



DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social

AGOURON PHARMACEUTICALS, INC. /

No. de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA.

Departamento o Estado

LA JOLLA, ESTADO DE CALIFORNIA /

Dirección

Ciudad

Teléfono

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre

CARLOS R. OLARTE

Dirección

CALLE 35 No. 7-25 Piso 4 /

Ciudad

SANTAFE DE BOGOTÁ

Teléfono

285-14-00/570-0010

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es)

CHUANGXING GUO, XINJUN J.HOU, JESUS ERNESTO
VILLAFRANCA, LIMING DONG, DARIN LOUIS
VANDERPOOL. /

Identificación

Dirección

Ciudad

Teléfono

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(34) Título de la Invención COMPUESTOS, COMPOSICIONES Y METODOS PARA ESTIMULAR EL
CRECIMIENTO Y ELONGACION DE NEURONAS /

PRIORIDAD REIVINDICADA

SI ☒

NO ☐

TIPO DE PRIORIDAD

ANDINA ☐

UNIONISTA ☒

(33) País

US

(32) Fecha

Diciembre 1, 1999

(31) No. Solicitud

60/168,246

Para Publicar a los

☒ 6 meses

☐ 12 meses

☐ 18 meses a partir de la fecha de la presente solicitud

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL

A61K 31/63, 31/395

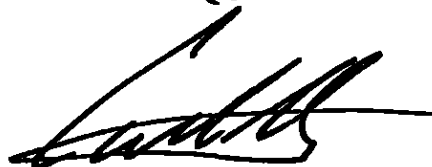
RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

ANEXOS DE LA SOLICITUD

- Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica ☒
- Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la **Adjunto** ☒
- Recibo de la tasa respectiva ☒
- Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras de la publicación ☐
- Si se reivindica prioridad Andina:
- Copia de la primera solicitud ☐
- Traducción oficial ☐
- Si se reivindica prioridad Unionista:
- Copia certificada de la primera solicitud ☒
- Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior
- Traducción simple ☒
- Capítulo descriptivo ☒
- Dibujos, planos necesarios ☐
- Capítulo reivindicatorio ☒
- Tarjeta archivo propietarios según formato ☒
- Tarjeta archivo temático según formato ☒
- Extracto para publicación según formato ☒
- Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cms ☒
- Otros Documentos ☐

**SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO
QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD**

FIRMA



NOMBRE CARLOS R. OLARTE

CC. 79.782.747 de Bogotá

T.P.No. 74.295

3

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00091748 00000000 Folios: 374
Fecha (ACB): 2000-11-30 16:49:52
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTE
Dependencia: 2020 DIVISION DE NEGOS CREATIVOS

NIT : 000176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 71,700
FECHA : NOVIEMBRE 21 DE 2000

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	No. PAGO	Vr. PAGO
E LUIS GOMEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050-00110-6	3118627	12,160,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	608,000.00
	TOTAL :	\$ 608,000.00

SOM: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

TRADUCCION OFICIAL No. 265/00 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 17 de agosto de 2000 por la Sra. María Teresa Lara R., c.c. 41.568.055 de Bogotá, Traductora Oficial según Resolución No. 01016 del 2 de octubre de 1998, expedida por el Ministerio de Justicia.

=====

Poder otorgado por AGOURON PHARMACEUTICALS, INC. para su representación en relación con asuntos de propiedad Industrial en Colombia. Certificación notarial suscrita por Bonnie Acosta, Notario Público del Estado de California, y legalizaciones subsiguientes.

PODER

La abajo firmada, Agouron Pharmaceuticals, Inc., domiciliada en 10350 North Torrey Pines Road, La Jolla, California, 92037-1020, E.U.A., declara por el presente otorgar a ALVARO CORREA ORDOÑEZ y/o LUZ HELENA VILLAMIL y/o CARLOS REINALDO OLARTE, poder especial amplio y bastante para recabar de las oficinas y autoridades nacionales que correspondan, la obtención de: Patentes de invención, fusiones, cambios de nombre, traspasos, presentación y trámite de oposiciones, cambios de dirección, a cuyo efecto los faculta para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado, elevar solicitudes, formular descripciones, protestas, declaraciones, apelaciones y reclamos, oblar impuestos, solicitar y pagar los derechos de registro, y en general, todo lo que sea necesario para la obtención de los derechos de propiedad industrial, para lo cual se le faculta para otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, para responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de las marcas se presentaren y hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades administrativas o

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE MINJUSTICIA

COPIA DE ESTE
DOCUMENTO
COINCIDE CON EL
ORIGINAL
2-1-2000

judiciales de cualquier orden, dándoles así mismo facultad para sustituir el presente y en caso necesario revocar dichas sustituciones.

Dado y firmado en La Jolla, California, E.U.A., a los 19 días del mes de julio de 2000.

(Fdo.) Gary E. Friedman

Gary E. Friedman, Vicepresidente,
Secretario y Asesor General Corporativo

RECONOCIMIENTO GENERAL - CALIFORNIA

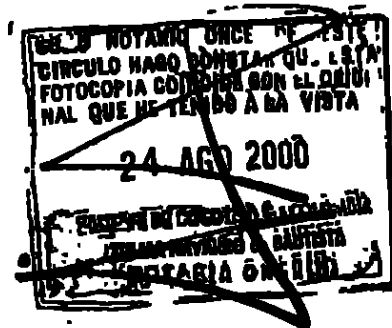
Estado de California)
) ss.
Condado de San Diego)

El día 19 de julio de 2000 ante mí, Bonnie Acosta, Notario Público, personalmente compareció Gary E. Friedman, a quien conozco personalmente como la persona cuyo nombre suscribe el instrumento adjunto y reconoció ante mí haber otorgado el mismo en su carácter autorizado, y que mediante su firma en el instrumento la persona o entidad a nombre de la cual él actuó, otorgó el instrumento.

EN CONSTANCIA firmo y coloco mi sello oficial.

(Fdo.) Bonnie Acosta
Firma del Notario Público

[Sello] BONNIE ACOSTA
 Comisión # 1115423
 Notario Público - California
 Condado de San Diego
 Mi comisión expira el 6 de diciembre de 2000



_____ OPCIONAL _____

MAQUINISTA PARA R.
TRADUCCION OFICIAL
RESOLUCION No. 01018
DE MINISTRIA

Descripción del Documento Adjunto

Número de Páginas: una

Calidad(es) Reclamada(s) por el(los) Signatario(s)

Agouron Pharmaceuticals, Inc.

BUENOS NOTARIO ONCE DE ESTE
 CIRCULO HAGO CONSTAR QUE ESTA
 FOTOCOPIA CONFORMA CON EL ORIGI-
 NAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
 L. CONADO
 24 AGO 2000-
 V. GARCIA DE DECEA D.C. - COLOMBIA
 V. MARIA FERNANDA BAUTISTA
 r/Secretaria del Conado

El suscrito, GREGORY J. SMITH, Tasador/Registrador/~~Secretario del Condado~~
de San Diego, Estado de California, legalmente provisto de Sello, CERTIFICO POR
EL PRESENTE que:

7 *

BONNIE ACOSTA, cuyo nombre suscribe el juramento o Certificado de Prueba o Reconocimiento del Instrumento adjunto y aparece allí escrito, era en el momento de recibir dicho juramento, o Prueba o Reconocimiento, una Notario Público, en y para dicho Condado, debidamente comisionada y juramentada y debidamente autorizada por las leyes de dicho Estado para recibir el mismo y para recibir juramentos y tomar los Reconocimientos y Pruebas de Escrituras y otros Instrumentos escritos que deban registrarse en este Estado. Conozco la letra manuscrita de dicha Notario Público y considero que la firma en dicho juramento o Certificado de Prueba o Reconocimiento es auténtica. Y CERTIFICO ADEMÁS que bajo las leyes del Estado de California el citado juramento o Certificado de Prueba o Reconocimiento requiere darse bajo sello, pero la Impresión de dicho sello no requiere según las leyes del Estado de California estar registrada en mi oficina o en cualquier otro lugar.

ALICIA TERESA LUNA
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01018
DE MINISTRIA

FECHADO: 07-26-00 Firmado en constancia

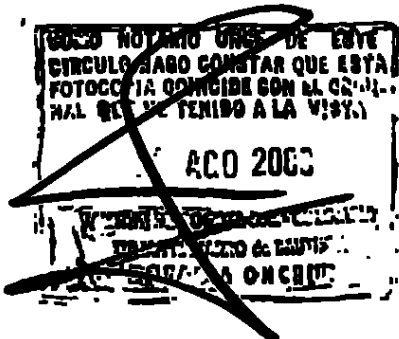
GREGORY J. SMITH, Tasador/Registrador/Secretario del Condado

Por:

(Fdo.) Karen J. Miller, Secretaria Principal

Estado de California

SECRETARÍA DE ESTADO



Yo, BILL JONES, Secretario de Estado del Estado de California, certifico por el presente:

8 /

Que GREGORY J. SMITH, cuyo nombre aparece en el certificado adjunto, era, el 26 DE JULIO DE 2000, el TASADOR/REGISTRADOR/SECRETARIO debidamente elegido, calificado y en funciones del Condado de SAN DIEGO, en el antedicho Estado.

Que el sello allí estampado es el sello de dicho Condado; que la firma allí colocada aparenta ser la firma de GREGORY J. SMITH y que el certificado adjunto ha sido expedido en la debida forma y por el funcionario apropiado.

EN FE DE LO CUAL, firmo este certificado y estampo el Gran Sello del Estado de California a los 26 días del mes de julio de 2000.

(Fdo.) Bill Jones

BILL JONES
Secretario de Estado

por: (Fdo.) Connie R. Christensen
Delegada

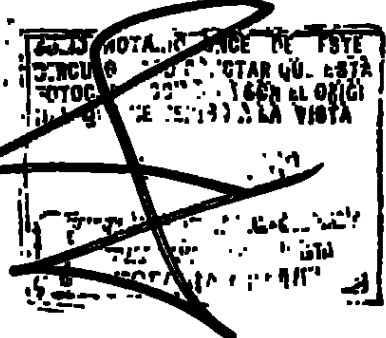
ALMA TERESA LUNA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 0013
DE MINISTRIA

No. 00043249-1

Estados Unidos de América

DEPARTAMENTO DE ESTADO

A todo aquel que viere el presente, un Saludo:



Certifico Que el documento adjunto lleva el Sello del Estado de California y que a dicho sello se debe dar plena fe y crédito.*

9 

En testimonio de lo cual, yo, Madeleine K. Albright, Secretaria de Estado, he hecho estampar aquí el sello del Departamento de Estado y he hecho suscribir mi nombre por la Oficial de Autenticaciones Asistente del citado Departamento, en la ciudad de Washington, en el Distrito de Columbia, a los siete días del mes de agosto de 2000.

(Firmado) Madeleine K. Albright
Secretaria de Estado

(Firmado) Jacqueline Pridgen
Oficial de Autenticaciones Asistente,
Departamento de Estado

* Por el contenido del documento adjunto, el Departamento no asume responsabilidad

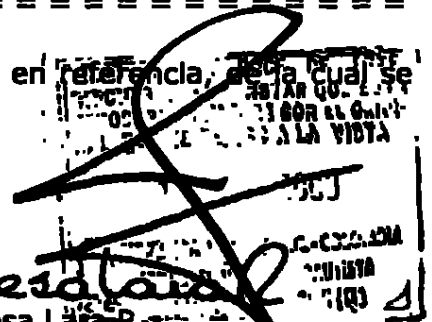
Este Certificado carece de validez si aparece borrado o alterado en cualquier forma.

EN ESPAÑOL: Autenticación de la firma de la Oficial de Autenticaciones del Departamento de Estado de los Estados Unidos por el Consulado de Colombia en Washington, D.C., bajo el No. 2034 de fecha 9 de agosto de 2000. Legalización de la firma de la Vicecónsul por el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia, bajo el No. 515559 de fecha 17 de agosto de 2000.

=====

La anterior es traducción fiel y completa del documento en referencia, de la cual se deja copia en este archivo para su confrontación.


Maria Teresa Lara-R.
c.c. 41.568.055 de Bogotá
Traductora Oficial según
Resolución No. 01016 del
2 de octubre de 1998, del
Ministerio de Justicia



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

QUIA FIRMAR APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES ASIGNADAS

516507

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL PORTO

2009 AUG 18 A P 35

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

COLOMBIA

**Gary E. Friedman, Corporate Vice President,
Secretary and General Counsel**

11 /



CONSULADO DE COLOMBIA
WASHINGTON, D.C.



No. 2034

EL CONSULADO DE COLOMBIA
CERTIFICA:

Que es auténtica la firma de JACQUELINE PRIDGEN.
quien el día 7 DE AGOSTO DEL 2000
desempeñaba las funciones de OFICIAL DE AUTENTICACIONES DEPARTAMENTO DE ESTADO.
la cual aparece al pie de los documentos anexas relacionados con PODER.

Dado en Washington, D.C. a los NUEVE (9)
AGOSTO. del año dos mil (2000)

Pagado Impuesto de Timbre 7=
Pagado Derecho Consular 15=
Total 22=

(El Consulado no asume ninguna
responsabilidad por el contenido de los
documentos anexas)

JACQUELINE PRIDGEN
Vicecónsul

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERNALES

518559
CUALIFICACION DE EN EL
DEPARTAMENTO DE RELACIONES
EXTERNALES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2001 JUN 17

JEFE DE LEGALIZACIONES
S.M. DE RELACIONES EXTERNALES

Alvarez
MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01018
DE MINISTERIO DE JUSTICIA
265/00

RECEIVED
2 JUN 2000
OFICINA DE LEGALIZACIONES
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERNALES
CALLE 17, BOGOTA

United States of America



DEPARTMENT OF STATE

To all to whom these presents shall come, Greetings:

I Certify That the document hereunto annexed is under the Seal of the State(s) of California, and that such Seal(s) is/are entitled to full faith and credit.*

In testimony whereof, I, Madeleine K. Albright, Secretary of State, have hereunto caused the seal of the Department of State to be affixed and my name subscribed by the Assistant Authentication Officer, of the said Department, at the city of Washington, in the District of Columbia, this seventh day of August, 2000.

Madeleine K. Albright
Secretary of State
By *Jay Byrd*
Assistant Authentication Officer,
Department of State

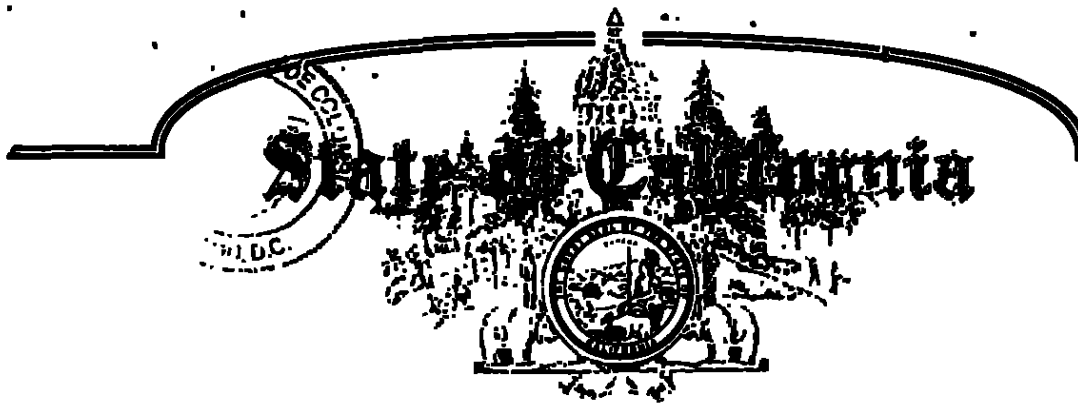
Issued pursuant to XIX, State of
Sept. 15, 1789, 1 Stat. 68-69; 22
USC 2637; 22 USC 2651a; 5 USC
301; 28 USC 1733 et. seq.; 8 USC
1443(f), RULE 44 Federal Rules of
Civil Procedure

*For the contents of the annexed document, the Department assumes no responsibility.
This certificate is not valid if it is removed or altered in any way whatsoever



(
(

(
(



13
S/A

SECRETARY OF STATE

I, **BILL JONES**, Secretary of State of the State of California, hereby certify:

That **GREGORY J. SMITH** , whose name appears on the annexed certificate, was on **JULY 26, 2000**, the duly elected, qualified and acting **ASSESSOR/RECORDER/CLERK** of the County of **SAN DIEGO** , in said State.

That the seal affixed thereto is the seal of said County; that the signature thereon appears to be the signature of **GREGORY J. SMITH** and that the annexed certificate is in due form and by proper officer.

IN WITNESS WHEREOF, I execute this certificate and affix the Great Seal of the State of California this 26TH day of JULY, 2000.



Bill Jones

BILL JONES
Secretary of State

Connie K. Charters
Deputy

COPIES OF THIS CERTIFICATE ARE TO BE FILED IN THE OFFICE OF THE CLERK OF THE COUNTY OF SAN DIEGO.

CLERK OF COUNTY OF SAN DIEGO

CLERK OF COUNTY OF SAN DIEGO

OFFICE



Assn
1600





Gregory J. Smith

COUNTY OF SAN DIEGO

ASSESSOR / RECORDER / COUNTY CLERK

14



ASSESSOR'S OFFICE

1600 Pacific Highway, Room 103
San Diego, CA 92101-2480
Tel. (619) 236-3771 • Fax (619) 557-4056

www.sdarcc.com

RECORDER/COUNTY CLERK'S OFFICE

1600 Pacific Highway, Room 260
P.O. Box 121750 • San Diego, CA 92112-1750
Tel. (619) 237-0502 • Fax (619) 557-4155

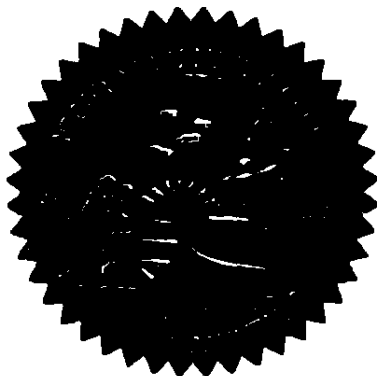
I, GREGORY J. SMITH, Assessor/Recorder/County Clerk of the County of San Diego, State of California, having by law a Seal, DO HEREBY CERTIFY that:

RONNIE ACCSTA whose name is subscribed to the oath or Certificate of Proof or Acknowledgment of the annexed instrument and thereon written, was at the time of taking such oath, or Proof or Acknowledgment, a Notary Public, in and for said County, duly commissioned and sworn and duly authorized by the laws of said State to take the same and administer oaths and to take the Acknowledgments and Proofs of Deeds and other instruments in writing to be recorded in this State. I am acquainted with the handwriting of such Notary Public and believe that the signature to said oath or Certificate of Proof Acknowledgment is genuine. I further certify that under the laws of the State of California the said oath or Certificate of Proof or Acknowledgment is required to be under seal, but the impression of said seal is not required by the laws of the State of California to be filed in my office or in any other place.

DATED: 07-26-00 Witness by hand

GREGORY J. SMITH, County Assessor/Recorder/Clerk

By:



Karen J. Miller
Karen J. Miller, Principal Clerk
24 AUG 2000
NOTARY PUBLIC - COUNTY OF SAN DIEGO
COMMISSION EXPIRES: 08/01/01
NOTARY PUBLIC - COUNTY OF SAN DIEGO
COMMISSION EXPIRES: 08/01/01

Branch Offices Available To Serve You

CHULA VISTA

344 "F" Street, Suite 200
Chula Vista, CA 91910-2646
(619) 498-2200

EL CAJON

198 West Main Street, Suite 101
El Cajon, CA 92020-3316
(619) 401-5700

KEARNY MESA

5473 Kearny Villa Road, 3rd Floor
San Diego, CA 92123-1142
(858) 505-6262

SAN MARCOS

334 Via Vera Cruz, Suite 15-
San Marcos, CA 92069-2631
(760) 940-6868



ALIFORNIA

State of

Count

Or

ALIF RNIA ALL-PURP SE ACKN WLEDGMENT

State of California

County of San Diego

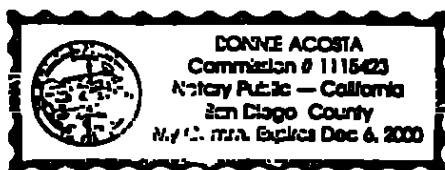
ss.

On 19 July 2000, before me, Bonnie Acosta, Notary Public
Date Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")

personally appeared Gary E. Friedman
Name(s) of Signer(s)

☒ personally known to me
☐ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.



Place Notary Seal Above

WITNESS my hand and official seal.

Bonnie Acosta
Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: Power of Attorney 0072-01-CO (Columbia)

Document Date: 7/19/00 Number of Pages: one

Signer(s) Other Than Named Above: none

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: Friedman

- ☐ Individual
☒ Corporate Officer — Title(s): Corporate Vice President, Secretary
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General and General Counsel
☐ Attorney in Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer is Representing: Agouron Pharmaceuticals, Inc.

NOTARY PUBLIC
OF CALIFORNIA
Top of thumb here

COMO NOTARIO PUBLICA DE CALIFORNIA
CIRCULO HAGO CONSTAR QUE
ESTOY DE ACORDO CON LO QUE
SE TENIO A LA VISTA

Solicitud Provisional de EE.UU.

para

**COMPUESTOS, COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA
ESTIMULAR EL DESARROLLO Y ALONGAMIENTO DE NEURONAS**

Inventores: Chuangxing Guo

Xinjun Hou

Jesus Ernest Villafranca

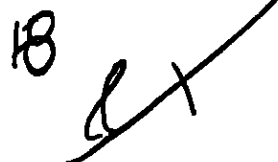
ALCANCE TÉCNICO Y APLICACIÓN INDUSTRIAL DE ESTA INVENCIÓN

Este invento se refiere a los métodos y compuestos y composiciones farmacéuticas para estimular el crecimiento de neuritas en células nerviosas para lograr la regeneración de los nervios. Más especialmente, las composiciones comprenden compuestos que inhiben la actividad enzimática de la peptidil-prolil isomerasa (rotamasa) asociada con las proteínas aglutinantes FK-506 (FKBP) tales como la FKBP 12 y FKBP 52. Adicionalmente, las composiciones contienen compuestos que inhiben la actividad enzimática rotamásica asociada con una proteína NIMA-interactiva (PIN1). Los métodos incluyen el tratamiento de células nerviosas con composiciones que contienen un compuesto inhibidor de rotamasa. Los métodos del invento se pueden usar para promover la reparación de daños neuronales causados por enfermedades o trauma.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN:

Las inmunofilinas son una familia de proteínas solubles que sirven de receptoras de drogas inmunosupresoras tales como la ciclosporina A, FK-506 y rapamicina. Inmunofilinas de particular interés son las proteínas aglutinantes FK-506 (FKBP). Para ver el papel que juegan las inmunofilinas en el sistema nervioso, véase Solomon et al., "Immunophilins and the Nervous System," *Nature Med.*, 1(1), 32-37 (1995).

La proteína aglutinante FK-506 de 12 kilodaltones, FKBP 12, se une a la FK-506 con gran afinidad. Esta unión se ha medido directamente usando microcalorimetría y radiotitulado FK-506, por ej. [³H]dihidro-FK-506 (véase Siekierka et al., *Nature*, 341, 755-57 (1989); y la patente U.S. Patent No. 5,696,135 a Steiner et al.) y 32-[1-¹⁴C]-benzoil-FK-506 (véase Harding et al., *Nature*, 341, 758-60 (1989)). La afinidad de otros compuestos hacia la FKBP se puede determinar

18 

directamente por microcalorimetría o por muestras aglutinantes competitivas, usando tritiada ó ^{14}C -titulada FK-506, según la describe Siekierka et al., o Harding et al.

La proteína aglutinante FK-506, FKBP12 participa en una significativa variedad de funciones celulares. La FKBP12 cataliza el isomerismo cis-trans de los vínculos peptidil-prolilo. A esta actividad enzimática del peptidil-prolilo también se le conoce como actividad rotamásica. Se puede evaluar esta actividad por métodos conocidos a los expertos (véase Fischer et al., *Biochim. Biophys. Acta* 791, 87 (1984); Fischer et al., *Biomed. Biochim. Acta* 43, 1101 (1984); y Fischer et al., *Nature* 337, 476-478 (1989)). Patentes U.S. Nos. 5,192,773 y 5,330,993 a Armistead et al., reportan afinidades aglutinantes con FKBP relacionadas a las actividades inhibitoras de la rotamasa para muchos compuestos.

La FK-506 y los compuestos que ligan a la FKBP competitivamente con FKBP, estimulan el crecimiento de neuritas (axonas) en las células nerviosas (véase la U.S. Patent No. 5,696,135 a Steiner et al.). Lyons et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 3191-95 (1994)) demostró que FK-506 actúa para mejorar o activar el potencial de eficacia del factor de crecimiento de nervios (NGF, siglas en inglés) al estimular el crecimiento de neuritas en una línea de células feocromocitomas de ratas. El mecanismo de estimulación de este crecimiento de neuritas parece ser de un factor de 10 a 100 de activación de crecimiento de nervios.

La potencia de la inhibición de actividad enzimática del peptidil-prolilo isomerasa (rotamasa) de FKBP por la FK-506, y por compuestos que competitivamente inhiben la aglutinación de FK-506 con FKBP, se relaciona empíricamente con la actividad de estimulación de crecimiento de neuritas. Debido a la cercana relación entre la inhibición rotamásica y la actividad neurotrópica, se ha propuesto que la rotamasa puede convertir un sustrato de proteína a una forma que

19 

promueve el crecimiento neural (véase U.S. Patent No. 5,696,135). Por ejemplo, se ha encontrado que FKBP12 forma complejas uniones con los canales intercelulares iónicos de calcio, el receptor rianodino (RyR) y el inositol 1,4,5-trifosfato receptor (IP₃R) (Jayaraman et al., *J. Biol. Chem.*, 267, 9474-9477 (1992); Cameron et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1784-1788 (1995)), ayudando a estabilizar la liberación del calcio. Tanto para RyR como para IP₃R, se ha demostrado que la FK-506 y la rapamicina son capaces de disociar la FKBP12 de estos receptores. En ambos casos, el "desprendimiento" del FKBP12 tiende a aumentar las fugas de los canales de calcio y reducir la concentración intracelular del calcio. Se ha sugerido que el flujo del calcio puede estar asociado con el estímulo al crecimiento de neuritas.

Además, las uniones complejas FK-506 con FKBP se unen e inhiben la calcineurina, una fosfatasa citoplásmica. La actividad fosfatásica de la calcineurina es necesaria para la desfosforilación y subsecuente translocación al núcleo del factor nuclear de células T activadas (NF-AT) (véase Flanagan et al., *Nature*, 352, 803-807 (1991)). NF-AT es un factor de transcripción que inicia la activación del gen interleukin-2 el que a su vez interviene en la proliferación de células T; estos pasos son importantes para la activación de una respuesta antiinmune. La actividad inhibidora de calcineurina está relacionada con la actividad inmunosupresora del FK-506 y compuestos afines.

Sin embargo, la inhibición de calcineurinas no está relacionada con el estímulo al crecimiento de neuritas. Por lo tanto, los compuestos que son potentes inhibidores de rotamasa, pero no de calcineurinas son deseables, ya que deben de ser neurotróficos y no inmunosupresores.

Se desea que estos agentes neurotróficos tengan uso en el aumento del crecimiento de neuritas y, por lo tanto, en la promoción de crecimiento neuronal y

20
K

regeneración en varias situaciones patológicas donde se puede facilitar la reparación neuronal, incluyendo daños a nervios periféricos causados por trauma o enfermedades como diabetes, daños cerebrales asociados con derrame cerebral, y para el tratamiento de desórdenes neurológicos relacionados con la neurodegeneración, incluyendo las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, y esclerosis amiotrófica lateral (ALS, siglas en inglés). Además, esta utilización es preferible sin el efecto asociado de inmunosupresión, ya que el uso a largo plazo de inmunosupresores está asociado con efectos secundarios como toxicidad renal, déficits neurológicos e hipertensión vascular.

Se conocen varios compuestos inhibidores de actividad de enzimas rotamasa, aglutinantes de FKBP, o inmunomodulados. Véase, por ej. las Patentes U.S. Nos. 5,192,773, 5,330,993, 5,516,797, 5,612,350, 5,614,547, 5,622,970, 5,654,332, 5,665,774, 5,696,135, 5,721,256, 5,798,355, 5,786,378, 5,846,979, 5,801,187, y 5,801,197. Véase también las Publicaciones Internacionales (*International Publication*) Nos. WO 96/41609, WO 96/40633, WO 96/40140, WO 98/29116, WO 98/29117, WO 97/14439, WO 98/37882, y WO 99/45006.

Dada la variedad de desórdenes que se pueden tratar por medio del estímulo de crecimiento de neuritas, y los relativamente pocos agentes neurotróficos que tienen afinidad por inmunofilinas tipo FKBP, existe la necesidad de más agentes neurotróficos. Especialmente, se necesitan agentes neurotróficos que sean potentes inhibidores de actividad enzimática, y especialmente de la actividad propilo isomerasa *cis-trans* (rotamasa) de las inmunofilinas tipo FKBP, particularmente de la inmunofilina FKBP-12. Es deseable que estos compuestos tengan propiedades físicas y químicas apropiadas para usarse en preparaciones farmacéuticas, por ej. biodisponibilidad, vida media, y entrega eficaz al punto de la actividad. Conociendo

21 / 2

las propiedades descadas se prefieren las moléculas orgánicas pequeñas, a las proteínas. Asimismo, tales compuestos no inhiben significativamente la proteína fosfatasa calcineurina y por lo tanto no tienen gran actividad inmunosupresora.

Hay estudios que han identificado una nueva quinasa mitótica, NIMA, codificada por el gen *Aspergillus nimA* (Osmani, et al., *Cell*, 53: 237, 1988). La actividad de la quinasa NIMA está totalmente regulada durante el ciclo de división nuclear, cuya actividad máxima está en G2 y M. Una sobreexpresión de NIMA promueve el ingreso de células a M (Osmani, et al., *Cell*, 53: 237, 1988); Lu y Means, *EMBO J.*, 13: 2103, 1994}. En esta forma, NIMA es importante para el progreso hacia la mitosis a *Aspergillus*.

NIMA es una quinasa Ser/Thr proteínica, bioquímicamente diferente a otras quinasas proteínicas, y su actividad de fosfotransferencia es regulada por la fosforilación de Ser/Thr. Se ha mostrado que el trayecto mitótico no está restringido a *Aspergillus*, sino que también existe en células de vertebrados (Lu and Hunter, *Cell*, 81: 413, 1995a). En los ovocitos *Xenopus*, NIMA induce el fracaso germinal vesicular, sin activar a Mos, CDC2 o a la quinasa MAP. NIMA induce eventos mitóticos en células HeLa sin activar CDC2, mientras que las mutaciones negativas dominantes de NIMA causan un detenimiento específico de G2. Adicionalmente, O'Connell, et al. (*EMBO J.*, 13: 4926, 1994), ha demostrado que NIMA induce condensación cromatina prematura en levadura de fisión y en células HeLa. Estos resultados revelan la existencia de un trayecto mitótico similar al de NIMA en otras células eucarióticas.

Como ejemplo, una proteína asociada a NIMA se llama "proteína en interacción con NIMA" (PIN1). Véase la U.S. Patent No. 5,952,467 que, como referencia, se incorpora aquí en su integridad. El PIN1 tiene actividad de terminal C

22 

peptidil-propilo isomerismo cis-trans y contiene un terminal conservado N de dominio triptófano (dominio WW) que se piensa que interviene en la interacción de proteína a proteína. Específicamente, se piensa que PIN1 es un regulador mitótico que está presente durante todo el ciclo que regula los eventos de transcripción y postranscripción, al catalizar los cambios en conformación de la fosforilación-dependiente de la sub-unidad polimerasa II RNA (Albert et al., J. Cell Sci. 112: 2493-500, agosto de 1999). Se ha mostrado que PIN1 induce un detenimiento de G2 y retrasa la mitosis inducida por NIMA cuando es sobreexpresada, e inicia un detenimiento mitótico y fragmentación de DNA cuando se agota.

El modular la actividad PIN1 por medio del contacto de una célula con una composición que modula la actividad PIN1, puede proporcionar un método para controlar el crecimiento de esa célula. Por ejemplo, un inhibidor de actividad PIN1 como el inhibidor peptidil-propilo isomerasa cis-trans (PPIase), o un anticuerpo anti-PIN1, o un inhibidor de la expresión PIN1 tal como una secuencia antisensor nucleótido, o una ribozima, se pueden usar para controlar el desarrollo de una célula. Alternativamente, la actividad PIN1 se puede aumentar por medio de un activador, o la expresión PIN1 se puede aumentar, por ejemplo, por medio de un agente facilitador. Así mismo, PIN1 puede también estar involucrado en la enfermedad de Alzheimer, Se ha reportado que PIN1 in vitro puede restaurar la habilidad de la proteína tau fosforilada para ligar microtúbulos y promover la convergencia de microtúbulos. El agotamiento de PIN1 y su secuestro conduce a la muerte de la célula (Lu et al., Nature 24 (6738): 739-40, junio 24 de 1999).

Debido a la variedad de trastornos que se pueden tratar por medio del control del desarrollo de células, y los relativamente pocos inhibidores de PIN1 que se conocen, se necesitan más inhibidores de PIN1. Es deseable que tales inhibidores

tengan propiedades físicas y químicas apropiadas para usarse en preparaciones farmacéuticas, por ej. biodisponibilidad, vida media y entrega eficaz al punto de utilización. En vista de las propiedades descables, se prefieren las moléculas orgánicas pequeñas, a las proteínas.

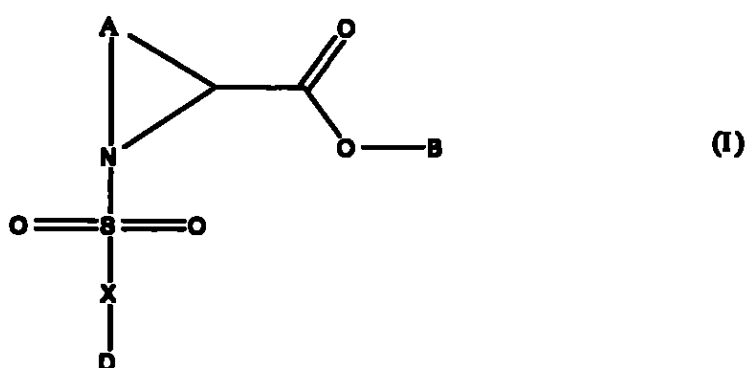
COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

Por lo tanto, un objetivo de la invención es proporcionar compuestos neurotróficos de moléculas pequeñas que tengan afinidad con inmunofilinas del tipo FKBP. Una vez ligados a estas proteínas, los compuestos neurotróficos son potentes inhibidores de la actividad enzimática asociada a las proteínas inmunofilínicas, especialmente la actividad de enzimas rotamasa. Un objetivo adicional es proporcionar compuestos inhibidores del presente invento que no ejercen actividad inmunosupresora significativa además de su actividad neurotrófica. Otro objetivo de la invención es proporcionar procedimientos eficaces para sintetizar tales compuestos y también sus productos intermedios útiles. Otro objetivo de la invención es proporcionar métodos para tratar pacientes que sufren de trauma neurológico o trastornos resultantes de, o asociados con, condiciones que incluyen (pero no están limitados a) neuralgias, distrofia muscular, parálisis de Bell, miastenia grave, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), derrame cerebral e isquemia asociada con el derrame, parapatía, otras enfermedades de degeneración neural, enfermedades neuromotoras y lesiones a los nervios, incluyendo nervios de la espina dorsal.

Se han logrado estos objetivos por medio de compuestos neurotróficos de esta invención, los que se pueden usar para estimular el desarrollo y regeneración de neuronas. La administración de estos compuestos a individuos que requieren estimulación terapéutica para desarrollo y regeneración de neuronas proporciona

terapias eficaces en varias situaciones patológicas donde se puede facilitar la reparación neuronal, incluyendo daños a nervios periféricos causados por lesiones o enfermedades como la diabetes, daños cerebrales causados por derrames, y para el tratamiento de trastornos neurológicos relacionados con la neurodegeneración, incluyendo la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica (ALS).

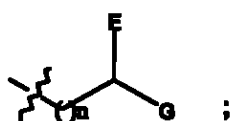
Para lograr estos y otros objetivos descritos en términos generales en las realizaciones, en primer lugar el presente invento se relaciona a un compuesto de la fórmula (I):



o a una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, donde:

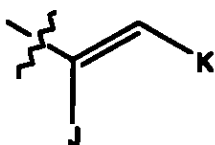
A es alquileo C_3-C_5 opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes apropiados y opcionalmente cualquiera de los grupos CH_2 del grupo alquileo puede ser reemplazado por O, S, SO o SO_2 ;

B es



25
5/2

E y G son independientemente alquilos Ar, H, C₁-C₆ de cadena recta o ramificada, C₁-C₆ son alquenos de cadena recta o ramificada, C₁-C₆ son alquilos o alquenos de cadena recta o ramificada sustituidos con un cicloalquilo C₃-C₇, C₁-C₆ es alquilo o alqueno de cadena recta o ramificada, o alqueno que es sustituido con un cicloalqueno C₃-C₇, o Ar sustituido C₁-C₆ alquilo o alqueno de cadena recta o ramificada donde, en cada caso, uno o dos de los grupos CH₂ de las cadenas de alquilo o alqueno pueden contener 1-2 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste de oxígeno, azufre, SO y SO₂ en patrones de sustitución químicamente razonables, o



siempre que B o D no sean H; J es H, C₁-C₆ son alquilos de cadena recta o ramificada o C₁-C₆ un alqueno de cadena recta o ramificada; K es Ar o un cicloalquilo de 5-7 miembros con sustituyentes en las posiciones 3 y 4 que son independientemente seleccionados del grupo que consiste de H, OH, -O-(CH₂)_m-alquilo, -O-(CH₂)_m-alqueno y carbonilo, donde m es 1-4; Ar es seleccionado del grupo que consiste de fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, sistemas de anillo monocíclicos y bicíclicos y heterocíclicos con tamaños individuales de 5 ó 6 que pueden contener en cualquiera de, o en ambos anillos, un total de 1-4 heteroátomos seleccionados independientemente de O, N y S; donde Ar puede contener de uno a tres sustituyentes que son independientemente seleccionados del grupo consistente de hidrógeno, halo, hidroxilo, nitro, trifluorometilo, trifluorometoxi, C₁-C₆ alquilo de cadena recta o ramificada, C₂-C₆ alqueno de cadena recta o ramificada, O-(C₁-C₄ alquilo de cadena recta o ramificada), O-(C₂-C₄

alquenilo de cadena recta o ramificada), O-bencilo, O-fenilo, 1,2-metilenodioxo, amino, carboxilo y fenilo;

n es de 0 a 4;

D es C₁-C₆ alquilo de cadena recta o ramificada, C₁-C₆ alquenilo de cadena recta o ramificada, C₅-C₇ cicloalquilo, C₅-C₇ cicloalquenilo sustituido con C₁-C₄ alquilo de cadena recta o ramificada o C₁-C₄ alquenilo de cadena recta o ramificada, [(C₂-C₄)-alquilo o (C₂-C₄)-alquenilo)]-Ar o Ar; y

X es NR¹⁰ u O, donde R¹⁰ es H o C₁-C₄ alquilo o C₁-C₄ alquenilo.

En segundo lugar, el invento se refiere a una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la fórmula (I) o su sal farmacéuticamente aceptable y un portador farmacéuticamente aceptable.

En tercer lugar, el invento se refiere a un método para tratar un trastorno neurológico en un animal, que comprende:

la administración al animal de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la fórmula (I) o su farmacéuticamente aceptable sal o solvato.

En cuarto lugar, el invento se refiere a procesos para producir los compuestos de la fórmula (I).

En quinto lugar, el invento se refiere a un método para modular la fosforilación de la proteína tau en un animal, lo que comprende:

la administración al animal de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la fórmula (I) o su farmacéuticamente aceptable sal o solvato.

En sexto lugar, el invento se refiere a un método para inhibir el secuestro de PIN1 en células de animales, lo que comprende:

la administración al animal de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la fórmula (I) o su farmacéuticamente aceptable sal o solvato.

27
t/c

En séptimo lugar, el invento se refiere a un método para controlar los cambios de conformación dependientes de la fosforilación de por lo menos una sub-unidad RNA polimerasa II, que comprende:

la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la fórmula (I) o su farmacéuticamente aceptable sal o solvato.

Otras características, objetivos y ventajas del invento se harán aparentes en las detalladas descripciones del invento que siguen a continuación:

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERENTES DE LA INVENCION:

Tal como se usan en esta aplicación, a menos que se indique lo contrario, aplican las siguientes definiciones:

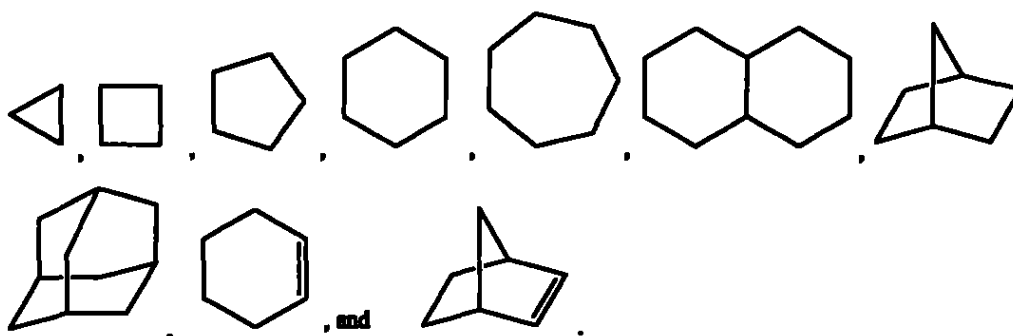
De acuerdo con prácticas convencionales de la especialidad,  se usa aquí en fórmulas estructurales para representar la unión que es el punto de conexión del componente o sustituyente del núcleo o estructura de soporte.

A menos que se represente una orientación especial, cuando se incluyen carbonos quirales en las estructuras químicas, se intenta incluir ambas formas estereoisoméricas.

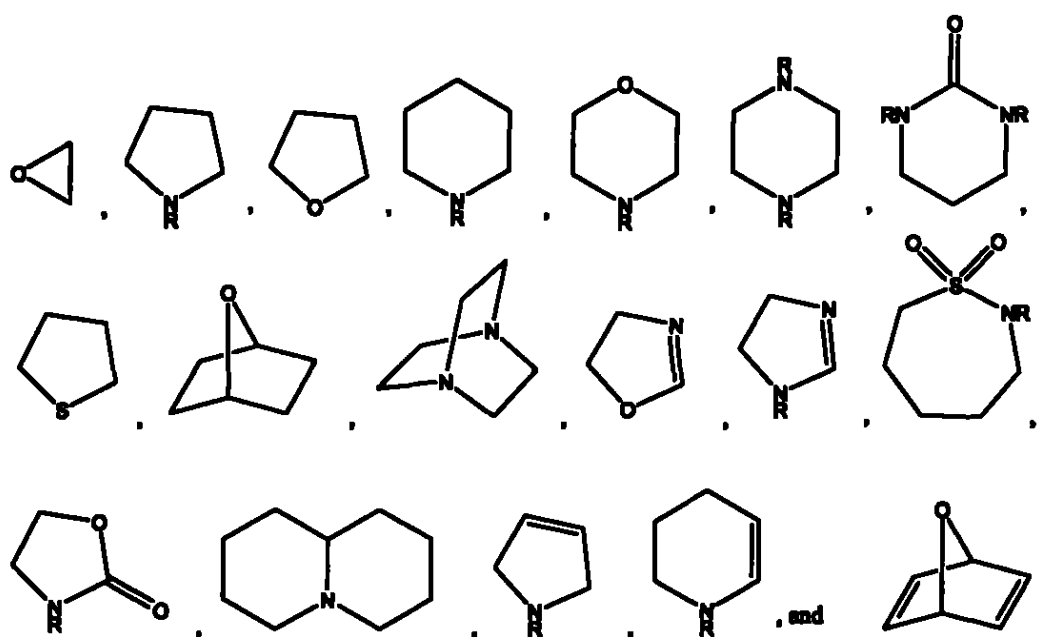
Por "grupo alquilo" se intenta significar un radical monovalente de cadena recta o ramificada de átomos de carbono e hidrógeno saturado o no saturado, como metilo (Me), etilo (Et), propilo, isopropilo, butilo (Bu), isobutilo, t-butilo (t-Bu), etenilo, pentenilo, butenilo, propenilo, etinilo, butinilo, propinilo, pentinilo, hexinilo y otros que pueden ser no sustituidos (o sea, que contienen sólo carbono e hidrógeno) o sustituidos por uno o más sustituyentes apropiados como se definen a continuación (por ej., uno o más halógenos como F, Cl, Br, o I, con F y Cl que son los preferidos).

Por "grupo alquilo inferior" se intenta significar un grupo alquilo que contiene de 1 a 4 átomos de carbono en su cadena

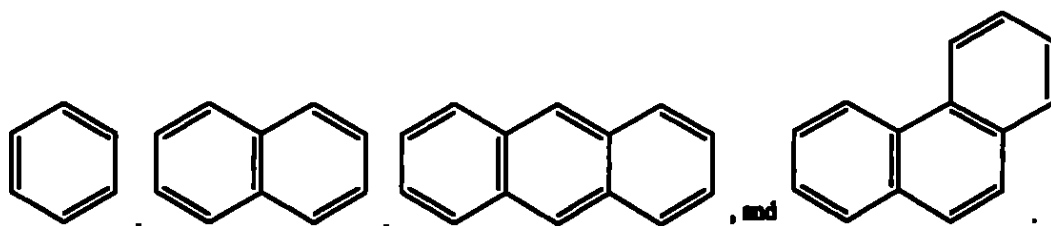
Por "grupo cicloalquilo" se intenta significar un radical monovalente monocíclico, bicíclico o tricíclico no aromático que contiene 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, ó 14 anillos de átomos de carbono, cada uno de los cuales puede ser saturado o no saturado, y que pueden ser no sustituidos o sustituidos por uno o más sustituyentes apropiados, como se definen más abajo, y a los cuales se les puede fusionar uno o más grupos heterocicloalquilo, grupos arilo, o grupos heteroarilo, los mismos que pueden ser no sustituidos o sustituidos por uno o más sustituyentes. Ejemplos ilustrativos de grupos cicloalquilo incluyen los siguientes:



Por "grupo heterocicloalquilo" se intenta significar un radical monovalente monocíclico, bicíclico o tricíclico no aromático que contiene 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ó 18 anillos de átomos que incluyen 1, 2, 3, 4, ó 5 heteroátomos seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre, donde el radical es no sustituido o sustituido por uno o más sustituyentes apropiados definidos más abajo, y a los cuales se les puede fusionar uno o más grupos cicloalquilo, grupos arilo, o grupos heteroarilo, los mismos que pueden ser no sustituidos o sustituidos por uno o más sustituyentes. Ejemplos ilustrativos de grupos cicloalquilo incluyen los siguientes:



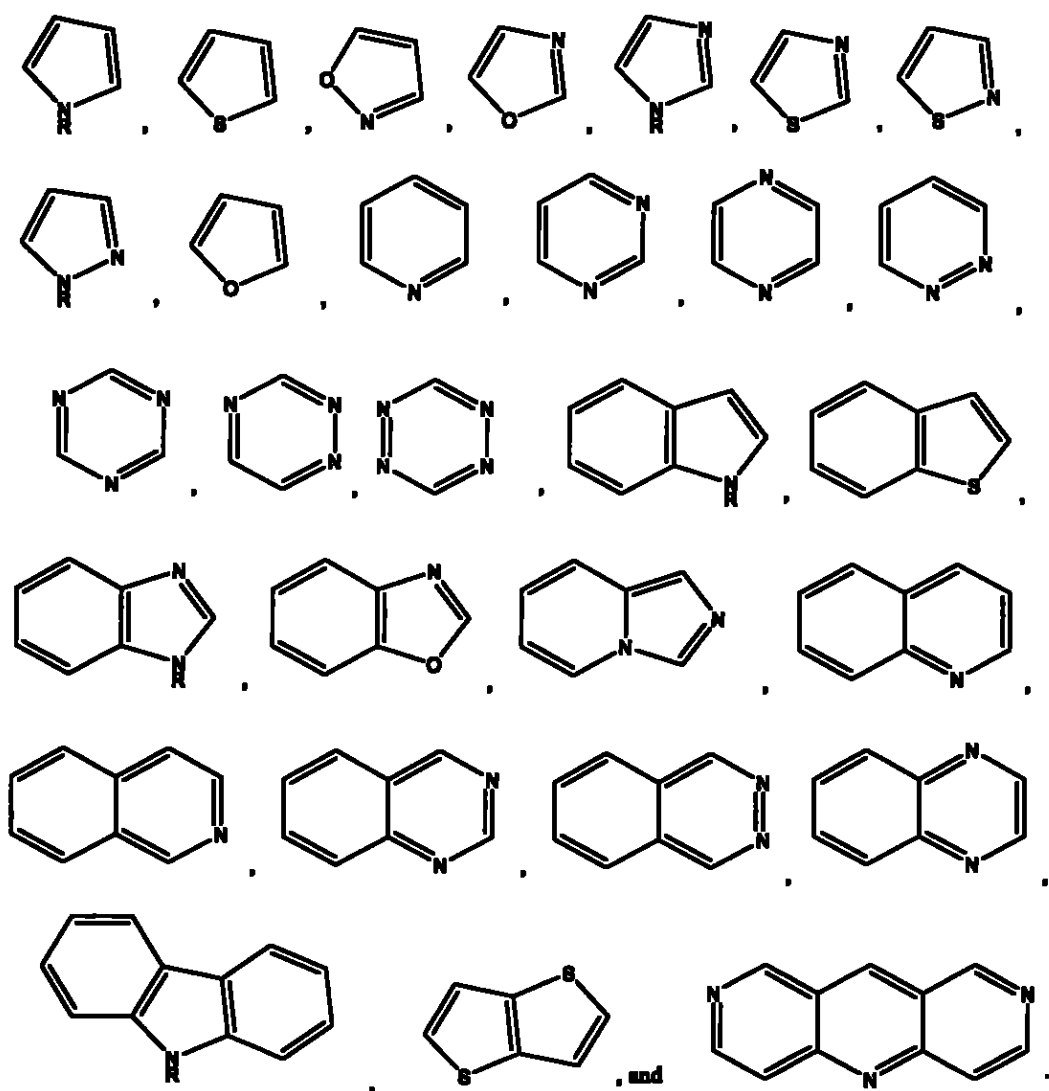
Por "grupo arilo" se intenta significar un radical monovalente monocíclico, bicíclico o tricíclico no aromático que contiene 6, 10, 14 ó 18 anillos de átomos de carbono que pueden ser no sustituidos o sustituidos por uno o más sustituyentes apropiados definidos más abajo, y a los cuales se les puede fusionar uno o más grupos cicloalquilo, grupos heterocicloalquilo, o grupos heteroarilo, los mismos que pueden ser no sustituidos o sustituidos por uno o más sustituyentes apropiados. Así es que el término "grupo arilo" incluye un grupo bencilo (Bzl). Ejemplos ilustrativos de grupos arilo incluyen los siguientes:



30 93

Por "grupo heteroarilo" se intenta significar un radical monovalente monocíclico, bicíclico o tricíclico aromático que contiene 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, ó 18 anillos de átomos, incluyendo 1, 2, 3, 4, ó 5 heteroátomos seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre, los que pueden ser no sustituidos o sustituidos por uno o más sustituyentes apropiados definidos más abajo, y a los cuales se les puede fusionar uno o más grupos cicloalquilo, grupos heterocicloalquilo, o grupos arilo, los mismos que pueden ser no sustituidos o sustituidos por uno o más sustituyentes apropiados. Ejemplos ilustrativos de grupos arilo incluyen los siguientes:

31 ~~R~~



Por "heterociclo" se intenta significar un grupo heteroarilo o heterocicloalquilo (cada uno, como se le definió más arriba, es opcionalmente sustituido).

Por "grupo acilo" se intenta significar un radical $-C(O)-R$ donde R es un sustituyente tal como se define más abajo.

Por "grupo tioacilo" se intenta significar un radical $-C(S)-R$ donde R es un sustituyente tal como se define más abajo.

Por "grupo sulfonilo" se intenta significar un radical $-SO_2R$ donde R es un sustituyente tal como se define más abajo.

Por "grupo hidroxilo" se intenta significar el radical $-OH$.

Por "grupo amino" se intenta significar el radical $-NH_2$.

Por "grupo alquilamino" se intenta significar el radical $-NHR_a$, donde R_a es un grupo alquilo.

Por "grupo "dialquilamino" se intenta significar el radical $-NR_aR_b$, donde R_a y R_b son cada uno independientemente un grupo alquilo.

Por "grupo alcoxi" se intenta significar el radical $-OR_a$, donde R_a es un grupo alquilo. Ejemplos de grupos alcoxi incluyen metoxi, etoxi, propoxi y similares.

Por "grupo alcoxicarbonil" se intenta significar el radical $-C(O)OR_a$, donde R_a es un grupo alquilo.

Por "grupo alquilsulfonilo" se intenta significar el radical $-SO_2R_a$, donde R_a es un grupo alquilo.

Por "grupo alquilaminocarbonil" se intenta significar el radical $-C(O)NHR_a$, donde R_a es un grupo alquilo.

Por "grupo "dialquilaminocarbonil" se intenta significar el radical $-C(O)NR_aR_b$, donde R_a y R_b son cada uno independientemente un grupo alquilo.

Por "grupo mercapto" se intenta significar el radical $-SH$.

Por "grupo alquiltio" se intenta significar el radical $-SR_a$, donde R_a es un grupo alquilo.

Por "grupo carboxi" se intenta significar el radical $-C(O)OH$.

Por "grupo carbamoilo" se intenta significar el radical $-C(O)NH_2$.

Por "grupo ariloxi" se intenta significar el radical $-OR_c$, donde R_c es un grupo arilo.

Por "grupo heteroariloxi" se intenta significar el radical $-OR_d$, donde R_d es un grupo heteroarilo.

Por "grupo ariltio" se intenta significar el radical $-SR_c$, donde R_c es un grupo arilo.

Por "grupo heteroariltio" se intenta significar el radical $-SR_d$, donde R_d es un grupo heteroarilo.

Por el término "elemento orgánico apropiado" se intenta significar cualquier elemento reconocible por los entendidos en la materia, por medio de pruebas de rutina, como que no afectan adversamente la actividad inhibidora de los compuestos del invento. Ejemplos ilustrativos de elementos orgánicos apropiados incluyen, pero no se limitan a, grupos hidroxilo, grupos alquilo, grupos oxo, grupos cicloalquilo, grupos heterocicloalquilo, grupos arilo, grupos heteroarilo, grupos acilo, grupos sulfonil, grupos mercapto, grupos alquiltio, grupos alcoxi, grupos carboxi, grupos amino, grupos alquilamino, grupos dialquilamino, grupos carbamoilo, grupos ariltio, grupos heteroariltio, y similares.

Por el término "sustituyente" o "sustituyente apropiado" se intenta significar cualquier sustituyente apropiado que pueda ser reconocido o seleccionado por los entendidos en la materia por medio de pruebas de rutina. Ejemplos ilustrativos de

sustituyentes apropiados incluyen, grupos hidroxilo, halógenos, grupos oxo, grupos alquilo, grupos acilo, grupos sulfonilo, grupos mercapto, grupos alquiltio, grupos alquilo, grupos cicloalquilo, grupos heterocicloalquilo, grupos arilo, grupos, heteroarilo, grupos carboxi, grupos amino, grupos alquilamino, grupos dialquilamino, grupos carbamilo, grupos arilo, grupos heteroarilo, grupos aro, grupos heteroarilo, y similares.

Por el término "opcionalmente sustituido" se intenta indicar expresamente que el grupo especificado no es no sustituido o sustituido por uno o más sustituyentes apropiados, a menos que los sustituyentes opcionales se especifiquen expresamente, en cuyo caso el término indica que el grupo es no sustituido o sustituido con los sustituyentes específicos. Tal como se definió más arriba, varios grupos pueden ser no sustituidos o sustituidos (o sea que son opcionalmente sustituidos) a menos que se indique lo contrario (por ej., indicando que el grupo especificado es no sustituido).

Por "prodroga" se intenta significar un compuesto que bajo condiciones fisiológicas o por solvolisis o metabólicamente, se convierte en un compuesto específico que es farmacéuticamente activo.

Por "metabolito farmacéuticamente activo" se intenta significar un producto activo producido por metabolismo dentro de un compuesto específico.

Por "solvato" se intenta significar una forma de solvato farmacéuticamente aceptable de un compuesto específico que mantiene la eficacia biológica de dicho compuesto. Ejemplos de solvatos incluyen compuestos del invento en combinación con agua, isopropanol, etanol, metanol, dimetil sulfoxido, acetato de etilo, ácido acético, o etanolamina.

Por "sal farmacéuticamente aceptable" se intenta significar una sal que retiene la eficacia biológica de los ácidos libres y las bases del compuesto especificado y que

35
28

no es indeseable biológicamente o de otra forma. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen a sulfatos, piro-sulfatos, bisulfatos, sulfitos, bisulfitos, fosfatos, monohidrogenfosfatos, dihidrogenfosfatos, metafosfatos, pirofosfatos, cloruros, bromuros, yoduros, acetatos, propionatos, decanoatos, caprilatos, acrilatos, formiatos, isobutiratos, caproatos, heptanoatos, propiolatos, oxalatos, malonatos, succinatos, suberatos, sebacatos, fumaratos, maleatos, butino-1, dioatos, hexino-1, dioatos, benzoatos, clorobenzoatos, metoxibenzoatos, ftalatos, sulfonatos, xilenesulfonatos, filacetatos, fenilpropionatos, filbutiratos, citratos, lactatos, γ -hidroxibutiratos, glicolatos, tartratos, metanosulfonatos, propanosulfonatos, naftaleno-1-sulfonatos, naftaleno-2-sulfonatos, y mandelatos

Además, el presente invento proporciona métodos de síntesis que están incluidos en uno de los pasos sintéticos expuestos en este documento. Un método de síntesis incluye un paso sintético cuando el paso sintético es por lo menos una parte del método final de síntesis. En esa forma, el método sintético puede ser el paso sintético solo o puede haber pasos de síntesis adicionales asociados con él. Tal método de síntesis puede tener algunos pasos sintéticos adicionales o puede tener numerosos pasos sintéticos adicionales.

Si el compuesto neurotrófico de la fórmula I producido por el proceso de esta invención es una base, se puede preparar la sal deseada por cualquier método conocido por los entendidos en la materia, incluyendo el tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico como ácido clorhídrico; ácido hidrobromico; ácido sulfúrico; ácido nítrico; ácido fosfórico, y similares, o con un ácido orgánico como ácido acético; ácido maleico; ácido succínico; ácido mandélico; ácido fumárico; ácido malónico; ácido pirúvico; ácido oxálico; ácido glicólico; ácido salicílico; ácido piranosidílico, como ácido glucorónico o ácido galacturónico; ácido alfa-hidroxi

26

como ácido cítrico o ácido tartárico; amino ácido como ácido aspártico o ácido glutámico; ácido aromático como ácido benzoico o ácido cinámico; ácido sulfónico como ácido p-toluenosulfónico o ácido etanosulfónico; o similares.

Si el compuesto neurotrófico de la fórmula I producido por el proceso del presente invento es un ácido, se puede preparar la sal deseada por cualquier método conocido por los especialistas, incluyendo el tratamiento del ácido libre con una base inorgánica u orgánica como una amina (primaria, secundaria o terciaria); un metal alcali o metal térreo hidróxido, o similares. Ejemplos ilustrativos de sales apropiadas incluyen sales orgánicas derivadas de amino ácidos como glicina y arginina; amoníaco; aminas primarias, secundarias o terciarias; y aminas cíclicas como piperidina, morfolina, y piperazina; así como sales inorgánicas derivadas de sodio, calcio, potasio, magnesio, manganeso, hierro, cobre, cinc, aluminio y litio.

En el caso de compuestos, sales o solvatos que son sólidos, los expertos en la materia entienden que los compuestos de la fórmula I y los intermedios utilizados en el proceso de esta invención, sus sales y solvatos pueden existir en diferentes formas de cristales, todos los cuales se intenta que estén dentro del campo de esta invención y las fórmulas especificadas.

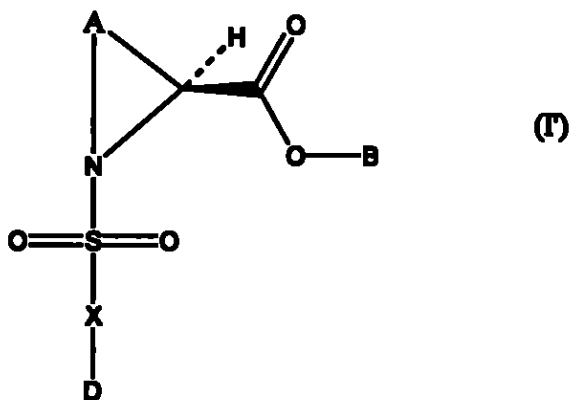
Los compuestos neurotróficos de la fórmula I y los intermedios utilizados en el proceso de esta invención, pueden existir solos como estereoisómeros o compuestos racémicos o como enantiómeros o diastereoisómeros. Se intenta que todo estereoisómero, compuestos racémicos solos y sus combinaciones estén comprendidos dentro del amplio espectro de esta invención. Sin embargo, se prefiere que los compuestos intermedios que se utilizan en el proceso de esta invención, se usen en su forma ópticamente pura.

J7

Es generalmente entendido por los expertos en la materia, que un compuesto ópticamente puro es uno que es enantioméricamente puro. Tal como se usa aquí, se intenta que el término "ópticamente puro" signifique un compuesto que contiene por lo menos una suficiente cantidad de un solo enantiómero para producir la deseada actividad farmacológica. Preferiblemente, se intenta que "ópticamente puro" signifique un compuesto que contiene por lo menos 90% de un solo isómero (80% exceso enantiomérico (e.e.), y preferiblemente por lo menos 95% (90% e.e.), y más preferiblemente por lo menos 97,5% (95% e.e.), y aún más preferiblemente por lo menos 99% (98% e.e.). Preferiblemente, los compuestos neurotróficos de la fórmula I de este invento son ópticamente puros.

Los compuestos neurotróficos de la invención están representados por la fórmula (I) definida más arriba. Preferiblemente, los compuestos neurotróficos inhiben la actividad enzimática de la rotamasa (peptidil-prolil isomerasa) de FKBP, y en especial, de FKBP12. Además de los compuestos de la fórmula (I), los compuestos neurotróficos del invento incluyen derivados farmacéuticamente aceptables de tales compuestos, como prodrogas, metabolitos activos farmacéuticamente aceptables, y sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables.

Particularmente se prefieren los compuestos de la fórmula (I')



38 AS

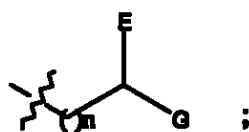
donde A, B, D, E y X son como previamente descritos para el compuesto de la fórmula (I).

En las definiciones de más arriba de los compuestos de la fórmula (I) y (I'), se prefieren las siguientes definiciones.

Preferiblemente, A es un grupo alquileo C_3-C_5 de cadena recta donde cualquiera de los grupos CH_2 del grupo alquileo es opcionalmente sustituido por S.

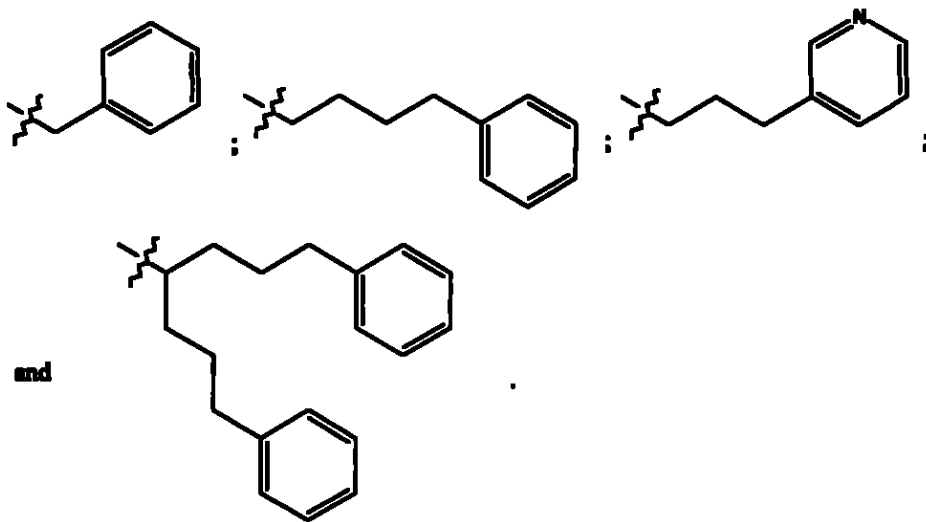
Más preferiblemente, A es un grupo alquileo no sustituido C_3 ó C_4 de cadena recta (o sea 1,3-propileno ó 1,4 butileno). Más preferiblemente, A es C_4 alquileo.

Preferiblemente, B es



donde E es seleccionada del grupo que consiste de H, bencilo, 3-piridilo, 2-feniletilo y 3-fenilpropilo; G es seleccionada del grupo que consiste de fenilo, 3-piridilo, 3-fenilpropilo, 3-fenoxifenilo y 4-fenoxifenilo; y n es 0-4.

Más preferiblemente, B es seleccionada del grupo que consiste de:

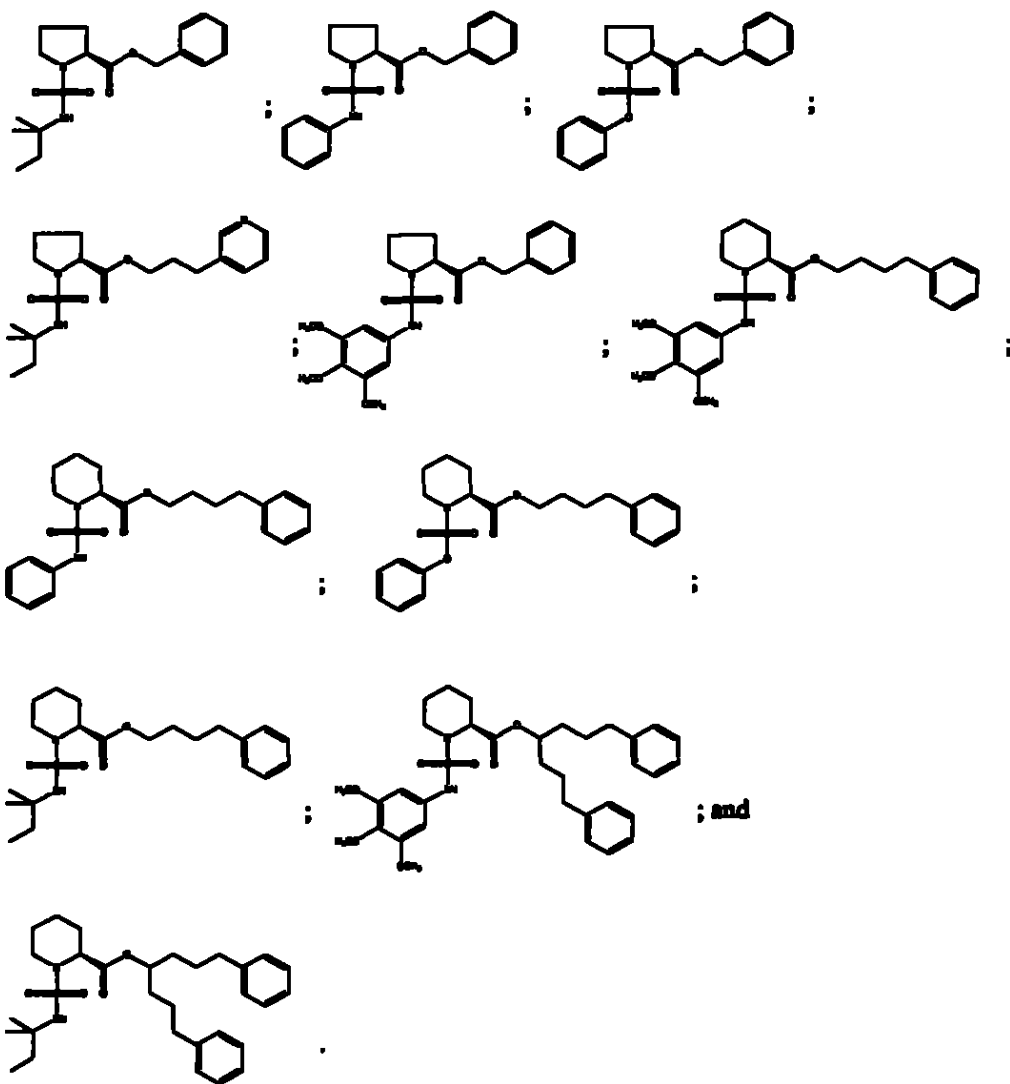


Preferiblemente, D es seleccionada del grupo que consiste de fenilo, 4-metilfenilo, 4-metoxifenilo, 2-tienilo, 2,4,6-triisopropilfenilo, 4-fluorofenilo, 3-metoxifenilo, 2-metoxifenilo, 3,5-dimetoxifenilo, 3,4,5-trimetoxifenilo, metilo, 1-naftilo, 8-quinolilo, 1-(5-N,N-dimetilamino)-naftilo, 4-yodofenilo, 2,4,6-trimetilfenil, bencilo, 4-nitrofenilo, 2-nitrofenilo, 4-clorofenilo, 1,1-dimetilpropil y E-estirenilo.

Aún más preferiblemente D es seleccionada del grupo que consiste de fenilo, 1,1-dimetilpropilo y 3,4,5-trimetoxifenilo.

Preferiblemente, X es NH u O.

Las especies de compuestos especialmente preferidas representadas por la fórmula (I) de más arriba, son las siguientes:



~~40~~
40

Los compuestos de la invención también incluyen derivados farmacéuticamente aceptables de compuestos de la fórmula (I). Un compuesto “farmacéuticamente aceptable” denota una prodroga, metabolito farmacéuticamente aceptable, o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, la sal de ese éster, o hidrato de un compuesto de esta invención. Tales compuestos, al administrarse a un paciente, son capaces de proporcionar directa o indirectamente un compuesto de este

21
invento, o un residuo metabólico o un producto de ellos y, por lo tanto, inhibir la actividad rotamásica de FKBP, o promover un aumento del desarrollo de neuritas.

Los compuestos de la fórmula (I) que se pueden usar en composiciones farmacéuticas en la forma de sales farmacéuticamente aceptables, tales sales son preferiblemente derivadas de ácidos o bases inorgánicas u orgánicas. Ejemplos de sales ácidas incluyen acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfoato, bisulfato, butirato, citrato, canforato, canfosulfonato, ciclopentapropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, hidrobromida, hidroyodida, 2- hidrozieta-sulfonato, lactato, maleato, metasulfonato, 2-naftalenosulfonato, nocotinato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato, y undecanoato. Ejemplos de bases sólidas incluyen sales amoníacas, sales metálicas alcalinas como el sodio y las sales de potasio, sales de metales terrosos como las sales de calcio y magnesio, sales de bases orgánicas como las sales diclohexilaminas, sal N-metilo-D-glucosamina, y sales con aminoácidos como la arginina y lisina. También los grupos básicos que contienen nitrógeno se pueden cuaternizar con agentes como: haluros de alquilo inferior, como metilo, etilo, propilo, y cloruros, bromuros o yoduros; sulfatos dialquilos, como dimetilo, dietilo, dibutilo, y sulfatos diamilos; haluros de cadena extensa como decilo, laurilo, miristilo y cloruros estearilos, cloruros, bromuros y yoduros; y haluros aralquilos, como el bencilo y los bromuros fenetlicos. A partir de tales sales se puede preparar productos solubles al agua o al aceite, o dispersantes.

Además, los compuestos de la invención se pueden modificar añadiéndoles funciones apropiadas para mejorar propiedades biológicas específicas. Tales

modificaciones, que están al alcance de los normalmente entendidos en la materia, incluyen el incremento de penetración biológica a un sistema biológico específico (por ej., el sistema linfático de la sangre, el sistema nervioso central) aumentando la disponibilidad oral, aumentando la solubilidad para permitir la administración por inyección, alterando el metabolismo, y alterando la velocidad de excreción.

Algunos de los compuestos aquí descritos contienen uno o más centros de asimetría y por lo tanto pueden crear enantiómeros, diastereoisómeros, y otras formas estereoisoméricas. Esta invención intenta incluir todos esos posibles estereoisómeros así como sus productos racémicos y formas ópticamente puras. Los isómeros ópticamente activos (R) y (S) se pueden preparar usando sintonas quirales o reactivos quirales, o resolverse utilizando técnicas convencionales. Cuando los compuestos aquí descritos contienen enlaces dobles olefinicos, se intenta incluir ambos isómeros geométricos E y Z.

Por otra parte, las fórmulas aquí mostradas pueden exhibir el fenómeno de tautomerismo. Debido a que los dibujos de las fórmulas dentro de esta especificación sólo pueden representar una de las posibles formas tautoméricas, se debe entender que la invención incluye toda forma tautomérica que se pueda generar por el uso de las herramientas descritas en su forma conocida, y no está limitada a la única forma tautomérica mostrada por la fórmula.

EJEMPLOS:

Los siguientes ejemplos ilustran este invento y no se intenta que se les apliquen limitaciones. A menos que se especifique lo contrario, todos los porcentajes están basados en 100% por peso del compuesto final.

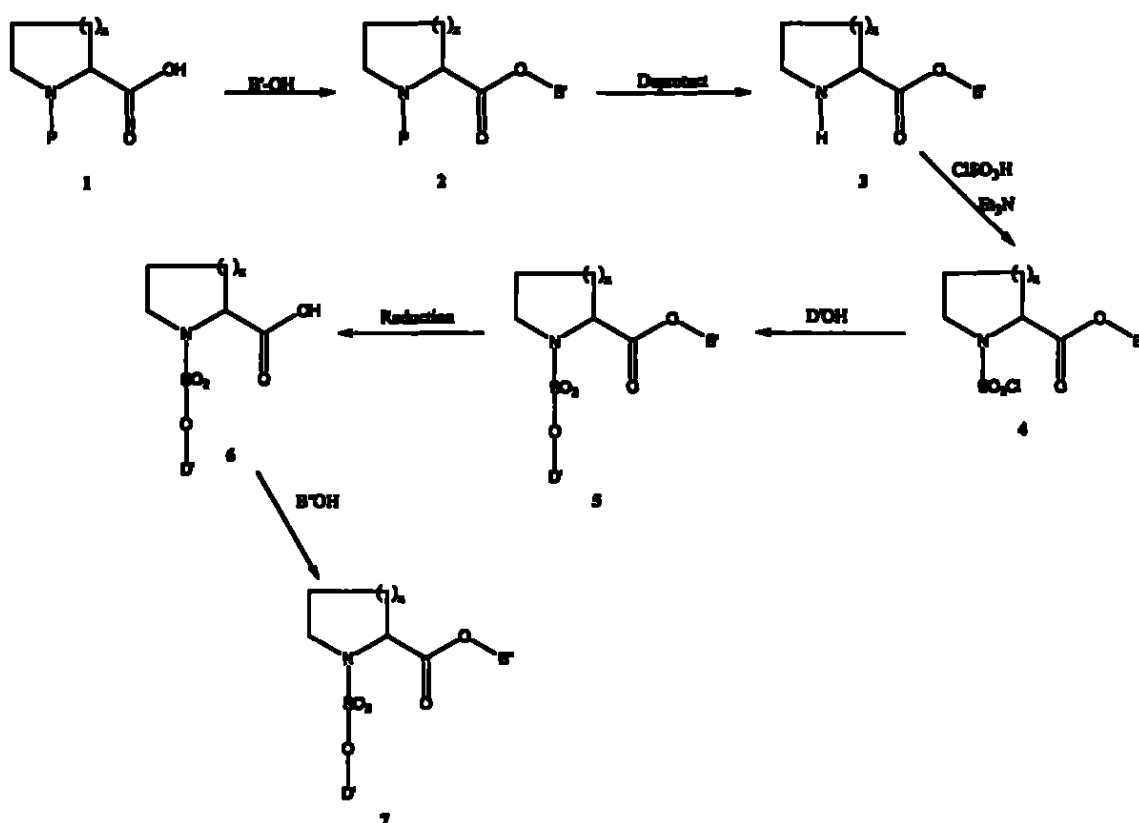
Los compuestos de la presente invención se pueden preparar fácilmente por medio de técnicas estándar de la química orgánica, utilizando los trayectos sintéticos

mostrados a continuación. Los compuestos oxisulfonilo de esta invención se pueden preparar siguiendo la forma mostrada en el Esquema 1 más abajo. Tal como se ha descrito en el Esquema 1, los amino ácidos 1 protegidos por grupos apropiados P en el amino ácido nitrógeno se pueden reaccionar con alcoholes B'OH para generar ésteres 2. Luego de quitar el grupo protector, la amina libre se puede reaccionar con ácido clorosulfónico para proporcionar el clorosulfonil 4. Entonces el clorosulfonil 4 se puede reaccionar con varios alcoholes D'OH para rendir el producto final 5. Dependiendo de la estructura del producto final a sintetizarse, puede ser más eficaz el preparar un compuesto de la fórmula 5 y luego sustituir el grupo B' con un grupo B''. Esto se puede hacer como se muestra en el Esquema 1, donde el producto 5 es reducido a los alcoholes correspondientes 6 que entonces se pueden reaccionar con alcoholes B''OH para dar los productos finales 7.

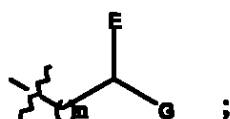
25

Scheme 1

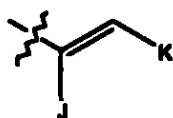
AA



En los compuestos mostrados arriba en el Esquema 1, B' y B'' son independientemente:



donde E y G son independientemente Ar, H, alquilos C₁-C₆ de cadena recta o ramificada, alquenos C₁-C₆ de cadena recta o ramificada, alquilo o alqueno C₁-C₆ de cadena recta o ramificada que es sustituido con cicloalqueno C₅-C₇, ó Ar sustituido alquilo o alqueno C₁-C₆ de cadena recta o ramificada donde, en cada caso, uno o dos de los grupos de cadenas CH₂ de las cadenas del alquilo o alqueno pueden contener 1-2 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste de oxígeno, azufre, SO y SO₂ en patrones de sustitución químicamente razonables, o



Δ

siempre que ambos, B' y B'' y D' no sean H; J es H, alquilo o alqueno C₁-C₆ de cadena recta o ramificada;

K es Ar o un cicloalquilo sustituido de 5-7 miembros con sustituyentes en la posición 3 y 4 que son independientemente seleccionados del grupo que consiste de H, OH, -O-(CH₂)_m-alquilo, -O-(CH₂)_m-alqueno y carbonilo, donde m es 1-4; Ar es seleccionado del grupo que consiste de fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, sistemas anulares heterocíclicos monocíclicos y bicíclicos con tamaños individuales de anillos de 5 ó 6, cualquiera de ellos o ambos pueden contener un total de 1-4 heteroátomos seleccionados independientemente de O, N y S; donde Ar puede contener de uno a tres sustituyentes que son independientemente seleccionados del grupo que consiste de hidrógeno, halo, hidroxilo, nitro, trifluorometilo, trifluorometoxilo, alquilo C₁-C₆ de cadena recta o ramificada, alqueno C₂-C₆ de cadena recta o ramificada, O-(alquilo C₁-C₄ de cadena recta o ramificada), O-(alqueno C₂-C₄ de cadena recta o ramificada), O-bencilo, O-fenilo, 1,2-metilendioxi, amino, carboxilo y fenilo;

n es de 0 a 4;

D' es alquilo C₁-C₆ de cadena recta o ramificada, alqueno C₁-C₆ de cadena recta o ramificada, cicloalquilo C₃-C₇, cicloalqueno C₃-C₇ sustituido con alquilo C₁-C₄ de cadena recta o ramificada, o alqueno C₁-C₄ de cadena recta o ramificada, [(C₂-C₄)-alquilo o (C₂-C₄)-alqueno]-Ar o Ar; y

x es de 0 a 1.

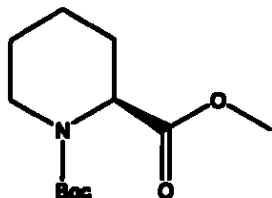
Los siguientes compuestos se prepararon de acuerdo al Esquema general 1 mostrado más arriba:

46

EJEMPLO 1

Síntesis de 1-Fenoxi sulfonil-piperidina-2S-ácido carboxílico 4-fenil-butil éster

Paso No. 1: Síntesis de piperidina-1,2S-ácido dicarboxílico 1-*tert*-éster butílico 2S-metil éster (compuesto 8):



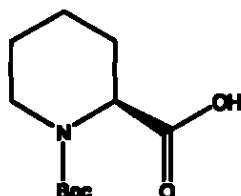
El compuesto 8 se preparó a partir de ácido racémico piperidínico usando los procedimientos publicados. Véase R.F. Nutt et al., J. Med. Chem., 24, págs. 692-698 (1981) y C.E. Davies et al., Synth. Comm., 26 (4), págs. 687-696 (1996). Se incluyen estos datos aquí como referencia.

Los análisis espectrales resultaron consistentes con los productos desecados.

^1H NMR (CDCl_3): δ 4,92 y 4,75 (1H, 2 s para dos rotámeros), 4,0-3,8 (1H, m), 3,74 (3H, s), 3,0-2,7 (1H, m), 2,15 (1H, m), 1,44 (9H, br s).

MS (FAB): 244 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Paso No. 2: Síntesis de piperidina-1,2S-ácido dicarboxílico 1-*tert*-éster butílico (compuesto 9):



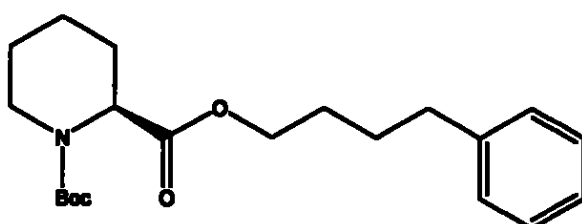
A una solución de metanol (25 mL) del compuesto 8 (28 g, 0,115 mol) se le añadió una solución de 2N hidróxido de sodio (25 mL) a 25°C. Después de

aproximadamente 20 horas, se concentró y acidificó la solución a un pH de aproximadamente 2 por medio de la adición de 10% de ácido clorhídrico (helado). La suspensión se extrajo con EtOAc (acetato de etilo) (3x100 mL). Los estratos orgánicos combinados fueron entonces lavados con una solución saturada de cloruro de sodio (1x150 mL) y se secaron sobre sulfato de sodio. Por evaporación se obtuvo 27 g (cuantitativos) de un sólido de color amarillo claro.

47

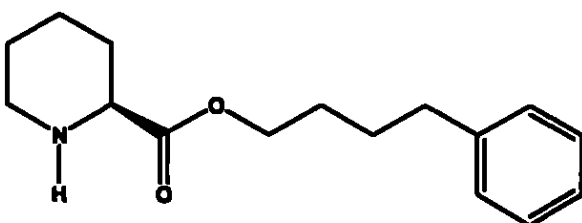
Los análisis espectrales del sólido de color amarillo claro resultaron consistentes con el compuesto 8: ^1H NMR (CDCl_3): δ 4,92 y 4,77 (1H, 2 s para dos rotámeros), 4,1-3,8 (1H, m), 3,1-2,8 (1H, m), 2,3-2,2 (1H, m), 1,41 (9H, br s).

Paso No. 3: Síntesis de piperidina-1,2S-ácido dicarboxílico 1-*terc*-éster butílico 2S-(4-fenil-butilo) éster (compuesto 10):



A una solución CH_2Cl_2 del compuesto 9 y 1-fenil-butan-4-ol se le añadió DCC (4,62 g, 22,4 mmol) y DMAP a aproximadamente 25°C . Después de varias horas, se filtró y se concentró la filtración. El aceite crudo se pasó por un fieltro de gel de sílice (5% EtOAc en hexanos) para rendir el compuesto 10.

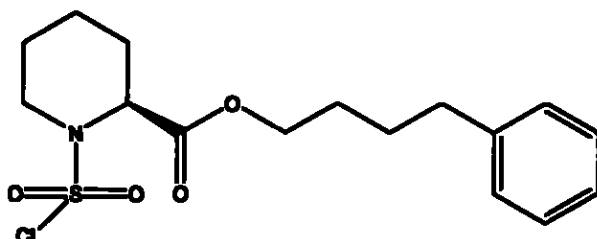
Paso No. 4: Síntesis de piperidina-2S-ácido carboxílico 4-fenil-butilo éster (compuesto 11):



48

A una solución CH_2Cl_2 del compuesto 10 se le añadió lentamente ácido trifluoroacético a aproximadamente 25°C . Después de varias horas, el CH_2Cl_2 y el ácido trifluoroacético se extrajeron *in vacuo* y se redisolvió el residuo en CHCl_3 . La solución resultante se lavó entonces con Na_2CO_3 saturado y se secó con Na_2SO_4 . Por evaporación se obtuvo el compuesto 11.

Paso No. 5: Síntesis de 1-clorosulfonyl-piperidina-2S-ácido carboxílico 4-fenil-butilo éster (compuesto 12):



A una solución CH_2Cl_2 del compuesto 11 se le añadió Et_3N y ClSO_3H lentamente. Se dejó calentar la mezcla hasta aproximadamente 25°C y se le agitó a esa temperatura por varias horas. Luego se concentró la solución *in vacuo* después de lo cual se añadió benceno y se le evaporó para quitar toda traza restante de Et_3N y agua. Se añadió el residuo a benceno y PCl_5 . Se calentó la suspensión a reflujo por aproximadamente 30 minutos, luego se le enfrió hasta 25°C y vertió en una solución helada de hidróxido sódico. La mezcla acuosa se extrajo con EtOAc . Las capas orgánicas se lavaron en una solución saturada de NaHCO_3 , se secaron sobre sulfato sódico y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía de columnas (5% EtOAc en hexanos) produciendo el compuesto 12.

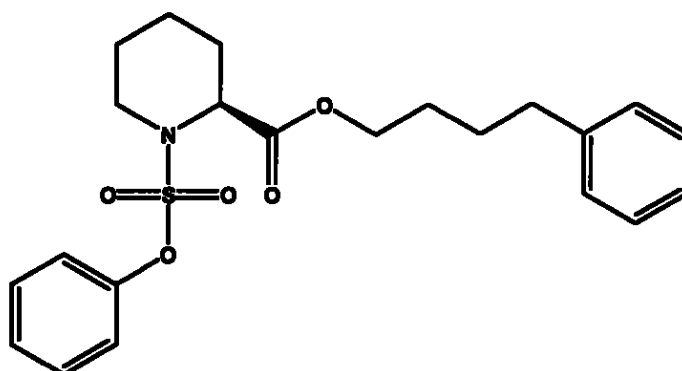
El análisis espectral del producto resultó consistente con el compuesto 12:

49
~~49~~

^1H NMR (CDCl_3): δ 7,3-7,1 (5H, m), 4,74 (1H, m), 4,2-4,1 (2H, m), 3,88 (1H, d, $J=11$ Hz), 2,7-2,5 (2H, m), 2,12 (1H, m), 1,88 (1H, m).

HRMS (FAB): calculado: 360,1036; encontrado 360,1033.

Paso No. 6: Síntesis de 1-fenoxi sulfonil-piperidina-2S-ácido carboxílico 4-fenil-butilo éster (compuesto 13):



A una temperatura de 0°C se añadió NaH (16 mg, 90%, 0,62 mmol) en tres porciones, a una solución de etilenglicol dimetil éter (1 mL) del compuesto 12 (100 mg, 0,28 mmol) y fenol (58 mg, 0,62 mmol). La solución resultante se agitó a aproximadamente 25°C por una hora y se vertió en una solución saturada y helada de NH_4Cl (10 mL). La mezcla acuosa se extrajo con EtOAc (2x20 mL). Luego se secaron las capas orgánicas combinadas sobre sulfato sódico y se concentraron. Se purificó el residuo por cromatografía de columna (CH_2Cl_2) y rindió 11,3 mg (10%) de un aceite incoloro.

El análisis espectral del aceite incoloro resultó consistente con el compuesto 13: ^1H NMR (CDCl_3): δ 7,4-7,1 (10H, m), 4,50 (1H, m), 4,12 (2H, m), 3,68 (1H, dd, $J=11, 1,6$ Hz), 3,39 (1H, td, $J=11, 1,7$ Hz), 2,6-2,5 (2H, m), 2,07 (1H, d, $J=10,8$ Hz). MS (FAB): 418 (M^++H)

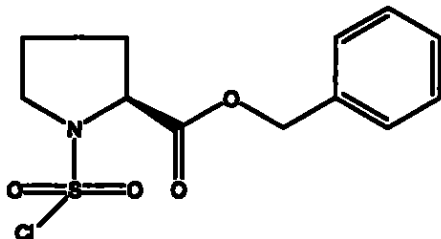
HRMS (FAB): calculado: 440,1508; encontrado 440,1520.

EJEMPLO 2

30

Síntesis de 1-Fenoxi sulfonyl-pirrolidina-2S-ácido carboxílico éster bencilico

Paso No. 1: Síntesis de 1-clorosulfonyl-pirrolidina-2S-ácido carboxílico éster bencilico (compuesto 14):



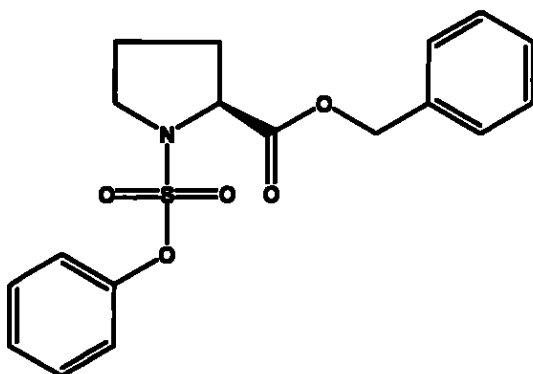
Se preparó el compuesto 14 a partir de pirrolidina-2-ácido carboxílico éster bencilico (disponible comercialmente de BACHEM) en forma análoga al método de síntesis del Ejemplo 1, paso No. 5 expuesto más arriba. Se obtuvo un rendimiento de 87% del compuesto 14.

El análisis espectral del producto resultó consistente con el compuesto 14: ^1H NMR (CDCl_3): δ 7,4-7,1 (5H, m), 5,12 (3H, s), 4,40 (1H, m), 3,67 (1H, m), 3,49 (1H, m).

MS (FAB): 326 ($\text{M}^+ + \text{Na}$), 321 ($\text{M}^+ + \text{NH}_4$).

51
X

Paso No. 2: Síntesis de 1-fenoxi sulfonil-pirrolidina-2S-ácido carboxílico éster bencílico (compuesto 15):



Se preparó el compuesto 15 a partir del compuesto 14 en forma análoga al método de síntesis del Ejemplo 1, paso No. 6 expuesto más arriba. Se obtuvo un rendimiento de 8% del compuesto 15.

El análisis espectral del producto resultó consistente con el compuesto 15:
 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 7,5-7,2 (10H, m), 5,13 (2H, s), 4,46 (1H, m), 3,7-3,5 (2H, m), 2,4-1,9 (4H, m).

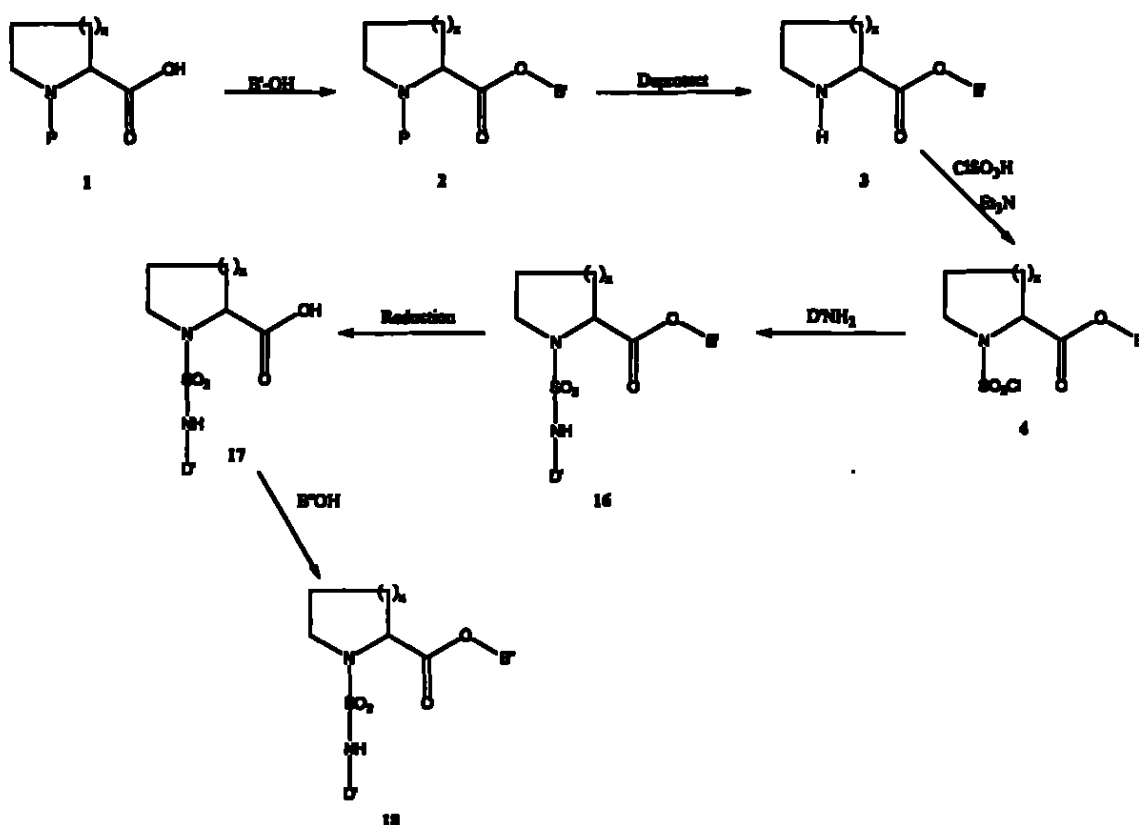
HRMS (FAB): calculado: 362,1062; encontrado: 362,1070.

Los compuestos sulfamilo del presente invento se pueden preparar en la forma expuesta en el Esquema 2 a continuación. Tal como se describe en el Esquema 2, los amino ácidos 1 protegidos por grupos de bloqueo apropiados P del amino ácido nitrógeno se pueden reaccionar con alcoholes $\text{B}'\text{OH}$ para generar ésteres 2. Después de extraer el grupo de bloqueo, la amina libre se puede reaccionar con ácido clorosulfónico para rendir el clorosulfonilo 4. El clorosulfonilo 4 se puede entonces reaccionar con varias aminas $\text{D}'\text{NH}_2$ para rendir un producto final 16. Dependiendo de la estructura del producto final siendo sintetizado, puede ser más eficiente el preparar un compuesto de la fórmula 16, y luego sustituir el grupo B' con un grupo B''. Esto se puede hacer como se muestra en el Esquema 2, donde el producto 16 se

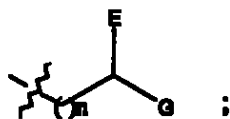
reduce a los alcoholes correspondientes 17 los que entonces se pueden reaccionar con alcoholes B''OH para rendir los productos finales 18.

53

Scheme 2



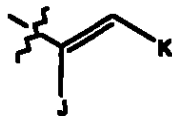
En los compuestos arriba mostrados en el Esquema 2, B' y B'' son independientemente:



donde E y G son independientemente Ar, H, alquilo C₁-C₆ de cadena recta o ramificada, alquenilo C₁-C₆ de cadena recta o ramificada, alquilo o alquenilo C₁-C₆ de cadena recta o ramificada que es sustituido con un cicloalquilo C₃-C₇, alquilo o alquenilo C₁-C₆ de cadena recta o ramificada que es sustituido con un cicloalquenilo C₃-C₇, o Ar sustituido alquilo o alquenilo C₁-C₆ de cadena recta o ramificada donde, en cada caso, uno o dos de los grupos CH₂ de las cadenas alquilo o alquenilo pueden

54


contener 1-2 heteroátomos seleccionados del grupo consistente de oxígeno, azufre, SO y SO₂ en patrones de sustitución químicamente razonables, o



siempre que ambas, B' o B'' y D' no sean H; J es H, alquilo C₁-C₆ de cadena recta o ramificada, o alquenilo C₁-C₆ de cadena recta o ramificada;

K es Ar o un cicloalquilo sustituido de 5-7 miembros con sustituyentes en las posiciones 3 y 4, que son independientemente seleccionados de los grupos que consisten de H, OH, -O-(CH₂)_m-alquilo, -O-(CH₂)_m-alquenilo y carbonilo, donde m es 1-4;

Ar es seleccionado del grupo que consiste de fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, sistemas anulares heterocíclicos monocíclicos y bicíclicos con tamaños individuales 5 ó 6 de anillos que en cualquiera o en ambos anillos pueden tener un total de 1-4 heteroátomos independientemente seleccionados de O, N y S; donde Ar puede contener de uno a tres sustituyentes que son independientemente seleccionados del grupo que consiste de hidrógeno, halo, hidroxilo, nitro, trifluorometilo, trifluorometoxi, alquilo C₁-C₆ de cadena recta o ramificada, alquenilo C₂-C₆ de cadena recta o ramificada, O-(alquilo C₁-C₄ de cadena recta o ramificada), O-(alquenilo C₂-C₄ de cadena recta o ramificada), O-bencilo, O-fenilo, 1,2-metilendioxi, amino, carboxilo y fenilo;

n es de 0 a 4;

D' es alquilo C₁-C₆ de cadena recta o ramificada, alquenilo C₁-C₆ de cadena recta o ramificada, cicloalquilo C₃-C₇, cicloalquenilo C₃-C₇ sustituido con alquilo C₁-C₄ de cadena recta o ramificada o alquenilo C₁-C₄ de cadena recta o ramificada, [(C₂-

C₄)-alquilo o (C₂-C₄)-alqueno)]-Ar o Ar; y

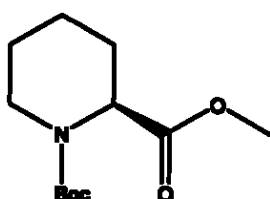
x es de 0 a 1.

Los siguientes compuestos se prepararon de acuerdo con el Esquema 2
mostrado más arriba.

EJEMPLO 3

Síntesis de 1-(3,4,5-Trimetoxi-fenilsulfamilo)-piperidina-2S-ácido carboxílico 4-fenilo-1(3-fenil-propilo)-butil éster

Paso No. 1: Síntesis de piperidina-1,2S-ácido dicarboxílico 1-*tert*-butil éster 2S-metil éster (compuesto 8)



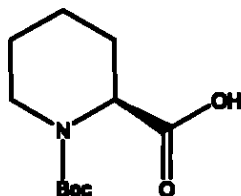
Se preparó el compuesto 8 a partir de ácido piperídico racémico por medio de los procedimientos publicados. Véase R.F. Nutt et al., J. Med. Chem., 24, págs. 692-698 (1981) y C.E. Davies et al., Synth. Comm., 26 (4), págs. 687-696 (1996). Se incluyen aquí estos datos como referencia.

El análisis espectral resultó consistente con el producto deseado:

¹H NMR (CDCl₃): δ 4,92 y 4,75 (1H, 2 s por dos rotámeros), 4,0-3,8 (1H, m), 3,74 (3H, s), 3,0-2,7 (1H, m), 2,15 (1H, m), 1,44 (9H, br s).

MS (FAB): 244 (M⁺+H).

Paso No. 2: Síntesis de piperidina-1,2S-ácido dicarboxílico 1-*tert*-butil éster 2S-metil éster (compuesto 9)

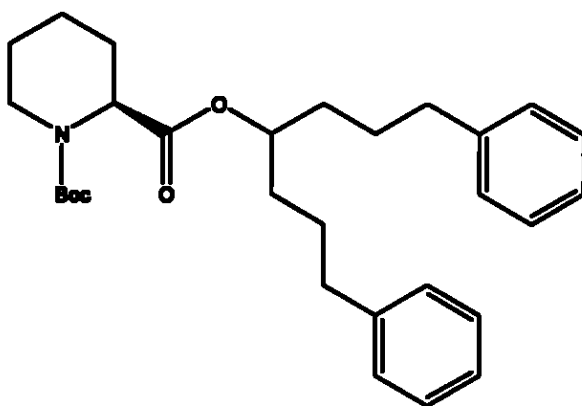


56

A una solución de metanol (25 mL) del compuesto 8 (28 g, 0,115 mol) se le añadió una solución de 2N hidróxido sódico (25 mL) a 25°C. Después de aproximadamente 20 horas se concentró y acidificó la solución a un pH de aproximadamente 2 por medio de la adición de 10% de ácido clorhídrico (helado). Se extrajo la solución con EtOAc (3x100 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de cloruro sódico (1x150 mL) y se secaron sobre sulfato sódico. Por evaporación se obtuvo 27 g (cuantitativamente) de un sólido de color amarillo claro.

El análisis espectral del sólido amarillo claro resultó consistente con el compuesto 8: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 4,92 y 4,77 (1H, 2 s por dos rotámeros), 4,1-3,8 (1H, m), 3,1-2,8 (1H, m), -2,3-2,2 (1H, m), 1,41 (9H, br s).

Paso No. 3: Síntesis de piperidina-1,2S-ácido dicarboxílico 1-*tert*-butil éster 2S-[4-fenilo-1-(3-fenil-propilo)-butilo] éster (compuesto 19):

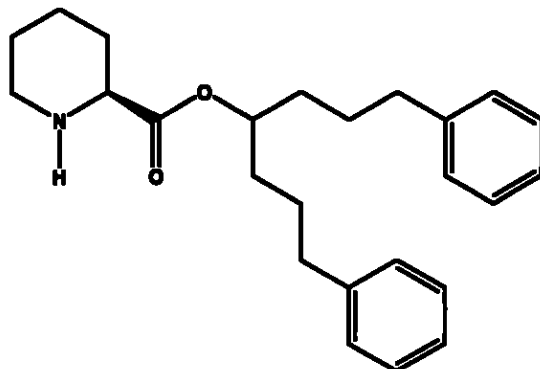


A una solución de CH_2Cl_2 (100 mL) del compuesto 9 (2,22 g, 9,7 mmol) y 1,7-difenil-heptano-4-ol (2 g, 7,5 mmol) se le añadió DCC (4,62 g, 22,4 mmol) y DMAP (0,55 g, 4,5 mmol) a 25°C. Después de aproximadamente 2 ½ horas se filtró la solución y se concentró el filtrado. El aceite crudo se pasó por un fieltro de gel de

57
58

silíce (5% EtOAc en hexanos) para obtener 3,6 g (cuantitativamente) de un aceite incoloro (compuesto 19).

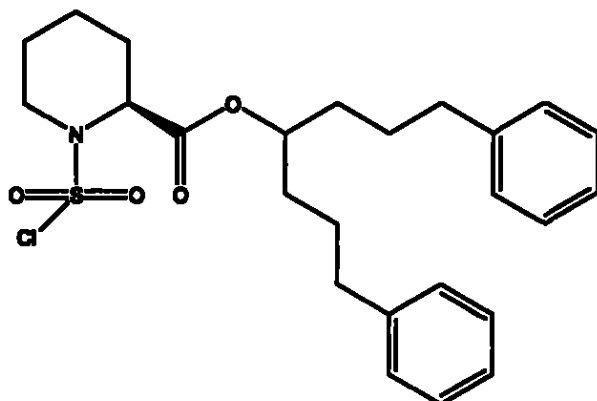
Paso No. 4: Síntesis de piperidina-2S-ácido carboxílico 4-fenilo-1-(3-fenilpropilo)-éster butílico (compuesto 20):



A una solución de CH_2Cl_2 (10 mL) del compuesto 19 se le añadió ácido trifluoroacético (3 mL) lentamente a 25°C . Después de aproximadamente 4 horas, se extrajeron el CH_2Cl_2 y el ácido trifluoroacético in vacuo y se redisolvió el residuo en CHCl_3 (100 mL). La solución resultante se lavó entonces con Na_2CO_3 saturado (2x50 mL) y se secó con Na_2SO_4 . Por evaporación se obtuvo 3 g (95%) de un aceite de color amarillo claro (compuesto 20).

El análisis espectral del aceite amarillo claro resultó consistente con el compuesto 20: ^1H NMR (CDCl_3): δ 7,3-7,0 (10H, 2 m), 4,92 (1H, m), 3,22 (1H, m), 3,00 (1H, m), 12,7-2,4 (5H, m).

Paso No. 5: Síntesis de clorosulfonil piperidina-2S-ácido carboxílico 4-fenilo-1-(3-fenilpropilo)-éster butílico (compuesto 21):

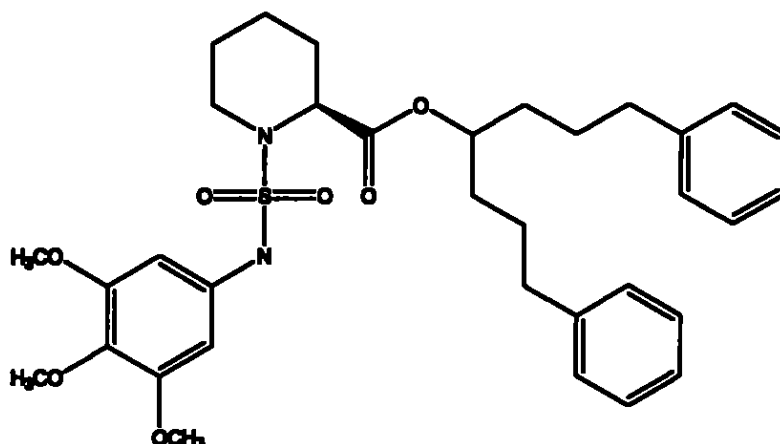


A una solución de CH_2Cl_2 (70 mL) del compuesto 20 (2,75 g, 7,3 mmol) se le añadió Et_3N (2 mL) y ClSO_3H (0,97 g, 8,3 mmol) lentamente. Se dejó calentar la mixtura hasta 25°C y se agitó a esa temperatura por aproximadamente 2 horas. Luego se concentró la solución in vacuo después de lo cual se añadió benceno (2x20 mL) y se evaporó para quitar toda traza de Et_3N y agua. Se añadió el residuo a benceno (20 mL) y PCl_5 (1,97 g, 9,4 mmol). Se calentó la suspensión a reflujo por aproximadamente 30 minutos y luego se le enfrió hasta 25°C y vertió en una solución helada de hidróxido sódico (50 mL). Se extrajo la mezcla acuosa con EtOAc (2x75 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de NaHCO_3 (1x100 mL), se secaron sobre sulfato sódico y se concentraron. Se purificó el residuo por cromatografía de columnas (5% EtOAc en hexanos) lo que rindió 2,2 g (63%) de un aceite color amarillo.

El análisis espectral del aceite amarillo resultó consistente con el compuesto 21: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 7,4-7,1 (10H, m), 5,05 (1H, m), 4,8 (1H, m), 3,98 (1H, m), 3,7-3,5 (1H, m), 2,7-2,5 (4H, m), 2,18 (1H, m), 1,95 (1H, m).

59
X

Paso No. 6: Síntesis de 1-(3,4,5-trimetoxi-fenilsulfamoilo)-piperidina-2S-ácido carboxílico 4-fenilo-1-(3-fenil-propilo)-butil éster (compuesto 22):



A una solución de piridina (1,5 mL) de 3,4,5-trimetoxianalina (115 mg, 0,53 mmol) se le añadió el compuesto 21 (100 mg, 0,21 mmol) en CH_2Cl_2 (1 mL) a aproximadamente 25°C. Después de aproximadamente 6 horas se lavó la suspensión con una solución helada al 5% de HCl (1x50 mL) y una solución saturada de sulfato de cobre (2x50 mL). Después de extraer el solvente, se purificó el residuo por cromatografía de columnas (3,5% CH_3OH en CH_2Cl_2) para rendir 35 mg (27%) de un aceite de color amarillo claro.

El análisis espectral del aceite resultó consistente con el compuesto 22:

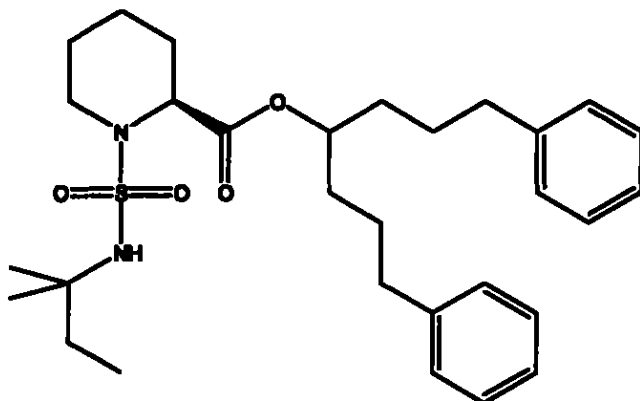
^1H NMR (CDCl_3): δ 7,3-7,1 (1H, m), 6,48 (2H, m), 5,07 (1H, m), 4,76 (1H, m), 3,83 (6H, s), 3,81 (3H, s), 3,69 (1H, d, $J=11,2$ Hz), 3,10 (1H, td, $J=11, 1,9$ Hz), 2,61 (4H, m), 2,23 (1H, d, $J=10,9$ Hz).

HRMS (FAB): calculado: 625,2947; encontrado 625,2962.

60
75

EJEMPLO 4

Síntesis de 1-(1,1-Dimetil-propilsulfamoilo)-piperidina-2S-ácido carboxílico 4-fenilo-1-(3-fenil-propilo)-butil éster (compuesto 23):



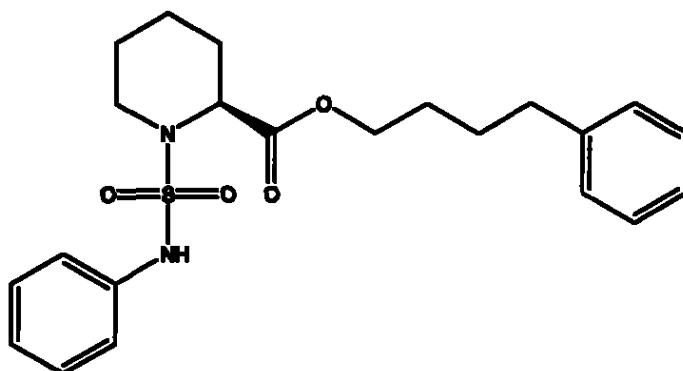
El compuesto 23 se preparó a partir del compuesto 21 por un método de síntesis análogo al del Ejemplo 3, Paso No. 6. Se obtuvo rendimiento de 9%.

El análisis espectral del aceite resultó consistente con el compuesto 23:

^1H NMR (CDCl_3): δ 7,3-7,1 (10H, m), 5,02 (1H, m), 4,98 (1H, s), 4,71 (1H, d, $J=1,8$ Hz), 3,65 (1H, d, $J=11,0$ Hz), 3,02 (1H, td, $J=11, 1,7$ Hz), 2,60 (4H, m), 2,20 (1H, d, $J=11,9$ Hz), 1,29 (6H, s), 0,86 (3H, t, $J=6,4$ Hz).

HRMS (FAB): calculado: 529,3100; encontrado 529,3113.

61/60

EJEMPLO 5**Síntesis de fenilgulfamoilo-piperidina-2S-ácido carboxílico 4-fenil-butil éster****(compuesto 24):**

El compuesto 24 se preparó a partir del compuesto 12 por un método de síntesis análogo al del Ejemplo 3, Paso No. 6. Se obtuvo rendimiento de 33%.

El análisis espectral del producto resultó consistente con el compuesto 24:

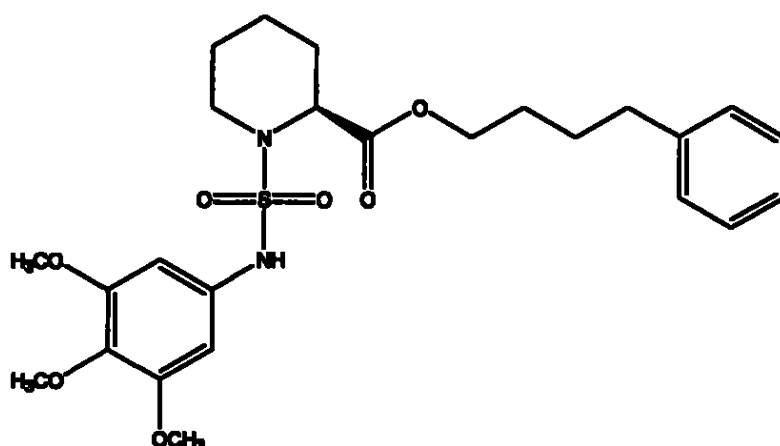
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 7,3-7,0 (11H, m), 4,69 (1H, m), 4,2-4,1 (2H, m), 3,58 (1H, d, $J=10,6$ Hz), 3,01 (1H, td, $J=10,6$, 1,7 Hz), 2,6-2,5 (2H, m), 2,18 (1H, d, $J=11,7$ Hz).

HRMS (FAB): calculado: 417,1848; encontrado 417,1838.

62
81

EJEMPLO 6

Síntesis de 1-(3,4,5-Trimetoxi-fenilsulfamilo-piperidina-2S-ácido carboxílico 4-fenil-butil éster (compuesto 25):



El compuesto 25 se preparó a partir del compuesto 12 por un método de síntesis análogo al del Ejemplo 3, Paso No. 6. Se obtuvo rendimiento de 13%.

El análisis espectral del producto resultó consistente con el compuesto 25:

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 7,3-7,1 (6H, m), 6,42 (2H, s), 4,69 (1H, m), 4,2-4,1 (1H, m), 3,78 (6H, s), 3,76 (3H, s), 3,63 (1H, d, $J=10,8$ Hz), 3,02 (1H, td, $J=10,8$, 1,8 Hz), 2,6 (2H, m), 2,19 (1H, d, $J=11,9$ Hz).

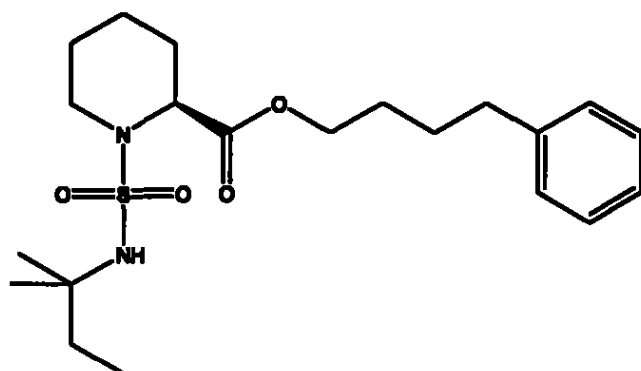
MS (FAB): 506 (M^+).

HRMS (FAB): calculado: 639,1141; encontrado 639,1124.

63
62

EJEMPLO 7

Síntesis de 1-(1,1-Dimetil-propilsulfamoilo)-piperidina-2S-ácido carboxílico 4-fenil-butil éster (compuesto 26):



El compuesto 26 se preparó a partir del compuesto 12 por un método de síntesis análogo al del Ejemplo 3, Paso No. 6. Se obtuvo rendimiento de 38%.

El análisis espectral del producto resultó consistente con el compuesto 26:

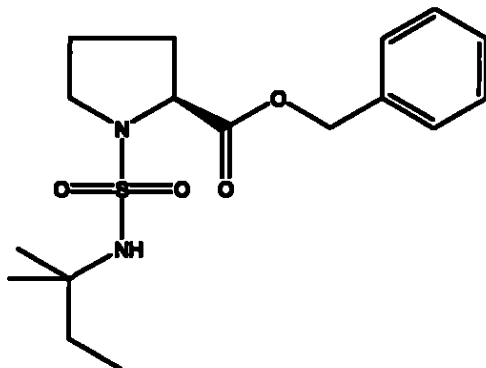
¹H NMR (CDCl₃): δ 7,3-7,1 (5H, m), 4,9 (1H, s), 4,63 (1H, d, J=2,3 Hz), 4,2-4,0 (1H, m), 3,58 (1H, d, J=10,7 Hz), 2,92 (1H, td, J=10,7, 1,8 Hz), 2,6-2,5 (2H, m), 2,14 (1H, d, J=11,8 Hz), 1,22 (6H, s), 0,82 (3H, t, J=6,6 Hz).

HRMS (FAB): calculado: 411,2318; encontrado 411,2308.

64
625

EJEMPLO 8

Síntesis de 1-(1,1-Dimetil-propilsulfamoilo)-pirrolidina-2S-ácido carboxílico éster
benílico (compuesto 27):



El compuesto 27 se preparó a partir del compuesto 14 por un método de síntesis análogo al del Ejemplo 3, Paso No. 6. Se obtuvo rendimiento de 42%.

El análisis espectral del producto resultó consistente con el compuesto 27:

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 7,4-7,2 (5H, m), 5,09 (2H, AB), 4,45 (1H, br s), 4,40 (1H, m), 3,40 (1H, m), 2,20 (1H, m), 1,23 (6H, s), 0,83 (3H, t, $J=6,7$ Hz).

MS (FAB): 355 (M^++H).

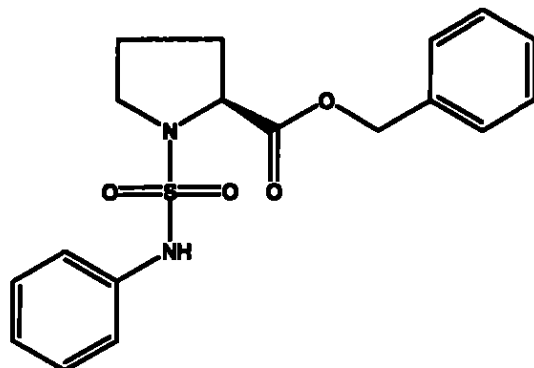
Análisis calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$: C 57,60 H 7,39 N 7,90 S 9,05; encontrado: C 57,75 H 7,56 N 7,83 S 9,14

65
6A

EJEMPLO 9

Síntesis de 1-Fenilsulfamilo-pirrolidina-2S-ácido carboxílico éster bencílico

(compuesto 28):



El compuesto 28 se preparó a partir del compuesto 14 por un método de síntesis análogo al del Ejemplo 3, Paso No. 6. Se obtuvo rendimiento de 59%.

El análisis espectral del producto resultó consistente con el compuesto 28:

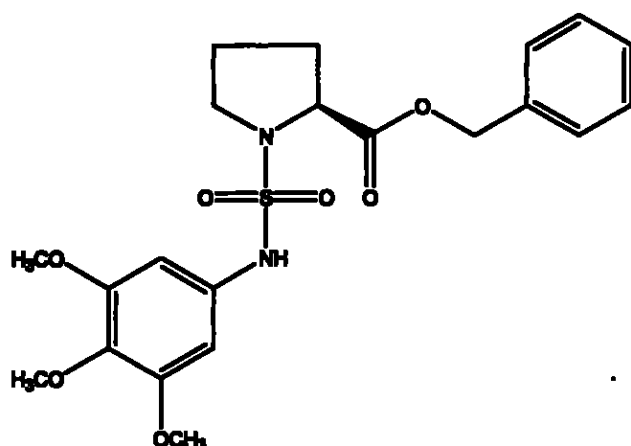
^1H NMR (CDCl_3): δ 7,6-7,0 (5H, m), 6,78 (1H, br s), 5,02 (2H, s), 4,50 (1H, dd, $J=7,6, 3,4$ Hz), 3,5-3,1 (2H, m), 2,4-1,8 (4H, m).

HRMS (FAB): calculado: 361,1222; encontrado: 361,1226.

66
16

EJEMPLO 10

Síntesis de 1-(3,4,5-Trimetoxi-fenilsulfamilo)-pirrolidina-2S-ácido carboxílico éster benílico (compuesto 29):



El compuesto 29 se preparó a partir del compuesto 14 por un método de síntesis análogo al del Ejemplo 3, Paso No. 6. Se obtuvo rendimiento de 29%.

El análisis espectral del producto resultó consistente con el compuesto 29:

^1H NMR (CDCl_3): δ 7,5-7,3 (5H, m), 6,76 (1H, br s), 6,45 (2H, s), 5,03 (2H, AB), 4,46 (1H, dd, $J=7,4, 3,2$ Hz), 3,77 (6H, s), 3,75 (3H, s), 3,5-3,2 (2H, m), 2,2-1,8 (4H, m).

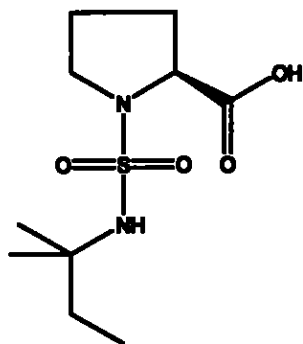
HRMS (FAB): calculado: 451,1539; encontrado: 451,1522.

67
66

EJEMPLO 11

Síntesis de 1-(1,1-Dimetil-propilsulfamoilo)-pirrolidina-2S-ácido carboxílico 3-piridina-3-yl-propil éster

Paso No. 1: Síntesis de 1-(1,1-Dimetil-propilsulfamoilo)-pirrolidina-2S-ácido carboxílico (compuesto 30):

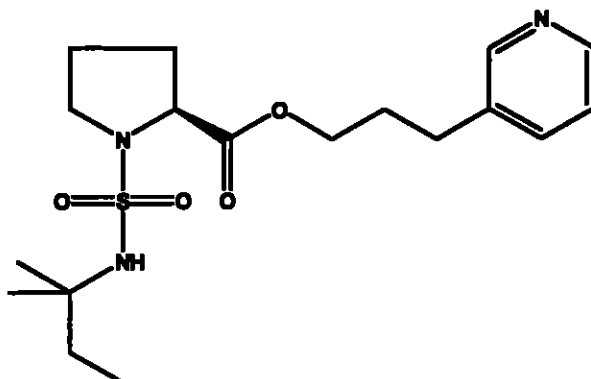


A una solución de metanol (1 mL) del compuesto 27 (32 mg, 0,09 mmol) se le añadió paladio sobre carbón (3 mg) a aproximadamente 25°C. Se mantuvo la suspensión en atmósfera de hidrógeno (1 atmósfera) por aproximadamente 1 ½ horas y se filtró por un fieltro de celita. El filtrado se concentró para rendir 24 mg (cuantitativos) de un aceite incoloro.

El análisis espectral resultó consistente con el compuesto 30:

¹H NMR (CDCl₃): δ 8,3 (1H, br s), 4,4 (1H, br s), 4,37 (1H, dd, J=7,6, 3,2 Hz), 3,41 (1H, t, J=6,2 Hz), 2,3-1,8 (4H, m), 1,60 (2H, m), 1,22 (6H, s), 0,83 (3H, t, J=6,3 Hz).

Paso No. 2: Síntesis de 1-(1,1-Dimetil-propilsulfamoilo)-pirrolidina-2S-ácido carboxílico 3-piridina-3-yl-propil éster (compuesto 31):



A una solución CH_2Cl_2 (1 mL) del compuesto 30 (24 mg, 0,09 mmol) y 3-piridina-3-yl-propan-1-ol se le añadió EDC (22,5 mg, 0,12 mmol) y HOBt (16 mg, 0,12 mmol) a aproximadamente 25°C . Después de aproximadamente 20 horas, la mezcla se diluyó con EtOAc (50 mL), se lavó con una solución saturada de NH_4Cl (2x50 mL), se secó sobre sulfato sódico y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía de columnas (50% EtOAc en hexanos) lo que rindió 29 mg (85%) de un aceite color amarillo claro.

El análisis espectral del aceite incoloro resultó consistente con el producto 31:
 ^1H NMR (CDCl_3): δ 8,43 (2H, br s), 7,53 (1H, m), 7,1 (1H, m), 4,48 (1H, br s), 4,32 (1H, dd, $J=7,7, 3,3$ Hz), 4,2-4,0 (2H, m), 3,40 (2H, t, $J=6,1$ Hz), 2,62 (2H, m), 2,3-2,1 (1H, m), 1,55 (2H, m), 1,23 (6H, s), 0,83 (3H, t, $J=6,4$ Hz).

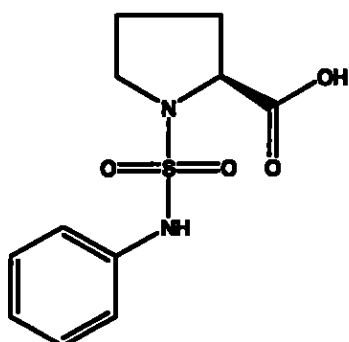
HRMS (FAB): calculado: 384,1957; encontrado: 384,1963.

69

EJEMPLO 12

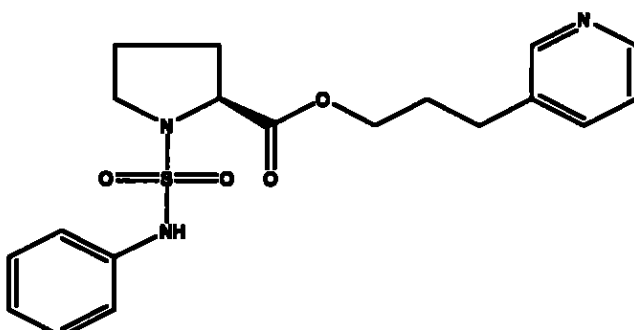
Síntesis de 1-Fenilsulfamoilo-pirrolidina-2S-ácido carboxílico 3-piridina-3-yl-propil éster

Paso No. 1: Síntesis de 1-Fenilsulfamoilo-pirrolidina-2S-ácido carboxílico
(compuesto 32):



Se sintetizó el compuesto 32 a partir del compuesto 28 por un método de síntesis análogo al expuesto en el Ejemplo 11, Paso 1. Se obtuvo rendimiento de 81%.

Paso No. 2: Síntesis de 1-Fenilsulfamoilo-pirrolidina-2S-ácido carboxílico 3-piridina-3-yl-propil éster (compuesto 33):



70
~~68~~

Se preparó el compuesto 33 a partir del compuesto 32 por un método de síntesis análogo al del Ejemplo 11, Paso 2. Se obtuvo rendimiento de 30%.

El análisis espectral resultó consistente con el compuesto 33:

^1H NMR (CDCl_3): δ 8,48 (2H, br s), 7,82 (1H, br s), 7,52 (1H, m), 7,3-7,0 (6H, m), 4,40 (1H, dd, $J=7,8, 3,5$ Hz), 4,2-4,0 (2H, m), 3,43 (2H, t, $J=6.2$ Hz), 2,71 (2H, m), 2,3-2,1 (1H, m).

HRMS (FAB): calculado: 390,1488; encontrado: 390,1476.

Se pueden emplear una variedad de ensayos y técnicas para determinar la actividad de los compuestos de esta invención. La actividad de un compuesto de la invención para estimular crecimiento de neuritas está relacionada directamente con su afinidad de aglutinamiento con FKBP12 y su habilidad para inhibir la actividad rotamásica de FKBP12. Para cuantificar estas últimas propiedades, se pueden emplear pruebas conocidas por los especialistas para medir los enlaces de ligando y la actividad enzimática. A continuación se describen ensayos para la estimulación de neuritas.

Por ejemplo, se pueden probar los compuestos para determinar su actividad neurotrófica utilizando el método descrito por Lyons et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:3191-3195 (1994). En esta prueba de crecimiento de neuritas en ratas feocromocitomas, las células de ratas feocromocitomas PC12 se mantienen a 37°C y 5% CO_2 en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 10% de suero de caballo inactivado térmicamente y 5% de suero fetal de bovino inactivado térmicamente. Luego se recubren las células a 10^5 por 35 mm en fosa de cultivo con colágeno de colas de rata a 5 mg/cm^2 , y se deja que se enlacen. El medio se reemplaza entonces con DMEM suplementado con 2% de suero de caballo, 1% de suero fetal de

71
~~70~~

bovino, factor de crecimiento nervioso (NGF), o variadas concentraciones de compuestos a probarse. A los cultivos de control se les administra NGF sin ninguno de los compuestos en ensayo.

Ejemplo de otro método para medir la potencia para estimular crecimiento de neuritas es el ensayo por ganglio de raíz dorsal de ratas. En este ensayo se disectan ganglios de raíz dorsal de embríos de ratas Sprague-Dawley de 16 días de edad. Los ganglios sensores se cultivan en platos Falcon de 35 mm recubiertos de colágeno con medio N-2 (DMEM/Ham's F₁₂, 1:1) a 37°C en ambiente de 15% CO₂. Se suplementa el medio con selenio, progesterona, insulina, putrescina, glucosa, penicilina y estreptomycin. Los ganglios se tratan luego con varias concentraciones de NGF (0-100 ng/ml) y el compuesto en ensayo. Los ganglios se examinan cada dos o tres días bajo un microscopio de contraste de fase, y se mide la longitud de las axonas. Véase Lyons et al., *PNAS*, 91:3191-3195 (1994).

Se pueden usar otros ensayos apropiados para medir la actividad de los compuestos de esta invención. Por ejemplo, la actividad inmunosupresora se puede estimar midiendo la actividad de inhibición de fosfatasa calcineurina por combinación de compuestos del invento aglutinados a FKBP (Babine et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 6, 385-390, 1996). La actividad de fosfatasa fosfopéptida de la calcineurina se prueba a 30°C utilizando un ensayo espectrofotométrico de acoplamiento continuo (Etzkorn et al., *Biochemistry*, 32, 2380, 1994) y el sustrato péptido 19-mer fosforilado derivado de la sub-unidad (R_{II}) dependiente de la proteinquinasa cAMP. La mezcla del ensayo contiene 50 mM MOPS (pH 7,5), 0,1 M NaCl, 6 mM MgCl₂, 0,5 mg/ml de albúmina de suero bovino, 0,5 mM ditiotretitol, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂, 20 µM péptido R_{II} fosforilado, 20 nM de calcineurina humana recombinante, 40 nM calmodulin, 10 µg/mL purina ribonucleósida fosforilasa, y 200 µM

72
7/8

metiltioguanosina como la describe Etzkorn et al., además de 1% dimetilsulfóxido (DMSO) como cosolvente y 100 μM FKBP. Los compuestos se prueban para su inhibición de calcineurina dependiente de FKBP a su solubilidad máxima. Bajo estas condiciones, la constante aparente de inhibición de calcineurina humana recombinante por FKBP-FK506 es de 43 nM.

La aglutinación de compuestos a FKBP se puede medir directamente por medio de calorimetría. La titrimetría calorimétrica se puede hacer usando el instrumento MCS-ITC (MicroCal, Inc., Northampton, MA). Las mediciones se pueden hacer como sigue. Se desgasifica la proteína dializada por 15 minutos utilizando el equipo MicroCal. Se añade una solución estándar al cosolvente (típicamente DMSO) y, luego de una corta exposición a ultrasonido, el dializado desgasificado produce las soluciones inhibidoras finales a usarse en la titrimetría. El rango de concentración de las soluciones inhibidoras finales es de 10 a 80 μM . La proteína dializada se añade al cosolvente y al dializado desgasificado para producir soluciones de FKBP12 en rangos de concentración de 200 a 1600 μM . Debido a que ambas soluciones se prepararon utilizando dializados desgasificados, no se ejecuta adicional desgasificación. Se añade cosolvente a las soluciones de proteína para mantener una concentración constante durante el curso de la titrimetría. La proteína se dosifica a un inhibidor utilizando una jeringa de inyección de 125- μL . La titrimetría se efectúa con el ligando en la célula debido a la baja solubilidad de los inhibidores. Típicamente, una inyección preliminar de 2- μL es seguida por quince inyecciones de 8- μL aplicadas a diversos intervalos entre las inyecciones. Se hace un control completo de controles de dilución por cada titrimetría. Se añade un volumen apropiado de cosolvente al dializado desgasificado para producir la solución de cosolvente amortiguado utilizado para obtener impurezas de dilución de los reactivos.

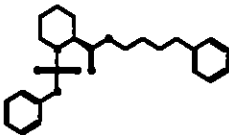
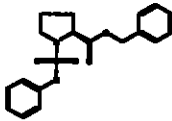
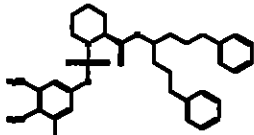
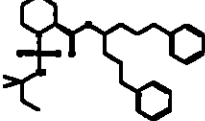
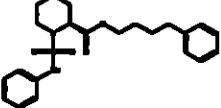
73
X

Después de corregir las impurezas de la dilución y la eliminación de la inyección preliminar, se ajustan los resultados de las titulaciones utilizando el modelo "*One Set of Sites Model*" del paquete de software ORIGIN proporcionado con el instrumento.

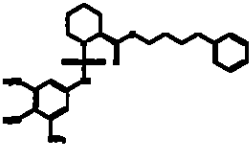
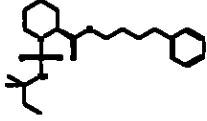
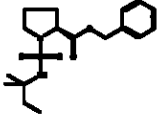
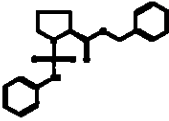
Se ha encontrado que la aglutinación a FKBP medida directamente por microcalorimetría tiene alta correlación con la potencia de inhibición de la reacción de rotamasa, lo cual se prueba fácilmente por métodos conocidos a los especialistas (véase, por ej., Fischer et al., *Biochim. Biophys. Acta* 791, 87 (1984); Fischer et al., *Biomed. Biochim. Acta* 43, 1101 (1984); Fischer et al., *Nature* 337, 476-478 (1989); Siekierka et al., *Nature*, 341, 755-57 (1989); U.S. Patent No. 5,696,135; y Harding et al., *Nature*, 341, 758-60 (1989)).

En el ensayo de inhibición de rotamasa, la isomerización de un sustrato N-succinilo-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida es observada espectrofotométricamente. El ensayo incluye la forma *cis* del sustrato, FKBP12, el compuesto que se está probando, y quimiotripsina. La quimiotripsina es capaz de exfoliar la p-nitroanilida de la forma *trans* del sustrato, pero no de la forma *cis*. La liberación de la p-nitroanilida se mide espectrofotométricamente. Usando este ensayo, se añadieron diversas cantidades de compuestos inhibidores de rotamasa FKBP de la fórmula (I) a *cis*-N-succinilo-alanina-alanina-prolina-fenilalanina-para-nitroanilina (BACHEM, 3132 Kashiwa Street, Torrance, CA 90505) en presencia de FKBP12 y quimiotripsina. Las mediciones de concentración de p-nitroanilina permitieron estimar los valores aparentes K_i que aparecen en el cuadro No. 1 a continuación.

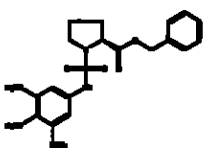
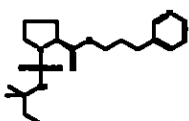
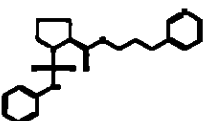
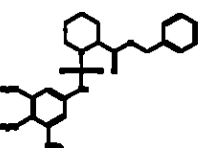
74
X

Cuadro No. 1				
Número del compuesto	Estructura molecular	Actividad	K_d (μM)	Rotamasa $K_{(app)}$ (μM)
13		-	-	-
15		-	-	-
22		-	-	0,382
23		-	-	6,99
24		-	-	1,16

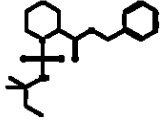
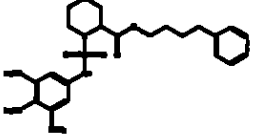
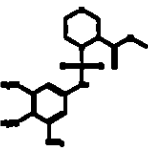
75
24

Cuadro No. 1				
Número del compuesto	Estructura molecular	Actividad ?	? K_d (μ M)	Rotamasa $K_{(app)}$ (μ M)
25		N.O. activo 0,001-1 μ M	1,2	0,2
26		-	-	0,193
27		-	-	-
28		-	-	-

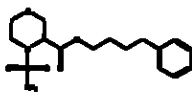
76
A

Cuadro No. 1				
Número del compuesto	Estructura molecular	Actividad ?	? K _d (μM)	Rotamasa K _{d(app)} (μM)
29		-	-	-
31		N.O. débil 0,001-1 μM	4,5	2,79
33		N.O. active 0.001-1 μM	14	-
34		-	-	-

77
~~76~~

Cuadro No. 1				
Número del compuesto	Estructura molecular	Actividad ?	? K_d (μ M)	Rotamasa $K_{(app)}$ (μ M)
35		-	-	-
36		-	-	-
37		-	-	-

78


Cuadro No. 1				
Número del compuesto	Estructura molecular	Actividad	?	Rotamasa
		?	K _d (μM)	K _{d(ape)} (μM)
38		-	-	-

Los agentes inhibidores de FKBP de la invención, tales como los ejemplos mostrados más arriba, se pueden usar para preparar las composiciones farmacéuticas que se describen a continuación.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención incluyen un compuesto eficaz de la fórmula (I) para el estímulo de crecimiento de neuritas, y un portador o diluyente inerte y farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden, además, incluir un factor neurotrófico. Estas composiciones se preparan en forma de dosis únicas apropiadas para su administración por varias vías.

En una realización, se proporcionan niveles eficaces de compuestos inhibidores de rotamasa no péptidos para así proporcionar beneficios respecto a la regulación de FKBP. Por “niveles eficaces” de compuestos se quiere decir niveles a los cuales la aglutinación de FKBP de FKBP12 es, por lo menos, controlada. Los compuestos pueden ser administrados en forma de prodroga que, en general, es diseñada para aumentar la absorción y es exfoliada *in vivo* para formar el componente

79

activo. También se pueden lograr niveles eficaces por medio de la administración de metabolitos farmacéuticamente activos (productos de conversiones metabólicas) del compuesto.

Un compuesto de la fórmula (I) se administra en forma de una dosis apropiada preparada combinando una cantidad terapéuticamente eficaz (o sea, un nivel eficaz suficiente para lograr el deseado efecto terapéutico de regulación de FKBP) de un compuesto de la fórmula (I) (como ingrediente activo) con portadores o diluyentes estándar farmacéuticamente de acuerdo con procedimientos convencionales. Estos procedimientos pueden incluir mezcla, granulación, y compresión o disolución de los ingredientes como sea apropiado para obtener la preparación deseada.

El portador farmacéutico usado puede ser en cualquier forma apropiada, por ejemplo, ya sea un sólido o un líquido. Ejemplos de portadores sólidos incluyen lactosa, terra alba, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábica, estearato de magnesio, ácido esteárico y similares. Ejemplos de portadores líquidos incluyen jarabe, aceite de maní, aceite de oliva, agua y similares. Igualmente, el portador o diluyente puede incluir materiales de liberación retardada conocidos por los especialistas, como gliceril monostearato o gliceril distearato, solo o con una cera, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilmetacrilato o similares.

Se pueden emplear una variedad de formas farmacéuticas. Por ejemplo, si se utiliza un portador sólido, la preparación puede ser en tabletas, dentro de una cápsula de gelatina dura en forma de polvo o pellets, o en forma de píldora o pastilla romboidal. La cantidad de portador sólido puede variar, pero preferiblemente será de aproximadamente 25 mg a 1 g. Si se utiliza un portador líquido, la preparación será preferiblemente en forma de jarabe, emulsión, cápsula de gelatina blanda, solución

80 

estéril inyectable o suspensión en una ampollita o frasco, o una suspensión en líquido no acuoso.

Para obtener una forma estable de dosis soluble en agua, se puede disolver una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de la fórmula (I) en una solución acuosa de un ácido orgánico o inorgánico, como una solución al 0,3 M de ácido succínico o, más preferiblemente, ácido cítrico. Si no hay disponible una forma de sal soluble, el compuesto de la fórmula (I) se puede disolver en un cosolvente o combinación de cosolventes apropiados. Ejemplos de cosolventes apropiados incluyen alcohol, propilenglicol, polietilenglicol 300, polisorbato 80, glicerina y similares, en concentraciones de 0 a 60% del volumen total. En una realización preferente, el compuesto activo de la fórmula (I) se disuelve en DMSO y se diluye con agua. La composición también puede ser en forma de una solución de una sal del ingrediente activo en un vehículo acuoso apropiado, tal como agua o una solución salina o dextrosa.

Se podrá apreciar que las dosis realmente preferidas de los compuestos de la fórmula (I) utilizados en las composiciones de esta invención pueden variar de acuerdo con la combinación específica que se use, la composición específica que se formule, la forma de administración y el sitio específico y el organismo receptor y la enfermedad en tratamiento. Las dosis óptimas para un cierto conjunto de condiciones las pueden determinar los expertos en la materia utilizando pruebas convencionales de determinación de dosis, por ej., conociendo los datos experimentales aquí presentados. Para la administración oral, la dosis diaria generalmente utilizada es de aproximadamente de 0,001 a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal, con tratamientos repetidos a intervalos apropiados. La farmacocinética inicial para seres

humanos se puede determinar por el modelo de ratas descrito por Gold et al., *Experimental Neurology*, 147:269-278 (1997).

Las composiciones farmacéuticas que contienen compuestos activos de esta invención se pueden manufacturar en las formas generalmente conocidas, por ej., por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, pulverización, emulsificación, encapsulación, envoltura o liofilización. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular en forma convencional utilizando uno o más portadores aceptables fisiológicamente que contienen excipientes o auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos para hacer preparaciones que se puedan usar farmacéuticamente. Naturalmente, la formulación apropiada depende de la vía de administración seleccionada.

Para la administración oral, se pueden formular los compuestos fácilmente combinando los compuestos activos con portadores farmacéuticamente aceptables conocidos a los entendidos en la materia. Estos portadores permiten que los compuestos de la invención se formulen como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, gelatinas, jarabes, semilíquidos, suspensiones y similares, para ingestión oral por el paciente en tratamiento. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener combinando un compuesto activo con un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos después de añadir auxiliares apropiados, si se desea, para obtener tabletas o núcleos de grageas. Los excipientes apropiados incluyen, por ej., aditivos como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; y preparados celulósicos como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de papas, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa sódica, o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se puede añadir agentes

82
JX

desintegrantes, tales como polivinilpirrolidona de encadenamiento cruzado, agar, o ácido algínico o su sal, como alginato sódico.

Se proporcionan núcleos de grageas con recubrimientos apropiados. Para este fin se pueden usar soluciones concentradas de azúcar, que opcionalmente pueden contener goma arábiga, polivinilpirrolidona, gel de Carbopol, polietilenglicol, o dióxido de titanio, soluciones de goma laca, y solventes orgánicos o mezcla de solventes apropiados. Se puede añadir sustancias colorantes o pigmentos a las tabletas o recubrimiento de grageas para su identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

Las formas de preparación farmacéutica que se pueden usar para la vía oral incluyen cápsulas tipo *push-fit* hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plasticizador como glicerol o sorbitol. Las cápsulas *push-fit* contienen los ingredientes activos en mixtura, con aditivos como lactosa, agentes ligantes como almidones, o lubricantes como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los ingredientes activos se pueden disolver o suspender en líquidos apropiados tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizadores. Todas las formulaciones para administración por vía oral deben de ser en dosis apropiadas para dicha administración. Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de tabletas o lozenges formulados en la forma convencional.

Un ejemplo para la preparación de una composición farmacéutica de esta invención sigue a continuación: se mezcla 100 mg de un compuesto de la fórmula (I) con 750 mg de lactosa, y la mixtura se incorpora en forma de una dosis única, tal como en una cápsula de gelatina dura, que es apropiada para la administración oral.

Para administración por inhalación los compuestos, de acuerdo con esta invención, se presentan en la forma conveniente de un rocío aerosol en recipientes presurizados o un nebulizador, usando un propelente, por ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas apropiado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosis se puede determinar proporcionando una válvula dosificadora que proporciona la medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo gelatina, para usar en un inhalador o insuflador se pueden formular conteniendo una mixtura en polvo del compuesto y una base de polvo apropiado como de lactosa o almidón.

Los compuestos se pueden formular para administración por vía parenteral por inyección, por ej., inyecciones intravasculares o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosis única, por ej., en ampollitas, o en recipientes para dosis múltiples, añadiendo un preservante. Las composiciones pueden tomar la forma de suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos líquidos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación como agentes de suspensión, estabilizantes o dispersantes.

Para inyección, los agentes de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en soluciones tamponadas fisiológicamente compatibles, como la solución de Hanks, la solución de Ringer, o un amortiguador fisiológico salino. Para administración por tejidos mucosos, en la formulación se usan penetrantes apropiados a la barrera a permearse, los que pueden ser seleccionados por los entendidos en la materia.

Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos solubles en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar como suspensiones

84
23

aceitosas para inyectarse. Los solventes lipofílicos o vehículos apropiados para preparar tales formulaciones incluyen aceites grasos como el aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos como el oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, las suspensiones también pueden contener estabilizantes apropiados o agentes que aumenten la solubilidad de los componentes, para permitir la preparación de soluciones de alta concentración.

Se puede preparar una composición farmacéutica de esta invención, apropiada para administración por inyección, en la siguiente forma: se mezclan 100 mg de un compuesto de la fórmula (I) con 10 ml de un solvente lipofílico tal como un aceite graso, y la mezcla se incorpora en una dosis única apropiada para la inyección, como una emulsión.

Alternativamente, el ingrediente activo puede ser en forma de polvo para constituirse en un vehículo apropiado, por ej., agua libre de pirógenos, antes de usarse. Los compuestos también se pueden formular como composiciones rectales como supositorios o enemas de retención, por ej., que contienen bases de supositorios convencionales como la mantequilla de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos también se pueden formular como preparaciones de efecto retardado. Estas formulaciones de efecto a largo plazo se pueden administrar por implantación (por ejemplo, subcutánea o intramuscularmente), o por inyección intramuscular. Por ejemplo, los compuestos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrofóbicos apropiados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o como resinas de intercambio iónico, o

85
28

como derivados de solubilidad limitada, por ejemplo, como una sal de solubilidad limitada.

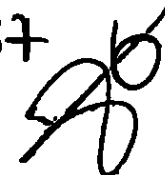
Un portador farmacéuticamente apropiado para compuestos hidrofóbicos de la invención es un sistema de cosolventes que incluye alcohol bencílico, un surfactante no polarizado, un polímero orgánico miscible en agua, y una fase acuosa. El sistema cosolvente puede ser el sistema cosolvente VPD (VPD es una solución de 3% w/v alcohol bencílico, 8% w/v del polisorbato surfactante no polarizado 80, y 65% w/v polietilenglicol 300, elevado a volumen en etanol absoluto). El sistema cosolvente VPD (VPD:5W) consiste de VPD diluido 1:1 con una solución de 5% de dextrosa en agua. Este sistema cosolvente disuelve bien los compuestos hidrofóbicos, y él mismo produce baja toxicidad al administrarse sistémicamente. Naturalmente, las proporciones del sistema cosolvente pueden variar considerablemente sin destruir sus características de solubilidad y toxicidad. Además, la identidad de los compuestos del cosolvente se puede cambiar: por ejemplo, en vez del polisorbato 80 se pueden usar otros surfactantes no polarizados de baja toxicidad; la cantidad de la fracción de polietilenglicol se puede cambiar; otros polímeros biocompatibles pueden reemplazar al polietilenglicol, por ej., polivinilpirrolidona; y otros azúcares o polisacáridos se pueden sustituir por dextrosa.

Alternativamente, se pueden emplear otros sistemas de entrega para los compuestos farmacéuticos hidrofóbicos. Las liposomas y emulsiones son bien conocidos vehículos o portadores para drogas hidrofóbicas. Ciertos solventes orgánicos como el dimetilsulfóxido también se pueden emplear, aunque usualmente a costa de mayor toxicidad. Adicionalmente, los compuestos se pueden entregar utilizando un sistema de liberación de efecto prolongado, tal como matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen los agentes

terapéuticos. Se han establecido varios materiales de liberación retardada que son conocidos por los expertos en la materia. Las cápsulas de liberación prolongada, dependiendo de su naturaleza química, liberan los compuestos durante un período de pocas semanas hasta de más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, se pueden utilizar estrategias adicionales para la estabilización de proteínas.

Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir portadores o excipientes apropiados de fase sólida o de gel. Ejemplos de tales portadores o excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato cálcico, varios azúcares, almidones, derivados celulósicos, gelatina, y polímeros como los polietilenglicoles.

En esta especialidad se han identificado numerosos factores neurotróficos y cualquiera de esos factores se puede utilizar en las composiciones de esta invención. Tal como se usa aquí, el término "factor neurotrófico" se refiere a sustancias capaces de estimular crecimiento o proliferación de tejido nervioso (pero excluyendo a compuestos de la invención inhibidores de rotamasa FKBP), por ej., factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1) y sus derivados truncados activos (gIGF-1), factor de crecimiento de fibroblastos ácidos o base (aFGF y bFGF respectivamente), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento derivados del cerebro (BDNF), factores neurotróficos ciliares (CNTF), factor neurotrófico derivado de líneas gliales (GDNF), neurotrofina-3 (NT-3), y neurotrofina 4/5 (NT-4/5). Además de uno o más agentes de la invención, las composiciones farmacéuticas pueden incluir como agentes activos, uno o más de estos factores neurotróficos. El factor neurotrófico preferido para utilizarse en los compuestos de esta invención es el NGF.

87


Otros componentes de las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención pueden incluir el alcohol bencílico u otros preservantes apropiados, estimulantes de absorción para aumentar la biodisponibilidad, fluorocarbonos u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

Una composición farmacéutica contiene un total de ingrediente(s) activo(s) suficiente(s) para lograr el deseado efecto terapéutico. Más específicamente, la composición farmacéutica contiene una cantidad terapéuticamente eficaz (o sea, una cantidad eficaz para prevenir el desarrollo de, o aliviar los síntomas existentes de una enfermedad o trastorno causado por FKBP) de un agente inhibidor de FKBP de la invención. Las cantidades totales del agente inhibidor de FKBP de la invención y cualquier factor neurotrófico opcional que pueda combinarse con los materiales del portador para producir una forma de dosis única podrán variar dependiendo del organismo receptor en tratamiento y el modo específico de administración. Preferiblemente, todas las composiciones del invento contienen ambos, un agente inhibidor de FKBP y un factor neurotrófico, con el agente inhibidor de FKBP actuando para potenciar la actividad del factor neurotrófico para aumentar la estimulación de crecimiento de neuritas. La cantidad de factor neurotrófico en tales composiciones es ventajosamente menor que la cantidad requerida en monoterapias que utilizan sólo el factor. Preferiblemente, se formulan las composiciones para que se administre una dosis de entre 0,01 y 100 mg/kg por peso corporal por día de un agente inhibidor de FKBP12, y una dosis de entre 0,01 y 100 µg/kg por peso corporal de un factor neurotrófico se administre por día a un paciente que recibe las composiciones.

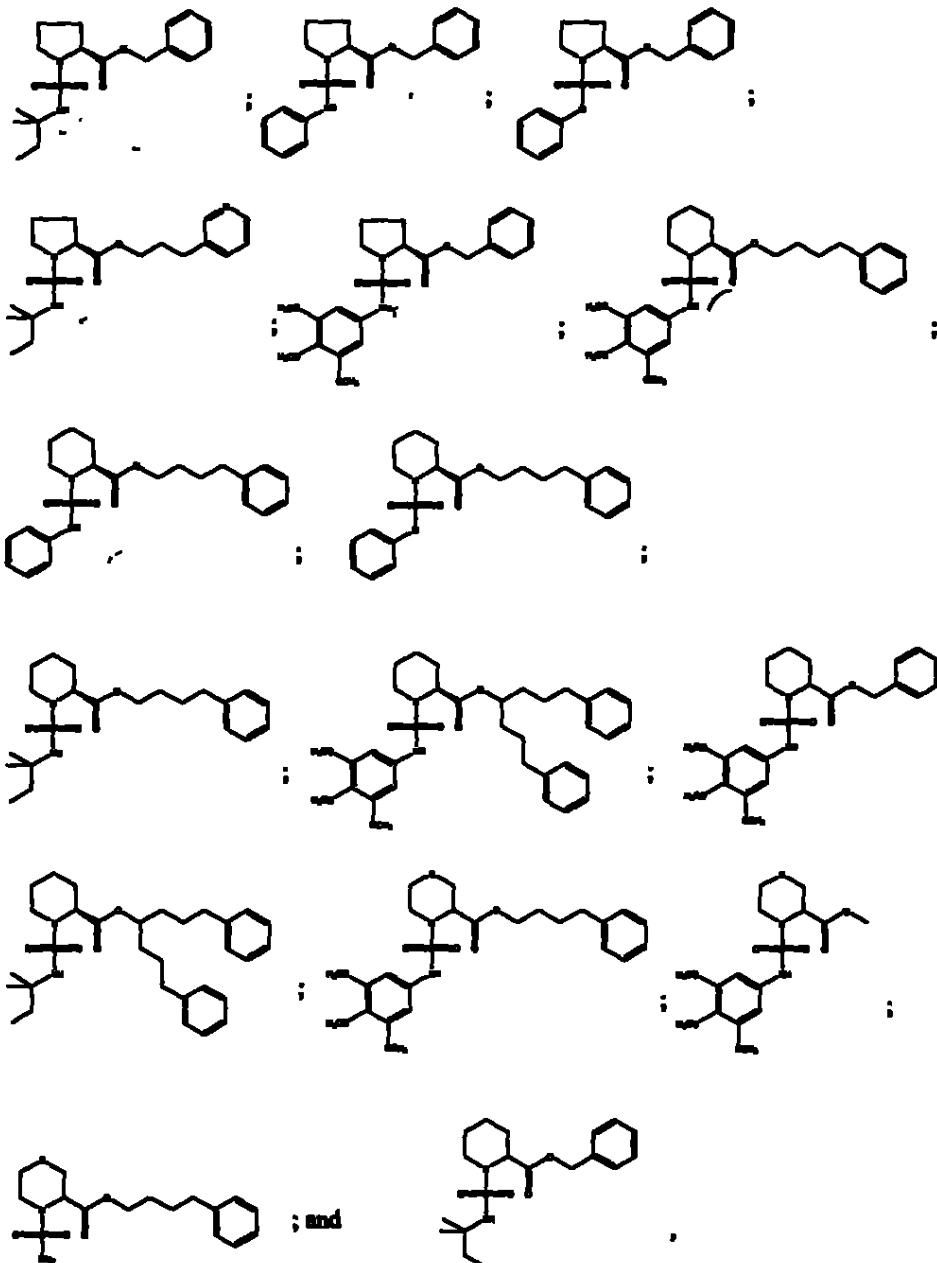
Se puede usar una composición farmacéutica de la invención en un método para inhibir la actividad enzimática de la rotamasa de una proteína aglutinante FK-506, que incluye la administración de la composición a un paciente. Las

08 ~~27~~

composiciones de la invención también se pueden utilizar para estimular el crecimiento de neuritas en células nerviosas, para estimular regeneración de nervios, o para promover regeneración neuronal. Preferiblemente, la composición incluye también un factor neurotrófico.

Aunque se ha ilustrado la invención con referencia a realizaciones específicas y preferentes, los expertos en la materia reconocerán que, por ej., por medio de experimentación y práctica rutinaria de la invención, se pueden hacer cambios y modificaciones. Por ejemplo, aquellos con experiencia normal en la materia podrán reconocer que aparentemente se pueden hacer cambios o sustituciones a los compuestos de la fórmula (I) sin afectar adversamente en forma significativa, la eficacia de las composiciones farmacéuticas. Así es que no se intenta que la invención esté limitada por la previamente vista descripción, sino que se define en las reivindicaciones anexas y sus equivalentes.

1. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste de:



o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables.



30

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

October 27, 2000

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: 60/168,246

FILING DATE: December 01, 1999



By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

T. Lawrence

T. LAWRENCE
Certifying Officer

Attorney's Docket No.: 0125-0046

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of: C. Guo, et al.

For: Compounds, Compositions, and Methods for Stimulating
Neuronal Growth and Elongation

Box Provisional Patent Application
Assistant Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

COVER SHEET FOR FILING PROVISIONAL APPLICATION
(37 C.F.R. § 1.51(c)(1))

This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT
under 37 C.F.R. 1.53(c).

The following comprises the information required by 37 C.F.R. § 1.51(c)(1).

1. The name(s) and address(es) of the inventor(s) is/are (37 C.F.R. § 1.51(ii) and 37 C.F.R. § 1.51(iii)):

Chuangding, Guo
561 Gardena Court,
Encinitas, CA 92024

Xinjun J. Hou
7435 Park Village Road
San Diego, CA 92129

Ernest Villafmca
Upas Street
San Diego, CA 92129

2. The title of the invention is (37 C.F.R. § 1.51(iv)):

Compounds, Compositions, and Methods for Stimulating Neuronal Growth
and Elongation

3. The name, registration, and telephone number of the attorney (if applicable) is
(37 C.F.R. § 1.51(v)):

Name of attorney: Simon D Roberts

Tel. (703) 683-3600

Reg. No. Certificate of Limited

Recognition Under 37CFR § 10.9(b)

JCS53 U.S. PTO
60/168246



gt

12/01/99
JCS53 U.S. PTO

60168246 20199

92

(complete the following, if applicable)

☐ A Combined declaration and power of attorney accompanies this cover sheet.

4. The docket number used to identify this application is (37 C.F.R. §1.51(vi)):

Docket No.: 0125-0046

5. The correspondence address for this application is (37 C.F.R. §1.51(vii)):

Shanks & Herbert
TransPotomac Plaza
1033 N. Fairfax Street, Suite 308
Alexandria, VA 22314

6. Statement as to whether invention was made by an agency of the U.S. Government or under contract with an agency of the U.S. Government. (37 C.F.R. §1.51(viii)):

This invention was made by an agency of the United States Government, or under contract with an agency of the United States Government.

☒ No.

☐ Yes.

The name of the U.S. Government agency and the Government contract number are:

7. Identification of documents accompanying this cover sheet:

A. Documents required by 37 C.F.R. §§ 1.51(c)(2)-(3):

Specification: (Including drawings and abstracts) No. of pages 67

B. Additional documents:

☒ Claims

No. of claims 1

☐ Combined Declaration and Power of attorney

☐ Small entity statement

☐ Assignment

☐ Other

8. Fee

The filing fee for this provisional application, as set in 37 C.F.R. § 1.16(k), is \$150.00, for other than a small entity, and \$75.00, for a small entity.

☐ Applicant is a small entity.

6015 246 20199

9. ☐ Fee payment is being made at this time.

☐ Not enclosed

☒ No filing fee is to be paid at this time. (This and the surcharge required by 37 C.F.R. § 1.16(l) can be paid subsequently.)

☐ Enclosed

10. Method of fee payment

☐ Check in the amount of

☐ Charge Account No. _____, in the amount of \$
A duplicate of this Cover Sheet is attached.

Please charge Account No. 500822 for any fee deficiency.

Date: December 1, 1999



Signature of attorney
Reg. No.: Cert. of Limited Recognition
Tel.: (703) 683-3600

6 10 94289709

U.S. Provisional Application
for
COMPOUNDS, COMPOSITIONS, AND METHODS FOR
STIMULATING NEURONAL GROWTH AND ELONGATION

Inventors: Chuangxing Guo
Xinjun Hou
Jesus Ernest Villafranca

60168246-10199

95 9f

**TECHNICAL FIELD AND INDUSTRIAL APPLICABILITY OF THE
INVENTION:**

60168246120199

The present invention relates to methods and pharmaceutical compounds and compositions for stimulating neurite outgrowth in nerve cells leading to nerve regeneration. More particularly, the compositions comprise compounds that inhibit the peptidyl-prolyl isomerase (rotamase) enzyme activity associated with the FK-506 binding proteins (FKBP), such as FKBP 12 and FKBP 52. Further, the compositions also comprise compounds that inhibit the rotamase enzyme activity associated with a NIMA-interacting protein (PIN1). The methods comprise treating nerve cells with compositions comprising the rotamase-inhibiting compound. The methods of the invention can be used to promote repair of neuronal damage caused by disease or physical trauma.

BACKGROUND OF THE INVENTION:

Immunophilins are a family of soluble proteins that serve as receptors for important immunosuppressant drugs such as cyclosporin A, FK-506 and rapamycin. An immunophilin of particular interest are the FK-506 binding proteins (FKBP). For a review of the role of immunophilins in the nervous system, see Solomon et al., "Immunophilins and the Nervous System," *Nature Med.*, 1(1), 32-37 (1995).

The 12-kiloDalton FK-506 binding protein, FKBP12, binds FK-506 with high affinity. Such binding has been directly measured using microcalorimetry and radiolabeled FK-506, e.g., [^3H]dihydro-FK-506 (see Siekierka et al., *Nature*, 341, 755-57 (1989); and U.S. Patent No. 5,696,135 to Steiner et al.) and 32-[1- ^{14}C]-benzoyl-FK-506 (see Harding et al., *Nature*, 341, 758-60 (1989)). Binding affinity of other compounds for FKBP can be determined directly by microcalorimetry or from

96 06

competitive binding assays using either tritiated or ^{14}C -labelled FK-506, as described by Siekierka et al. or Harding et al.

FK-506-binding protein FKBP12 participates in a variety of significant cellular functions. FKBP12 catalyzes cis-trans isomerization of peptidyl-prolyl linkages. This peptidyl-prolyl isomerase enzyme activity is also referred to as rotamase activity. Such activity is readily assayed by methods known in the art (see Fischer et al., *Biochim. Biophys. Acta* 791, 87 (1984); Fischer et al., *Biomed. Biochim. Acta* 43, 1101 (1984); and Fischer et al., *Nature* 337, 476-478 (1989)). U.S. Patent Nos. 5,192,773 and 5,330,993 to Armistead et al. report FKBP binding affinities that were correlated with rotamase-inhibiting activities for many compounds.

FK-506 and compounds that bind FKBP competitively with FKBP stimulate outgrowth of neurites (axons) in nerve cells (see U.S. Patent No. 5,696,135 to Steiner et al.). Lyons et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 3191-95 (1994)) demonstrated that FK-506 acts to enhance or potentiate the effectiveness of nerve growth factor (NGF) in stimulating neurite outgrowth in a rat pheochromocytoma cell line. The mechanism of stimulation of such neurite outgrowth appears to be 10- to 100-fold potentiation of the action of nerve growth factor.

Potency for inhibition of the peptidyl-prolyl isomerase (rotamase) enzyme activity of FKBP by FK-506, and by compounds that competitively inhibit FK-506 binding to FKBP, empirically correlates with activity for stimulation of neurite outgrowth. Because of the close correlation between rotamase inhibition and neurotrophic action, it has been proposed that the rotamase may convert a protein substrate into a form that promotes neural growth (see U.S. Patent No. 5,696,135). For example, it has been found that FKBP12 forms bound complexes with the intracellular calcium ion channels—the ryanodine receptor (RyR) and the inositol

92
97

1,4,5-triphosphate receptor (IP₃R) (Jayaraman et al., *J. Biol. Chem.*, 267, 9474-9477 (1992); Cameron et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1784-1788 (1995)), helping to stabilize calcium release. For both the RyR and the IP₃R, it has been demonstrated that FK-506 and rapamycin are capable of dissociating FKBP12 from these receptors. In both cases, the "stripping" off of FKBP12 leads to increased leakiness of the calcium channels and lower intracellular calcium concentrations. It has been suggested that calcium flux may be associated with stimulation of neurite outgrowth.

In addition, FK-506-FKBP bound complexes bind to and inhibit calcineurin, a cytoplasmic phosphatase. The phosphatase activity of calcineurin is necessary for dephosphorylation and subsequent translocation into the nucleus of nuclear factor of activated T-cells (NF-AT) (see Flanagan et al., *Nature*, 352, 803-807 (1991)). NF-AT is a transcription factor that initiates interleukin-2 gene activation, which in turn mediates T-cell proliferation; these steps are important to the activation of an immune response. Calcineurin-inhibiting activity is correlated with the immunosuppressant activity of FK-506 and related compounds.

Calcineurin inhibition, however, does not correlate with the stimulation of neurite outgrowth. Therefore, compounds that are potent inhibitors of rotamase but not strong inhibitors of calcineurin are desired since they should be neurotrophic but non-immunosuppressive.

Such neurotrophic agents desirably find use in augmenting neurite outgrowth, and hence in promoting neuronal growth and regeneration in various pathological situations where neuronal repair can be facilitated, including peripheral nerve damage caused by injury or diseases such as diabetes, brain damage associated with stroke, and for the treatment of neurological disorders related to neurodegeneration, including Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and amyotrophic lateral sclerosis (ALS).

Further, such use is preferably without the associated effect of immunosuppression, since long-term use of immunosuppressants is associated with side effects such as kidney toxicity, neurological deficits, and vascular hypertension.

Various inhibitors of rotamase enzyme activity, FKBP-binding compounds, or immunomodulating compounds are known. See, e.g., U.S. Patent Nos. 5,192,773, 5,330,993, 5,516,797, 5,612,350, 5,614,547, 5,622,970, 5,654,332, 5,665,774, 5,696,135, 5,721,256, 5,798,355, 5,786,378, 5,846,979, 5,801,187, and 5,801,197. See also International Publication Nos. WO 96/41609, WO 96/40633, WO 96/40140, WO 98/29116, WO 98/29117, WO 97/14439, WO 98/37882, and WO 99/45006.

In view of the variety of disorders that may be treated by stimulating neurite outgrowth and the relatively few neurotropic agents having an affinity for FKBP-type immunophilins, there remains a need for additional neurotrophic agents. In particular, there is a need for those neurotropic agents that are potent inhibitors of the enzyme activity and especially of the *cis-trans* propyl isomerase (rotamase) activity of the FKBP-type immunophilins, particularly the immunophilin FKBP-12. Such compounds will desirably have physical and chemical properties suitable for use in pharmaceutical preparations, e.g., bioavailability, half-life, and efficient delivery to the active site. In view of the desired properties, small organic molecules are preferred over proteins. Furthermore, such compounds will not significantly inhibit the protein phosphatase calcineurin and therefore lack any significant immunosuppressive activity.

Studies have identified a novel mitotic kinase, NIMA, encoded by the *Aspergillus nimA* gene (Osmani, et al., Cell, 53: 237, 1988). NIMA kinase activity is tightly regulated during the nuclear division cycle, peaking in late G2 and M. Overexpression of NIMA promotes entry of *Aspergillus* cells into M (Osmani, et al.,

6016824 4289709 120199

9B

g8

Cell, 53: 237, 1988; Lu and Means, EMBO J., 13: 2103, 1994). Thus, NIMA is important for progression into mitosis in *Aspergillus*.

NIMA is a protein-Ser/Thr kinase, biochemically distinct from other protein kinases, and its phosphotransferase activity is regulated by Ser/Thr phosphorylation. It has been shown that the NIMA mitotic pathway is not restricted to *Aspergillus*, but also exists in vertebrate cells (Lu and Hunter, Cell, 81: 413, 1995a). In *Xenopus* oocytes, NIMA induces germinal vesicle breakdown without activating Mos, CDC2 or MAP kinase. In HeLa cells, NIMA induces mitotic events without activating CDC2, whereas dominant-negative NIMA mutants cause a specific G2 arrest. In addition, O'Connell, et al (EMBO J, 13: 4926, 1994) have also demonstrated that NIMA induce premature chromatin condensation in fission yeast and HeLa cells. These results reveal the existence of a NIMA-like mitotic pathway in other eukaryotic cells.

An exemplary NIMA associated protein is called "protein interacting with NIMA" (PIN1). See U.S. Patent No. 5,952,467 which is herein incorporated by reference in its entirety. PIN1 has C-terminal peptidyl-propyl cis/trans isomerase activity and contains a conserved N-terminal tryptophan domain (WW domain) thought to mediate protein-protein interactions. Specifically, PIN1 is thought to be a mitotic regulator present throughout the cell cycle which regulates transcriptional and post transcriptional events by catalyzing phosphorylation-dependent conformational changes of RNA polymerase II subunit (Albert et al., J. Cell Sci. 112: 2493-500, August 1999). It has been shown that PIN1 induces a G2 arrest and delays NIMA-induced mitosis when overexpressed, and triggers mitotic arrest and DNA fragmentation when depleted.

100
100

Modulating PIN1 activity by contacting a cell with a composition which modulates PIN1 activity may provide a method for controlling the growth of that cell. For example, an inhibitor of PIN1 activity such as a peptidyl-prolyl cis/trans isomerases (PPIase) inhibitor or an anti-PIN1 antibody, or an inhibitor of PIN1 expression such as an antisense nucleotide sequence or a ribozyme, can be used to control growth of a cell. Alternatively, PIN1 activity can be increased by an activator or PIN1 expression can be increased by an enhancer, for example. Further, PIN1 may also be involved in Alzheimer's disease. It is reported that in vitro, PIN1 can restore the ability of phosphorylated tau protein to bind microtubules and promote microtubule assembly. Depletion of PIN1 and sequestration of it leads to cell death (Lu et al., Nature 24 (6738): 739-40, June 24, 1999).

In view of the variety of disorders that may be treated by controlling the growth of cells and the relatively few PIN1 inhibitors known, there remains a need for additional PIN1 inhibitors. Such inhibitors will desirably have physical and chemical properties suitable for use in pharmaceutical preparations, e.g., bioavailability, half-life, and efficient delivery to the active site. In view of the desired properties, small organic molecules are preferred over proteins.

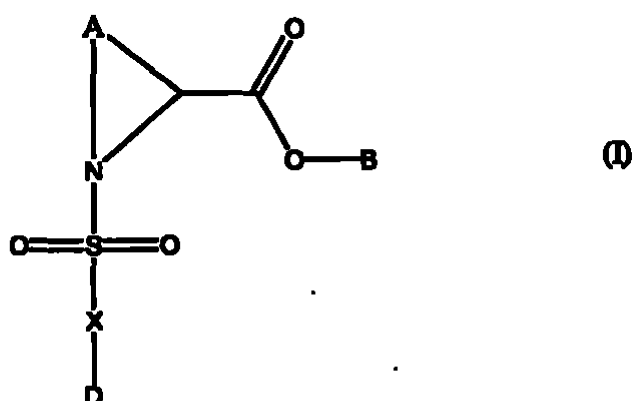
SUMMARY OF THE INVENTION:

101
701

It is therefore an object of the invention to provide small-molecule neurotrophic compounds having an affinity for FKBP-type immunophilins. Once bound to these proteins, the neurotrophic compounds are potent inhibitors of the enzyme activity associated with immunophilin proteins, particularly rotamase enzyme activity. An additional object is to provide inhibitor compounds of the present invention that do not exert any significant immunosuppressive activity in addition to their neurotrophic activity. It is a further object of the invention to provide effective processes for synthesizing such compounds as well as useful intermediates therefor. Another object of the invention is to provide methods for treating patients having neurological trauma or disorders as a result of, or associated with, conditions that include (but are not limited to) neuralgias, muscular dystrophy, Bell's palsy, myasthenia gravis, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, multiple sclerosis, ALS, stroke and ischemia associated with stroke, neural parapathy, other neural degenerative diseases, motor neuron diseases, and nerve injuries including spinal cord injuries.

Such objects have been achieved by the neurotrophic compounds of the present invention, which may be used to stimulate the growth and regeneration of neurons. The administration of these compounds to individuals requiring therapeutic stimulation of neuronal growth and regeneration provides effective therapies in various pathological situations where neuronal repair can be facilitated, including peripheral nerve damage caused by injury or disease such as diabetes, brain damage associated with stroke, and for the treatment of neurological disorders related to neurodegeneration, including Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and amyotrophic lateral sclerosis.

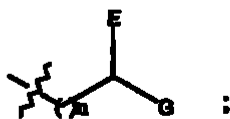
To achieve these and other objectives, as embodied and broadly described, in a first aspect, the present invention relates to a compound of formula (I):



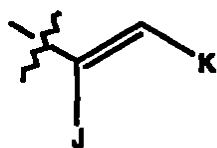
or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof, wherein:

A is C₃-C₈ alkylene optionally substituted with one or more suitable substituents and optionally any one of the CH₂ groups of the alkylene group may be replaced by O, S, SO or SO₂;

B is



E and G are independently Ar, H, C₁-C₆ straight or branched alkyl, C₁-C₆ straight or branched alkenyl, C₁-C₆ straight or branched alkyl or alkenyl that is substituted with a C₃-C₇ cycloalkyl, C₁-C₆ straight or branched alkyl or alkenyl that is substituted with a C₃-C₇ cycloalkenyl, or Ar substituted C₁-C₆ straight or branched alkyl or alkenyl, wherein, in each case, one or two of the CH₂ groups of the alkyl or alkenyl chains may contain 1-2 heteroatoms selected from the group consisting of oxygen, sulfur, SO and SO₂ in chemically reasonable substitution patterns, or



103



provided that both B and D are not H; J is H, C₁-C₆ straight or branched alkyl or C₁-C₆ straight or branched alkenyl;

K is Ar or substituted 5-7 membered cycloalkyl with substituents at positions 3 and 4 which are independently selected from the group consisting of H, OH,

-O-(CH₂)_m-alkyl, -O-(CH₂)_m-alkenyl and carbonyl, wherein m is 1-4;

Ar is selected from the group consisting of phenyl, 1-naphthyl, 2-naphthyl, 2-furyl, 3-furyl, 2-thienyl, 3-thienyl, 2-pyridyl, 3-pyridyl, 4-pyridyl, monocyclic and bicyclic heterocyclic ring systems with individual ring sizes being 5 or 6 which may contain in either or both rings a total of 1-4 heteroatoms independently selected from O, N and S; wherein Ar may contain one to three substituents which are independently selected from the group consisting of hydrogen, halo, hydroxyl, nitro, trifluoromethyl, trifluoromethoxy, C₁-C₄ straight or branched alkyl, C₂-C₄ straight or branched alkenyl, O-(C₁-C₄ straight or branched alkyl), O-(C₂-C₄ straight or branched alkenyl), O-benzyl, O-phenyl, 1,2-methylenedioxy, amino, carboxyl and phenyl;

n is 0 to 4;

D is C₁-C₆ straight or branched alkyl, C₁-C₆ straight or branched alkenyl, C₃-C₇ cycloalkyl, C₃-C₇ cycloalkenyl substituted with C₁-C₄ straight or branched alkyl or C₁-C₄ straight or branched alkenyl, [(C₂-C₄)-alkyl or (C₂-C₄)-alkenyl]-Ar or Ar, and

X is NR¹⁰ or O, where R¹⁰ is H or C₁-C₄ alkyl or C₁-C₄ alkenyl.

In a second aspect, the invention relates to a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of the compound of formula (I) or its pharmaceutically acceptable salt and a pharmaceutically acceptable carrier.

124
104-
In a third aspect, the invention relates to a method of treating a neurological disorder in an animal, comprising:

administration to the animal a therapeutically effective amount of the compound of formula (I) or its pharmaceutically acceptable salt or solvate.

In a fourth aspect, the invention relates to processes of making the compounds of formula (I).

In a fifth aspect, the invention relates to a method of modulating the phosphorylation of tau protein in an animal, comprising:

administration to the animal a therapeutically effective amount of the compound of formula (I) or its pharmaceutically acceptable salt or solvate.

In a sixth aspect, the invention relates to a method of inhibiting the sequestration of PIN1 within an animal's cell, comprising:

administration to the animal a therapeutically effective amount of the compound of formula (I) or its pharmaceutically acceptable salt or solvate.

In a seventh aspect, the invention relates to a method of modulating the phosphorylation dependant conformational changes of at least one RNA polymerase II subunit, comprising:

administration of a therapeutically effective amount of the compound of formula (I) or its pharmaceutically acceptable salt or solvate.

Other features, objects, and advantages of the invention will become apparent from the following detailed description of the invention.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS OF THE INVENTION:

As used in the present application, unless otherwise stated, the following definitions apply:

105
105

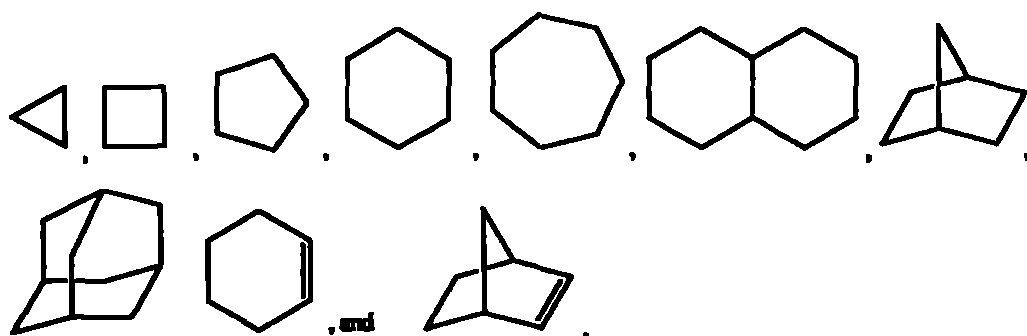
In accordance with a convention used in the art,  is used in structural formulas herein to depict the bond that is the point of attachment of the moiety or substituent to the core or backbone structure.

Where chiral carbons are included in chemical structures, unless a particular orientation is depicted, both stereoisomeric forms are intended to be encompassed.

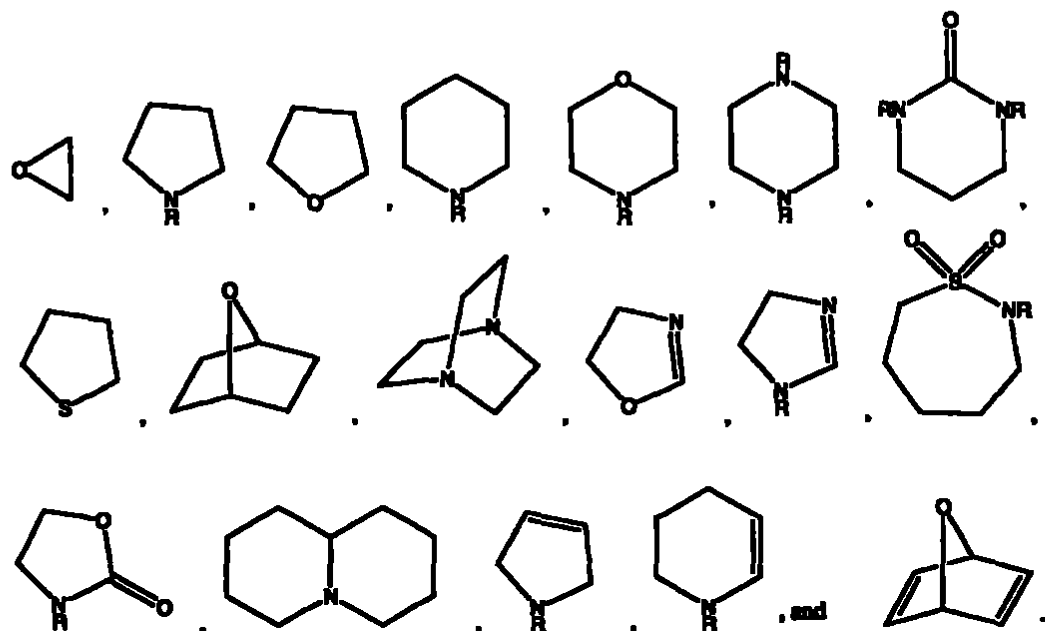
An "alkyl group" is intended to mean a straight- or branched chain monovalent radical of saturated and/or unsaturated carbon atoms and hydrogen atoms, such as methyl (Me), ethyl (Et), propyl, isopropyl, butyl (Bu), isobutyl, t-butyl (t-Bu), ethenyl, pentenyl, butenyl, propenyl, ethynyl, butynyl, propynyl, pentynyl, hexynyl, and the like, which may be unsubstituted (i.e., containing only carbon and hydrogen) or substituted by one or more suitable substituents as defined below (e.g., one or more halogens, such as F, Cl, Br, or I, with F and Cl being preferred). A "lower alkyl group" is intended to mean an alkyl group having from 1 to 4 carbon atoms in its chain.

A "cycloalkyl group" is intended to mean a non-aromatic monovalent monocyclic, bicyclic, or tricyclic radical containing 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, or 14 carbon ring atoms, each of which may be saturated or unsaturated, and which may be unsubstituted or substituted by one or more suitable substituents as defined below, and to which may be fused one or more heterocycloalkyl groups, aryl groups, or heteroaryl groups, which themselves may be unsubstituted or substituted by one or more substituents. Illustrative examples of cycloalkyl groups include following moieties:

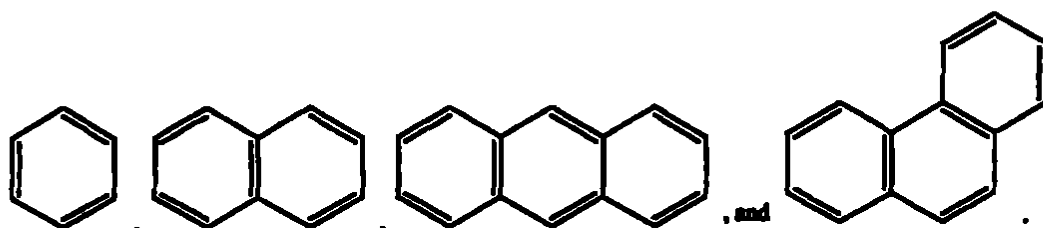
()



A "heterocycloalkyl group" is intended to mean a non-aromatic monovalent monocyclic, bicyclic, or tricyclic radical, which is saturated or unsaturated, containing 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, or 18 ring atoms, which includes 1, 2, 3, 4, or 5 heteroatoms selected nitrogen, oxygen, and sulfur, where the radical is unsubstituted or substituted by one or more suitable substituents as defined below, and to which may be fused one or more cycloalkyl groups, aryl groups, or heteroaryl groups, which themselves may be unsubstituted or substituted by one or more suitable substituents. Illustrative examples of heterocycloalkyl groups include the following moieties:

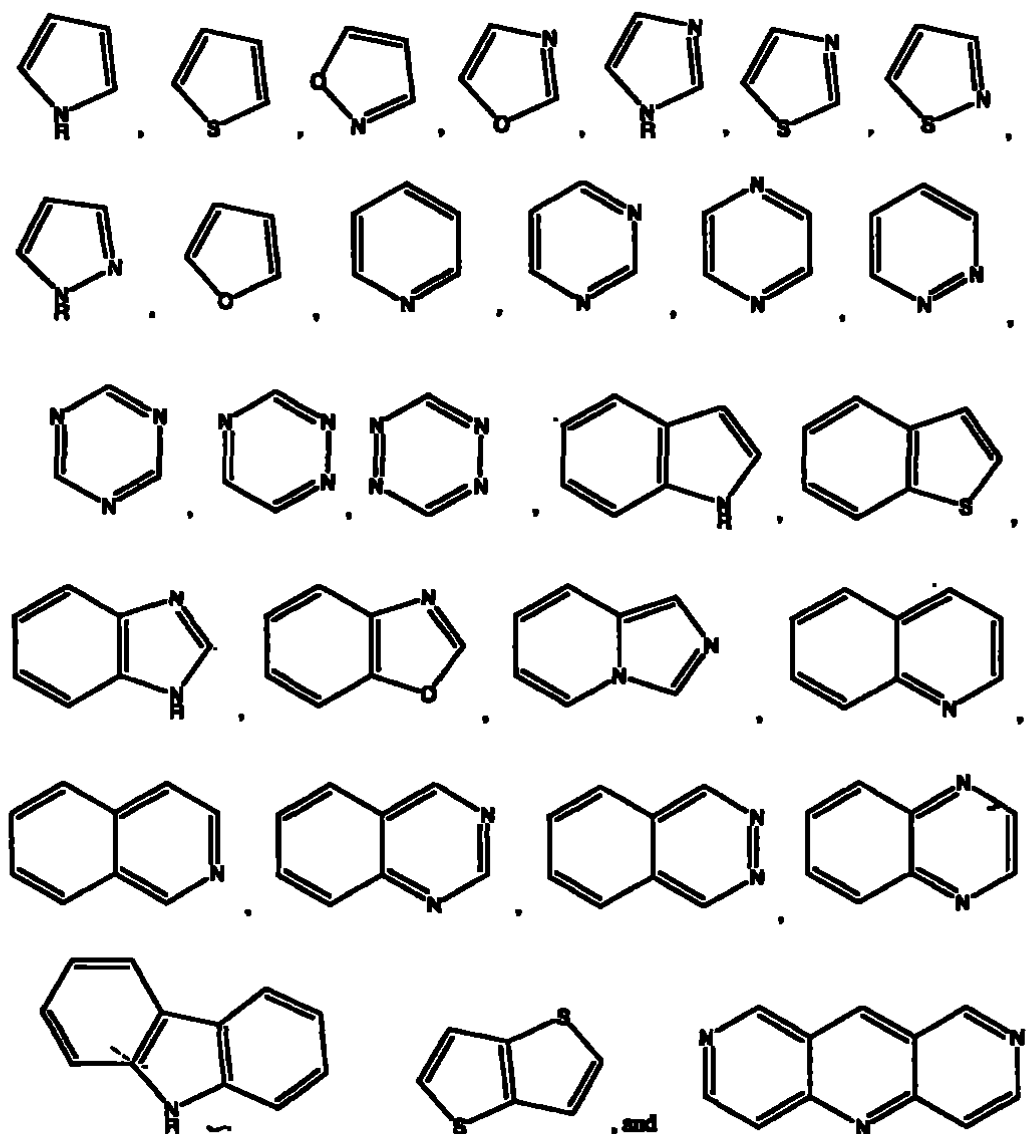


An "aryl group" is intended to mean an aromatic monovalent monocyclic, bicyclic, or tricyclic radical containing 6, 10, 14, or 18 carbon ring atoms, which may be unsubstituted or substituted by one or more suitable substituents as defined below, and to which may be fused one or more cycloalkyl groups, heterocycloalkyl groups, or heteroaryl groups, which themselves may be unsubstituted or substituted by one or more suitable substituents. Thus, the term "aryl group" includes a benzyl group (Bzl). Illustrative examples of aryl groups include the following moieties:



A "heteroaryl group" is intended to mean an aromatic monovalent monocyclic, bicyclic, or tricyclic radical containing 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, or 18 ring atoms, including 1, 2, 3, 4, or 5 heteroatoms selected from nitrogen, oxygen, and sulfur, which may be unsubstituted or substituted by one or

more suitable substituents as defined below, and to which may be fused one or more cycloalkyl groups, heterocycloalkyl groups, or aryl groups, which themselves may be unsubstituted or substituted by one or more suitable substituents. Illustrative examples of heteroaryl groups include the following moieties:



109 108
A "heterocycle" is intended to mean a heteroaryl or heterocycloalkyl group (each of which, as defined above, are optionally substituted).

An "acyl group" is intended to mean a $-C(O)-R$ radical, where R is a substituent as defined below.

A "thioacyl group" is intended to mean a $-C(S)-R$ radical, where R is a substituent as defined below.

A "sulfonyl group" is intended to mean a $-SO_2R$ radical, where R is a substituent as defined below.

A "hydroxy group" is intended to mean the radical $-OH$.

An "amino group" is intended to mean the radical $-NH_2$.

An "alkylamino group" is intended to mean the radical $-NHR_a$, where R_a is an alkyl group.

A "dialkylamino group" is intended to mean the radical $-NR_aR_b$, where R_a and R_b are each independently an alkyl group.

An "alkoxy group" is intended to mean the radical $-OR_a$, where R_a is an alkyl group. Exemplary alkoxy groups include methoxy, ethoxy, propoxy, and the like.

An "alkoxycarbonyl group" is intended to mean the radical $-C(O)OR_a$, where R_a is an alkyl group.

An "alkylsulfonyl group" is intended to mean the radical $-SO_2R_a$, where R_a is an alkyl group.

An "alkylaminocarbonyl group" is intended to mean the radical $-C(O)NHR_a$, where R_a is an alkyl group.

A "dialkylaminocarbonyl group" is intended to mean the radical $-C(O)NR_aR_b$, where R_a and R_b are each independently an alkyl group.

A "mercapto group" is intended to mean the radical $-SH$.

110
109

An "alkylthio group" is intended to mean the radical $-SR_n$, where R_n is an alkyl group.

A "carboxy group" is intended to mean the radical $-C(O)OH$.

A "carbamoyl group" is intended to mean the radical $-C(O)NH_2$.

An "aryloxy group" is intended to mean the radical $-OR_n$, where R_n is an aryl group.

A "heteroaryloxy group" is intended to mean the radical $-OR_n$, where R_n is a heteroaryl group.

An "arylthio group" is intended to mean the radical $-SR_n$, where R_n is an aryl group.

A "heteroarylthio group" is intended to mean the radical $-SR_n$, where R_n is a heteroaryl group.

The term "suitable organic moiety" is intended to mean any organic moiety recognizable, such as by routine testing, to those skilled in the art as not adversely affecting the inhibitory activity of the inventive compounds. Illustrative examples of suitable organic moieties include, but are not limited to, hydroxyl groups, alkyl groups, oxo groups, cycloalkyl groups, heterocycloalkyl groups, aryl groups, heteroaryl groups, acyl groups, sulfonyl groups, mercapto groups, alkylthio groups, alkoxy groups, carboxy groups, amino groups, alkylamino groups, dialkylamino groups, carbamoyl groups, arylthio groups, heteroarylthio groups, and the like.

The term "substituent" or suitable substituent" is intended to mean any suitable substituent that may be recognized or selected, such as through routine testing, by those skilled in the art. Illustrative examples of suitable substituents include hydroxy groups, halogens, oxo groups, alkyl groups, acyl groups, sulfonyl groups, mercapto groups, alkylthio groups, alkyloxy groups, cycloalkyl groups,

6016 246 20199

111
X

heterocycloalkyl groups, aryl groups, heteroaryl groups, carboxy groups, amino groups, alkylamino groups, dialkylamino groups, carbamoyl groups, aryloxy groups, heteroaryloxy groups, arylthio groups, heteroarylthio groups, and the like.

The term "optionally substituted" is intended to expressly indicate that the specified group is unsubstituted or substituted by one or more suitable substituents, unless the optional substituents are expressly specified, in which case the term indicates that the group is unsubstituted or substituted with the specified substituents. As defined above, various groups may be unsubstituted or substituted (i.e., they are optionally substituted) unless indicated otherwise herein (e.g., by indicating that the specified group is unsubstituted).

A "prodrug" is intended to mean a compound that is converted under physiological conditions or by solvolysis or metabolically to a specified compound that is pharmaceutically active.

A "pharmaceutically active metabolite" is intended to mean a pharmacologically active product produced through metabolism in the body of a specified compound.

A "solvate" is intended to mean a pharmaceutically acceptable solvate form of a specified compound that retains the biological effectiveness of such compound. Examples of solvates include compounds of the invention in combination with water, isopropanol, ethanol, methanol, dimethyl sulfoxide, ethyl acetate, acetic acid, or ethanolamine.

A "pharmaceutically acceptable salt" is intended to mean a salt that retains the biological effectiveness of the free acids and bases of the specified compound and that is not biologically or otherwise undesirable. Examples of pharmaceutically acceptable salts include sulfates, pyrosulfates, bisulfates, sulfites, bisulfites,

112
111

phosphates, monohydrogenphosphates, dihydrogenphosphates, metaphosphates, pyrophosphates, chlorides, bromides, iodides, acetates, propionates, decanoates, caprylates, acrylates, formates, isobutyrate, caproates, heptanoates, propiolates, oxalates, malonates, succinates, suberates, sebacates, fumarates, malcates, butyne-1, 4-dioates, hexyne-1,6-dioates, benzoates, chlorobenzoates, methylbenzoates, dinitrobenzoates, hydroxybenzoates, methoxybenzoates, phthalates, sulfonates, xylenesulfonates, phylacetates, phenylpropionates, phylbutyrates, citrates, lactates, γ -hydroxybutyrates, glycollates, tartrates, methane-sulfonates, propanesulfonates, naphthalene-1-sulfonates, naphthalene-2-sulfonates, and mandelates.

60168246
20199

The present invention further provides synthetic methods that are comprised of one of the synthetic steps set forth in the present disclosure. A synthetic method is comprised of a synthetic step when the synthetic step is at least part of the final synthetic method. In such a fashion, the synthetic method can be only the synthetic step or have additional synthetic steps that may be associated with it. Such a synthetic method can have a few additional synthetic steps or can have numerous additional synthetic steps.

If the neurotrophic compound of formula I formed from the process of the present invention is a base, a desired salt may be prepared by any suitable method known to the art, including treatment of the free base with an inorganic acid, such as hydrochloric acid; hydrobromic acid; sulfuric acid; nitric acid; phosphoric acid; and the like, or with an organic acid, such as acetic acid; maleic acid; succinic acid; mandelic acid; fumaric acid; malonic acid; pyruvic acid; oxalic acid; glycolic acid; salicylic acid; pyranosidyl acid, such as glucuronic acid or galacturonic acid; alpha-hydroxy acid, such as citric acid or tartaric acid; amino acid, such as aspartic acid or

113
X12

glutamic acid; aromatic acid, such as benzoic acid or cinnamic acid; sulfonic acid, such as p-toluenesulfonic acid or ethanesulfonic acid; or the like.

If the neurotrophic compound of formula I formed from the process of the present invention is an acid, a desired salt may be prepared by any suitable method known to the art, including treatment of the free acid with an inorganic or organic base, such as an amine (primary, secondary, or tertiary); an alkali metal or alkaline earth metal hydroxide; or the like. Illustrative examples of suitable salts include organic salts derived from amino acids such as glycine and arginine; ammonia; primary, secondary, and tertiary amines; and cyclic amines, such as piperidine, morpholine, and piperazine; as well as inorganic salts derived from sodium, calcium, potassium, magnesium, manganese, iron, copper, zinc, aluminum, and lithium.

In the case of compounds, salts, or solvates that are solids, it is understood by those skilled in the art that the compounds of formula I and the intermediates used in the process of the present invention, salts, and solvates thereof, may exist in different crystal forms, all of which are intended to be within the scope of the present invention and specified formulas.

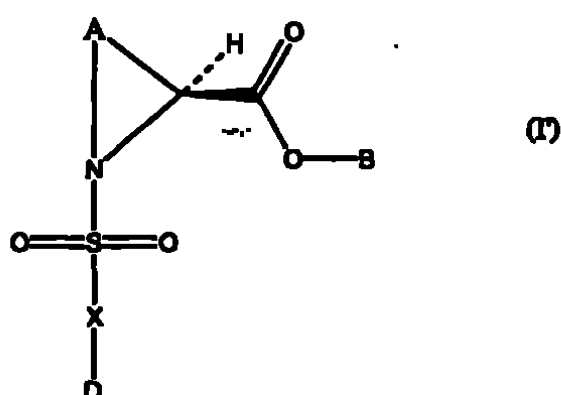
The neurotrophic compounds of formula I, and the intermediates used in the process of the present invention, may exist as single stereoisomers, racemates, and/or mixtures of enantiomers and/or diastereomers. All such single stereoisomers, racemates, and mixtures thereof are intended to be within the broad scope of the present invention. Preferably, however, the intermediate compounds used in the process of the present invention are used in optically pure form.

As generally understood by those skilled in the art, an optically pure compound is one that is enantiomerically pure. As used herein, the term "optically pure" is intended to mean a compound comprising at least a sufficient amount of a

single enantiomer to yield a compound having the desired pharmacological activity. Preferably, "optically pure" is intended to mean a compound that comprises at least 90% of a single isomer (80% enantiomeric excess (e.e.)), more preferably at least 95% (90% e.e.), even more preferably at least 97.5% (95% e.e.), and most preferably at least 99% (98% e.e.). Preferably, the neurotrophic compounds of formula I of the present invention are optically pure.

Neurotrophic compounds of the invention are represented by the formula (I) defined above. Preferably, the neurotrophic compounds inhibit the rotamase (peptidyl-prolyl isomerase) enzyme activity of FKBP, in particular, FKBP12. In addition to compounds of the formula (I), neurotrophic compounds of the invention include pharmaceutically acceptable derivatives of such compounds, such as prodrugs, pharmaceutically active metabolites, and pharmaceutically acceptable salts or solvates thereof.

Particularly preferred are compounds of the formula (I')



wherein A, B, D, E and X are as previously defined for the compound of formula (I).

In the above definitions of the compounds of formulas (I) and (I'), the following definitions are preferred.

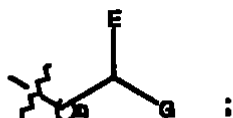
114
X/5

115 ~~114~~

Preferably, A is an unbranched C₃-C₅ alkylene group wherein any one of the CH₂ groups of the alkylene group is optionally substituted by S.

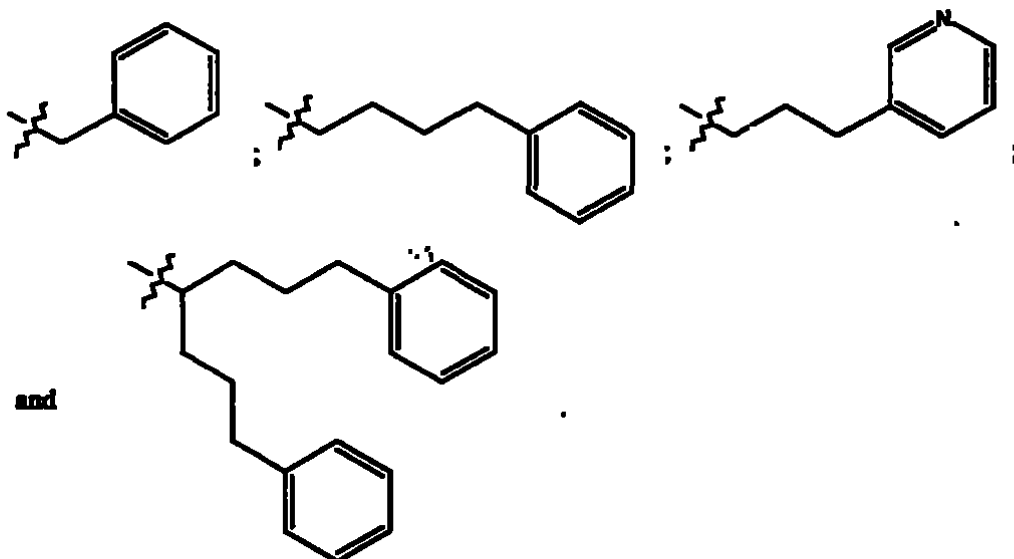
More preferably, A is an unbranched unsubstituted C₃ or C₄ alkylene group (i.e., 1,3-propylene or 1,4-butylene). Most preferably, A is C₄ alkylene.

Preferably, B is



wherein E is selected from the group consisting of H, benzyl, 3-pyridyl, 2-phenylethyl and 3-phenylpropyl; G is selected from the group consisting of phenyl, 3-pyridyl, 3-phenylpropyl, 3-phenoxyphenyl and 4-phenoxyphenyl; and n is 0-4.

More preferably B is selected from the group consisting of:



Preferably, D is selected from the group consisting of phenyl, 4-methylphenyl, 4-methoxyphenyl, 2-thienyl, 2,4,6-triisopropylphenyl, 4-fluorophenyl, 3-methoxyphenyl, 2-methoxyphenyl, 3,5-dimethoxyphenyl, 3,4,5-trimethoxyphenyl, methyl, 1-naphthyl, 8-quinolyl, 1-(5-N,N-dimethylamino)-naphthyl, 4-iodophenyl,

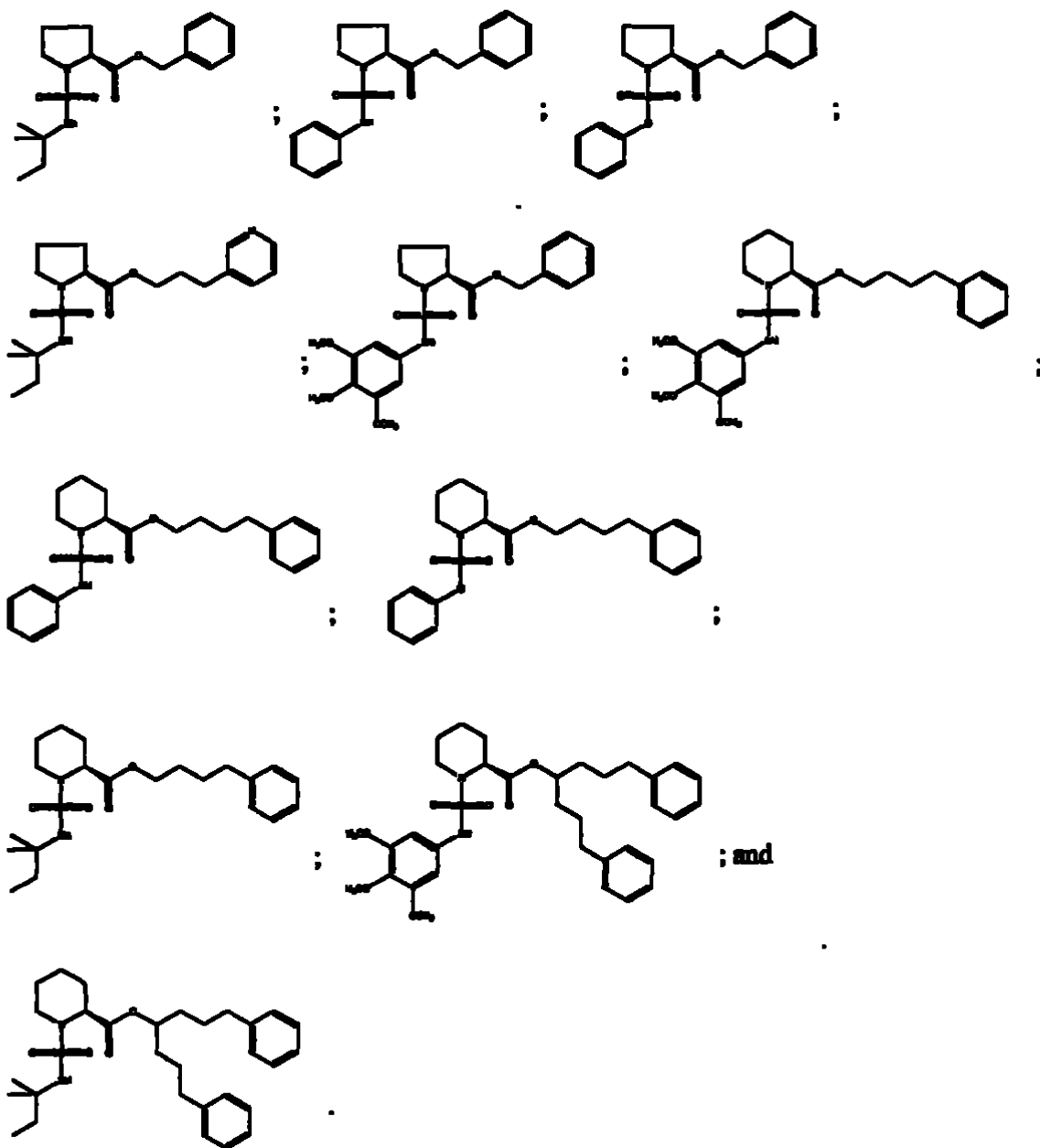
2,4,6-trimethylphenyl, benzyl, 4-nitrophenyl, 2-nitrophenyl, 4-chlorophenyl, 1,1-dimethylpropyl and E-styrenyl.

Even more preferably D is selected from the group consisting of phenyl, 1,1-dimethylpropyl and 3,4,5-trimethoxyphenyl.

Preferably, X is NH or O.

Especially preferred species of compounds represented by the above formula

(I) are the following:



117
116

The compounds of the invention also include pharmaceutically acceptable derivatives of compounds of the formula (I). A "pharmaceutically acceptable derivative" denotes a prodrug, pharmaceutically active metabolite, or pharmaceutically acceptable salt, ester, salt of such ester, or hydrate of a compound of this invention. Such compounds, when administered to a patient, are capable of directly or indirectly yielding a compound of this invention, or a metabolic residue or product thereof, and thereby inhibit FKBP rotamase activity or promote or augment neurite outgrowth.

The compounds of formula (I) and may be used in pharmaceutical compositions in the form of pharmaceutically acceptable salts. Such salts are preferably derived from inorganic or organic acids and bases. Exemplary acid salts include acetate, adipate, alginate, aspartate, benzoate, benzenesulfonate, bisulfate, butyrate, citrate, camphorate, camphorsulfonate, cyclopentanepropionate, digluconate, dodecylsulfate, ethanesulfonate, fumarate, glucoheptanoate, glycerophosphate, hemisulfate, heptanoate, hexanoate, hydrochloride, hydrobromide, hydroiodide, 2-hydroxyethanesulfonate, lactate, maleate, methanesulfonate, 2-naphthalenesulfonate, nicotinate, oxalate, pamoate, pectinate, persulfate, 3-phenylpropionate, picrate, pivalate, propionate, succinate, tartrate, thiocyanate, tosylate, and undecanoate. Exemplary base salts include ammonium salts, alkali metal salts, such as sodium and potassium salts, alkaline earth metal salts, such as calcium and magnesium salts, salts with organic bases, such as dicyclohexylamine salts, N-methyl-D-glucosamine salt, and salts with amino acids such as arginine and lysine. Also, the basic nitrogen-containing groups can be quaternized with such agents as: lower alkyl halides, such as methyl, ethyl, propyl, and butyl chlorides, bromides or iodides; dialkyl sulfates,

118
X

such as dimethyl, diethyl, dibutyl, and diamyl sulfates; long-chain halides such as decyl, lauryl, myristyl and stearyl chlorides, bromides, and iodides; and aralkyl halides, such as benzyl and phenethyl bromides. Water- or oil-soluble or dispersible products may be prepared from such salts.

In addition, the compounds of the invention may be modified by appending appropriate functionalities to enhance selective biological properties. Such modifications, which are within the purview of the ordinarily skilled artisan, include those increasing biological penetration into a given biological system (e.g., blood, lymphatic system, central nervous system), increasing oral availability, increasing solubility to allow administration by injection, altering metabolism, and altering rate of excretion.

Some of the compounds described herein contain one or more centers of asymmetry and may thus give rise to enantiomers, diastereoisomers, rotamers, and other stereoisomeric forms. The present invention is meant to include all such possible stereoisomers as well as their racemic and optically pure forms. Optically active (R) and (S) isomers may be prepared using chiral synthons or chiral reagents, or resolved using conventional techniques. When the compounds described herein contain olefinic double bonds, they are intended to include both E and Z geometric isomers.

Moreover, the chemical formulae referred to herein may exhibit the phenomenon of tautomerism. As the formulae drawings within this specification can only represent one of the possible tautomeric forms, it should be understood that the invention encompasses any tautomeric form that can be generated by employing the tools disclosed or in a known manner, and is not limited to any one tautomeric form depicted by the formulae.

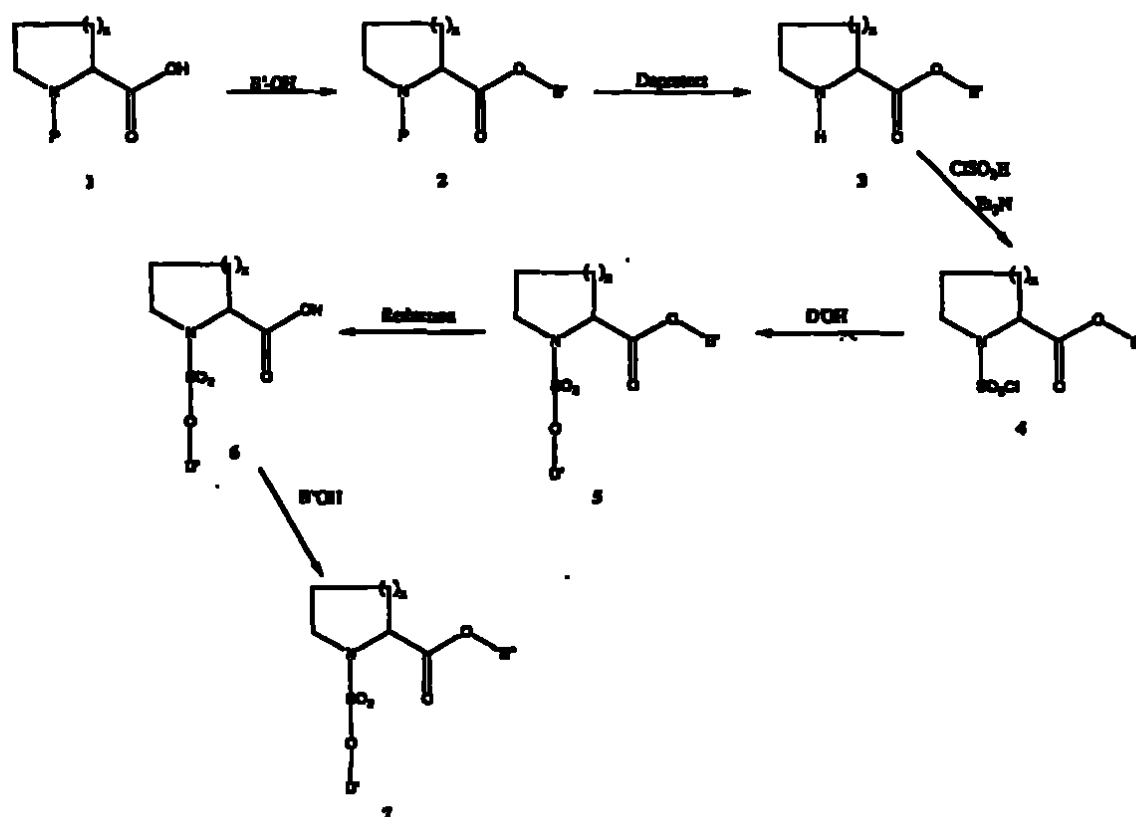
EXAMPLES:

The following examples are illustrative of the present invention and are not intended to be limitations thereon. Unless otherwise specified, all percentages are based on 100% by weight of the final compound.

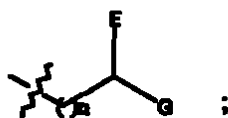
The compounds of the present invention may be readily prepared by standard techniques of organic chemistry, utilizing the general synthetic pathways depicted below. The oxy sulfonyl compounds of the present invention may be prepared in the manner depicted in Scheme 1 below. As described in Scheme.1, amino acids 1 protected by suitable blocking groups P on the amino acid nitrogen may be reacted with alcohols B'OH to generate esters 2. After removal of the protecting group, the free amine may be reacted with chlorosulfonic acid to provide the chlorosulfonyl 4. The chlorosulfonyl 4 may then be reacted with various alcohols D'OH to provide a final product 5. Depending on the structure of the final product being synthesized, it may prove to be more efficient to prepare a compound of formula 5, and then substitute the B' group with an B'' group. This may be carried out as depicted in Scheme 1, wherein the product 5 is reduced to the corresponding alcohols 6 which may then be reacted with alcohols B''OH to provide final products 7.

120
X/g

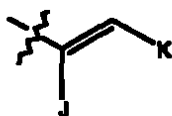
Scheme 1



In the compounds depicted above in Scheme 1, B' and B'' are independently:



wherein E and G are independently Ar, H, C₁-C₆ straight or branched alkyl, C₁-C₆ straight or branched alkenyl, C₁-C₆ straight or branched alkyl or alkenyl that is substituted with a C₅-C₇ cycloalkyl, C₁-C₆ straight or branched alkyl or alkenyl that is substituted with a C₃-C₇ cycloalkenyl, or Ar substituted C₁-C₆ straight or branched alkyl or alkenyl, wherein, in each case, one or two of the CH₂ groups of the alkyl or alkenyl chains may contain 1-2 heteroatoms selected from the group consisting of oxygen, sulfur, SO and SO₂ in chemically reasonable substitution patterns, or



121

20

provided that both B' or B'' and D' are not H; J is H, C₁-C₆ straight or branched alkyl or C₁-C₆ straight or branched alkenyl;

K is Ar or substituted 5-7 membered cycloalkyl with substituents at positions 3 and 4 which are independently selected from the group consisting of H, OH,

-O-(CH₂)_m-alkyl, -O-(CH₂)_m-alkenyl and carbonyl, wherein m is 1-4;

Ar is selected from the group consisting of phenyl, 1-naphthyl, 2-naphthyl, 2-furyl, 3-furyl, 2-thienyl, 3-thienyl, 2-pyridyl, 3-pyridyl, 4-pyridyl, monocyclic and bicyclic heterocyclic ring systems with individual ring sizes being 5 or 6 which may contain in either or both rings a total of 1-4 heteroatoms independently selected from O, N and S; wherein Ar may contain one to three substituents which are independently selected from the group consisting of hydrogen, halo, hydroxyl, nitro, trifluoromethyl, trifluoromethoxy, C₁-C₆ straight or branched alkyl, C₂-C₆ straight or branched alkenyl, O-(C₁-C₄ straight or branched alkyl), O-(C₂-C₄ straight or branched alkenyl), O-benzyl, O-phenyl, 1,2-methylenedioxy, amino, carboxyl and phenyl;

n is 0 to 4;

D' is C₁-C₆ straight or branched alkyl, C₁-C₆ straight or branched alkenyl, C₃-C₇ cycloalkyl, C₃-C₇ cycloalkenyl substituted with C₁-C₄ straight or branched alkyl or C₁-C₄ straight or branched alkenyl, [(C₂-C₄)-alkyl or (C₂-C₄)-alkenyl]-Ar or Ar; and

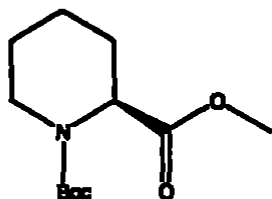
x is 0-1.

The following compounds were prepared according to the general Scheme 1 depicted above:

EXAMPLE 1

Synthesis of 1-Phenoxy sulfonyl-piperidine-2S-carboxylic acid 4-phenyl-butyl ester

Step 1: Synthesis of piperidine-1,2S-dicarboxylic acid 1-*tert*-butyl ester 2S-methyl ester (compound 8):



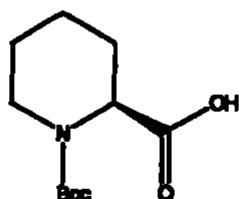
Compound 8 was prepared from racemic pipecolic acid via the published procedures. See R.F. Nutt et al., J. Med. Chem., 24, pp. 692-698 (1981) and C.H. Davies et al., Synth. Comm., 26 (4), pp. 687-696 (1996). These references are herein incorporated by reference.

Spectral analysis were consistent with the desired product:

^1H NMR (CDCl_3): δ 4.92 and 4.75 (1H, 2 s for two rotamers), 4.0-3.8 (1H, m), 3.74 (3H, s), 3.0-2.7 (1H, m), 2.15 (1H, m), 1.44 (9H, br s).

MS (FAB): 244 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

Step 2: Synthesis of piperidine-1,2S-dicarboxylic acid 1-*tert*-butyl ester (compound 9):



To a methanol solution (25mL) of compound 8 (28g, 0.115 mol) was added 2N sodium hydroxide solution (25 mL) at 25 $^{\circ}\text{C}$. After about 20 hours, the solution

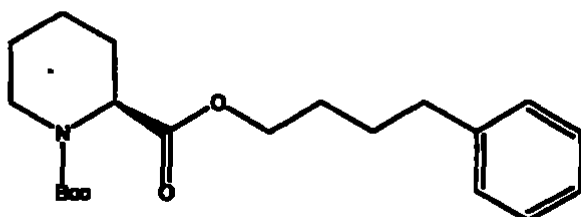
123
722

was concentrated and acidified to a pH of about 2 by the addition of 10% hydrochloric acid (ice-cold). The suspension was extracted with EtOAc (ethyl acetate) (3x100 mL). The combined organic layers were then washed with saturated sodium chloride solution (1x150mL) and dried over sodium sulfate. Evaporation afforded 27g (quantitative) pale-yellow solid.

Spectral analysis of the pale-yellow solid were consistent with compound 8:

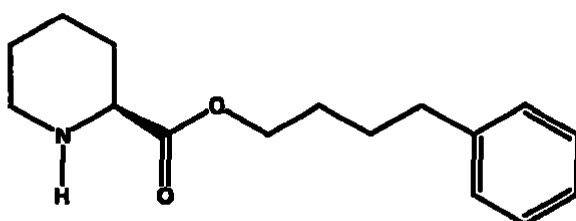
^1H NMR (CDCl_3): δ 4.92 and 4.77 (1H, 2 s for two rotamers), 4.1-3.8 (1H, m), 3.1-2.8 (1H, m), 2.3-2.2 (1H, m), 1.41 (9H, br s).

Step 3: Synthesis of piperidine-1,2S-dicarboxylic acid 1-*tert*-butyl ester 2S-(4-phenyl-butyl) ester (compound 10):



To a CH_2Cl_2 solution of compound 9 and 1-phenyl-butan-4-ol was added DCC (4.62 g, 22.4 mmol) and DMAP at about 25 $^\circ\text{C}$. After several hours, the suspension was filtered and the filtrate was concentrated. The crude oil was passed through a pad of silica gel (5% EtOAc in hexanes) to provide compound 10.

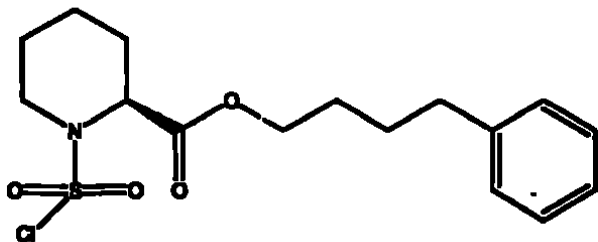
Step 4: Synthesis of piperidine-2S-carboxylic acid 4-phenyl-butyl ester (compound 11):



124
125

To a CH_2Cl_2 solution of compound 10 was added trifluoroacetic acid slowly at about 25 °C. After about several hours, the CH_2Cl_2 and trifluoroacetic acid were removed in vacuo and the residue redissolved in CHCl_3 . The resulting solution was then washed with saturated Na_2CO_3 and dried with Na_2SO_4 . Evaporation yielded compound 11.

Step 5: Synthesis of 1-chlorosulfonyl-piperidine-2S-carboxylic acid 4-phenyl-butyl ester (compound 12):



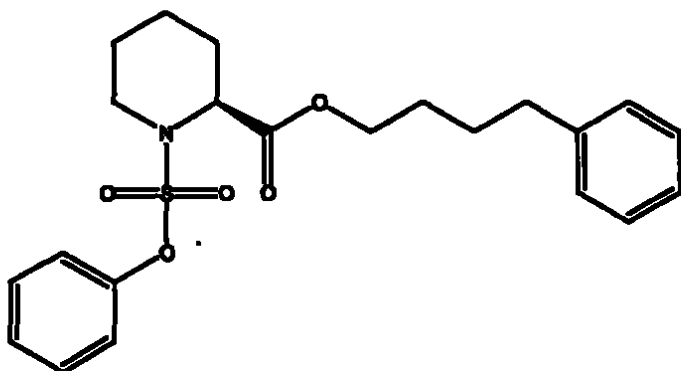
To a CH_2Cl_2 solution of compound 11 was added Et_3N and ClSO_3H slowly. The mixture was allowed to warm to about 25 °C and stirred at that temperature for several hours. The solution was then concentrated in vacuo after which benzene was added and evaporated to remove trace amounts of Et_3N and water. The residue was added to benzene and PCl_5 . The suspension was heated at reflux for about 30 minutes, then cooled to about 25 °C and poured into an ice-cold sodium hydroxide solution. The aqueous mixture was extracted with EtOAc . The combined organic layers were washed with a saturated NaHCO_3 solution, dried over sodium sulfate and concentrated. The residue was purified by column chromatography (5% EtOAc in hexanes) affording compound 12.

Spectral analysis of the product was consistent with compound 12:

^1H NMR (CDCl_3): δ 7.3-7.1 (5H, m), 4.74 (1H, m), 4.2-4.1 (2H, m), 3.88 (1H, d, $J=11$ Hz), 2.7-2.5 (2H, m), 2.12 (1H, m), 1.88 (1H, m).

HRMS (FAB): calculated: 360.1036; found 360.1033.

Step 6: Synthesis of 1-phenoxy sulfonyl-piperidine-2S-carboxylic acid 4-phenyl-butyl ester (compound 13):



At about 0 °C, an ethylene glycol dimethyl ether solution (1 mL) of compound 12 (100 mg, 0.28 mmol) and phenol (58 mg, 0.62 mmol) was added NaH (16 mg, 90%, 0.62 mmol) in three portions. The resulting suspension was then stirred at about 25 °C for 1 hour and poured into a saturated ice-cold NH₄Cl solution (10 mL). The aqueous mixture was extracted with EtOAc (2x20 mL). The combined organic layers were then dried over sodium sulfate and concentrated. The residue was purified by column chromatography (CH₂Cl₂) to yield 11.3 mg (10%) of a colorless oil.

Spectral analysis of the colorless oil was consistent with compound 13:

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.4-7.1 (10H, m), 4.50 (1H, m), 4.12 (2H, m), 3.68 (1H, dd, J=11, 1.6 Hz), 3.39 (1H, td, J=11, 1.7 Hz), 2.6-2.5 (2H, m), 2.07 (1H, d, J=10.8 Hz).

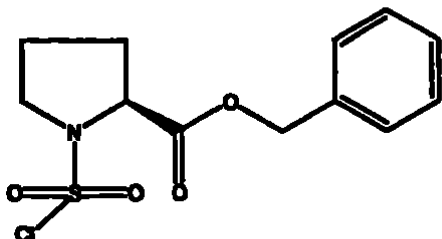
MS (FAB): 418 (M⁺+H)

HRMS (FAB): calculated: 440.1508; found 440.1520.

EXAMPLE 2

Synthesis of 1-Phenoxy sulfonyl-pyrrolidine-2S-carboxylic acid benzyl ester

Step 1: Synthesis of 1-chlorosulfonyl-pyrrolidine-2S-carboxylic acid benzyl ester
(compound 14):



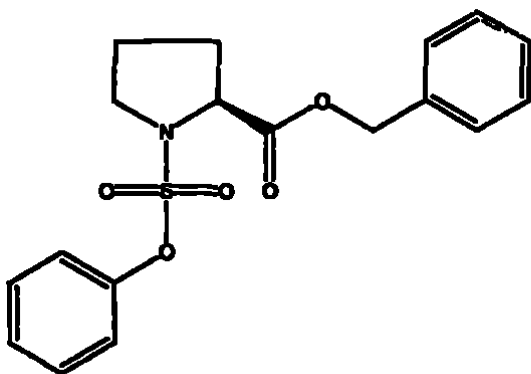
Compound 14 was prepared from pyrrolidine-2-carboxylic acid benzyl ester (commercially available from BACHEM) in a manner analogous to the synthetic method of Example 1—Step 5 set forth above. An 87% yield of compound 14 was obtained.

Spectral analysis of the product was consistent with compound 14:

^1H NMR (CDCl_3): δ 7.4-7.1 (5H, m), 5.12 (3H, s), 4.40 (1H, m), 3.67 (1H, m), 3.49 (1H, m).

MS (FAB): 326 ($\text{M}^+ + \text{Na}$), 321 ($\text{M}^+ + \text{NH}_4$).

Step 2: Synthesis of 1-phenoxy sulfonyl-pyrrolidine-2S-carboxylic acid benzyl ester
(compound 15):



127 128

Compound 15 was prepared from compound 14 in a manner analogous to the synthetic method of Example 1—Step 6 set forth above. An 8% yield of compound 15 was obtained.

Spectral analysis of the product was consistent with compound 15:

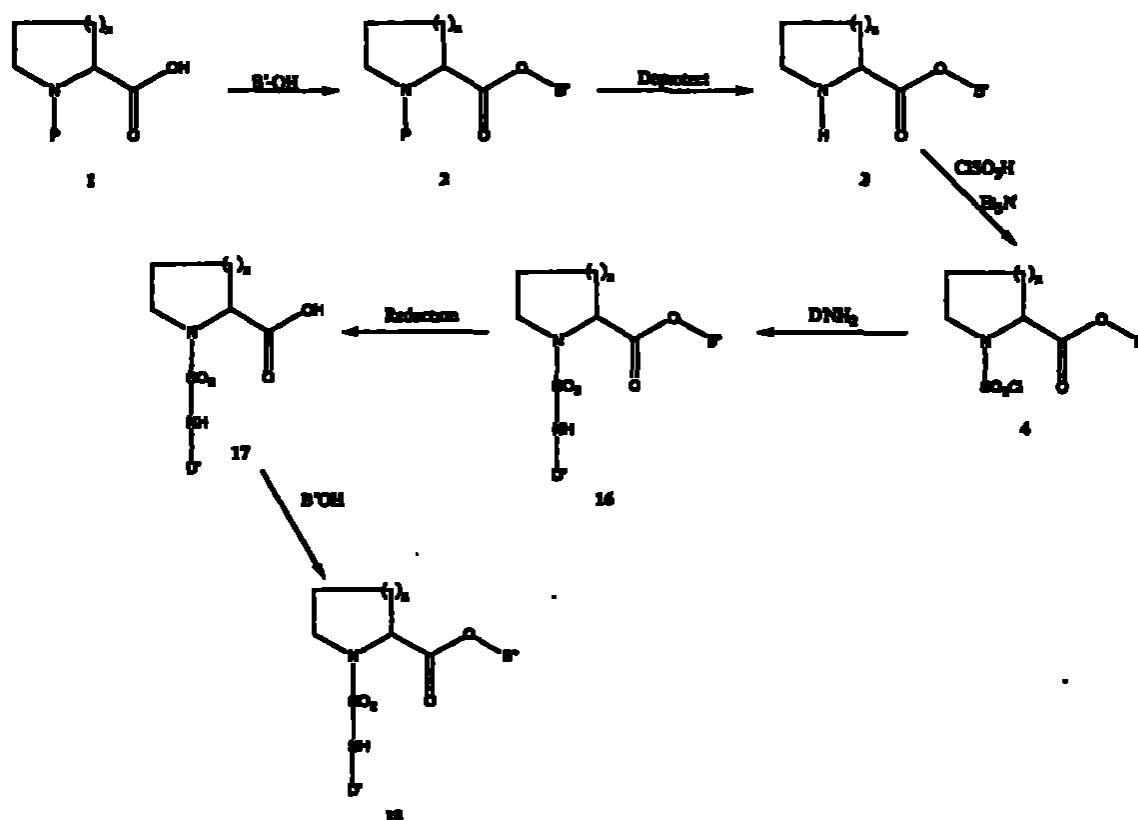
^1H NMR (CDCl_3): δ 7.5-7.2 (10H, m), 5.13 (2H, s), 4.46 (1H, m), 3.7-3.5 (2H, m), 2.4-1.9 (4H, m).

HRMS (FAB): calculated: 362.1062; found: 362.1070.

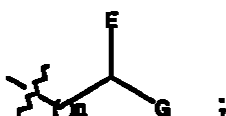
60168246 20199

The sulfamoyl compounds of the present invention may be prepared in the manner depicted in Scheme 2 below. As described in Scheme 2, amino acids 1 protected by suitable blocking groups P on the amino acid nitrogen may be reacted with alcohols B'OH to generate esters 2. After removal of the protecting group, the free amine may be reacted with chlorosulfonic acid to provide the chlorosulfonyl 4. The chlorosulfonyl 4 may then be reacted with various amines D'NH₂ to provide a final product 16. Depending on the structure of the final product being synthesized, it may prove to be more efficient to prepare a compound of formula 16, and then substitute the B' group with an B'' group. This may be carried out as depicted in Scheme 2, wherein the product 16 is reduced to the corresponding alcohols 17 which may then be reacted with alcohols B''OH to provide final products 18.

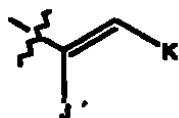
Scheme 2



In the compounds depicted above in Scheme 2, B' and B'' are independently:



wherein E and G are independently Ar, H, C₁-C₆ straight or branched alkyl, C₁-C₆ straight or branched alkenyl, C₁-C₆ straight or branched alkyl or alkenyl that is substituted with a C₅-C₇ cycloalkyl, C₁-C₆ straight or branched alkyl or alkenyl that is substituted with a C₅-C₇ cycloalkenyl, or Ar substituted C₁-C₆ straight or branched alkyl or alkenyl, wherein, in each case, one or two of the CH₂ groups of the alkyl or alkenyl chains may contain 1-2 heteroatoms selected from the group consisting of oxygen, sulfur, SO and SO₂ in chemically reasonable substitution patterns, or



129
(28)

provided that both B' or B'' and D' are not H; J is H, C₁-C₆ straight or branched alkyl or C₁-C₆ straight or branched alkenyl;

K is Ar or substituted 5-7 membered cycloalkyl with substituents at positions 3 and 4 which are independently selected from the group consisting of H, OH,

-O-(CH₂)_m-alkyl, -O-(CH₂)_m-alkenyl and carbonyl, wherein m is 1-4;

Ar is selected from the group consisting of phenyl, 1-naphthyl, 2-naphthyl, 2-furyl, 3-furyl, 2-thienyl, 3-thienyl, 2-pyridyl, 3-pyridyl, 4-pyridyl, monocyclic and bicyclic heterocyclic ring systems with individual ring sizes being 5 or 6 which may contain in either or both rings a total of 1-4 heteroatoms independently selected from O, N and S; wherein Ar may contain one to three substituents which are independently selected from the group consisting of hydrogen, halo, hydroxyl, nitro, trifluoromethyl, trifluoromethoxy, C₁-C₆ straight or branched alkyl, C₂-C₆ straight or branched alkenyl, O-(C₁-C₄ straight or branched alkyl), O-(C₂-C₄ straight or branched alkenyl), O-benzyl, O-phenyl, 1,2-methylenedioxy, amino, carboxyl and phenyl;

n is 0 to 4;

D' is C₁-C₆ straight or branched alkyl, C₁-C₆ straight or branched alkenyl, C₅-C₇ cycloalkyl, C₅-C₇ cycloalkenyl substituted with C₁-C₄ straight or branched alkyl or C₁-C₄ straight or branched alkenyl, [(C₂-C₄)-alkyl or (C₂-C₄)-alkenyl]-Ar or Ar; and

x is 0-1.

The following compounds were prepared according to the general Scheme 2 depicted above:

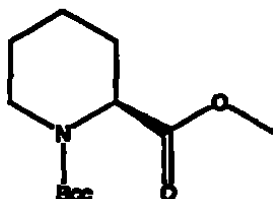
130

29

EXAMPLE 3

Synthesis of 1-(3,4,5-Trimethoxy-phenylsulfamoyl)-piperidine-2S-carboxylic acid 4-phenyl-1(3-phenyl-propyl)-butyl ester

Step 1: Synthesis of piperidine-1,2S-dicarboxylic acid 1-*tert*-butyl ester 2S-methyl ester (compound 8):



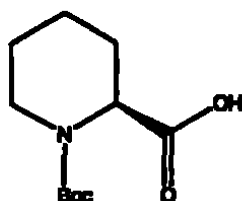
Compound 8 was prepared from racemic pipecolic acid via the published procedures. See R.F. Nutt et al., J. Med. Chem., 24, pp. 692-698 (1981) and C.E. Davies et al., Synth. Comm., 26 (4), pp. 687-696 (1996). These references are herein incorporated by reference.

Spectral analysis were consistent with the desired product:

¹H NMR (CDCl₃): δ 4.92 and 4.75 (1H, 2 s for two rotamers), 4.0-3.8 (1H, m), 3.74 (3H, s), 3.0-2.7 (1H, m), 2.15 (1H, m), 1.44 (9H, br s).

MS (FAB): 244 (M⁺+H).

Step 2: Synthesis of piperidine-1,2S-dicarboxylic acid 1-*tert*-butyl ester (compound 9):

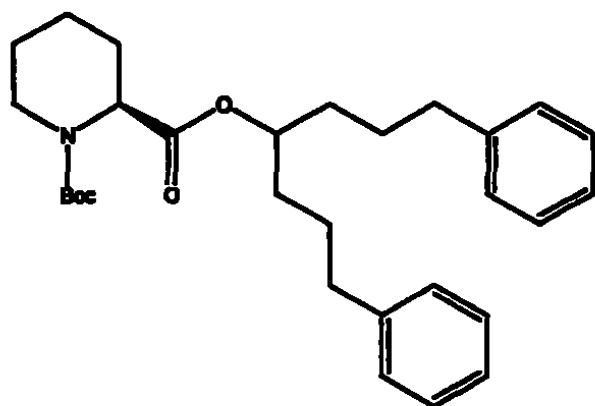


131
-120

To a methanol solution (25mL) of compound 8 (28g, 0.115 mol) was added 2N sodium hydroxide solution (25 mL) at 25 °C. After about 20 hours, the solution was concentrated and acidified to a pH of about 2 by the addition of 10% hydrochloric acid (ice-cold). The suspension was extracted with EtOAc (3x100 mL). The combined organic layers were then washed with saturated sodium chloride solution (1x150mL) and dried over sodium sulfate. Evaporation afforded 27g (quantitative) pale-yellow solid.

Spectral analysis of the pale-yellow solid were consistent with compound 8: ¹H NMR (CDCl₃): δ 4.92 and 4.77 (1H, 2 s for two rotamers), 4.1-3.8 (1H, m), 3.1-2.8 (1H, m), 2.3-2.2 (1H, m), 1.41 (9H, br s).

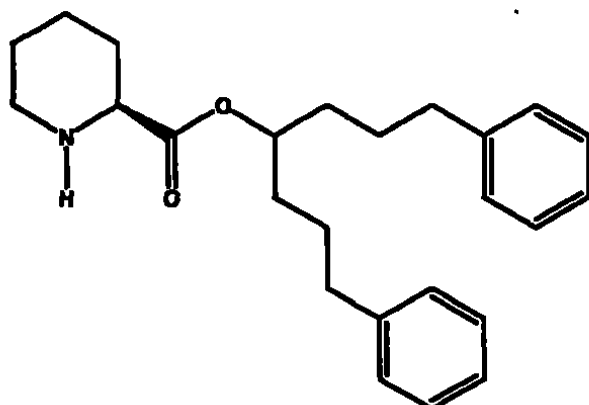
Step 3: Synthesis of piperidine-1,2S-dicarboxylic acid 1-*tert*-butyl ester 2S-[4-phenyl-1-(3-phenyl-propyl)-butyl] ester (compound 19):



To a CH₂Cl₂ solution (100 mL) of compound 9 (2.22 g, 9.7 mmol) and 1,7-diphenyl-heptan-4-ol (2 g, 7.5 mmol) was added DCC (4.62 g, 22.4 mmol) and DMAP (0.55g, 4.5 mmol) at 25 °C. After about 2.5 hours, the suspension was filtered and the filtrate was concentrated. The crude oil was passed through a pad of silica gel (5% EtOAc in hexanes) to provide 3.6 g (quantitative) of colorless oil (compound 19).

Step 4: Synthesis of piperidine-2S-carboxylic acid 4-phenyl-1-(3-phenyl-propyl)-butyl ester (compound 20):

132
131

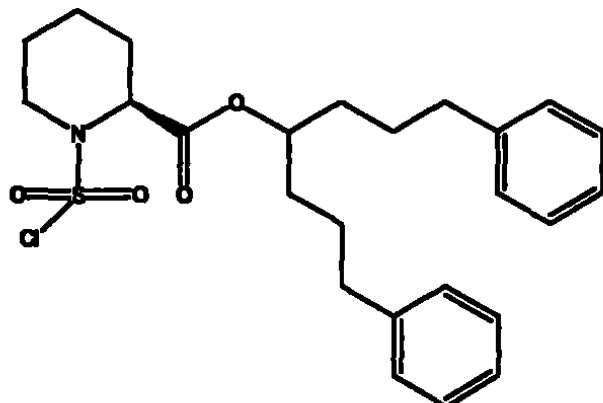


To a CH_2Cl_2 solution (10 mL) of compound 19 was added trifluoroacetic acid (3 mL) slowly at 25 °C. After about 4 hours, the CH_2Cl_2 and trifluoroacetic acid were removed in vacuo and the residue redissolved in CHCl_3 (100 mL). The resulting solution was then washed with saturated Na_2CO_3 (2x50 mL) and dried with Na_2SO_4 . Evaporation yielded 3 g (95%) of a pale yellow oil (compound 20).

Spectral analysis of the pale-yellow oil was consistent with compound 20:
 ^1H NMR (CDCl_3): δ 7.3-7.0 (10H, 2 m), 4.92 (1H, m), 3.22 (1H, m), 3.00 (1H, m), 12.7-2.4 (5H, m).

133 132

Step 5: Synthesis of 1-chlorosulfonyl-piperidine-2S-carboxylic acid 4-phenyl-1-(3-phenyl-propyl)-butyl ester (compound 21):



667027120399

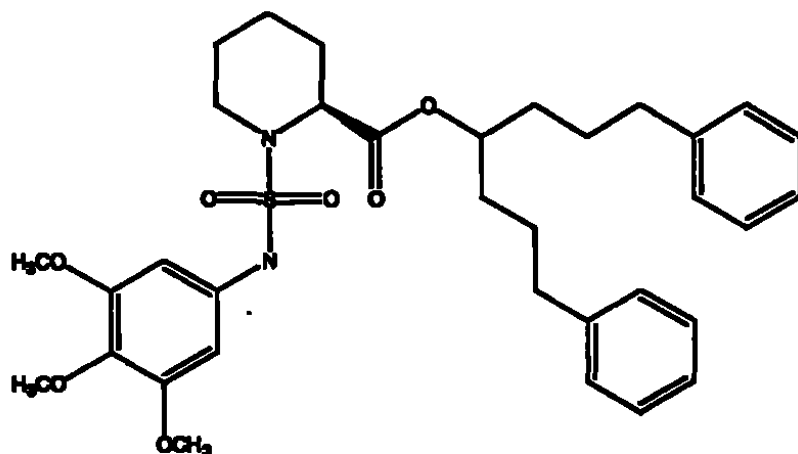
To a CH_2Cl_2 solution (70 mL) of compound 20 (2.75 g, 7.3 mmol) was added Et_3N (2 mL) and ClSO_3H (0.97 g, 8.3 mmol) slowly. The mixture was allowed to warm to about 25 °C and stirred at that temperature for about 2 hours. The solution was then concentrated in *vacuo* after which benzene (2x20 mL) was added and evaporated to remove trace amounts of Et_3N and water. The residue was added to benzene (20 mL) and PCl_5 (1.97 g, 9.4 mmol). The suspension was heated at reflux for about 30 minutes, then cooled to about 25 °C and poured into an ice-cold sodium hydroxide solution (50 mL). The aqueous mixture was extracted with EtOAc (2x75 mL). The combined organic layers were washed with a saturated NaHCO_3 solution (1x100 mL), dried over sodium sulfate and concentrated. The residue was purified by column chromatography (5% EtOAc in hexanes) affording 2.2 g (63%) of a yellow oil.

Spectral analysis of the yellow oil was consistent with compound 21:

^1H NMR (CDCl_3): δ 7.4-7.1 (10H, m), 5.05 (1H, m), 4.8 (1H, m), 3.98 (1H, m), 3.7-3.5 (1H, m), 2.7-2.5 (4H, m), 2.18 (1H, m), 1.95 (1H, m).

134 137

Step 6: Synthesis of 1-(3,4,5-trimethoxy-phenylsulfamoyl)-piperidine-2S-cardoxylic acid 4-phenyl-1-(3-phenyl-propyl)-butyl ester (compound 22):



6016 248 120199

To a pyridine solution (1.5 mL) of 3,4,5-trimethoxyaniline (115 mg, 0.53 mmol) was added compound 21 (100 mg, 0.21 mmol) in CH_2Cl_2 (1 mL) at about 25 °C. After about 6 hours, the suspension was washed with ice-cold 5% HCl solution (1x50 mL) and saturated copper sulfate solution (2x50 mL). After removal of the solvent, the residue was purified by column chromatography (3.5% CH_3OH in CH_2Cl_2) to yield 35 mg (27%) of a pale yellow oil.

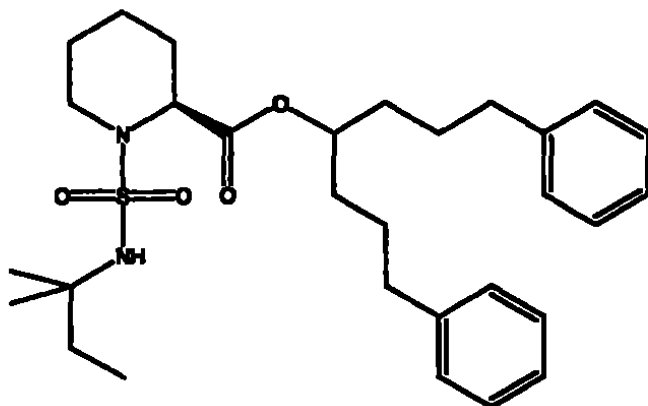
Spectral analysis of the oil was consistent with compound 22:

^1H NMR (CDCl_3): δ 7.3-7.1 (11H, m), 6.48 (2H, m), 5.07 (1H, m), 4.76 (1H, m), 3.83 (6H, s), 3.81 (3H, s), 3.69 (1H, d, $J=11.2$ Hz), 3.10 (1H, td, $J=11, 1.9$ Hz), 2.61 (4H, m), 2.23 (1H, d, $J=10.9$ Hz).

HRMS (FAB): calculated: 625.2947; found 625.2962.

EXAMPLE 4

Synthesis of 1-(1,1-Dimethyl-propylsulfamoyl)-piperidine-2S-carboxylic acid 4-phenyl-1-(3-phenyl-propyl)-butyl ester (compound 23):



Compound 23 was prepared from compound 21 by a synthetic method analogous to that of Example 3--Step 6. A 9% yield was obtained.

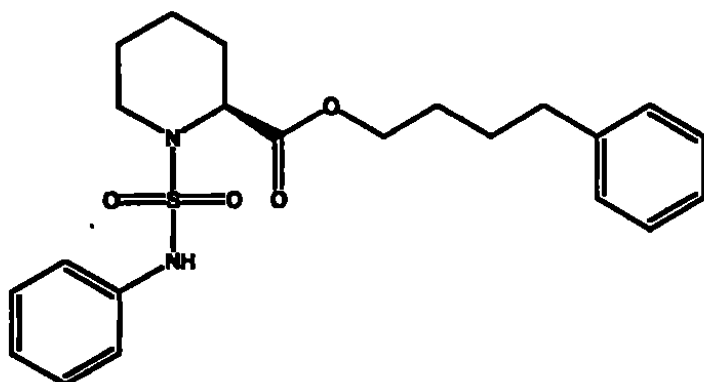
Spectral analysis of the product was consistent with compound 23:

^1H NMR (CDCl_3): δ 7.3-7.1 (10H, m), 5.02 (1H, m), 4.98 (1H, s), 4.71 (1H, d, $J=1.8$ Hz), 3.65 (1H, d, $J=11.0$ Hz), 3.02 (1H, td, $J=11, 1.7$ Hz), 2.60 (4H, m), 2.20 (1H, d, $J=11.9$ Hz), 1.29 (6H, s), 0.86 (3H, t, $J=6.4$ Hz).

HRMS (FAB): calculated: 529.3100; found 529.3113.

EXAMPLE 5

Synthesis of 1-Phenylsulfamoyl-piperidine-2S-carboxylic acid 4-phenyl-butyl ester
(compound 24):



Compound 24 was prepared from compound 12 by a synthetic method analogous to that of Example 3—Step 6. A 33% yield was obtained.

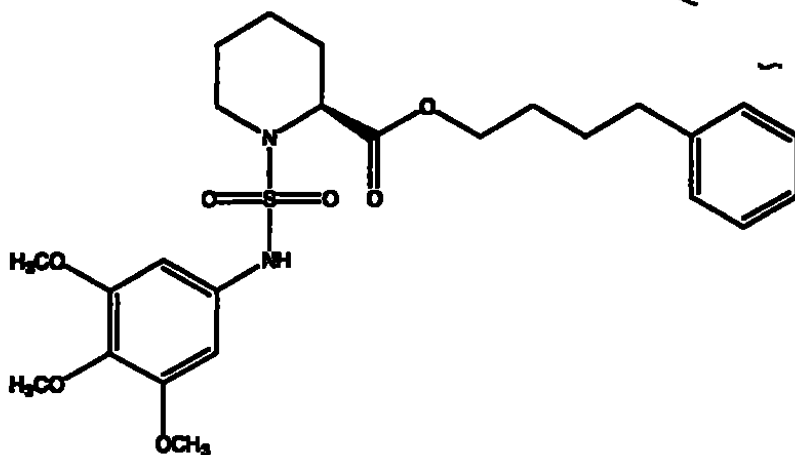
Spectral analysis of the product was consistent with compound 24:

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.3-7.0 (11H, m), 4.69 (1H, m), 4.2-4.1 (2H, m), 3.58 (1H, d, J=10.6 Hz), 3.01 (1H, td, J=10.6, 1.7 Hz), 2.6-2.5 (2H, m), 2.18 (1H, d, J=11.7 Hz).

HRMS (FAB): calculated: 417.1848; found 417.1838.

EXAMPLE 6

Synthesis of 1-(3,4,5-Trimethoxy-phenylsulfamoyl-piperidine-2S-carboxylic acid 4-phenyl-butyl ester (compound 25):



137 136

Compound 25 was prepared from compound 12 by a synthetic method analogous to that of Example 3—Step 6. A 13% yield was obtained.

Spectral analysis of the product was consistent with compound 25:

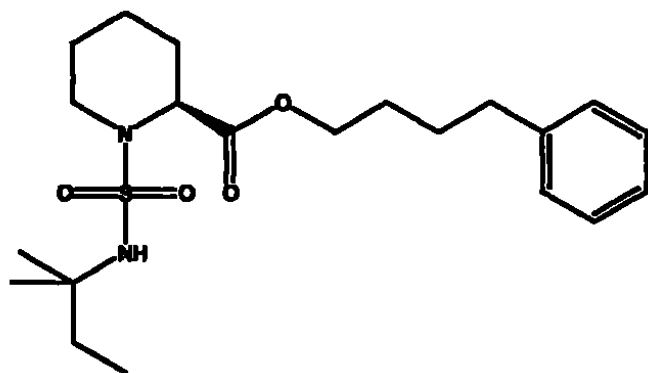
^1H NMR (CDCl_3): δ 7.3-7.1 (6H, m), 6.42 (2H, s), 4.69 (1H, m), 4.2-4.1 (1H, m), 3.78 (6H, s), 3.76 (3H, s), 3.63 (1H, d, $J=10.8$ Hz), 3.02 (1H, td, $J=10.8, 1.8$ Hz), 2.6 (2H, m), 2.19 (1H, d, $J=11.9$ Hz).

MS (FAB): 506 (M^+).

HRMS (FAB): calculated: 639.1141; found 639.1124.

EXAMPLE 7

Synthesis of 1-(1,1-Dimethyl-propylsulfamoyl)-piperidine-2S-carboxylic acid 4-phenyl-butyl ester (compound 26):



Compound 26 was prepared from compound 12 by a synthetic method analogous to that of Example 3—Step 6. A 38% yield was obtained.

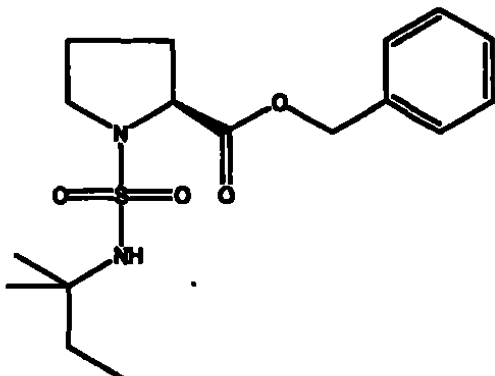
Spectral analysis of the product was consistent with compound 26:

^1H NMR (CDCl_3): δ 7.3-7.1 (5H, m), 4.9 (1H, s), 4.63 (1H, d, $J=2.3$ Hz), 4.2-4.0 (1H, m), 3.58 (1H, d, $J=10.7$ Hz), 2.92 (1H, td, $J=10.7, 1.8$ Hz), 2.6-2.5 (2H, m), 2.14 (1H, d, $J=11.8$ Hz), 1.22 (6H, s), 0.82 (3H, t, $J=6.6$ Hz).

HRMS (FAB): calculated: 411.2318; found 411.2308.

EXAMPLE 8

Synthesis of 1-(1,1-Dimethyl-propylsulfamoyl)-pyrrolidine-2S-carboxylic acid benzyl ester (compound 27):



Compound 27 was prepared from compound 14 by a synthetic method analogous to that of Example 3-Step 6. A 42% yield was obtained.

Spectral analysis of the product was consistent with compound 27:

^1H NMR (CDCl_3): δ 7.4-7.2 (5H, m), 5.09 (2H, AB), 4.45 (1H, br s), 4.40 (1H, m), 3.40 (1H, m), 2.20 (1H, m), 1.23 (6H, s), 0.83 (3H, t, $J=6.7$ Hz).

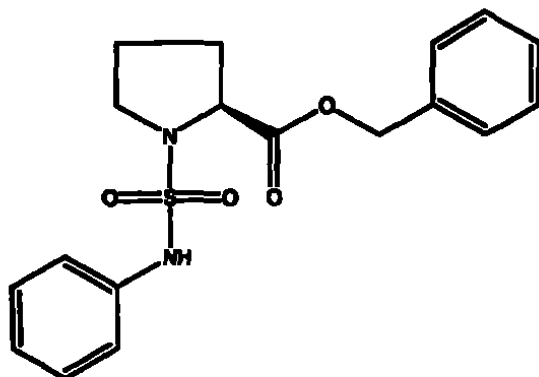
MS (FAB): 355 (M^++H).

Analysis calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$: C 57.60 H 7.39 N 7.90 S 9.05; found: C 57.75

H 7.56 N 7.83 S 9.14

EXAMPLE 9

Synthesis of 1-Phenylsulfamoyl-pyrrolidine-2S-carboxylic acid benzyl ester
(compound 28):



Compound 28 was prepared from compound 14 by a synthetic method analogous to that of Example 3--Step 6. A 59% yield was obtained.

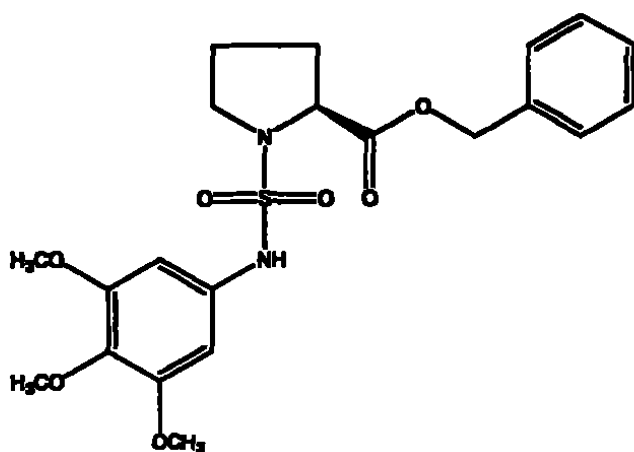
Spectral analysis of the product was consistent with compound 28:

^1H NMR (CDCl_3): δ 7.6-7.0 (5H, m), 6.78 (1H, br s), 5.02 (2H, s), 4.50 (1H, dd, $J=7.6, 3.4$ Hz), 3.5-3.1 (2H, m), 2.4-1.8 (4H, m).

HRMS (FAB): calculated: 361.1222; found: 361.1226.

EXAMPLE 10

Synthesis of 1-(3,4,5-Trimethoxy-phenylsulfamoyl)-pyrrolidine-2S-carboxylic acid benzyl ester (compound 29):



140 139

Compound 29 was prepared from compound 14 by a synthetic method analogous to that of Example 3-Step 6. A 29% yield was obtained.

Spectral analysis of the product was consistent with compound 29:

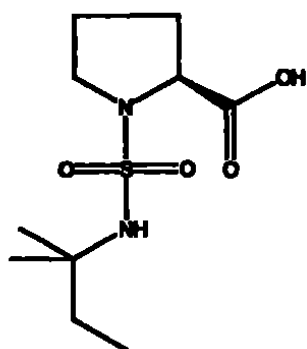
^1H NMR (CDCl_3): δ 7.5-7.3 (5H, m), 6.76 (1H, br s), 6.45 (2H, s), 5.03 (2H, AB), 4.46 (1H, dd, $J=7.4, 3.2$ Hz), 3.77 (6H, s), 3.75 (3H, s), 3.5-3.2 (2H, m), 2.2-1.8 (4H, m).

HRMS (FAB): calculated: 451.1539; found: 451.1522.

EXAMPLE 11

Synthesis of 1-(1,1-Dimethyl-propylsulfamoyl)-pyrrolidine-2S-carboxylic acid 3-pyridin-3-yl-propyl ester

Step 1: Synthesis of 1-(1,1-Dimethyl-propylsulfamoyl)-pyrrolidine-2S-carboxylic acid (compound 30):

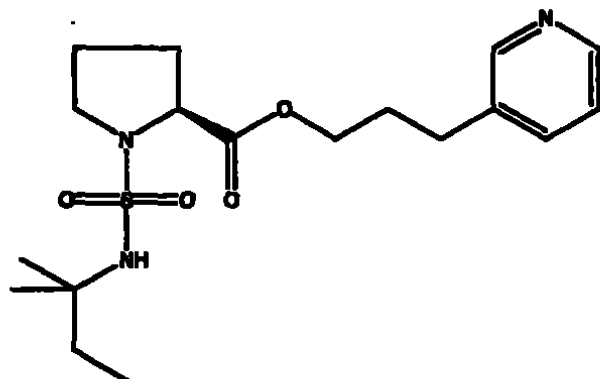


To a methanol solution (1 mL) of compound 27 (32 mg, 0.09 mmol) was added palladium on charcoal (3 mg) at about 25 °C. The suspension was kept under hydrogen atmosphere (1 atmospheres) for about 1.5 hours and filtered through a pad of celite. The filtrate was concentrated to provide 24 mg (quantitative) of an colorless oil.

Spectral analysis of the colorless oil was consistent with compound 30:

¹H NMR (CDCl₃): δ 8.3 (1H, br s), 4.4 (1H, br s), 4.37 (1H, dd, J=7.6, 3.2 Hz), 3.41 (1H, t, J=6.2 Hz), 2.3-1.8 (4H, m), 1.60 (2H, m), 1.22 (6H, s), 0.83 (3H, t, J=6.3 Hz).

Step 2: Synthesis of 1-(1,1-Dimethyl-propylsulfamoyl)-pyrrolidine-2S-carboxylic acid 3-pyridin-3-yl-propyl ester (compound 31):



To a CH₂Cl₂ solution (1 mL) of compound 30 (24 mg, 0.09 mmol) and 3-pyridin-3-yl-propan-1-ol was added EDC (22.5 mg, 0.12 mmol) and HOBT (16 mg, 0.12 mmol) at about 25 °C. After about 20 hours, the mixture was diluted with EtOAc (50 mL), washed with saturated NH₄Cl solution (2x50 mL), dried over sodium sulfate and concentrated. The residue was purified by column chromatography (50% EtOAc in hexanes) yielding 29 mg (85%) of a pale yellow oil.

Spectral analysis of the colorless oil was consistent with compound 31:

¹H NMR (CDCl₃): δ 8.43 (2H, br s), 7.53 (1H, m), 7.1 (1H, m), 4.48 (1H, br s), 4.32 (1H, dd, J=7.7, 3.3 Hz), 4.2-4.0 (2H, m), 3.40 (2H, t, J=6.1 Hz), 2.62 (2H, m), 2.3-2.1 (1H, m), 1.55 (2H, m), 1.23 (6H, s), 0.83 (3H, t, J=6.4 Hz).

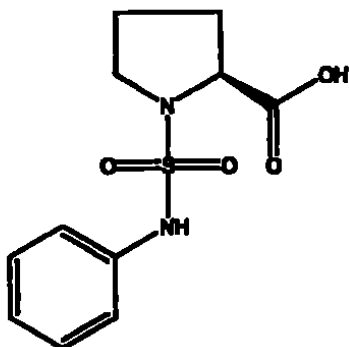
HRMS (FAB): calculated: 384.1957; found: 384.1963.

EXAMPLE 12

142 741

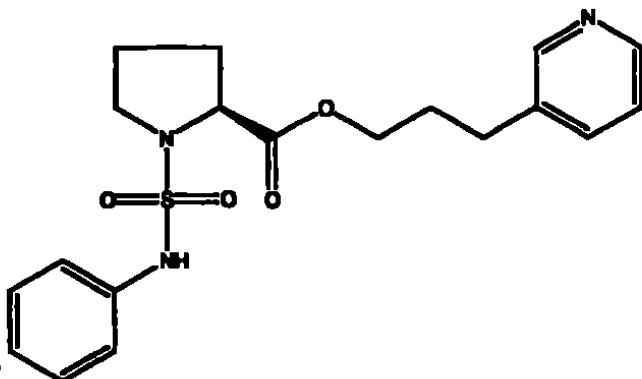
Synthesis of 1-Phenylsulfamoyl-pyrrolidine-2S-carboxylic acid 3-pyridin-3-yl-propyl ester

Step 1: Synthesis of 1-Phenylsulfamoyl-pyrrolidine-2S-carboxylic acid (compound 32):



Compound 32 was synthesized from compound 28 by a synthetic method analogous to that set forth in Example 11-Step 1. A 81% yield was obtained.

Step 2: Synthesis of 1-Phenylsulfamoyl-pyrrolidine-2S-carboxylic acid 3-pyridin-3-yl-propyl ester (compound 33):



Compound 33 was prepared from compound 32 by a synthetic method analogous to that of Example 11-Step 2. A 30% yield was obtained.

Spectral analysis of the product was consistent with compound 33:

143 742
¹H NMR (CDCl₃): δ 8.48 (2H, br s), 7.82 (1H, br s), 7.52 (1H, m), 7.3-7.0 (6H, m), 4.40 (1H, dd, $J=7.8, 3.5$ Hz), 4.2-4.0 (2H, m), 3.43 (2H, t, $J=6.2$ Hz), 2.71 (2H, m), 2.3-2.1 (1H, m).

HRMS (FAB): calculated: 390.1488; found: 390.1476.

A variety of assays and techniques may be employed to determine the activities of the compounds of the present invention. The activity of a compound of the invention for stimulation of neurite outgrowth is directly related to its binding affinity for FKBP12 and its ability to inhibit FKBP12 rotamase activity. In order to quantify these latter properties, assays known in the art for measuring ligand binding and enzyme activity may be employed. Assays for stimulation of neurite outgrowth are described below.

For example, compounds may be tested to determine their neurotrophic activity using the method described by Lyons et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:3191-3195 (1994). In this rat pheochromocytoma assay for neurite outgrowth, PC12 rat pheochromocytoma cells are maintained at 37°C and 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated horse serum and 5% heat-inactivated fetal bovine serum. Cells are then plated, coated at 10⁵ per 35 mm culture well with rat tail collagen at 5 mg/cm², and allowed to attach. Medium is then replaced with DMEM supplemented with 2% horse serum, 1% fetal bovine serum, nerve growth factor (NGF), and/or varying concentrations of test compounds. The control cultures are administered NGF without any of the test compounds.

Another exemplary method that may be used for measuring potency for stimulation of neurite outgrowth is the rat dorsal root ganglia assay. In this assay, dorsal root ganglia are dissected from 16-day-old Sprague-Dawley rat embryos. The sensory ganglia are then cultured in collagen-coated 35 mm Falcon dishes with N-2

144
7/13

medium (DMEM/Ham's F₁₂, 1:1) at 37°C in a 15% CO₂ environment. The medium is supplemented with selenium, progesterone, insulin, putrescine, glucose, penicillin and streptomycin. The ganglia are then treated with various concentrations of NGF (0-100 ng/ml) and test compound. The sensory ganglia are observed every two to three days under a phase contrast microscope, and the axon lengths are measured. See Lyons et al., *PNAS*, 91:3191-3195 (1994).

Other suitable assays may be used to measure the activity of the compounds of the present invention. For example, immunosuppressant activity can be estimated through measurements of the inhibition of calcineurin phosphatase activity by complexes of compounds of the invention bound to FKBP (Babine et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 6, 385-390, 1996). The phosphopeptide phosphatase activity of calcineurin is assayed at 30°C using a continuous coupled spectrophotometric assay (Etzkorn et al., *Biochemistry*, 32, 2380, 1994) and the phosphorylated 19-mer peptide substrate derived from the regulatory subunit (R_N) of cAMP-dependent protein kinase. The assay mixture contains 50 mM MOPS (pH 7.5), 0.1 M NaCl, 6 mM MgCl₂, 0.5 mg/ml bovine serum albumin, 0.5 mM dithiothreitol, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂, 20 μM phosphorylated R_N peptide, 20 nM human recombinant calcineurin, 40 nM calmodulin, 10 μg/mL purine ribonucleoside phosphorylase, and 200 μM methylthioguanosine as described by Etzkorn et al., plus 1% dimethylsulfoxide (DMSO) as co-solvent and 100 μM FKBP. Compounds are tested for FKBP-dependent inhibition of calcineurin at their maximum solubility. Under these conditions, the apparent inhibition constant for inhibition of human recombinant calcineurin by FKBP-FK506 is measured to be 43 nM.

Binding of compounds to FKBP may be measured directly using microcalorimetry. Calorimetric titrations are carried out using the MCS-ITC

145 744

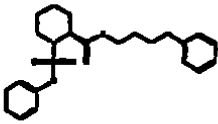
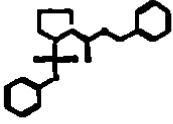
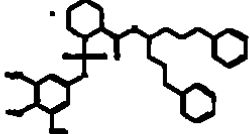
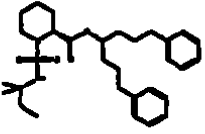
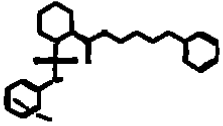
instrument (MicroCal Inc., Northampton, MA). The titrations may be conducted as follows. Protein dialysate is degassed for 15 minutes using MicroCal equipment. Stock inhibitor solution is added to co-solvent (typically DMSO) and degassed dialysate, followed by brief sonication, to produce the final inhibitor solutions to be used in the titrations. Final inhibitor solutions are in the concentration range 10 to 80 μ M. Dialyzed protein is added to co-solvent and degassed dialysate to produce FKBP12 solutions in the concentration range 200 to 1600 μ M. As both solutions are prepared using degassed dialysate, no additional degassing of the solutions is performed. Co-solvent is added to the protein solutions to maintain a fixed co-solvent concentration throughout the course of the titration. Protein is titrated into inhibitor using a 125- μ L injection syringe. The titrations are conducted with the ligand in the cell due to low solubility of inhibitors. Typically, a preliminary 2- μ L injection is followed by fifteen 8- μ L injections made at varying injection intervals. A full set of dilution controls is conducted for each titration. An appropriate volume of co-solvent is added to degassed dialysate to produce the buffered co-solvent solution used to obtain heats of dilution of the reactants. After correcting for the heats of dilution and deletion of the preliminary injection, the titration results are fitted using the "One Set of Sites Model" in the ORIGIN software package supplied with the instrument.

Binding to FKBP as directly measured by microcalorimetry has been found to correlate well with potency for inhibition of the rotamase reaction, which is readily assayed by methods known in the art (see, e.g., Fischer et al., *Biochim. Biophys. Acta* 791, 87 (1984); Fischer et al., *Biomed. Biochim. Acta* 43, 1101 (1984); Fischer et al., *Nature* 337, 476-478 (1989); Sickierka et al., *Nature*, 341, 755-57 (1989); U.S. Patent No. 5,696,135; and Harding et al., *Nature*, 341, 758-60 (1989)).

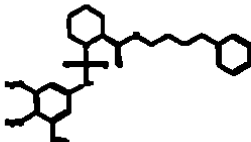
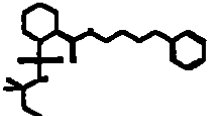
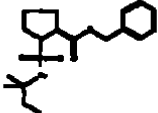
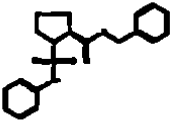
146
105

In the rotamase inhibition assay, isomerization of an artificial substrate N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide is followed spectrophotometrically. The assay includes the cis form of the substrate, FKBP12, the compound being tested, and chymotrypsin. Chymotrypsin is able to cleave p-nitroaniline from the trans form of the substrate, but not from the cis form. Release of p-nitroaniline is measured spectrophotometrically. Using this assay, various amounts of the FKBP rotamase-inhibiting compounds of formula (I) were added to cis-N-succinyl-alanine-alanine-proline-phenylalanine-para-nitroaniline (BACHEM, 3132 Kashiwa Street, Torrance, CA 90505) in the presence of FKBP12 and chymotrypsin. Spectrophotometric measurements of p-nitroaniline concentrations allowed estimation of the apparent K_i values, which are provided in Table 1 below.

147
~~146~~

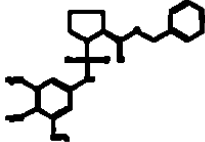
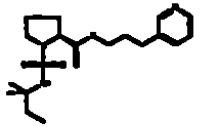
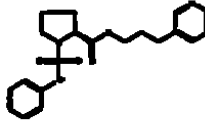
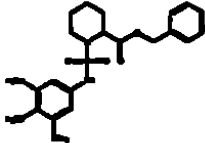
Table 1				
Compound Number	Molecular Structure	Activity ?	? K_d (μ M)	Rotamase K_{app} (μ M)
13		-	-	-
15		-	-	-
22		-	-	0.382
23		-	-	6.99
24		-	-	1.16

148
147

Table 1				
Compound Number	Molecular Structure	Activity ?	? K_d (μ M)	Rotamase K_{app} (μ M)
25		N.O. active 0.001-1 μ M	1.2	0.2
26		-	-	0.193
27		-	-	-
28		-	-	-

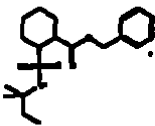
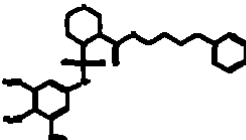
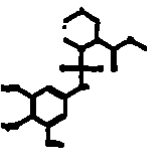
667027 4289T09

149
1/18

Table 1				
Compound Number	Molecular Structure	Activity ?	? K_d (μ M)	Rotamase K_{app} (μ M)
29		-	-	-
31		N.O. weak 0.001-1 μ M	4.5	2.79
33		N.O. active 0.001-1 μ M	14	-
34		-	-	-

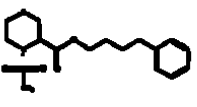
60168246
66T02784289T09

150
+09

Table 1				
Compound Number	Molecular Structure	Activity ?	? K_d (μ M)	Rotamase K_{app} (μ M)
35		-	-	-
36		-	-	-
37		-	-	-

0168246 2019 66102

151
158

Table 1				
Compound Number	Molecular Structure	Activity	K_d (μ M)	Rotamase K_{app} (μ M)
38		-	-	-

FKBP-inhibiting agents of the invention, such as the compounds exemplified above, may be used to prepare pharmaceutical compositions, such as those described below.

The pharmaceutical compositions of this invention comprise an effective neurite-outgrowth-stimulating compound of formula (I) and an inert, pharmaceutically acceptable carrier or diluent. The pharmaceutical compositions may additionally comprise a neurotrophic factor. These compositions are prepared in unit-dosage forms appropriate for various routes of administration.

In one embodiment, efficacious levels of non-peptide rotamase-inhibiting compounds are provided so as to provide therapeutic benefits involving regulation of FKBP. By "efficacious levels" of compounds is meant levels in which the FKBP binding of FKBP12 is, at a minimum, regulated. The compounds may be administered in the form of a prodrug which, in general, is designed to enhance absorption and is cleaved *in vivo* to form the active component. Efficacious levels

may also be achieved by administration of pharmaceutically active metabolites (products of metabolic conversions) of the compound.

152
X/5

A compound of formula (I) is administered in a suitable dosage form prepared by combining a therapeutically effective amount (i.e., an efficacious level sufficient to achieve the desired therapeutic effect through FKBP regulation) of a compound of formula (I) (as an active ingredient) with standard pharmaceutical carriers or diluents according to conventional procedures. These procedures may involve mixing, granulating, and compressing or dissolving the ingredients as appropriate to attain the desired preparation.

The pharmaceutical carrier employed may be in any suitable form, for example, either a solid or liquid. Exemplary solid carriers include lactose, terra alba, sucrose, talc, gelatin, agar, pectin, acacia, magnesium stearate, stearic acid and the like. Exemplary liquid carriers include syrup, peanut oil, olive oil, water and the like. Similarly, the carrier or diluent may include time-delay material known in the art, such as glyceryl monostearate or glyceryl distearate, alone or with a wax, ethylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, methylmethacrylate or the like.

A variety of pharmaceutical forms can be employed. For example, if a solid carrier is used, the preparation can be tableted, placed in a hard gelatin capsule in powder or pellet form, or formed into a troche or lozenge. The amount of solid carrier may vary, but preferably will be from about 25 mg to about 1 g. If a liquid carrier is used, the preparation will preferably be in the form of syrup, emulsion, soft gelatin capsule, sterile injectable solution or suspension in an ampoule or vial, or nonaqueous liquid suspension.

To obtain a stable water-soluble dose form, a pharmaceutically acceptable salt of a compound of formula (I) may be dissolved in an aqueous solution of an organic

or inorganic acid, such as 0.3 M solution of succinic acid, or more preferably, citric acid. If a soluble salt form is not available, the compound of formula (I) may be dissolved in a suitable co-solvent or combination of co-solvents. Examples of suitable co-solvents include alcohol, propylene glycol, polyethylene glycol 300, polysorbate 80, glycerin and the like in concentrations ranging from 0 to 60 % of the total volume. In a preferred embodiment, the active compound of formula (I) is dissolved in DMSO and diluted with water. The composition may also be in the form of a solution of a salt form of the active ingredient in an appropriate aqueous vehicle, such as water or isotonic saline or dextrose solution.

It will be appreciated that the actual preferred dosages of the compounds of formula (I) used in the compositions of this invention may vary according to the particular complex being used, the particular composition formulated, the mode of administration and the particular site, and the host and disease being treated. Optimal dosages for a given set of conditions can be ascertained by those skilled in the art using conventional dosage-determination tests, e.g., in view of the experimental data provided herein. For oral administration, the usual daily dose generally employed is from about 0.001 to about 1000 mg/kg of body weight, with courses of treatment repeated at appropriate intervals. Initial pharmacokinetics for humans may be determined from the rat model as described by Gold et al., *Experimental Neurology*, 147:269-278 (1997).

The pharmaceutical compositions containing active compounds of the present invention may be manufactured in a manner that is generally known, e.g., by means of conventional mixing, dissolving, granulating, dragee-making, levigating, emulsifying, encapsulating, entrapping, or lyophilizing processes. Pharmaceutical compositions may be formulated in a conventional manner using one or more physiologically

53 X 2

acceptable carriers comprising excipients and/or auxiliaries which facilitate processing of the active compounds into preparations that can be used pharmaceutically. Of course, the appropriate formulation is dependent upon the route of administration chosen.

For oral administration, the compounds can be formulated readily by combining the active compounds with pharmaceutically acceptable carriers known in the art. Such carriers allow the compounds of the invention to be formulated as tablets, pills, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions and the like, for oral ingestion by a patient to be treated. Pharmaceutical preparations for oral use can be obtained by combining an active compound with a solid excipient, optionally grinding the resulting mixture, and processing the mixture of granules, after adding suitable auxiliaries, if desired, to obtain tablets or dragee cores. Suitable excipients include, e.g.: fillers such as sugars, including lactose, sucrose, mannitol, or sorbitol; and cellulose preparations such as maize starch, wheat starch, rice starch, potato starch, gelatin, gum tragacanth, methyl cellulose, hydroxypropylmethyl-cellulose, sodium carboxymethylcellulose, and/or polyvinylpyrrolidone (PVP). If desired, disintegrating agents may be added, such as cross-linked polyvinylpyrrolidone, agar, or alginic acid or a salt thereof such as sodium alginate.

Dragee cores are provided with suitable coatings. For this purpose, concentrated sugar solutions may be used, which may optionally contain gum arabic, polyvinylpyrrolidone, Carbopol gel, polyethylene glycol, and/or titanium dioxide, lacquer solutions, and suitable organic solvents or solvent mixtures. Dyestuffs or pigments may be added to the tablets or dragee coatings for identification or to characterize different combinations of active compound doses.

154
173

155
174

Pharmaceutical preparation forms that can be used orally include push-fit capsules made of gelatin, as well as soft, sealed capsules made of gelatin and a plasticizer, such as glycerol or sorbitol. The push-fit capsules can contain the active ingredients in admixture with filler such as lactose, binders such as starches, and/or lubricants such as talc or magnesium stearate, and, optionally, stabilizers. In soft capsules, the active compounds may be dissolved or suspended in suitable liquids, such as fatty oils, liquid paraffin, or liquid polyethylene glycols. In addition, stabilizers may be added. All formulations for oral administration should be in dosages suitable for such administration. For buccal administration, the compositions may take the form of tablets or lozenges formulated in a conventional manner.

An example for preparing an oral pharmaceutical composition of this invention is as follows: 100 mg of a compound of formula (I) is mixed with 750 mg of lactose, and the mixture is incorporated into an oral unit-dosage form, such as a hard gelatin capsule, which is suitable for oral administration.

For administration by inhalation, the compounds according to the present invention are conveniently delivered in the form of an aerosol spray presentation from pressurized packs or a nebuliser, with the use of a suitable propellant, e.g., dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, carbon dioxide or other suitable gas. In the case of a pressurized aerosol, the dosage unit may be determined by providing a valve to deliver a metered amount. Capsules and cartridges of, for example, gelatin for use in an inhaler or insufflator may be formulated containing a powder mix of the compound and a suitable powder base such as lactose or starch.

The compounds may be formulated for parenteral administration by injection, e.g., by bolus injection or continuous infusion. Formulations for injection may be

156
JFS

presented in unit-dosage form, e.g., in ampoules or in multi-dose containers, with an added preservative. The compositions may take such forms as suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles, and may contain formulatory agents such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents.

For injection, the agents of the invention may be formulated in aqueous solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hanks's solution, Ringer's solution, or physiological saline buffer. For transnmucosal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated are used in the formulation and may be selected from those known in the art.

Pharmaceutical formulations for parenteral administration include aqueous solutions of the active compounds in water-soluble form. Additionally, suspensions of the active compounds may be prepared as appropriate oily injection suspensions. Suitable lipophilic solvents or vehicles for preparing such formulations include fatty oils such as sesame oil, or synthetic fatty acid esters such as ethyl oleate or triglycerides, or liposomes. Aqueous injection suspensions may contain substances that increase the viscosity of the suspension, such as sodium carboxymethylcellulose, sorbitol, or dextran. Optionally, the suspension may also contain suitable stabilizers or agents which increase the solubility of the compounds to allow for the preparation of highly concentrated solutions.

A parenteral pharmaceutical composition of this invention suitable for administration by injection may be prepared as follows: 100 mg of a compound of formula (I) is mixed with 10 ml of a lipophilic solvent such as a fatty oil, and the mixture is incorporated into a unit-dosage form suitable for administration by injection as an emulsion.

157 ~~156~~

Alternatively, the active ingredient may be in powder form for constitution with a suitable vehicle, e.g., sterile pyrogen-free water, before use. The compounds may also be formulated in rectal compositions such as suppositories or retention enemas, e.g., containing conventional suppository bases such as cocoa butter or other glycerides.

In addition to the formulations described previously, the compounds may also be formulated as a depot preparation. Such long-acting formulations may be administered by implantation (for example, subcutaneously or intramuscularly) or by intramuscular injection. For example, the compounds may be formulated with suitable polymeric or hydrophobic materials (for example, as an emulsion in an acceptable oil) or ion-exchange resins, or as sparingly soluble derivatives, for example, as a sparingly soluble salt.

A suitable pharmaceutical carrier for the hydrophobic compounds of the invention is a co-solvent system comprising benzyl alcohol, a nonpolar surfactant, a water-miscible organic polymer, and an aqueous phase. The co-solvent system may be the VPD co-solvent system (VPD is a solution of 3% w/v benzyl alcohol, 8% w/v of the nonpolar surfactant polysorbate 80, and 65% w/v polyethylene glycol 300, made up to volume in absolute ethanol). The VPD co-solvent system (VPD:5W) consists of VPD diluted 1:1 with a 5% dextrose in water solution. This co-solvent system dissolves hydrophobic compounds well, and itself produces low toxicity upon systemic administration. Naturally, the proportions of a co-solvent system may be varied considerably without destroying its solubility and toxicity characteristics. Furthermore, the identity of the co-solvent components may be varied: for example, other low-toxicity nonpolar surfactants may be used instead of polysorbate 80; the fraction size of polyethylene glycol may be varied; other biocompatible polymers may

158 ~~157~~

replace polyethylene glycol, e.g., polyvinylpyrrolidone; and other sugars or polysaccharides may be substituted for dextrose.

Alternatively, other delivery systems for hydrophobic pharmaceutical compounds may be employed. Liposomes and emulsions are well known examples of delivery vehicles or carriers for hydrophobic drugs. Certain organic solvents such as dimethylsulfoxide also may be employed, although usually at the cost of greater toxicity. Additionally, the compounds may be delivered using a sustained-release system, such as semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the therapeutic agents. Various sustained-release materials have been established and are known by those skilled in the art. Sustained-release capsules may, depending on their chemical nature, release the compounds for a period of a few weeks up to over 100 days. Depending on the chemical nature and the biological stability of the therapeutic reagent, additional strategies for protein stabilization may be employed.

The pharmaceutical compositions also may comprise suitable solid- or gel-phase carriers or excipients. Examples of such carriers or excipients include calcium carbonate, calcium phosphate, various sugars, starches, cellulose derivatives, gelatin, and polymers such as polyethylene glycols.

Numerous neurotrophic factors have been identified in the art and any of those factors may be utilized in the compositions of this invention. As used herein, the term "neurotrophic factor" refers to substances that are capable of stimulating growth or proliferation of nervous tissue (but excluding the FKBP-rotamase inhibiting compounds of the invention), e.g., nerve growth factor (NGF), insulin growth factor (IGF-1) and its active truncated derivatives (gIGF-1), acidic and basic fibroblast growth factor (aFGF and bFGF, respectively), platelet-derived growth factors (PDGF), brain-derived growth factors (BDNF), ciliary neurotrophic factors (CNTF),

159 ~~158~~

glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), neurotrophin-3 (NT-3), and neurotrophin 4/5 (NT- 4/5). Pharmaceutical compositions may include as active ingredients, in addition to one or more agents of the invention, one or more of such neurotrophic factors. The most preferred neurotrophic factor for use in the compositions of this invention is NGF.

Other components of the pharmaceutically acceptable compositions of this invention may include benzyl alcohol or other suitable preservatives, absorption promoters to enhance bioavailability, fluorocarbons, and/or other conventional solubilizing or dispersing agents.

A pharmaceutical composition contains a total amount of the active ingredient(s) sufficient to achieve the intended therapeutic effect. More specifically, the pharmaceutical composition contains a therapeutically effective amount (i.e., an amount effective to prevent development of or to alleviate the existing symptoms of a disease or condition mediated by FKBP) of an FKBP-inhibiting agent of the invention. The total amounts of the FKBP-inhibitory agent of the invention and any optional neurotrophic factor that may be combined with the carrier materials to produce a single-dosage form will vary depending upon the host treated and the particular mode of administration. Preferably, the compositions of the invention each contains both an FKBP-inhibiting agent and a neurotrophic factor, with the FKBP-inhibiting agent acting to potentiate the activity of the neurotrophic factor to enhance stimulation of neurite outgrowth. The amount of neurotrophic factor in such compositions is advantageously less than the amount required in a monotherapy utilizing only the factor. Preferably, the compositions are formulated so that a dosage of between 0.01 to 100 mg/kg body weight/day of a FKBP12-inhibiting agent is

administered and a dosage of between 0.01 to 100 $\mu\text{g/kg}$ body weight/day of a neurotrophic factor is administered to a patient receiving the compositions.

A pharmaceutical composition of the invention may be used in a method of inhibiting the rotamase enzyme activity of an FK-506 binding protein, comprising administering the composition to a patient. The inventive compositions may also be used to stimulate the growth of neurites in nerve cells, to stimulate nerve regeneration, or to promote neuronal regeneration. Preferably, the composition further comprises a neurotrophic factor.

While the invention has been illustrated by reference to specific and preferred embodiments, those skilled in the art will recognize, e.g., through routine experimentation and practice of the invention, that variations and modifications may be made. For example, those of ordinary skill in the art may recognize that apparent variations or substitutions to the compounds of formula (I) may be made without adversely affecting in a significant manner their efficacy in the pharmaceutical compositions. Thus, the invention is intended not to be limited by the foregoing description, but to be defined by the appended claims and their equivalents.

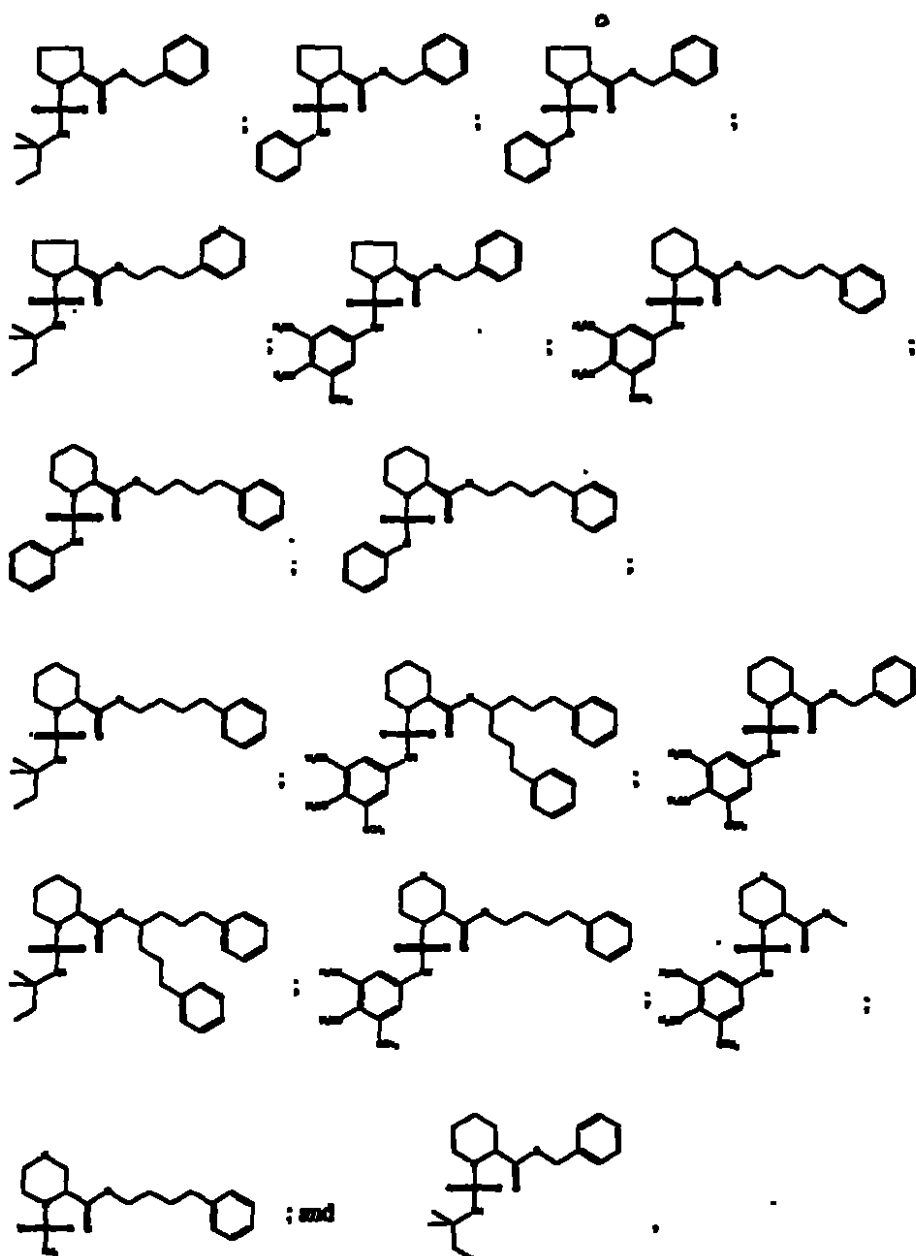
160



WHAT IS CLAIMED IS:

161 ~~160~~

1. A compound selected from the group consisting of:



or a pharmaceutical acceptable salt or solvate thereof.

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

REQUISITOS MINIMOS PARA A

Radicación : 00091748 03000000

Folios: 374

Fecha (ADM): 2000-11-30 16:49:52

Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAR

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION []

- Nombre e identificación del Solicitante []
- Nombre e identificación del Inventor []
- Título o nombre de la Invención []
- Descripción 27 []
- Reivindicaciones []
- Resumen 365 []
- Comprobante de Pago 3 []
- Poder, cuando proceda []
- Copia de la primera solicitud de patente, si reivindica prioridad, señalándola expresamente []
- Firma del solicitante o apoderado []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- Nombre e identificación del peticionario []
- Nombre e identificación del inventor o diseñador []
- Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse []
- Representación gráfica []
- Comprobante de pago []
- Poder, cuando proceda []
- Firma del solicitante o apoderado []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha: _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

2020
Bogotá, D.C.

Doctor
CARLOS R. OLARTE

REFERENCIA:	Radicación No.	00-91748
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio No.	0682
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Con el fin de reconocer personería al abogado que presenta la solicitud, es necesario que se allegue la sustitución del poder, otorgada por quien aparece como apoderado principal. Lo anterior de conformidad con el artículo 86 del Código de Procedimiento Civil.
- Debe allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el inventor al solicitante o a su causante (art. 26-k, Dec 486/2000).
- Debe indicarse el domicilio del inventor (Art. 27-e, D 486/00).
- El interesado debe informar la dirección del solicitante, debido a que en la solicitud no aparece la misma. (Art. 27-b, D 486/00).

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la Resolución Reglamentaria No. 210 del 15 de enero del 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

15 FEB. 2001

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____

202027/202022

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 382 2695
E-mail: Info@slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia