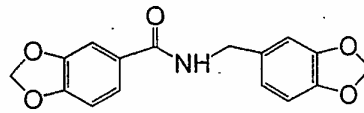
10
49B
o-((3,4-metilendioxifenoxi)anilida del ácido
3,4-metilendioxibenzoico



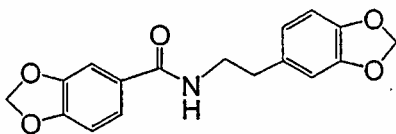
50B
2,6-bis(3,4-metilendioxifenoxi)-piridina



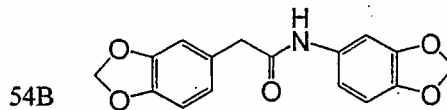
15
51B
3,4-metilendioxianilida del ácido
3,4-metilendioxibenzoico



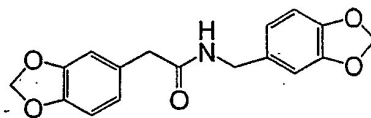
52B
3,4-metilendioxibencilamida del ácido
3,4-metilendioxibenzoico



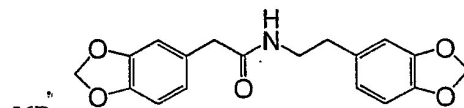
20
53B
3,4-metilendioxifenetilamida del ácido
3,4-metilendioxibenzoico



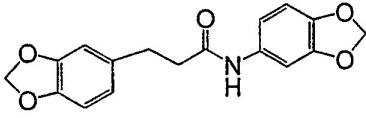
54B
3,4-metilendioxianilida del ácido
3,4-metilendioxifenilacético



55B
3,4-metilendioxibencilamida del ácido
3,4-metilendioxifenilacético

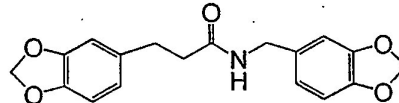


56B
3,4-metilendioxifenetilamida del ácido
3,4-metilendioxifenilacético



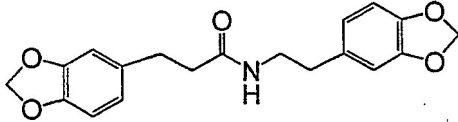
57B

3,4-metilendioxianilida del ácido
3-(3,4-metilendioxifenil)-propiónico



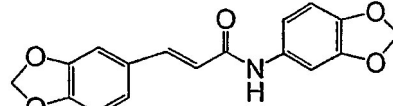
58B

3,4-metilendioxibencilamida del ácido
3-(3,4-metilendioxifenil)-propiónico



59B

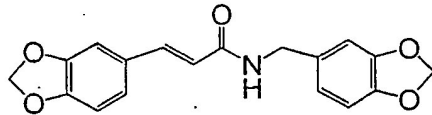
3,4-metilendioxifenetilamida del ácido
3-(3,4-metilendioxifenil)-propiónico



60B

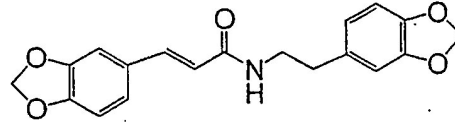
3,4-metilendioxianilida del ácido
3,4-metilendioxicinámico

5



61B

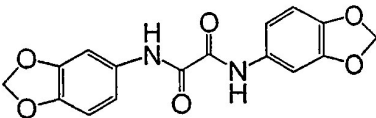
3,4-metilendioxibencilamida del ácido
3,4-metilendioxicinámico



62B

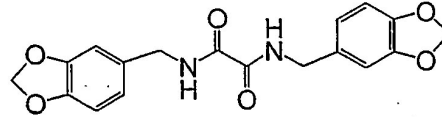
3,4-metilendioxifenetilamida del ácido
3,4-metilendioxicinámico

10



63B

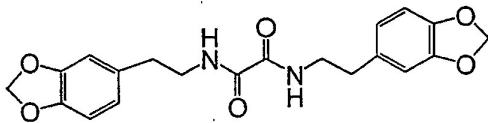
bis(3,4-metilendioxianilida) del ácido
oxálico



64B

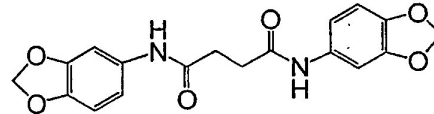
bis(3,4-metilendioxibencilamida) del ácido oxálico

15



65B

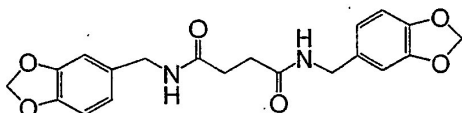
bis(3,4-metilendioxifenetilamida) del ácido
oxálico



66B

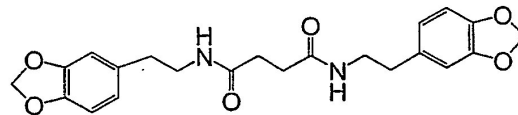
bis(3,4-metilendioxianilida) del ácido succínico

20



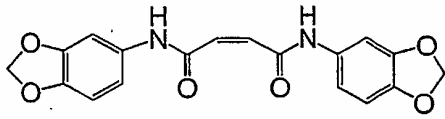
67B

bis(3,4-metilendioxibencilamida) del ácido
succínico

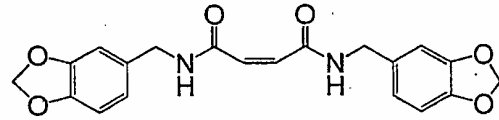


68B

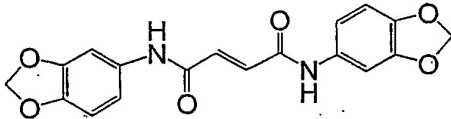
bis(3,4-metilendioxifenetilamida) del ácido succínico



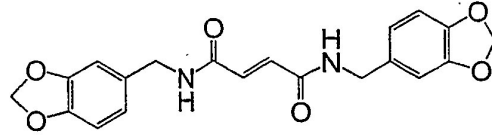
69B
bis(3,4-metilendioxianilida) del ácido maleico



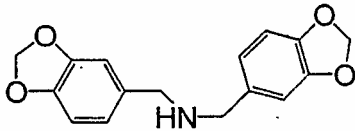
70B
bis(3,4-metilendioxibencilamida) del ácido maleico



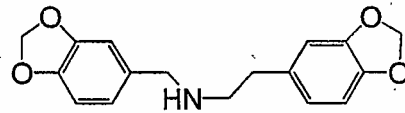
5 71B
bis(3,4-metilendioxianilida) del ácido fumárico



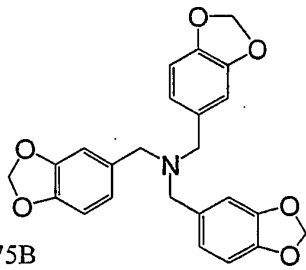
72B
bis(3,4-metilendioxibencilamida) del ácido fumárico



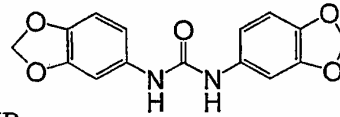
10 73B
bis-(3,4-metilendioxibencil)-amina



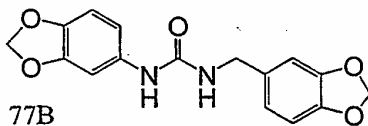
74B
N-(3,4-metilendioxibencil)-3,4-metilendioxfenilamina



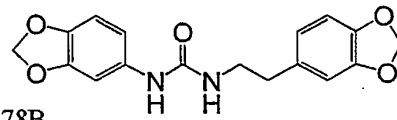
15 75B
tris-(3,4-metilendioxibencil)-amina



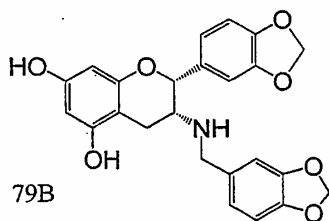
76B
1,3-bis-(3,4-metilendioxfenil)-urea



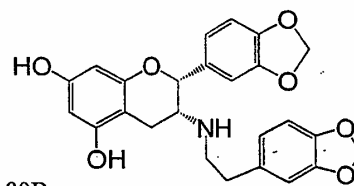
20 77B
1-(3,4-metilendioxfenil)-3-(3,4-metilendioxibencil)urea



78B
1-(3,4-metilendioxfenil)-3-(3,4-metilendioxfenil)urea



79B
3-deoxi-3-(3,4-metilendioxibencil)-aminoepicatequina



80B
3-deoxi-3-(3,4-metilendioxfenil)-aminoepicatequina

Ejemplo comparativo 30: Compuestos acilados

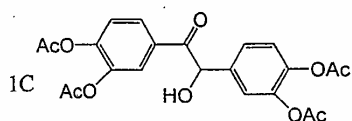
Otra estrategia potencial para la administración de los compuestos de bis-dihidroxifenilo de la presente invención para mejorar y/o producir un metabolismo y características de biodisponibilidad más favorables, implica métodos de protección de los grupos hidroxilo como sus ésteres farmacéuticamente aceptables. Los grupos éster que reemplazan los grupos hidroxilo también tienden a producir compuestos más estables, y que es menos probable que se alteren o se degraden por la oxidación de los grupos hidroxilo.

Se presenta más adelante la tabla de compuestos siguiente ilustra los ésteres de acetilo de los 80 compuestos de hidroxiarilo de los Ejemplos 1 - 23 y 28, en la que los grupos OH están reemplazados por grupos acetilo. La ilustración de ésteres de acetilo en el presente documento es meramente un ejemplo de la clase de ésteres farmacéuticamente aceptable que son parte de los compuestos de la presente invención y pueden prepararse mediante métodos análogos.

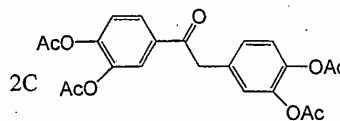
Se espera que estos compuestos sean eficaces en su capacidad para tratar amiloidosis y sinucleinopatías una vez se escindan los enlaces éster (mediante enzimas en el plasma o en el tejido cerebral) y los grupos hidroxilo se regeneren. El reemplazo de los grupos hidroxilo por grupos éster producirá profármacos que se cree que mejoran la toxicidad (es decir, son menos tóxicos), metabolismo (ya que será menos probable que los grupos OH se alteren por mutilación, glucuronidación y sulfatación) y biodisponibilidad. En este concepto de profármaco, se cree que la conversión del profármaco tiene lugar en el plasma (después de su protección a través del intestino) y cercano a su tejido diana apropiado (órganos sistémicos para el tratamiento de amiloidosis sistémicas y/o cerebro para el tratamiento de Alzheimer, Parkinson, diabetes de tipo 2 y otros amiloides A β y sinucleinopatías. Se cree que las enzimas de la sangre y los tejidos apropiados son capaces de escindir los enlaces éster de estos ésteres farmacéuticamente aceptables para proporcionar las estructuras de dihidroxilo importantes para la eficacia observada contra la enfermedad de Alzheimer, otras amiloidosis (tales como fibrillas IAPP en diabetes de tipo 2) y fibrillas de α -sinucleína/NAC, tal como en la enfermedad de Parkinson y otras sinucleinopatías.

Los ésteres farmacéuticamente aceptables de los compuestos N^o 1 a N^o 86 se preparan mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como mediante reacción de los compuestos de dihidroxiarilo con ácidos farmacéuticamente aceptables, especialmente en forma activada (tal como los haluros de acilo) y/o en presencia de reactivos que facilitan la esterificación (tal como un catalizador ácido) y/o en condiciones que favorecen la esterificación (tal como realizando la reacción en condiciones en las que el agua formada en la esterificación se elimina, por ejemplo por destilación). Los métodos de esterificación de grupos hidroxilo fenólicos son bien conocidos por un experto en la técnica.

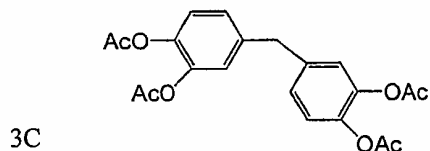
Los ácidos adecuados para la formación de ésteres farmacéuticamente aceptables son los ácidos alcanoicos C₂₋₆ (ácido acético, ácido propiónico y similares), ácido benzoico, ácidos arilalcanoicos (ácido fenilacético y similares); aunque muchos otros ácidos son adecuadas para la formulación de ésteres farmacéuticamente aceptables y un experto en la técnica no tendrá dificultad en la elección de un ácido adecuado.



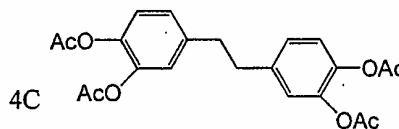
bis(3,4-diacetoxi)benzoína



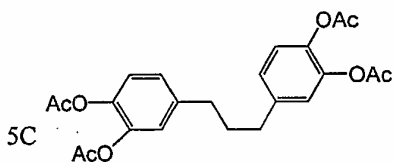
bis(3,4-diacetoxi)desoxibenzoína



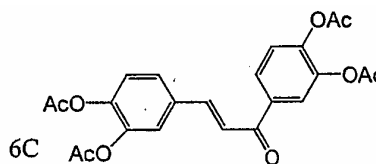
1,1-bis(3,4-diacetoxifenil)metano



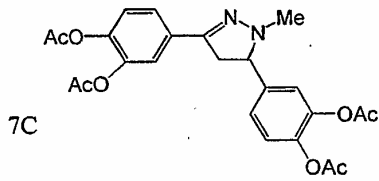
1,2-bis(3,4-diacetoxifenil)etano



1,3-bis(3,4-diacetoxifenil)propano

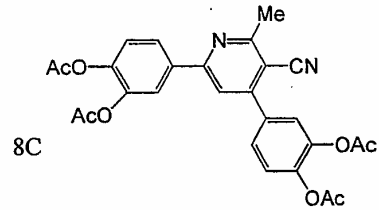


bis(3,4-diacetoxifenil)chalcona

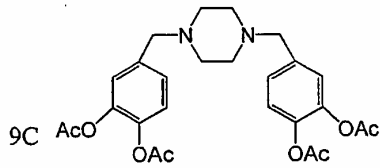


3,5-bis(3,4-diacetoxifenil)-
1-metil-2-pirazolina

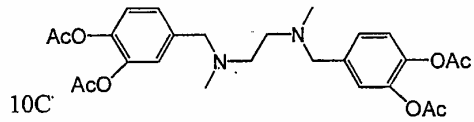
5



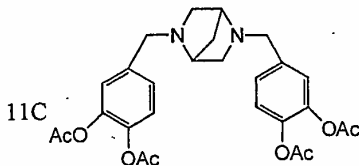
4,6-bis(3,4-diacetoxifenil)-
3-ciano-2-metilpiridina



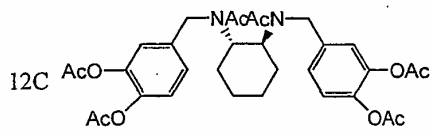
1,4-bis(3,4-diacetoxibencil)piperazina



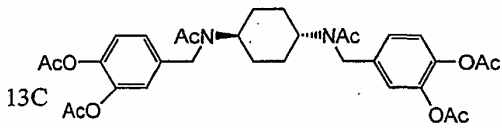
N,N'-bis(3,4-diacetoxibencil)-N,N'-dimetil-etilendiamina



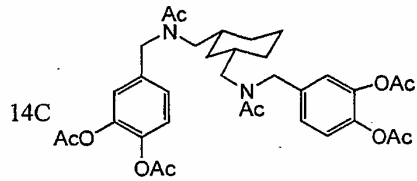
10 2,5-bis(3,4-diacetoxibencil)-2,5-
diaza[2,2,1]-bicioheptano



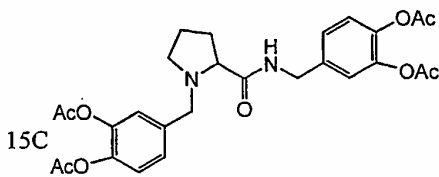
N,N'-bis(3,4-diacetoxibencil)-trans-
1,2-diaminociclohexano



15 N,N'-bis(3,4-diacetoxibencil)-trans-
1,4-diaminociclohexano

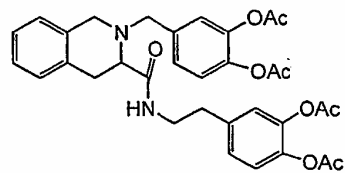


N,N'-bis(3,4-diacetoxibencil)-cis-
1,3-bis-(aminometil)ciclohexano

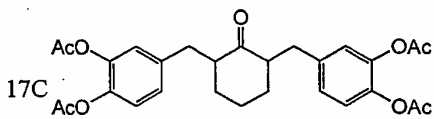


3,4-diacetoxibencilamida
de N-(3,4-metiendioxibencil)prolina

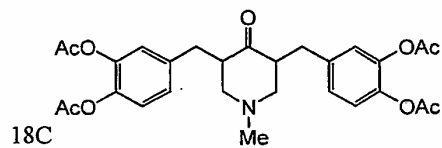
20



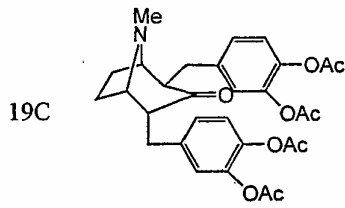
3,4-diacetoxifenetilamida
del ácido 2-(3,4-diacetoxibencil)isoquinolina-3-carboxílico



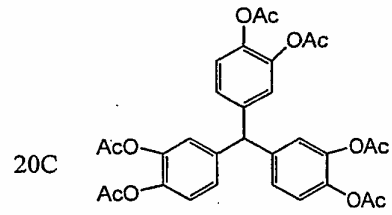
2,6-bis(3,4-diacetoxibencil)
ciclohexanona



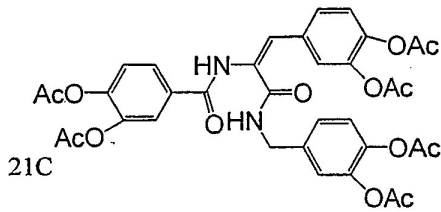
3,5-bis(3,4-diacetoxibencil)-1-metil-4-
piperidinona



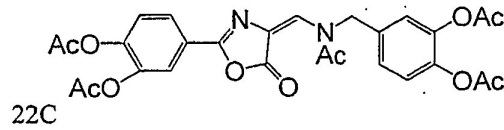
2,4-bis(3,4-diacetoxibencil)-3-tropinona



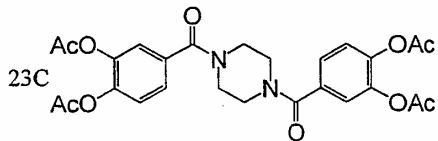
Tris-(3,4-diacetoxifenil)metano



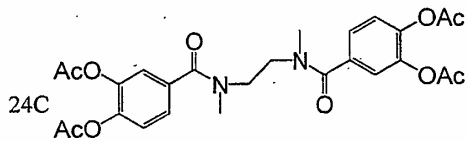
3,4-diacetoxibencilamida del ácido α-(3,4-diacetoxibenzamido)-3,4-diacetoxi(-)cinámico



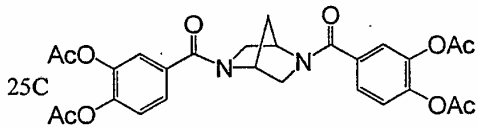
4-(3,4-diacetoxibencilaminometilen)-2-(3,4-diacetoxifenil)oxazolin-5-ona



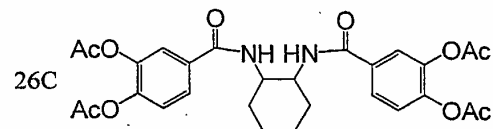
1,4-bis(3,4-diacetoxibenzoil)-piperazina



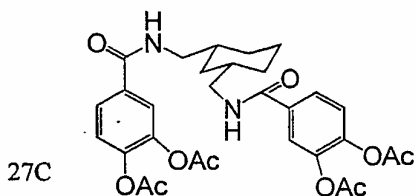
N,N'-bis(3,4-diacetoxibencil)-N,N'-dimetil(-)etilendiamina



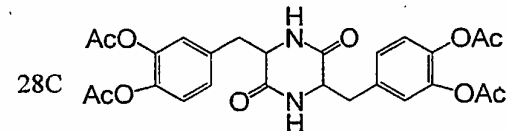
2,5-bis(3,4-diacetoxibenzoil)-2,5-diaza[2,2,1]-bicycloheptano



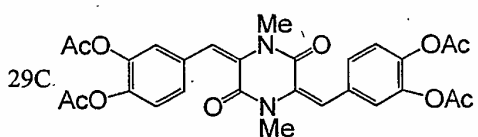
N,N'-bis(3,4-diacetoxibenzoil)-trans-diaminociclohexano



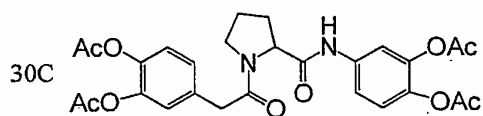
N,N'-bis(3,4-diacetoxibenzoil)-cis-1,3-bis(aminometil)ciclohexano



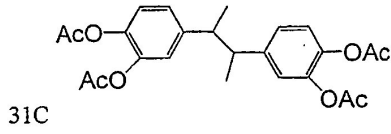
3,6-bis(3,4-diacetoxibencil)-2,5-dicetopiperazina



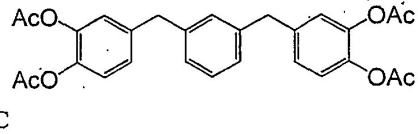
3,6-bis(3,4-diacetoxibencilideno)-1,4-dimetil-2,5-dicetopiperazina



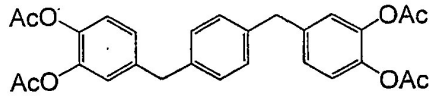
3,4-diacetoxianilida de N-(3,4-diacetoxifenilacetil)-prolina



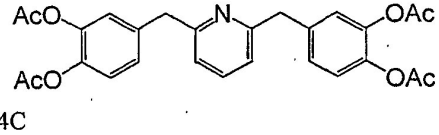
2,3-bis(3,4-diacetoxifenil)-butano



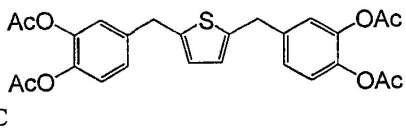
1,3-bis(3,4-diacetoxibencil)-benceno



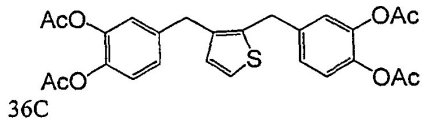
1,4-bis(3,4-diacetoxibencil)-benceno



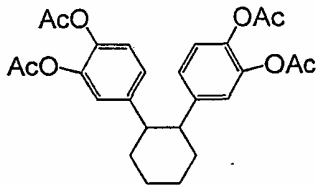
2,6-bis(3,4-diacetoxibencil)piridina



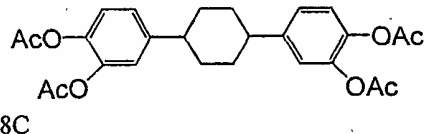
2,5-bis(3,4-diacetoxibencil)-tiofeno



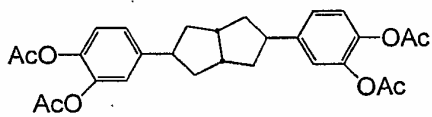
2,3-bis(3,4-diacetoxibencil)-tiofeno



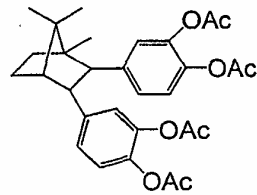
1,2-bis(3,4-diacetoxifenil)-ciclohexano



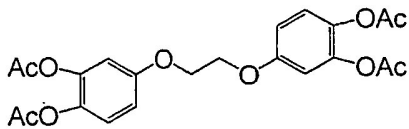
1,4-bis(3,4-diacetoxifenil)-ciclohexano



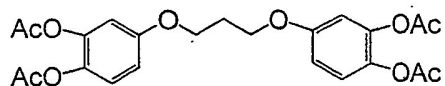
3,7-bis(3,4-diacetoxifenil)-
bicyclo[3,3,0](-)octane



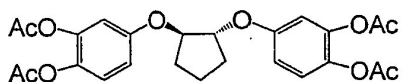
2,3-bis(3,4-diacetoxifenil)-
1,7,7-trimetil-biciclo [2,2,1]heptano



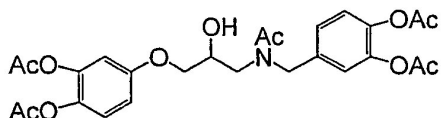
1,2-bis(3,4-diacetoxifenoxi)-etano



1,3-bis(3,4-diacetoxifenoxi)propano

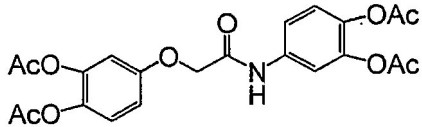


1,2-bis(3,4-diacetoxifenoxi)ciclopropano



1,2-bis(3,4-diacetoxifenoxi)propano-1-ol

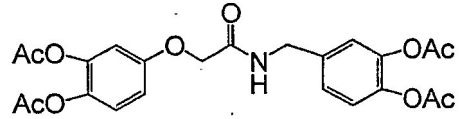
trans-1,2-bis(3,4-diacetoxifenoxi)-
(-)ciclopentano



45C

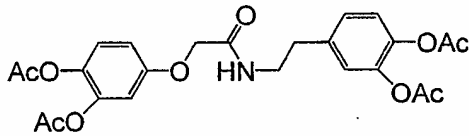
5 3,4-diacetoxianilida del ácido
3,4-diacetoxifenoxi-acético

N-(3,4-diacetoxibencil)-3-(3,4-
diacetoxi(-)fenoxi)-2-hidroxiopropilamina



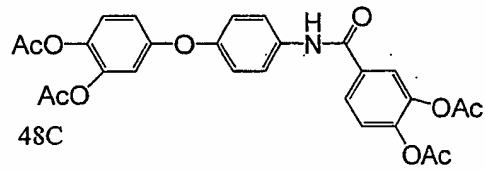
46C

3,4-diacetoxibencilamida del ácido
3,4-diacetoxifenoxi-acético



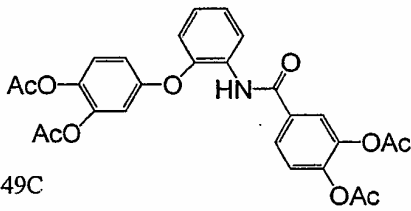
47C

10 3,4-diacetoxifenetilamida del ácido
3,4-diacetoxifenoxi-acético



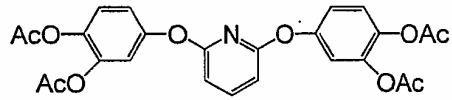
48C

p-((3,4-diacetoxifenoxi)anilida del ácido
3,4-diacetoxibenzoico



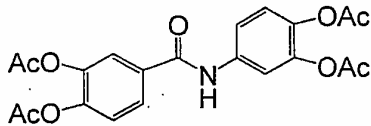
49C

15 o-((3,4-diacetoxifenoxi)anilida del ácido
3,4-diacetoxibenzoico



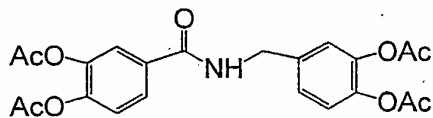
50C

2,6-bis(3,4-diacetoxifenoxi)-piridina



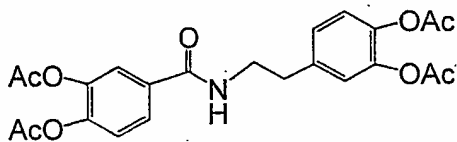
51C

3,4-diacetoxianilida del ácido
3,4-diacetoxibenzoico



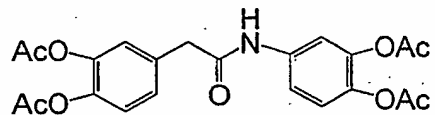
52C

3,4-diacetoxibencilamida del ácido
3,4-diacetoxibenzoico



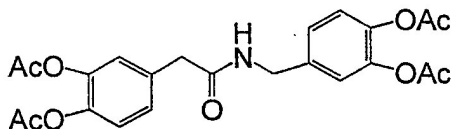
53C

20 3,4-diacetoxifenetilamida del ácido
3,4-diacetoxibenzoico

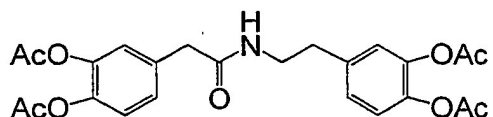


54C

3,4-diacetoxianilida del ácido
3,4-diacetoxifenilacético

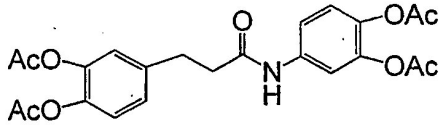


55C



56C

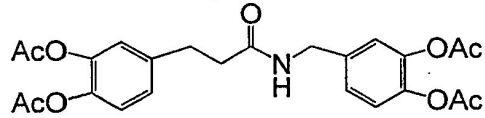
3,4-diacetoxibencilamida del ácido
3,4-diacetoxifenilacético



57C

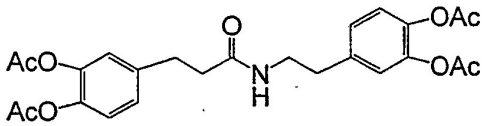
5 3,4-diacetoxianilida del ácido
3-(3,4-diacetoxifenil)-propiónico

3,4-diacetoxifenetilamida del ácido
3,4-diacetoxifenilacético



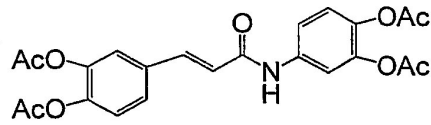
58C

3,4-diacetoxibencilamida del ácido
3-(3,4-diacetoxifenil)-propiónico



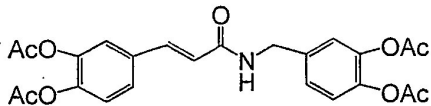
59C

10 3,4-diacetoxifenetilamida del ácido
3-(3,4-diacetoxifenil)-propiónico



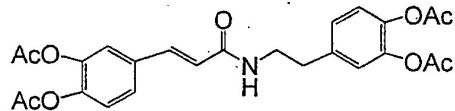
60C

3,4-diacetoxianilida del ácido
3,4-diacetoxicinámico



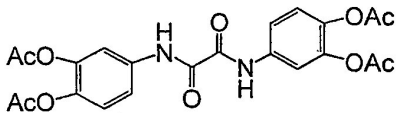
61C

15 3,4-diacetoxibencilamida del ácido
3,4-diacetoxicinámico



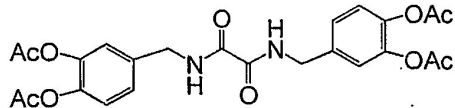
62C

3,4-diacetoxifenetilamida del ácido
3,4-diacetoxicinámico



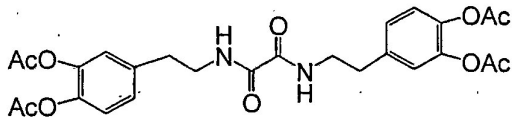
63C

bis(3,4-diacetoxianilida) del ácido
oxálico



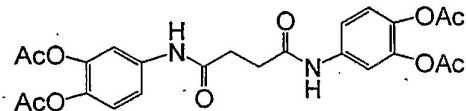
64C

bis(3,4-diacetoxibencilamida) del ácido oxálico



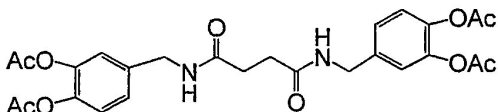
65C

20 bis(3,4-diacetoxifenetilamida) del ácido
oxálico



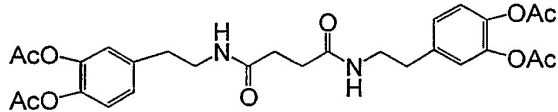
66C

bis(3,4-diacetoxianilida) del ácido succínico



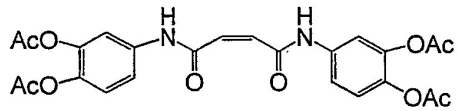
67C

25 bis(3,4-diacetoxibencilamida) del ácido
succínico

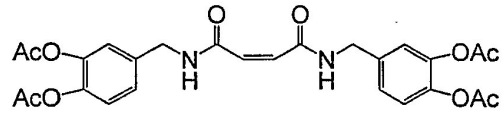


68C

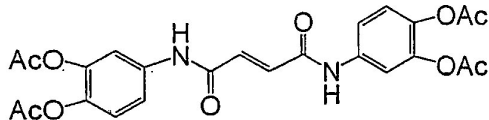
bis(3,4-diacetoxifenetilamida) del ácido succínico



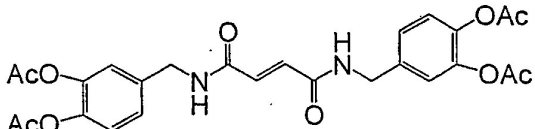
69C
bis(3,4-diacetoxianilida) del ácido maleico



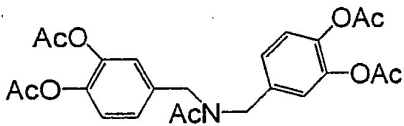
70C
bis(3,4-diacetoxibencilamida) del ácido maleico



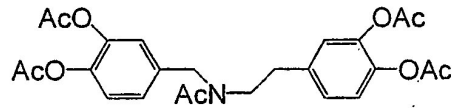
5 71C
bis(3,4-diacetoxianilida) del ácido fumárico



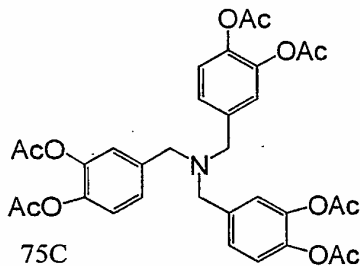
72C
bis(3,4-diacetoxibencilamida) del ácido fumárico



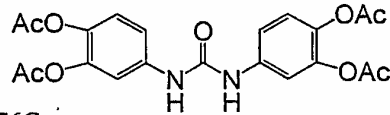
10 73C
bis-(3,4-diacetoxibencil)-amina



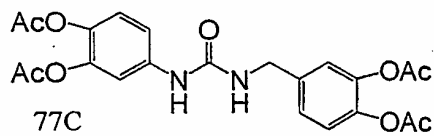
74C
N-(3,4-diacetoxibencil)-3,4-diacetoxifenetilamina



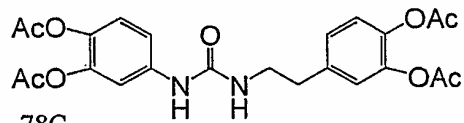
15 75C
tris-(3,4-diacetoxibencil)-amina



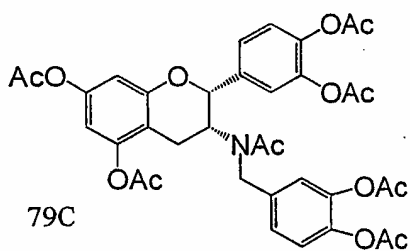
76C
1,3-bis-(3,4-diacetoxifenil)-urea



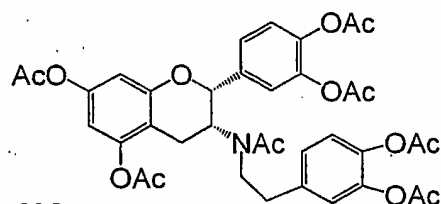
77C
1-(3,4-diacetoxifenil)-3-(3,4-diacetoxibencil)urea



78C
1-(3,4-diacetoxifenil)-3-(3,4-diacetoxifenetil)urea



79C
3-deoxi-3-(3,4-diacetoxibencil)-aminoepicatequina



80C
3-deoxi-3-(3,4-diacetoxifenetil)-aminoepicatequina

Ejemplo 32: Composiciones de compuestos de la presente invención

5 Los compuestos de la presente invención, tal como se ha mencionado previamente, se administran de forma deseable en forma de composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas y el método para prepararlas, son bien conocidos por el experto en la técnica y se describen en tratados tales como Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, ed., 20ª edición, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA.

Las composiciones representativas son las siguientes:

10 Formulación de comprimido de uso oral

Una formulación de comprimido de uso oral de un compuesto de la presente invención se prepara como sigue:

	<u>% p/p</u>
Compuesto de la presente invención	10,0
Estearato de magnesio	0,5
Almidón	2,0
Hidroxipropilmetilcelulosa	1,0
Celulosa microcristalina	86,5

15 Los ingredientes se mezclan hasta homogeneidad, después se granulan con la ayuda de agua y los granulados se secan. Después el granulado se prensa dando comprimidos que se dimensionan para dar una dosis adecuada del compuesto. El comprimido se recubre opcionalmente aplicando una suspensión de un agente formador de película (por ejemplo hidroxipropilmetilcelulosa), pigmento (por ejemplo dióxido de titanio) y plastificante (por ejemplo ftalato de dietilo), y se seca la película por evaporación del disolvente. La capa de película puede comprender, por ejemplo,
20 el 2-6 % del peso del comprimido.

Formulación de cápsula de uso oral

25 El granulado de la sección anterior de este Ejemplo se introduce en cápsulas de gelatina duras de un tamaño adecuado para la dosis deseada. Se forman bandas en la cápsula para el sellado, si se desea.

Formulación de gel blando

30 La formulación de un gel blando se prepara como sigue:

	<u>% p/p</u>
Compuesto de la presente invención	20,0
Polietilenglicol 400	80,0

35 El compuesto se disuelve o se dispersa en el polietilenglicol y se añade un agente espesante si se requiere. Después se introduce una cantidad de la formulación suficiente para proporcionar la dosis deseada del compuesto en geles blandos.

Formulación de uso parenteral

La formulación de uso parenteral se prepara como sigue:

	<u>% p/p</u>
Compuesto de la presente invención	1,0
Solución salina normal	99,0

40 El compuesto se disuelve en la solución salina y la solución resultante se esteriliza y se introduce en viales, ampollas y jeringas prellenadas, según sea apropiado.

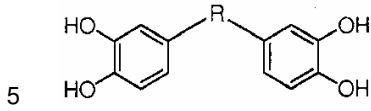
Formulación de uso oral de liberación controlada

45 Puede prepararse una formulación de liberación mantenida mediante el método de la patente de Estados Unidos Nº 4.710.384, como sigue:

Un kg de un compuesto de la presente invención se recubre en un recubridor de polvo de Uni-Glatt modificado con etilcelulosa Dow Type 10. La solución de pulverización es una solución al 8 % de la etilcelulosa en acetona al 90 % y etanol al 10 %. Se añade aceite de ricino como plastificante en una cantidad igual al 20 % de la etilcelulosa presente. Las condiciones de pulverización son las siguientes: 1) velocidad, 1 litro/hora; 2) aleta, 10-15 %; 3) temperatura de entrada, 50 °C, 4) temperatura de salida, 30 °C, 5) porcentaje de recubrimiento, 17 %. El compuesto recubierto se tamiza para dar tamaños de partícula de entre 74 y 210 micrómetros. Se tiene cuidado para asegurar una buena mezcla de partículas de diferentes tamaños dentro de ese intervalo. Se mezclan cuatrocientos mg de las partículas recubiertas con 100 mg de almidón y la mezcla se comprime en una prensa de mano a 1,5 toneladas para producir un comprimido de liberación controlada de 500 mg.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la que:

R es un grupo alquileo C₆-C₁₀, en el que hay:

10

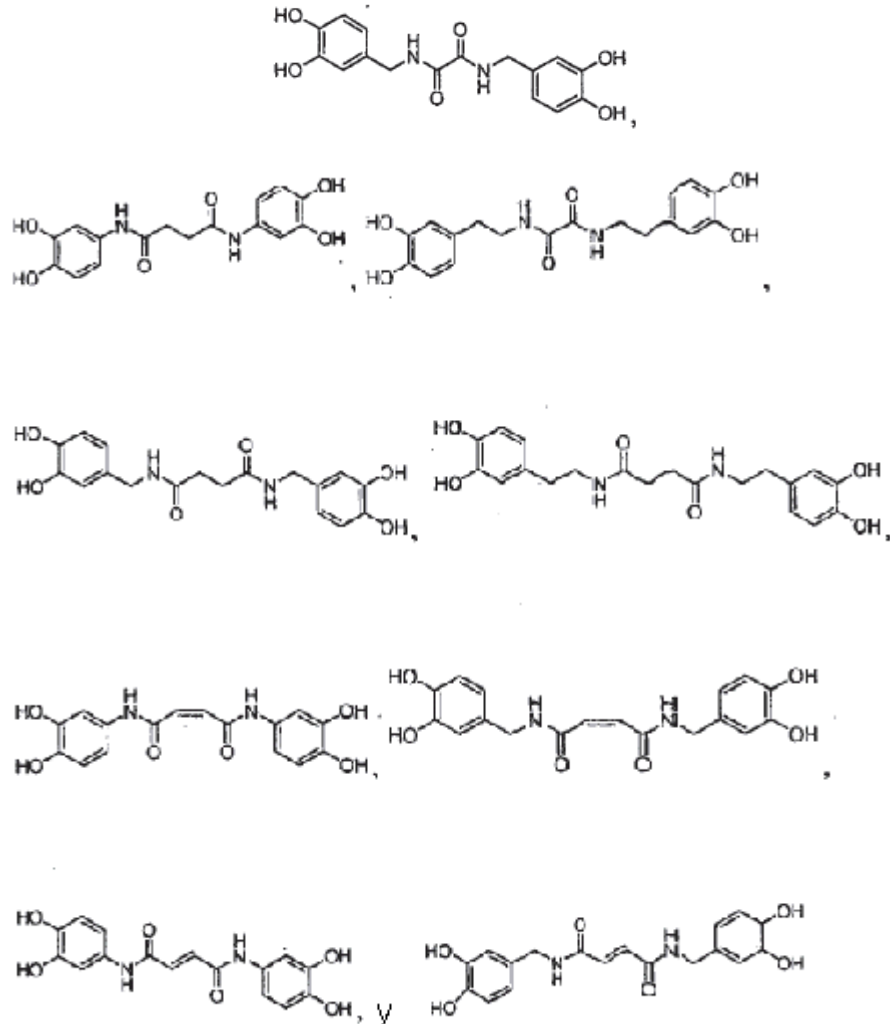
i) opcionalmente 1 o 2 dobles enlaces no adyacentes;

ii) 1 a 3 grupos metileno no adyacentes están reemplazados por NR', O o S, en la que R' es H, acilo C₂₋₄ o alquilo C₁₋₃, y

iii) 2 grupos metileno están reemplazados por un grupo carbolino o hidroximetileno.

15

2. El compuesto de la reivindicación 1, seleccionado entre:



20 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

3. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

25 4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento de la formación, la deposición, la acumulación o la persistencia de fibrillas de amiloide o las fibrillas de sinucleína.

5. Un método *in vitro* para tratar la formación, la deposición, la acumulación o la persistencia de las fibrillas de amiloide o las fibrillas de sinucleína, que comprende tratar las fibrillas con una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
- 5 6. El compuesto de la reivindicación 4 o el método de la reivindicación 5, en el que las fibrillas de amiloide son fibrillas de amiloide A β o fibrillas de amiloide IAPP.
- 10 7. El compuesto de la reivindicación 4 o el método de la reivindicación 5, en el que las fibrillas de sinucleína son fibrillas de α -sinucleína.
8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento de una amiloidosis o una sinucleinopatía en un mamífero que padece la misma.
- 15 9. El compuesto de la reivindicación 8, en el que la amiloidosis es una enfermedad asociada con la formación, la deposición, la acumulación o la persistencia de una proteína amiloidea seleccionada del grupo que consiste en amiloide A β , amiloide AA, amiloide AL, amiloide IAPP, amiloide PrP, amiloide de β_2 -microglobulina, transtiretina, prealbúmina y procalcitonina.
- 20 10. El compuesto de la reivindicación 8, en la que la amiloidosis se selecciona del grupo de enfermedades que consiste en enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, demencia pugilística, atrofia multisistémica, miositosis por cuerpos de inclusión, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés, enfermedad de Nieman-Pick de tipo C, angiopatía cerebral β -amiloidea, demencia asociada con degeneración basal cortical, la amiloidosis de la diabetes de tipo 2, la amiloidosis de inflamación crónica, la amiloidosis de tumor maligno y fiebre mediterránea familiar, la amiloidosis de mieloma múltiple y discrasias de linfocitos B, la amiloidosis de las enfermedades priónicas, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, síndrome de Gerstmann-Straussler, kuru, tembladera, la amiloidosis asociada con el síndrome del túnel carpiano, amiloidosis cardíaca senil, polineuropatía amiloidótica familiar y la amiloidosis asociada con tumores endocrinos.
- 25 11. El compuesto de la reivindicación 8, en el que la sinucleinopatía es una enfermedad asociada con la formación, la deposición, la acumulación o la persistencia de fibrillas de sinucleína, preferentemente fibrillas de α -sinucleína.
- 30 12. El compuesto de la reivindicación 8, en el que la sinucleinopatía se selecciona del grupo de enfermedades que consiste en la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Parkinson familiar, enfermedad de cuerpos de Lewy, la variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica y complejo parkinsonismo-demencia de Guam.
- 35 13. El compuesto de la reivindicación 8, en el que el mamífero es un ser humano.
- 40 14. El compuesto de la reivindicación 8, que es para la administración en una cantidad de entre 0,1 mg/kg/día y 1000 mg/kg/día, preferentemente entre 1 mg/kg/día y 100 mg/kg/día, más preferentemente entre 10 mg/kg/día y 100 mg/kg/día.
- 45 15. El uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en la fabricación de un medicamento para tratar:
- a) la formación, la deposición, la acumulación o la persistencia de fibrillas de amiloide o fibrillas de sinucleína, o
b) una amiloidosis o una sinucleinopatía en un mamífero que padece la misma,
- preferentemente en el que a) está modificado por las características de las reivindicaciones 6 o 7 o en el que b) está modificado por las características de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14.

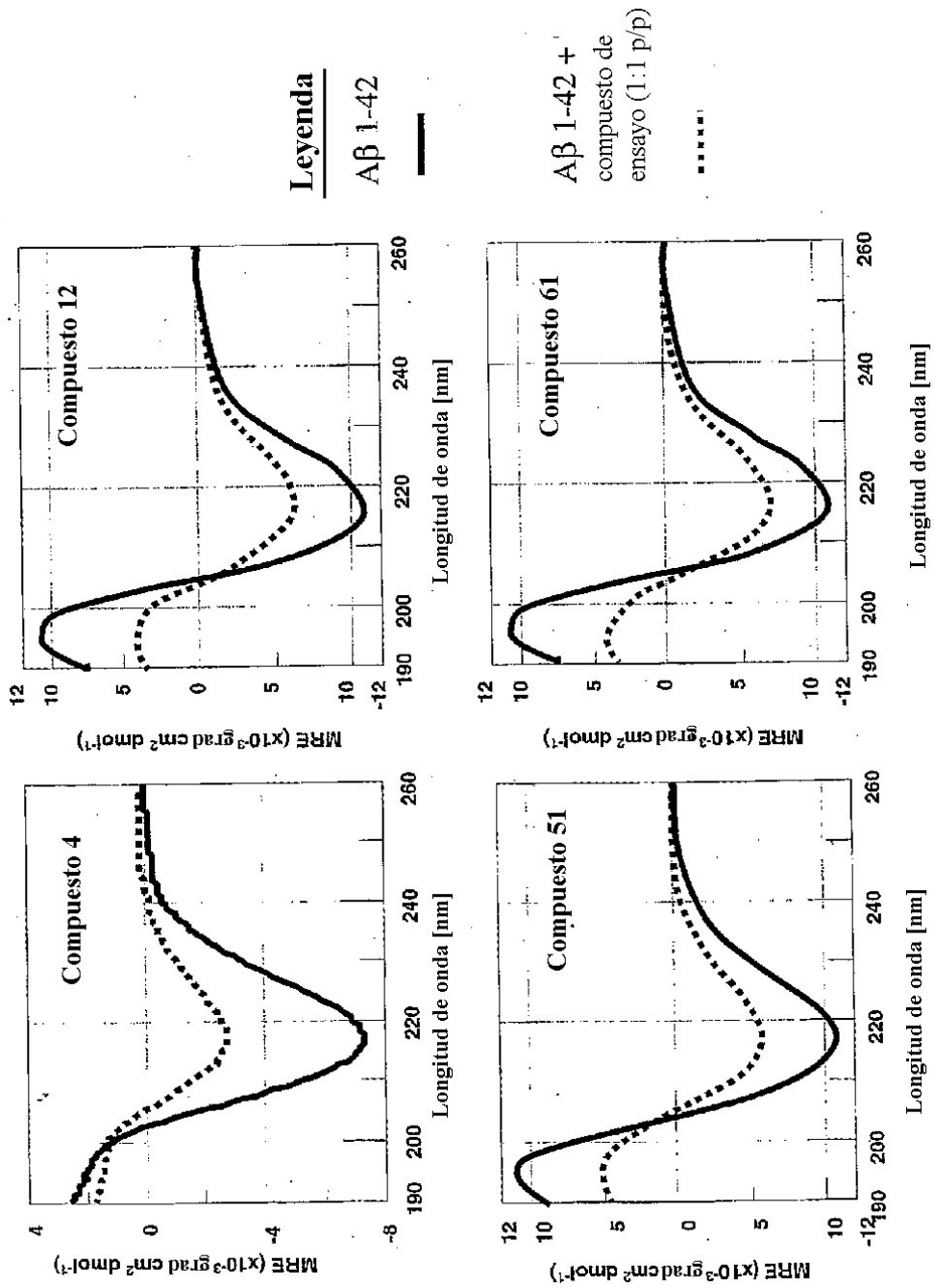


Figura 1

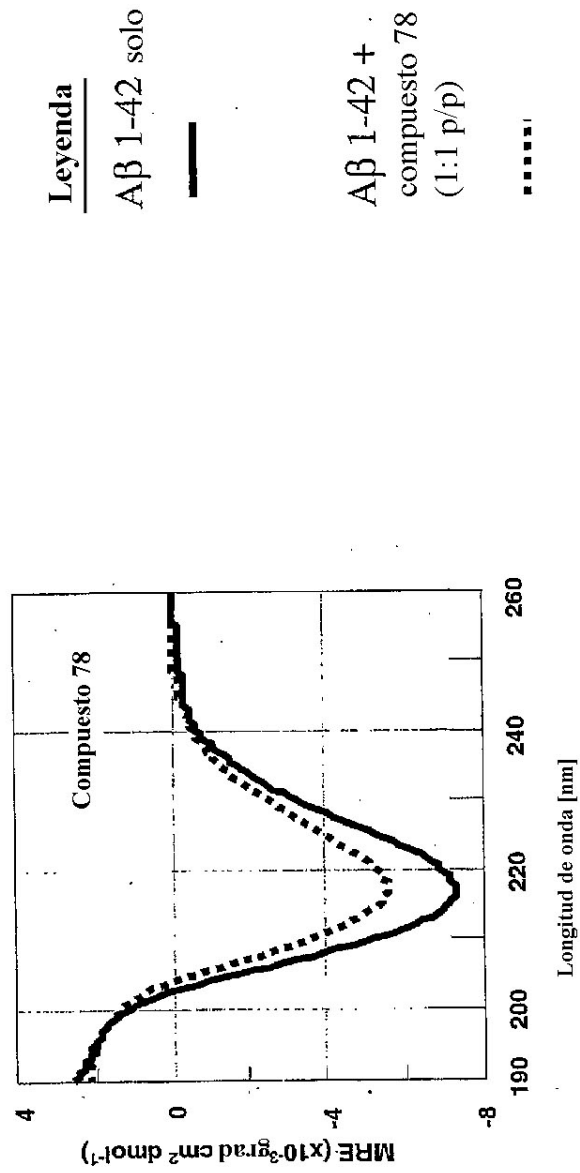


Figura 2

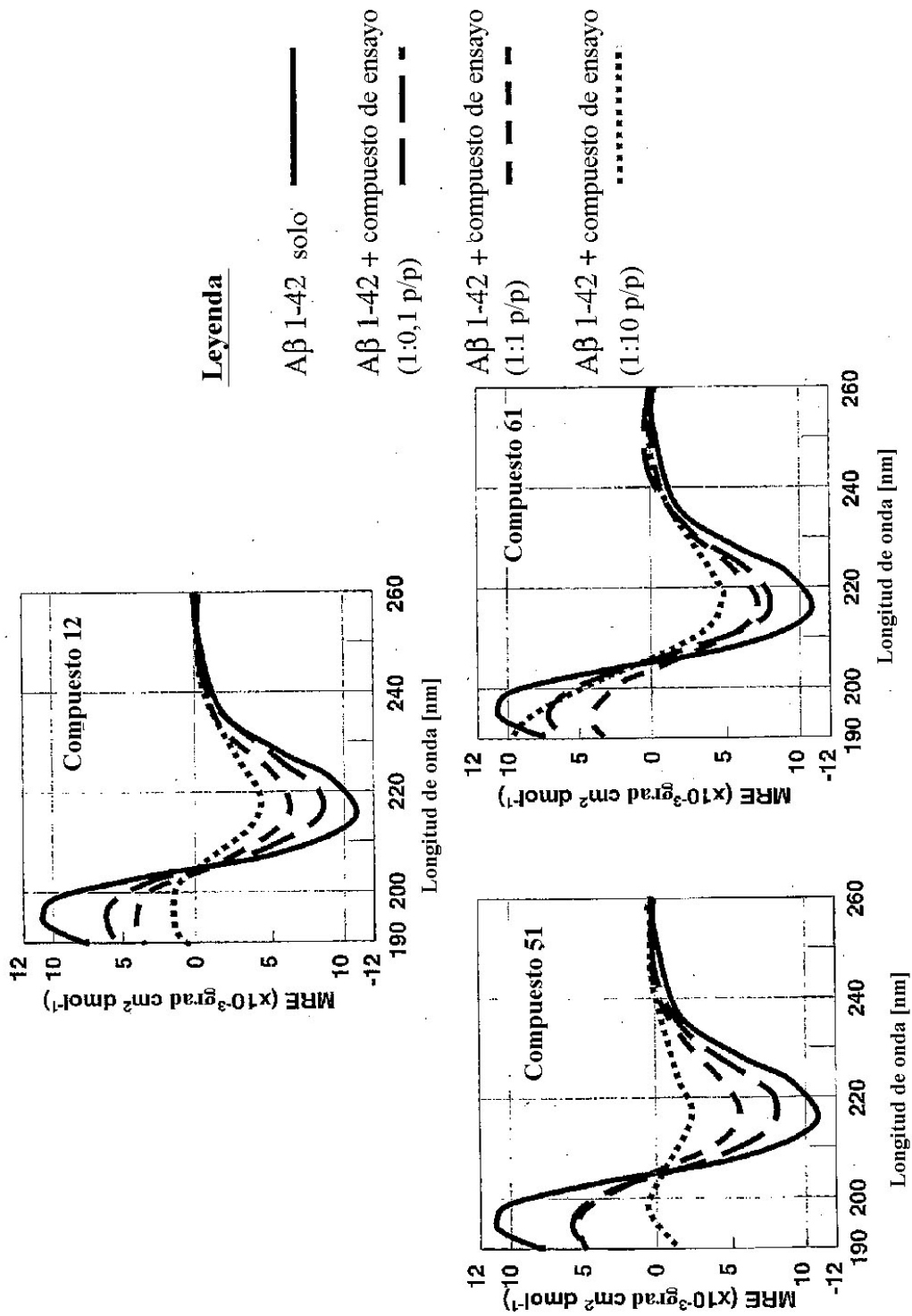


Figura 3