

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-044322-00000-0000

Fecha: 2011-04-11 11:12:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 251/

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-044322-00000-0000

Fecha: 2011-04-11 11:12:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 252

PCT

SUPER

RCIO

LA LA

Q.F

PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

11-44322

SOLICITUD DE PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

NÚMERO DE PCT:

PCT/US2009/048855

PATENTE: COMPUESTOS, COMPOSICIONES Y
MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE
ENFERMEDADES CAUSADAS POR UN β -AMILOIDE Y
SINUCLINOPATÍAS

CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL: A01N 47/28
(2006.01)

SOLICITANTES: PROTEOTECH INC

DOMICILIO: Kirkland, Washington, Estados Unidos
de América

APODERADO: Martha BONILLA CASTRO

Bogotá D.C., abril de 2011

Pod. C
03-05-2011



No. 11-044322-00000-0000

Fecha: 2011-04-11 11:12:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 251



No. 11-044322-00000-0000

Fecha: 2011-04-11 11:12:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 252

FORMULARIO ÚNICO DE

ENTRADA F

1

SOLI

☒ Patente de Invención

☒ Capítulo I.

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: PROTEOTECH INC.

Dirección: 12040 115th Ave NE, Kirkland, WA, USA
98034

Nacionalidad o Domicilio: Kirkland, Washington,
Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: Estados Unidos de
América

Tel: 571- 3230233 **Fax:** 571- 3230233

E-mail: info@brlatina.com

IDENTIFICACIÓN

☐ C.C.

☐ NIT

☐ C.E.

☒ Otro

Cual _____
Número _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: Marcela ROJAS ROJAS

Dirección: Carrera 13 No. 29 – 21 Oficina 241

Tel: 571- 3230233 **Fax:** 571- 3230234

Email: info@brlatina.com

IDENTIFICACIÓN

☒ C.C.

☐ NIT

☐ C.E.

☐ Otro

Número: 1.032.387.271

T.P: 191426

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: HUDSON, F., Michael

Dirección: 320 Lee St. #1105, Oakland, CA 94610

Nacionalidad o Domicilio: Oakland, California, Estados Unidos de América

Nombre: LAKE, Thomas

Dirección: 7732 Interurban Boulevard, Snohomish, WA 98296 USA

Nacionalidad o Domicilio: Snohomish, Washington, Estados Unidos de América

Nombre: CUMMINGS, Joel

Dirección: 9726 - 49th Ave NE, Seattle, WA 98115

Nacionalidad o Domicilio: Seattle, Washington, Estados Unidos de América

Nombre: SNOW, Alan, D.

Dirección: 3812 167th Pl. SW, Lynnwood, WA 98037, USA

Nacionalidad o Domicilio: Lynnwood, Washington, Estados Unidos de
América

Nombre: LARSEN, Lesley

Dirección: 24 Fairview Terrace, Sawyers Bay, Dunedin, 9001 NZ

Nacionalidad o Domicilio: Dunedin, Nueva Zelanda

Nombre: WEIGELE, Manfred

Dirección: 6 Canal Park #601, Cambridge, MA 02141

Nacionalidad o Domicilio: Cambridge, Massachusetts, Estados Unidos de América

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/US2009/048855

Publicación Internacional No.

WO/2010/039308

Fecha: Junio 26 de 2009

Fecha: Abril 08 de 2010

6

**Título (54): COMPUESTOS, COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO
DE ENFERMEDADES CAUSADAS POR UN β -AMILOIDE Y SINUCLEINOPATÍAS**

7

Clasificación Internacional (51) A01N 47/28 (2006.01)

8

Prioridad

☒ SI

☐ NO

(33) País de Origen

Estados Unidos de
América

(32) Fecha

Octubre 03 de 2008

(31) Número de

solicitud

12/244,968

9

Comprobante de pago No.

11-0033132
y 11-0033133

Fecha:

11-Abril-2011

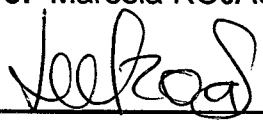
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante es persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuera el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☐ Otros

11 **FIGURA CARACTERÍSTICA:**12 **Solicito la concesión de la patente**

Nombre: Marcela ROJAS ROJAS

Firma: 

C.C. 1.032.387.271

T.P. 191.426

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0033132

Bogotá D.C., Abril 11 de 2011 - 10:46:26

RECIBIDO DE : B&R LTDA

NI 830.122.790

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	444417315	04/04/2011	733.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	110 PTC. SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-044322-00000-0000

Fecha: 2011-04-11 11:12:00
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 251

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-044322-00000-0000

Fecha: 2011-04-11 11:12:00
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 252

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Abril 11 de 2011 - 10:46:26

3.A

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0033133

Bogotá D.C., Abril 11 de 2011 - 10:46:26

RECIBIDO DE : B&R LTDA

NI 830.122.790

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	444417315	04/04/2011	733.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
6	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	27.000.00	162.000.00
				\$162.000.00

SON: **CIENTO SESENTA Y DOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-044322-00000-0000

Fecha: 2011-04-11 11:12:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 251

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-044322-00000-0000

Fecha: 2011-04-11 11:12:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 252

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Abril 11 de 2011 - 10:46:26

**TITULO: COMPUESTOS, COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES CAUSADAS POR UN β -AMILOIDE
Y SINUCLEINOPATÍAS**

5

RESUMEN

Compuestos dihidroxiarilo y los ésteres aceptados para uso farmacéutico,
10 sus síntesis, las composiciones farmacéuticas que los contienen y su uso
para el tratamiento de enfermedades causadas por un β -amiloide, como las
observadas en la enfermedad de Alzheimer y sinucleinopatías, como las
observadas en la enfermedad de Parkinson y la fabricación de medicamentos
15 para ese tratamiento.

15

20

25

30

35

DESCRIPCIÓN

Esta invención se refiere a compuestos de bis-dihidroxiarilo y sales aceptadas para uso farmacéutico, sus síntesis, las composiciones farmacéuticas que los contienen y su uso para el tratamiento de enfermedades causadas por un β -amiloide, como las observadas en la enfermedad de Alzheimer y sinucleinopatías, como las observadas en la enfermedad de Parkinson y la fabricación de medicamentos para ese tratamiento.

10

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reclama prioridad ante la solicitud U.S. Serie No. 12/244,968, titulada "Compuestos, Composiciones y Métodos para el Tratamiento de Enfermedades Causadas por β -Amiloide y Sinucleinopatías" para Esposito et al., presentada en octubre 3, 2008.

15

CAMPO TÉCNICO

Esta invención se refiere a compuestos de bis-dihidroxiarilo y sales aceptadas para uso farmacéutico, sus síntesis, las composiciones farmacéuticas que los contienen y su uso para el tratamiento de enfermedades causadas por un β -amiloide, como las observadas en la enfermedad de Alzheimer y sinucleinopatías, como las observadas en la enfermedad de Parkinson y la fabricación de medicamentos para ese tratamiento.

25

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la acumulación de un péptido formado por 39-43 aminoácidos llamado proteína β -amiloide o A β en una forma fibrilar, que existe como agregado en las placas amiloides extracelulares y como amiloides dentro de las paredes de los vasos sanguíneos cerebrales. El depósito del agregado A β amiloide fibrilar en la enfermedad de Alzheimer se cree que es perjudicial para el paciente y eventualmente origina la toxicidad y muerte de las células neuronales, indicio característico de la enfermedad de Alzheimer. La acumulación de evidencia

30

implica al amiloide, y más específicamente, la formación, depósito, acumulación y/o persistencia de los agregados A β , como un factor causal principal de la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Además de la enfermedad de Alzheimer, un número de otras enfermedades causadas por amiloides implican la formación, depósito, acumulación y persistencia de los agregados A β , que incluyen el Síndrome de Down, desordenes que implican la angiopatía congofílica, como puede ser pero no limitado a, hemorragia cerebral hereditaria del tipo Dutch, y angiopatía cerebral causada por β -amiloides.

10

La enfermedad de Parkinson es otro desorden humano caracterizado por la formación, depósito, acumulación, agregación y/o persistencia de depósitos de proteína fibrilar anormal que demuestra muchas de las características del amiloide. En la enfermedad de Parkinson, una acumulación de cuerpos de Lewy citoplásmicos que consisten en agregados de filamentos de α -sinucleína se cree que son importantes en la patogénesis y como dianas terapéuticas. Nuevos agentes o compuestos capaces de inhibir la formación, depósito, acumulación, agregación y/o persistencia de α -sinucleína, o romper los fibrillas de α -sinucleína preformadas o agregadas (o partes de éstas) son considerados como terapéuticos potenciales para el tratamiento de Parkinson y las sinucleinopatías relacionadas. Un fragmento de 35 aminoácidos de α -sinucleína que tiene la capacidad para formar fibrillas tipo amiloide o agregados ya sea in vitro o como se observó en los cerebros de pacientes con la enfermedad de Parkinson. El fragmento de una α -sinucleína es una diana terapéutica relativamente importante ya que se cree que esta parte de α -sinucleína es crucial para la formación de cuerpos de Lewy como se observó en todos los pacientes con la enfermedad de Parkinson, sinucleinopatías y desordenes relacionados. Además, la proteína α -sinucleína que forma fibrillas o agregados, y da positiva a la prueba de rojo Congo y Tioflavina S (manchas específicas se utilizan para detectar los agregados de fibrillas amiloides), se encontraron como parte de los cuerpos de Lewy en los cerebros de pacientes con la enfermedad de Parkinson, enfermedad de cuerpos de Lewy (Lewy en Handbuch der Neurologie, M. Lewandowski, ed., Springer, Berlin pp. 920-933, 1912; Pollanen et al, J.

Neuropath. Exp. Neurol. 52:183-191, 1993; Spillantini et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:6469-6473, 1998; Arai et al, Neurosci. Lett. 259:83-86, 1999), atrofia de sistemas múltiples (Wakabayashi et al, Acta Neuropath. 96:445-452, 1998), demencia con Cuerpos de Lewy y la variante del cuerpo de Lewy de la enfermedad de Alzheimer. En la enfermedad de Parkinson, los agregados que se desarrollan en los cerebros de los pacientes con esta enfermedad que son positivos al rojo Congo y Tioflavina S, y que contiene estructura secundaria en forma de placa beta predominante.

10 ***Amiloides como una diana terapéutica para la enfermedad de Alzheimer***

La enfermedad de Alzheimer también impone una enorme carga económica a la sociedad. Un estudio reciente estimó que el costo de cuidar un paciente con la enfermedad de Alzheimer con graves deterioros cognitivos en casa o en una clínica, es de más de \$47,000 al año {Una guía para entender la enfermedad de Alzheimer y desordenes relacionados}. Para una enfermedad que puede abarcar desde 2 hasta 20 años, el costo total de la enfermedad de Alzheimer para las familias y la sociedad es grande. El impuesto económico anual de la enfermedad de Alzheimer en los Estados Unidos en términos de gastos para el cuidado de la salud y salarios perdidos tanto de pacientes como de sus cuidadores se estima en \$80 a \$100 billones (2003 Reporte del Progreso en la enfermedad de Alzheimer).

El clorhidrato de tacrina ("Cognex"), el primer fármaco aprobado por la FDA para la enfermedad de Alzheimer, es un inhibidor de acetilcolinesterasa (Cutler y Sramek, N Engl. J. Med. 328:808 810, 1993). Sin embargo, este fármaco ha mostrado éxito limitado para producir mejoramiento cognitivo en los pacientes con la enfermedad de Alzheimer e inicialmente tuvo efectos colaterales importantes como la toxicidad hepática. El segundo fármaco aprobado por la FDA, donepezil ("Aricept"), que también es un inhibidor de acetilcolinesterasa, es más efectivo que la tacrina, demostrando un ligero mejoramiento cognitivo en los pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Bamer y Gray, Ann. Pharmacotherapy 32:70-77, 1998; Rogers y Friedhoff,

Eur. Neuropsych. 8:67-75, 1998), pero no se cree que sea una cura. Por lo tanto, es claro que existe una necesidad para tratamientos más efectivos para los pacientes con la enfermedad de Alzheimer.

- 5 La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por el depósito y acumulación de un péptido formado por 39-43 aminoácidos llamado proteína beta-amiloide, A β o β /A4 (Glennner y Wong, Biochem. Biophys. Res. Comm. 120:885-890, 1984; Masters et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4245-4249, 1985; Husby et al., Bull. WHO 71:105-108, 1993). A β se obtiene por el desdoblamiento de
- 10 proteasas a partir de proteínas precursoras más grandes llamadas proteínas precursoras de β -amiloide (APP) de las cuales hay diversas variantes empalmadas de forma alternativa. Las formas más abundantes de las APP incluyen proteínas que consisten 695, 751 y 770 aminoácidos (Tanzi et al., Nature 31:528-530, 1988).
- 15 El péptido A β pequeño es un componente principal que constituye los depósitos de amiloides de "placas" en los cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer. Además, la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la presencia de numerosos "marañas" neurofibrilares, que
- 20 consisten en filamentos helicoidales apareados que se acumulan de forma anormal en el citoplasma neuronal (Grundke-Iqbal et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4913-4917, 1986; Kosik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4044-4048, 1986; Lee et al., Science 251:675-678, 1991). El indicio patológico de la enfermedad de Alzheimer es por lo tanto la presencia de
- 25 "placas" y "marañas", teniendo depositado β -amiloide en el núcleo central de las placas. El otro tipo principal de lesión encontrado en el cerebro con la enfermedad de Alzheimer es la acumulación de β -amiloides en las paredes de los vasos sanguíneos, tanto dentro del parénquima cerebral como en las paredes de los vasos meníngeos que se encuentran fuera del cerebro. Los
- 30 depósitos de β -amiloides localizados en las paredes de los vasos sanguíneos se mencionan como amiloides cerebro vasculares o angiopatía congofílica (Mandybur, J. Neuropath. Exp. Neurol. 45:79-90, 1986; Pardridge et al., J. Neurochem. 49:1394-1401, 1987)

Durante muchos años ha habido un debate científico en curso sobre la importancia del "β-amiloide" en la enfermedad de Alzheimer y si las "placas" y "marañas" características de esta enfermedad son una causa o únicamente una consecuencia de la enfermedad. Dentro de los últimos pocos años, los estudios ahora indican que el β-amiloide de hecho es un factor causal de la enfermedad de Alzheimer y no debe considerarse únicamente como una activación inespecífica. Se ha demostrado que la proteína Aβ de Alzheimer en el cultivo de células provoca la degeneración de las células nerviosas dentro de periodos cortos de tiempo (Pike et al., Br. Res. 563:311-314, 1991; J. Neurochem. 64:253-265, 1995). Los estudios sugieren que la estructura fibrilar (que consiste en una estructura secundaria en forma de placa β predominante), la cual es responsable de los efectos neurotóxicos. También se ha encontrado que Aβ es neurotóxico en cultivos de cortes del hipocampo (Harrigan et al., Neurobiol. Aging 16:779-789, 1995) e induce la muerte de las células nerviosas en ratones transgénicos (Games et al., Nature 373:523-527, 1995; Hsiao et al., Science 274:99-102, 1996). La inyección de los Aβ de Alzheimer en el cerebro de ratas también provocó deterioro de la memoria y disfunción neuronal (Flood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3363-3366, 1991; Br. Res. 663:271-276, 1994).

20

Probablemente, la evidencia más convincente de que el amiloide Aβ está directamente implicado en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer viene de los estudios genéticos. Se descubrió que la producción de Aβ puede resultar de mutaciones en la codificación génica, su precursor, la proteína precursora de β-amiloide (Van Broeckhoven et al., Science 248:1120-1122, 1990; Murrell et al., Science 254:97-99, 1991; Haass et al., Nature Med. 1:1291-1296, 1995). La identificación de mutaciones en el gen de la proteína precursora beta-amiloide que provoca el comienzo temprano de la enfermedad de Alzheimer familiar es el argumento más fuerte de que el amiloide es central al proceso patógeno subyacente de esta enfermedad. Se han descubierto cuatro mutaciones provocadas por la enfermedad, reportadas, que demuestran la importancia de Aβ al provocar la enfermedad de Alzheimer familiar (revisado en Hardy, Nature Genet. 1:233-234, 1992). Todos estos estudios sugieren que proporcionando un fármaco para reducir,

eliminar o prevenir la formación, agregación, depósito, acumulación y/o persistencia de fibrillas A β en los cerebros de pacientes humanos servirá como una terapéutica efectiva.

5 ***Enfermedad de Parkinson y sinucleinopatías***

La enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo que se caracteriza de forma patológica por la presencia de cuerpos de Lewy intracitoplásmicos (Lewy in Handbuch der Neurologie, M. Lewandowski, ed., Springer, Berlín, pp. 920-933, 1912; Pollanen et al., J. Neuropath. Exp. Neurol. 52:183-191, 1993), los componentes principales de los cuales son filamentos que consisten en α -sinucleína (Spillantini et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 95:6469-6473, 1998; Arai et al., Neurosci. Lett. 259:83-86, 1999), una proteína de 140 aminoácidos (Ueda et al., Proc. Natl Acad. Sci USA 90:11282-11286, 1993). Dos mutaciones dominantes en α -sinucleína que provocan el comienzo temprano de la enfermedad de Parkinson familiar se han descrito sugiriendo que los cuerpos de Lewy contribuyen de forma mecanicista a la degeneración de neuronas en la enfermedad de Parkinson y desordenes relacionados (Polymeropoulos et al., Science 276:2045-2047, 1997; Kruger et al., Nature Genet. 18: 106-108, 1998). Recientemente, los estudios in vitro han demostrado que la α -sinucleína recombinante de hecho puede formar fibrillas o agregados tipo cuerpo de Lewy (Conway et al., Nature Med. 4:1318-1320, 1998; Hashimoto et al., Brain Res. 799:301-306, 1998; Nahri et al., J. Biol Chem. 274:9843-9846, 1999). De forma más importante, tanto las mutaciones de α -sinucleína enlazadas con la enfermedad de Parkinson aceleran este proceso de agregación, demostrando que esos estudios in vitro pueden tener relevancia para la patogénesis de la enfermedad de Parkinson. La agregación de Alfa-sinucleína y la formación de fibrillas cumplen los criterios de un proceso de polimerización dependiente de nucleación (Wood et al., J. Biol. Chem. 274:19509-19512, 1999). En este aspecto la formación o agregación de fibrillas de α -sinucleína se asemejan a las de las fibrillas de proteína β -amiloide (A β) de Alzheimer. La proteína Alfa-sinucleína recombinante, y el componente no A β (conocido como NAC), el cual es un fragmento del péptido formado por 35 aminoácidos de α -sinucleína, ambos tienen la

capacidad para formar fibrillas o agregados cuando se incuban a 37°C y son positivos con manchas de amiloide como puede ser rojo Congo (demostrando una birrefringencia roja/verde cuando se ve bajo una luz polarizada) y Tioflavina S (demostrando fluorescencia positiva) (Hashimoto et al., Brain Res. 799:301-306, 1998; Ueda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11282-11286, 1993).

Las sinucleínas son una familia de proteínas neuronales presinápticas pequeñas, compuestas de α -, β -, y γ -sinucleínas, de las cuales únicamente los agregados de α -sinucleína han sido asociados con varias enfermedades neurológicas (Iqbal et al., Clinical Neurosci. Res. 1:445-455, 2001; Trojanowski y Lee, Neurotoxicology 23:457-460, 2002). La función de las sinucleínas (y en particular, alfa-sinucleína) en la etiología de un número de enfermedades neurodegenerativas se han desarrollado a partir de diversas observaciones. De forma patológica, la sinucleína se identificó como un componente principal de los cuerpos de Lewy, las inclusiones de indicio de la enfermedad de Parkinson, y un fragmento de éstas se aisló a partir de las placas amiloides de una enfermedad neurológica diferente, la enfermedad de Alzheimer. De forma bioquímica, se mostró que la α -sinucleína recombinante forma fibrillas o agregados que recapitulan las características ultraestructurales del alfa-sinucleína aislada de pacientes con demencia con cuerpos de Lewy, la enfermedad de Parkinson y atrofia de sistemas múltiples. Adicionalmente, la identificación de mutaciones dentro del gen de sinucleína, aunque en casos raros de la enfermedad de Parkinson familiar, demostró un enlace inequívoco entre la patología de la sinucleína y las enfermedades neurodegenerativas. La complicación común de α -sinucleína en un espectro de enfermedades como la enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia de sistemas múltiples y la variante del cuerpo de Lewy de la enfermedad de Alzheimer ha originado la clasificación de estas enfermedades bajo el término común de "sinucleinopatías".

Las fibrillas o agregados de α -sinucleína de la enfermedad de Parkinson y las fibrillas A β de la enfermedad de Alzheimer, ambas consisten en una

estructura en forma de placa β de forma predominante. Se encontró que los compuestos que inhiben la formación de fibrillas $A\beta$ amiloide de la enfermedad de Alzheimer también han demostrado ser efectivos en la inhibición de la formación o agregación de fibrillas de α -sinucleína, como se muestra en los Ejemplos de la presente invención. Estos compuestos por lo tanto también servirían como terapéutica para la enfermedad de Parkinson y otras sinucleinopatías, además de ser eficaces como una terapéutica para la enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer se caracterizan por la inapropiada acumulación de agregados insolubles que consisten principalmente de proteínas mal plegadas que están enriquecidas en la estructura secundaria de placas β (revisado en Cohen et al., *Nature* 426:905-909, 2003; Chiti et al., *Annu. Rev. Biochem.*, 75:333-366, 2006). En la Enfermedad de Parkinson, la α -sinucleína es el constituyente principal de estos agregados, como parte de los cuerpos de Lewy, y las mutaciones en α -sinucleína que aumentan su propensión a plegarse mal y agregados se observan en la enfermedad de Parkinson familiar (Polymeropoulos et al., *Science* 276:1197-1199, 1997; Papadimitriou et al., *Neurology* 52:651-654, 1999).

La disfunción mitocondrial, de forma específica como resultado del deterioro en el complejo I de la cadena de transporte de electrones, es también una característica común de la enfermedad de Parkinson (Schapira et al., *J. Neurochem.*, 54:823-827, 1990; revisado en Verdeamyre et al., *IUBMB Life*, 52:135-141, 2001). La evidencia directa de las deficiencias mitocondriales en la etiología de la enfermedad de Parkinson vienen primero de la observación de que MPP⁺ (1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinio), el metabolito activo de la toxina N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) del parkinsonismo, inhibe el complejo I (Nicklas et al., *Life Sci.*, 36:2503-2508, 1985). De forma subsiguiente, se mostró que la rotenona, otro inhibidor del complejo I, era un modelo mejorado para la agregación de α -sinucleína porque reproduce los agregados intracitoplásmicos positivos a la α -sinucleína antes mencionados, además de los cambios de comportamiento y pérdida de neuronas dopaminérgicas vistas en el modelo MPTP. La toxicidad de la rotenona de

este tipo se ve en sistemas de modelos múltiples que incluyen ratas (Betarbet et al., Nat. Neurosci., 3:1301-1306, 2000; Panov et al., J. Biol. Chem., 280:42026-42035, 2005), cortes de cerebros de ratas (Sherer et al., J. Neurosci., 23:10756-10764, 2003; Testa et al., Mol. Brain Res, 134:109-118, 2005), *C elegans* (Ved et al., J. Biol. Chem., 280:42655-42668, 2005) y células cultivadas (Sherer et al., J. Neurosci., 22:7006-7015, 2002) y se ha demostrado que es una consecuencia del daño oxidativo aumentado que resulta de la inhibición del complejo I.

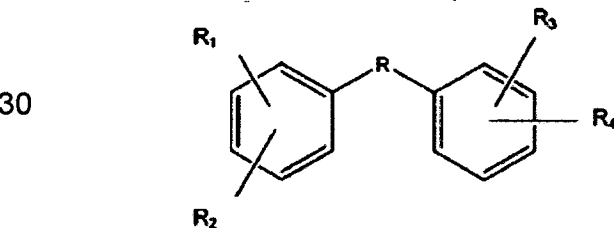
Para entender mejor la relación del daño oxidativo a la patogénesis de α -sinucleína mutante, se ha establecido una línea de células neuroblastoma (utilizando 17 células BE-M) en la técnica que sobreexpresa A53T α -sinucleína. En estas células, los agregados de A53T α -sinucleína en respuesta a una variedad de agentes que inducen tensión oxidativa y potencian la disfunción mitocondrial y la muerte de células (Ostrerova-Golts et al., J. Neurosci., 20:6048-6054, 2000). Estas células son sensibles al tratamiento con rotenona como un inductor de tensión oxidativa y por lo tanto, son particularmente útiles como agentes de prueba que pueden inhibir la agregación/fibrillogénesis de α -sinucleína.

El descubrimiento e identificación de nuevos compuestos o agentes como terapéuticos potenciales para detener la formación, depósito, acumulación y/o persistencia de amiloides que ocurre en la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, se buscan intensamente.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a compuestos bis-dihidroxiarilo y sales aceptadas para uso farmacéutico de estos. Los compuestos son útiles en el tratamiento de enfermedades causadas por β -Amiloide y sinucleinopatías.

Los compuestos son: compuestos de la fórmula:



donde: donde R y R₂, y R₃ y R₄ son grupos hidroxilo de forma independiente colocados en una de posiciones seleccionadas del grupo que consiste en

2,3; 2,4; 2,5; 2,6; 3,5; 3,6; 4,5; 4,6 y 5,6, y R se selecciona de una sulfonamida, heteroarilo, trícicloalquilo y $-C(O)NR'$ donde R' se selecciona de H o CH_3 o ésteres aceptados para uso farmacéutico o sales de estos.

- 5 También se proporcionan algunos derivados aceptados para uso farmacéutico, que incluyen sales, ésteres, éteres o ésteres de enol, acetales, cetales, ortoésteres, semiacetales, seratonestales, solvatos, hidratos o profármacos de los compuestos. Las sales aceptadas para uso farmacéutico, incluyen, pero no se limitan a, sales de amina, como pueden ser pero no
- 10 limitadas a N,N'-dibenziletilendiamina, cloroprocaína, colina, amoníaco, dietanolamina y otras aminas hidroxialquilo, etilendiamina, N-metilglucamina, procaina, N-benzilfenetilamina, 1-para-clorobenzil-2-pirrolidin-1'-ilmetilbenzimidazol, dietilamina y otras alquilaminas, piperazina, tris(hidroximetil)aminometano, sales de metales alcalinos, como pueden ser
- 15 pero no limitados a litio, potasio y sodio, sales de metales alcalino térreos, como pueden ser pero no limitados a bario, calcio y magnesio, sales de metales de transición, como pueden ser pero no limitados a zinc y otras sales de metales, como pueden ser pero no limitados a sodio fosfato de hidrógeno y fosfato disodio, y también incluyendo, pero no limitado a, sales de ácidos
- 20 minerales, como pueden ser pero no limitados a clorhidratos y sulfatos, sales de ácidos orgánicos, como pueden ser pero no limitados a acetatos, lactatos, malatos, tartratos, citratos, ascorbatos, succinatos, butiratos, valeratos y fumaratos.
- 25 Las formulaciones de uso farmacéutico para la administración mediante una ruta apropiada y medios que contienen concentraciones efectivas de uno o más de los compuestos proporcionados en la presente o derivados aceptados para uso farmacéutico, como pueden ser sales, ésteres, éteres o ésteres de enol, acetales, cetales, ortoésteres, semiacetales, seratonestales,
- 30 solvatos, hidratos o profármacos, de los compuestos que entregan cantidades efectivas para el tratamiento de enfermedades causadas por amiloides, también se proporcionan.

Las formulaciones son composiciones adecuada para la administración mediante cualquier ruta deseada e incluye soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, tabletas dispersables, píldoras, cápsulas, polvos, polvos secos para inhalación, formulaciones de liberación prolongada, aerosoles para entrega respiratoria y nasal, parches para entrega transdérmica y cualquier otra ruta adecuada. Las composiciones deben ser adecuadas para la administración oral, administración parenteral por inyección, incluyendo de forma subcutánea, intramuscular o intravenosa como una solución o emulsión inyectable acuosa o aceitosa, administración transdérmica y otras rutas seleccionadas.

Se proporcionan los métodos que utilizan esos compuestos y composiciones para romper, desagregar y causar eliminación, reducción o aclaramiento de β -amiloides o fibrillas de α -sinucleína o agregados proporcionando nuevos tratamientos para las enfermedades causadas por β -Amiloides y sinucleinopatías.

También se proporcionan los métodos para tratamiento, prevención o alivio de uno o más síntomas de las enfermedades causadas por amiloides o amiloidosis, incluyendo pero no limitados a enfermedades asociadas con la formación, depósito, acumulación, o persistencia de fibrillas β -amiloides.

Los métodos para el tratamiento de enfermedades causadas por amiloides, incluyen, pero no se limitan a la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis del tipo Dutch, y angiopatía cerebral causada por β -amiloides.

También se proporcionan los métodos para el tratamiento, prevención o alivio de uno o más síntomas de enfermedades causadas por sinucleína o sinucleinopatías. En una modalidad, los métodos inhiben o previenen la formación de fibrillas de α -sinucleína, inhiben o previenen el crecimiento de fibrillas de α -sinucleína, y/o provocan desensamble, disrupción, y/o desagregación de agregados preformados de α -sinucleína y depósitos de proteína asociados con α -sinucleína. Las enfermedades causadas por

sinucleína incluyen, pero no se limitan a la enfermedad de Parkinson familiar, enfermedad de Parkinson, enfermedad del cuerpo de Lewy, la variante del cuerpo de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia de sistemas múltiples, y el complejo de

5 Parkinsonismo/demencia de Guam.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS)

El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. Las copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con

10 dibujo(s) a color será proporciona por la Oficina después de la solicitud y pago de los costos necesarios.

La Figura 1A muestra varios aspectos de dicroísmo circular que muestran que las fibrillas de la Enfermedad de Alzheimer A β se rompen mediante los

15 compuestos probados en una relación de 1:1 en peso. La Figura 1 B muestra de forma grafica el % de inhibición.

La Figura 2 muestra los espectros de dicroísmo circular comparativos que muestran una estructura rica en α -sinucleína que forma de placa β después

20 de 4 días de agitación a 37°C.

La Figura 3 muestra varios espectros de dicroísmo circular que muestran que los compuestos probados inhiben la agregación de α -sinucleína en una relación de 1:1 en peso. La Figura 3B muestra de forma grafica el % de inhibición.

25

La Figura 4 muestra varios espectros de dicroísmo circular que muestran que los compuestos inhiben la agregación de α -sinucleína en una relación de 1:1 en peso. La Figura 4B muestra de forma grafica el % de inhibición.

30 La Figura 5 resume de forma gráfica los resultados, medidos con Tio T, de los compuestos probados para inhibir la formación o agregación de fibrillas A β .

La Figura 6 resume de forma gráfica los resultados, medidos con rojo Congo, de los compuestos probados para inhibir la formación o agregación de fibrillas A β .

- 5 La Figura 7 resume de forma gráfica los resultados, medidos con Tio T, de los compuestos probados para inhibir la formación o agregación de fibrillas α -sinucleína.

- La Figura 8 resume de forma gráfica los resultados, medidos con rojo Congo, de
10 los compuestos probados para inhibir la formación o agregación de fibrillas α -sinucleína.

- Figuras 9 A-D son ejemplos de fotomicrografías fluorescentes que demuestran los efectos de rotenona en el número de agregados positivos a
15 Tioflavina S. La Figura 9 A es vehículo solo, la Figura 9B es 1 μ M de rotenona, la Figura 9C es 5 μ M a baja amplificación, y la Figura 9D es 5 μ M a alta amplificación. La Figura 9E resume el análisis cuantitativo de la Tioflavina S en respuesta al tratamiento de rotenona.

- 20 Las Figuras 10 A-C son ejemplos de fotomicrografías fluorescentes que demuestran una reducción en los agregados positivos a Tioflavina S (fluorescencia verde) después de la solicitud de un compuesto testigo positivo. La Figura 10A es no tratada, la Figura 10B muestra 500 ng/mL de compuesto testigo positivo y la Figura 10C muestra 1 μ g/mL del compuesto
25 testigo positivo. La Figura 10D resume el análisis cuantitativo de la reducción en agregación dependiente de la dosis.

- Las Figuras 11 A-D son ejemplos de fotomicrografías fluorescentes que demuestran los efectos del Compuesto 1 en la presencia de agregados
30 inducidos por rotenona positivos a Tioflavina S (verde) en células en una manera dependiente de la dosis. La Figura 11 A es no tratada (únicamente rotenona), y las Figuras 11 B-D, respectivamente, muestran 500 ng/mL, 1 μ g/mL y 2 μ g/mL del Compuesto 1. La Figura 11D resume el análisis cuantitativo de los efectos del compuesto 1.

Las Figuras 12 A-D son ejemplos de fotomicrografías fluorescentes que demuestran que el Compuesto 2 reduce fuertemente la presencia de agregados inducidos por rotenona positivos a Tioflavina S (verde) en células.

- 5 La Figura 12 A es no tratada (únicamente rotenona), y Las Figuras 12 B-D, respectivamente, muestran 500 ng/mL, 1 µg/mL y 2 µg/mL del Compuesto 2. La Figura 12E resume el análisis cuantitativo de los efectos anti-agregación del compuesto 2.

- 10 Las Figuras 13 A-D son ejemplos de fotomicrografías fluorescentes que demuestran que el Compuesto 3 reduce la presencia de agregados positivos a Tioflavina S inducidos por rotenona (verde) en células en una manera dependiente de la dosis. La Figura 13 A es no tratada (únicamente rotenona), y las Figuras 13 B-D, respectivamente, muestran 500 ng/mL, 1 µg/mL y 2 µg/mL del Compuesto 3. La Figura 13 E resume el análisis cuantitativo de los efectos anti-agregación del Compuesto 3.

- Las Figuras 14 A-D son ejemplos de fotomicrografías fluorescentes que demuestran que el Compuesto 4 reduce de forma mínima la presencia de agregados positivos a Tioflavina S inducidos por rotenona (verde) en las células en una manera dependiente de la dosis. La Figura 14 A es no tratada (únicamente rotenona), y las Figuras 14 B-D, respectivamente, muestran 500 ng/mL, 1 µg/mL y 2 µg/mL del Compuesto 4. La Figura 14 E resume el análisis cuantitativo de los efectos del Compuesto 4.

25

- Las Figuras 15 A-D son ejemplos de fotomicrografías fluorescentes que demuestran que el Compuesto 5 reduce ligeramente la presencia de agregados positivos a Tioflavina S inducidos por rotenona (verde) en células en una manera dependiente de la dosis. La Figura 15 A es no tratada (únicamente rotenona), y las Figuras 15 B-D, respectivamente, muestran 500 ng/mL, 1 µg/mL y 2 µg/mL del Compuesto 5. La Figura 15 E resume el análisis cuantitativo de los efectos anti-agregación del Compuesto 5.

30

Las Figuras 16 A-D son ejemplos de fotomicrografías fluorescentes que demuestran que el Compuesto 6 afecta de forma mínima la presencia de agregados positivos a Tioflavina S inducidos por rotenona (verde) en células de una manera dependiente de la dosis. La Figura 16 A es no tratada (únicamente rotenona), y Figuras 16 B-D, respectivamente, muestran 500 ng/mL, 1 μ g/mL y 2 μ g/mL del Compuesto 6. La Figura 16 E resume el análisis cuantitativo de los efectos del Compuesto 6.

Las Figuras 17 A-C son ejemplos de fotomicrografías fluorescentes que demuestran que el Compuesto 7 reduce de forma moderada la presencia de agregados positivos a Tioflavina S inducidos por rotenona (verde) en células en una manera dependiente de la dosis. La Figura 17 A es no tratada (únicamente rotenona), y las Figuras 17 B-C respectivamente muestra 500 ng/mL, y 2 μ g/mL del Compuesto 7. La Figura 17 D resume el análisis cuantitativo de los efectos anti-agregación del Compuesto 7.

Las Figuras 18 A-D son ejemplos de fotomicrografías fluorescentes que demuestran que el Compuesto 8 reduce de forma moderada la presencia de agregados positivos a Tioflavina S inducidos por rotenona (verde) en células en una manera dependiente de la dosis. La Figura 18 A es no tratada (únicamente rotenona), y las Figuras 18 B-D, respectivamente, muestran 500 ng/mL, 1 μ g/mL y 2 μ g/mL del Compuesto 8. La Figura 18 E resume el análisis cuantitativo de los efectos anti-agregación del Compuesto 8.

Las Figuras 19 A-D son ejemplos de fotomicrografías fluorescentes que demuestran que el compuesto 9 reduce la presencia de agregados positivos a Tioflavina S inducidos por rotenona (verde) en células en una manera dependiente de la dosis. La Figura 19 A es no tratada (únicamente rotenona), y Figuras 19 B-D, respectivamente, muestran 500 ng/mL, 1 μ g/mL y 2 μ g/mL del Compuesto 9. La Figura 19 E resume el análisis cuantitativo de los efectos anti-agregación del Compuesto 9 donde * $p < 0.05$ en relación con 1 μ M de rotenona únicamente.

La Figura 20 es una gráfica que muestra 35-45% de reducción en la viabilidad de la célula después de 2 días de tratamiento con rotenona medida con el ensayo de Citotoxicidad XTT.

5 La Figura 21 es una gráfica que muestra la capacidad del compuesto testigo positivo para inhibir la toxicidad inducida por rotenona medida con el ensayo de Citotoxicidad XTT.

La Figura 22 A es una gráfica que muestra que el compuesto 1 es no tóxico hasta 10 µg/mL. La Figura 22 B es una gráfica que muestra la capacidad del

10 Compuesto 1 para proteger contra la toxicidad inducida por rotenona medido con el ensayo de Citotoxicidad XTT.

La Figura 23 A es una gráfica que muestra que el compuesto 2 es no tóxico hasta 25 µg/mL. La Figura 23 B es una gráfica que muestra la capacidad del

15 Compuesto 2 para proteger contra la toxicidad inducida por rotenona medido con el ensayo de Citotoxicidad XTT.

La Figura 24 A es una gráfica que muestra que el compuesto 3 es no tóxico hasta 50 µg/mL. La Figura 24 B es una gráfica que muestra la capacidad del

20 Compuesto 3 para proteger contra la toxicidad inducida por rotenona medido con el ensayo de Citotoxicidad XTT.

La Figura 25 A es una gráfica que muestra que el compuesto 4 es no tóxico hasta 25 µg/mL.

25 La Figura 25 B es una gráfica que muestra la capacidad del Compuesto 4 para proteger contra la toxicidad inducida por rotenona medido con el ensayo de Citotoxicidad XTT.

La Figura 26 A es una gráfica que muestra que el compuesto 5 es no tóxico hasta 25 µg/mL. La Figura 26 B es una gráfica que muestra la incapacidad del

30 Compuesto 5 para proteger contra la toxicidad inducida por rotenona medido con el ensayo de Citotoxicidad XTT.

La Figura 27 A es una gráfica que muestra que el compuesto 6 es no tóxico hasta 50 µg/mL. La Figura27 B es una gráfica que muestra la capacidad del Compuesto 6 para proteger contra la toxicidad inducida por rotenona medido con el ensayo de Citotoxicidad XTT.

5

La Figura 28 A es una gráfica que muestra que el compuesto 7 es no tóxico hasta 50 µg/mL. La Figura28 B es una gráfica que muestra la capacidad del Compuesto 7 para proteger contra la toxicidad inducida por rotenona medido con el ensayo de Citotoxicidad XTT.

10

La Figura 29 A es una gráfica que muestra que el compuesto 8 es no tóxico hasta 25 µg/mL.

La Figura 29 B es una gráfica que muestra la capacidad del Compuesto 8 para proteger contra la toxicidad inducida por rotenona medido con el ensayo de Citotoxicidad XTT.

15

La Figura 30 A es una gráfica que muestra que el compuesto 9 es no tóxico hasta 25 µg/mL. La Figura 30 B es una gráfica que muestra la incapacidad del Compuesto 9 para proteger contra la toxicidad inducida por rotenona medido con el ensayo de Citotoxicidad XTT.

20

La Figura 31 es una gráfica que muestra los tiempos para atravesar la viga y los efectos del tratamiento con el compuesto. El tratamiento con los compuestos 2 y 7 mejoran el rendimiento motor en la prueba para atravesar la viga.

25

En tres meses de tratamiento, el compuesto 2 mejora el rendimiento motor (medido con una reducción en el tiempo para cruzar) en la prueba para atravesar la viga de forma importante ($p<0.05$) en 49%, en relación con los ratones tratados con el vehículo en la misma edad. En seis meses de tratamiento, el compuesto 7 mejora el rendimiento motor en la prueba para atravesar la viga de forma importante ($p<0.05$) en 35%, en relación con los ratones tratados con el vehículo en la misma edad. Además, el compuesto 7 muestra una tendencia general a mejorar el rendimiento motor en 39% en

30

tres meses de tratamiento, en relación con los ratones tratados con el vehículo en la misma edad.

La Figura 32 es una gráfica que muestra los tiempos de giro en la prueba del poste y los efectos del tratamiento con el compuesto. El tratamiento con el compuesto 7 mejora el rendimiento motor en la prueba del poste. En tres meses de tratamiento, el compuesto 7 tiende a mejorar el rendimiento motor (medido por una reducción en tiempo de giro) en la prueba del poste y en seis meses de tratamiento, el compuesto 7 de forma importante ($p<0.01$) mejora el rendimiento en 41%, en relación con el rendimiento anterior al tratamiento. Después de 6 meses de tratamiento con el compuesto 7, el rendimiento es similar a los ratones no transgénicos de 16 meses de edad. Los ratones tratados con el vehículo se desarrollaron de forma similar antes del tratamiento y en 3 y 6 meses de tratamiento.

La Figura 33 es una gráfica que muestra tiempos para atravesar la viga y los efectos del tratamiento con el compuesto 7. En seis semanas de tratamiento, el compuesto 7 de forma importante mejora el rendimiento motor en la prueba para atravesar la viga (medido por un 36% de reducción en tiempo para cruzar), en relación con los ratones tratados con el vehículo en la misma edad ($**p<0.01$). Las barras representan la media + SEM, $n=8$ por grupo.

La Figura 34 (Paneles A-F) son fotomicrografías que muestran que el tratamiento con el compuesto 7 provoca una reducción de los niveles de α -sinucleína en el cerebro del ratón transgénico de 18 meses de edad como se evidencia mediante la inmunohistoquímica. Los ratones tratados con el compuesto 7 (paneles C-D) presentan de forma importantes menos α -sinucleína humana intraneuronal en la corteza frontal comparados con los ratones tratados con el vehículo (paneles A-B). Los cerebros de los ratones tipo silvestres no transgénicos están desprovistos de manchas de α -sinucleína humana y se muestran como un testigo para la especificidad del anticuerpo para la α -sinucleína humana derivada del transgen (E y F). La cuantificación de la imagen revela que el tratamiento con el compuesto 7 provoca una reducción importante de 81% de objetos positivos a α -sinucleína. Los datos se expresan como porcentaje del área ocupada por los objetos positivos. Las barras representan la media + SEM, $n=5$ para los

ratones tratados con el vehículo, n=11 para los tratados con el Compuesto 7, y n=4 para no transgénicos (Non-Tg). ***p<0.001 en relación con los ratones tratados con el vehículo mediante ANOVA de una vía y la prueba de Tukey-Kramer post hoc.

5

La Figura 35, panel A es una fotografía de un análisis Western Blot que muestra los niveles de α -sinucleína en la fracción particulada de la parte anterior de los cerebros de ratones transgénicos tratados con α -sinucleína durante 6 meses con el compuesto 7 o vehículo testigo. El panel B muestra las gráficas de barras que representan el promedio cuantificado de las intensidades de banda de dos análisis Western Blot independientes que indican una reducción importante de 69% total y una reducción de 58% en hembras de los niveles monómero de α -sinucleína después del tratamiento con el compuesto 7. Las intensidades de banda del monómero de α -sinucleína se normalizaron contra las intensidades de banda de la banda 25 kDa (testigo de carga). *p<0.05, **p<0.01 en relación con los tratados con vehículo. Las barras representan media + SEM.

La Figura 36, panel A es una fotografía de un análisis Western Blot que muestra los niveles de α -sinucleína en la fracción citosólica de la parte anterior de los cerebros de ratones transgénicos tratados con α -sinucleína durante 6 meses con el Compuesto 7 o vehículo testigo. El panel B muestra las gráficas de barras que representan las intensidades de banda cuantificadas del análisis Western Blot en el panel A que indica una reducción importante de 73% total y una reducción de 48% en hembras de niveles de monómeros de α -sinucleína después del tratamiento con el compuesto 7. Las intensidades de banda de monómeros de α -sinucleína se normalizaron contra las intensidades de banda de la banda actina β (testigo de carga). *p<0.05 en relación con los tratados con el vehículo. Las barras representan la media + SEM.

La Figura 37, panel A es una fotografía de un análisis Western Blot que muestra los niveles de α -sinucleína en la fracción particulada de la parte anterior de los cerebros de ratones transgénicos tratados con α -sinucleína de

- 4-5 meses de edad durante 6 semanas con el compuesto 7 o vehículo testigo. El panel B muestra gráficas de barras que representan el promedio de las intensidades de banda cuantificadas de cuatro análisis Western Blot independientes que indican que el tratamiento con el compuesto 7 resulta en una reducción importante 45% en niveles de monómeros de α -sinucleína en relación con los testigos tratados con vehículo. Las intensidades de Banda de monómeros de α -sinucleína se normalizaron contra intensidades de banda de la banda 25 kDa (testigo de carga). * $p < 0.05$ en relación con los tratados con vehículo. Las barras representan la media + SEM.
- 10 La Figura 38, panel A es una fotografía de un análisis Western Blot que muestra los niveles de α -sinucleína en la fracción citosólica de la parte anterior de los cerebros de ratones transgénicos tratados con α -sinucleína de 4-5 meses de edad durante 6 semanas con el compuesto 7 o vehículo testigo. El panel B muestra una gráfica de barras que representa el promedio de las intensidades de banda cuantificadas de cuatro análisis Western Blot independientes que indican que el tratamiento con el compuesto 7 resulta en una reducción importante de 71% en los niveles de monómeros de α -sinucleína en relación con los testigos tratados con el vehículo. Las intensidades de banda del monómero de α -sinucleína se normalizaron contra las intensidades de banda de la banda α -tubulin (testigo de carga). ** $p < 0.01$ en relación con los tratados con vehículo. Las barras representan la media + SEM.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 25 **Definiciones**
- En esta solicitud, los siguientes términos tendrán los siguientes significados, sin importar si los términos se utilizan en cualquier forma en cualquier parte en la literatura o de otro modo en la técnica conocida.
- 30 Como se utiliza en la presente "Enfermedades causadas por amiloides" o "amiloidosis" son enfermedades asociadas con la formación, depósito, acumulación, o persistencia de fibrillas A β amiloides. Esas enfermedades incluyen, pero no se limitan a enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down,

hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis del tipo Dutch y angiopatía cerebral causada por β -amiloides.

Como se utiliza en la presente, " enfermedades causadas por sinucleína " o
5 "sinucleinopatías" son enfermedades asociadas con la formación, depósito,
acumulación, persistencia o agregación de α -sinucleína. Esas enfermedades
incluyen, pero no se limitan a enfermedad de Parkinson familiar, enfermedad
de Parkinson, enfermedad de cuerpo de Lewy, la variante del cuerpo de
Lewy de la enfermedad de Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia
10 de sistemas múltiples, y el complejo de Parkinsonismo/demencia de Guam.

"Fibrillogénesis" se refiere a la formación, depósito, acumulación, agregación
y/o persistencia de fibrillas, filamentos, inclusiones, depósitos de β -amiloides,
así como fibrillas, filamentos, inclusiones, depósitos, agregados o similares
15 de α -sinucleína.

"Inhibición de fibrillogénesis" se refiere a la inhibición de formación, depósito,
acumulación, agregación y/o persistencia de esas fibrillas de β -amiloides o
depósitos o agregados tipo fibrillas de α -sinucleína.

20

"Disrupción de fibrillas o fibrillogénesis" se refiere a la disrupción de agregados
de β -amiloides o α -sinucleína pre-formados, que generalmente existen en una
estructura secundaria en forma de placa β . Esa disrupción mediante los
compuestos proporcionados en la presente pueden implicar la reducción o
25 desensamble marcado de agregados de amiloides o sinucleína como se evaluó
por medio de diversos métodos como fluorometría de Tioflavina T, unión de rojo
Congo, espectros de dicroísmo circular, ensayos con base en tioflavina S y
células como puede ser agregación de α -sinucleína y ensayos de citotoxicidad
XTT y como se demuestra por los Ejemplos presentados en esta solicitud.

30

"Neuroprotección" o "neuroprotector" se refiere a la capacidad de un
compuesto para proteger, reducir, aliviar, mejorar, y/o atenuar el daño a las
células nerviosas (neurodegeneración).

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

5

"Excipiente Aceptado para uso farmacéutico" significa un excipiente que convencionalmente es útil para preparar una composición para uso farmacéutico que generalmente es segura, no tóxica, y apetecible e incluye excipientes que son aceptados para uso veterinario o para uso farmacéutico humano. Esos excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos o, en el caso de una composición en aerosol, gaseoso.

10

Una "cantidad efectiva de forma terapéutica" significa la cantidad que, cuando se administra a un sujeto o animal para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar el grado deseado del tratamiento, prevención o alivio de los síntomas para la enfermedad. Una "cantidad efectiva de forma terapéutica " o una "dosis efectiva de forma terapéutica" en ciertas modalidades inhibe, reduce, interrumpe, desensambla formación, depósito, acumulación y/o persistencia de β -amiloides o agregados de α -sinucleína, o trata, previene, o mejora uno o más síntomas de una enfermedad asociada con estas condiciones, como puede ser una enfermedad causada por amiloides o una sinucleinopatía, en una cantidad que se puede medir en una modalidad, al menos 20%, en otra modalidad, al menos 40%, en otra modalidad al menos 60%, y aún en otra modalidad al menos 80%, en relación con un sujeto no tratado. Las cantidades efectivas de un compuesto proporcionado en la presente o composición de estos para el tratamiento de un mamífero son aproximadamente de 0.1 hasta aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal del sujeto/día, como puede ser desde aproximadamente desde 1 hasta aproximadamente 100 mg/kg/día, en otra modalidad, desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 500 mg/kg/día. Un intervalo amplio de dosis de composiciones descritas se cree que son tanto seguras como efectivas.

15

20

25

30

El término "componente de liberación prolongada" se define en la presente como un compuesto o compuestos, que incluye, pero no se limita a, polímeros, matrices de polímero, geles, membranas permeables, liposomas, microesferas, o similares, o a combinación de estos, que facilitan la liberación
5 prolongada del ingrediente activo.

Si el complejo es soluble en agua, se puede formular en una solución amortiguadora apropiada, por ejemplo, solución salina amortiguada con fosfato, u otras soluciones compatibles de forma fisiológica. De otro modo, si
10 el complejo resultante tiene solubilidad pobre en disolventes acuosos, entonces se puede formular con un tensoactivo no iónico como puede ser Tween, o polietilenglicol. De esta manera, los compuestos y sus disolventes fisiológicos se pueden formular para su administración mediante inhalación o insuflación (ya sea a través de la boca o la nariz) o administración oral, bucal,
15 parenteral, o rectal, como ejemplos.

Como se utiliza en la presente, los derivados aceptados para uso farmacéutico de un compuesto incluyen sales, ésteres, éteres de enol, ésteres de enol, acetales, cetales, ortoésteres, semiacetales, semicetales,
20 solvatos, hidratos o profármacos de estos. Esos derivados pueden ser preparados fácilmente por los expertos en la técnica utilizando métodos conocidos para esa derivación. Los compuestos producidos se pueden administrar a animales o humanos sin efectos tóxicos considerables y son activos de forma farmacéutica o son profármacos. Las sales aceptadas para
25 uso farmacéutico incluyen, pero no se limitan a, sales de amina, como pueden ser pero no limitadas a KN'-dibenziletildiamina, cloroprocaina, colina, amoniaco, dietanolamina y otras hidroxialquiloaminas, etilendiamina, N-metilglucamina, procaina, N-benzilfenetilamina, 1 -para-clorobenzil-2-pirrolidin-1'-ilmetil-benzimidazol, dietilamina y otras alquiloaminas, piperacina
30 y tris(hidroximetil)aminometano; sales de metales alcalinos, como pueden ser pero no limitados a litio, potasio y sodio; sales de metales alcalino térreos, como pueden ser pero no limitados a bario, calcio y magnesio; sales de metales de transición, como pueden ser pero no limitados a zinc; y otras sales de metales, como pueden ser pero no limitados a fosfato hidrógeno de

sodio y fosfato disodio; y también incluyendo, pero no limitado a, sales de ácidos minerales, como pueden ser pero no limitados a clorhidratos y sulfatos; y sales de ácidos orgánicos, como pueden ser pero no limitados a acetatos, lactatos, malatos, tartratos, citratos, ascorbatos, succinatos, butiratos, valeratos y fumaratos. Los ésteres aceptados para uso farmacéutico incluyen, pero no se limitan a, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, aralquilo, heteroaralquilo, cicloalquilo y ésteres de heterociclilo de grupos ácidos, incluyendo, pero no limitados a, ácidos carboxílicos, ácidos fosfóricos, ácidos fosfínicos, ácidos sulfónicos, ácidos sulfinicos y ácidos borónicos. Los éteres de enol aceptados para uso farmacéutico incluyen, pero no se limitan a, derivados de la fórmula $C=C(OR)$ donde R es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, aralquilo, heteroaralquilo, cicloalquilo o heterociclilo. Los ésteres de enol aceptados para uso farmacéutico incluyen, pero no se limitan a, derivados de la fórmula $C-C(OC(O)R)$ donde R es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, aralquilo, heteroaralquilo, cicloalquilo o heterociclilo. Los solvatos e hidratos aceptados para uso farmacéutico son complejos de un compuesto con uno o más disolventes o moléculas agua, o desde 1 hasta aproximadamente 100, o desde 1 hasta aproximadamente 10, o desde uno hasta aproximadamente 2, 3 o 4, disolventes o moléculas de agua.

Como se utiliza en la presente, tratamiento significa cualquier manera en la cual uno o más de los síntomas de una enfermedad o desorden son aliviados o de otro modo alterados de forma benéfica. El tratamiento de una enfermedad también incluye prevenir que se presente la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no experimenta o presenta síntomas de la enfermedad (tratamiento profiláctico), inhibir la enfermedad (alentando o deteniendo su desarrollo), proporcionando alivio de los síntomas o efectos colaterales de la enfermedad (incluyendo tratamiento paliativo), y liberando la enfermedad (provocando la regresión de la enfermedad), como puede ser mediante la disrupción de β -amiloides preformados o agregados de α -sinucleína. Como se utiliza en la presente, el alivio de los síntomas de un desorden particular mediante la administración de un compuesto o composición para uso farmacéutico particular se refiere a

cualquier disminución, ya sea permanente o programada, duradero o transitorio que se pueda atribuir a o asociadas con la administración de la composición.

- 5 Como se utiliza en la presente, inhibición de la formación, depósito, acumulación, agregación, y/o persistencia de fibrillas de α -sinucleína se cree que es el tratamiento efectivo para un número de enfermedades que implican la α -sinucleína, como puede ser la enfermedad de Parkinson, enfermedad del cuerpo de Lewy y atrofia de sistemas múltiples.

10

Como se utiliza en la presente, un profármaco es un compuesto que, tras la administración in vivo, se metaboliza mediante uno o más pasos o procesos o de otro modo se convierten a la forma activa biológica, farmacéutica o terapéutica del compuesto. Para producir un profármaco, el compuesto activo

- 15 farmacéutico se modifica de manera que el compuesto activo se regenerará mediante los procesos metabólicos. El profármaco se puede diseñar para alterar la estabilidad metabólica o las características de transporte de un fármaco, para enmascarar los efectos colaterales o toxicidad, para mejorar el sabor de un fármaco o para alterar otras características o propiedades de un
- 20 fármaco. En virtud del conocimiento de los procesos farmacodinámicos y metabolismo in vivo del fármaco, los expertos en la técnica, una vez que se conoce un compuesto activo de forma farmacéutica, puede diseñar profármacos del compuesto (Véase por ejemplo, Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, New York,
- 25 páginas 388-392).

- Se muestran las estructuras químicas para algunos de los compuestos de esta invención. Los nombres de los compuestos so nombres IUPAC de forma diversa [nombres derivados de acuerdo con el sistema IUPAC (Unión
- 30 Internacional de Química Pura y Aplicada)(International Union of Pure and Applied Chemistry) aceptado establecido por la coalición de la Comisión en Nomenclatura de Química Orgánica (Commission on Nomenclature of Organic Chemistry) y la Comisión en Química Orgánica Física (Commission on Physical Organic Chemistry), como se puede encontrar en

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac>]. Nombres derivados a partir de nombres IUPAC mediante la adición o sustitución (por ejemplo, por el uso de "3,4-metilendioxfenil" derivado a partir de "fenil" en lugar de "benzo[1,3]dioxol-5-il"), y nombres derivados a partir de los nombres de reactivos (por ejemplo, por el uso de "3,4-ácido dihidroxibenzóico 3,4-dihidroxianilida" en lugar de "N-(3,4-hidroxifenil)-3,4-dihidroxibenzamida"). Sin embargo, los nombres utilizados están igualados de forma explícita con las estructuras químicas y se cree que se pueden entender fácilmente por las personas con experiencia ordinaria en la técnica.

10

"Una sustancia farmacéutica" o "sustancia farmacológica" o "composición para uso farmacéutico" se refieren a un compuesto o combinación de compuestos utilizados para el tratamiento, preferiblemente en una forma pura o casi pura. En la especificación, las agentes farmacéuticas o farmacológicas incluyen los compuestos de esta invención. Los compuestos deseablemente se purifican al 80% de homogeneidad, y preferentemente 90% de homogeneidad. Se cree que los compuestos y composiciones purificadas a 99.9% de homogeneidad son ventajosos. Como una prueba o confirmación, se producirá un compuesto homogéneo adecuado en HPLC, que los expertos en la técnica identificarán como una banda simple de pico afilado.

20

Se entenderá que los compuestos proporcionados en la presente pueden contener centros quirales. Esos centros quirales pueden ser de la configuración (R) o (S), o pueden ser una mezcla de estos. De esta manera, los compuestos proporcionados en la presente pueden ser enantioméricamente puros, o ser mezclas estereoisoméricas o diastereoméricas. En el caso de residuos de aminoácido, esos residuos pueden ser en la forma de L- o D-. La configuración para los residuos de aminoácido que se encuentran de forma natural generalmente es aminoácido L. Cuando no se especifica el residuo es la forma L. Como se utiliza en la presente, el término "aminoácido" se refiere a α -aminoácidos que son racémicos, o de la configuración D- o L-. La designación "d" que precede una designación de aminoácido (por ejemplo., dAla, dSer, dVal, etc.) se refiere al D-isómero del aminoácido. La designación "dl" que precede una designación

25

30

de aminoácido (por ejemplo., diPip) se refiere a una mezcla de los isómeros L- y D- del aminoácido. Se debe entender que los centros quirales de los compuestos proporcionados en la presente se pueden someter a epimerización in vivo. Por tal, un experto en la técnica reconocerá que la
5 administración de un compuesto en su forma (R) es equivalente, para los compuestos que se someten a la epimerización in vivo, la administración del compuesto es en su forma (S).

Como se utiliza en la presente, prácticamente puro significa
10 suficientemente homogéneo para aparecer libre de impurezas detectable de forma fácil como se determina mediante los métodos normales de análisis, como puede ser la cromatografía de capa fina (TLC), electroforesis por gel, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas (MS), utilizadas por los expertos en la técnica
15 para evaluar esa pureza, o suficientemente puro de manera que otra purificación no alterará de forma detectable las propiedades físicas y químicas, como pueden ser las actividades enzimáticas y biológicas, de la sustancia. Los métodos de purificación de los compuestos para producir compuestos químicos considerablemente puros son conocidos por los
20 expertos en la técnica. Un compuesto químico considerablemente puro, sin embargo, ser una mezcla de estereoisómeros. En esas instancias, otra purificación puede aumentar la actividad específica del compuesto.

Como se utiliza en la presente, las cadenas de carbono de alquilo,
25 alquenilo y alquinilo, si no se especifica, contienen desde 1 hasta 20 carbonos, o desde 1 o 2 hasta 16 carbonos, y son rectas o ramificadas. Las cadenas de carbono de alquenilo desde 2 hasta 20 carbonos, en ciertas modalidades, contienen desde 1 hasta 8 enlaces dobles y las cadenas de carbono de alquenilo desde 2 hasta 16 carbonos, en ciertas
30 modalidades, contienen desde 1 hasta 5 enlaces dobles. Las cadenas de carbono de alquinilo desde 2 hasta 20 carbonos, en ciertas modalidades, contienen desde 1 hasta 8 enlaces triples y las cadenas de carbono de alquinilo desde 2 hasta 16 carbonos, en ciertas modalidades, contienen desde 1 hasta 5 enlaces triple. Los grupos ejemplares de alquilo, alquenilo

y alquinilo en la presente incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, isobutilo, n-butilo, sec-butilo, ter-butilo, isopentilo, neopentilo, ter-pentilo, isohexilo, alilo (propenilo) y propargilo (propinilo). Como se utiliza en la presente, alquilo inferior, alquenilo inferior, y alquinilo inferior se refieren a cadenas de carbono que tienen desde aproximadamente 1 o aproximadamente 2 carbonos hasta aproximadamente 6 carbonos. Como se utiliza en la presente, "alqu(en)(in)il" se refiere a un grupo alquilo que contiene al menos un enlace doble y al menos un enlace triple.

10

Como se utiliza en la presente, "cicloalquilo" se refiere a un sistema de anillo mono- o multicíclico saturado, en ciertas modalidades desde 3 hasta 10 átomos de carbono, en otras modalidades desde 3 hasta 6 átomos de carbono; cicloalquenil y cicloalquinilo se refiere a sistemas de anillo mono- o multicíclicos que respectivamente incluyen al menos un enlace doble y al menos un enlace triple. Los grupos cicloalquenilo y cicloalquinilo pueden, en ciertas modalidades, contener desde 3 hasta 10 átomos de carbono, con los grupos cicloalquenilo, en otras modalidades, conteniendo desde 4 hasta 7 átomos de carbono y los grupos cicloalquinilo, en otras modalidades, conteniendo desde 8 hasta 10 átomos de carbono. Los sistemas de los grupos cicloalquilo, cicloalquenilo y cicloalquinilo pueden estar compuestos de un anillo o dos o más anillos que se pueden unir juntos en una forma fundida, en puente o conectados por la forma espiro. "Cicloalqu(en)(in)il" se refiere a un grupo cicloalquilo que contiene al menos un enlace doble y al menos un enlace triple.

25

Como se utiliza en la presente, "arilo" se refiere a grupos monocíclicos o multicíclicos aromáticos que contienen desde 6 hasta 19 átomos de carbono. Los grupos arilo incluyen, pero no se limitan a grupos como pueden ser fluorenilo sustituido o no sustituido, fenilo sustituido o no sustituido y naftilo sustituido o no sustituido.

30

Como se utiliza en la presente, "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillo monocíclico o multicíclico aromático, en ciertas modalidades, desde

aproximadamente 5 hasta aproximadamente 15 miembros donde uno o más, en una modalidad desde 1 hasta 3, de los átomos en el sistema de anillo es un heteroátomo, esto es, un elemento diferente al carbono, que incluye pero no se limita a, nitrógeno, oxígeno o azufre. El heterogrupos arilo se puede fundir de forma optativa a un anillo de benceno. Los heterogrupos arilo incluyen, pero no se limitan a, furil, imidazolil, pirimidinil, tetrazolil, tienil, piridil, pirrolil, tiazolil, isotiazolil, oxazolil, isoxazolil, triazolil, quinolinil e isoquinonil, imidazol, triazol y pirazol.

10 Como se utiliza en la presente, "heterociclilo" se refiere a un sistema de anillo monocíclico o multicíclico no aromático, en una modalidad desde 3 hasta 10 miembros, en otra modalidad desde 4 hasta 7 miembros, en otra modalidad más desde 5 hasta 6 miembros, donde uno o más, en ciertas modalidades, desde 1 hasta 3, de los átomos en el sistema de anillo es un heteroátomo, esto es, un elemento diferente al carbono, que incluye pero no se limita a, nitrógeno, oxígeno o azufre. En las modalidades donde el o los heteroátomo(s) es(son) nitrógeno, el nitrógeno de forma optativa es sustituido con alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, aralquilo, heteroaralquilo, cicloalquilo, heterociclilo, cicloalquilo, heterociclilalquilo, acilo, guanidino, o el nitrógeno se puede cuaternizar para formar un grupo amonio donde los sustituyentes se seleccionan como se menciona anteriormente.

Como se utiliza en la presente, "aralquilo" se refiere a un grupo alquilo en el cual uno de los átomos de hidrógeno del alquilo se reemplaza mediante un grupo arilo.

Como se utiliza en la presente, "heteroaralquilo" se refiere a un grupo alquilo en el cual uno de los átomos de hidrógeno del alquilo se reemplaza mediante un heterogrupos arilo.

30

Como se utiliza en la presente, "halo", "halógeno" o "haluro" se refiere a F, Cl, Br o I.

Como se utiliza en la presente, los grupos pseudo haluros o pseudo halo son grupos que se comportan prácticamente igual que los haluros. Esos

compuestos se pueden utilizar en la misma manera y tratar en la misma manera que los haluros. Los pseudo haluros incluyen, pero no se limitan a, cianuro, cianato, tiocianato, selenocianato, trifluorometoxi y azida.

- 5 Como se utiliza en la presente, "haloalquilo" se refiere a un grupo alquilo en el cual uno o más de los átomos de hidrógeno se reemplazan por halógeno. Esos grupos incluyen, pero no se limitan a, clorometilo, trifluorometilo y 1-cloro-2-fluoroetilo.

- 10 Como se utiliza en la presente, "haloalcoxi" se refiere a RO- en el cual R es un grupo haloalquilo.

Como se utiliza en la presente, "sulfinil" o "tionil" se refiere a -S(O)-. Como se utiliza en la presente, "sulfonil" o "sulfuril" se refiere a -S(O)₂-. Como se utiliza

- 15 en la presente, "sulfo" se refiere a -S(O)₂O-.

Como se utiliza en la presente, "carboxi" se refiere a un radical divalente, -C(O)O-.

- 20 Como se utiliza en la presente, "aminocarbonilo" se refiere a -C(O)NH₂.

Como se utiliza en la presente, "alquilaminocarbonilo" se refiere a -C(O)NHR en el cual R es alquilo, incluyendo alquilo inferior.

- 25 Como se utiliza en la presente, "dialquilaminocarbonilo" se refiere a -C(O)NR¹R en el cual R¹ y R son cada uno de forma independiente alquilo, incluyendo alquilo inferior; "carboxamida" se refiere a grupos de la fórmula -NR¹COR en los cuales R' y R son cada uno de forma independiente alquilo, incluyendo alquilo inferior.

30

Como se utiliza en la presente, "arilalquilaminocarbonilo" se refiere a -C(O)NRR¹ en la cual uno de R y R' es arilo, incluyendo arilo inferior, como puede ser fenilo, y el otro de R y R' es alquilo, incluyendo alquilo inferior.

Como se utiliza en la presente, "arilaminocarbonilo" se refiere a $-C(O)NHR$ en la cual R es arilo, incluyendo arilo inferior, como puede ser fenilo.

Como se utiliza en la presente, "hidroxicarbonilo" se refiere a $-COOH$.

5

Como se utiliza en la presente, "alcoxicarbonilo" se refiere a $-C(O)O$ en el cual R es alquilo, incluyendo alquilo inferior.

Como se utiliza en la presente, "ariloxicarbonilo" se refiere a $-C(O)O$ en el cual R es arilo, incluyendo arilo inferior, como puede ser fenilo.

10

Como se utiliza en la presente, "alcoxi" y "alquiltio" se refiere a $RO-$ y $RS-$, en el cual R es alquilo, incluyendo alquilo inferior.

Como se utiliza en la presente, "ariloxi" y "ariltio" se refiere a $RO-$ y $RS-$, en el cual R es arilo, incluyendo arilo inferior, como puede ser fenil.

15

Como se utiliza en la presente, "alquilenos" se refiere a un grupo hidrocarbóno alifático divalente recto, en ciertas modalidades ramificado o cíclico, en una modalidad teniendo desde 1 hasta aproximadamente 20 átomos de carbono, en otra modalidad teniendo desde 1 hasta 12 carbonos, en otra modalidad más alquilenos incluye alquilenos inferior. De forma optativa puede haber insertados a lo largo del grupo alquilenos uno o más grupos oxígeno, azufre, incluyendo $S(=O)$ y $S(=O)_2$, o átomos de nitrógeno sustituido o no sustituido, incluyendo grupos $-NR-$ y $-N^+RR-$, donde el(los) sustituyente(s) de nitrógeno es(son) alquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, heteroaralquilo o COR' , donde R' es alquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, heteroaralquilo, $-OY$ o $-NYY$, donde Y es hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterociclilo. Los grupos alquilenos incluyen, pero no se limitan a, metilen($-CH_2-$), etilen($-CH_2CH_2-$), propilen($-(CH_2)_3-$), metilendioxi($-O-CH_2-O-$) y etilendioxi($-O-(CH_2)_2-O-$). El término "alquilenos inferior" se refiere a grupos alquilenos que tienen desde 1 hasta 6 carbonos. En ciertas modalidades, los grupos alquilenos son alquilenos inferior, incluyendo alquilenos de 1 a 3 átomos de carbono.

20

25

30

Como se utiliza en la presente, "azaalquileno" se refiere a $-(CRR)_n-NR-(CRR)_m-$, donde n y m son cada uno de forma independiente un entero de 0 a 4. Como se utiliza en la presente, "oxaalquileno" se refiere a $-(CRR)_n-O-(CRR)_m-$, donde n y m son cada uno de forma independiente un entero de 0 a 4. Como se utiliza en la presente, "tiaalquileno" se refiere a $-(CRR)_n-S-(CRR)_m-$, $-(CRR)_n-S(=O)-(CRR)_m-$, y $-(CRR)_n-S(-O)_2-(CRR)_m-$, donde n y m son cada uno de forma independiente un entero de 0 a 4.

Como se utiliza en la presente, "alquenileno" se refiere a un grupo hidrocarburo alifático divalente recto, ramificado o cíclico, en una modalidad recto o ramificado, en ciertas modalidades tiene desde 2 hasta aproximadamente 20 átomos de carbono y al menos un enlace doble, en otras modalidades de 1 hasta 12 carbonos. En otras modalidades, los grupos alquenileno incluyen alquenileno inferior. De forma optativa puede haber insertados a lo largo del grupo alquileno uno o más grupos oxígeno, azufre, o átomos de nitrógeno sustituido o no sustituido, donde el sustituyente de nitrógeno es alquilo. Los grupos Alquenileno incluyen, pero no se limitan a, $-CH=CH-CH=CH-$ y $-CH=CH-CH_2-$. El término "alquenileno inferior" se refiere grupos alquenileno que tienen de 2 a 6 carbonos. En ciertas modalidades, los grupos alquenileno son alquenileno inferior, que incluyen alquenileno de 3 a 4 átomos de carbono.

Como se utiliza en la presente, "alquinileno" se refiere a un grupo hidrocarburo alifático divalente recto, ramificado o cíclico, en ciertas modalidades recto o ramificado, en una modalidad tiene desde 2 hasta aproximadamente 20 átomos de carbono y al menos un enlace triple, en otra modalidad de 1 a 12 carbonos. En otra modalidad más, alquinileno incluye alquinileno inferior. De forma optativa puede haber insertados a lo largo del grupo alquileno uno o más grupos oxígeno, azufre, o átomos de nitrógeno sustituido o no sustituido, donde el sustituyente del nitrógeno es alquilo. Los grupos alquinileno incluyen, pero no se limitan a, $-C\equiv C-C\equiv C-$, $-C\equiv C-$ y $-C\equiv C-CH_2-$. El término "alquinileno inferior" se refiere a grupos alquinileno que tienen de 2 a 6 carbonos. En ciertas modalidades, los grupos

alquinileno son alquinileno inferior, que incluyen alquinileno de 3 a 4 átomos de carbono.

Como se utiliza en la presente, "alqu(en)(in)ileno" se refiere a un grupo hidrocarbónico alifático divalente recto, ramificado o cíclico, en ciertas modalidades recto o ramificado, en una modalidad tiene desde 2 hasta aproximadamente 20 átomos de carbono y al menos un enlace triple y al menos un enlace doble; en otra modalidad de 1 a 12 carbonos. En otras modalidades, alqu(en)(in)ileno incluye alqu(en)(in)ileno inferior. De forma optativa puede haber insertados a lo largo del grupo alquileno uno o más grupos oxígeno, azufre, o átomos de nitrógeno sustituido o no sustituido, donde el sustituyente del nitrógeno es alquilo. Los grupos alqu(en)(in)ileno incluyen, pero no se limitan a, $\text{—C=C—(CH}_2\text{)}_n\text{—C=C—}$, donde n es 1 o 2. El término "alqu(en)(in)ileno inferior" se refiere a grupos alqu(en)(in)ileno que tienen hasta 6 carbonos. En ciertas modalidades, los grupos alqu(en)(in)ileno tienen aproximadamente 4 átomos de carbono.

Como se utiliza en la presente, "cicloalquileno" se refiere a un sistema de anillo mono- o multicíclico saturado divalente, en ciertas modalidades de 3 a 10 átomos de carbono, en otras modalidades de 3 a 6 átomos de carbono; cicloalquenileno y cicloalquinileno se refiere a sistemas de anillo mono- o multicíclico divalente que respectivamente incluyen al menos un enlace doble y al menos un enlace triple. Los grupos cicloalquenileno y cicloalquinileno pueden, en ciertas modalidades, contener de 3 a 10 átomos de carbono, los grupos cicloalquenileno en ciertas modalidades contienen de 4 a 7 átomos de carbono y los grupos cicloalquinileno en ciertas modalidades contienen de 8 a 10 átomos de carbono. Los sistemas de anillo de los grupos cicloalquileno, cicloalquenileno y cicloalquinileno pueden estar compuestos de un anillo o dos o más anillos que se pueden unir juntos en una forma fundido, en puente o conectados por la forma espiro. "Cicloalqu(en)(in)ileno" se refiere a un grupo cicloalquileno que contiene al menos un enlace doble y al menos un enlace triple.

Como se utiliza en la presente, "arileno" se refiere a un grupo aromático divalente, monocíclico o policíclico, en ciertas modalidades monocíclico, en una modalidad tiene desde 5 hasta aproximadamente 20 átomos de carbono y al menos un anillo aromático, en otra modalidad de 5 a 12 carbonos. En
 5 otras modalidades, arileno incluye arileno inferior. Los grupos arileno incluyen, pero no se limitan a, 1,2-, 1,3- y 1,4-fenileno. El término "arileno inferior" se refiere a grupos arileno que tienen 6 carbonos.

Como se utiliza en la presente, "heteroarileno" se refiere a un sistema de
 10 anillo aromático monocíclico o multicíclico divalente, en una modalidad desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 15 átomos en el o los anillos), donde uno o más, en ciertas modalidades de 1 a 3, de los átomos en el sistema de anillo es un heteroátomo, esto es, un elemento diferente al carbono, que incluye pero no se limita a, nitrógeno, oxígeno o azufre. El
 15 término "heteroarileno inferior" se refiere a grupos heteroarileno que tienen 5 o 6 átomos en el anillo.

Como se utiliza en la presente, "heterociclileno" se refiere a un sistema de anillo no aromático monocíclico o multicíclico divalente, en ciertas
 20 modalidades de 3 a 10 miembros, en una modalidad de 4 a 7 miembros, en otra modalidad de 5 a 6 miembros, donde uno o más, incluyendo de 1 a 3, de los átomos en el sistema de anillo es un heteroátomo, esto es, un elemento diferente al carbono, que incluye pero no se limita a, nitrógeno, oxígeno o azufre.

25

Como se utiliza en la presente, "alquilo sustituido," "alquenilo sustituido," "alquinilo sustituido," "cicloalquilo sustituido," "cicloalquenilo sustituido," "cicloalquinilo sustituido," "arilo sustituido," "heteroarilo sustituido," "heterociclilo sustituido," "alquileno sustituido," "alquenileno sustituido,"
 30 "alquinileno sustituido," "cicloalquileno sustituido," "cicloalquenileno sustituido," "cicloalquinileno sustituido," "arileno sustituido," "heteroarileno sustituido" y "heterociclileno sustituido" se refiere a grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, cicloalquinilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, alquileno, alquenileno, alquinileno, cicloalquileno,

cicloalquenileno, cicloalquinileno, arileno, heteroarileno y heterociclileno, respectivamente, que son sustituidos con uno o más sustituyentes, en ciertas modalidades uno, dos, tres o cuatro sustituyentes, donde los sustituyentes son como se definen en la presente, en una modalidad seleccionados de Q¹.

5

Como se utiliza en la presente, "alquilideno" se refiere a un grupo divalente, como puede ser $-CR'R''$, el cual se une a un átomo de otro grupo, formando un enlace doble. Los grupos alquilideno incluyen, pero no se limitan a, metilideno ($=CH_2$) y etilideno ($=CHCH_3$). Como se utiliza en la presente, "aril alquilideno" se refiere a un grupo alquilideno en el cual R' o R'' es un grupo arilo. Los grupos "Cicloalquilideneo" son aquellos donde R' y R'' se enlazan para formar un anillo carbocíclico. Los grupos "Heterociclilideno" son aquellos donde al menos uno de R' y R'' contienen un heteroátomo en la cadena, y R' y R'' se enlazan para formar un anillo heterocíclico.

15

Como se utiliza en la presente, "amida" se refiere al grupo divalente $-C(O)NH-$. "Tioamida" se refiere al grupo divalente $-C(S)NH-$. "Oxiamida" se refiere al grupo divalente $-OC(O)NH-$. "Tioamida" se refiere al grupo divalente $-SC(O)NH-$. "Ditioamida" se refiere al divalente grupo $-SC(S)NH-$. "Ureido" se refiere al grupo divalente $-HNC(O)NH-$. "Tioureido" se refiere al grupo divalente $-NC(S)NH-$.

20

Como se utiliza en la presente, "semicarbazida" se refiere a $-NHC(O)NHNH-$. "Carbazato" se refiere al grupo divalente $-OC(O)NHNH-$. "Isotiocarbazato" se refiere al grupo divalente $-SC(O)NHNH-$. "Tiocarbazato" se refiere al grupo divalente $-OC(S)NHNH-$. "Sulfonilhidrazida" se refiere al grupo divalente $-SO_2NHNH-$. "Hidrazida" se refiere al grupo divalente $-C(O)NHNH-$. "Azo" se refiere al grupo divalente $-N=N-$. "Hidrazinilo" se refiere al grupo divalente $-NH-NH-$.

25

30

Como se utiliza en la presente, "sulfonamida" se refiere a $-RSO_2NH_2-$ un grupo sulfona conectado a un grupo amina.

Como se utiliza en la presente, "imidazol" se refiere a un compuesto orgánico aromático heterocíclico que tiene una fórmula general de $C_3H_4N_2$.

5 Como se utiliza en la presente, "triazol" se refiere a uno de un par de compuestos químicos isoméricos con la fórmula molecular de $C_2H_3N_3$.

10 Como se utiliza en la presente, "pirazol" se refiere a un anillo de 5 miembros heterocíclico compuesto de tres carbonos y dos átomos de nitrógeno en posiciones contiguas.

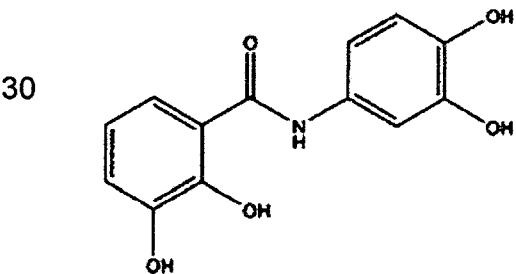
Como se utiliza en la presente, "adamantano" se refiere a un tricycloalquilo que tiene una fórmula general de $C_{10}H_{16}$.

15 Donde el número de cualquier sustituyente determinado no se específicos (por ejemplo., haloalquilo), puede haber uno o más sustituyentes presentes. Por ejemplo, "haloalquilo" puede incluir uno o más del mismo o diferentes halógenos. Como otro ejemplo, "alcoxifenilo de C_{1-3} " puede incluir uno o más de los mismos o diferentes grupos alcoxí que contienen uno, dos o tres carbonos.

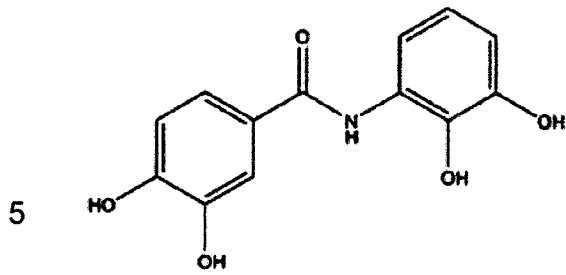
20 Como se utiliza en la presente, las abreviaturas para cualquier grupo protector, aminoácidos y otros compuestos, son, a menos que se indique de otro modo, de acuerdo con su uso común, abreviaturas reconocidas, o la IUPAC-IUB Comisión en Nomenclatura Bioquímica (véase, (1972) Biochem. 25 11:942-944).

Compuestos de la invención

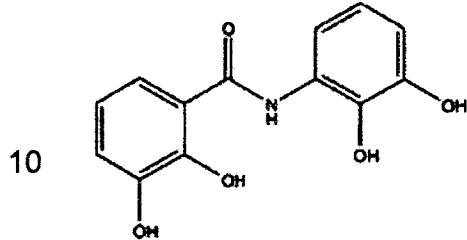
Los compuestos de esta invención son:



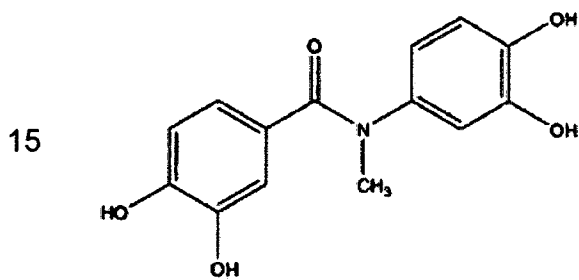
3,4 dihidroxianilida del ácido 2,3 dihidroxibenzoico (Compuesto 1),



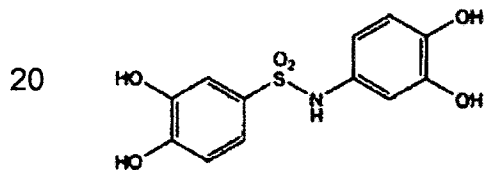
2,3 dihidroxianilida del ácido 3,4 dihidroxibenzoico (Compuesto 2),



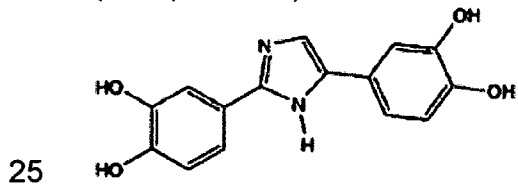
2,3 dihidroxianilida del ácido 2,3 dihidroxibenzoico (Compuesto 3),



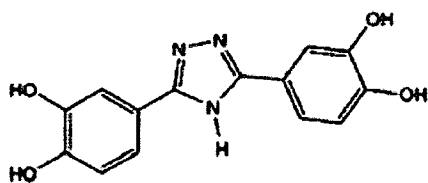
3,4 dihidroxi N-metil anilida del ácido 3,4 dihidroxibenzoico (Compuesto 4),



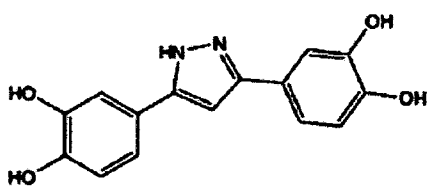
3,4 dihidroxifenilsulfonamida del ácido 3,4 dihidroxibenzensulfónico (Compuesto 5),



2,4 bis (3,4 dihidroxifenil) imidazol (Compuesto 6),

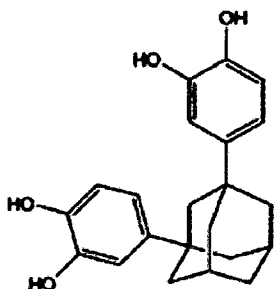


30 3,5 bis (3,4 dihidroxifenil) 1,2,4 triazol (Compuesto 7),



3,5 bis (3,4 dihidroxifenil) pirazol (Compuesto 8),

5



1,3 bis (3,4 dihidroxifenil) adamantano (Compuesto 9),

Síntesis de los compuestos de la invención

- 10 Los compuestos de esta invención se pueden preparar mediante métodos generalmente conocido por las personas con experiencia en la técnica, considerando el conocimiento y la descripción de esta solicitud que incluyen los Ejemplos 1-5.
- 15 Los materiales iniciales y reactivos utilizados al preparar estos compuestos están disponibles de proveedores comerciales como Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Bachem (Torrance, CA), Sigma (St. Louis, MO), o Lancaster Synthesis Inc. (Windham, NH) o se preparan mediante métodos bien conocidos por las personas con experiencia en la técnica, los siguientes
- 20 procedimientos descritos en esas referencias como Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, vols. 1-17, John Wiley y Sons, New York, NY, 1991; Rodd's Chemistry de Carbon Compounds, vols. 1-5 y sups., Elsevier Science Publishers, 1989; Organic Reactions, vols. 1-40, John Wiley y Sons, New York, NY, 1991 ; March J.: Advanced Organic Chemistry, 4th
- 25 ed., John Wiley y Sons, New York, NY; y Larock: Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, New York, 1989.

En la mayor parte de los casos, los grupos protectores para los grupos hidroxilo se introducen y finalmente se eliminan. Los grupos protectores adecuados se describen en Verdee et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, Segunda edición, John Wiley and Sons, New York, 1991. Otros

5 materiales iniciales precoces o intermedios se pueden prepararse mediante la elaboración de los materiales antes mencionados, por ejemplo, mediante métodos bien conocidos por las personas con experiencia en la técnica.

Los materiales iniciales, intermedios y compuestos de esta invención se

10 pueden aislar y purificar utilizando técnicas convencionales, que incluyen la precipitación, filtración, destilación, cristalización, cromatografía, y similares. Los compuestos se pueden caracterizar utilizando métodos convencionales, que incluyen constantes físicas y métodos espectroscópicos.

15 **Farmacología y Servicios Públicos**

Los compuestos proporcionados se pueden utilizar como tales, administrarse en la forma de sales aceptadas para uso farmacéutico derivadas de ácidos orgánicos o inorgánicos, o utilizadas en combinación con uno o más excipientes aceptados para uso farmacéutico. La frase "sales aceptadas para

20 uso farmacéutico" significa aquellas sales que están, dentro del alcance del criterio médico, adecuadas para utilizarse en contacto con los tejidos sin toxicidad, irritación, respuestas alérgicas y similares indebidos y son conmensuradas con una relación beneficio/riesgo razonable. Las sales aceptadas para uso farmacéutico son bien conocidas en la técnica. Las sales

25 se pueden preparar in situ durante el aislamiento y purificación final de los compuestos proporcionados en la presente y de forma separada mediante la reacción de la sustancia activa básico o ácido con una base o ácido respectivamente. Las sales comunes derivadas de sales ácidas orgánicas o inorgánicas incluyen, pero no se limitan a clorhidrato, bromhidrato,

30 yodhidrato, acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bisulfato, gluconato, fumarato, yodhidrato, lactato, maleato, oxalato, palmitato, pectinato, succinato, tartrato, fosfato, glutamato, y bicarbonato. Las sales comunes derivadas de bases orgánicas o inorgánicas incluyen, pero no se limitan a litio, sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, amonio de

monoalquilo como puede ser meglumina, dialquilamonio, trialquilamonio, y tetralquilamonio.

Los niveles de dosis reales de ingredientes activos y el modo de
5 administración de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la
presente se pueden cambiar para obtener la respuesta terapéutica efectiva
para un paciente particular. La frase "cantidad efectiva de forma terapéutica"
del compuesto propuesto en la presente significa una cantidad suficiente del
compuesto para tratar desordenes, en una relación beneficio/riesgo
10 razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá, sin
embargo, que el uso diario total de los compuestos y composiciones de lo
provisto será decidido por el especialista que atiende dentro del alcance del
criterio médico. La dosis diaria total de los compuestos proporcionados en la
presente puede variar desde aproximadamente 0.1 hasta aproximadamente
15 1000 mg/kg/día. Para los propósitos de la administración oral, las dosis
pueden ser en el intervalo desde aproximadamente 1 hasta
aproximadamente 500 mg/kg/día. Si se desea, la dosis diaria efectiva se
puede dividir en dosis múltiples para los propósitos de administración; en
consecuencia, las composiciones de una sola dosis pueden contener esas
20 cantidades o submúltiplos de éstas para constituir la dosis diaria. El nivel de
dosis efectiva de forma terapéutica específica para cualquier paciente
particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el desorden
que está siendo tratado y la gravedad del desorden; el historial médico del
paciente, la actividad del compuesto específico emplead; la composición
25 específica empleada, edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del
paciente, el tiempo de administración, la ruta de administración, la duración
del tratamiento, tasa de excreción del compuesto específico empleado,
fármacos utilizados en combinación o coincidente con el compuesto
específico empleado; y similares.

30

Los compuestos proporcionados se pueden formular junto con uno o más
diluyentes, portadores, paliativos, y agentes antibacterianos y antifungicidas
como pueden ser parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares.
La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de

materiales de recubrimiento como puede ser as lecitina, por el mantenimiento del tamaño de la partícula en el caso de dispersiones, y por el uso de tensoactivos. En algunos casos, para prolongar el efecto del fármaco, es deseable disminuir la tasa de absorción del fármaco de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede realizar suspendiendo el cristalino o sustancia activa amorfo en un vehículo que tenga solubilidad al agua pobre como pueden ser los aceites. La tasa de absorción del fármaco depende entonces de su tasa de disolución, lo cual, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma del cristalino. La absorción prolongada de una forma farmacéutica inyectable se puede obtener mediante el uso de agentes retardantes de la absorción como puede ser el monoestereato de aluminio o gelatina.

El compuesto propuesto en la presente se puede administrar en forma entérica o parenteral en formas sólidas o líquidas. Las composiciones para inyección parenteral pueden tener soluciones acuosas o no acuosas, dispersiones, suspensiones, o emulsiones fisiológicamente aceptables, isotónicas estériles, y polvos estériles para la reconstitución en soluciones inyectables estériles o dispersiones. Ejemplos de portadores, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (propilenglicol, polietilenglicol, glicerol, y similares), aceites vegetales (como puede ser aceite de oliva), ésteres orgánicos inyectables como puede ser oleato de etilo y mezclas adecuadas de estos. Estas composiciones también pueden contener paliativos como pueden ser agentes preservadoras, humectantes, emulsificantes, y dosificadoras. Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión como pueden ser alcoholes de isoestearilo etoxilados, polioxietilen sorbitol y ésteres de sorbitan, celulosa de microcristalino, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, o mezclas de estas agentes.

Los compuestos propuestos en la presente también se pueden administrar por inyección o infusión, ya sea subcutánea o intravenosa, o intramuscular, o intraesternal, o intranasal, o mediante técnicas de infusión en la forma de

- suspensión oleaginosa o inyectable estéril. El compuesto puede estar en la forma de suspensiones oleaginosas o acuosas inyectables estériles. Estas suspensiones se pueden formular de acuerdo con técnica conocida utilizando agentes de dispersión, de humedad y agentes de suspensión que se describieron anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico aceptado para uso parenteral por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptados que se pueden emplear son agua, solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónico. Además, aceites fijos, estériles, son empleados de forma convencional como un disolvente o medio de suspensión. Para este propósito cualquier aceite fijo blando se puede emplear de forma convencional incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además los ácidos grasos como puede ser el ácido oleico encontraron uso en la preparación de inyectables. Los esquemas de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, varias dosis divididas se pueden administrar diariamente o la dosis se puede reducir proporcionalmente como indiquen las exigencias de la situación terapéutica.
- Las formas de los depósitos inyectables se hacen formando matrices micro encapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables como pueden ser polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la relación del fármaco al polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, la tasa de liberación del fármaco se puede controlar. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables del depósito también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o micro emulsiones que son compatibles con los tejidos del cuerpo. Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, por filtración a través de un filtro que retiene bacterias o incorporando agentes esterilizantes en la forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver o dispersar en agua estéril u otro medio inyectable estéril justo antes de utilizarlo.

Las formas de dosis sólidas para la administración oral incluyen cápsulas, tabletas, píldoras, polvos y gránulos. En esas formas de dosis sólidas, el compuesto activo se puede mezclar con al menos un excipiente o portador inerte, aceptado para uso farmacéutico, como puede ser citrato de sodio o difosfato de calcio y/o (a) cargas o prolongadores como pueden ser almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico; (b) aglomerantes como pueden ser carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y acacia; (c) humectantes como glicerol; (d) agentes desintegrantes como pueden ser agar-agar, carbonato de calcio, almidón de papa o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (e) solución agentes retardantes como la parafina; (f) aceleradores de absorción como compuestos amonio cuaternario; (g) agentes humectantes como alcohol de cetilo y monoestearato de glicerol; (h) absorbentes como caolín y arcilla de bentonita y (i) lubricantes como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilen glicoles sólidos, sulfato lauril de sodio y mezclas de estos. En el caso de cápsulas, tabletas y píldoras, la forma de la dosis también puede tener agentes de solución amortiguadora. Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina con carga blanda y dura utilizando esos excipientes como lactosa o azúcar de leche así como polietilen glicoles de pesos moleculares altos y similares.

Las formas de dosis sólidas de tabletas, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y coberturas como pueden ser recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. Ellas pueden contener de forma optativa agentes opacificantes y también puede ser de una composición tal que libere el ingrediente activo únicamente, o preferentemente, en una cierta parte del tracto intestinal, de forma optativa, en una forma retardada. Ejemplos de composiciones incrustadas que se pueden utilizar incluyen agentes y ceras poliméricas. Las tabletas contienen el compuesto mezclado con excipientes aceptados para uso farmacéutico no tóxicos que son adecuados para la fabricación de tabletas. Estos excipientes pueden ser por

ejemplo, diluyentes inertes, como puede ser carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio;

agentes de sedimentación y desintegrantes, por ejemplo, almidón de maíz o
 5 ácido algínico; agentes aglomerantes, por ejemplo, almidón de maíz, gelatina o acacia, y agentes lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio o ácido esteárico o talo. Las tabletas ser sin recubrimiento o pueden estar recubiertas mediante técnicas conocidas para demorar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y por lo tanto proporciona una acción sobre un
 10 periodo más grande. Por ejemplo, se puede emplear un material de retardo de tiempo como puede ser el monoestearato de glicerol o diestearato de glicerol. Las formulaciones para uso oral también se pueden presentar como cápsulas de gelatina dura en donde el compuesto se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolina, o
 15 como cápsulas de gelatina blanda en donde ingrediente activo se mezcla con agua o un medio aceitoso, por ejemplo, aceite de cacahuate, parafina líquida o aceite de oliva.

Las formas de dosis líquida para administración oral incluyen emulsiones,
 20 soluciones, suspensiones, jarabes y elíxires aceptados para uso farmacéutico. Además de los compuestos activos, las formas de dosis líquida pueden contener diluyentes inertes utilizados comúnmente en la técnica como puede ser, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes y emulsificadores solubilizantes como pueden ser alcohol de etilo, alcohol de isopropilo, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol de benzilo, benzoato de benzilo, prolilen glicol, 1,3-butilen glicol, formamida de dimetilo, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuate, maíz, yema, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol de tetrahidrofurfurilo, polietilen glicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitan y mezclas de
 25 estos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir paliativos como agentes humectantes, emulsificadoras y agentes dispersantes, edulcorantes, agentes saborizantes y aromatizantes.
 30

- Las suspensiones acuosas contienen el Compuesto mezclado con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Esos excipientes son agentes dispersantes, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetil celulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y de acacia; los agentes dispersantes o humectantes pueden ser fosfátidos naturales, por ejemplo lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo, heptadecaetilenoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos como hexitol como puede ser monooleato sorbitol polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato sorbitan polietileno. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más preservativos, por ejemplo, etil o n-propil p-hidroxibenzoato, una o más agentes colorantes, una o más agentes saborizantes, o una o más agentes edulcorantes, como puede ser sacarosa o sacarina.
- Las suspensiones oleosas se pueden formular dispersando el compuesto en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de cacahuate, aceite de oliva, aceite de sésamo, o aceite de coco o en un aceite mineral como puede ser parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener una sustancia espesante, por ejemplo cera de abeja, parafina dura o alcohol de cetilo. Las agentes edulcorantes, como pueden ser aquellas establecidas más adelante, y agentes saborizantes se pueden adicionar para proporcionar una apetecible preparación oral. Estas composiciones se pueden preservar mediante la adición de un antioxidante como puede ser ácido ascórbico. Los polvos dispersables y gránulos adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporciona el ingrediente activo mezclado con una sustancia dispersante o humectante, una sustancia dispersante y uno o más preservativos. Las agentes dispersantes o humectantes y las agentes dispersantes se ejemplifican mediante aquellas ya

descritas anteriormente. Los excipientes adicionales, por ejemplo agentes edulcorantes y saborizantes también pueden estar presentes.

Los compuestos propuestos en la presente también pueden estar en la forma de emulsiones de aceite en agua. La fase aceitosa puede ser un aceite
5 vegetal, por ejemplo aceite de oliva o aceite de cacahuete, o un aceite mineral, por ejemplo parafina líquida o mezclas de éstos. Los agentes emulsificadores pueden ser gomas naturales, por ejemplo acacia o goma tragacanto, fosfátidos naturales, por ejemplo soya, lecitina, y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por
10 ejemplo monooleato de sorbitan y productos de condensación de los ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato polioxietilen sorbitan. La emulsion también puede contener agentes edulcorantes y saborizantes. Los jarabes y elixires se pueden formular con agentes edulcorantes, por ejemplo, glicerol, sorbitol o sacarosa. Esas formulaciones también pueden
15 contener un demulcente, un preservativo y agentes saborizantes y colorantes.

En una modalidad, los compuestos se formulan en forma de unidad de dosis para facilitar la administración y uniformidad de la dosis. La forma de unidad
20 de dosis como se utiliza en la presente se refiere a unidades pequeñas físicamente adecuadas como dosis unitarias para los sujetos que se van a tratar; cada una contiene una cantidad efectiva de forma terapéutica del compuesto y al menos un excipiente para uso farmacéutico. Un producto medicinal contendrá una forma de unidad de dosis dentro de un contenedor
25 que está etiquetado o acompañado por una etiqueta que indica el método de tratamiento propuesto, como puede ser el tratamiento de una enfermedad causada por β -amiloides, por ejemplo una amiloidosis como puede ser la enfermedad de Alzheimer o una enfermedad asociada con la formación de fibrillas de α -sinucleína como puede ser la enfermedad de Parkinson. Las
30 composiciones para la administración rectal o vaginal preferentemente son supositorios que se pueden preparar mezclando los compuestos propuestos en la presente con excipientes o portadores no irritantes adecuados como pueden ser mantequilla de cocoa, polietilen glicol o un supositorio de cera que sean sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura del

cuerpo y por lo tanto se funden en el recto o cavidad vaginal y liberan el compuesto activo.

Los compuestos propuestos en la presente también se pueden administrar
5 en la forma de liposomas. Los métodos para formar liposomas son conocidos
en la técnica (Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology* 1976, Volumen XIV,
Academic Press, New York, N.Y.) como es conocido en la técnica, los
liposomas generalmente se derivan de fosfolípidos u otros agentes lípidos.
Los liposomas se forman mediante cristales líquidos mono- o multi-lamelares
10 hidratados que están dispersos en un medio acuoso. Se puede utilizar
cualquier lípido metabolizable y aceptado de forma fisiológica, no tóxico
capaz de formar liposomas. Las composiciones presentes en la forma de
liposomas pueden contener, además del compuesto propuesto en la
presente, estabilizadores, preservativos, excipientes y similares. Los lípidos
15 preferidos son fosfolípidos naturales y sintéticos y fosfatidil colinas (lecitinas).

Los compuestos propuestos en la presente también se pueden administrar
en la forma de un 'profármaco' en donde los ingredientes para uso
farmacéutico activos, son liberados in vivo después del contacto con las
20 enzimas hidrolíticas como pueden ser esterasas y fosfatasas en el cuerpo. El
término "profármacos aceptados para uso farmacéutico" como se utiliza en la
presente representa aquellos profármacos de los compuestos propuestos en
la presente, los cuales son, dentro del alcance del criterio médico, adecuado
para utilizarse en contacto con los tejidos sin toxicidad indebida, irritación,
25 respuesta alérgica, y similares, conmensurado con una relación razonable
beneficio/riesgo, y efectiva para su uso propuesto. Una descripción completa
se proporciona en T. Higuchi y V. Stella (Higuchi, T. y Stella, V. *Prodrugs as
Novel Delivery Systems*, V. 14 of the A.C.S. Symposium Series; Edward B.
Roche, Ed., *Bioreversible Carriers in Drug Design* 1987, American
30 Pharmaceutical Association and Pergamon Press), las cuales se incorporan a
la presente para referencia.

Los compuestos propuestos en la presente, o derivados aceptados para uso
farmacéutico de estos, también se pueden formular para ser dirigida a un tejido,

receptor, u otra área particular del cuerpo del sujeto que se va a tratar. Muchos de esos métodos de orientación son bien conocidos por los expertos en la técnica. Todos esos métodos de orientación se contemplan en la presente para utilizarse en las composiciones instantáneas. Para ejemplos no limitantes de
 5 métodos de orientación, véase, por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 6,316,652, 6,274,552, 6,271,359, 6,253,872, 6,139,865, 6,131,570, 6,120,751, 6,071,495, 6,060,082, 6,048,736, 6,039,975, 6,004,534, 5,985,307, 5,972,366, 5,900,252, 5,840,674, 5,759,542 y 5,709,874.

10 En una modalidad, las suspensiones liposomales, que incluyen liposomas dirigidos al tejido, como pueden ser liposomas dirigidos al tumor, también pueden ser portadores aceptados para uso farmacéutico adecuados. Estos se pueden preparar de acuerdo con los métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las formulaciones de liposoma se pueden
 15 preparar como se describe en Patente U.S. No. 4,522,811. Brevemente, los liposomas como pueden ser las vesículas multilamelares (MLVs) se pueden formar secando la colina fosfatidil de huevo y serina fosfatidil del cerebro (relación molar 7:3) en el interior de un matraz. Una solución de un compuesto propuesto en la presente en solución salina amortiguada con
 20 fosfato a la que le faltan los cationes divalentes (PBS) se adicionan y el matraz se agita hasta que la película del lípido se dispersa. Las vesículas resultantes se lavan para eliminar el compuesto no encapsulado, sedimentado por centrifugación, y después vuelto a dispersar en PBS.

25 **Formulaciones de Liberación Prolongada**

La invención también incluye el uso de formulaciones de liberación prolongada para entregar los compuestos de la presente invención en la diana deseada (es decir, cerebro u órganos sistémicos) a niveles de circulación elevados (entre 10^{-9} y 10^{-4} M) también se describen. En una
 30 modalidad preferida para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o de Parkinson, los niveles de circulación de los compuestos se mantienen hasta 10^{-7} M. Los niveles están circulando en el paciente ya sea de forma sistémica, o en una modalidad preferida, presente en el tejido del cerebro, y

en modalidades más preferidas, se localizan en los depósitos de β -amiloides o fibrillas de α -sinucleína en el cerebro u otros tejidos.

Se entiende que los niveles del compuesto se mantienen sobre un cierto periodo de tiempo como se desea y un experto en la técnica lo puede determinar fácilmente utilizando esta descripción y los compuestos de la invención. En una modalidad preferida, la invención incluye una característica única de administración que consiste en una formulación de liberación prolongada de manera que un nivel constante del compuesto terapéutico se mantiene entre 10 y 10 M entre 48 a 96 horas en los sueros.

Esas formulaciones de liberación prolongada y/o programada se pueden hacer mediante dispositivos de entrega de medios de liberación prolongada que son bien conocidos por los expertos en la técnica, como pueden ser los descritos en las Patentes US Nos. 3,845,770; 3,916,899; 3,536,809; 3,598,123; 4,008,719; 4,710,384; 5,674,533; 5,059,595; 5,591,767; 5,120,548; 5,073,543; 5,639,476; 5,354,556 y 5,733,566, las descripciones de las cuales se incorporan a la presente para referencia. Estas composiciones para uso farmacéutico se pueden utilizar para proporcionar liberación prolongada o lenta de uno o más de los compuesto activos utilizando, por ejemplo, celulosa de hidroxipropilmetilo, otras matrices de polímero, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, recubrimientos multicapa, micro partículas, liposomas, microesferas, o similares. Las formulaciones de liberación prolongada adecuadas, conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo aquellas descritas en la presente, se pueden seleccionar fácilmente para utilizarse con las composiciones para uso farmacéutico de la invención. De esta manera, las formas de una sola dosis adecuadas para oral administración, como pueden ser, pero no limitadas a, tabletas, cápsulas, gelcaps, caplets, polvos y similares, que están adaptadas para liberación prolongada están abarcados en la presente invención.

En una modalidad preferida, la formulación de liberación prolongada contiene compuesto activo como puede ser, pero no limitado a, celulosa

microcristalina, maltodextrina, etilcelulosa, y estearato de magnesio. Como se describe antes, todos los métodos conocidos para encapsulación que son compatibles con las propiedades de los compuestos descritos están abarcados en esta invención. La formulación de liberación prolongada se encapsula mediante partículas o gránulos de recubrimiento de la composición para uso farmacéutico de la invención con diferentes espesores de polímeros soluble de forma lenta o mediante microencapsulación. En una modalidad preferida, la formulación de liberación prolongada se encapsula con un material de recubrimiento de diferentes espesores (por ejemplo, aproximadamente de 1 micrón a 200 micrones) que permiten la disolución de la composición para uso farmacéutico aproximadamente de 48 horas a aproximadamente 72 horas después de su administración a un mamífero. En otra modalidad, el material de recubrimiento es un aditivo aprobado para alimentos.

15

En otra modalidad, la formulación de liberación prolongada es un dispositivo de disolución de matriz que se prepara mediante la compresión del fármaco con un portador de polímero soluble de forma lenta en una tableta. En una modalidad preferida, las partículas recubiertas tienen un tamaño que varía desde aproximadamente 0.1 hasta aproximadamente 300 micrones, como se describe en las Patentes U.S. Nos. 4,710,384 y 5,354,556, las cuales se incorporan a la presente para referencia en su totalidad. Cada una de las partículas tiene la forma de una micromatriz, con el ingrediente activo distribuido de forma uniforme en todo el polímero.

25

Se describen Las formulaciones Liberación prolongada como aquellas descritas en la Patente U.S. No. 4,710,384, la cual se incorpora a la presente para referencia en su totalidad, tienen un porcentaje relativamente alto de plastificante en el recubrimiento para permitir suficiente flexibilidad para prevenir el rompimiento considerable durante la compresión. La cantidad específica de plastificante varía dependiendo de la naturaleza del recubrimiento y el plastificante particular utilizado. La cantidad se puede determinar fácilmente de forma empírica probando las características de liberación de las tabletas formadas. Si el medicamento se libera muy rápido,

30

entonces se utiliza como plastificante. Las características de liberación también son una función del espesor del recubrimiento. Cuando se utilizan cantidades considerables de plastificante, la capacidad de liberación prolongada del recubrimiento disminuye. De esta manera, el espesor del recubrimiento puede aumentar ligeramente para constituir un aumento en la cantidad del plastificante. En general, el plastificante en esa modalidad estará presente en una cantidad de aproximadamente 15 a 30% del material de liberación prolongada en el recubrimiento, preferentemente de 20 a 25%, y la cantidad de recubrimiento será desde 10 hasta 25% en peso del material activo, preferentemente de 15 a 20%. Cualquier plastificante convencional aceptado para uso farmacéutico se puede incorporar en el recubrimiento.

Los compuestos de la invención se pueden formular como una formulación de liberación prolongada y/o programada. Todos los productos de uso farmacéutico de liberación prolongada tienen una meta común para mejorar la terapia del fármaco sobre las obtenidas por sus contrapartes no prolongadas. De forma ideal, el uso de una preparación de liberación prolongada diseñada de forma óptima en el tratamiento medico se caracteriza por un mínimo de sustancia activa siendo empleada para curar o como testigo de la condición. Las ventajas de las formulaciones de liberación prolongada pueden incluir: 1) actividad extendida de la composición, 2) reducir la frecuencia de la dosis y 3) aumenta la observancia del paciente. Además, las formulaciones de liberación prolongada se pueden utilizar para afectar el tiempo de inicio de la acción u otras características, como pueden ser los niveles de sangre de la composición, y de esta manera puede afectar la ocurrencia de los efectos colaterales.

Las formulaciones de liberación prolongada de la invención están diseñadas para liberar inicialmente una cantidad de la composición terapéutica que produce rápidamente el efecto terapéutico deseado y libera de forma gradual continua otras cantidades de las composiciones para mantener este nivel de efecto terapéutico sobre un periodo extendido de tiempo. Para mantener este nivel constante en el cuerpo, la composición terapéutica se debe liberar de la

forma de dosificación en una relación que reemplazará la composición que está siendo metabolizada y excretada del cuerpo.

La liberación prolongada de un ingrediente activo se puede estimular
5 mediante diversos inductores, por ejemplo pH, temperatura, enzimas, agua, u
otras condiciones o compuestos fisiológicos. El término "componente de
liberación prolongada" en el contexto de la presente invención se define
como un compuesto o compuestos, que incluyen, pero no se limitan a,
polímeros, matrices de polímero, geles, membranas permeables, liposomas,
10 microesferas, o similares, o una combinación de estos, que facilitan la
liberación prolongada del ingrediente activo.

Si el complejo es soluble en agua, se puede formular en una solución
amortiguadora apropiada, por ejemplo, solución salina amortiguada con
15 fosfato, u otras soluciones compatibles de forma fisiológica. De otro modo, si
el complejo resultante tiene solubilidad pobre en disolventes acuosos,
entonces se puede formular con un tensoactivo no iónico como puede ser
Tween, o polietilen glicol. De esta manera, los compuestos y sus disolventes
de forma fisiológica se pueden formular para su administración mediante
20 inhalación o insuflación (ya sea a través de la boca o la nariz) o
administración oral, bucal, parenteral, o rectal, como ejemplos.

Las preparaciones para administración oral se pueden formular de forma
adecuada para dar liberación testigo del compuesto activo. En una modalidad
25 preferida, los compuestos de la presente invención se formulan como polvos
de liberación testigo de micro partículas muy pequeñas que se pueden
formular fácilmente en forma líquida. El polvo de liberación prolongada
contiene partículas que contienen un ingrediente activo y de forma optativa,
un excipiente con al menos un polímero no tóxico.

30

El polvo se puede dispersar o suspender en un vehículo líquido y mantendrá
sus características de liberación prolongada durante un periodo de tiempo
útil. Estas dispersiones o suspensiones tienen estabilidad química y
estabilidad en términos de tasa de disolución. El polvo puede contener un

excipiente que tiene un polímero, el cual puede ser soluble, insoluble, permeable, impermeable, o biodegradable. Los polímeros pueden ser polímeros o copolímeros. Los polímeros pueden ser un polímero natural o sintético. Los polímeros naturales incluyen polipéptidos (por ejemplo, zeína),
5 polisacáridos (por ejemplo, celulosa) y ácido algínico. Los polímeros sintéticos representativos incluyen aquellos descritos, pero no se limitan a, aquellos descritos en la columna 3, líneas 33-45 de la Patente U.S. No. 5,354,556, la cual se incorpora en su totalidad para referencia. De forma particular los polímeros adecuados incluyen aquellos descritos, pero no
10 limitados a aquellos descritos en la columna 3, línea 46, columna 4, línea 8 de la Patente U.S. No. 5,354,556 la cual se incorpora en su totalidad para referencia.

Los compuestos de liberación prolongada de la invención se pueden formular
15 para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyecciones o implantes intramusculares en tejidos subcutáneos y diversas cavidades del cuerpo y dispositivos transdérmicos. En una modalidad, las inyecciones intramusculares se formulan como suspensiones acuosas u oleosas. En una suspensión acuosa, el efecto de liberación prolongada se debe, en parte, a la
20 reducción en solubilidad del compuesto activo tras la formación del complejo o una disminución en la tasa de disolución. Una propuesta similar se tomó con las suspensiones y soluciones oleosas, en donde la tasa de liberación de un compuesto activo se determina particionando el compuesto activo fuera del aceite hacia el medio acuoso circundante. Únicamente los compuestos
25 activos que son solubles en aceite y tienen las características de partición deseadas son adecuados. Los aceites que se pueden utilizar para la inyección intramuscular incluyen, pero no se limitan a, aceite de sésamo, oliva, cacahuate, maíz, almendra, soya, semilla de algodón y ricino.

30 Una forma altamente desarrollada de entrega de fármaco que imparte liberación prolongada sobre periodos de tiempo que varían desde días hasta años es implantar un dispositivo polimérico portador del fármaco de forma subcutánea o en diversas cavidades del cuerpo. El material polímero utilizado en un implante, el cual debe ser biocompatible y no tóxico, incluye

pero no se limita a hidrogeles, siliconas, polietilenos, copolímeros de acetato de etilen-vinilo, o polímeros biodegradables.

Evaluación de la actividad de los compuestos

- La actividad biológica de los compuestos propuestos en la presente como
- 5 disruptores/inhibidores de las fibrillas de la proteína β -amiloide ($A\beta$) de la enfermedad de Alzheimer, y el agregado de α -sinucleína de la enfermedad de Parkinson se evaluó determinando la eficacia de los compuestos para provocar un desensamble/ disrupción de fibrillas amiloides pre-formados de la enfermedad de Alzheimer (es decir 1-42 fibrillas $A\beta$) y los agregados de α -
- 10 sinucleína de la enfermedad de Parkinson. En un estudio, la fluorometría de Tioflavina T se utilizó para determinar los efectos de los compuestos, y de EDTA (como un testigo negativo). En este ensayo la Tioflavina T enlaza específicamente los amiloides fibrilares y este enlace produce un mejoramiento en la fluorescencia en 485 nm que es directamente
- 15 proporcional a la cantidad de fibrillas presentes. Mientras la fluorescencia sea más alta, más grande es la cantidad de fibrillas o agregados presentes (Naki et al, Lab. Invest. 65:104-110, 1991; Levine III, Protein Sci. 2:404-410, 1993; Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest. 2:1-6, 1995).
- 20 En el ensayo de enlace de rojo Congo la habilidad de un compuesto de prueba determinado para alterar los enlaces de amiloides (1-42 fibrillas $A\beta$, o agregados de α -sinucleína) al rojo Congo se cuantificaron, en este ensayo, 1-42 fibrillas $A\beta$, o agregados de α -sinucleína y compuestos de prueba se incubaron durante 3 días y después se filtraron al vacío a través de un filtro
- 25 de 0.2 μ m. La cantidad de 1-42 fibrillas $A\beta$, o agregados de α -sinucleína retenidos en el filtro se cuantificaron después de manchar el filtro con rojo Congo. Después de lavar de forma apropiada el filtro, cualquier disminución del color rojo Congo red en el filtro en la presencia del compuesto de prueba (comparado con el manchado de rojo Congo de la proteína amiloidea en la
- 30 ausencia del compuesto de prueba) fue indicativo de la habilidad del compuesto de prueba para disminuir/alterar la cantidad de agregado y 1-42 fibrillas congofilicas $A\beta$, o agregados de α -sinucleína.

Terapia de Combinación

En otra modalidad, los compuestos se pueden administrar en combinación, o en forma secuencial, con otro agente terapéutico. Esos otros agentes terapéuticos incluyen aquellos conocidos para el tratamiento, prevención, o alivio de uno o más síntomas de amiloidosis y enfermedades causadas por sinucleína. Esos agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, donepezil clorhidrato (Aracepto), tartrato de rivastigmina (Exelon), clorhidrato de tacrina (Cognex) y bromhidrato de galantamina (Reminil).

10 Métodos de use de los compuestos y composiciones

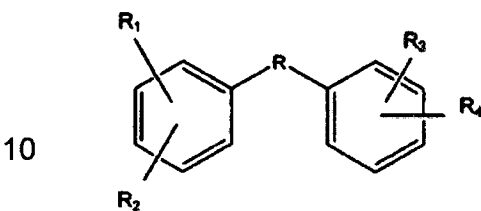
Los compuestos y composiciones propuestos en la presente son útiles en los métodos de tratamiento, prevención, o alivio de uno o más síntomas de enfermedades o desordenes causados por β -amiloides, que incluyen pero no se limitan a enfermedades asociadas con la formación, depósito, acumulación, o persistencia de fibrillas de β -amiloides. En ciertas modalidades, los compuestos y composiciones propuestos en la presente se utilizan para el tratamiento, prevención, o alivio de uno o más síntomas de enfermedades que incluyen, pero no se limitan a la enfermedad de Alzheimer. El síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis del tipo Dutch y angiopatía cerebral causada por β -amiloides.

También se proponen métodos para inhibir o prevenir la formación de fibrillas de α -sinucleína, métodos para inhibir o prevenir el crecimiento de fibrillas de α -sinucleína y métodos para provocar el desensamble, disrupción y/o desagregación de agregados de α -sinucleína preformados y depósitos de proteína de α -sinucleína asociados.

En ciertas modalidades, las enfermedades causadas por sinucleína o sinucleinopatías tratadas, prevenidas o cuyos síntomas son aliviados por los compuestos y composiciones propuestos en la presente incluyen, pero no se limitan a enfermedades asociadas con la formación, depósito, acumulación, o persistencia de agregados de sinucleína, que incluyen fibrillas de α -sinucleína. En ciertas modalidades, esas enfermedades incluyen la enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Parkinson familiar, enfermedad de

cuerpos de Lewy, la variante del cuerpo de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, demencia con Cuerpos de Lewy, atrofia de sistemas múltiples, y complejo de Parkinsonismo/demencia de Guam.

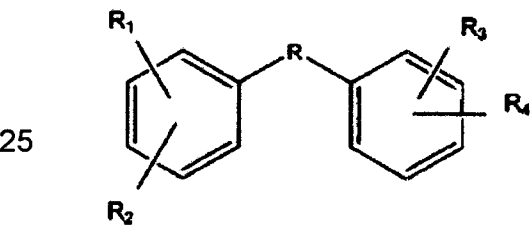
- 5 En una modalidad hay un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



donde R₁, R₂, R₃ y R₄ son grupos hidroxilo colocados de forma independiente y R se selecciona de heteroarilo, -C(O)NR', sulfonamida, tricicloalquilo o ésteres aceptados para uso farmacéutico o sales de estos y donde R' se selecciona de H o CH₃, y de manera que cuando R es -C(O)NR' y uno de los grupos hidroxilo R₁ y R₂ o los grupos hidroxilo R₃ y R₄ están en la posición 3,4, entonces los otros grupos hidroxilo están en una de las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 2,3; 2,4; 2,5; 2,6; 3,5; 3,6; 4,5; 4,6 y 5,6.

20

En otra modalidad se proporciona un compuesto seleccionado del grupo que consiste en



donde R₁, R₂, R₃, y R₄ son grupos hidroxilo colocados de forma independiente, R es -C(O)NR' y R' se selecciona de H o CH₃, y cuando uno de los grupos hidroxilo R₁ y R₂ o los grupos hidroxilo R₃ y R₄ están en la posición 3,4, entonces los otros grupos hidroxilo están en una de las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 2,3; 2,4; 2,5; 2,6; 3,5; 3,6; 4,5; 4,6 y 5,6 y sales aceptadas para uso farmacéutico de éstos.

30

En otra modalidad se proporciona una composición para uso farmacéutico que tiene los compuestos de esta invención y un excipiente aceptado para uso farmacéutico.

- 5 En otra modalidad se proporciona un método para tratar la formación, depósito, acumulación, o persistencia de A β amiloides o agregados de α -sinucleína, que consiste en tratar los agregados con una cantidad efectiva de los compuestos de esta invención. En otra modalidad se proporciona un método para tratar una enfermedad causada por β -amiloides o a
- 10 sinucleinopatía en un mamífero que sufre de ésta, que consiste en la administración de una cantidad efectiva de forma terapéutica de los compuestos de esta invención.

- En otra modalidad se proporciona un método para mejorar el rendimiento
- 15 motor en un mamífero que sufre de una sinucleinopatía, que consiste en la administración de una cantidad efectiva de forma terapéutica de los compuestos de esta invención.

- En otra modalidad se proporciona un método para detener la progresión de las deficiencias motoras en un mamífero que sufre de la enfermedad de
- 20 Parkinson, que consiste en la administración de una cantidad efectiva de forma terapéutica de los compuestos de esta invención.

- Los siguientes Ejemplos no limitantes se dan como ilustración únicamente y no se consideran una limitación de esta invención, muchas variaciones
- 25 evidentes de las cuales son posibles sin salir del espíritu o alcance de estos.

EJEMPLOS

Procedimientos Experimentales Generales

- Todos los disolventes se destilaron antes de utilizarlos y se eliminaron
- 30 mediante evaporación giratoria a temperaturas de hasta 35⁰C. El gel de sílice Merck 60, malla de 200-400, 40-63 μ m, se utilizó para la cromatografía instantánea en gel de sílice. TLC se realizó utilizando DC-plastikfolien Kieselgel 60 F254 de Merck, primero se visualizó con una lámpara UV, y después se sumergió en una solución de vanillina (1% de vanillina, 1%

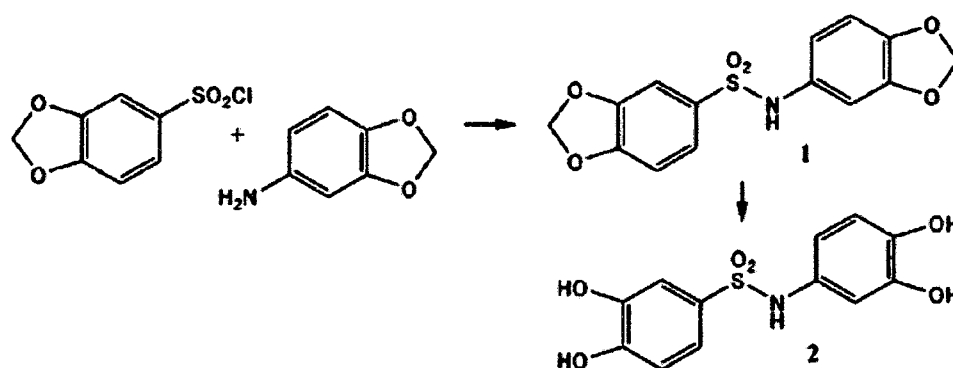
H₂SO₄ en EtOH), y se calentó. La espectrometría de masa se registró en un instrumento Kratos MS-80. Los espectros NMR, a 25°C, se registraron a 500 o 300 MHz para ¹H y 125 o 75 MHz para ¹³C en los espectrómetros Varian INOVA-500 o VXR-300. Los desplazamientos químicos se dieron en ppm en la escala δ con referencia a los picos del solvente: CHCl₃ a 7.25 y CDCl₃ a 77.0 ppm o (CH₃)₂CO en 2.15 y (CD₃)₂CO a 30.5 ppm o CH₃OD a 3.30 y CD₃OD a 39.0 ppm.

Condiciones HPLC

Las muestras se analizaron utilizando un instrumento Agilent HP1100, operado con software EzChrom Elite, y ajustado con una columna C18 (Fenomenex Prodigy 5 μm 100A, 250 x 4.6 mm) con una columna de protección (Fenomenex ODS 4 x 3 mm, 5 μm) mantenido a 30°C. Los picos se detectaron a 280 nm. La fase móvil fue acetonitrilo en agua (con 0.1% TFA); t₀=11%, t₂₀=11%, t₃₀=100%, t₃₁=11%, t₄₀=11%. La tasa de flujo fue de 1 mL/min y el volumen de inyección de 5 μL.

Ejemplo 1: Síntesis de Sulfonamida 2

3,4-ácido dihidroxibenzensulfónico 3,4-dihidroxifenilsulfonamida
(Compuesto 5)



La síntesis de la sulfonamida 2 se realizó mediante la reacción de 3,4-cloruro de metilendioxibenzensulfonilo (preparado a partir de 1,2-metilendioxibenzeno (Tao, E.V.P.; Miller, W.D. Patente U.S. 5,387,681. 1995)) con 3,4-metilendioxianilina para obtener la sulfonamida 1 con buen rendimiento. La desprotección con tribromuro de boro en condiciones estándar la sulfonamida fenólica libre en producción razonable.

A una solución agitada de cloruro de 1,3-benzodioxol-5-sulfonil (Tao, E.V.P.; Miller, W.D. Patente U.S. 5,387,681. 1995) (1 g) en diclorometano (DCM) (10 mL) se adicionó una solución de 3,4-metilendioxianilina (0.62 g) en diclorometano (10 mL) seguido de piridina (1 mL). La mezcla se sometió a
 5 reflujo durante 2 horas, se enfrió, se diluyó con diclorometano (150 mL), se lavó con HCl acuoso (1M, 2 x 100 mL), se secó, después se evaporó al vacío para obtener el producto crudo como una goma café. La purificación mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice eluido con 5 - 10% de acetato de etilo en diclorometano dio la sulfonamida 1 pura como una goma café pálida
 10 (1.34 g, 92%). La cristalización de 95% de etanol dio el producto como cristales café pálido. HPLC 29.6 minutos.

^1H NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 8.75 (1H, s), 7.39 (2H, dd, J 2, 9Hz), 7.24 (1H, d, J 2Hz), 7.02 (1H, d, J 9Hz), 6.86 (1H, d, J 2Hz), 6.81 (1H, d, J 9Hz), 6.72 (2H, dd, J
 15 2, 9Hz), 6.23 (2H, s) y 6.06 (2H, s).
 HREIMS encontrado, 344.0201; MNa^+ , $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NNaO}_6\text{S}$ necesita 344.0199.

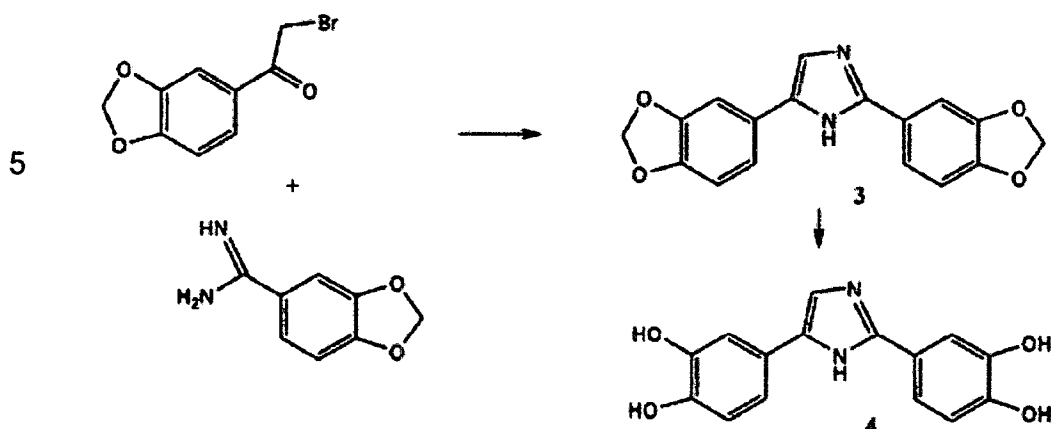
Para una solución de sulfonamida 1 (0.7 g) en DCM seco (50 mL) se adicionó tribromuro de boro (0.5 mL) y la mezcla se dejó a temperatura ambiente
 20 durante 3 horas. Se adicionó metanol (gota a gota 5 mL) cuidadosamente, después la reacción se dejó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla se evaporó al vacío a 1 mL, después se adicionó más metanol (20 mL), esto se repitió cuatro veces, después los disolventes se eliminaron mediante evaporación al vacío.

25 La purificación mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice eluyendo con 0 - 20% metanol en cloroformo dio el producto como una goma café pálida. Otra purificación sobre sílice de fase inversa de C-18 eluyendo con 0 - 50% acetonitrilo en agua, seguido por secado por congelación, dio el producto puro 2 como un polvo café claro (295 mg, 45%). HPLC 12.9 minutos
 30 95%.

^1H NMR (CD_3OD) 7.05 (1H, d, J 2Hz), 7.03 (2H, dd, J 2, 9Hz), 6.76 (1H, d, J 9Hz), 6.57 (1H, d, J 2Hz), 6.56 (1H, d, J 9Hz) y 6.31 (2H, dd, J 2, 9Hz).
 HREIMS encontrado, 296.0241, M^+ , $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{NO}_6\text{S}$ necesita, 296.0234.

Ejemplo 2: Síntesis de Imidazol 4

2,4 bis (3,4 dihidroxifenil) imidazol (Compuesto 6)



- 10 El anillo imidazol se formó de acuerdo con el método descrito por Li et al. (Li et. al. Organic Process Research y Development 2002, 6, 682-3) del amidinobenzeno, formado de piperonilnitrilo (Thurkauf et al. J Med Chem. 1995, 38 (12), 2251-2255) y la bromocetona (Castedo et al. Tetrahedron 1982, 38 (11), 1569 - 70) formada de 3,4-metilendioxiacetofenona de acuerdo
- 15 con el método descrito por Lee et al. (Korean Chem Soc. 2003, 24 (4), 407 - 408). La desprotección con tribromuro de boro en condiciones estándar dio el imidazol fenólico libre con buen rendimiento.

- De acuerdo con el proceso descrito por Li, una mezcla de 3-amiditiobenzeno
- 20 (Thurkauf et ah J Med Chem. 1995, 38 (12), 2251-2255) (0.5 g, 3 mmol) y bicarbonato de potasio (1.20 g, 12 mmol) en tetrahidrofurano (THF) (16 mL) y agua (4 mL) se calentó fuertemente al someterse a reflujo. Bromocetona (Castedo et al Tetrahedron 1982, 38 (11), 1569 - 70; y Lee et al Korean Chem Soc. 2003, 24 (4), 407 - 408) (0.729 g, 3 mmol) en THF (4 mL) se
- 25 adicionó sobre 30 minutos y el reflujo se mantuvo durante dos horas más. El THF se eliminó entonces mediante evaporación al vacío y el resto fue extraído en acetato de etilo, se secó y evaporó al vacío para dar el producto crudo como un sólido café. La cristalización de 95% de etanol dio el imidazol puro 3 como un sólido cristalino amarillo pálido (0.54 g, 58%).
- 30 HPLC 27.9 minutos. NMR ((CD₃)₂CO) 7.45 7.70 (5H, m), 7.02 (1H, d, J 9Hz), 6.95 (1H, d, J 9Hz), 6.15 (2H, s) y 6.09 (2H, S) y 6.09
- HREIMS encontrado, 309.0875; MH⁺, C₁₇H₁₂N₂O₄ necesita, 309.0870.

A una solución del imidazol 3 (0.5 g) en DCM seco (50 mL) se adicionó tribromuro de boro (1.0 mL) y la mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 3 horas. Metanol (gota a gota 5 mL) se adicionó de forma cuidadosa después la reacción se dejó a temperatura ambiente durante 24
5 horas. La mezcla se evaporó al vacío a 1 mL, después se adicionó más metanol (30 mL), esto se repitió cuatro veces, después los disolventes se eliminaron mediante la evaporación al vacío.

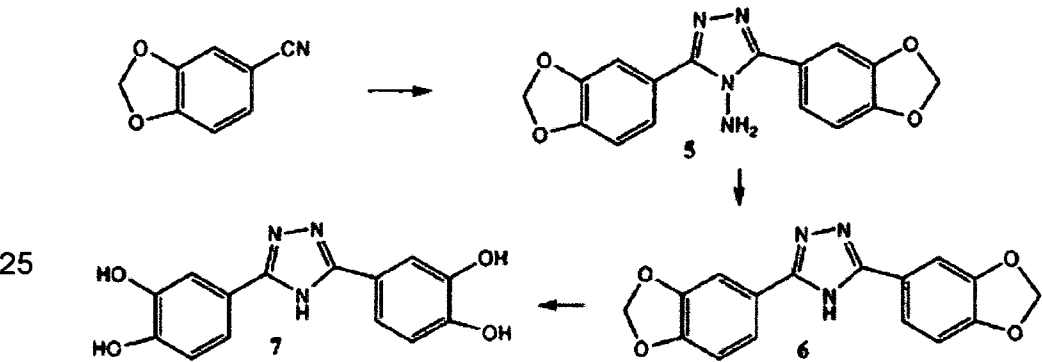
La purificación mediante cromatografía de columna sobre gel de sílice
10 eluyendo con 0 - 20% de metanol en cloroformo dio el producto 4 como un sólido café pálido (0.27 g, 58%). HPLC 16.3 minutos 99%

¹H NMR (CD₃OD) 7.59 (1H, s), 7.36 (1H, d, J 2Hz), 7.31 (2H, dd, J 2, 9Hz),
7.16 (1H, d, J 2Hz), 7.10 (2H, dd, J 2, 9Hz), 6.98 (1H, d, J 9Hz) y 6.88 (1H, d,
15 J 9Hz).

HREIMS encontrado, 285.0873; MH⁺, C₁₅H₁₃N₂O₄ necesita 285.0870.

Ejemplo 3: Síntesis de Triazol 7

20 **3,5 bis (3,4 dihidroxifenil) 1,2,4 triazol (Compuesto 7)**



El anillo de 4-aminotriazol se formó mediante una reacción de dimerización de piperonilonitrilo de acuerdo con el método descrito por Bentiss (Bentiss et al. J Heterocyclic Chem. 1999, 36, 149-152) y después la deaminacion se
30 llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por Bentiss (Bentiss et al. J. Heterocyclic Chem. 2002, 39, 93 - 96.) Para producir el triazol 6 con buen rendimiento. La desprotección con tribromuro de boro en condiciones estándar dio el triazol fenólico libre 7 con buen rendimiento.

De acuerdo con el proceso descrito por Bentiss (Bentiss et al. J Heterocyclic Chem. 1999, 36, 149-152) una mezcla de nitrilo aromático (1 g), hidrato de hidracina (1 g) e hidrazina clorhídrica (0.5 g) en solución en etilen glicol (5 mL) se calentaron a 130°C durante 5 horas. La solución se enfrió después diluida con agua (7 mL), el producto sólido se filtró, lavó con DCM, después se secó para dar el producto crudo. La recristalización a partir de metanol dio el 4-aminotriazol puro 5, como un sólido amarillo pálido (0.65 g, 66%). HPLC 27.0 minutos.

10

^1H NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 7.62 (2H, dd, J 2, 9Hz), 7.42 (2H, d, J 2Hz), 6.94 (2H, d, J 9Hz), 6.15 (2H, s) y 5.93 (4H, s).

HREIMS encontrado, 325.0937; MH^+ , $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_4$ necesita 325.0931.

De acuerdo con el proceso descrito por Bentiss (Bentiss et al. J. Heterocyclic Chem. 2002, 39, 93 96) a una solución agitada de amino triazol 5 (0.5 g) en una solución acuosa de ácido hipofosforoso (50%, 5 mL) se adicionó lentamente una solución de nitrito de sodio (0.6 g) en agua (1.5 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una hora más, después se recolectó el precipitado naranja pálido, se lavó con agua y se secó para dar el triazol 6 (0.38, 80%). HPLC 29.48 minutos.

20

^1H NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 7.81 (2H, dd, J 2, 9Hz), 7.70 (2H, d, J 2Hz), 7.10 (2H, d, J 9Hz) y 6.20 (4H, s).

HREIMS encontrado, 310.0818; $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4$ necesita 310.0822.

A una solución del triazol 6 (0.5 g) en DCM seco (50 mL) se adicionó tribromuro de boro (1.0 mL) y la mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 3 horas. Metanol (gota a gota 5 mL) se adicionó cuidadosamente, después la reacción se dejó a temperatura ambiente durante 24 h. La mezcla se evaporó al vacío a 1 mL, después se adicionó más metanol (30 mL), esto se repitió cuatro veces, después los disolventes se eliminaron mediante evaporación al vacío.

30

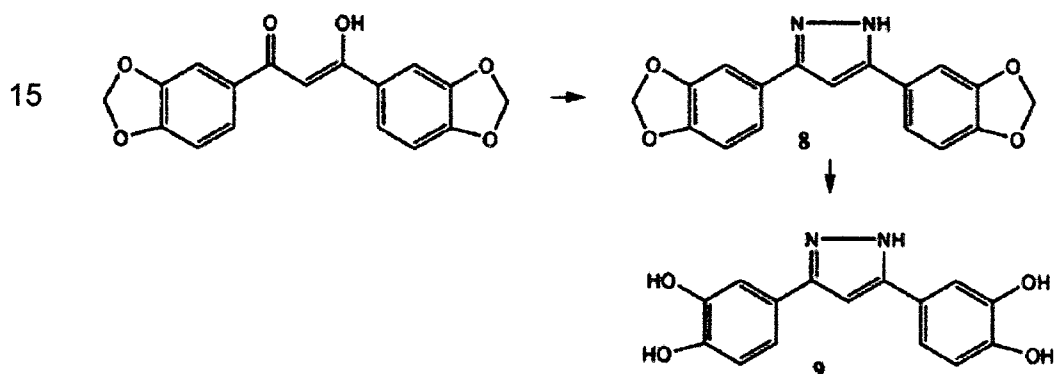
La purificación mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con 0 - 20% de metanol en cloroformo dio el producto 7 como un sólido café pálido (0.24 g, 52%). HPLC 16.1 minutos 97%

^1H NMR (CD_3OD) 7.46 (2H, d, J 2Hz), 7.41 (2H, dd, J 2, 9Hz), 7.15 (1H, s) y 6.96 (2H, d, J 9Hz).

HREIMS encontrado, 286.0815; MH^+ , $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4$ necesita 286.0822.

Ejemplo 4: Síntesis de Pirazol 9

3,5 bis (3,4 dihidroxifenil) pirazol (Compuesto 8)



La reacción de 1,3-dicetona (Lopez et al. Planta Med. 1998, 64 (1), 76 - 77) (preparada de acuerdo con el método descrito por Choshi et al. (Chem. Farm. Bull. 1992, 40 (4), 1047 -1049) con hidrato de hidrazina de acuerdo con el método descrito por Fink et al. (Chemistry and Biology 1999, 6, 205 - 219) dio el pirazol 8 con buen rendimiento. La desprotección con tribromuro de boro en condiciones estándar dio el pirazol fenólico libre 9 con buen rendimiento.

De acuerdo con el método descrito por Fink et al (Chemistry and Biology 1999, 6, 205 -219) una suspensión de dicetona (Choshi et al. Chem. Farm. Bull. 1992, 40 (4), 1047 1049 y Lopez et al. Planta Med. 1998, 64 (1), 76 - 77) (1 g) e hidrazina HCl (1 g, 5 equivalentes) en DMF/THF (3:1, 12 mL) se calentó para someterse a reflujo durante 24 h. Se adicionó agua y la mezcla fue extraída en diclorometano, se secó y evaporó al vacío para dar el producto crudo 8 como un sólido amarillo. La purificación mediante

cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con 0 - 20% de acetato de etilo en diclorometano dio el pirazol 8 como un sólido amarillo pálido (0.49 g, 50%). HPLC 30.3 minutos

- 5 ^1H NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 7.47 (2H, dd, J 2, 9Hz), 7.46 (2H, d, J 2Hz), 7.04 (1H, s), 7.02 (2H, d, J 9Hz) y 6.14 (4H, s).

HREIMS encontrado, 309.0859; MH^+ , $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4$ necesita 309.0870.

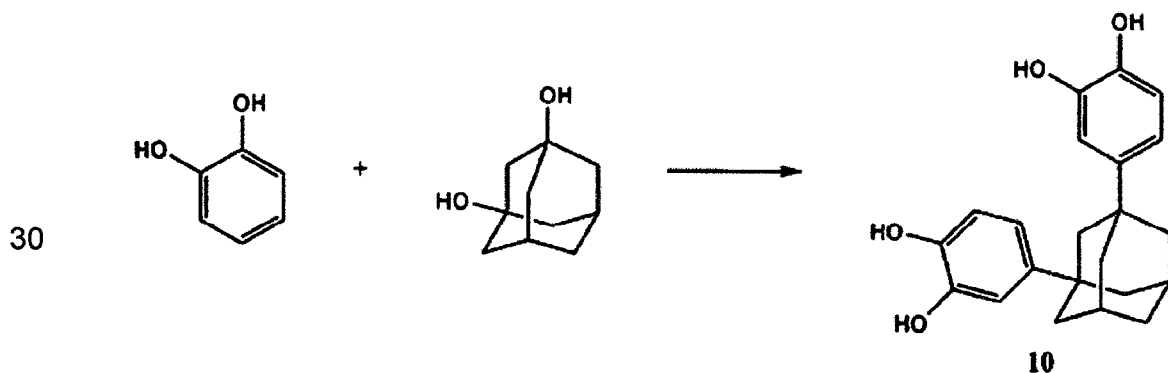
- A una solución de pirazol 8 (0.46 g) en DCM seco (50 mL) se adicionó
10 tribromuro de boro (0.4 mL) y la mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 3 horas. Metanol (gota a gota 5 mL) se adicionó de forma cuidadosa, después la reacción se dejó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla se evaporó al vacío a 1 mL, después se adicionó más metanol (30 mL), esto se repitió cuatro veces, después los disolventes se eliminaron
15 mediante evaporación al vacío.

La purificación mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con 0 — 20% de metanol en cloroformo dio el pirazol 9 como un sólido amarillo pálido. (0.285 g, 67%). HPLC 25.9 minutos 98%

- 20 ^1H NMR (CD_3OD) 7.26 (2H, d, J 2Hz), 7.22 (2H, dd, J 2, 9Hz), 7.15 (1H, s) y 6.93 (2H, d, J 9Hz).

HREIMS encontrado, 285.0879; $\text{C}_5\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4$ necesita, 285.0870.

- Ejemplo 5: Síntesis de Adamantano 10 1,3 bis (3,4 dihidroxifenil)**
25 **adamantana (Compuesto 9)**



La reacción de pirocatequina con 1,3-adamantano-diol de acuerdo con el método descrito por Lu et al (Lu et al. J Med Chem 2005, 48 (14), 4576 - 4585) dio el aducto 10 en producción razonable.

- 5 De acuerdo con el método descrito por Lu una solución de pirocatequina (1.0 g) y adamantana diol (0.5 g) en ácido metansulfónico (2 mL) se calentó a 80°C durante 3 horas, después se dejó a temperatura ambiente toda la noche. Se adicionó agua y la mezcla se extrajo hacia 10% de metanol en cloroformo, el cual se secó y evaporó al vacío para dar un sólido blanco. La
- 10 purificación mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con 0 - 20% de metanol en cloroformo dio el producto como un sólido blanco. La cristalización a partir de dietil éter/40% éter de petróleo dio el producto puro 10 como un sólido cristalino (210 mg, 20%). HPLC 29.8 minutos 98%
¹H NMR (CD₃OD) 6.82 (2H, t, J 1.5Hz), 6.68 (4H, d, J 1.5Hz), 2.22 (2H, bs),
15 1.87 (8H, m) y 1.77 (2H, bs).
HREIMS encontrado, 387.1369; MCl⁻, C₂₂H₂₄ClO₄ necesita, 387.1369.

Ejemplo 6: Compuestos de esta invención son potentes disruptores de 1-42 fibrillas Aβ o agregados de Alzheimer

- 20 Se encontró que los compuestos preparados en los Ejemplos precedentes son potentes disruptores/inhibidores de fibrillas o agregados de proteína β-amiloides (Aβ) de la Enfermedad de Alzheimer. En una serie de estudios, se analizó la eficacia de los compuestos para provocar un desensamble/disrupción de fibrillas amiloides pre-formadas de la enfermedad
- 25 de Alzheimer (es decir que consiste en 1-42 fibrillas Aβ).

Parte A – Fluorometría de Tioflavina T

- En un estudio, se utilizó fluorometría de Tioflavina T para determinar los efectos de los compuestos, y de EDTA (como un testigo negativo). En este
- 30 ensayo el enlace de Tioflavina T específicamente a amiloide fibrilar, y este enlace produce un mejoramiento de fluorescencia en 485 nm que es directamente proporcional a la cantidad de fibrillas de amiloides formados. Mientras más alta sea la fluorescencia, mayor la cantidad de fibrillas

amiloides formadas (Naki et al., Lab. Invest, 65:104-110, 1991; Levine III, Protein Sci. 2:404-410, 1993; Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest. 2:1-6, 1995).

En este estudio, 30 μ L de una solución de 1 mg/mL (en agua destilada) de 1-42 A β pre-fibrilizados (rPéptido) se incubó a 37°C durante 3 días ya sea solo, o en la presencia de uno de los compuestos o EDTA (en relaciones de peso de A β :Compuesto de prueba de 1:1, 1:0.1, 1:0.01 o 1:0.001). Después de 3 días de co-incubación, 50 μ L de cada mezcla de incubación se transfirió hacia una placa de microtitulación de 96 pozos que contiene 150 μ L de agua destilada y 50 μ L de una solución de Tioflavina T (es decir 500 mM Tioflavina T en 250 mM de solución amortiguadora de fosfato, pH 6.8). La emisión de fluorescencia se leyó en 485 nm (longitud de onda de excitación 444 nm) utilizando un fluorómetro de placa ELISA después de la sustracción con la solución amortiguadora sola o compuesto solo, como blanco.

15

Los resultados de las incubaciones de 3 días se muestran gráficamente en la Figura 5. Por ejemplo, considerando que EDTA ('-C' en la Figura 5) no causó inhibición importante de 1-42 fibrillas A β en todas las concentraciones probadas, todos los compuestos causaron una disrupción/desensamble dependiente de la dosis de las 1-42 fibrillas A β preformadas. Todos los compuestos probados fueron efectivos en la disrupción de 1-42 fibrillas A β preformadas iguales a los resultados obtenidos de un compuesto testigo positivo ('+C' en la Figura 5). Por ejemplo, todos los compuestos provocaron al menos 96% de inhibición cuando se utilizaron en una relación de peso A β :compuesto de prueba de 1:1 comparado con 99% para el testigo. En una relación de peso A β :compuesto de prueba de 1:0.1 los niveles de inhibición variaron desde 86 hasta 95% comparados con 92% para el testigo. Este estudio indicó que los compuestos de esta invención son potentes disruptores/inhibidores de las fibrillas A β tipo enfermedad de Alzheimer, y generalmente ejercen sus efectos en una manera dependiente de la dosis.

30

Parte B: Rojo Congo

En el ensayo de enlace de rojo Congo se cuantifica la capacidad de un compuesto de prueba para alterar el enlace β -amiloide con rojo Congo. En este ensayo, A β 1-42 (como se preparó para el ensayo de Tio T) y

- compuestos de prueba se incubaron durante 3 días y después se filtraron al vacío a través de un filtro de 0.2 μm . La cantidad de de A β 1-42 retenido en el filtro se cuantificó después de manchar el filtro con rojo Congo. Después de lavar de forma apropiada el filtro, cualquier disminución del color rojo Congo en el filtro en la presencia del compuesto de prueba (comparado con la mancha del Congo red de la proteína amiloide en la ausencia del compuesto de prueba) fue indicativo de la capacidad del compuesto de prueba para disminuir/alterar la cantidad de A β agregado y congofílico.
- 10 En un estudio, se determinó la capacidad de las fibrillas A β para enlazar al rojo Congo en la ausencia o presencia de cantidades crecientes de los compuestos o EDTA (en relaciones de peso de A β :compuesto de prueba de 1:1, 1:0.1, 1:0.01 o 1:0.001). Los resultados de incubaciones de 3 días se muestran gráficamente en la Figura 6. Considerando que EDTA ('-C' en la
- 15 Figura 6) no causó inhibición importante de fibrillas del enlace de A β 1-42 con rojo Congo en todas las concentraciones probadas, los compuestos provocaron una inhibición dependiente de la dosis del enlace de A β con rojo Congo, algunos excedieron los efectos del compuesto testigo positivo ('+C' en la Figura 6). Por ejemplo, el compuesto testigo positivo provocó una
- 20 inhibición importante de ($p < 0.01$) 73.5% enlace de rojo Congo red con fibrillas A β 1-42 cuando se utilizaron en una relación en peso de A β :Compuesto de prueba de 1:1, y una inhibición importante de ($p < 0.01$) 10.4% del enlace de rojo Congo cuando se utilizó en una relación en peso de A β :compuesto de prueba de 1:0.1. Los compuestos 6, 8 y 9 excedieron los
- 25 resultados del compuesto testigo positivo en ambas relaciones mencionadas anteriormente. Similar a los resultados para el ensayo de Tio T, este estudio también indicó que los compuestos de esta invención son potentes inhibidores del enlace de fibrillas A β con rojo Congo, y generalmente ejercen sus efectos en una manera dependiente de la dosis.

30

Parte D – Datos de espectroscopia de dicroismo circular

La espectroscopia de dicroismo circular (CD) es un método que se puede utilizar para determinar los efectos de compuestos de prueba en la disrupción de la conformación estructural secundaria de fibrillas amiloides. En un

estudio, como se describe en este Ejemplo, la espectroscopia de dicroísmo circular se utilizó para determinar los efectos de diferentes compuestos de la invención en la conformación de placa β de fibrillas $A\beta_{1-42}$. Para este estudio, $A\beta_{1-42}$ (rPeptide Inc., Bogart, GA) se liofilizó primero a partir de una solución NaOH de 50 mM, el pH se mantuvo arriba de 10 antes de la congelación y liofilización. EL péptido se reconstituyó después en 20 mM de una solución amortiguadora de acetatos, pH 4.0, en una concentración de 1 mg/mL. La dilución y adición de compuestos de prueba o vehículo se realizó de manera que la concentración final del péptido fue de 0.5 mg/mL y las relaciones en peso de $A\beta$:compuesto de prueba fueron de 1:1 y 1:0.1. Cuando no se adicionaron compuestos de prueba, la cantidad de vehículo adicionado a la mezcla de la reacción fue igual a la cantidad utilizada para entregar los compuestos de prueba. Después de 5 días de incubación a 37°C en la presencia de compuestos o vehículo, se registraron los espectros CD en un espectropolarímetro Jasco 810 (Easton, MD). Todos los espectros CD se recolectaron en celdas de cuarzo de 0.05 o 0.1 cm. Los trazos de longitud de onda fueron barridos a partir de 190-270 corridas en incrementos de 0.1 nm con un ancho de banda de 2 nm, a una velocidad de barrido de 50 nm por minuto, un tiempo de respuesta de 1 segundo y una separación de datos de 0.1 nm. El sistema complete se equilibró y niveló continuamente con nitrógeno a 10 L/min. Para el procesamiento de datos, 10 espectros replicados de $A\beta_{1-42}$ con vehículo adicionado se adquirieron antes de la incubación, promediado y restado de 10 espectros promediados de “ $A\beta_{1-42}$ + compuesto de prueba” o vehículo después del periodo de incubación. Los espectros promedio se convirtieron de elipticidad en grados a elipticidad específica utilizando la fórmula $[\Psi] = (\Psi^\circ/d) \times c$ donde Ψ° es la elipticidad en grados, d es la longitud de vía en mm y c es la concentración en mg/mL. De esta manera, el cambio en la estructura del péptido que ocurre entre el encontrado en el tiempo de disolución inicial y el encontrado después de la incubación se puede evaluar.

La Figura 1A muestra algunos de los espectros CD generados en este estudio. $A\beta_{1-42}$ solo (vehículo en la Figura 1A) en solución amortiguadora de acetatos 20 mM después de la incubación generalmente demostró el

Espectro CD de una proteína amiloide con estructura en forma de placa β importante, como se demostró mediante la mínima observada en 218 nm. Sin embargo, en la presencia de algunos de los compuestos, una disrupción marcada de la estructura en forma de placa β en las fibrillas $A\beta_{1-42}$ fue
 5 evidente (con un aumento importante en espiral aleatoria o α -helicoidal) como se muestra mediante la reducción en la magnitud de la mínima observada en 218 nm (comparado con $A\beta_{1-42}$ solo).

La Figura 1B muestra los efectos de los compuestos 1 y 2 en la inhibición de
 10 la estructura en forma de placa β de la formación de fibrillas $A\beta_{1-42}$ cuando se comparó con un compuesto testigo positivo. Los estudios CD demostraron que los compuestos de esta invención tienen la capacidad para la disrupción/desensamble de la estructura en forma de placa β característica de las fibrillas $A\beta$ de Alzheimer. Los resultados de los estudios también
 15 confirman los ejemplos anteriores utilizando fluorometría de Tioflavina T y ensayos tipo enlace de rojo Congo.

Ejemplo 7: Los compuestos de esta invención son potentes disruptores de fibrillas de α -sinucleína o agregados de la enfermedad de Parkinson

20 Se encontró que los compuestos probados de esta invención también son potentes disruptores/inhibidores de fibrillas de α -sinucleína o agregados de la enfermedad de Parkinson, α -sinucleína ha demostrado que forma fibrillas o agregados cuando se incubó a 37°C durante varios días, se postuló que α -sinucleína juega una función importante en la patogénesis de la enfermedad
 25 de Parkinson y otras sinucleinopatías. En esta serie de estudios, se analizó la eficacia de los compuestos para provocar un desensamble/disrupción de fibrillas de α -sinucleína pre-formada o agregados de la enfermedad de Parkinson.

30 Parte A – Fluorometría de Tioflavina T

En un estudio, se utilizó la fluorometría de Tioflavina T para determinar los efectos de los compuestos y EDTA (como un testigo negativo, (-C)). En este ensayo, Tioflavina T enlaza específicamente con las fibrillas o agregados de α -sinucleína, y este enlace produce un mejoramiento de fluorescencia en 485

nm que es directamente proporcional a la cantidad de fibrillas de α -sinucleína o agregados presentes. Mientras más alta es la fluorescencia, mayor la cantidad de fibrillas de α -sinucleína o agregados presentes (Naki et al, Lab. Invest. 65:104-110, 1991; Levine III, Protein Sci. 2:404-410, 1993; Amyloid: 5 Int. J. Exp. Clin. Invest. 2:1-6, 1995).

En este estudio, 30 μ L de una solución de α -sinucleína 1 mg/mL (rPéptido) se pre-fibrilizó a 37°C con agitación a 1400 rpm durante 4 días y de forma subsiguiente se incubó a 37°C durante 3 días ya sea solo o en la presencia 10 de los compuestos o EDTA (en relaciones de peso de α -sinucleína:compuesto de 1:1, 1:0.1, 1:0.01 ó 1:0.001). Después de 3 días de co-incubación, 50 μ L de cada mezcla de incubación mixture se transfirieron a una placa de microtitulación de 96pozos que contiene 150 μ L de agua destilada y 50 μ L de una solución de Tioflavina T (es decir 500 mM de 15 Tioflavina T en 250 mM de solución amortiguadora de fosfato, pH 6.8). La emisión de fluorescencia se leyó en 485 nm (longitud de onda de excitación de 444 nm) utilizando un fluorómetro de placa ELISA después de la sustracción con una solución amortiguadora sola o compuesto solo, como blanco.

20

Los resultados de las incubaciones de 3 días se muestran gráficamente en la Figura 7. Por ejemplo, considerando que EDTA no provocó inhibición importante de fibrillas de α -sinucleína o agregados en todas las concentraciones probadas, todos los compuestos provocaron la 25 disrupción/desensamble dependiente de la dosis de fibrillas de α -sinucleína preformadas o agregados en diversas extensiones. Por ejemplo, en una relación de α -sinucleína:compuesto de 1:0.01 el compuesto testigo positivo (+C en la Figura 7) provocó una inhibición importante ($p < 0.01$) 77.4% considerando que los otros compuestos probados presentaron un intervalo 30 desde 45 hasta 83%. Los compuestos 1, 4, 5 y 6 presentaron resultados muy similares al compuesto testigo positivo. Este estudio indicó que los compuestos de esta invención son potentes disruptores/inhibidores de las fibrillas de α -sinucleína o agregados de la enfermedad de Parkinson y generalmente ejercen sus efectos en una manera dependiente de la dosis.

Parte B: Rojo Congo

En el ensayo de enlace de rojo Congo, se cuantificó la capacidad de un compuesto de prueba determinado para alterar el enlace de α -sinucleína con rojo Congo. En este ensayo, α -sinucleína (pre-fibrilizadas como se prepararon en el ensayo de Tio T) y compuestos se incubaron durante 3 días y después se filtraron al vacío a través de un filtro de 0.2 μ m. La cantidad de α -sinucleína retenida en el filtro se cuantificó después de manchar el filtro con rojo Congo. Después de lavar el filtro de forma apropiada, cualquier disminución del color rojo Congo en el filtro en la presencia del Compuesto (comparado con la mancha rojo Congo de la proteína amiloide en la ausencia del Compuesto) fue indicativo de la capacidad del compuesto de prueba para disminuir/alterar la cantidad de agregado y α -sinucleína congofílica.

En un estudio, se determinó la capacidad de las fibrillas de α -sinucleína o agregados para enlazar el rojo Congo en la ausencia o presencia de cantidades crecientes de compuestos o EDTA (en relaciones de peso de α -sinucleína:compuesto de 1:1, 1:0.1, 1:0.01 ó 1:0.001). Los resultados de las incubaciones de 3 días se muestran gráficamente en la Figura 8. Considerando que EDTA (-C) no provocó inhibición importante de fibrillas de α -sinucleína enlazando a rojo Congo en todas las concentraciones probadas, los compuestos probados provocaron una inhibición del enlace de α -sinucleína a rojo Congo dependiente de la dosis. Por ejemplo, el compuesto testigo positivo (+C) provocó una inhibición importante ($p < 0.01$) 78.5% del enlace de rojo Congo con las fibrillas de α -sinucleína o agregados en una relación de peso de 1: 1. El intervalo de inhibición en la misma relación para todos los compuestos probados fue desde 60 hasta 100%. Este estudio indicó que los compuestos de esta invención también son potentes inhibidores de los enlaces de las fibrillas α -sinucleína tipo enfermedad de Parkinson a rojo Congo y generalmente ejercen sus efectos en una dependiente de la dosis.

Parte C - Dicroísmo Circular

La espectroscopia de dicroísmo circular (CD) es un método que se puede utilizar para determinar los defectos de los compuestos de prueba en la

conformación estructural secundaria de α -sinucleína. Debido a que el auto
 ensamble de monómeros de α -sinucleína en agregados o fibrillas no es
 posible sin la formación de la estructura secundaria, a saber placa beta, la
 espectroscopia CD se puede utilizar para medir la capacidad de los
 5 compuestos de prueba para inhibir la fibrilación o proceso de agregación.

En un estudio, como se describe en este Ejemplo, se utilizó espectroscopía
 de dicroísmo circular para determinar los efectos de diferentes compuestos
 de la invención en la conformación de placa β de α -sinucleína. Para este
 10 estudio, α -sinucleína (rPeptide Inc., Bogart, GA) se disolvió en 9.5 mM
 solución amortiguadora de fosfato (PBS) a 1 mg/mL. La solución madre
 resultante se diluyó en la misma solución amortiguadora y los compuestos de
 prueba o el vehículo se adicionaron de manera que concentración final del
 péptido fue de 0.25 mg/mL y las relaciones en peso de α -
 15 sinucleína:compuesto fueron de 1:1 y 1:0.1. Un Espectro CD se registró de la
 muestra tratada del vehículo antes de la incubación de todas las muestras
 durante 4 días, después de lo cual se adquirieron los aspectos para todas las
 reacciones de α -sinucleína/Compuesto o reacciones del vehículo. Los
 espectros CD se registraron en un espectropolarímetro Jasco 810 (Easton,
 20 MD). Todos los espectros CD se adquirieron utilizando celdas de cuarzo de
 0.10 cm.

Los trazos de longitud de onda fueron barridos a partir de 190-270 en
 incrementos de 0.1 nm con un ancho de banda de 2 nm, a una velocidad
 25 de barrido de 50 nm/minuto, un tiempo de respuesta de 32 segundos y
 una distancia entre datos (*data pitch*) de 0.5 nm. El sistema completo se
 equilibró y niveló continuamente con nitrógeno a 10 L/min. Para el
 procesamiento de datos, 10 espectros replicados de la solución
 amortiguadora con vehículo adicionado se adquirieron antes de la
 30 incubación, promediado y restado de 10 espectros promediados de " α -
 sinucleína + compuesto de prueba" o vehículo después del periodo de
 incubación. Los espectros promedio se convirtieron de elipticidad en
 grados a elipticidad específica utilizando la fórmula $[\Psi] = (\Psi^\circ/d) \times c$ donde
 Ψ° es la elipticidad en grados, d es la longitud de vía en mm y c es la

concentración en mg/mL. De esta manera, el cambio en la estructura del péptido que ocurre entre el encontrado en el tiempo de disolución inicial y el encontrado después de la incubación se puede evaluar.

5 La Figura 2 muestra los espectros CD generados para una α -sinucleína en tiempo cero y después de 4 días de incubación a 37°C. α -sinucleína sola en vehículo tratado de solución amortiguadora PBS demostró la firma de espiral aleatoria en tiempo cero y después de 4 días de incubación demostró el espectro CD común de una proteína con estructura en forma de placa β
10 importante, como se demostró por la mínima observada en 218 nm. Sin embargo, en la presencia de algunos de los compuestos, una inhibición marcada de la formación de la estructura en forma de placa β mediante α -sinucleína fue evidente como se muestra por la reducción en la magnitud de la mínima observada en 218 nm (comparado con α -sinucleína sola).

15

La Figura 3 A muestra algunos de los Espectros CD generados en este estudio, α -sinucleína en tiempo cero produce el espectro indicativo de un péptido de espiral aleatoria y también proporciona el 100% de los datos del testigo de inhibición. Después de la incubación, el espectro de α -
20 sinucleína es lo que se esperaría para una estructura en forma de placa β , indicando que agregados de orden más alto se han formado y se utiliza para proporcionar los datos de testigo con 0% de inhibición. Las muestras utilizadas por los testigos son vehículos tratados para asegurar una relación cuantitativa entre estas muestras y las muestras tratadas del
25 compuesto de prueba. Estos dos espectros permiten la cuantificación precisa del porcentaje de inhibición de la formación de fibrillas en las muestras tratadas del compuesto de prueba debido al establecimiento de sus testigos positivo y negativo, los cuales se supone que son 100% y 0% fibrilares respectivamente. No obstante que estos porcentajes testigo son
30 únicamente estimados, hay insuficiente incertidumbre para hacerlos sospechosos, es decir el extremo inferior puede ser 0-5% de inhibición mientras que el extremo superior puede ser 95-100% de inhibición. Los testigos se generan en cada corrida de lote, utilizando la misma solución madre de α -sinucleína que se fracciona en alícuotas de igual volumen a la

cual se adiciona el Compuesto de prueba individual o vehículo y se corren en paralelo para asegurar la exactitud de la cuantificación. Los espectros que se muestran en la Figura 3 A se adquirieron con una relación en peso de α -sinucleína/compuesto de prueba de 1:1. Estos Espectros CD
5 demostraron que los compuestos de esta invención tienen la capacidad para inhibir la formación de la estructura en forma de placa β característica de las fibrillas de α -sinucleína o agregados de la enfermedad de Parkinson.

10 La Figura 3 B muestra los efectos de compuestos en la inhibición de la estructura en forma de placa β de α -sinucleína cuando se compara con un compuesto testigo positivo (+C). El testigo positivo (+C) es, como se menciona, el espectro tratado con vehículo en el tiempo cero mientras el testigo negativo (-C) es el espectro del vehículo tratado durante 4 días.

15

La Figura 4A muestra algunos de los espectros CD que se adquirieron en este estudio. Estos espectros se adquirieron y procesaron en la misma forma como aquellos presentados en la Figura 3A. Estos espectros carecen de la firma en forma de placa β encontrada en el espectro de muestra del vehículo
20 tratado.

La Figura 4B muestra los efectos de compuestos en la inhibición de la estructura en forma de placa β de α -sinucleína cuando se compara con un compuesto testigo positivo (+C). El testigo positivo (+C1) es, como se
25 menciona, el espectro del vehículo tratado en el tiempo cero mientras que el testigo negativo (-C) es el espectro del vehículo durante 4 días.

Los resultados de los estudios también confirman los ejemplos anteriores utilizando fluorometría de Tioflavina T y ensayos tipo enlace de rojo Congo,
30 que los compuestos de esta invención son potentes agentes anti-fibrilacion de α -sinucleína.

Ejemplo 8: Los compuestos de esta invención son potentes disruptores/inhibidores de agregados de α -sinucleína asociados con la enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por la acumulación de agregados intraneuronales insolubles llamados Cuerpos de Lewy, un componente principal de los cuales es α -sinucleína (revisado en Dauer et al., Neuron, 39:889-909, 2003). Debido a que las mutaciones dominantes autosomales en α -sinucleína causan una subserie de casos de Enfermedad de Parkinson familiar, y debido a que estas mutaciones aumentan la probabilidad de α -sinucleína para agregar y formar Cuerpos de Lewy, se propone implicar directamente la α -sinucleína agregada en la etiología y progresión de la enfermedad (Polymeropoulos et al., Science 276:1197-1199, 1997; Papadimitriou et al., Neurology 52:651-654, 1999). Los estudios estructurales han revelado que los Cuerpos de Lewy intracelulares contienen una gran proporción de proteínas mal plegadas con un alto grado de estructura secundaria en forma de placa β . Estos estudios se realizaron para determinar la eficacia de los compuestos de prueba en la inhibición/disrupción de agregados de α -sinucleína asociados con la enfermedad de Parkinson.

Por lo tanto, para probar el potencial terapéutico de los compuestos, se utilizaron ensayos con base en dos células. En ambos ensayos, se utilizó rotenona para inducir la tensión oxidativa mitocondrias y la agregación de α -sinucleína. El primer ensayo utilice el enlace del colorante fluorescente tioflavina S para estructuras con alto contenido de placa β incluyendo fibrillas de agregados de α -sinucleína. Por lo tanto, el avalúo cuantitativo de la extensión de la mancha positiva de tioflavina S de células fijas se utilizó para probar la capacidad de los compuestos para disminuir la cantidad de agregados de α -sinucleína. En el Segundo ensayo, la viabilidad de la celda se evaluó utilizando el ensayo de Citotoxicidad XTT, el cual depende de la mitocondria intacta, funcional en células vivas. De esta manera, el ensayo de Citotoxicidad XTT se utilizó para probar la capacidad de los compuestos para mejorar la toxicidad mitocondrias y resulta en la pérdida de viabilidad asociada con la acumulación de agregados de α -sinucleína. Dicho de otra forma, el ensayo de Citotoxicidad XTT ensayo se utilice para calibrar la

eficacia neuroprotectora de los compuestos. Estos estudios se presentan en los siguientes ejemplos.

Para realizar estos estudios, se utilizó un modelo de *cultivo* de células en el cual se indujo experimentalmente la agregación de α -sinucleína humana. Se obtuvieron 7 células de neuroblastoma BE-ML humano transfectadas de forma estable con α -sinucleína mutante humana A53T de. Los reactivos para cultivo de células se obtuvieron de Gibco/Invitrogen y las células fueron crecidas en OPTIMEM complementado con 10% FBS, Penicilina (100 unidades/mL), Estreptomicina (100 μ g/mL) y 500 μ g/mL G418 como se describió anteriormente (Ostrerova-Golts et al., J. Neurosci, 20:6048-6054, 2000).

Tioflavina S comúnmente se utiliza para detectar estructuras que contienen amiloides *in situ*, incluidas en el tejido cerebral (Vallet et al., Acta Neuropathol., 83:170-178, 1992), y células cultivadas (Ostrerova-Golts et al., J. Neurosci., 20:6048-6054, 2000), considerando que Tioflavina T frecuentemente se utiliza como un reactivo *in vitro* para analizar la agregación de proteínas amiloides solubles en las fibrillas enriquecidas en estructuras en forma de placa β (LeVine III, Prot. Sci., 2:404-410, 1993). Por lo tanto, la histoquímica de Tioflavina S se utilice en células cultivadas para detectar agregados que contienen un alto grado de estructuras en forma de placa β que se forman en respuesta a los agentes que inducen tensión oxidativa (en este caso rotenona) como se describió anteriormente, con modificaciones menores (Ostrerova-Golts et al., J. Neurosci., 20:6048-6054, 2000). Brevemente, para estos estudios, las células se crecieron en cámaras de porta objetos de vidrio recubiertos de Poly-D-Lisina en aproximadamente 3×10^4 células/cm². Después de 24 horas, las células se trataron con 500 nM, 1 μ M o 5 μ M de rotenona (Sigma) o vehículo (0.05% DMSO) como se indicó. Inmediatamente después de la adición de rotenona (o vehículo), los compuestos se adicionaron en las concentraciones indicadas, o el medio de cultivo de células únicamente (ningún Compuesto) en la presencia de rotenona se adicionó. Tratamientos idénticos se repitieron después de 48 horas. Después de 48 horas adicionales, las células se fijaron durante 25

minutos en 3% de paraformaldehído. Después de un lavado PBS, las células se incubaron con 0.015% de Tioflavina S en 50% de etanol durante 25 minutos, se lavó dos veces durante cuatro minutos en 50% de etanol y dos veces durante cinco minutos en agua deionizada y después se montó

5 utilizando montante con base acuosa diseñado para proteger contra foto blanqueado. Agregados que enlazan a Tioflavina S se detectaron con un microscopio fluorescente utilizando una serie de filtros High Q FITC (480 a 535 de ancho de banda corrido) y unos lentes de objetivo 20X a menos que se indique de otro modo. Se selecciona entre 8 y 16 imágenes

10 representativas por condición, reproducidas y procesadas mediante un experimentador quien desconocía las condiciones del tratamiento (experimento ciego). Para evaluar la cantidad de agregados positivos a Tioflavina S, se determinó el área total por campo cubierto por inclusiones positivas a Tioflavina S. Para este propósito, fluorescencia de fondo que falló

15 para exceder el tamaño preestablecido o parámetros umbrales de intensidad de píxel se eliminó utilizando software Q-capture. Falso, fluorescencia asociada con no-células se eliminó de forma manual. A menos que se indique de otro modo, los datos representan medios de grupo $\pm$ SEM. Los análisis estadísticos se realizaron con GrafPad Prism (GraphPad Inc). Las

20 diferencias entre las medias (dos muestras) fueron evaluadas mediante la prueba *t* del estudiante. Las diferencias entre medios múltiples se evaluaron mediante un factor ANOVA seguido por la prueba de comparación múltiple de Tukey.

25 Para validar la capacidad del ensayo para detectar de forma cuantitativa los agregados que enlazan Tioflavina S, se realizó el manchado de células BE-M17 que sobre expresan α -sinucleína A53T y los resultados revelaron un aumento dependiente de la dosis de rotenona en los agregados positivos a Tioflavina S en relación con las células testigo tratadas con vehículo (La

30 Figura 9A-D). Las imágenes de amplificación más alta obtenidas con objetivo 40X indicó que los agregados positivos a Tioflavina S fueron intracelulares y citoplásmicos (Figura 9D), análogo a la acumulación de Cuerpos de Lewy intracitoplásmicos que son indicios patológicos asociados con la enfermedad de Parkinson. La cuantificación del área cubierta por agregados positivos a

tioflavina S estableció que 5 μM de rotenona fue suficiente para inducir la agregación robusta (Figura 9E) y de esta manera es una dosis efectiva para probar la capacidad de compuestos para atenuar la formación de estos agregados.

5

Utilizando el protocolo descrito anteriormente, se probaron varios compuestos por su capacidad para reducir, prevenir o eliminar agregados positivos a Tioflavina S en células BE-M17 tratados con rotenona que sobre expresan α -sinucleína A53T. Ejemplos de los resultados obtenidos de

10 experimentos utilizando estos compuestos se describen más adelante.

En células tratadas únicamente con 1 μM de rotenona, hubo una presencia robusta de agregados positivos a Tioflavina S (La Figura 10A). La adición de 500 ng/mL (Figura 10B) o 1 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 10C) de compuesto testigo

15 positivo redujeron de forma marcada la abundancia de estos agregados inducidos por rotenona por 87% y 91% respectivamente (como se muestra en la Figura 10D) en relación con células tratadas únicamente con rotenona. Por lo tanto, el compuesto testigo positivo es altamente efectivo en la reducción, prevención y/o eliminación de Agregados positivos a Tioflavina S

20 en células que expresan α -sinucleína A53T humana.

La adición desde 500 ng/mL hasta 2 $\mu\text{g/mL}$ (Figuras 11B-D) del compuesto 1 no redujeron la abundancia de agregados inducidos por rotenona en relación con las células tratadas únicamente con rotenona (Figuras 11D y E).

25

Como se muestra en la Figura 12, en las células tratadas con 1 μM de rotenona la adición de 500 ng/mL y 2 $\mu\text{g/mL}$ del compuesto 2 redujeron la abundancia de agregados inducidos por rotenona en 39-44%, y en células tratadas con 5 μM de rotenona la adición de 1 $\mu\text{g/mL}$ del Compuesto 2 redujo

30 de forma marcada la abundancia de agregados inducidos por rotenona en 67% (Figura 12E).

Figuras 13 A-E show los efectos de Compuesto 3. en células tratadas con 1 μM rotenona la adición de 500 ng/mL hasta 2 $\mu\text{g/mL}$ de Compuesto 3 reducir la

abundancia de agregados inducidos por rotenona de 41 a 63% en relación con las células tratadas únicamente con rotenona.

La adición de 500 ng/mL hasta 2 µg/mL del compuesto 4 no redujo la
5 abundancia de agregados inducidos por rotenona en relación con células tratadas únicamente con rotenona (Figuras 14 A-E).

Las Figuras 15 A-E muestran los efectos del Compuesto 5. En células tratadas con 1 µM de rotenona la adición de 1-2 µg/mL del Compuesto 3
10 redujo la abundancia de agregados inducidos por rotenona en 25 a 49% en relación con las células tratadas únicamente con rotenona.

La adición del Compuesto 6 no tuvo efectos importantes en la abundancia de agregados inducidos por rotenona en relación con las células tratadas
15 únicamente con rotenona (Figuras 16 A-E).

La adición de 500 ng/mL y 2 µg/mL del Compuesto 7 redujo de forma marcada la abundancia de agregados inducidos por rotenona en 60 y 74% (respectivamente) en relación con las células tratadas únicamente con
20 rotenona en células tratadas con 1 µM de rotenona únicamente. En células tratadas con 5 µM de rotenona la adición de 500 ng/mL y 2 µg/mL del Compuesto 7 redujo la abundancia de agregados inducidos por rotenona en 31 y 67% (respectivamente) (Figuras 17A-E).

25 Las Figuras 18 A-E muestran los efectos del Compuesto 8. En células tratadas con 1 µM de rotenona la adición de 1 µg/mL del Compuesto 8 redujo la abundancia de agregados inducidos por rotenona en 56% en relación con células tratadas únicamente con rotenona. En células tratadas con 5 µM de rotenona la adición de 1 o 2 µg/mL del Compuesto 8 redujo la abundancia de
30 agregados inducidos por rotenona en 48 y 38% (respectivamente).

La adición desde 500 ng/mL hasta 2 µg/mL del compuesto 9 redujo la abundancia de agregados inducidos por rotenona desde 19 hasta 60% en relación con las células tratadas únicamente con rotenona en células tratadas

con 1 μ M rotenona (Figuras 19A-E). La adición del Compuesto 9 no redujo la abundancia de agregados inducidos por rotenona en células tratadas con 5 μ M de rotenona aunque el manchado de la línea base fue menor que el esperado en esta dosis de rotenona.

5

En conclusión, muchos de los compuestos probados, especialmente los compuestos 2, 3, 5, 7, 8 y 9 efectiva y potencialmente redujeron, previnieron, inhibieron y/o eliminaron la formación, depósito y/o acumulación de agregados α -sinucleína en células BE-M 17 que expresan A53T α -sinucleína.

10

Ejemplo 9: Los compuestos de esta invención protegen contra la citotoxicidad inducida por rotenona

El Ensayo de Citotoxicidad XTT (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) se utilizó anteriormente para demostrar que A53T α -sinucleína potencia la muerte de la célula en células BE-M17 a través de un mecanismo dependiente de la tensión oxidativa (Ostrerova-Golts et al., J. Neurosci., 20:6048-6054, 2000). La investigación ha demostrado que la acumulación de agregados α -sinucleína en los Cuerpos de Lewy contribuye de forma mecánica a la degradación de neuronas en la enfermedad de Parkinson y desordenes relacionados (Polymeropoulos et al., Science 276:2045-2047, 1997; Kruger et al., Nature Genet. 18:106-108, 1998). En la presente, el ensayo de Citotoxicidad XTT (de aquí en adelante mencionado como el ensayo XTT) se utilizó para medir la capacidad de los compuestos de prueba para proteger contra la Citotoxicidad inducida por rotenona (capacidad neuroprotectora). El ensayo se basa en el principio de que la conversión de la sal de tetrazolio amarillo XTT para formar un colorante formazan naranja (que absorbe la luz alrededor de 490 nm) ocurre únicamente en células viables metabolitamente activas. Por lo tanto, la absorbencia de luz en 490 nm es proporcional a la viabilidad de la célula. Para este ensayo, las células fueron sembradas en caja de cultivo de tejido de 96 pozos a una densidad celular de 10^4 células por pozo. Después de 24 horas, las células se trataron con 500 nM o 2 μ M de rotenona, o vehículo (0.05% DMSO) como se indicó. Inmediatamente después de la adición de rotenona, los compuestos se adicionaron en la concentración indicada. Como un testigo, los compuestos

se adicionaron sin rotenona (únicamente vehículo, 0.05% DMSO) y no resultaron tóxicas en las dosis probadas. Las células no tratadas recibieron medios de cultivo de células únicamente (ningún compuesto, con o sin rotenona). Después de 40-44 horas de tratamiento, los medios condicionados se eliminaron y reemplazaron con 100 μ L de medios frescos y la mezcla de reacción se marcó con 50 μ L de XTT de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Cinco o seis horas después, la absorbancia en 490 nm se midió y corrigió por absorbancia en la longitud de onda de referencia de 700 nm. El tratamiento con 500 nM y 2 μ M de rotenona generalmente disminuyó la viabilidad en 35-45% en relación con células no tratadas sin rotenona (La Figura 20). El porcentaje de inhibición de la muerte de células se calculó como la proporción de disminución de la absorbancia inducida por rotenona (viabilidad) que se eliminó mediante el tratamiento con el compuesto de prueba.

El tratamiento con compuesto testigo positivo en 10-25 μ g/mL inhibió la pérdida inducida por rotenona de viabilidad en 25-33% en ambas dosis de rotenona (La Figura 21).

El experimento se realizó con cada compuesto y los resultados se muestran en las Figuras 22-30. Las Figuras 22-30, el panel A muestra de forma gráfica la toxicidad del Compuesto considerando que las Figuras 22-30, panel B muestran la inhibición por el compuesto de la pérdida inducida por rotenona de viabilidad medida en ambas dosis de rotenona.

El tratamiento con 10 μ g/mL del Compuesto 1 indica que este Compuesto es no-tóxico, considerando que dosis más altas presentan alguna toxicidad (Figura 22A). El tratamiento con 10 μ g/mL del Compuesto 1 inhibió la pérdida inducida por rotenona de viabilidad en aproximadamente 18 a 27% en ambas dosis de rotenona (Figura 22B).

El tratamiento con 10-25 μ g/mL del Compuesto 2 indica que este compuesto es no-tóxico, considerando que una dosis de 50 μ g/mL presentó alguna toxicidad (Figura 23A). El tratamiento con 25 μ g/mL del Compuesto 2 inhibió

la pérdida inducida por rotenona de viabilidad en aproximadamente 20 a 28% en ambas dosis de rotenona (Figura 23B).

El tratamiento con 10-50 $\mu\text{g/mL}$ del Compuesto 2 indica que este compuesto es relativamente no-tóxico en todas las dosis probadas (Figura 24A). El tratamiento con 10 a 50 $\mu\text{g/mL}$ del Compuesto 3 inhibió la pérdida inducida por rotenona de viabilidad en aproximadamente 17 a 28% en ambas dosis de rotenona (Figura 24B).

El tratamiento con 10 y 25 $\mu\text{g/mL}$ del Compuesto 4 indica que este compuesto es no-tóxico, considerando que una dosis de 50 $\mu\text{g/mL}$ presentó alguna toxicidad (Figura 25A). El tratamiento con 25 $\mu\text{g/mL}$ del Compuesto 4 fue particularmente efectivo e inhibió la pérdida inducida por rotenona de viabilidad en aproximadamente 50% en una dosis de 500nM de rotenona considerando que en 2 μM la inhibición observada fue de aproximadamente 26% (Figura 25B).

El tratamiento con 10 o 25 $\mu\text{g/mL}$ del Compuesto 5 indica que este compuesto es no-tóxico, considerando que una dosis de 50 $\mu\text{g/mL}$ presentó mínima toxicidad (Figura 26A). El tratamiento con el Compuesto 5 no provocó ninguna inhibición de la pérdida inducida por rotenona de viabilidad en ninguna dosis de rotenona (Figura 26B).

El tratamiento con 10 a 50 $\mu\text{g/mL}$ del Compuesto 6 indica que este compuesto es no-tóxico en todas las dosis probadas (Figura 27A). El tratamiento con 50 $\mu\text{g/mL}$ del Compuesto 6 en una dosis de 500nM de rotenona inhibió la pérdida de viabilidad inducida por rotenona en aproximadamente 12-16% para todas las dosis del compuesto probado (Figura 27B).

El tratamiento con 1 a 50 $\mu\text{g/mL}$ del Compuesto 7 indica que este compuesto es no-tóxico e incluso dosis más altas (100-150 $\mu\text{g/mL}$ presentaron únicamente toxicidad muy mínima (Figura 28A). El tratamiento con 50 $\mu\text{g/mL}$ del Compuesto 7 mostró la inhibición más alta de la pérdida de viabilidad

como se describe antes). Los testigos tratados con el vehículo en ambas edades se procesaron de forma idéntica. El cerebro medio derecho se bisecó en forma coronal para producir una parte anterior y posterior. Los cerebros medios bisecados se congelaron de forma instantánea en un baño de hielo seco/etanol y se almacenó a -80°C . Los cerebros se sometieron a fraccionación bioquímica para separar la fracción citosólica soluble de la insoluble, particulado (membrana). Brevemente, los cerebros se homogenizaron en 9 volúmenes de solución amortiguadora HEPES (libre de detergente), complementada con inhibidores de proteasa y fosfatasa (Calbiochem). La homogenización suave se facilitó con un pistilo de Teflon en un homogenizador de vidrio fritado (Kontes #19) para llevar al mínimo la disrupción de las interacciones de α -sinucleína/membrana durante la lisis. El lisado de células enteras se centrifugó después a baja velocidad para sedimentar (P1) las células y organelos no rotos (como pueden ser los núcleos). El sobrenadante (S1) se centrifugó después a $225,000 \times g$ durante 1 hora a 4°C para granular las membranas (P2) (esta fracción puede incluir organelos como pueden ser mitocondrios). El sobrenadante (S2) fue la fracción "citosólica". El gránulo (P2) se resuspendió pipeteando en 2.5 volúmenes de solución amortiguadora para homogenización, sonicación en hielo durante $5 \times 1 \text{ s}$ y mencionado como el "particulado" o fracción "membrana". La concentración total de proteína se determinó mediante el ensayo MicroBCA (Pierce). Cantidades iguales de proteína por franja ($25 \mu\text{g}$) se corrieron en SDS-PAGE (Bio-Rad Criterio 4-12% geles Bis-Tris, 26 pozos por gel), y se transfirieron a nitrocelulosa (BioRad). La eficiencia consistente de transferencia a través del análisis Blot se confirmó mediante el manchado reversible con colorante Ponceau S y formación de imagen en un digitalizador de lecho plano. Los blots desteñidos se bloquearon y probaron con anticuerpos policlonales de conejo, purificados AB5038P (Chemicon) seguido de anticuerpos secundarios anti IgG/HRP de conejo (Abeam) y SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrato (Pierce) para detectar α -sinucleína. La especificidad del anticuerpo AB5038P para los análisis Western Blot en α -sinucleína se confirmó mediante la pre-absorción del anticuerpo con 50X molar en exceso de α -sinucleína humana purificada, lo

meses de edad. La Figura 34 muestra que los ratones tratados con el compuesto 7 (paneles C-D presentan de forma importante menos α -sinucleína humana intraneuronal en la corteza frontal comparados con los ratones tratados con el vehículo (paneles A-B). Los cerebros de los ratones tipo silvestre no transgénicos están desprovistos de manchas de α -sinucleína humana y se muestran como un testigo para la especificidad del anticuerpo para la α -sinucleína humana derivada del transgen (E y F). El análisis y cuantificación de imagen revela que el tratamiento con el compuesto 7 provoca una reducción importante del 81% de los objetos positivos a α -sinucleína.

El tratamiento con el compuesto 7 durante 6 meses reduce dramáticamente los niveles de α -sinucleína en la corteza frontal de ratones transgénicos α -sinucleína humana, en relación con los testigos tratados con el vehículo. Estos datos se correlacionan con nuestros datos que muestran rendimiento motor mejorado de ratones transgénicos tratados durante 6 meses con los compuestos de esta invención.

Ejemplo 13: Reducción de los niveles de α -sinucleína en el cerebro de ratones transgénicos para α -sinucleína

Dodecil sulfato de sodio - electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y análisis Western Blot se utilizaron para analizar la concentración de α -sinucleína en el particulado (membrana) y fracciones citosólicas de regiones anteriores del cerebro de ratones tanto de 18 meses de edad como de 4-5 meses de edad, transgénicos (descritos antes) y no transgénicos. Ambas fracciones contienen grupos potencialmente patógenos de agregados de α -sinucleína que la mayor parte se reduce a monómeros en las condiciones reductoras de la SDS-PAGE.

Después de sacrificar a los ratones transgénicos para α -sinucleína después de 6 meses de tratamiento con el compuesto (cuando los animales tuvieron 18 meses de edad) o 6 semanas de tratamiento con el compuesto (cuando los animales tuvieron 4-5 meses de edad), los cerebros se separaron y bisecaron a lo largo de la línea media (esquema del tratamiento

Ejemplo 12: Reducción del inmunomanchado intraneuronal positivo a α -sinucleína- en los cerebros de ratones transgénicos para α -sinucleína.

- 5 Se realizó el inmunomanchado y análisis de imagen para determinar si el tratamiento con el compuesto 7 reduce los niveles de α -sinucleína en ratones transgénicos para α -sinucleína envejecidos (descrito antes). Después de bloquear el enlace anticuerpo no específico, las secciones del cerebro del ratón se incubaron toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal de
- 10 conejo elevado contra α -sinucleína humana (Chemicon AB5038P; dilución 1:500). En el día 2, después enjuagar completamente en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado (anti conejo de cabra, Vector Labs) en una dilución de 1:200 durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de enjuagar
- 15 completamente en PBS las secciones se incubaron con complejo biotina avidina de Vector labs (ABC) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se enjuagaron después en PBS tres veces y se hicieron reaccionar durante 4 minutos en Vector DAB (de acuerdo con las instrucciones del fabricante). La reacción DAB se apagó mediante dos
- 20 enjuagues con solución amortiguadora Tris. Las secciones se montaron sobre deslizantes cargados y se secaron toda la noche. Los porta objetos fueron cubiertos y se tomaron las imágenes.

- Para análisis y cuantificación de la imagen, se digitalizaron tres imágenes de
- 25 la corteza, anatómicamente equilibradas entre los ratones (ampliación 100X) con una digital Q-Image y software de Q-Capture. Cada imagen se procesó utilizando software Image-Pro. Un umbral predeterminado para la segmentación de color del píxel y área de objeto mínima se aplicó a cada imagen. Los artefactos formadores de imagen se separaron y los datos se
 - 30 exportaron y procesaron para determinar el porcentaje (%) de área ocupada mediante objetos inmuno-marcados positivos para α -sinucleína.

Los ratones fueron tratados durante 6 meses recibiendo diariamente inyecciones i.p de 50 mg/kg/día desde los 12 meses de edad hasta los 18

del tratamiento. Después 6 meses de tratamiento (n=11) con el compuesto 7, los ratones (18 meses de edad) mostraron un mejoramiento importante de 41% en la prueba del poste en relación con su rendimiento antes del tratamiento y su rendimiento fue similar al de los ratones no transgénicos de 16 meses de edad (Figura 32). Por el contrario, el rendimiento de los ratones tratados con el vehículo en 3 y 6 meses de tratamiento fue similar a su rendimiento antes del tratamiento. Estos resultados muestran que el compuesto 7 mejora el rendimiento en la prueba del poste.

10 **B) Prueba para atravesar la viga en ratones transgénicos más jóvenes**

Una prueba para atravesar la viga ligeramente modificada (experimentos de 2 días en lugar de 3 días) se utilizó para medir el rendimiento motor ratones transgénicos para α -sinucleína más jóvenes (a los 3 meses de edad) tratados durante 6 semanas con el compuesto 7 (o vehículo testigo) (n=8 por grupo). Los ratones fueron entrenados un día, en seis experimentos, para cruzar una viga angosta (separada en cuatro segmentos) con rebordes de soporte unidos a lo largo de cada lado y dirigiendo al animal a su jaula. En el Segundo día, la prueba se volvió más desafiante colocando un rejilla de malla sobre la superficie de la viga, dejando un pequeño espacio de aproximadamente 1 cm entre la rejilla y la superficie de la viga. Los ratones se video grabaron sobre un periodo de cinco experimentos y el tiempo para cruzar, número de pasos tomados y número de deslizamientos se registraron mediante un experimentador quien desconocía las condiciones del tratamiento con el fármaco (Fleming SM, et al., 2006. Neuroscience 142:1245-1253).

Los ratones transgénicos que se les administró el compuesto 7 durante 6 semanas mostraron un mejoramiento importante de 36% (tiempo para cruzar la viga) en relación con los ratones testigo tratados con el vehículo, igualados por edades (4-5 meses de edad) (Figura3). No hubo efecto importante en el número de pasos tomados, o deslizamientos por paso (relación de error). Tomados juntos, estos resultados indicaron que el compuesto 7 mejora el rendimiento en la prueba para atravesar la viga.

Para evaluar la eficacia potencial de los compuestos en la prueba del poste, los ratones tratados con el compuesto y los tratados con el vehículo se evaluaron antes del tratamiento (en 0 meses) y otra vez en 3 y 6 meses del tratamiento. Los ratones transgénicos fueron aquellos descritos en el Ejemplo 5 10 anterior y recibieron diariamente inyecciones i.e. de 50 MG/kg/día. Para evaluar la eficacia potencial en la prueba de la viga, los ratones tratados con el compuesto y los tratados con el vehículo se evaluaron en 5-6 semanas de tratamiento. Si los compuestos fueron efectivos, uno podría esperar que los ratones a los que se les administró el compuesto se desarrollarían mejor que 10 los ratones tratados con el vehículo en la misma edad, y/o que el tratamiento con el compuesto podría mejorar las deficiencias (mejorar el rendimiento) sobre el tiempo dentro de un grupo determinado. Por ejemplo, si los compuestos de prueba fueron efectivos, uno podría esperar que los ratones tratados con el compuesto cruzaran la viga más rápidamente, en relación con 15 los ratones tratados con el vehículo. O uno podría esperar que el mejoramiento de los deterioros dentro de un grupo sobre el tiempo (por ejemplo rendimiento después del tratamiento con el compuesto pudieran estar mejor que antes del tratamiento con el compuesto considerando que los ratones tratados con el vehículo se desarrollan de forma similar, o empeoran 20 de forma progresiva, sobre el mismo periodo de tiempo.

A) Prueba del Poste

En la prueba del poste, la cual es una medida del rendimiento motor, los ratones son entrenados un día (en 2 experimentos) para descender un poste 25 de madera después de ser colocado con la cabeza hacia arriba en la parte superior del poste. En el día dos, los ratones son probados en cinco experimentos y la latencia para girar hacia abajo (tiempo de giro), tiempo para descender (tiempo de viaje) y tiempo total en el poste es grabado por un experimentador quien desconocía las condiciones del tratamiento con el 30 fármaco.

Los ratones transgénicos a los que se les administró el compuesto 7 durante 3 meses (n-11) (15 meses de edad) mostraron una tendencia hacia un mejoramiento en el rendimiento de la prueba del poste (disminución en el tiempo de giro) en relación con su rendimiento antes

En la prueba para atravesar la viga, en la cual uno mide el desempeño motor, los ratones son entrenados dos días, con cinco experimentos diarios, para cruzar una viga angosta (separada en cuatro segmentos) con rebordes de soporte unidos a lo largo de cada lado y dirigiéndose a la jaula del animal. En el tercer día, la prueba se hace más desafiante colocando una rejilla de malla sobre la superficie de la viga, dejando un espacio pequeño de aproximadamente 1 cm entre la rejilla y la superficie de la viga. Los animales son video grabados sobre un periodo de cinco experimentos y el tiempo para cruzar, número de pasos tomados y número de deslizamientos son registrados por un experimentador quien desconocía las condiciones del tratamiento del fármaco (Fleming SM, et al., 2006. Neuroscience 142:1245-1253).

Los ratones transgénicos a los que se les administró el compuesto 2 durante tres meses mostraron un mejoramiento marcado, importante de 49% (tiempo para cruzar la viga) en relación con los ratones testigos tratados con el vehículo, igualados por edades (15 meses de edad), (Figura 31). Después de seis meses de tratamiento, sin embargo, el rendimiento fue similar a los ratones tratados con el vehículo en esta edad (Figura 31). Tomados juntos, estos datos muestran que el compuesto 2 retarda el inicio de las deficiencias de comportamiento en la prueba para atravesar la viga.

Los ratones transgénicos a los que se les administró el compuesto 7 durante seis meses mostraron un mejoramiento marcado, importante de 35% (tiempo para cruzar la viga) en relación con los ratones testigos tratados con el vehículo, igualados por edades (15 meses de edad), (Figura 31). Además, después de únicamente tres meses de tratamiento con el compuesto 7, el rendimiento mejoró en 39% en relación con los testigos tratados con el vehículo en esta edad (Figura 31). Tomados juntos, estos datos muestran que el compuesto 7 evita la progresión de las deficiencias en la prueba para atravesar la viga.

Ejemplo 11: Rendimiento motor mejorado de ratones transgénicos para α -sinucleína tratados con compuestos de esta invención

indicios patológicos de la enfermedad de Parkinson (Rockenstein E, et al., 2002. J. Neurosci. Res. 68:568-578 y Hashimoto M, et al., 2003 Ann N Y Acad Sci 991:171-188). (2) Los ratones experimentan un déficit dopaminérgico en la vía nigrostriatal, como se indica mediante la pérdida de proyecciones neuronales inmunorreactivas para la hidroxilasa tirosina en el estriato (Hashimoto M, et al., 2003 Ann N Y Acad Sci 991: 171-188). Este déficit también se ve en pacientes PD humanos. (3) Los ratones muestran deficiencias, incluyendo lentitud de movimiento, pérdida de equilibrio y coordinación y debilidad muscular en la prueba de comportamiento dependiente de la función motor como puede ser la prueba para atravesar la viga (Fleming SM, et al., 2004 J Neurosci 24:9434-9440 y Fleming SM, et al., 2006 Neuroscience 142:1245-1253).

Disfunción motora similar se ve en pacientes PD humanos. Para evaluar la eficacia potencial de los compuestos para mejorar el rendimiento motor o llevar al mínimo las deficiencias, se realizó la prueba del desafío para atravesar la viga en ratones tratados con el compuesto y tratados con el vehículo evaluados antes del tratamiento en 0 meses y otra vez en 3 y 6 meses de tratamiento. Si los compuestos fueron efectivos, esperaríamos que los ratones a los que se les administraron estos compuestos se desempeñaran mejor que los ratones tratados con el vehículo en la misma edad, y/o que el tratamiento con el compuesto de prueba pudiera mejorar la declinación en el desempeño, dependiente de la edad dentro de un grupo determinado. Por ejemplo, si los compuestos de prueba fueron efectivos, uno podría esperar que los ratones tratados con el compuesto para cruzaran la viga más rápidamente, en relación con los ratones tratados con el vehículo. O uno podría esperar que los deterioros dependientes de la edad dentro de un grupo que se va a disminuir (por ejemplo el rendimiento después del tratamiento con el compuesto podría ser similar al rendimiento antes del tratamiento, o incluso mejor, considerando que los ratones tratados con el vehículo se desempeñan progresivamente peor sobre el mismo periodo de tiempo).

Prueba para atravesar la viga

inducida por rotenona en aproximadamente 25% en la dosis de 500nM de rotenona (Figura 28B).

El tratamiento con 10 a 25 $\mu\text{g/mL}$ del Compuesto 8 indica que este compuesto es relativamente no-tóxico, (Figura 29A). No obstante alguna toxicidad menor en 50 $\mu\text{g/mL}$, el compuesto aparentemente produce alguna protección contra la toxicidad fuerte de rotenona, Esta conclusión está soportada por análisis morfológicos (no se muestran). El tratamiento con 50 $\mu\text{g/mL}$ del compuesto 1 en 2 μM de rotenona mostró la inhibición de pérdida de viabilidad inducida por rotenona en aproximadamente 18% (Figura 29B).

El tratamiento con 10 a 25 $\mu\text{g/mL}$ del Compuesto 9 indica que este compuesto es relativamente no tóxica, considerando que la dosis más alta presentó alguna toxicidad (Figura 30A). El tratamiento con el compuesto 9 no provocó ninguna inhibición apreciable de la pérdida de viabilidad inducida por rotenona en ninguna dosis de rotenona (Figura 30B).

En conclusión, muchos de los compuestos probados fueron eficaces al inhibir la citotoxicidad inducida por rotenona demostrando actividad neuroprotectora contra la toxicidad de α -sinucleína.

Ejemplo 10: Rendimiento motor mejorado de ratones transgénicos para α -sinucleína tratados con compuestos de esta invención

Para evaluar la eficacia potencial de compuestos en un modelo de ratón relevante para la enfermedad de Parkinson, se utilizaron ratones transgénicos que sobre expresan α -sinucleína humana tipo silvestre en el testigo del promotor Thy-1 del ratón (Rockenstein E, et al., 2002. J Neurosci Res 68:568-578). Los ratones transgénicos para α -sinucleína humana han probado ser modelos útiles para la enfermedad de Parkinson, y de esta manera un sistema adecuado para probar los agentes terapéuticos potenciales, por un número de razones que incluyen las siguientes. La presencia de agregados de α -sinucleína que son detectables mediante ambos métodos: inmunohistoquímica (manchado) y bioquímica (Western Blot). Estos agregados son similares a los Cuerpos de Lewy (inclusiones intracelulares que consisten principalmente de α -sinucleína) que son los

cual suprime todas las señales excepto para una banda que migra en 25 kDa (en la presente indicada la banda no específica 25 kDa).

Los animales fueron tratados con compuestos durante 6 meses de inyecciones i.p. diarias de 50 mg/kg/día desde los 12 meses de edad hasta los 18 meses de edad. El compuesto 7 reduce de forma importante los niveles de α -sinucleína en 69% en la fracción particulada (Figura 35) y reduce de forma importante los niveles de α -sinucleína en 73% en la fracción citosólica (Figura 36) en relación con los ratones tratados con el vehículo.

Debido a que estos cohortes son de género mezclado (generalmente hay 2 machos por grupo), y debido a que la variabilidad relacionada con el género en los niveles de α -sinucleína algunas veces se ve, analizamos de forma separada a las hembras. De forma importante, el compuesto 7 reduce de forma significativa los niveles de α -sinucleína en 58% en la fracción del particulado (Figura 35) y 48% en la fracción citosólica (Figura 36) cuando únicamente se analizaron las hembras.

Para probar si los compuestos resultarían en una reducción similar de α -sinucleína en animales más jóvenes, se trataron durante un tiempo más corto, los compuestos (o vehículo) se administraron durante 6 semanas en inyecciones i.p. diario, únicamente en ratones hembras, en 50 mg/kg/día desde aproximadamente 3 meses de edad hasta aproximadamente 4-5 meses de edad. Los tratamientos con el compuesto 7 redujeron de forma importante los niveles de α -sinucleína en 45% en la fracción particulada (Figura 37) y redujeron de forma importante los niveles de α -sinucleína en 71% en la fracción citosólica (Figura 38) en relación con los ratones tratados con el vehículo. Reducciones similares en los niveles de α -sinucleína con el tratamiento con el compuesto 7 (en relación con los testigos tratados con el vehículo) se ven cuando se analizó la parte posterior del cerebro (menos el cerebelo) (los datos no se muestran).

30

Tomados juntos, estos resultados sugieren que mediante la disrupción o reducción de la agregación de α -sinucleína del tratamiento con el compuesto puede resultar en más formas de α -sinucleína solubles incluyendo monómero) que son mejores sustratos para aclarar.

Ejemplo 14: Composiciones de compuestos de esta invención

Los compuestos de esta invención, como se menciona anteriormente, se administran de manera deseable en la forma de composiciones para uso farmacéutico. Las composiciones adecuadas para uso farmacéutico y el método para prepararlas, son bien conocidos por las personas con experiencia en la técnica y se describen en esos tratados como Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, ed., 20a edición, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA. Las composiciones representativas son como sigue:

Formulación de Tabletas Orales

Una formulación de tabletas orales de un compuesto de esta invención se prepara como sigue:

	% p/p
Compuesto de esta invención	10.0
Estearato de magnesio	0.5
Almidón	2.0
Hidroxipropilmetilcelulosa	1.0
celulosa microcristalina	86.5

Los ingredientes se mezclaron para homogeneidad, después se granularon con la ayuda de agua, y los granulados se secaron. El granulado seco se comprimió después en tabletas con el tamaño para dar una dosis adecuada del compuesto. La tableta opcionalmente se recubrió aplicando una suspensión de un agente formador de película (por ejemplo hidroxipropilmetilcelulosa), pigmento (por ejemplo dióxido de titanio), y plastificante (por ejemplo ftalato de dietilo) y secando la película por evaporación del disolvente, el recubrimiento de la película puede contener, por ejemplo, 2-6% del peso de la tableta.

Formulación de cápsulas orales

El granulado de la sección anterior de este Ejemplo se cargó en cápsulas de gelatina dura de un tamaño adecuado para la dosis propuesta. A la capsula se le coloca una banda para sellar, si se desea.

5 **Formulación de gel blando**

Una formulación de gel blando se prepara como sigue:

	% p/p
Compuesto de esta invención	20.0
Polietilen glicol	80.0

10 El compuesto se disolvió o disperse en el polietilen glicol y se adicionó un agente espesante si se requirió. Una cantidad suficiente de la formulación para proporcionar la dosis deseada del compuesto se cargó en geles blandos.

Formulación Parenteral

15 Una formulación parenteral se prepara como sigue:

	% p/p
Compuesto de esta invención	1.0
Salina normal	99.0

El compuesto se disolvió en la salina y la solución resultante se esterilizó y cargó en frascos, ampolletas y jeringas precargas, como fue apropiado.

20 **Formulación oral de liberación controlada**

Una formulación de liberación prolongada se puede preparar mediante el método de la Patente US No. 4,710,384, como sigue:

25 Un kg de un compuesto de esta invención se recubrió en un recubridor de polvo Uni-Glatt modificado con celulosa de etilo Dow Type 10. La solución dispersante es una solución al 8% de celulosa de etilo en 90% de acetona a 10% de etanol. Se adicionó aceite de ricino como plastificante en una cantidad igual al 20% de la celulosa de etilo presente. Las condiciones

dispersants son como sigue: 1) velocidad, 1 litro/hora; 2) flap, 10-15%; 3) temperatura de entrada, 50°C, 4) temperatura de salida, 30°C, 5) porcentaje de recubrimiento, 17%. El compuesto recubierto se tamizó a tamaños de partícula entre 74 y 210 micrones. Se puso atención en asegurar una Buena
5 mezcla de partículas de diferentes tamaños dentro del intervalo. 400 mg de las partículas recubiertas se mezclaron con 100 mg de almidón y la mezcla se comprimió en una prensa de banda a 1.5 tons para producir una tableta de liberación controlada de 500 mg.

10 La presente invención no está limitada en alcance por las modalidades específicas descritas en la presente. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las descritas serán evidentes para los expertos en la técnica de las descripciones anteriores. Se intenta que esas modificaciones estén dentro del alcance de las reivindicaciones anexas. Se mencionan
15 diversas publicaciones en la presente, las descripciones de las cuales se incorporan para referencia en su totalidad.

20

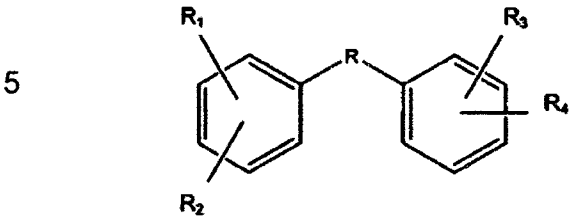
25

30

35

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



donde R₁, R₂, R₃, y R₄ son grupos hidroxilo colocados de forma independiente y

- 10 R es un heteroarilo seleccionado del grupo que consiste en imidazoles, triazoles y pirazoles o sales aceptadas para uso farmacéutico de estos.

- 15 2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 donde R es un imidazol.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 donde R es un triazol.

- 20 4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 donde R es un pirazol.

- 25 5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en: 2,4-bis(3,4-dihidroxifenil)imidazol;
3,5-bis(3,4 dihidroxifenil) 1,2,4 triazol;
3,5-bis(3,4 dihidroxifenil)pirazol y sales aceptadas para uso farmacéutico de éste.

- 30 6. Una composición para uso farmacéutico que contiene el compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 y un excipiente aceptado para uso farmacéutico.

7. Un método para inhibir la formación, depósito, acumulación, o persistencia de Aβ amiloides o agregados α-sinucleína, consiste en

tratar los agregados con una cantidad efectiva del compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.

- 5 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7 donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:
2,4-bis(3,4 dihidroxifenil) imidazol,
3,5-bis(3,4 dihidroxifenil) 1,2,4 triazol, y
3,5-bis(3,4 dihidroxifenil) pirazol y sales aceptadas para uso farmacéutico de éste.
- 10 9. Un método para tratar una enfermedad causada por β -amiloides o una sinucleinopatía en un mamífero que sufre de ésta, consiste en la administración de una cantidad efectiva de forma terapéutica del compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.
- 15 10. El método de acuerdo con la reivindicación 9 la enfermedad causada por β -amiloides se selecciona del grupo de enfermedades que consiste en enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria amiloidosis del tipo Dutch y angiopatía cerebral causada por β -amiloides.
- 20 11. El método de acuerdo con la reivindicación 10 donde la enfermedad causada por β -amiloides es la enfermedad de Alzheimer.
- 25 12. El método de acuerdo con la reivindicación 9 donde la sinucleinopatía se selecciona del grupo que consiste en la enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Parkinson familiar, enfermedad de cuerpos de Lewy, la variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia de sistemas múltiples, y
- 30 13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, donde la sinucleinopatía es la Enfermedad de Parkinson.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 9 donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en
2,4-bis (3,4 dihidroxifenil)imidazol,
3,5-bis (3,4 dihidroxifenil) 1,2,4 triazol, y
5 3,5-bis (3,4 dihidroxifenil)pirazol, y sales aceptadas para uso farmacéutico de éste.
15. Un método para mejorar el rendimiento motor en un mamífero que sufre de una sinucleinopatía, que consiste en la administración de una
10 cantidad efectiva de forma terapéutica del compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.
16. Un método para detener la progresión de las deficiencias motoras en un mamífero que sufre de la enfermedad de Parkinson, consiste en la
15 administración de una cantidad efectiva de forma terapéutica del compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.

DIBUJOS

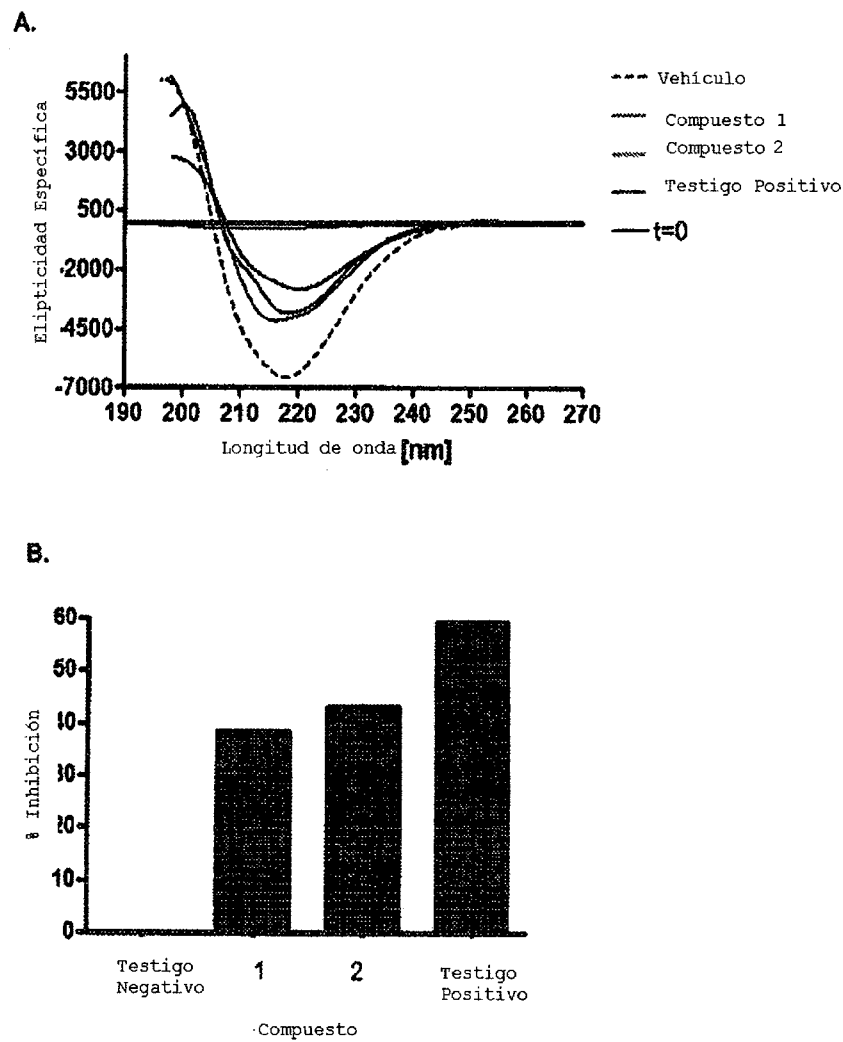


Figura 1

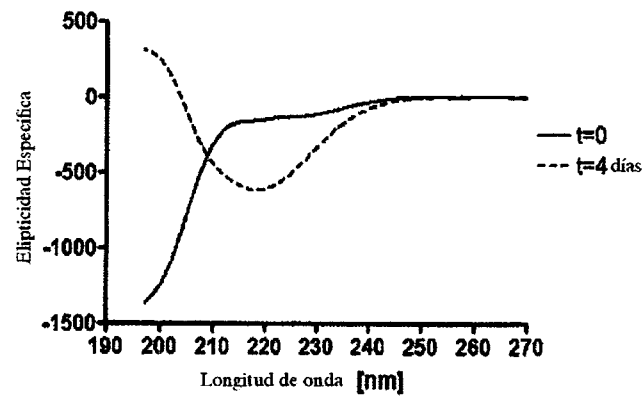
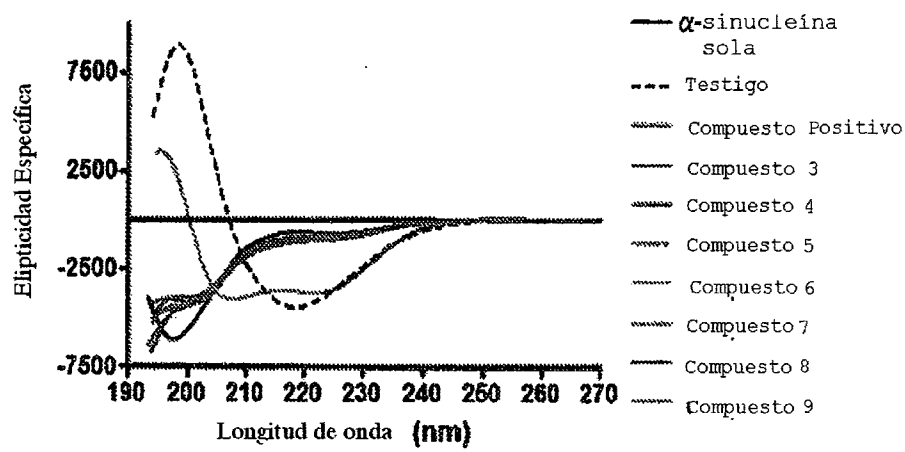


Figura 2

A.



B.

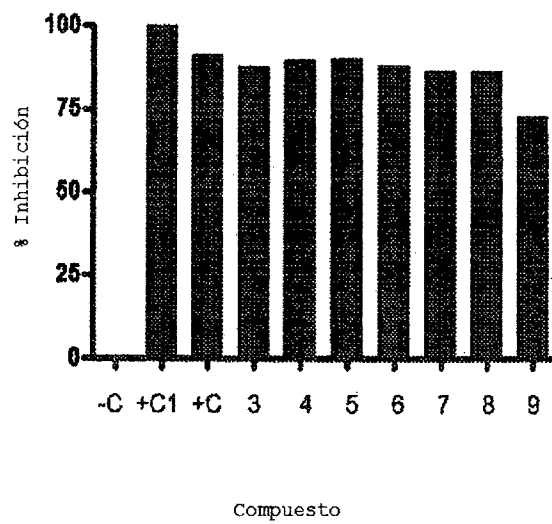
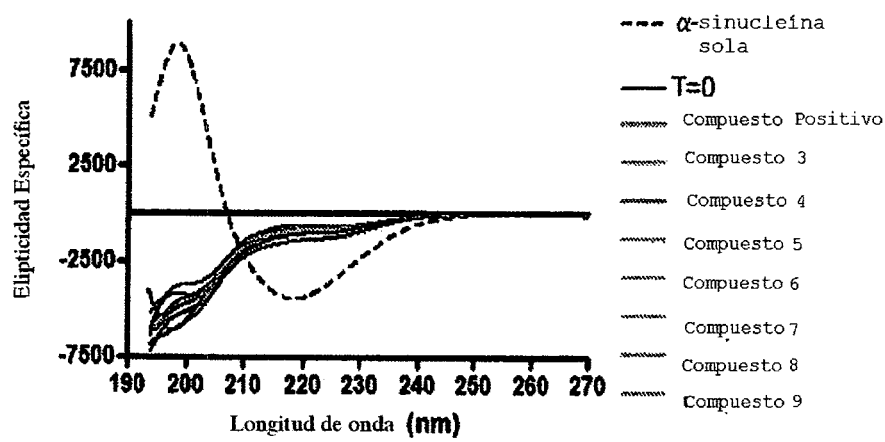


Figura 3



3.

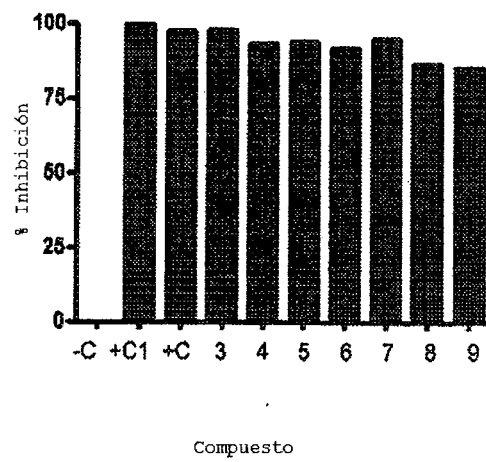


Figura 4

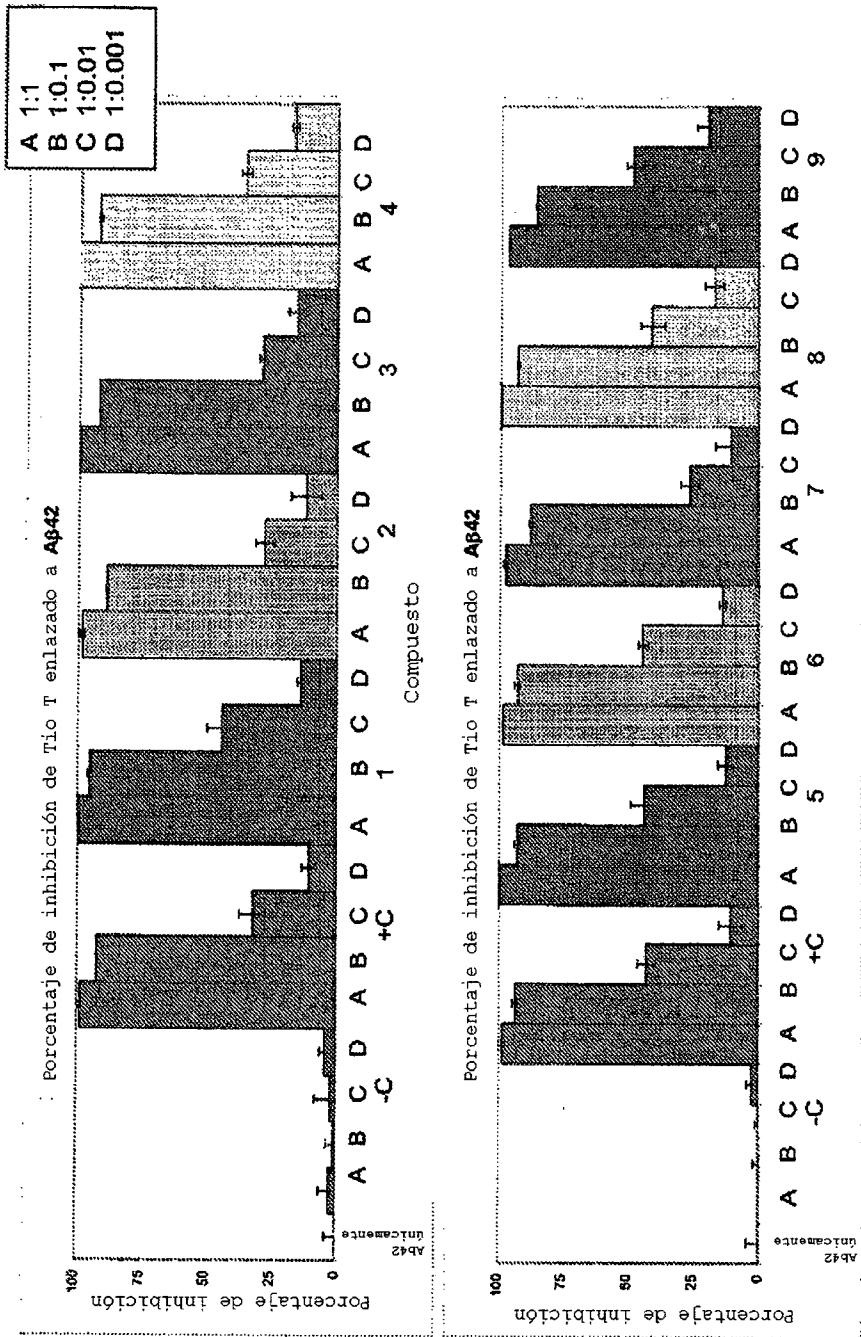


Figura 5

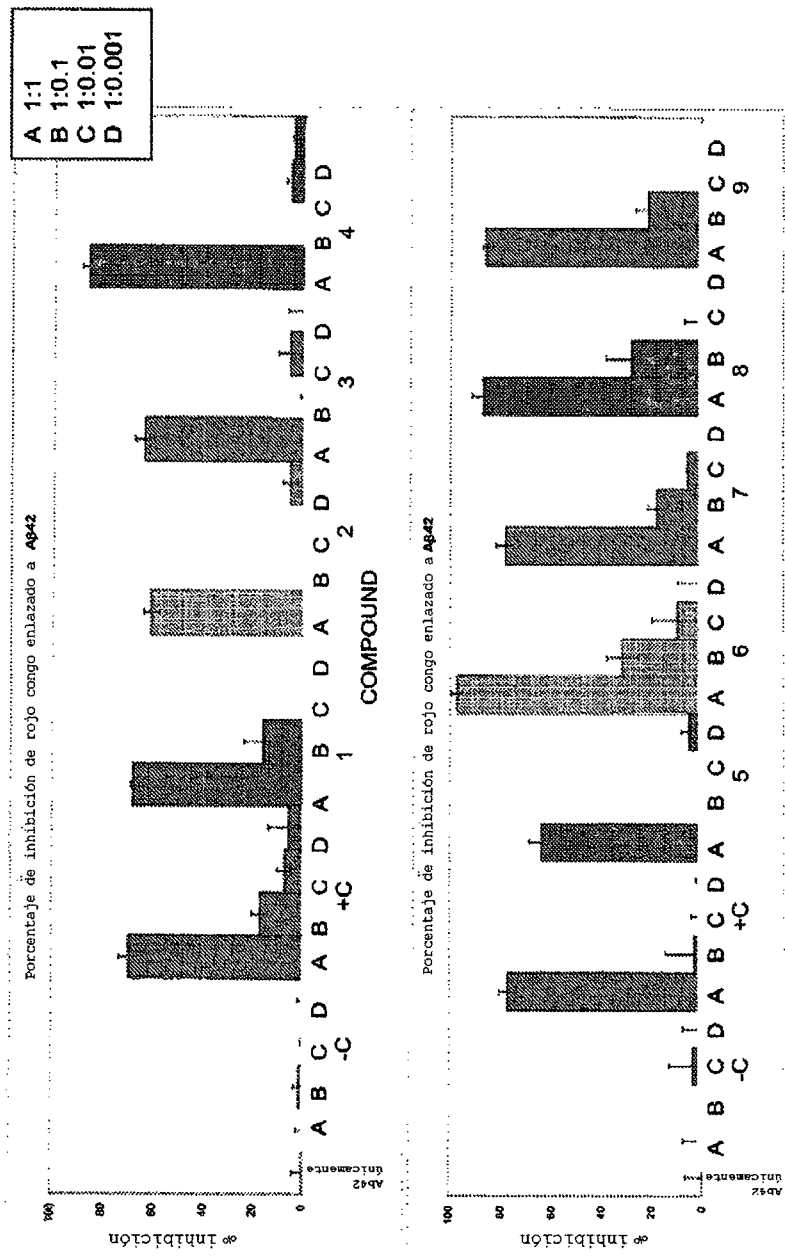
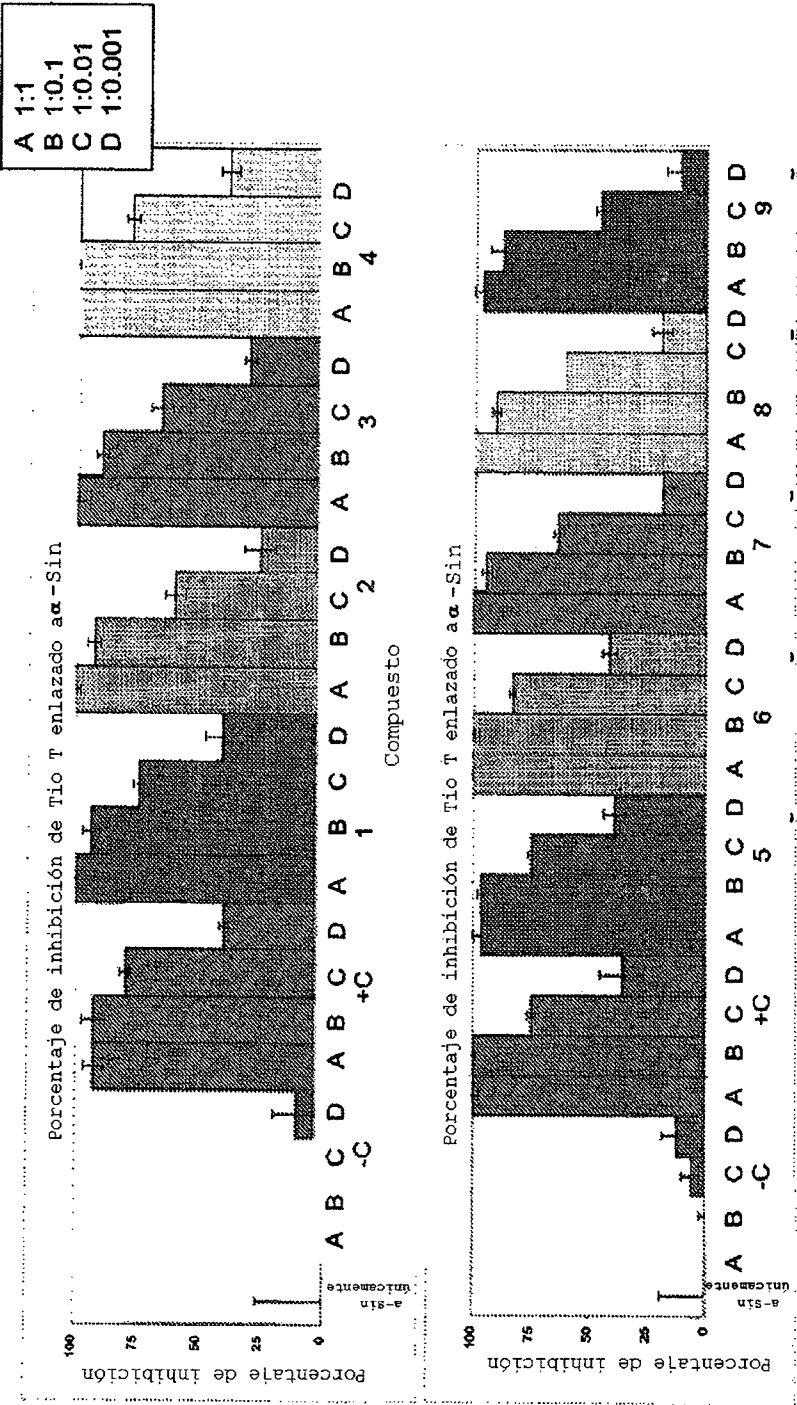


Figura 6



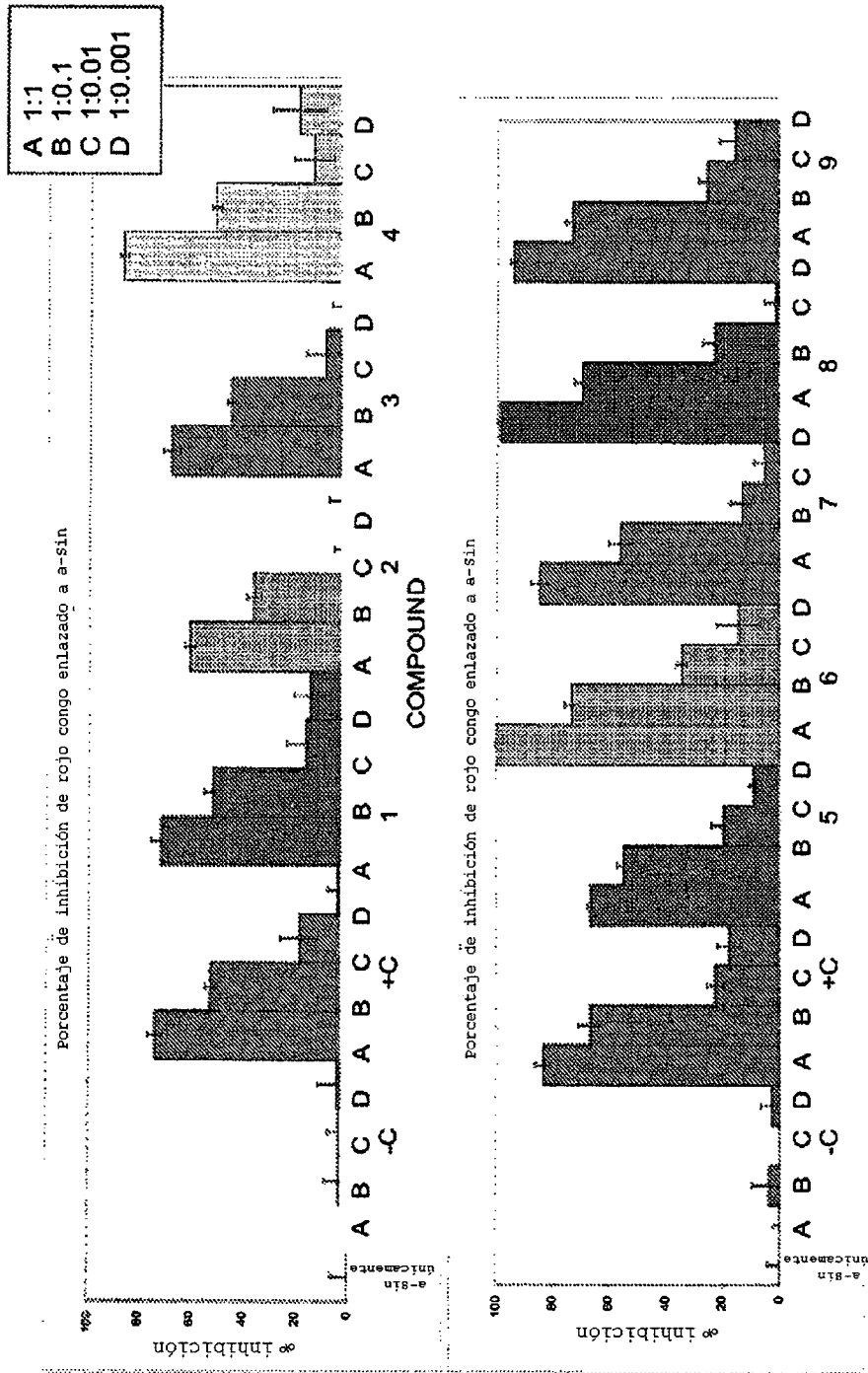


Figura 8

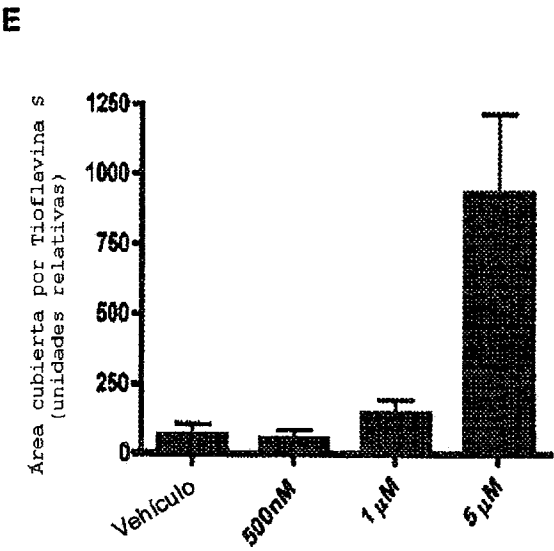
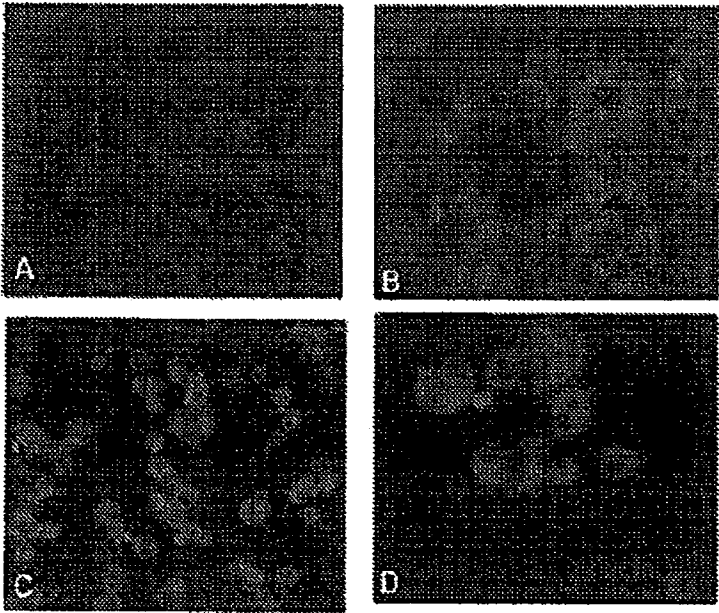


Figura 9

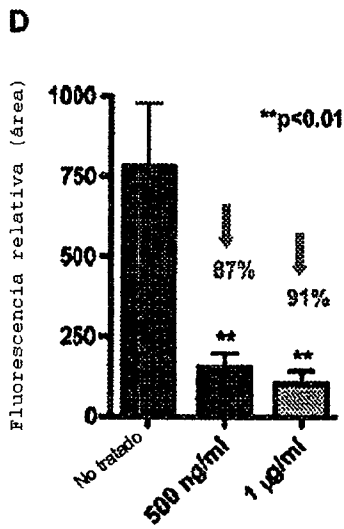
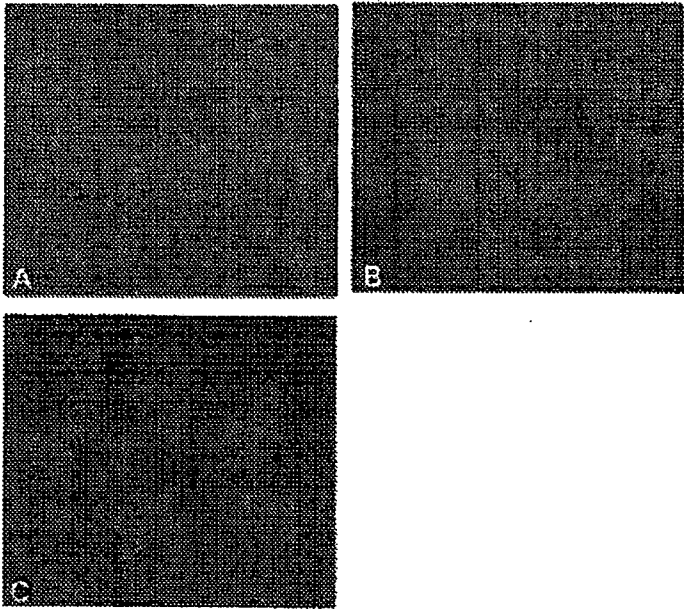


Figura 10

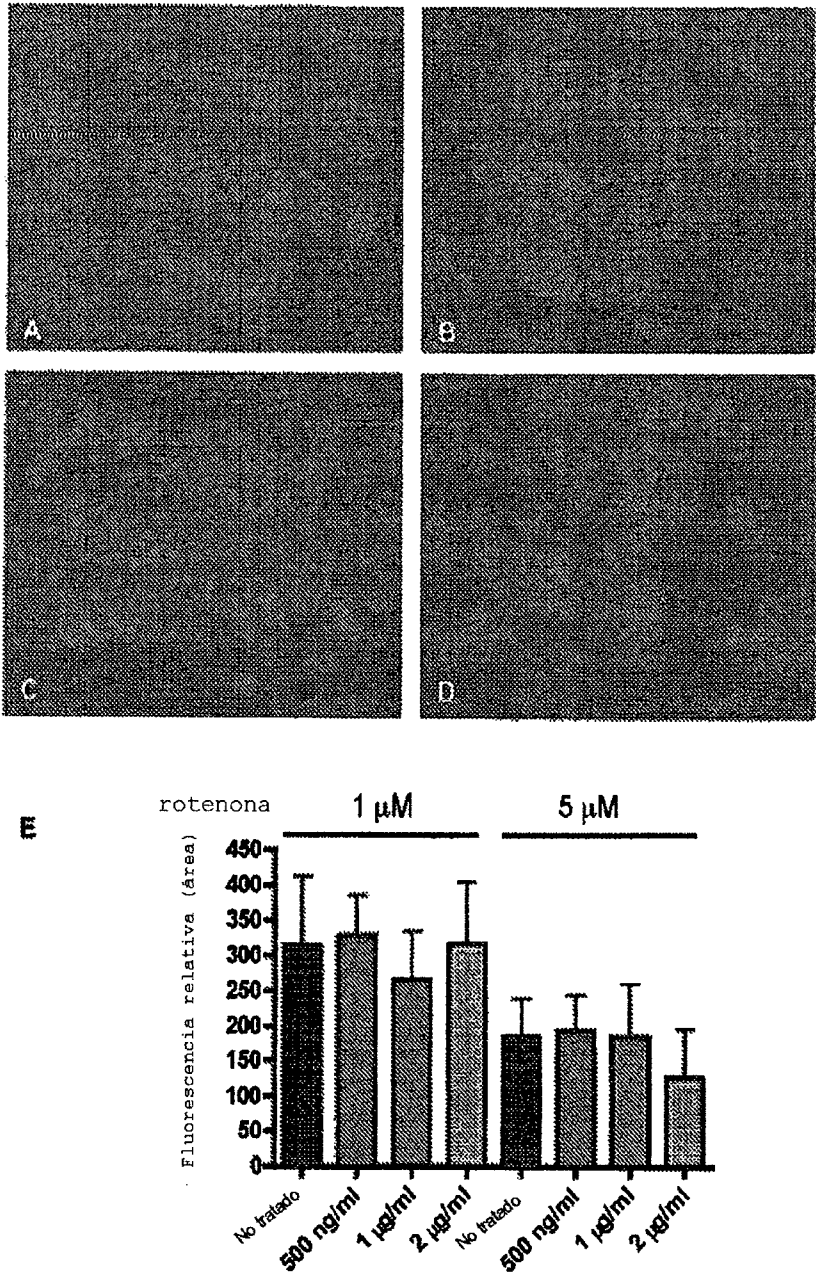


Figure 11

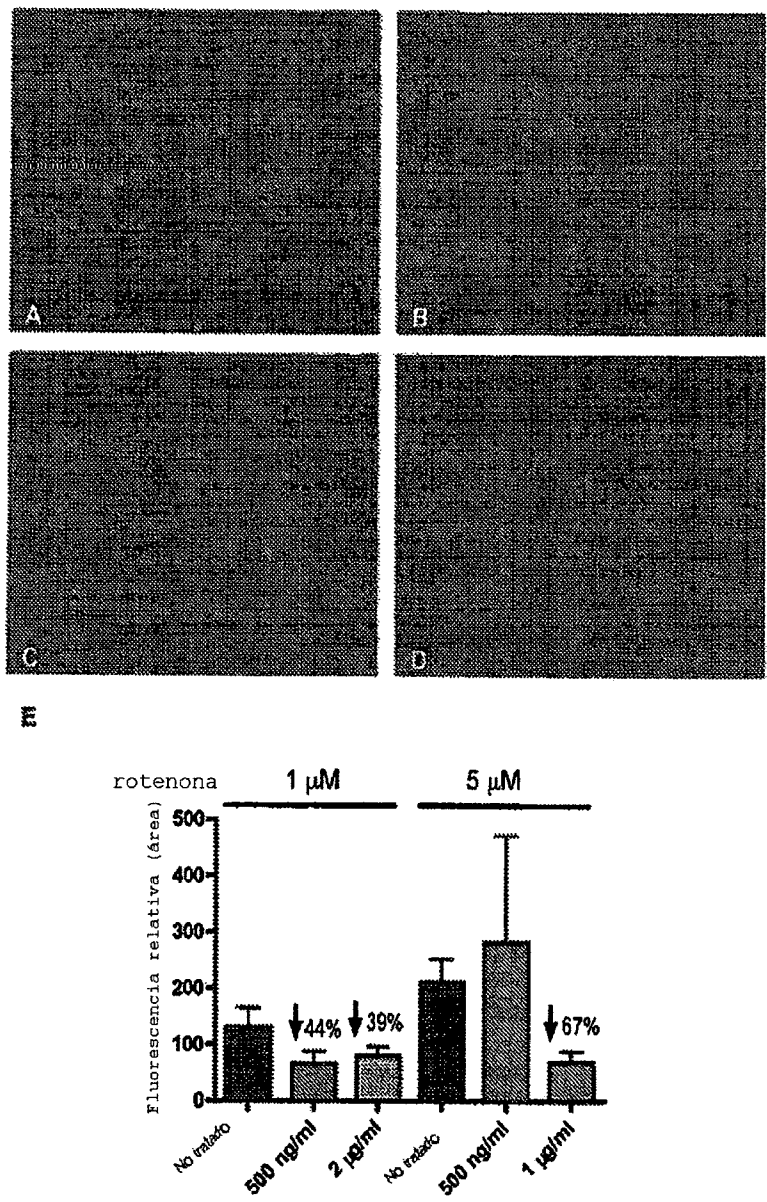


Figura 12

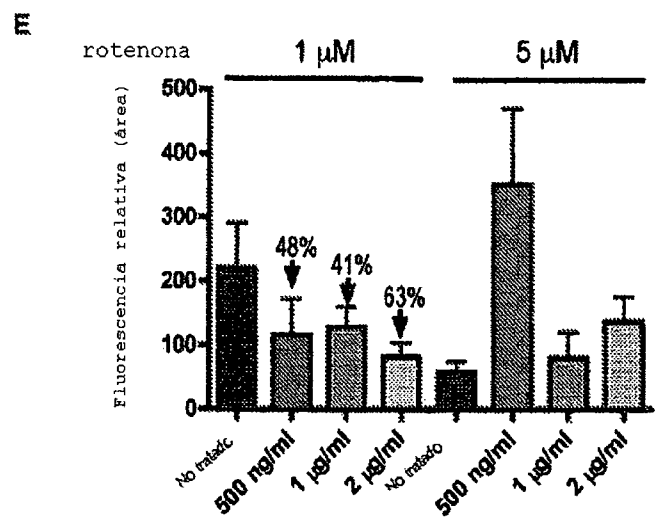
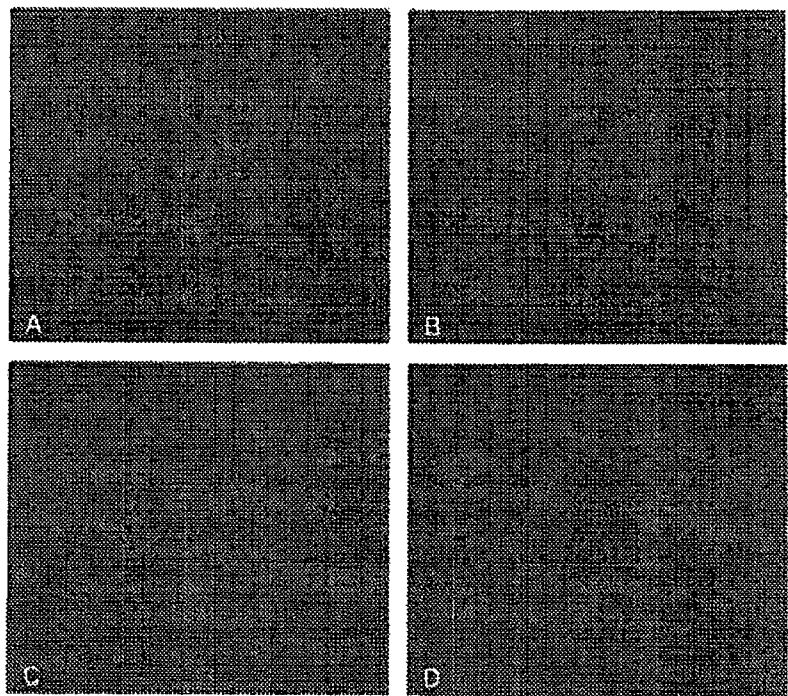


Figura 13

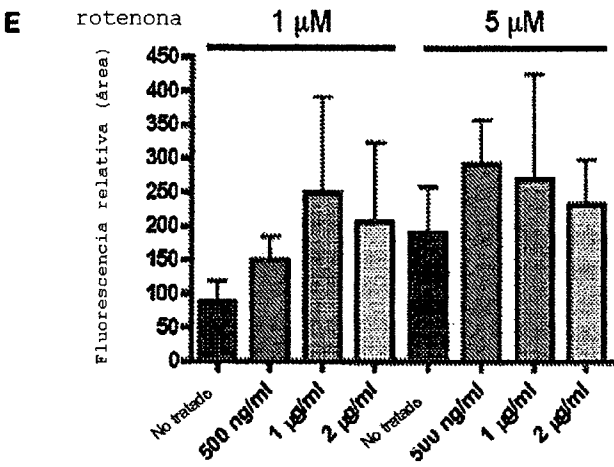
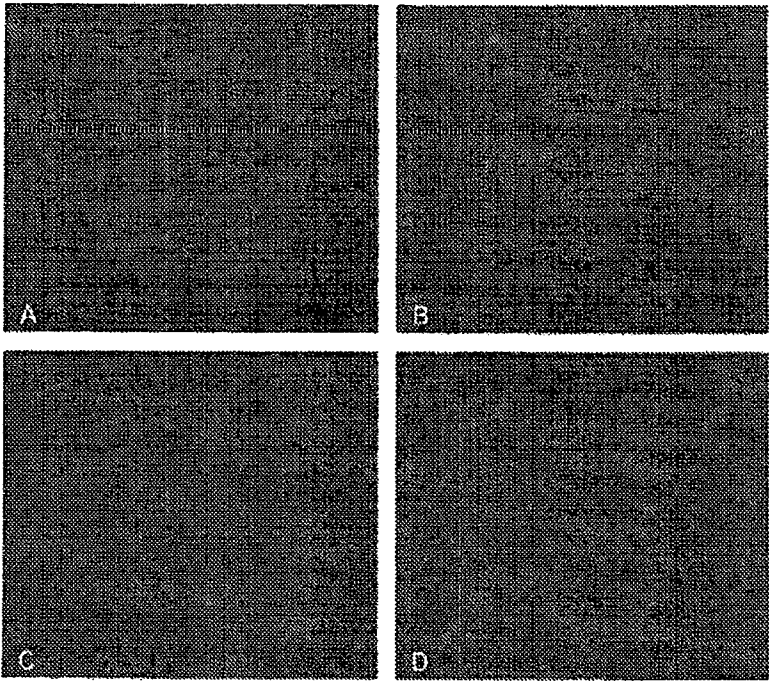


Figura 14

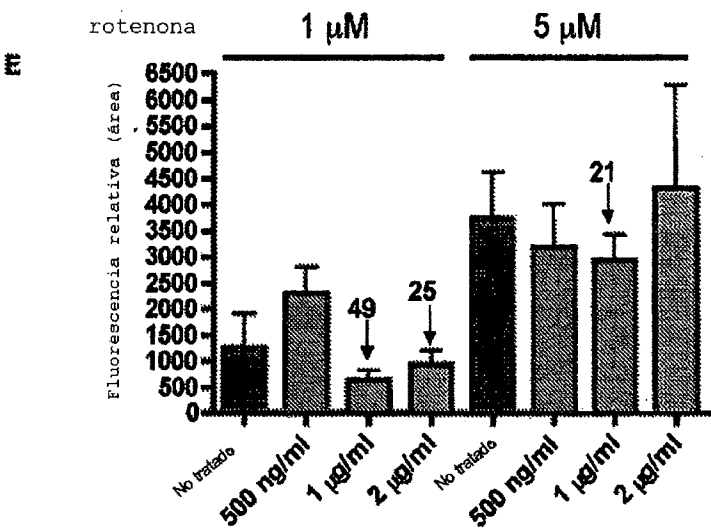
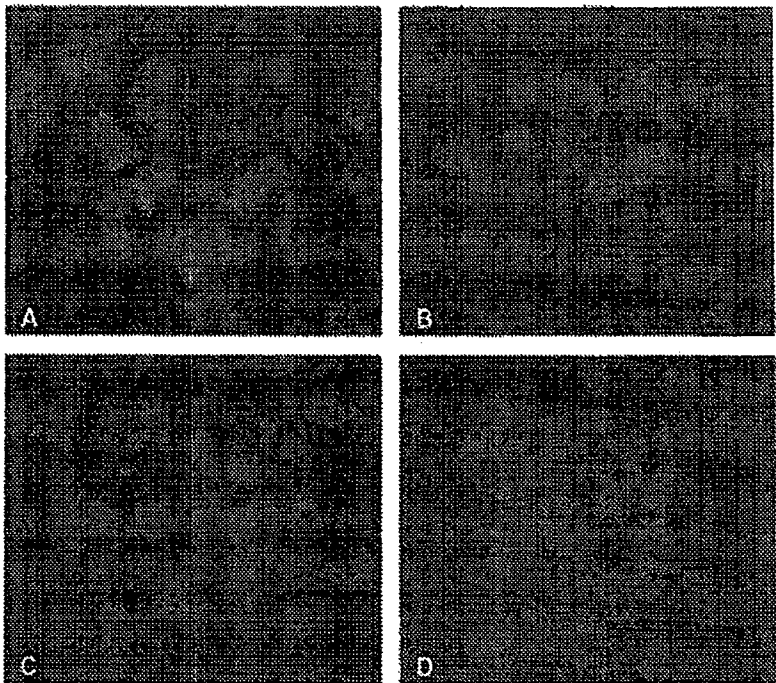


Figure 15

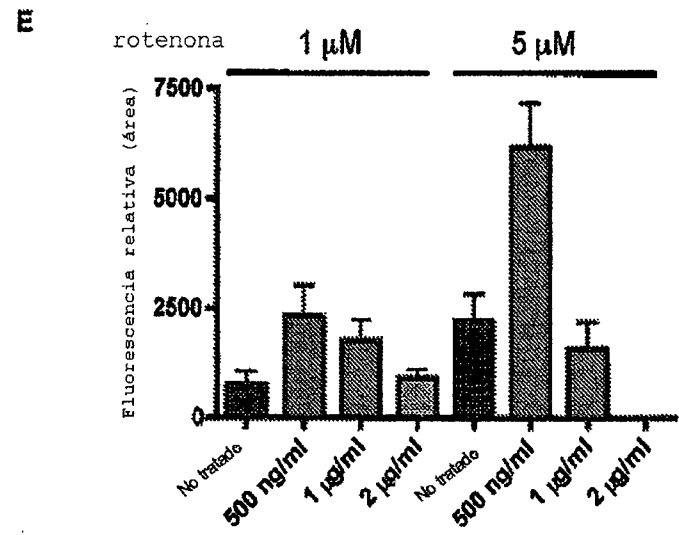
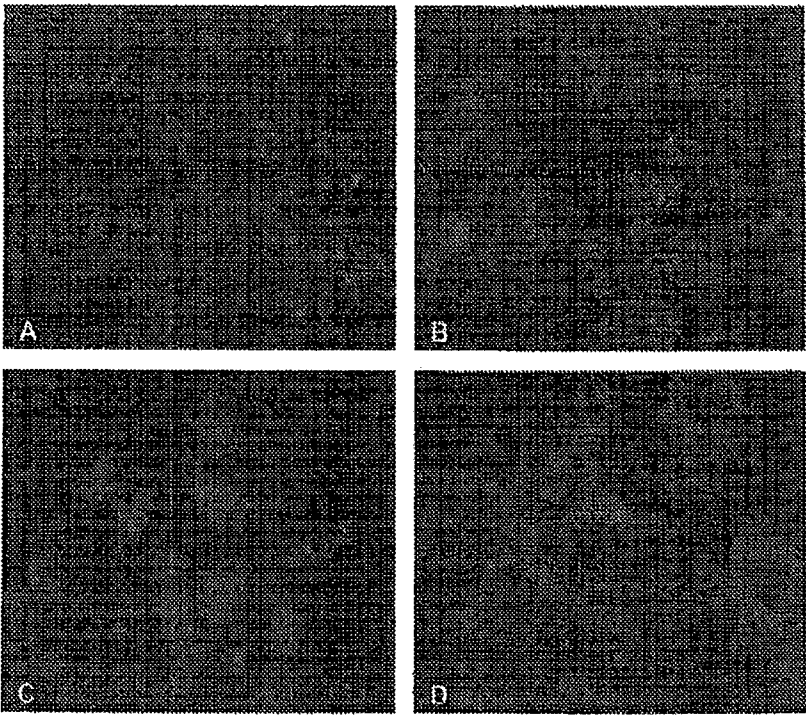


Figura 16

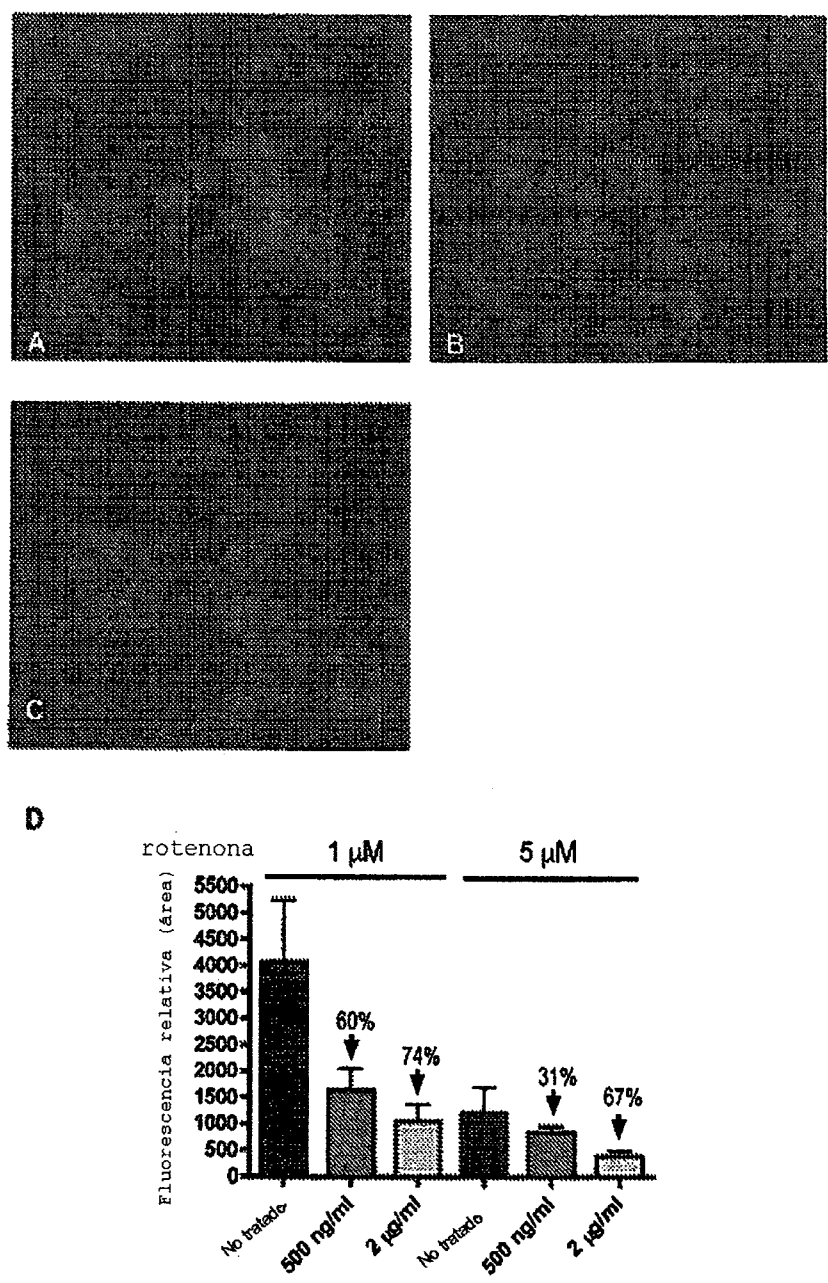


Figura 17

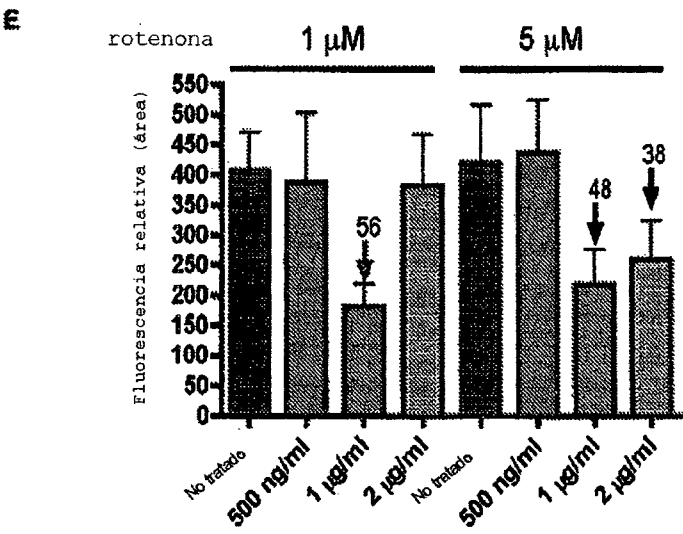
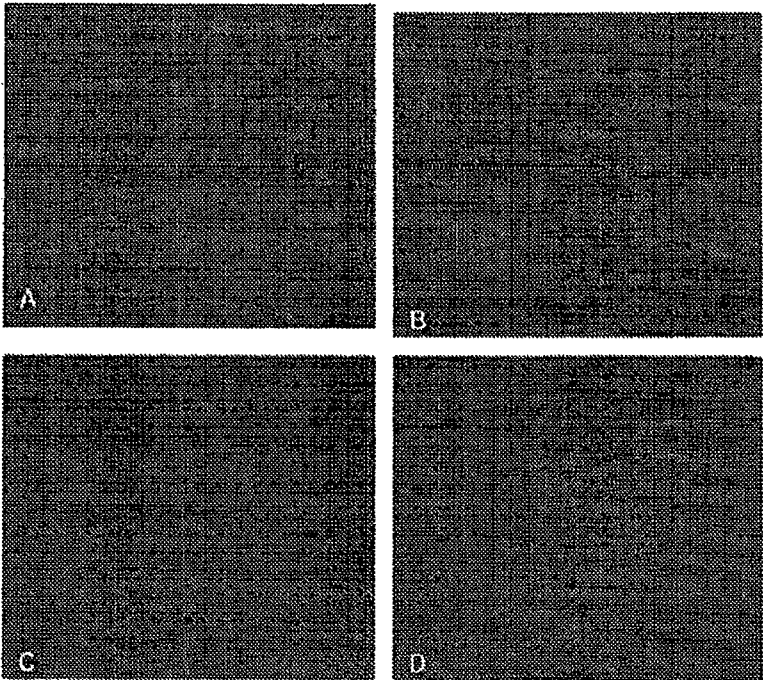


Figura 18

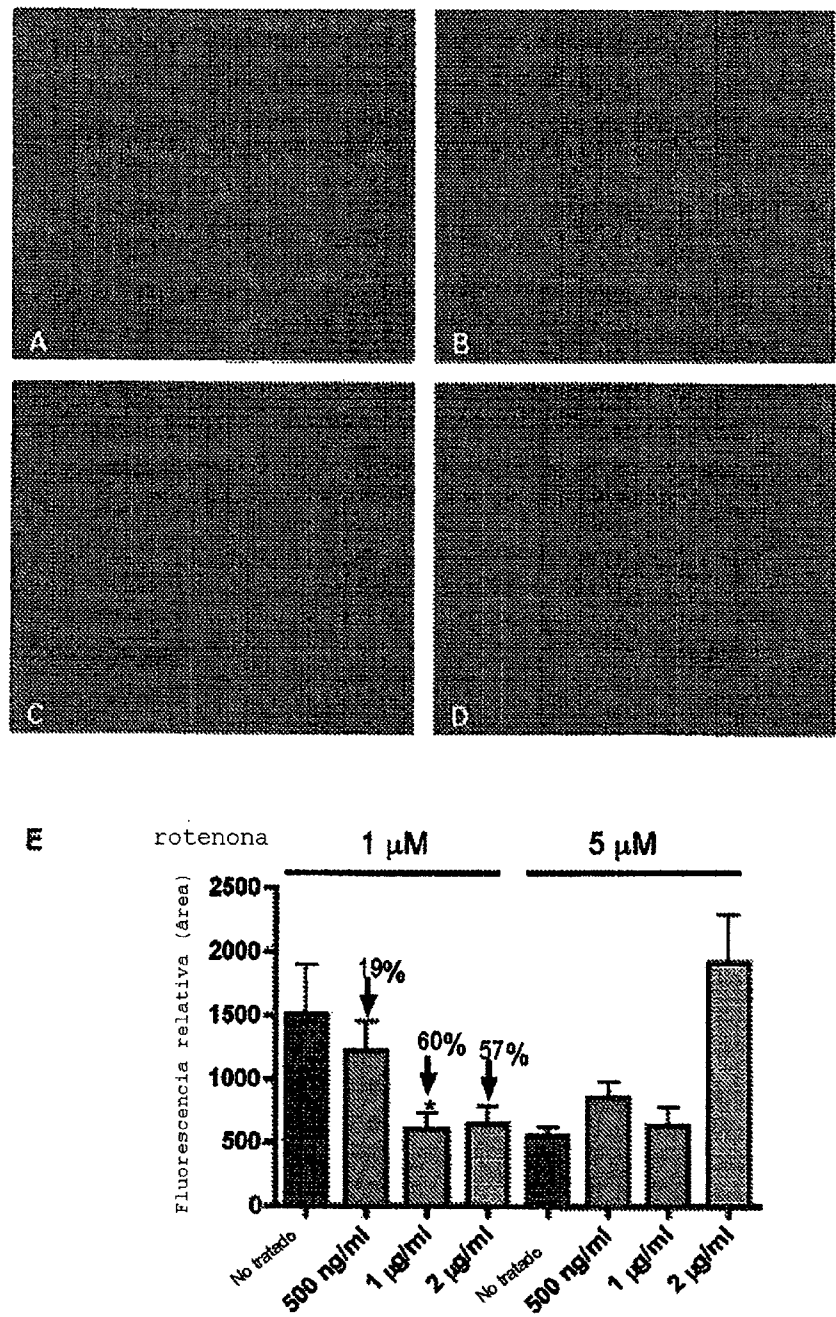


Figura 19

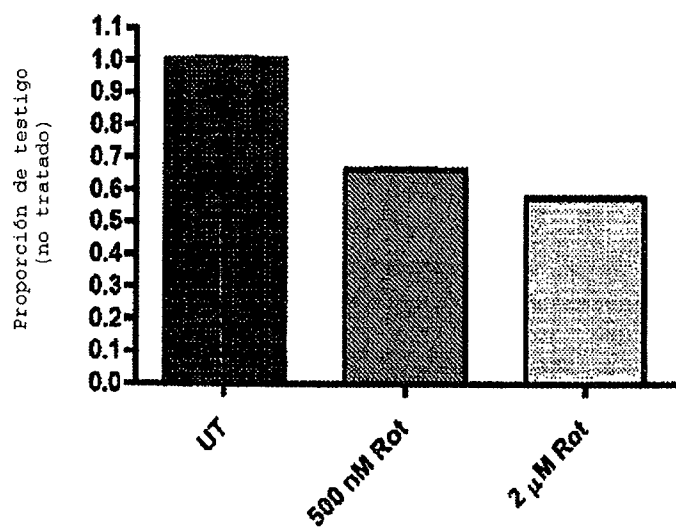


Figura 20

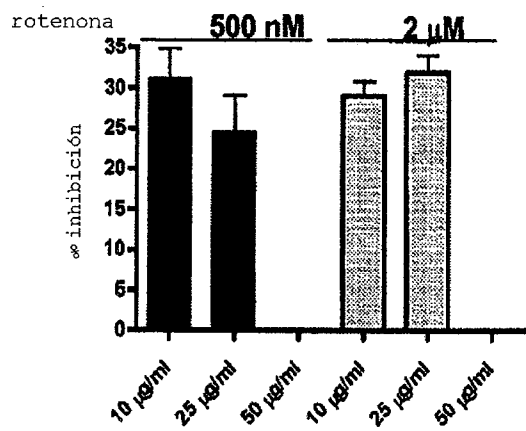


Figura 21

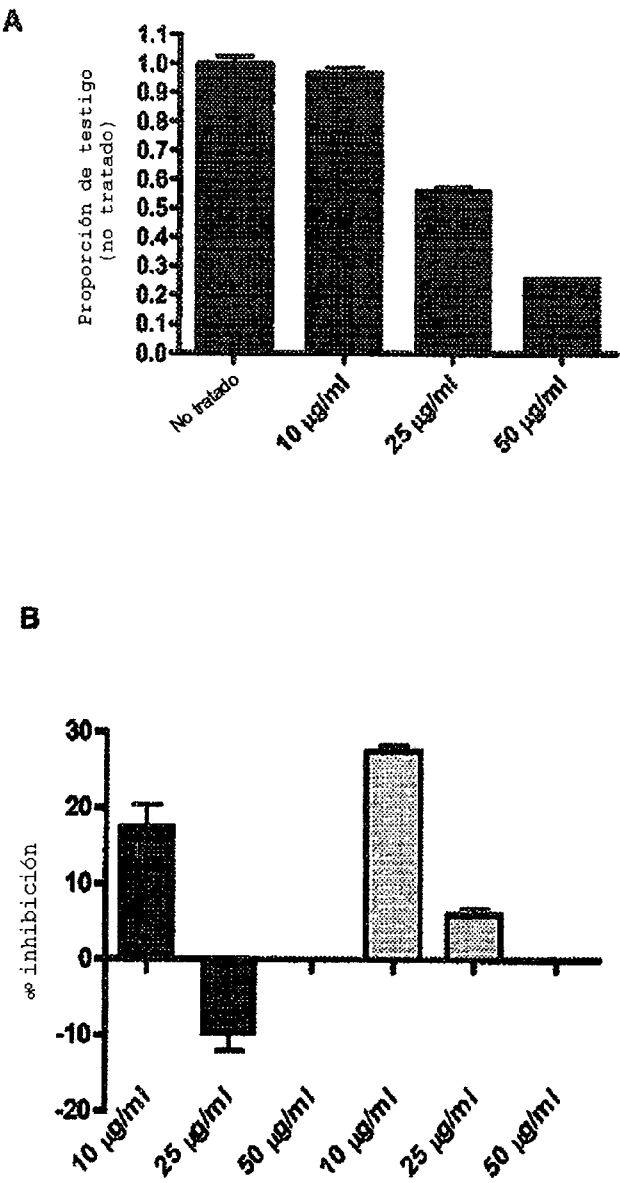
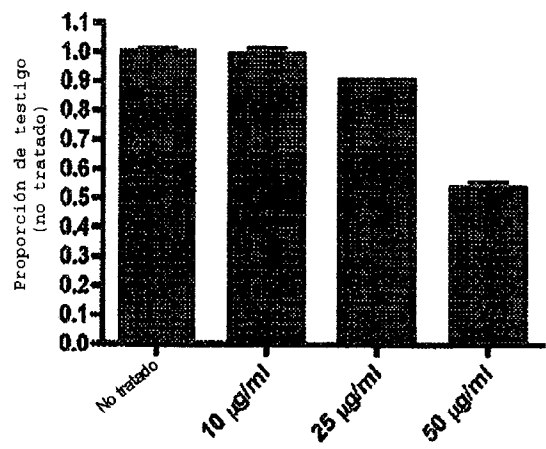


Figura 22

A



B

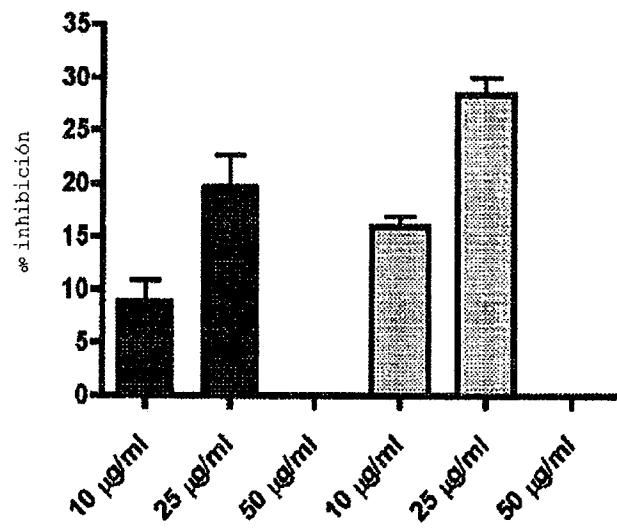


Figura 23

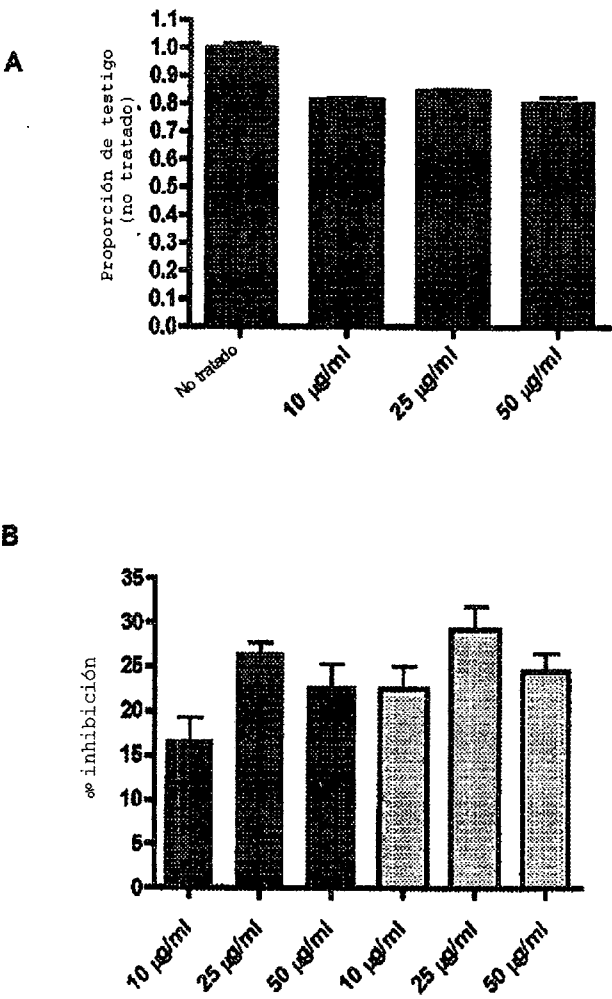
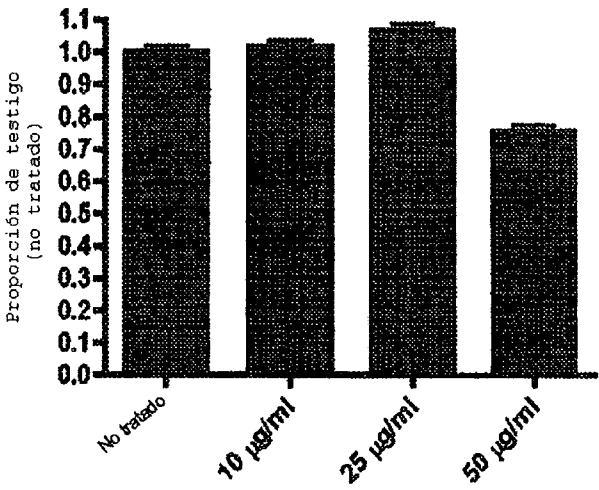


Figura 24

A



B

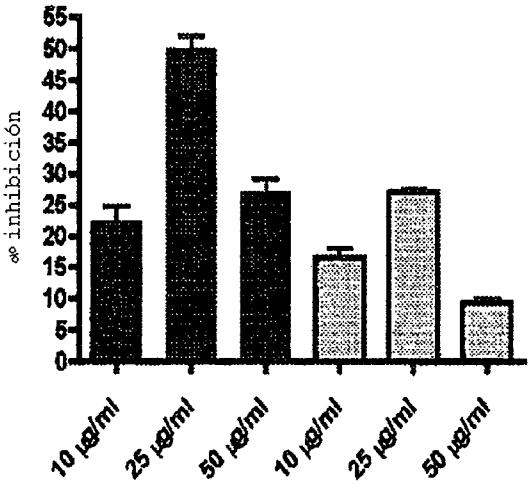
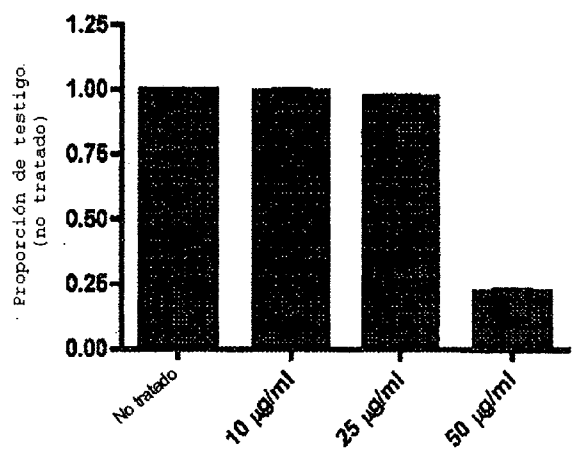


Figura 25

A



B

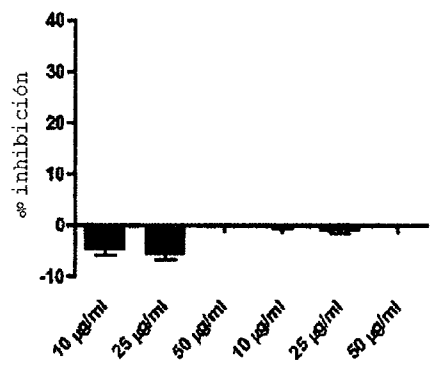


Figura 26

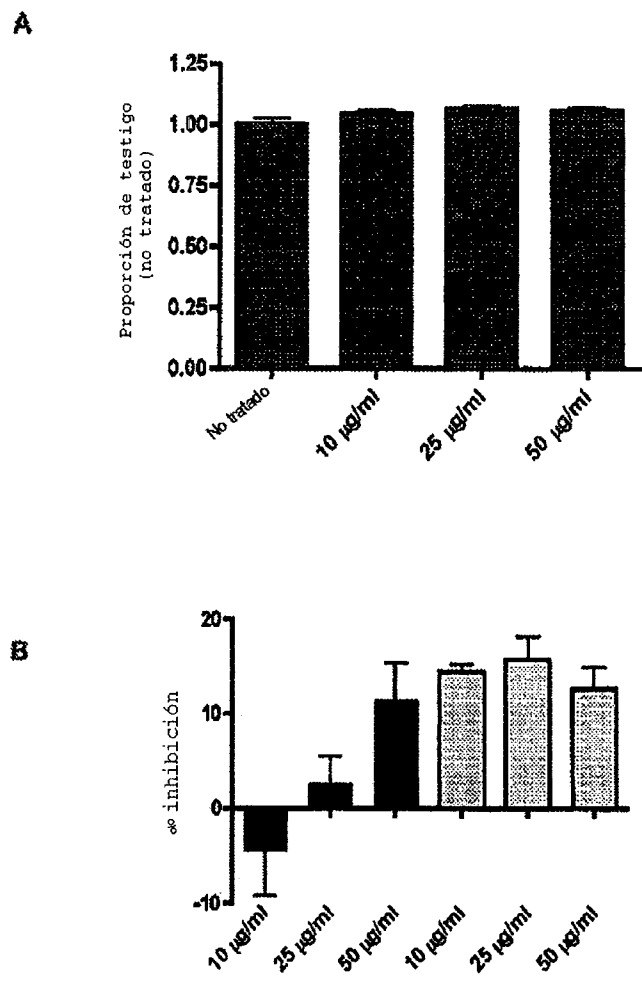


Figura 27

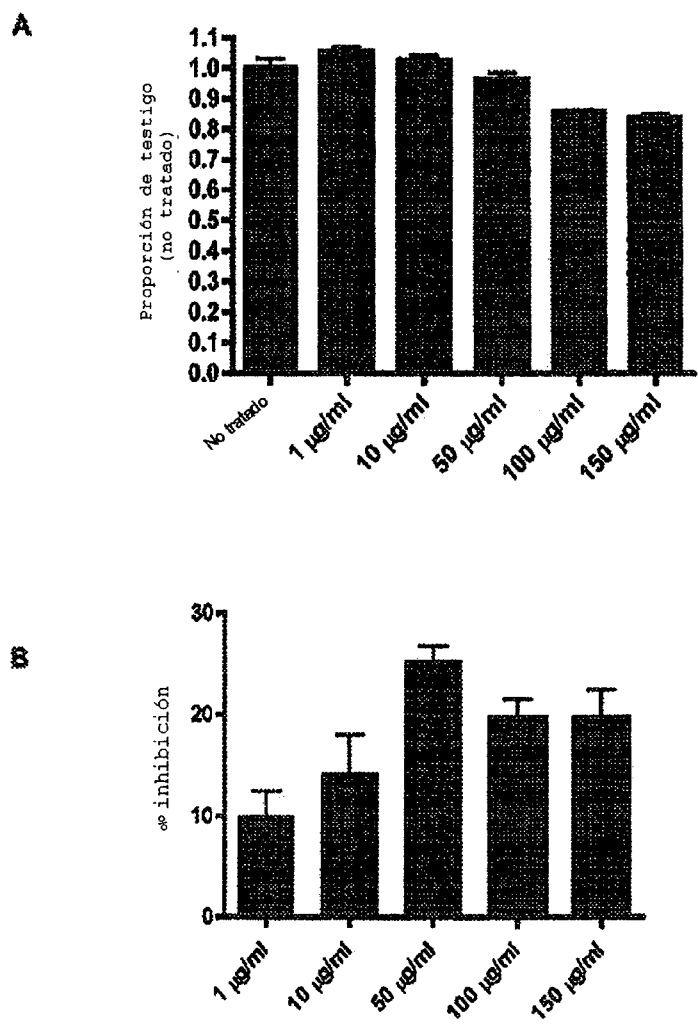


Figura 28

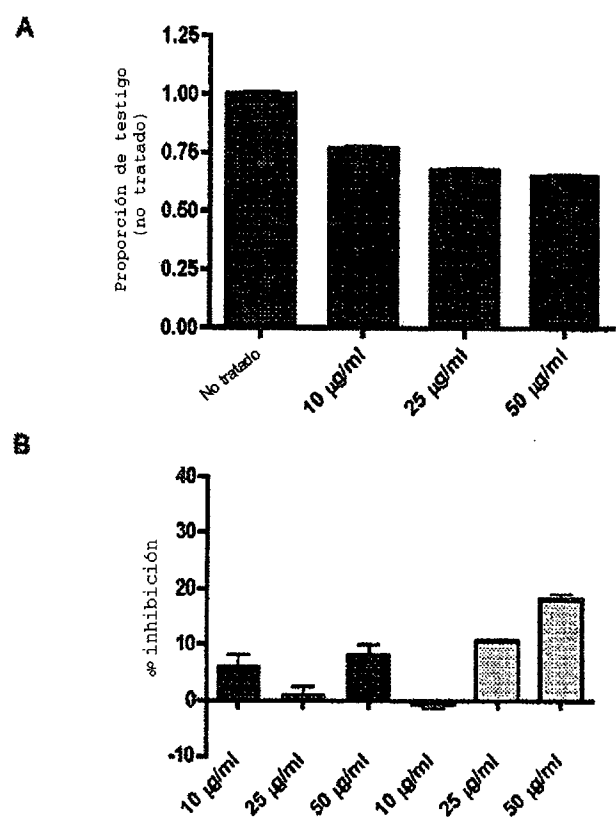


Figura 29

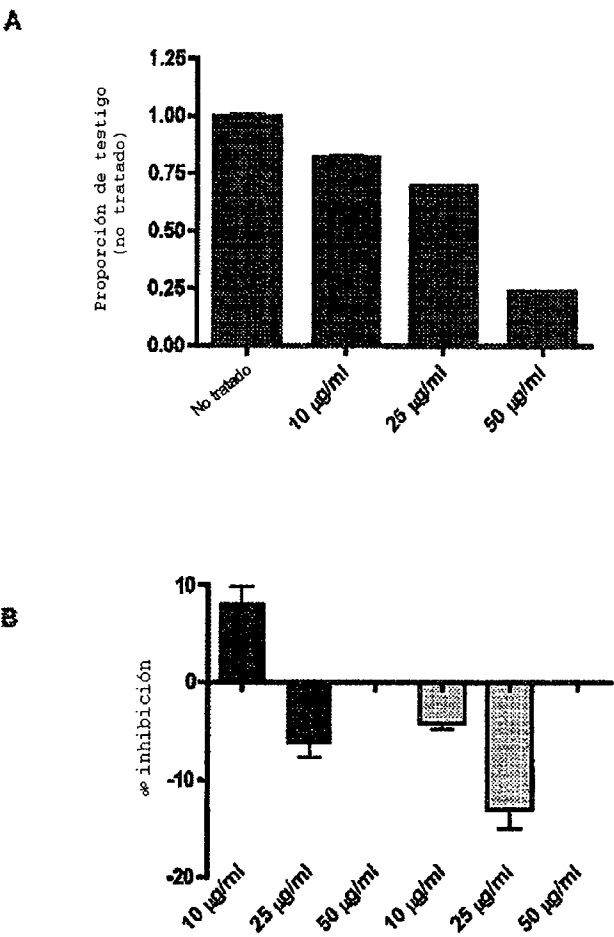


Figura 30

Figura 31

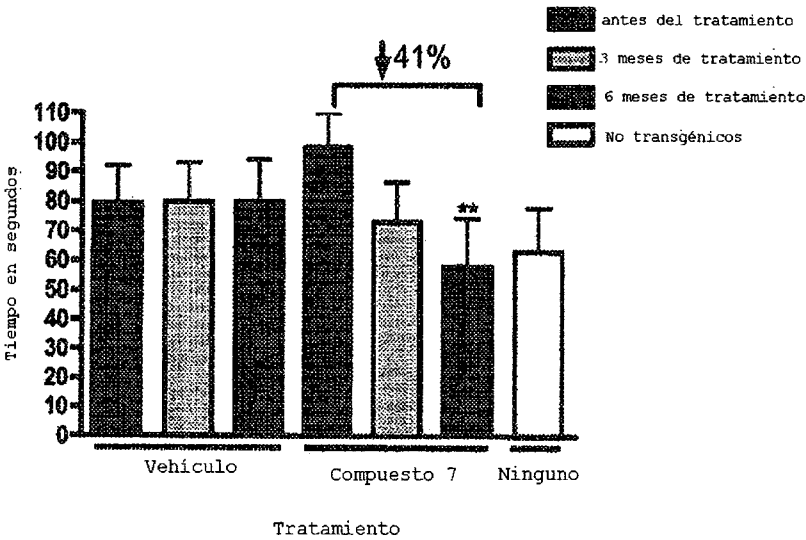
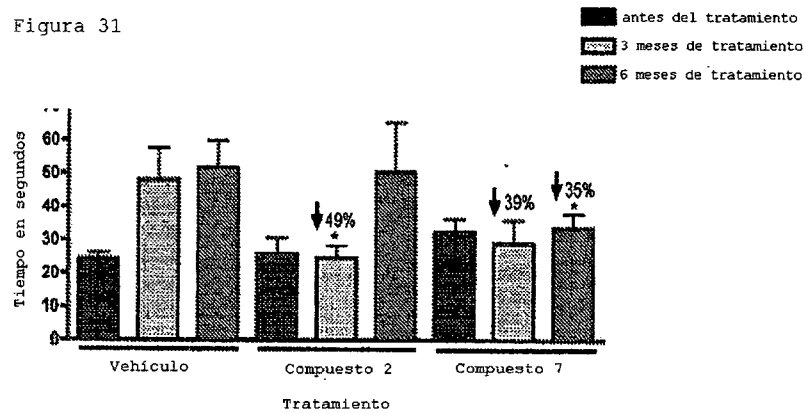


Figura 32

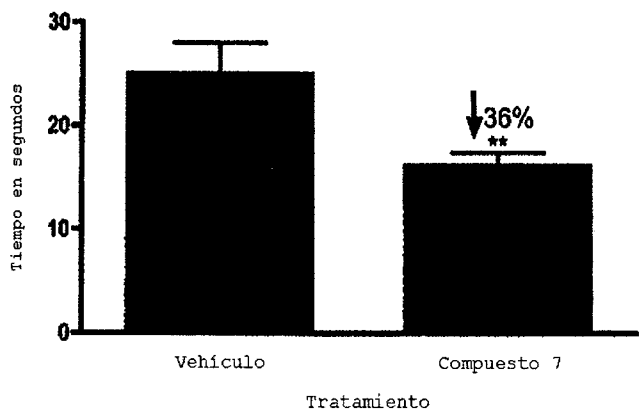


Figura 33

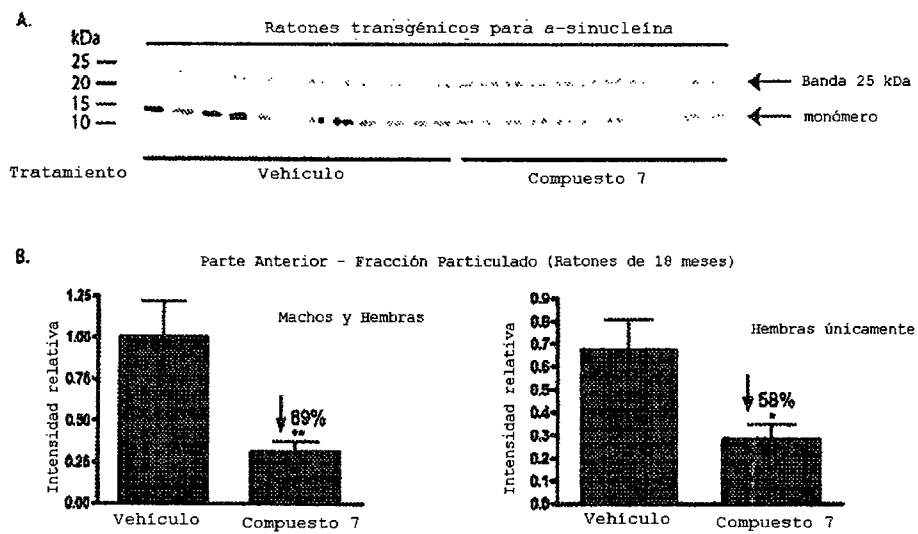
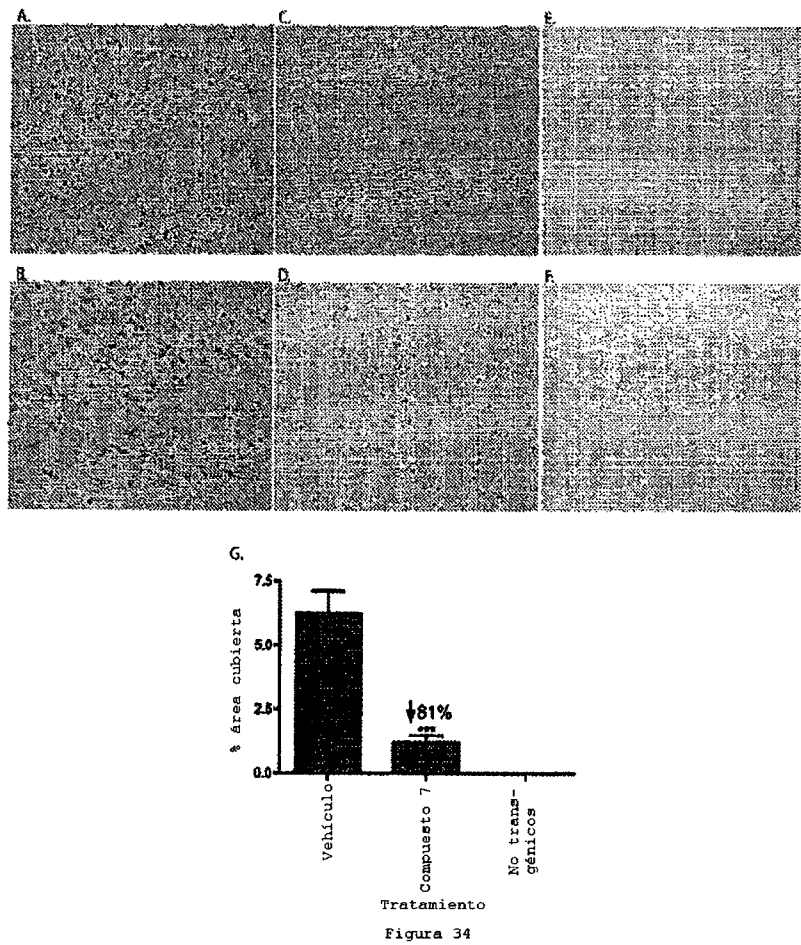


Figura 35

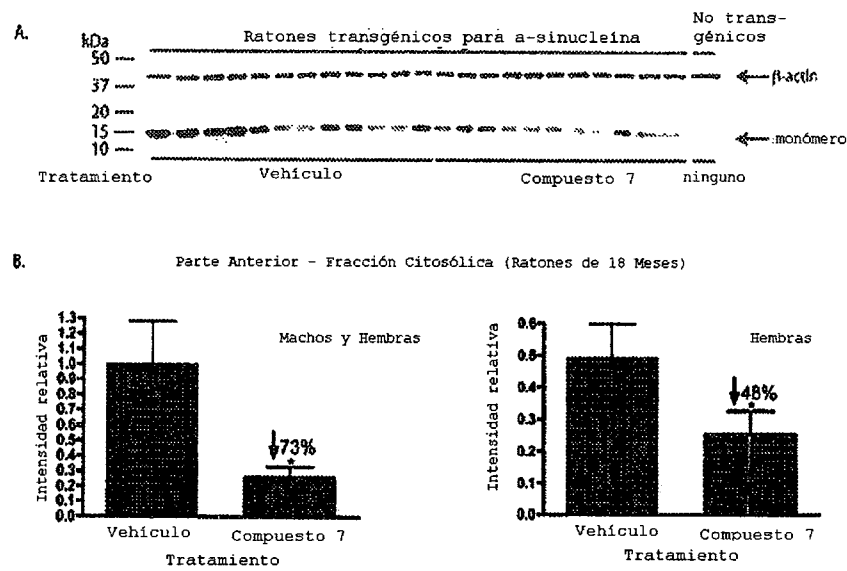


Figura 36

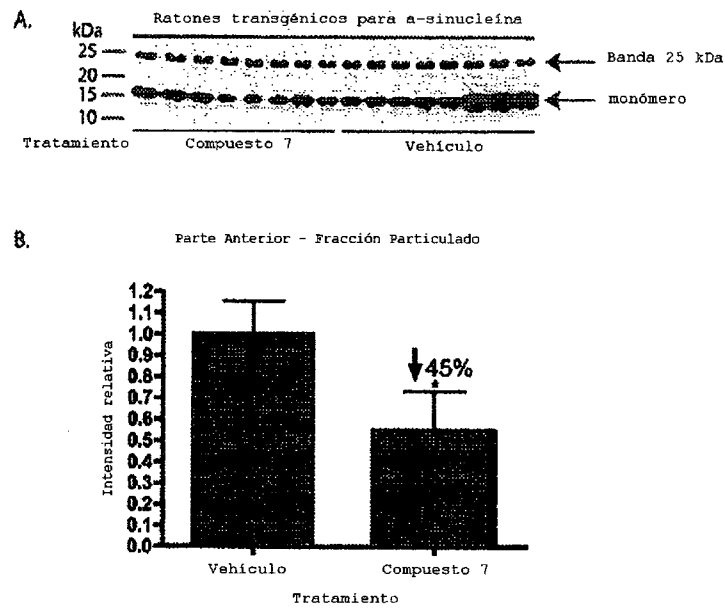


Figura 37

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
8 April 2010 (08.04.2010)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2010/039308 A1(51) International Patent Classification:
A01N 47/28 (2006.01)

(74) Agent: EAGEN, Rebecca; 12040 115th Ave NE, Kirkland, WA 98034-6931 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2009/048855

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date:
26 June 2009 (26.06.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
12/244,968 3 October 2008 (03.10.2008) US

(71) Applicant (for all designated States except US): PROTEOTECH INC. [US/US]; 12040 115th Ave NE, Kirkland, WA 98034-6931 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ESPOSITO, Luke, A. [US/US]; 845 Bellevue PI E. Apt 105, Seattle, WA 98102 (US). HUDSON, F., Michael [US/US]; 221 13th Ave. E. Apt. 404, Seattle, WA 98102 (US). LAKE, Thomas [US/US]; 7732 Interurban Boulevard, Snohomish, WA 98296 (US). CUMMINGS, Joel [US/US]; 9726 - 49th Ave NE, Seattle, WA 98115 (US). WEIGELE, Manfred [DE/US]; 6 Canal Park #601, Cambridge, MA 02141 (US). SNOW, Alan, D. [US/US]; 3812 167th PI. SW, Lynnwood, WA 98037 (US). LARSEN, Lesley [NZ/NZ]; 24 Fairview Terrace, Sawyers Bay, Dunedin, 9001 (NZ).

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: COMPOUNDS, COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF β -AMYLOID DISEASES AND SYNUCLEINOPATHIES(57) Abstract: Dihydroxyaryl compounds and pharmaceutically acceptable esters, their synthesis, pharmaceutical compositions containing them, and their use in the treatment of β -amyloid diseases, such as observed in Alzheimer's disease, and synucleinopathies, such as observed in Parkinson's disease, and the manufacture of medicaments for such treatment.

WO 2010/039308 A1

COMPOUNDS, COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF β-AMYLOID DISEASES AND SYNUCLEINOPATHIES

RELATED APPLICATIONS

This application claims priority to U.S. application Serial No. 12/244,968, entitled "Compounds, Compositions and Methods for the Treatment of β-Amyloid Diseases and Synucleinopathies" to Esposito *et al.*, filed October 3, 2008.

TECHNICAL FIELD

This invention relates to bis-dihydroxyaryl compounds and pharmaceutically acceptable salts, their synthesis, pharmaceutical compositions containing them, and their use in the treatment of Aβ amyloid disease, such as observed in Alzheimer's disease, and synucleinopathies, such as observed in Parkinson's disease, and in the manufacture of medicaments for such treatment.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Alzheimer's disease is characterized by the accumulation of a 39-43 amino acid peptide termed the β-amyloid protein or Aβ, in a fibrillar form, existing as aggregates in extracellular amyloid plaques and as amyloid within the walls of cerebral blood vessels. Fibrillar Aβ amyloid aggregate deposition in Alzheimer's disease is believed to be detrimental to the patient and eventually leads to toxicity and neuronal cell death, characteristic hallmarks of Alzheimer's disease. Accumulating evidence implicates amyloid, and more specifically, the formation, deposition, accumulation and/or persistence of Aβ aggregates, as a major causative factor of Alzheimer's disease pathogenesis. In addition, besides Alzheimer's disease, a number of other amyloid diseases involve formation, deposition, accumulation and persistence of Aβ aggregates, including Down's syndrome, disorders involving congophilic angiopathy, such as but not limited to, hereditary cerebral hemorrhage of the Dutch type, and cerebral β-amyloid angiopathy.

Parkinson's disease is another human disorder characterized by the formation, deposition, accumulation, aggregation and/or persistence of abnormal fibrillar protein deposits that demonstrate many of the characteristics of amyloid. In Parkinson's disease, an accumulation of cytoplasmic Lewy bodies consisting of aggregates of filaments of α-synuclein are believed important in the pathogenesis and as therapeutic targets. New agents or compounds able to inhibit

α -synuclein formation, deposition, accumulation, aggregation and/or persistence, or disrupt pre-formed α -synuclein fibrils or aggregates (or portions thereof) are regarded as potential therapeutics for the treatment of Parkinson's and related synucleinopathies. A 35 amino acid fragment of α -synuclein that has the ability to form amyloid-like fibrils or aggregates either *in vitro* or as observed in the brains of patients with Parkinson's disease. The fragment of α -synuclein is a relative important therapeutic target as this portion of α -synuclein is believed crucial for formation of Lewy bodies as observed in all patients with Parkinson's disease, synucleinopathies and related disorders. In addition, the α -synuclein protein which forms fibrils or aggregates, and is Congo red and Thioflavin S positive (specific stains used to detect amyloid fibrillar aggregates), is found as part of Lewy bodies in the brains of patients with Parkinson's disease, Lewy body disease (Lewy in *Handbuch der Neurologie*, M. Lewandowski, ed., Springer, Berlin pp. 920-933, 1912; Pollanen et al, *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 52:183-191, 1993; Spillantini et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6469-6473, 1998; Arai et al, *Neurosci. Lett.* 259:83-86, 1999), multiple system atrophy (Wakabayashi et al, *Acta Neuropath.* 96:445-452, 1998), dementia with Lewy bodies, and the Lewy body variant of Alzheimer's disease. In Parkinson's disease, aggregates develop in the brains of patients with this disease which are Congo red and Thioflavin S positive, and which contain predominant beta-pleated sheet secondary structure.

Amyloid as a therapeutic target for Alzheimer's disease

Alzheimer's disease also puts a heavy economic burden on society. A recent study estimated that the cost of caring for one Alzheimer's disease patient with severe cognitive impairments at home or in a nursing home, is more than \$47,000 per year (*A Guide to Understanding Alzheimer's Disease and Related Disorders*). For a disease that can span from 2 to 20 years, the overall cost of Alzheimer's disease to families and to society is staggering. The annual economic toll of Alzheimer's disease in the United States in terms of health care expenses and lost wages of both patients and their caregivers is estimated at \$80 to \$100 billion (2003 *Progress Report on Alzheimer's Disease*).

Tacrine hydrochloride ("Cognex"), the first FDA approved drug for Alzheimer's disease, is a acetylcholinesterase inhibitor (Cutler and Sramek, *N. Engl. J. Med.* 328:808 810, 1993). However, this drug has showed limited success in producing cognitive improvement in

Alzheimer's disease patients and initially had major side effects such as liver toxicity. The second FDA approved drug, donepezil ("Aricept"), which is also an acetylcholinesterase inhibitor, is more effective than tacrine, by demonstrating slight cognitive improvement in Alzheimer's disease patients (Barner and Gray, *Ann. Pharmacotherapy* 32:70-77, 1998; Rogers and Friedhoff, *Eur. Neuropsych.* 8:67-75, 1998), but is not believed to be a cure. Therefore, it is clear that there is a need for more effective treatments for Alzheimer's disease patients.

Alzheimer's disease is characterized by the deposition and accumulation of a 39-43 amino acid peptide termed the beta-amyloid protein, A β or β /A4 (Glennner and Wong, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 120:885-890, 1984; Masters et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4245-4249, 1985; Husby et al., *Bull. WHO* 71:105-108, 1993). A β is derived by protease cleavage from larger precursor proteins termed β -amyloid precursor proteins (APPs) of which there are several alternatively spliced variants. The most abundant forms of the APPs include proteins consisting of 695, 751 and 770 amino acids (Tanzi et al., *Nature* 31:528-530, 1988).

The small A β peptide is a major component that makes up the amyloid deposits of "plaques" in the brains of patients with Alzheimer's disease. In addition, Alzheimer's disease is characterized by the presence of numerous neurofibrillary "tangles", consisting of paired helical filaments which abnormally accumulate in the neuronal cytoplasm (Grundke-Iqbal et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4913-4917, 1986; Kosik et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4044-4048, 1986; Lee et al., *Science* 251:675-678, 1991). The pathological hallmark of Alzheimer's disease is therefore the presence of "plaques" and "tangles", with β -amyloid being deposited in the central core of the plaques. The other major type of lesion found in the Alzheimer's disease brain is the accumulation of β -amyloid in the walls of blood vessels, both within the brain parenchyma and in the walls of meningeal vessels that lie outside the brain. The β -amyloid deposits localized to the walls of blood vessels are referred to as cerebrovascular amyloid or congophilic angiopathy (Mandybur, *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 45:79-90, 1986; Pardridge et al., *J. Neurochem.* 49:1394-1401, 1987).

For many years there has been an ongoing scientific debate as to the importance of " β -amyloid" in Alzheimer's disease, and whether the "plaques" and "tangles" characteristic of this disease were a cause or merely a consequence of the disease. Within the last few years, studies now indicate that β -amyloid is indeed a causative factor for Alzheimer's disease and should not be regarded as merely an innocent bystander. The Alzheimer's A β protein in cell culture has been

shown to cause degeneration of nerve cells within short periods of time (Pike et al., *Br. Res.* 563:311-314, 1991; *J. Neurochem.* 64:253-265, 1995). Studies suggest that it is the fibrillar structure (consisting of a predominant β -pleated sheet secondary structure), which is responsible for the neurotoxic effects. $A\beta$ has also been found to be neurotoxic in slice cultures of hippocampus (Harrigan et al., *Neurobiol. Aging* 16:779-789, 1995) and induces nerve cell death in transgenic mice (Games et al., *Nature* 373:523-527, 1995; Hsiao et al., *Science* 274:99-102, 1996). Injection of the Alzheimer's $A\beta$ into rat brain also causes memory impairment and neuronal dysfunction (Flood et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3363-3366, 1991; *Br. Res.* 663:271-276, 1994).

Probably, the most convincing evidence that $A\beta$ amyloid is directly involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease comes from genetic studies. It was discovered that the production of $A\beta$ can result from mutations in the gene encoding, its precursor, β -amyloid precursor protein (Van Broeckhoven et al., *Science* 248:1120-1122, 1990; Murrell et al., *Science* 254:97-99, 1991; Haass et al., *Nature Med.* 1:1291-1296, 1995). The identification of mutations in the beta-amyloid precursor protein gene that cause early onset familial Alzheimer's disease is the strongest argument that amyloid is central to the pathogenetic process underlying this disease. Four reported disease-causing mutations have been discovered which demonstrate the importance of $A\beta$ in causing familial Alzheimer's disease (reviewed in Hardy, *Nature Genet.* 1:233-234, 1992). All of these studies suggest that providing a drug to reduce, eliminate or prevent fibrillar $A\beta$ formation, aggregation, deposition, accumulation and/or persistence in the brains of human patients will serve as an effective therapeutic.

Parkinson's Disease and Synucleinopathies

Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder that is pathologically characterized by the presence of intracytoplasmic Lewy bodies (Lewy in *Handbuch der Neurologie*, M. Lewandowski, ed., Springer, Berlin, pp. 920-933, 1912; Pollanen et al., *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 52:183-191, 1993), the major components of which are filaments consisting of α -synuclein (Spillantini et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6469-6473, 1998; Arai et al., *Neurosci. Lett.* 259:83-86, 1999), an 140-amino acid protein (Ueda et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11282-11286, 1993). Two dominant mutations in α -synuclein causing familial early onset Parkinson's disease have been described suggesting that Lewy bodies contribute

mechanistically to the degeneration of neurons in Parkinson's disease and related disorders (Polymeropoulos et al., *Science* 276:2045-2047, 1997; Kruger et al., *Nature Genet.* 18:106-108, 1998). Recently, *in vitro* studies have demonstrated that recombinant α -synuclein can indeed form Lewy body-like fibrils or aggregates (Conway et al., *Nature Med.* 4:1318-1320, 1998; Hashimoto et al., *Brain Res.* 799:301-306, 1998; Nahri et al., *J. Biol. Chem.* 274:9843-9846, 1999). Most importantly, both Parkinson's disease-linked α -synuclein mutations accelerate this aggregation process, demonstrating that such *in vitro* studies may have relevance for Parkinson's disease pathogenesis. Alpha-synuclein aggregation and fibril formation fulfills the criteria of a nucleation-dependent polymerization process (Wood et al., *J. Biol. Chem.* 274:19509-19512, 1999). In this regard α -synuclein fibril formation or aggregation resembles that of Alzheimer's β -amyloid protein (A β) fibrils. Alpha-synuclein recombinant protein, and non-A β component (known as NAC), which is a 35-amino acid peptide fragment of α -synuclein, both have the ability to form fibrils or aggregate when incubated at 37°C, and are positive with amyloid stains such as Congo red (demonstrating a red/green birefringence when viewed under polarized light) and Thioflavin S (demonstrating positive fluorescence) (Hashimoto et al., *Brain Res.* 799:301-306, 1998; Ueda et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11282-11286, 1993).

Synucleins are a family of small, presynaptic neuronal proteins composed of α -, β -, and γ -synucleins, of which only α -synuclein aggregates have been associated with several neurological diseases (Ian et al., *Clinical Neurosc. Res.* 1:445-455, 2001; Trojanowski and Lee, *Neurotoxicology* 23:457-460, 2002). The role of synucleins (and in particular, alpha-synuclein) in the etiology of a number of neurodegenerative diseases has developed from several observations. Pathologically, synuclein was identified as a major component of Lewy bodies, the hallmark inclusions of Parkinson's disease, and a fragment thereof was isolated from amyloid plaques of a different neurological disease, Alzheimer's disease. Biochemically, recombinant α -synuclein was shown to form fibrils or aggregates that recapitulate the ultrastructural features of alpha-synuclein isolated from patients with dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and multiple system atrophy. Additionally, the identification of mutations within the synuclein gene, albeit in rare cases of familial Parkinson's disease, demonstrated an unequivocal link between synuclein pathology and neurodegenerative diseases. The common involvement of α -synuclein in a spectrum of diseases such as Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, multiple system

atrophy and the Lewy body variant of Alzheimer's disease has led to the classification of these diseases under the umbrella term of "synucleinopathies".

Parkinson's disease α -synuclein fibrils or aggregates, and the A β fibrils of Alzheimer's disease, both consist of a predominantly β -pleated sheet structure. Compounds found to inhibit Alzheimer's disease A β amyloid fibril formation have also been shown to be effective in the inhibition of α -synuclein fibril formation or aggregation, as illustrated in the Examples of the present invention. These compounds would therefore also serve as therapeutics for Parkinson's disease and other synucleinopathies, in addition to having efficacy as a therapeutic for Alzheimer's disease.

Parkinson's disease and Alzheimer's disease are characterized by the inappropriate accumulation of insoluble aggregates comprised primarily of misfolded proteins that are enriched in β -pleated sheet secondary structure (reviewed in Cohen et al., *Nature* **426**:905-909, 2003; Chiti et al., *Annu. Rev. Biochem.*, **75**:333-366, 2006). In Parkinson's disease, α -synuclein is the major constituent of these aggregates, as part of Lewy Bodies, and mutations in α -synuclein that increase its propensity to misfold and aggregate are observed in familial Parkinson's disease (Polymeropoulos et al., *Science* **276**:1197-1199, 1997; Papadimitriou et al., *Neurology* **52**:651-654, 1999).

Mitochondrial dysfunction, specifically as a result of impairment at complex I of the electron transport chain, is also a common feature of Parkinson's disease (Schapira et al., *J. Neurochem.*, **54**:823-827, 1990; reviewed in Greenamyre et al., *IUBMB Life*, **52**:135-141, 2001). Direct evidence for mitochondrial deficits in the etiology of Parkinson's disease came first from the observation that MPP⁺ (1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium), the active metabolite of the parkinsonism toxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), inhibits complex I (Nicklas et al., *Life Sci.*, **36**:2503-2508, 1985). Subsequently, rotenone, another complex I inhibitor, was shown to be an improved model for α -synuclein aggregation because it reproduces the above-mentioned α -synuclein-positive intracytoplasmic aggregates, in addition to the behavioral changes and loss of dopaminergic neurons seen in the MPTP model. Rotenone toxicity of this type is seen in multiple model systems including rats (Betarbet et al., *Nat. Neurosci.*, **3**:1301-1306, 2000; Panov et al., *J. Biol. Chem.*, **280**:42026-42035, 2005), rat brain slices (Sherer et al., *J. Neurosci.*, **23**:10756-10764, 2003; Testa et al., *Mol. Brain Res.*, **134**:109-118, 2005), *C. elegans* (Ved et al., *J. Biol. Chem.*, **280**:42655-42668, 2005) and cultured cells (Sherer

et al., *J. Neurosci.*, 22:7006-7015, 2002) and has been shown to be a consequence of increased oxidative damage resulting from complex I inhibition.

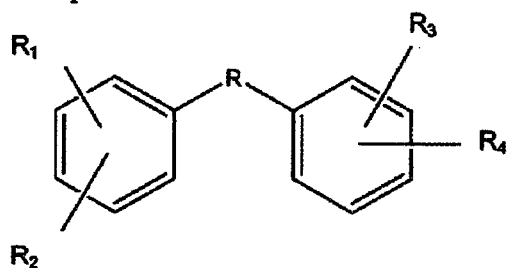
To better understand the relationship of oxidative damage to mutant α -synuclein pathogenesis, a neuroblastoma cell line (using BE-M17 cells) has been established in the art that overexpresses A53T α -synuclein. In these cells, A53T α -synuclein aggregates in response to a variety of oxidative stress-inducing agents and potentiates mitochondrial dysfunction and cell death (Ostrerova-Golts et al., *J. Neurosci.*, 20:6048-6054, 2000). These cells are amenable to rotenone treatment as an oxidative stress inducer and hence, are particularly useful for testing agents that might inhibit α -synuclein aggregation/fibrillogenesis.

Discovery and identification of new compounds or agents as potential therapeutics to arrest amyloid formation, deposition, accumulation and/or persistence that occurs in Alzheimer's disease, and Parkinson's disease, are desperately sought.

SUMMARY OF THE INVENTION

This invention relates to bis-dihydroxyaryl compounds and pharmaceutically acceptable salts thereof. The compounds are useful in the treatment of β -amyloid diseases and synucleinopathies.

The compounds are:
compounds of the formula:



where:

where R₁ and R₂, and R₃ and R₄ are hydroxyl groups independently positioned at one of the positions selected from the group consisting of 2,3; 2,4; 2,5; 2,6; 3,5; 3,6; 4,5; 4,6 and 5,6, and R is selected from a sulfonamide, heteroaryl, tricycloalkyl and -C(O)NR' where R' is selected from H or CH₃ or pharmaceutically acceptable esters or salts thereof.

Also provided are any pharmaceutically-acceptable derivatives, including salts, esters, enol ethers or esters, acetals, ketals, orthoesters, hemiacetals, hemiketals, solvates, hydrates or prodrugs of the compounds. Pharmaceutically-acceptable salts, include, but are not limited to, amine salts, such as but not limited to N,N'-dibenzylethylenediamine, chlorprocaine, choline, ammonia, diethanolamine and other hydroxyalkylamines, ethylenediamine, N-methylglucamine, procaine, N-benzylphenethylamine, 1-para-chlorobenzyl-2-pyrrolidin-1'-ylmethylbenzimidazole, diethylamine and other alkylamines, piperazine, tris(hydroxymethyl)aminomethane, alkali metal salts, such as but not limited to lithium, potassium and sodium, alkali earth metal salts, such as but not limited to barium, calcium and magnesium, transition metal salts, such as but not limited to zinc and other metal salts, such as but not limited to sodium hydrogen phosphate and disodium phosphate, and also including, but not limited to, salts of mineral acids, such as but not limited to hydrochlorides and sulfates, salts of organic acids, such as but not limited to acetates, lactates, malates, tartrates, citrates, ascorbates, succinates, butyrates, valerates and fumarates.

Pharmaceutical formulations for administration by an appropriate route and means containing effective concentrations of one or more of the compounds provided herein or pharmaceutically acceptable derivatives, such as salts, esters, enol ethers or esters, acetals, ketals, orthoesters, hemiacetals, hemiketals, solvates, hydrates or prodrugs, of the compounds that deliver amounts effective for the treatment of amyloid diseases, are also provided.

The formulations are compositions suitable for administration by any desired route and include solutions, suspensions, emulsions, tablets, dispersible tablets, pills, capsules, powders, dry powders for inhalation, sustained release formulations, aerosols for nasal and respiratory delivery, patches for transdermal delivery and any other suitable route. The compositions should be suitable for oral administration, parenteral administration by injection, including subcutaneously, intramuscularly or intravenously as an injectable aqueous or oily solution or emulsion, transdermal administration and other selected routes.

Methods using such compounds and compositions for disrupting, disaggregating and causing removal, reduction or clearance of β -amyloid or α -synuclein fibrils or aggregates are provided thereby providing new treatments for β -amyloid diseases and synucleinopathies.

Also provided are methods for treatment, prevention or amelioration of one or more symptoms of amyloid diseases or amyloidoses, including but not limited to diseases associated with the formation, deposition, accumulation, or persistence of β -amyloid fibrils.

Methods for treatment of amyloid diseases, include, but are not limited to Alzheimer's disease, Down's syndrome, hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of the Dutch type, and cerebral β -amyloid angiopathy.

Also provided are methods for treatment, prevention or amelioration of one or more symptoms of synuclein diseases or synucleinopathies. In one embodiment, the methods inhibit or prevent α -synuclein fibril formation, inhibit or prevent α -synuclein fibril growth, and/or cause disassembly, disruption, and/or disaggregation of preformed α -synuclein aggregates and α -synuclein -associated protein deposits. Synuclein diseases include, but are not limited to Parkinson's disease, familial Parkinson's disease, Lewy body disease, the Lewy body variant of Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, multiple system atrophy, and the Parkinsonism-dementia complex of Guam.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The patent or application file contains at least one drawing executed in color. Copies of this patent or patent application publication with color drawing(s) will be provided by the Office upon request and payment of the necessary fee.

Figure 1A shows several circular dichroism spectra illustrating that Alzheimer's disease A β fibrils are disrupted by the compounds tested at 1:1 wt/wt. Figure 1B shows graphically the % inhibition.

Figure 2 shows comparative circular dichroism spectra illustrating α -synuclein forms β -sheet rich structure after 4 days of agitation at 37°C.

Figure 3 shows several circular dichroism spectra illustrating that tested compounds inhibit α -synuclein aggregation at 1:1 wt/wt. Figure 3B shows graphically the % inhibition.

Figure 4 shows several circular dichroism spectra illustrating that compounds inhibit α -synuclein aggregation at 1:0.1 wt/wt. Figure 4B shows graphically the % inhibition.

Figure 5 graphically summarizes the results, as measured by Thio T, of the tested compounds to inhibit A β fibril formation or aggregation.

Figure 6 graphically summarizes the results, as measured by Congo Red, of the tested compounds to inhibit A β fibril formation or aggregation.

Figure 7 graphically summarizes the results, as measured by Thio T, of the tested compounds to inhibit α -synuclein fibril formation or aggregation.

Figure 8 graphically summarizes the results, as measured by Congo Red, of the tested compounds to inhibit α -synuclein fibril formation or aggregation.

Figures 9 A-D are examples of fluorescent photomicrographs demonstrating effects of rotenone on number of thioflavin S-positive aggregates. Figure 9A is vehicle alone, Figure 9B is 1 μ M rotenone, Figure 9C is 5 μ M at low magnification, and Figure 9D is 5 μ M at high magnification. Figure 9E summarizes the quantitative analysis of the Thioflavin S in response to rotenone treatment.

Figures 10 A-C are examples of fluorescent photomicrographs demonstrating a reduction in thioflavin S-positive aggregates (green fluorescence) upon application of a positive control compound. Figure 10 A is untreated, Figure 10 B shows 500 ng/mL of positive control compound and Figure 10 C shows 1 μ g/mL positive control compound. Figure 10D summarizes the quantitative analysis of dose dependent reduction in aggregation.

Figures 11 A-D are examples of fluorescent photomicrographs demonstrating the effects of compound 1 on the presence of rotenone-induced thioflavin S-positive aggregates (green) in cells in a dose dependent manner. Figure 11 A is untreated (rotenone only), and Figures 11 B-D, respectively, show 500 ng/mL, 1 μ g/mL and 2 μ g/mL of compound 1. Figure 11D summarizes the quantitative analysis of the effects of the compound 1.

Figures 12 A-D are examples of fluorescent photomicrographs demonstrating that compound 2 strongly reduces the presence of rotenone-induced thioflavin S-positive aggregates (green) in cells. Figure 12 A is untreated (rotenone only), and Figures 12 B-D, respectively, show 500 ng/mL, 1 μ g/mL and 2 μ g/mL of compound 2. Figure 12E summarizes the quantitative analysis of the anti-aggregation effects of compound 2.

Figures 13 A-D are examples of fluorescent photomicrographs demonstrating that compound 3 reduces the presence of rotenone-induced thioflavin S-positive aggregates (green) in cells in a dose dependent manner. Figure 13 A is untreated (rotenone only), and Figures 13 B-D, respectively, show 500 ng/mL, 1 μ g/mL and 2 μ g/mL of compound 3. Figure 13 E summarizes the quantitative analysis of the anti-aggregation effects of compound 3.

Figures 14 A-D are examples of fluorescent photomicrographs demonstrating that compound 4 minimally reduces the presence of rotenone-induced thioflavin S-positive aggregates (green) in cells in a dose dependent manner. Figure 14 A is untreated (rotenone only), and Figures

14 B-D, respectively, show 500 ng/mL, 1 μ g/mL and 2 μ g/mL of compound 4. Figure 14 E summarizes the quantitative analysis of the effects of compound 4.

Figures 15 A-D are examples of fluorescent photomicrographs demonstrating that compound 5 mildly reduces the presence of rotenone-induced thioflavin S-positive aggregates (green) in cells in a dose dependent manner. Figure 15 A is untreated (rotenone only), and Figures 15 B-D, respectively, show 500 ng/mL, 1 μ g/mL and 2 μ g/mL of compound 5. Figure 15 E summarizes the quantitative analysis of the anti-aggregation effects of compound 5.

Figures 16 A-D are examples of fluorescent photomicrographs demonstrating that compound 6 minimally affects the presence of rotenone-induced thioflavin S-positive aggregates (green) in cells in a dose dependent manner. Figure 16 A is untreated (rotenone only), and Figures 16 B-D, respectively, show 500 ng/mL, 1 μ g/mL and 2 μ g/mL of compound 6. Figure 16 E summarizes the quantitative analysis of the effects of compound 6.

Figures 17 A-C are examples of fluorescent photomicrographs demonstrating that compound 7 moderately reduces the presence of rotenone-induced thioflavin S-positive aggregates (green) in cells in a dose dependent manner. Figure 17 A is untreated (rotenone only), and Figures 17 B-C respectively show 500 ng/mL, and 2 μ g/mL of compound 7. Figure 17 D summarizes the quantitative analysis of the anti-aggregation effects of compound 7.

Figures 18 A-D are examples of fluorescent photomicrographs demonstrating that compound 8 moderately reduces the presence of rotenone-induced thioflavin S-positive aggregates (green) in cells in a dose dependent manner. Figure 18 A is untreated (rotenone only), and Figures 18 B-D, respectively, show 500 ng/mL, 1 μ g/mL and 2 μ g/mL of compound 8. Figure 18 E summarizes the quantitative analysis of the anti-aggregation effects of compound 8.

Figures 19 A-D are examples of fluorescent photomicrographs demonstrating that compound 9 reduces the presence of rotenone-induced thioflavin S-positive aggregates (green) in cells in a dose dependent manner. Figure 19 A is untreated (rotenone only), and Figures 19 B-D, respectively, show 500 ng/mL, 1 μ g/mL and 2 μ g/mL of compound 9. Figure 19 E summarizes the quantitative analysis of the anti-aggregation effects of compound 9 where * $p < 0.05$ relative to 1 μ M rotenone only.

Figure 20 is a graph showing 35-45% reduction in cell viability after 2 days of treatment with rotenone as measured by the XTT Cytotoxicity assay.

Figure 21 is a graph showing the ability of the positive control compound to inhibit rotenone-induced toxicity as measured by the XTT Cytotoxicity assay.

Figure 22 A is a graph showing that compound 1 is non-toxic up to 10 $\mu\text{g/ml}$. Figure 22 B is a graph showing the ability of compound 1 to protect against rotenone-induced toxicity as measured by the XTT Cytotoxicity assay.

Figure 23 A is a graph showing that compound 2 is non-toxic up to 25 $\mu\text{g/ml}$. Figure 23 B is a graph showing the ability of compound 2 to protect against rotenone-induced toxicity as measured by the XTT Cytotoxicity assay.

Figure 24 A is a graph showing that compound 3 is non-toxic up to 50 $\mu\text{g/ml}$. Figure 24 B is a graph showing the ability of compound 3 to protect against rotenone-induced toxicity as measured by the XTT Cytotoxicity assay.

Figure 25 A is a graph showing that compound 4 is non-toxic up to 25 $\mu\text{g/ml}$. Figure 25 B is a graph showing the ability of compound 4 to protect against rotenone-induced toxicity as measured by the XTT Cytotoxicity assay.

Figure 26 A is a graph showing that compound 5 is non-toxic up to 25 $\mu\text{g/ml}$. Figure 26 B is a graph showing the inability of compound 5 to protect against rotenone-induced toxicity as measured by the XTT Cytotoxicity assay.

Figure 27 A is a graph showing that compound 6 is non-toxic up to 50 $\mu\text{g/ml}$. Figure 27 B is a graph showing the ability of compound 6 to protect against rotenone-induced toxicity as measured by the XTT Cytotoxicity assay.

Figure 28 A is a graph showing that compound 7 is non-toxic up to 50 $\mu\text{g/ml}$. Figure 28 B is a graph showing the ability of compound 7 to protect against rotenone-induced toxicity as measured by the XTT Cytotoxicity assay.

Figure 29 A is a graph showing that compound 8 is non-toxic up to 25 $\mu\text{g/ml}$. Figure 29 B is a graph showing the ability of compound 8 to protect against rotenone-induced toxicity as measured by the XTT Cytotoxicity assay.

Figure 30 A is a graph showing that compound 9 is non-toxic up to 25 $\mu\text{g/ml}$. Figure 30 B is a graph showing the inability of compound 9 to protect against rotenone-induced toxicity as measured by the XTT Cytotoxicity assay.

Figure 31 is a graph showing beam traversal times and the effects of compound treatment. Treatment with compounds 2 and 7 improve the motor performance in the beam traversal test.

At three months of treatment, compound 2 improves the motor performance (measured by a reduction in time to cross) in the beam traversal test significantly ($p<0.05$) by 49%, relative to vehicle-treated mice at the same age. At six months of treatment, compound 7 improves the motor performance in the beam traversal test significantly ($p<0.05$) by 35%, relative to vehicle-treated mice at the same age. In addition, compound 7 shows a general trend in improving motor performance by 39% at three months of treatment, relative to vehicle-treated mice at the same age.

Figure 32 is a graph showing turn times on the pole test and the effects of compound treatment. Treatment with compound 7 improves motor performance in the pole test. At 3 months of treatment, compound 7 tends to improve motor performance (measured by a reduction in turn time) in the pole test and at 6 months of treatment, compound 7 significantly ($p<0.01$) improves performance by 41%, relative to performance prior to treatment. After 6 months of compound 7 treatment, performance is similar to 16-month-old non-transgenic mice. Vehicle-treated mice performed similarly prior to treatment and at 3 and 6 months of treatment.

Figure 33 is a graph showing beam traversal times and the effects of compound 7 treatment. At six weeks of treatment, compound 7 significantly improves motor performance in the beam traversal test (measured by a 36% reduction in time to cross), relative to vehicle-treated mice at the same age ($**p<0.01$). Bars represent mean + SEM, $n=8$ per group.

Figure 34 (Panels A-F) are photomicrographs showing that compound 7 treatment causes a reduction of α -synuclein levels in 18-month old transgenic mouse brain as evidenced by immunohistochemistry. Compound 7-treated mice (panels C-D) exhibit significantly less intraneuronal human α -synuclein in the frontal cortex compared to vehicle-treated mice (panels A-B). Non-transgenic wild-type mouse brains are devoid of human α -synuclein staining and are shown as a control for the specificity of the antibody for transgene-derived human α -synuclein (E and F). Image analysis and quantitation reveals that compound 7 treatment causes a significant 81% reduction of α -synuclein-positive objects. Data is expressed as percent area occupied by positive objects. Bars represent mean + SEM, $n=5$ for vehicle-treated, $n=11$ for compound 7-treated, and $n=4$ for non-transgenic (Non-Tg) mice. $***p<0.001$ relative to vehicle-treated mice by one-way ANOVA and Tukey-Kramer post hoc test.

Figure 35, panel A is a photograph of a western blot showing levels of α -synuclein in the particulate fraction from the anterior portion of brains from α -synuclein transgenic mice treated for 6

months with compound 7 or vehicle control. Panel B shows bar graphs representing the average quantified band intensities from two independent western blots that indicate a significant 69% reduction overall and a 58% reduction in females of α -synuclein monomer levels following treatment with compound 7. Band intensities of α -synuclein monomer were normalized against band intensities of the 25 kDa band (loading control). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ relative to vehicle-treated. Bars represent mean + SEM.

Figure 36, panel A is a photograph of a western blot showing levels of α -synuclein in the cytosolic fraction from the anterior portion of brains from α -synuclein transgenic mice treated for 6 months with compound 7 or vehicle control. Panel B shows bar graphs representing quantified band intensities of the western blot in panel A that indicates a significant 73% reduction overall and a 48% reduction in females of α -synuclein monomer levels following treatment with compound 7. Band intensities of α -synuclein monomer were normalized against band intensities of the β -actin band (loading control). * $p < 0.05$ relative to vehicle-treated. Bars represent mean + SEM.

Figure 37, panel A is a photograph of a western blot showing levels of α -synuclein in the particulate fraction from the anterior portion of brains from 4-5 month old α -synuclein transgenic mice treated for 6 weeks with compound 7 or vehicle control. Panel B shows a bar graphs representing the average quantified band intensities from four independent western blots that indicates compound 7 treatment results in a significant 45% reduction in α -synuclein monomer levels relative to vehicle-treated controls. Band intensities of α -synuclein monomer were normalized against band intensities of the 25 kDa band (loading control). * $p < 0.05$ relative to vehicle-treated. Bars represent mean + SEM.

Figure 38, panel A is a photograph of a western blot showing levels of α -synuclein in the cytosolic fraction from the anterior portion of brains from 4-5 month old α -synuclein transgenic mice treated for 6 weeks with compound 7 or vehicle control. Panel B shows a bar graph representing the average quantified band intensities from four independent western blots that indicates compound 7 treatment results in a significant 71% reduction in α -synuclein monomer levels relative to vehicle-treated controls. Band intensities of α -synuclein monomer were normalized against band intensities of the α -tubulin band (loading control). ** $p < 0.01$ relative to vehicle-treated. Bars represent mean + SEM.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Definitions

In this application, the following terms shall have the following meanings, without regard to whether the terms are used variantly elsewhere in the literature or otherwise in the known art.

As used herein “Amyloid diseases” or “amyloidoses” are diseases associated with the formation, deposition, accumulation, or persistence of A β amyloid fibrils. Such diseases include, but are not limited to Alzheimer’s disease, Down’s syndrome, hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of the Dutch type, and cerebral β -amyloid angiopathy.

As used herein, “Synuclein diseases” or “synucleinopathies” are diseases associated with the formation, deposition, accumulation, persistence or aggregation of α -synuclein. Such diseases include, but are not limited to Parkinson’s disease, familial Parkinson’s disease, Lewy body disease, the Lewy body variant of Alzheimer’s disease, dementia with Lewy bodies, multiple system atrophy, and the Parkinsonism-dementia complex of Guam.

“Fibrillogenesis” refers to the formation, deposition, accumulation, aggregation and/or persistence of β -amyloid fibrils, filaments, inclusions, deposits, as well as α -synuclein fibrils, filaments, inclusions, deposits, aggregates or the like.

“Inhibition of fibrillogenesis” refers to the inhibition of formation, deposition, accumulation, aggregation and/or persistence of such a β -amyloid fibrils or α -synuclein fibril-like deposits or aggregates.

“Disruption of fibrils or fibrillogenesis” refers to the disruption of pre-formed β -amyloid or α -synuclein aggregates, that usually exist in a pre-dominant β -pleated sheet secondary structure. Such disruption by compounds provided herein may involve marked reduction or disassembly of amyloid or synuclein aggregates as assessed by various methods such as Thioflavin T fluorometry, Congo red binding, circular dichroism spectra, thioflavin S and cell based assays such as α -synuclein aggregation and XTT cytotoxicity assays and as demonstrated by the Examples presented in this application.

“Neuroprotection” or “neuroprotective” refers to the ability of a compound to protect, reduce, alleviate, ameliorate, and/or attenuate damage to nerve cells (neurodegeneration).

“Mammal” includes both humans and non-human mammals, such as companion animals (cats, dogs, and the like), laboratory animals (such as mice, rats, guinea pigs, and the like) and farm animals (cattle, horses, sheep, goats, swine, and the like).

“Pharmaceutically acceptable excipient” means an excipient that is conventionally useful in preparing a pharmaceutical composition that is generally safe, non-toxic, and desirable, and includes excipients that are acceptable for veterinary use or for human pharmaceutical use. Such excipients may be solid, liquid, semisolid, or, in the case of an aerosol composition, gaseous.

A “therapeutically effective amount” means the amount that, when administered to a subject or animal for treating a disease, is sufficient to affect the desired degree of treatment, prevention or symptom amelioration for the disease. A “therapeutically effective amount” or a “therapeutically effective dosage” in certain embodiments inhibits, reduces, disrupts, disassembles β -amyloid or α -synuclein aggregates formation, deposition, accumulation and/or persistence, or treats, prevents, or ameliorates one or more symptoms of a disease associated with these conditions, such as an amyloid disease or a synucleinopathy, in a measurable amount in one embodiment, by at least 20%, in other embodiment, by at least 40%, in other embodiment by at least 60%, and in still other embodiment by at least 80%, relative to an untreated subject. Effective amounts of a compound provided herein or composition thereof for treatment of a mammalian subject are about 0.1 to about 1000 mg/Kg of body weight of the subject/day, such as from about 1 to about 100 mg/Kg/day, in other embodiment, from about 10 to about 500 mg/Kg/day. A broad range of disclosed composition dosages are believed to be both safe and effective.

The term “sustained release component” is defined herein as a compound or compounds, including, but not limited to, polymers, polymer matrices, gels, permeable membranes, liposomes, microspheres, or the like, or a combination thereof, that facilitates the sustained release of the active ingredient.

If the complex is water-soluble, it may be formulated in an appropriate buffer, for example, phosphate buffered saline, or other physiologically compatible solutions. Alternatively, if the resulting complex has poor solubility in aqueous solvents, then it may be formulated with a non-ionic surfactant such as Tween, or polyethylene glycol. Thus, the compounds and their physiological solvents may be formulated for administration by inhalation or insufflation (either through the mouth or the nose) or oral, buccal, parenteral, or rectal administration, as examples.

As used herein, pharmaceutically acceptable derivatives of a compound include salts, esters, enol ethers, enol esters, acetals, ketals, orthoesters, hemiacetals, hemiketals, solvates, hydrates or prodrugs thereof. Such derivatives may be readily prepared by those of skill in this art using known methods for such derivatization. The compounds produced may be administered to animals or humans without substantial toxic effects and either are pharmaceutically active or are prodrugs. Pharmaceutically acceptable salts include, but are not limited to, amine salts, such as but not limited to N,N'-dibenzylethylenediamine, chlorprocaine, choline, ammonia, diethanolamine and other hydroxyalkylamines, ethylenediamine, N-methylglucamine, procaine, N-benzylphenethylamine, 1-para-chlorobenzyl-2-pyrrolidin-1'-ylmethyl-benzimidazole, diethylamine and other alkylamines, piperazine and tris(hydroxymethyl)aminomethane; alkali metal salts, such as but not limited to lithium, potassium and sodium; alkali earth metal salts, such as but not limited to barium, calcium and magnesium; transition metal salts, such as but not limited to zinc; and other metal salts, such as but not limited to sodium hydrogen phosphate and disodium phosphate; and also including, but not limited to, salts of mineral acids, such as but not limited to hydrochlorides and sulfates; and salts of organic acids, such as but not limited to acetates, lactates, malates, tartrates, citrates, ascorbates, succinates, butyrates, valerates and fumarates. Pharmaceutically acceptable esters include, but are not limited to, alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, aralkyl, heteroaralkyl, cycloalkyl and heterocyclyl esters of acidic groups, including, but not limited to, carboxylic acids, phosphoric acids, phosphinic acids, sulfonic acids, sulfinic acids and boronic acids. Pharmaceutically acceptable enol ethers include, but are not limited to, derivatives of formula $C=C(OR)$ where R is hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, aralkyl, heteroaralkyl, cycloalkyl or heterocyclyl. Pharmaceutically acceptable enol esters include, but are not limited to, derivatives of formula $C=C(OC(O)R)$ where R is hydrogen, alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, aralkyl, heteroaralkyl, cycloalkyl or heterocyclyl. Pharmaceutically acceptable solvates and hydrates are complexes of a compound with one or more solvent or water molecules, or 1 to about 100, or 1 to about 10, or one to about 2, 3 or 4, solvent or water molecules.

As used herein, treatment means any manner in which one or more of the symptoms of a disease or disorder are ameliorated or otherwise beneficially altered. Treatment of a disease also includes preventing the disease from occurring in a subject that may be predisposed to the disease but does not yet experience or exhibit symptoms of the disease (prophylactic treatment),

inhibiting the disease (slowing or arresting its development), providing relief from the symptoms or side-effects of the disease (including palliative treatment), and relieving the disease (causing regression of the disease), such as by disruption of pre-formed β -amyloid or α -synuclein aggregates. As used herein, amelioration of the symptoms of a particular disorder by administration of a particular compound or pharmaceutical composition refers to any lessening, whether permanent or temporary, lasting or transient that can be attributed to or associated with administration of the composition.

As used herein, inhibition of α -synuclein fibril formation, deposition, accumulation, aggregation, and/or persistence is believed to be effective treatment for a number of diseases involving α -synuclein, such as Parkinson's disease, Lewy body disease and multiple system atrophy.

As used herein, a prodrug is a compound that, upon *in vivo* administration, is metabolized by one or more steps or processes or otherwise converted to the biologically, pharmaceutically or therapeutically active form of the compound. To produce a prodrug, the pharmaceutically active compound is modified such that the active compound will be regenerated by metabolic processes. The prodrug may be designed to alter the metabolic stability or the transport characteristics of a drug, to mask side effects or toxicity, to improve the flavor of a drug or to alter other characteristics or properties of a drug. By virtue of knowledge of pharmacodynamic processes and drug metabolism *in vivo*, those of skill in this art, once a pharmaceutically active compound is known, can design prodrugs of the compound (see, *e.g.*, Nogrady (1985) *Medicinal Chemistry A Biochemical Approach*, Oxford University Press, New York, pages 388-392).

Chemical structures for some of the compounds of this invention are shown. The names of the compounds are variously IUPAC names [names derived according to the accepted IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) system established by the coalition of the Commission on Nomenclature of Organic Chemistry and the Commission on Physical Organic Chemistry, as can be found at <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/>], names derived from IUPAC names by addition or substitution (for example, by the use of "3,4-methylenedioxyphenyl" derived from "phenyl" instead of "benzo[1,3]dioxol-5-yl"), and names derived from the names of reactants (for example, by the use of "3,4-dihydroxybenzoic acid 3,4-dihydroxyanilide" instead of "N-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydroxybenzamide"). However, the names used are explicitly

equated to chemical structures, and are believed to be readily understood by a person of ordinary skill in the art.

"A pharmaceutical agent" or "pharmacological agent" or "pharmaceutical composition" refers to a compound or combination of compounds used for treatment, preferably in a pure or near pure form. In the specification, pharmaceutical or pharmacological agents include the compounds of this invention. The compounds are desirably purified to 80% homogeneity, and preferably to 90% homogeneity. Compounds and compositions purified to 99.9% homogeneity are believed to be advantageous. As a test or confirmation, a suitable homogeneous compound on HPLC would yield, what those skilled in the art would identify as a single sharp-peak band.

It is to be understood that the compounds provided herein may contain chiral centers. Such chiral centers may be of either the (R) or (S) configuration, or may be a mixture thereof. Thus, the compounds provided herein may be enantiomerically pure, or be stereoisomeric or diastereomeric mixtures. In the case of amino acid residues, such residues may be of either the L- or D-form. The configuration for naturally occurring amino acid residues is generally L. When not specified the residue is the L form. As used herein, the term "amino acid" refers to α -amino acids which are racemic, or of either the D- or L-configuration. The designation "d" preceding an amino acid designation (*e.g.*, dAla, dSer, dVal, etc.) refers to the D-isomer of the amino acid. The designation "dl" preceding an amino acid designation (*e.g.*, dlPip) refers to a mixture of the L- and D-isomers of the amino acid. It is to be understood that the chiral centers of the compounds provided herein may undergo epimerization *in vivo*. As such, one of skill in the art will recognize that administration of a compound in its (R) form is equivalent, for compounds that undergo epimerization *in vivo*, to administration of the compound in its (S) form.

As used herein, substantially pure means sufficiently homogeneous to appear free of readily detectable impurities as determined by standard methods of analysis, such as thin layer chromatography (TLC), gel electrophoresis, high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS), used by those of skill in the art to assess such purity, or sufficiently pure such that further purification would not detectably alter the physical and chemical properties, such as enzymatic and biological activities, of the substance. Methods for purification of the compounds to produce substantially chemically pure compounds are known to those of skill in the art. A substantially chemically pure compound may, however, be a mixture of stereoisomers. In such instances, further purification might increase the specific activity of the compound.

As used herein, alkyl, alkenyl and alkynyl carbon chains, if not specified, contain from 1 to 20 carbons, or 1 or 2 to 16 carbons, and are straight or branched. Alkenyl carbon chains of from 2 to 20 carbons, in certain embodiments, contain 1 to 8 double bonds and alkenyl carbon chains of 2 to 16 carbons, in certain embodiments, contain 1 to 5 double bonds. Alkynyl carbon chains of from 2 to 20 carbons, in certain embodiments, contain 1 to 8 triple bonds, and the alkynyl carbon chains of 2 to 16 carbons, in certain embodiments, contain 1 to 5 triple bonds. Exemplary alkyl, alkenyl and alkynyl groups herein include, but are not limited to, methyl, ethyl, propyl, isopropyl, isobutyl, n-butyl, sec-butyl, tert-butyl, isopentyl, neopentyl, tert-pentyl, isohexyl, allyl (propenyl) and propargyl (propynyl). As used herein, lower alkyl, lower alkenyl, and lower alkynyl refer to carbon chains having from about 1 or about 2 carbons up to about 6 carbons. As used herein, "alk(en)(yn)yl" refers to an alkyl group containing at least one double bond and at least one triple bond.

As used herein, "cycloalkyl" refers to a saturated mono- or multi- cyclic ring system, in certain embodiments of 3 to 10 carbon atoms, in other embodiments of 3 to 6 carbon atoms; cycloalkenyl and cycloalkynyl refer to mono- or multicyclic ring systems that respectively include at least one double bond and at least one triple bond. Cycloalkenyl and cycloalkynyl groups may, in certain embodiments, contain 3 to 10 carbon atoms, with cycloalkenyl groups, in further embodiments, containing 4 to 7 carbon atoms and cycloalkynyl groups, in further embodiments, containing 8 to 10 carbon atoms. The ring systems of the cycloalkyl, cycloalkenyl and cycloalkynyl groups may be composed of one ring or two or more rings which may be joined together in a fused, bridged or spiro-connected fashion. "Cycloalk(en)(yn)yl" refers to a cycloalkyl group containing at least one double bond and at least one triple bond.

As used herein, "aryl" refers to aromatic monocyclic or multicyclic groups containing from 6 to 19 carbon atoms. Aryl groups include, but are not limited to groups such as unsubstituted or substituted fluorenyl, unsubstituted or substituted phenyl, and unsubstituted or substituted naphthyl.

As used herein, "heteroaryl" refers to a monocyclic or multicyclic aromatic ring system, in certain embodiments, of about 5 to about 15 members where one or more, in one embodiment 1 to 3, of the atoms in the ring system is a heteroatom, that is, an element other than carbon, including but not limited to, nitrogen, oxygen or sulfur. The heteroaryl group may be optionally fused to a benzene ring. Heteroaryl groups include, but are not limited to, furyl, imidazolyl, pyrimidinyl,

tetrazolyl, thienyl, pyridyl, pyrrolyl, thiazolyl, isothiazolyl, oxazolyl, isoxazolyl, triazolyl, quinoliny and isoquinoliny. imidazole, triazole and pyrazole.

As used herein, "heterocyclyl" refers to a monocyclic or multicyclic non-aromatic ring system, in one embodiment of 3 to 10 members, in another embodiment of 4 to 7 members, in a further embodiment of 5 to 6 members, where one or more, in certain embodiments, 1 to 3, of the atoms in the ring system is a heteroatom, that is, an element other than carbon, including but not limited to, nitrogen, oxygen or sulfur. In embodiments where the heteroatom(s) is(are) nitrogen, the nitrogen is optionally substituted with alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, aralkyl, heteroaralkyl, cycloalkyl, heterocyclyl, cycloalkylalkyl, heterocyclalkyl, acyl, guanidino, or the nitrogen may be quaternized to form an ammonium group where the substituents are selected as above.

As used herein, "aralkyl" refers to an alkyl group in which one of the hydrogen atoms of the alkyl is replaced by an aryl group.

As used herein, "heteroaralkyl" refers to an alkyl group in which one of the hydrogen atoms of the alkyl is replaced by a heteroaryl group.

As used herein, "halo", "halogen" or "halide" refers to F, Cl, Br or I.

As used herein, pseudohalides or pseudohalo groups are groups that behave substantially similar to halides. Such compounds can be used in the same manner and treated in the same manner as halides. Pseudohalides include, but are not limited to, cyanide, cyanate, thiocyanate, selenocyanate, trifluoromethoxy, and azide.

As used herein, "haloalkyl" refers to an alkyl group in which one or more of the hydrogen atoms are replaced by halogen. Such groups include, but are not limited to, chloromethyl, trifluoromethyl and 1-chloro-2-fluoroethyl.

As used herein, "haloalkoxy" refers to RO- in which R is a haloalkyl group.

As used herein, "sulfinyl" or "thionyl" refers to -S(O)-. As used herein, "sulfonyl" or "sulfuryl" refers to -S(O)₂-. As used herein, "sulfo" refers to -S(O)₂O-.

As used herein, "carboxy" refers to a divalent radical, -C(O)O-.

As used herein, "aminocarbonyl" refers to -C(O)NH₂.

As used herein, "alkylaminocarbonyl" refers to -C(O)NHR in which R is alkyl, including lower alkyl.

As used herein, "dialkylaminocarbonyl" refers to $-C(O)NR'R$ in which R' and R are each independently alkyl, including lower alkyl; "carboxamide" refers to groups of formula $-NR'COR$ in which R' and R are each independently alkyl, including lower alkyl.

As used herein, "arylalkylaminocarbonyl" refers to $-C(O)NRR'$ in which one of R and R' is aryl, including lower aryl, such as phenyl, and the other of R and R' is alkyl, including lower alkyl.

As used herein, "arylamino carbonyl" refers to $-C(O)NHR$ in which R is aryl, including lower aryl, such as phenyl.

As used herein, "hydroxycarbonyl" refers to $-COOH$.

As used herein, "alkoxycarbonyl" refers to $-C(O)OR$ in which R is alkyl, including lower alkyl.

As used herein, "aryloxycarbonyl" refers to $-C(O)OR$ in which R is aryl, including lower aryl, such as phenyl.

As used herein, "alkoxy" and "alkylthio" refer to $RO-$ and $RS-$, in which R is alkyl, including lower alkyl.

As used herein, "aryloxy" and "arylthio" refer to $RO-$ and $RS-$, in which R is aryl, including lower aryl, such as phenyl.

As used herein, "alkylene" refers to a straight, branched or cyclic, in certain embodiments straight or branched, divalent aliphatic hydrocarbon group, in one embodiment having from 1 to about 20 carbon atoms, in another embodiment having from 1 to 12 carbons. In a further embodiment alkylene includes lower alkylene. There may be optionally inserted along the alkylene group one or more oxygen, sulfur, including $S(=O)$ and $S(=O)_2$ groups, or substituted or unsubstituted nitrogen atoms, including $-NR-$ and $-N^+RR-$ groups, where the nitrogen substituent(s) is(are) alkyl, aryl, aralkyl, heteroaryl, heteroaralkyl or COR' , where R' is alkyl, aryl, aralkyl, heteroaryl, heteroaralkyl, $-OY$ or $-NYY$, where Y is hydrogen, alkyl, aryl, heteroaryl, cycloalkyl or heterocyclyl. Alkylene groups include, but are not limited to, methylene ($-CH_2-$), ethylene ($-CH_2CH_2-$), propylene ($-(CH_2)_3-$), methylenedioxy ($-O-CH_2-O-$) and ethylenedioxy ($-O-(CH_2)_2-O-$). The term "lower alkylene" refers to alkylene groups having 1 to 6 carbons. In certain embodiments, alkylene groups are lower alkylene, including alkylene of 1 to 3 carbon atoms.

As used herein, "azaalkylene" refers to $-(CRR)_n-NR-(CRR)_m-$, where n and m are each independently an integer from 0 to 4. As used herein, "oxaalkylene" refers to $-(CRR)_n-O-(CRR)_m-$,

where n and m are each independently an integer from 0 to 4. As used herein, "thiaalkylene" refers to $-(CRR)_n-S-(CRR)_m-$, $-(CRR)_n-S(=O)-(CRR)_m-$, and $-(CRR)_n-S(=O)_2-(CRR)_m-$, where n and m are each independently an integer from 0 to 4.

As used herein, "alkenylene" refers to a straight, branched or cyclic, in one embodiment straight or branched, divalent aliphatic hydrocarbon group, in certain embodiments having from 2 to about 20 carbon atoms and at least one double bond, in other embodiments 1 to 12 carbons. In further embodiments, alkenylene groups include lower alkenylene. There may be optionally inserted along the alkenylene group one or more oxygen, sulfur or substituted or unsubstituted nitrogen atoms, where the nitrogen substituent is alkyl. Alkenylene groups include, but are not limited to, $-CH=CH-CH=CH-$ and $-CH=CH-CH_2-$. The term "lower alkenylene" refers to alkenylene groups having 2 to 6 carbons. In certain embodiments, alkenylene groups are lower alkenylene, including alkenylene of 3 to 4 carbon atoms.

As used herein, "alkynylene" refers to a straight, branched or cyclic, in certain embodiments straight or branched, divalent aliphatic hydrocarbon group, in one embodiment having from 2 to about 20 carbon atoms and at least one triple bond, in another embodiment 1 to 12 carbons. In a further embodiment, alkynylene includes lower alkynylene. There may be optionally inserted along the alkynylene group one or more oxygen, sulfur or substituted or unsubstituted nitrogen atoms, where the nitrogen substituent is alkyl. Alkynylene groups include, but are not limited to, $-C\equiv C-C\equiv C-$, $-C\equiv C-$ and $-C\equiv C-CH_2-$. The term "lower alkynylene" refers to alkynylene groups having 2 to 6 carbons. In certain embodiments, alkynylene groups are lower alkynylene, including alkynylene of 3 to 4 carbon atoms.

As used herein, "alk(en)(yn)ylene" refers to a straight, branched or cyclic, in certain embodiments straight or branched, divalent aliphatic hydrocarbon group, in one embodiment having from 2 to about 20 carbon atoms and at least one triple bond, and at least one double bond; in another embodiment 1 to 12 carbons. In further embodiments, alk(en)(yn)ylene includes lower alk(en)(yn)ylene. There may be optionally inserted along the alkynylene group one or more oxygen, sulfur or substituted or unsubstituted nitrogen atoms, where the nitrogen substituent is alkyl. Alk(en)(yn)ylene groups include, but are not limited to, $-C=C-(CH_2)_n-C\equiv C-$, where n is 1 or 2. The term "lower alk(en)(yn)ylene" refers to alk(en)(yn)ylene groups having up to 6 carbons. In certain embodiments, alk(en)(yn)ylene groups have about 4 carbon atoms.

As used herein, "cycloalkylene" refers to a divalent saturated mono- or multicyclic ring system, in certain embodiments of 3 to 10 carbon atoms, in other embodiments 3 to 6 carbon atoms; cycloalkenylene and cycloalkynylene refer to divalent mono- or multicyclic ring systems that respectively include at least one double bond and at least one triple bond. Cycloalkenylene and cycloalkynylene groups may, in certain embodiments, contain 3 to 10 carbon atoms, with cycloalkenylene groups in certain embodiments containing 4 to 7 carbon atoms and cycloalkynylene groups in certain embodiments containing 8 to 10 carbon atoms. The ring systems of the cycloalkylene, cycloalkenylene and cycloalkynylene groups may be composed of one ring or two or more rings which may be joined together in a fused, bridged or spiro-connected fashion. "Cycloalk(en)(yn)ylene" refers to a cycloalkylene group containing at least one double bond and at least one triple bond.

As used herein, "arylene" refers to a monocyclic or polycyclic, in certain embodiments monocyclic, divalent aromatic group, in one embodiment having from 5 to about 20 carbon atoms and at least one aromatic ring, in another embodiment 5 to 12 carbons. In further embodiments, arylene includes lower arylene. Arylene groups include, but are not limited to, 1,2-, 1,3- and 1,4-phenylene. The term "lower arylene" refers to arylene groups having 6 carbons.

As used herein, "heteroarylene" refers to a divalent monocyclic or multicyclic aromatic ring system, in one embodiment of about 5 to about 15 atoms in the ring(s), where one or more, in certain embodiments 1 to 3, of the atoms in the ring system is a heteroatom, that is, an element other than carbon, including but not limited to, nitrogen, oxygen or sulfur. The term "lower heteroarylene" refers to heteroarylene groups having 5 or 6 atoms in the ring.

As used herein, "heterocyclylene" refers to a divalent monocyclic or multicyclic non-aromatic ring system, in certain embodiments of 3 to 10 members, in one embodiment 4 to 7 members, in another embodiment 5 to 6 members, where one or more, including 1 to 3, of the atoms in the ring system is a heteroatom, that is, an element other than carbon, including but not limited to, nitrogen, oxygen or sulfur.

As used herein, "substituted alkyl," "substituted alkenyl," "substituted alkynyl," "substituted cycloalkyl," "substituted cycloalkenyl," "substituted cycloalkynyl," "substituted aryl," "substituted heteroaryl," "substituted heterocyclyl," "substituted alkylene," "substituted alkenylene," "substituted alkynylene," "substituted cycloalkylene," "substituted cycloalkenylene," "substituted cycloalkynylene," "substituted arylene," "substituted heteroarylene" and "substituted

heterocyclylene" refer to alkyl, alkenyl, alkynyl, cycloalkyl, cycloalkenyl, cycloalkynyl, aryl, heteroaryl, heterocyclyl, alkylene, alkenylene, alkynylene, cycloalkylene, cycloalkenylene, cycloalkynylene, arylene, heteroarylene and heterocyclylene groups, respectively, that are substituted with one or more substituents, in certain embodiments one, two, three or four substituents, where the substituents are as defined herein, in one embodiment selected from Q¹.

As used herein, "alkylidene" refers to a divalent group, such as =CR'R", which is attached to one atom of another group, forming a double bond. Alkylidene groups include, but are not limited to, methyldiene (=CH₂) and ethyldiene (=CHCH₃). As used herein, "arylalkylidene" refers to an alkylidene group in which either R' or R" is an aryl group. "Cycloalkylidene" groups are those where R' and R" are linked to form a carbocyclic ring. "Heterocyclidene" groups are those where at least one of R' and R" contain a heteroatom in the chain, and R' and R" are linked to form a heterocyclic ring.

As used herein, "amido" refers to the divalent group -C(O)NH-. "Thioamido" refers to the divalent group -C(S)NH-. "Oxyamido" refers to the divalent group -OC(O)NH-. "Thiaamido" refers to the divalent group -SC(O)NH-. "Dithiaamido" refers to the divalent group -SC(S)NH-. "Ureido" refers to the divalent group -HNC(O)NH-. "Thioureido" refers to the divalent group -NC(S)NH-.

As used herein, "semicarbazide" refers to -NHC(O)NHNH-. "Carbazate" refers to the divalent group -OC(O)NHNH-. "Isothiocarbazate" refers to the divalent group -SC(O)NHNH-. "Thiocarbazate" refers to the divalent group -OC(S)NHNH-. "Sulfonylhydrazide" refers to the divalent group -SO₂NHNH-. "Hydrazide" refers to the divalent group -C(O)NHNH-. "Azo" refers to the divalent group -N=N-. "Hydrazinyl" refers to the divalent group -NH-NH-.

As used herein, "sulfonamide" refers to -RSO₂NH₂- a sulfone group connected to an amine group.

As used herein, "imidazole" refers to a heterocyclic aromatic organic compound having a general formula of C₃H₄N₂.

As used herein, "triazole" refers to either one of a pair of isomeric chemical compounds with molecular formula of C₂H₃N₃.

As used herein, "pyrazole" refers to a heterocyclic 5-membered ring composed of three carbons and two nitrogen atoms in adjacent positions.

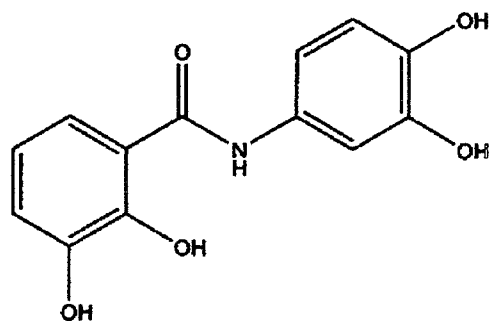
As used herein, "adamantane" refers to a tricycloalkyl having a general formula of C₁₀H₁₆.

Where the number of any given substituent is not specified (*e.g.*, haloalkyl), there may be one or more substituents present. For example, "haloalkyl" may include one or more of the same or different halogens. As another example, "C₁₋₃ alkoxyphenyl" may include one or more of the same or different alkoxy groups containing one, two or three carbons.

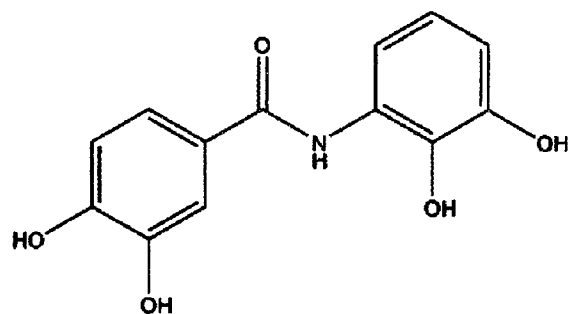
As used herein, the abbreviations for any protective groups, amino acids and other compounds, are, unless indicated otherwise, in accord with their common usage, recognized abbreviations, or the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (see, (1972) *Biochem. 11*:942-944).

Compounds of the invention

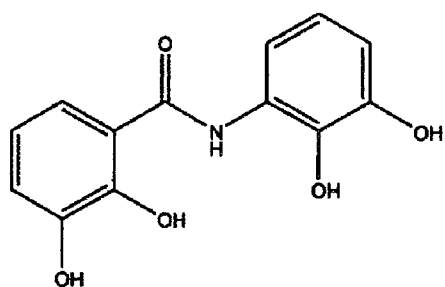
The compounds of this invention are:



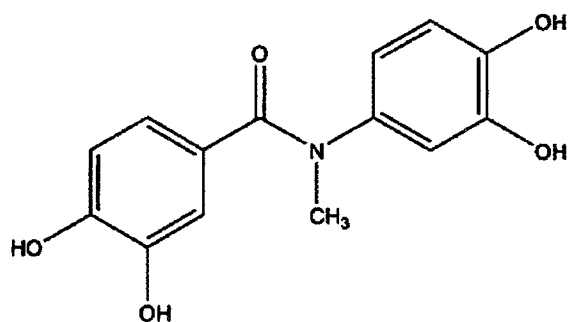
2,3 dihydroxybenzoic acid 3,4 dihydroxyanilide (Compound 1),



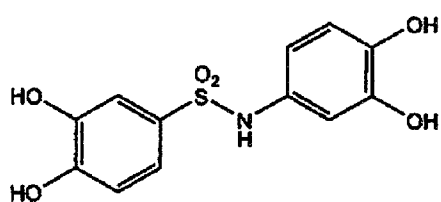
3,4 dihydroxybenzoic acid 2,3 dihydroxyanilide (Compound 2),



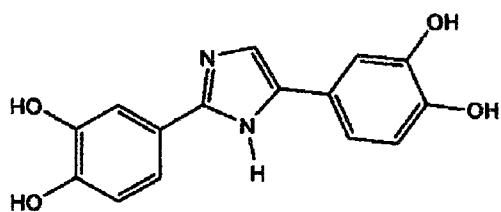
2,3 dihydroxybenzoic acid 2,3 dihydroxyanilide (Compound 3),



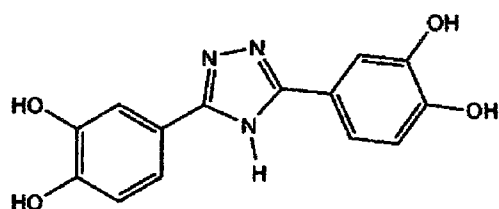
3,4 dihydroxybenzoic acid 3,4 dihydroxy N-methyl anilide (Compound 4),



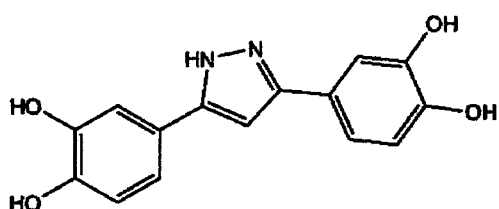
3,4 dihydroxybenzenesulfonic acid 3,4 dihydroxyphenylsulfonamide (Compound 5),



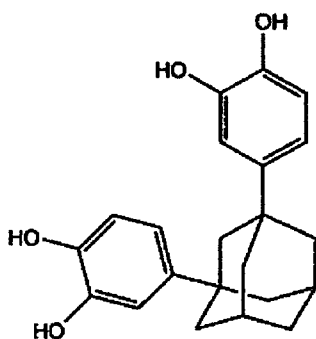
2,4 bis (3,4 dihydroxyphenyl) imidazole (Compound 6),



3,5 bis (3,4 dihydroxyphenyl) 1,2,4 triazole (Compound 7),



3,5 bis (3,4 dihydroxyphenyl) pyrazole (Compound 8),



1,3 bis (3,4 dihydroxyphenyl) adamantane (Compound 9),

Synthesis of the compounds of the invention

The compounds of this invention may be prepared by methods generally known to the person of ordinary skill in the art, having regard to that knowledge and the disclosure of this application including Examples 1-5.

The starting materials and reagents used in preparing these compounds are either available from commercial suppliers such as the Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Bachem (Torrance, CA), Sigma (St. Louis, MO), or Lancaster Synthesis Inc. (Windham, NH) or are

prepared by methods well known to a person of ordinary skill in the art, following procedures described in such references as Fieser and Fieser's *Reagents for Organic Synthesis*, vols. 1-17, John Wiley and Sons, New York, NY, 1991; *Rodd's Chemistry of Carbon Compounds*, vols. 1-5 and supps., Elsevier Science Publishers, 1989; *Organic Reactions*, vols. 1-40, John Wiley and Sons, New York, NY, 1991; March J.: *Advanced Organic Chemistry*, 4th ed., John Wiley and Sons, New York, NY; and Larock: *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers, New York, 1989.

In most cases, protective groups for the hydroxy groups are introduced and finally removed. Suitable protective groups are described in Greene et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, Second Edition, John Wiley and Sons, New York, 1991. Other starting materials or early intermediates may be prepared by elaboration of the materials listed above, for example, by methods well known to a person of ordinary skill in the art.

The starting materials, intermediates, and compounds of this invention may be isolated and purified using conventional techniques, including precipitation, filtration, distillation, crystallization, chromatography, and the like. The compounds may be characterized using conventional methods, including physical constants and spectroscopic methods.

Pharmacology and Utility

The compounds provided herein can be used as such, be administered in the form of pharmaceutically acceptable salts derived from inorganic or organic acids, or used in combination with one or more pharmaceutically acceptable excipients. The phrase "pharmaceutically acceptable salt" means those salts which are, within the scope of sound medical judgment, suitable for use in contact with the tissues without undue toxicity, irritation, allergic response, and the like, and are commensurate with a reasonable benefit/risk ratio. Pharmaceutically acceptable salts are well known in the art. The salts can be prepared either *in situ* during the final isolation and purification of the compounds provided herein or separately by reacting the acidic or basic drug substance with a suitable base or acid respectively. Typical salts derived from organic or inorganic acids include, but are not limited to hydrochloride, hydrobromide, hydroiodide, acetate, adipate, alginate, citrate, aspartate, benzoate, bisulfate, gluconate, fumarate, hydroiodide, lactate, maleate, oxalate, palmitoate, pectinate, succinate, tartrate, phosphate, glutamate, and bicarbonate. Typical salts derived from organic or inorganic bases include, but are not limited to

lithium, sodium, potassium, calcium, magnesium, ammonium, monoalkylammonium such as meglumine, dialkylammonium, trialkylammonium, and tetralkylammonium.

Actual dosage levels of active ingredients and the mode of administration of the pharmaceutical compositions provided herein can be varied in order to achieve the effective therapeutic response for a particular patient. The phrase "therapeutically effective amount" of the compound provided herein means a sufficient amount of the compound to treat disorders, at a reasonable benefit/risk ratio applicable to any medical treatment. It will be understood, however, that the total daily usage of the compounds and compositions of the provided will be decided by the attending physician within the scope of sound medical judgment. The total daily dose of the compounds provided herein may range from about 0.1 to about 1000 mg/kg/day. For purposes of oral administration, doses can be in the range from about 1 to about 500 mg/kg/day. If desired, the effective daily dose can be divided into multiple doses for purposes of administration; consequently, single dose compositions may contain such amounts or submultiples thereof to make up the daily dose. The specific therapeutically effective dose level for any particular patient will depend upon a variety of factors including the disorder being treated and the severity of the disorder; medical history of the patient, activity of the specific compound employed; the specific composition employed, age, body weight, general health, sex and diet of the patient, the time of administration, route of administration, the duration of the treatment, rate of excretion of the specific compound employed, drugs used in combination or coincidental with the specific compound employed; and the like.

The compounds provided can be formulated together with one or more non-toxic pharmaceutically acceptable diluents, carriers, adjuvants, and antibacterial and antifungal agents such as parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, and the like. Proper fluidity can be maintained, for example, by the use of coating materials such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersions, and by the use of surfactants. In some cases, in order to prolong the effect of the drug, it is desirable to decrease the rate of absorption of the drug from subcutaneous or intramuscular injection. This can be accomplished by suspending crystalline or amorphous drug substance in a vehicle having poor water solubility such as oils. The rate of absorption of the drug then depends upon its rate of dissolution, which, in turn, may depend upon crystal size and crystalline form. Prolonged absorption of an injectable

pharmaceutical form can be achieved by the use of absorption delaying agents such as aluminum monostearate or gelatin.

The compound provided herein can be administered enterally or parenterally in solid or liquid forms. Compositions suitable for parenteral injection may comprise physiologically acceptable, isotonic sterile aqueous or nonaqueous solutions, dispersions, suspensions, or emulsions, and sterile powders for reconstitution into sterile injectable solutions or dispersions. Examples of suitable aqueous and nonaqueous carriers, diluents, solvents or vehicles include water, ethanol, polyols (propyleneglycol, polyethyleneglycol, glycerol, and the like), vegetable oils (such as olive oil), injectable organic esters such as ethyl oleate, and suitable mixtures thereof. These compositions can also contain adjuvants such as preserving, wetting, emulsifying, and dispensing agents. Suspensions, in addition to the active compounds, may contain suspending agents such as ethoxylated isostearyl alcohols, polyoxyethylene sorbitol and sorbitan esters, microcrystalline cellulose, aluminum metahydroxide, bentonite, agar-agar and tragacanth, or mixtures of these substances.

The compounds provided herein can also be administered by injection or infusion, either subcutaneously or intravenously, or intramuscularly, or intrasternally, or intranasally, or by infusion techniques in the form of sterile injectable or oleaginous suspension. The compound may be in the form of a sterile injectable aqueous or oleaginous suspensions. These suspensions may be formulated according to the known art using suitable dispersing of wetting agents and suspending agents that have been described above. The sterile injectable preparation may also be a sterile injectable solution or suspension in a non-toxic parenterally-acceptable diluent or solvent for example, as a solution in 1,3-butanediol. Among the acceptable vehicles and solvents that may be employed are water, Ringer's solution and isotonic sodium chloride solution. In addition, sterile, fixed oils are conventionally employed as a solvent or suspending medium. For this purpose any bland fixed oils may be conventionally employed including synthetic mono- or diglycerides. In addition fatty acids such as oleic acid find use in the preparation of injectables. Dosage regimens can be adjusted to provide the optimum therapeutic response. For example, several divided dosages may be administered daily or the dosage may be proportionally reduced as indicated by the exigencies of the therapeutic situation.

Injectable depot forms are made by forming microencapsule matrices of the drug in biodegradable polymers such as polylactide-polyglycolide. Depending upon the ratio of drug to

polymer and the nature of the particular polymer employed, the rate of drug release can be controlled. Examples of other biodegradable polymers include poly(orthoesters) and poly(anhydrides). Depot injectable formulations are also prepared by entrapping the drug in liposomes or microemulsions which are compatible with body tissues. The injectable formulations can be sterilized, for example, by filtration through a bacterial-retaining filter or by incorporating sterilizing agents in the form of sterile solid compositions which can be dissolved or dispersed in sterile water or other sterile injectable medium just prior to use.

Solid dosage forms for oral administration include capsules, tablets, pills, powders and granules. In such solid dosage forms, the active compound may be mixed with at least one inert, pharmaceutically acceptable excipient or carrier, such as sodium citrate or dicalcium phosphate and/or (a) fillers or extenders such as starches, lactose, sucrose, glucose, mannitol and silicic acid; (b) binders such as carboxymethylcellulose, alginates, gelatin, polyvinylpyrrolidone, sucrose and acacia; (c) humectants such as glycerol; (d) disintegrating agents such as agar-agar, calcium carbonate, potato or tapioca starch, alginic acid, certain silicates and sodium carbonate; (e) solution retarding agents such as paraffin; (f) absorption accelerators such as quaternary ammonium compounds; (g) wetting agents such as cetyl alcohol and glycerol monostearate; (h) absorbents such as kaolin and bentonite clay and (i) lubricants such as talc, calcium stearate, magnesium stearate, solid polyethylene glycols, sodium lauryl sulfate and mixtures thereof. In the case of capsules, tablets and pills, the dosage form may also comprise buffering agents. Solid compositions of a similar type may also be employed as fillers in soft and hard-filled gelatin capsules using such excipients as lactose or milk sugar as well as high molecular weight polyethylene glycols and the like.

The solid dosage forms of tablets, dragees, capsules, pills and granules can be prepared with coatings and shells such as enteric coatings and other coatings well-known in the pharmaceutical formulating art. They may optionally contain opacifying agents and may also be of a composition such that they release the active ingredient(s) only, or preferentially, in a certain part of the intestinal tract, optionally, in a delayed manner. Examples of embedding compositions which can be used include polymeric substances and waxes. Tablets contain the compound in admixture with non-toxic pharmaceutically acceptable excipients that are suitable for the manufacture of tablets. These excipients may be for example, inert diluents, such as calcium carbonate, sodium carbonate, lactose, calcium phosphate or sodium phosphate;

granulating and disintegrating agents, for example, maize starch or alginic acid; binding agents, for example, maize starch, gelatin or acacia, and lubricating agents, for example, magnesium stearate or stearic acid or tale. The tablets may be uncoated or they may be coated by known techniques to delay disintegration and absorption in the gastrointestinal tract and thereby provide a sustained action over a longer period. For example, a time delay material such as glycerol monostearate or glycerol distearate may be employed. Formulations for oral use may also be presented as hard gelatin capsules wherein the compound is mixed with an inert solid diluent, for example, calcium carbonate, calcium phosphate or kaolin, or as soft gelatin capsules wherein the active ingredient is mixed with water or an oil medium, for example, peanut oil, liquid paraffin or olive oil.

Liquid dosage forms for oral administration include pharmaceutically acceptable emulsions, solutions, suspensions, syrups and elixirs. In addition to the active compounds, the liquid dosage forms may contain inert diluents commonly used in the art such as, for example, water or other solvents, solubilizing agents and emulsifiers such as ethyl alcohol, isopropyl alcohol, ethyl carbonate, ethyl acetate, benzyl alcohol, benzyl benzoate, propylene glycol, 1,3-butylene glycol, dimethyl formamide, oils (in particular, cottonseed, groundnut, corn, germ, olive, castor and sesame oils), glycerol, tetrahydrofurfuryl alcohol, polyethylene glycols and fatty acid esters of sorbitan and mixtures thereof. Besides inert diluents, the oral compositions may also include adjuvants such as wetting agents, emulsifying and suspending agents, sweetening, flavoring and perfuming agents.

Aqueous suspensions contain the compound in admixture with excipients suitable for the manufacture of aqueous suspensions. Such excipients are suspending agents, for example, sodium carboxymethylcellulose, methylcellulose, hydroxypropylmethyl cellulose, sodium alginate, polyvinylpyrrolidone, gum tragacanth and gum acacia; dispersing or wetting agents may be naturally occurring phosphatides, for example lecithin, or condensation products of an alkylene oxide with fatty acids, for example polyoxyethylene stearate, or condensation products of ethylene oxide with long chain aliphatic alcohols, for example, heptadecaethyleneoxycetanol, or condensation products of ethylene oxide with partial esters derived from fatty acids such as hexitol such as polyoxyethylene sorbitol monooleate, or condensation products of ethylene oxide with partial esters from fatty acids and a hexitol anhydrides, for example, polyethylene sorbitan monooleate. The aqueous suspensions may also contain one or more preservatives, for example,

ethyl or n-propyl p-hydroxybenzoate, one or more coloring agents, one or more flavoring agents, or one or more sweetening agents, such as sucrose or saccharin.

Oily suspensions may be formulated by suspending the compound in a vegetable oil, for example arachis oil, olive oil, sesame oil, or coconut oil or in a mineral oil such as liquid paraffin. The oily suspensions may contain a thickening agent, for example beeswax, hard paraffin or cetyl alcohol. Sweetening agents, such as those set forth below, and flavoring agents may be added to provide a palatable oral preparation. These compositions may be preserved by the addition of an antioxidant such as ascorbic acid. Dispersible powders and granules suitable for preparation of an aqueous suspension by the addition of water provide the active ingredient in admixture with a dispersing or wetting agent, a suspending agent and one or more preservatives. Suitable dispersing or wetting agents and suspending agents are exemplified by those already described above. Additional excipients, for example sweetening, flavoring and agents, may also be present.

The compounds provided herein may also be in the form of oil-in-water emulsions. The oily phase may be a vegetable oil, for example olive oil or arachis oils, or a mineral oil, for example liquid paraffin or mixtures of these. Suitable emulsifying agents may be naturally-occurring gums, for example gum acacia or gum tragacanth, naturally occurring phosphatides, for example soy bean, lecithin, and occurring phosphatides, for example soy bean, lecithin, and esters or partial esters derived from fatty acids and hexitol anhydrides, for example sorbitan monooleate, and condensation products of the said partial esters with ethylene oxide, for example polyoxyethylene sorbitan monooleate. The emulsion may also contain sweetening and flavoring agents. Syrups and elixirs may be formulated with sweetening agents, for example, glycerol, sorbitol or sucrose. Such formulations may also contain a demulcent, a preservative and flavoring and coloring agents.

In one embodiment, the compounds are formulated in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subjects to be treated; each containing a therapeutically effective quantity of the compound and at least one pharmaceutical excipient. A drug product will comprise a dosage unit form within a container that is labeled or accompanied by a label indicating the intended method of treatment, such as the treatment of an β -amyloid disease, for example an amyloidosis such as Alzheimer's disease or a disease associated with α -synuclein fibril formation such as Parkinson's disease. Compositions for rectal or vaginal

administration are preferably suppositories which can be prepared by mixing the compounds provided herein with suitable non-irritating excipients or carriers such as cocoa butter, polyethylene glycol or a suppository wax which are solid at room temperature but liquid at body temperature and therefore melt in the rectum or vaginal cavity and release the active compound.

Compounds provided herein can also be administered in the form of liposomes. Methods to form liposomes are known in the art (Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology* 1976, Volume XIV, Academic Press, New York, N.Y.) As is known in the art, liposomes are generally derived from phospholipids or other lipid substances. Liposomes are formed by mono- or multi-lamellar hydrated liquid crystals which are dispersed in an aqueous medium. Any non-toxic, physiologically acceptable and metabolizable lipid capable of forming liposomes can be used. The present compositions in liposome form can contain, in addition to a compound provided herein, stabilizers, preservatives, excipients and the like. The preferred lipids are natural and synthetic phospholipids and phosphatidyl cholines (lecithins).

The compounds provided herein can also be administered in the form of a 'prodrug' wherein the active pharmaceutical ingredients, are released *in vivo* upon contact with hydrolytic enzymes such as esterases and phosphatases in the body. The term "pharmaceutically acceptable prodrugs" as used herein represents those prodrugs of the compounds provided herein, which are, within the scope of sound medical judgment, suitable for use in contact with the tissues without undue toxicity, irritation, allergic response, and the like, commensurate with a reasonable benefit/risk ratio, and effective for their intended use. A thorough discussion is provided in T. Higuchi and V. Stella (Higuchi, T. and Stella, V. Pro-drugs as Novel Delivery Systems, V. 14 of the A.C.S. Symposium Series; Edward B. Roche, Ed., *Bioreversible Carriers in Drug Design* 1987, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press), which is incorporated herein by reference.

The compounds provided herein, or pharmaceutically acceptable derivatives thereof, may also be formulated to be targeted to a particular tissue, receptor, or other area of the body of the subject to be treated. Many such targeting methods are well known to those of skill in the art. All such targeting methods are contemplated herein for use in the instant compositions. For non-limiting examples of targeting methods, see, e.g., U.S. Patent Nos. 6,316,652, 6,274,552, 6,271,359, 6,253,872, 6,139,865, 6,131,570, 6,120,751, 6,071,495, 6,060,082, 6,048,736, 6,039,975, 6,004,534, 5,985,307, 5,972,366, 5,900,252, 5,840,674, 5,759,542 and 5,709,874.

In one embodiment, liposomal suspensions, including tissue-targeted liposomes, such as tumor-targeted liposomes, may also be suitable as pharmaceutically acceptable carriers. These may be prepared according to methods known to those skilled in the art. For example, liposome formulations may be prepared as described in U.S. Patent No. 4,522,811. Briefly, liposomes such as multilamellar vesicles (MLV's) may be formed by drying down egg phosphatidyl choline and brain phosphatidyl serine (7:3 molar ratio) on the inside of a flask. A solution of a compound provided herein in phosphate buffered saline lacking divalent cations (PBS) is added and the flask shaken until the lipid film is dispersed. The resulting vesicles are washed to remove unencapsulated compound, pelleted by centrifugation, and then resuspended in PBS.

Sustained Release Formulations

The invention also includes the use of sustained release formulations to deliver the compounds of the present invention to the desired target (i.e. brain or systemic organs) at high circulating levels (between 10^{-9} and 10^{-4} M) are also disclosed. In a preferred embodiment for the treatment of Alzheimer's or Parkinson's disease, the circulating levels of the compounds is maintained up to 10^{-7} M. The levels are either circulating in the patient systemically, or in a preferred embodiment, present in brain tissue, and in a most preferred embodiments, localized to the β -amyloid or α -synuclein fibril deposits in brain or other tissues.

It is understood that the compound levels are maintained over a certain period of time as is desired and can be easily determined by one skilled in the art using this disclosure and compounds of the invention. In a preferred embodiment, the invention includes a unique feature of administration comprising a sustained release formulation so that a constant level of therapeutic compound is maintained between 10^{-8} and 10^{-6} M between 48 to 96 hours in the sera.

Such sustained and/or timed release formulations may be made by sustained release means of delivery devices that are well known to those of ordinary skill in the art, such as those described in US Patent Nos. 3,845,770; 3,916,899; 3,536,809; 3,598,123; 4,008,719; 4,710,384; 5,674,533; 5,059,595; 5,591,767; 5,120,548; 5,073,543; 5,639,476; 5,354,556 and 5,733,566, the disclosures of which are each incorporated herein by reference. These pharmaceutical compositions can be used to provide slow or sustained release of one or more of the active compounds using, for example, hydroxypropylmethyl cellulose, other polymer matrices, gels, permeable membranes, osmotic systems, multilayer coatings, microparticles, liposomes,

microspheres, or the like. Suitable sustained release formulations known to those skilled in the art, including those described herein, may be readily selected for use with the pharmaceutical compositions of the invention. Thus, single unit dosage forms suitable for oral administration, such as, but not limited to, tablets, capsules, gelcaps, caplets, powders and the like, that are adapted for sustained release are encompassed by the present invention.

In a preferred embodiment, the sustained release formulation contains active compound such as, but not limited to, microcrystalline cellulose, maltodextrin, ethylcellulose, and magnesium stearate. As described above, all known methods for encapsulation which are compatible with properties of the disclosed compounds are encompassed by this invention. The sustained release formulation is encapsulated by coating particles or granules of the pharmaceutical composition of the invention with varying thickness of slowly soluble polymers or by microencapsulation. In a preferred embodiment, the sustained release formulation is encapsulated with a coating material of varying thickness (e.g. about 1 micron to 200 microns) that allow the dissolution of the pharmaceutical composition about 48 hours to about 72 hours after administration to a mammal. In another embodiment, the coating material is a food-approved additive.

In another embodiment, the sustained release formulation is a matrix dissolution device that is prepared by compressing the drug with a slowly soluble polymer carrier into a tablet. In one preferred embodiment, the coated particles have a size range between about 0.1 to about 300 microns, as disclosed in U.S. Patent Nos. 4,710,384 and 5,354,556, which are incorporated herein by reference in their entireties. Each of the particles is in the form of a micromatrix, with the active ingredient uniformly distributed throughout the polymer.

Sustained release formulations such as those described in U.S. Patent No. 4,710,384, which is incorporated herein by reference in its entirety, having a relatively high percentage of plasticizer in the coating in order to permit sufficient flexibility to prevent substantial breakage during compression are disclosed. The specific amount of plasticizer varies depending on the nature of the coating and the particular plasticizer used. The amount may be readily determined empirically by testing the release characteristics of the tablets formed. If the medicament is released too quickly, then more plasticizer is used. Release characteristics are also a function of the thickness of the coating. When substantial amounts of plasticizer are used, the sustained release capacity of the coating diminishes. Thus, the thickness of the coating may be increased

slightly to make up for an increase in the amount of plasticizer. Generally, the plasticizer in such an embodiment will be present in an amount of about 15 to 30 % of the sustained release material in the coating, preferably 20 to 25 %, and the amount of coating will be from 10 to 25% of the weight of the active material, preferably 15 to 20 %. Any conventional pharmaceutically acceptable plasticizer may be incorporated into the coating.

The compounds of the invention can be formulated as a sustained and/or timed release formulation. All sustained release pharmaceutical products have a common goal of improving drug therapy over that achieved by their non-sustained counterparts. Ideally, the use of an optimally designed sustained release preparation in medical treatment is characterized by a minimum of drug substance being employed to cure or control the condition. Advantages of sustained release formulations may include: 1) extended activity of the composition, 2) reduced dosage frequency, and 3) increased patient compliance. In addition, sustained release formulations can be used to affect the time of onset of action or other characteristics, such as blood levels of the composition, and thus can affect the occurrence of side effects.

The sustained release formulations of the invention are designed to initially release an amount of the therapeutic composition that promptly produces the desired therapeutic effect, and gradually and continually release of other amounts of compositions to maintain this level of therapeutic effect over an extended period of time. In order to maintain this constant level in the body, the therapeutic composition must be released from the dosage form at a rate that will replace the composition being metabolized and excreted from the body.

The sustained release of an active ingredient may be stimulated by various inducers, for example pH, temperature, enzymes, water, or other physiological conditions or compounds. The term "sustained release component" in the context of the present invention is defined herein as a compound or compounds, including, but not limited to, polymers, polymer matrices, gels, permeable membranes, liposomes, microspheres, or the like, or a combination thereof, that facilitates the sustained release of the active ingredient.

If the complex is water-soluble, it may be formulated in an appropriate buffer, for example, phosphate buffered saline, or other physiologically compatible solutions. Alternatively, if the resulting complex has poor solubility in aqueous solvents, then it may be formulated with a non-ionic surfactant such as Tween, or polyethylene glycol. Thus, the compounds and their

physiologically solvents may be formulated for administration by inhalation or insufflation (either through the mouth or the nose) or oral, buccal, parenteral, or rectal administration, as examples.

Preparations for oral administration may be suitably formulated to give controlled release of the active compound. In a preferred embodiment, the compounds of the present invention are formulated as controlled release powders of discrete microparticles that can be readily formulated in liquid form. The sustained release powder comprises particles containing an active ingredient and optionally, an excipient with at least one non-toxic polymer.

The powder can be dispersed or suspended in a liquid vehicle and will maintain its sustained release characteristics for a useful period of time. These dispersions or suspensions have both chemical stability and stability in terms of dissolution rate. The powder may contain an excipient comprising a polymer, which may be soluble, insoluble, permeable, impermeable, or biodegradable. The polymers may be polymers or copolymers. The polymer may be a natural or synthetic polymer. Natural polymers include polypeptides (e.g., zein), polysaccharides (e.g., cellulose), and alginic acid. Representative synthetic polymers include those described, but not limited to, those described in column 3, lines 33-45 of U.S. Patent No. 5,354,556, which is incorporated by reference in its entirety. Particularly suitable polymers include those described, but not limited to those described in column 3, line 46-column 4, line 8 of U.S. Patent No. 5,354,556 which is incorporated by reference in its entirety.

The sustained release compounds of the invention may be formulated for parenteral administration, e.g., by intramuscular injections or implants for subcutaneous tissues and various body cavities and transdermal devices. In one embodiment, intramuscular injections are formulated as aqueous or oil suspensions. In an aqueous suspension, the sustained release effect is due to, in part, a reduction in solubility of the active compound upon complexation or a decrease in dissolution rate. A similar approach is taken with oil suspensions and solutions, wherein the release rate of an active compound is determined by partitioning of the active compound out of the oil into the surrounding aqueous medium. Only active compounds which are oil soluble and have the desired partition characteristics are suitable. Oils that may be used for intramuscular injection include, but are not limited to, sesame, olive, arachis, maize, almond, soybean, cottonseed and castor oil.

A highly developed form of drug delivery that imparts sustained release over periods of time ranging from days to years is to implant a drug-bearing polymeric device subcutaneously or

in various body cavities. The polymer material used in an implant, which must be biocompatible and nontoxic, include but are not limited to hydrogels, silicones, polyethylenes, ethylene-vinyl acetate copolymers, or biodegradable polymers.

Evaluation of the activity of the compounds

The biological activity of the compounds provided herein as disruptors/inhibitors of Alzheimer's disease β -amyloid protein ($A\beta$) fibrils, and Parkinson's disease α -synuclein aggregates was assessed by determining the efficacy of the compounds to cause a disassembly/disruption of pre-formed amyloid fibrils of Alzheimer's disease (i.e. consisting of $A\beta$ 1-42 fibrils), and Parkinson's disease α -synuclein aggregates. In one study, Thioflavin T fluorometry was used to determine the effects of the compounds, and of EDTA (as a negative control). In this assay Thioflavin T binds specifically to fibrillar amyloid, and this binding produces a fluorescence enhancement at 485 nm that is directly proportional to the amount of fibrils present. The higher the fluorescence, the greater the amount of fibrils or aggregates present (Naki et al, *Lab. Invest.* 65:104-110, 1991; Levine III, *Protein Sci.* 2:404-410, 1993; *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* 2:1-6, 1995).

In the Congo red binding assay the ability of a given test compound to alter amyloid ($A\beta$ 1-42 fibrils, or α -synuclein aggregates) binding to Congo red was quantified. In this assay, $A\beta$ 1-42 fibrils, or α -synuclein aggregates and test compounds were incubated for 3 days and then vacuum filtered through a 0.2 μ m filter. The amount of $A\beta$ 1-42 fibrils, or α -synuclein aggregates retained in the filter was then quantitated following staining of the filter with Congo red. After appropriate washing of the filter, any lowering of the Congo red color on the filter in the presence of the test compound (compared to the Congo red staining of the amyloid protein in the absence of the test compound) was indicative of the test compound's ability to diminish/alter the amount of aggregated and congophilic $A\beta$ 1-42 fibrils, or α -synuclein aggregates.

Combination therapy

In another embodiment, the compounds may be administered in combination, or sequentially, with another therapeutic agent. Such other therapeutic agents include those known for treatment, prevention, or amelioration of one or more symptoms of amyloidosis and synuclein diseases. Such therapeutic agents include, but are not limited to, donepezil hydrochloride

(Aracept), rivastigmine tartrate (Exelon), tacrine hydrochloride (Cognex) and galantamine hydrobromide (Reminyl).

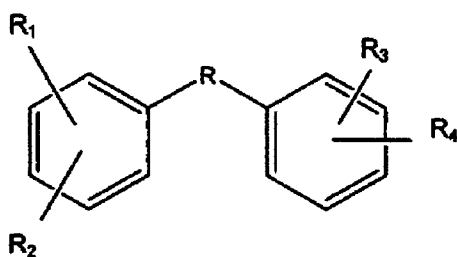
Methods of use of the compounds and compositions

The compounds and compositions provided herein are useful in methods of treatment, prevention, or amelioration of one or more symptoms of β -amyloid diseases or disorders, including but not limited to diseases associated with the formation, deposition, accumulation, or persistence of β -amyloid fibrils. In certain embodiments, the compounds and compositions provided herein are used for treatment, prevention, or amelioration of one or more symptoms of diseases including, but not limited to of Alzheimer's disease. Down's syndrome, hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of the Dutch type, and cerebral β -amyloid angiopathy.

Also provided are methods to inhibit or prevent α -synuclein fibril formation, methods to inhibit or prevent α -synuclein fibril growth, and methods to cause disassembly, disruption, and/or disaggregation of preformed α -synuclein aggregates and α -synuclein-associated protein deposits.

In certain embodiments, the synuclein diseases or synucleinopathies treated, prevented or whose symptoms are ameliorated by the compounds and compositions provided herein include, but are not limited to diseases associated with the formation, deposition, accumulation, or persistence of synuclein aggregates, including α -synuclein fibrils. In certain embodiments, such diseases include Parkinson's disease, familial Parkinson's disease, Lewy body disease, the Lewy body variant of Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, multiple system atrophy, and the Parkinsonism-dementia complex of Guam.

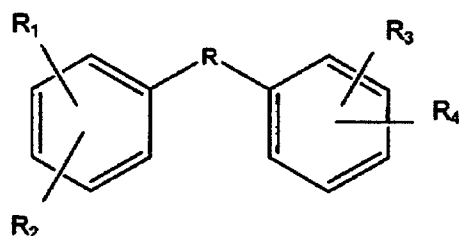
In one embodiment there is a compound selected from the group consisting of:



where R₁, R₂, R₃, and R₄ are independently positioned hydroxyl groups and R is selected from heteroaryl, -C(O)NR', sulfonamide, tricycloalkyl or pharmaceutically acceptable esters or salts thereof and where R' is selected from H or CH₃, and

such that when R is $-C(O)NR'$ and one of either the R_1 and R_2 hydroxyl groups or the R_3 and R_4 hydroxyl groups are at the 3,4 position, then the other hydroxyl groups are at one of the positions selected from the group consisting of 2,3; 2,4; 2,5; 2,6; 3,5; 3,6; 4,5; 4,6 and 5,6.

In another embodiment there is provided a compound selected from the group consisting of



where R_1 , R_2 , R_3 , and R_4 are independently positioned hydroxyl groups, R is $-C(O)NR'$ and R' is selected from H or CH_3 , and when one of either the R_1 and R_2 hydroxyl groups or the R_3 and R_4 hydroxyl groups are at the 3,4 position, then the other hydroxyl groups are at one of the positions selected from the group consisting of 2,3; 2,4; 2,5; 2,6; 3,5; 3,6; 4,5; 4,6 and 5,6, and pharmaceutically acceptable salts thereof.

In another embodiment there is provided a pharmaceutical composition comprising the compounds of this invention and a pharmaceutically acceptable excipient.

In another embodiment there is provided a method of treating the formation, deposition, accumulation, or persistence of A β amyloid or α -synuclein aggregates, comprising treating the aggregates with an effective amount of the compounds of this invention.

In another embodiment there is provided a method of treating a β -amyloid disease or a synucleinopathy in a mammal suffering therefrom, comprising administration of a therapeutically effective amount of the compounds of this invention.

In another embodiment there is provided a method of improving motor performance in a mammal suffering from a synucleinopathy, comprising administration of a therapeutically effective amount of the compounds of this invention.

In another embodiment there is provided a method of arresting the progression of motor deficits in a mammal suffering from Parkinson's disease, comprising administration of a therapeutically effective amount of the compounds of this invention.

The following non-limiting Examples are given by way of illustration only and are not considered a limitation of this invention, many apparent variations of which are possible without departing from the spirit or scope thereof.

EXAMPLES

General Experimental Procedures

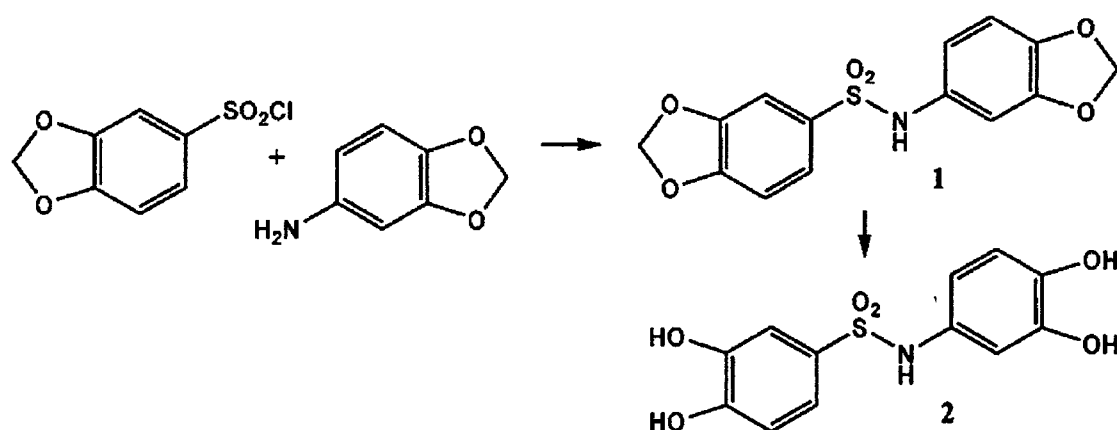
All solvents were distilled before use and were removed by rotary evaporation at temperatures up to 35 °C. Merck silica gel 60, 200–400 mesh, 40–63 µm, was used for silica gel flash chromatography. TLC was carried out using Merck DC-plastikfolien Kieselgel 60 F254, first visualised with a UV lamp, and then by dipping in a vanillin solution (1 % vanillin, 1 % H₂SO₄ in EtOH), and heating. Mass spectra were recorded on a Kratos MS-80 instrument. NMR spectra, at 25°C, were recorded at 500 or 300 MHz for ¹H and 125 or 75 MHz for ¹³C on Varian INOVA-500 or VXR-300 spectrometers. Chemical shifts are given in ppm on the δ scale referenced to the solvent peaks: CHCl₃ at 7.25 and CDCl₃ at 77.0 ppm or (CH₃)₂CO at 2.15 and (CD₃)₂CO at 30.5 ppm or CH₃OD at 3.30 and CD₃OD at 39.0 ppm.

HPLC Conditions

Samples were analysed using an Agilent HP1100 instrument, operated with EzChrom Elite software, and fitted with a C18 column (Phenomenex Prodigy 5 µm 100A, 250 x 4.6 mm) with a guard column (Phenomenex ODS 4 x 3 mm, 5 µm) held at 30 °C. Peaks were detected at 280 nm. The mobile phase was acetonitrile in water (with 0.1 % TFA): t₀=11%, t₂₀=11%, t₃₀=100%, t₃₁=11%, t₄₀=11%. The flow rate was 1 mL/min and the injection volume of 5 µL.

Example 1: Synthesis of Sulfonamide 2

3,4 dihydroxybenzenesulfonic acid 3,4 dihydroxyphenylsulfonamide (Compound 5)



Synthesis of the sulfonamide 2 was accomplished by reaction of 3,4-methylenedioxybenzenesulfonyl chloride (prepared from 1,2-methylenedioxybenzene (Tao, E.V.P.; Miller, W.D. U.S. Patent 5,387,681. 1995)) with 3,4-methylenedioxyaniline to give the sulfonamide 1 in good yield. Deprotection with boron tribromide under standard conditions gave the free phenolic sulfonamide in reasonable yield.

To a stirred solution of 1,3-benzodioxole-5-sulfonyl chloride (Tao, E.V.P.; Miller, W.D. U.S. Patent 5,387,681. 1995) (1 g) in dichloromethane (DCM) (10 ml) was added a solution of 3,4-methylenedioxyaniline (0.62 g) in dichloromethane (10 ml) followed by pyridine (1 ml). The mixture was refluxed for 2 hours, cooled, diluted with dichloromethane (150 ml), washed with aqueous HCl (1M, 2 x 100 ml), dried, then evaporated *in vacuo* to give the crude product as a brown gum. Purification by column chromatography over silica gel eluting with 5 – 10% ethyl acetate in dichloromethane gave the pure sulphonamide 1 as a pale brown gum (1.34 g, 92%). Crystallisation from 95% ethanol gave the product as pale brown crystals.

HPLC 29.6 minutes.

^1H NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 8.75 (1H, s), 7.39 (2H, dd, J 2, 9Hz), 7.24 (1H, d, J 2Hz), 7.02 (1H, d, J 9Hz), 6.86 (1H, d, J 2Hz), 6.81 (1H, d, J 9Hz), 6.72 (2H, dd, J 2, 9Hz), 6.23 (2H, s) and 6.06 (2H, s).

HREIMS Found, 344.0201; MNa^+ , $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NNaO}_6\text{S}$ requires 344.0199.

To a solution of the sulphonamide 1 (0.7 g) in dry DCM (50 ml) was added boron tribromide (0.5 ml) and the mixture left at room temperature for 3 hours. Methanol (dropwise then 5 ml) was added carefully then the reaction left at room temperature for 24 hours. The mixture

was evaporated *in vacuo* to 1 ml, then more methanol (20 ml) was added, this was repeated four times, then the solvents were removed by evaporation *in vacuo*.

Purification by column chromatography over silica gel eluting with 0 – 20% methanol in chloroform gave the product as a pale brown gum. Further purification over C-18 reverse phase silica eluting with 0 – 50% acetonitrile in water, followed by freeze drying, gave the pure product 2 as a light brown powder (295 mg, 45%).

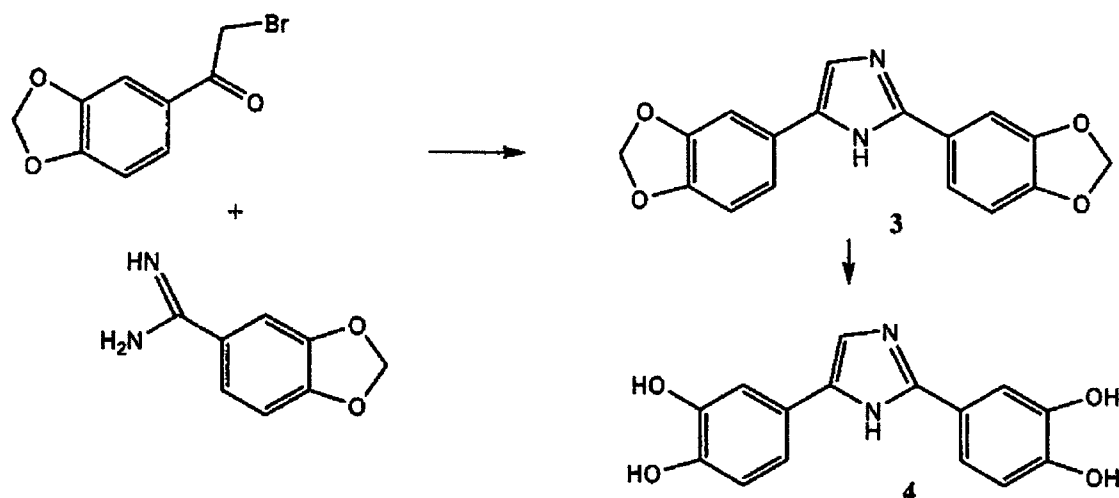
HPLC 12.9 minutes 95%

¹H NMR (CD₃OD) 7.05 (1H, d, J 2Hz), 7.03 (2H, dd, J 2, 9Hz), 6.76 (1H, d, J 9Hz), 6.57 (1H, d, J 2Hz), 6.56 (1H, d, J 9Hz) and 6.31 (2H, dd, J 2, 9Hz).

HREIMS Found, 296.0241, M⁺, C₁₂H₁₀NO₆S requires, 296.0234.

Example 2: Synthesis of Imidazole 4

2,4 bis (3,4 dihydroxyphenyl) imidazole (Compound 6)



The imidazole ring was formed according to the method described by Li *et al.* (Li *et al.* Organic Process Research and Development 2002, 6, 682-3) from the amidinobenzene, formed from piperonylonitrile (Thurkauf *et al.* J Med Chem. 1995, 38 (12), 2251-2255) and the bromoketone (Castedo *et al.* Tetrahedron 1982, 38 (11), 1569 – 70) formed from 3,4-methylenedioxyacetophenone according to the method described by Lee *et al.* (Korean Chem Soc. 2003, 24 (4), 407 – 408). Deprotection with boron tribromide under standard conditions gave the free phenolic imidazole in good yield.

According to the process described by Li, a mixture of 3-amidinobenzene (Thurkauf *et al.* J Med Chem. 1995, 38 (12), 2251-2255) (0.5 g, 3 mmol) and potassium bicarbonate (1.20 g, 12 mmol) in tetrahydrofuran (THF) (16 ml) and water (4 ml) was heated vigorously at reflux. Bromoketone (Castedo *et al.* Tetrahedron 1982, 38 (11), 1569 – 70; and Lee *et al.* Korean Chem Soc. 2003, 24 (4), 407 – 408) (0.729 g, 3 mmol) in THF (4 ml) was added over 30 minutes and reflux was maintained for a further 2 hours. The THF was then removed by evaporation *in vacuo* and the residue extracted into ethyl acetate, dried and evaporated *in vacuo* to give the crude product as a brown solid. Crystallisation from 95% ethanol gave the pure imidazole 3 as a pale yellow crystalline solid (0.54 g, 58%).

HPLC 27.9 minutes. NMR ((CD₃)₂CO) 7.45 – 7.70 (5H, m), 7.02 (1H, d, J 9Hz), 6.95 (1H, d, J 9Hz), 6.15 (2H, s) and 6.09

(2H, s)HREIMS Found, 309.0875; MH⁺, C₁₇H₁₂N₂O₄ requires, 309.0870.

To a solution of the imidazole 3 (0.5 g) in dry DCM (50 ml) was added boron tribromide (1.0 ml) and the mixture left at room temperature for 3 hours. Methanol (dropwise then 5 ml) was added carefully then the reaction left at room temperature for 24 hours. The mixture was evaporated *in vacuo* to 1 ml, then more methanol (30 ml) was added, this was repeated four times, then the solvents were removed by evaporation *in vacuo*.

Purification by column chromatography over silica gel eluting with 0 – 20% methanol in chloroform gave the product 4 as a pale brown solid (0.27 g, 58%).

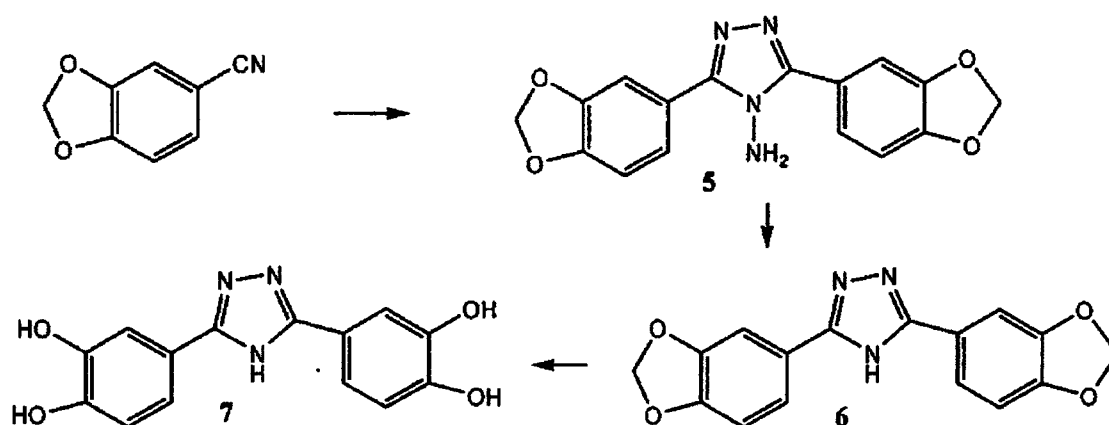
HPLC 16.3 minutes 99%

¹H NMR (CD₃OD) 7.59 (1H, s), 7.36 (1H, d, J 2Hz), 7.31 (2H, dd, J 2, 9Hz), 7.16 (1H, d, J 2Hz), 7.10 (2H, dd, J 2, 9Hz), 6.98 (1H, d, J 9Hz) and 6.88 (1H, d, J 9Hz).

HREIMS Found, 285.0873; MH⁺, C₁₅H₁₃N₂O₄ requires 285.0870.

Example 3: Synthesis of Triazole 7

3,5 bis (3,4 dihydroxyphenyl) 1,2,4 triazole (Compound 7)



The 4-aminotriazole ring was formed by a dimerization reaction of piperonylnitrile according to the method described by Bentiss (Bentiss *et al.* J Heterocyclic Chem. 1999, 36, 149-152) and then deamination was carried out according to the method described by Bentiss (Bentiss *et al.* J. Heterocyclic Chem. 2002, 39, 93 – 96.) to give the triazole 6 in good yield. Deprotection with boron tribromide under standard conditions gave the free phenolic triazole 7 in good yield.

According to the process described by Bentiss (Bentiss *et al.* J Heterocyclic Chem. 1999, 36, 149-152) a mixture of aromatic nitrile (1 g), hydrazine hydrate (1 g) and hydrazine hydrochloride (0.5 g) in solution in ethylene glycol (5 ml) was heated to 130°C for 5 hours. The solution was cooled then diluted with water (7 ml), the solid product was filtered, washed with DCM then dried to give the crude product. Recrystallisation from methanol gave the pure 4-aminotriazole 5, as a pale yellow solid (0.65 g, 66%).

HPLC 27.0 minutes.

¹H NMR ((CD₃)₂CO) 7.62 (2H, dd, J 2, 9Hz), 7.42 (2H, d, J 2Hz), 6.94 (2H, d, J 9Hz), 6.15 (2H, s) and 5.93 (4H, s).

HREIMS Found, 325.0937; MH⁺, C₁₆H₁₃N₄O₄ requires 325.0931.

According to the process described by Bentiss (Bentiss *et al.* J. Heterocyclic Chem. 2002, 39, 93 – 96) to a stirred solution of amino triazole 5 (0.5 g) in an aqueous solution of hypophosphorus acid (50%, 5 ml) a solution of sodium nitrite (0.6 g) in water (1.5 ml) was added slowly. The mixture was stirred at room temperature for a further hour then the pale orange precipitate was collected, washed with water and dried to give the triazole 6 (0.38, 80%).

HPLC 29.48 minutes.

^1H NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 7.81 (2H, dd, J 2, 9Hz), 7.70 (2H, d, J 2Hz), 7.10 (2H, d, J 9Hz) and 6.20 (4H, s). HREIMS Found, 310.0818; $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4$ requires 310.0822.

To a solution of the triazole 6 (0.5 g) in dry DCM (50 ml) was added boron tribromide (1.0 ml) and the mixture left at room temperature for 3 hours. Methanol (dropwise then 5 ml) was added carefully then the reaction left at room temperature for 24 h. The mixture was evaporated *in vacuo* to 1 ml, then more methanol (30 ml) was added, this was repeated four times, then the solvents were removed by evaporation *in vacuo*.

Purification by column chromatography over silica gel eluting with 0 – 20% methanol in chloroform gave the product 7 as a pale brown solid (0.24 g, 52%).

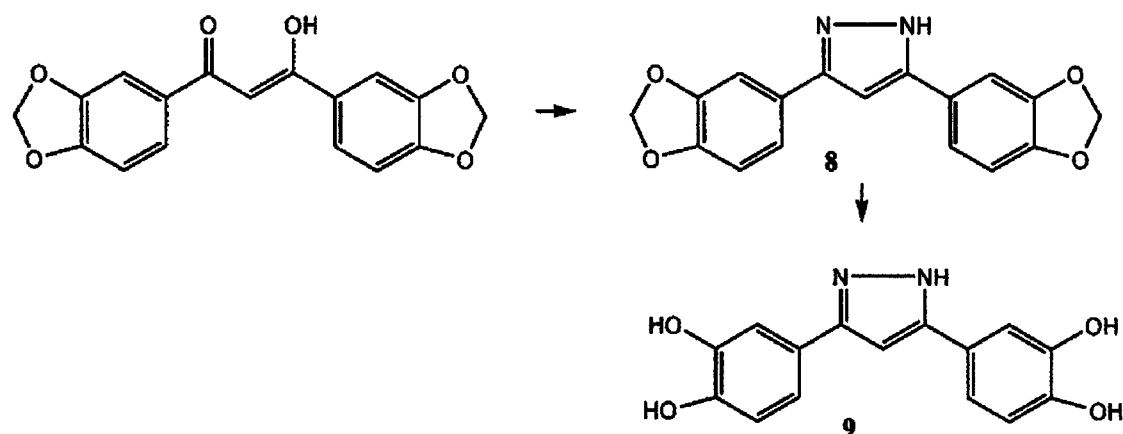
HPLC 16.1 minutes 97%

^1H NMR (CD_3OD) 7.46 (2H, d, J 2Hz), 7.41 (2H, dd, J 2, 9Hz), 7.15 (1H, s) and 6.96 (2H, d, J 9Hz).

HREIMS Found, 286.0815; MH^+ , $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4$ requires 286.0822.

Example 4: Synthesis of Pyrazole 9

3,5 bis (3,4 dihydroxyphenyl) pyrazole (Compound 8)



Reaction of the 1,3-diketone (Lopez *et al.* Planta Med. 1998, 64 (1), 76 – 77) (prepared according to the method described by Choshi *et al.* (Chem. Pharm. Bull. 1992, 40 (4), 1047 – 1049) with hydrazine hydrate according to the method described by Fink *et al.* (Chemistry and Biology 1999, 6, 205 – 219) gave the pyrazole 8 in good yield. Deprotection with boron tribromide under standard conditions gave the free phenolic pyrazole 9 in good yield.

According to the method described by Fink *et al.* (Chemistry and Biology 1999, 6, 205 – 219) a suspension of the diketone (Choshi *et al.* Chem. Pharm. Bull. 1992, 40 (4), 1047 – 1049 and Lopez *et al.* Planta Med. 1998, 64 (1), 76 – 77) (1 g) and hydrazine HCl (1 g, 5 equivs) in DMF/THF (3:1, 12 ml) was heated to reflux for 24 h. Water was added and the mixture extracted into dichloromethane, dried and evaporated *in vacuo* to give the crude product 8 as a yellow solid. Purification by column chromatography over silica gel eluting with 0 – 20% ethyl acetate in dichloromethane gave the pyrazole 8 as a pale yellow solid (0.49 g, 50%).

HPLC 30.3 minutes

¹H NMR ((CD₃)₂CO) 7.47 (2H, dd, J 2, 9Hz), 7.46 (2H, d, J 2Hz), 7.04 (1H, s), 7.02 (2H, d, J 9Hz) and 6.14 (4H, s).

HREIMS Found, 309.0859; MH⁺, C₁₇H₁₃N₂O₄ requires 309.0870.

To a solution of the pyrazole 8 (0.46 g) in dry DCM (50 ml) was added boron tribromide (0.4 ml) and the mixture left at room temperature for 3 hours. Methanol (dropwise then 5 ml) was added carefully then the reaction left at room temperature for 24 hours. The mixture was evaporated *in vacuo* to 1 ml, then more methanol (30 ml) was added, this was repeated four times, then the solvents were removed by evaporation *in vacuo*.

Purification by column chromatography over silica gel eluting with 0 – 20% methanol in chloroform gave the pyrazole 9 as a pale yellow solid. (0.285 g, 67%).

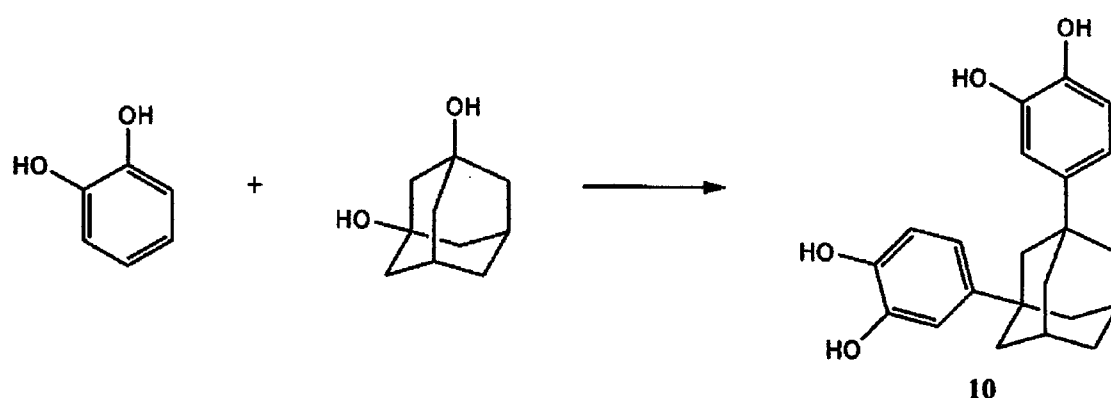
HPLC 25.9 minutes 98%

¹H NMR (CD₃OD) 7.26 (2H, d, J 2Hz), 7.22 (2H, dd, J 2, 9Hz), 7.15 (1H, s) and 6.93 (2H, d, J 9Hz).

HREIMS Found, 285.0879; C₁₅H₁₃N₂O₄ requires, 285.0870.

Example 5: Synthesis of Adamantane 10

1,3 bis (3,4 dihydroxyphenyl) adamantane (Compound 9)



Reaction of catechol with 1,3-adamantane-diol according to the method described by Lu *et al* (Lu *et al.* J Med Chem 2005, 48 (14), 4576 - 4585) gave the adduct **10** in reasonable yield.

According to the method described by Lu a solution of catechol (1.0 g) and adamantane diol (0.5 g) in methanesulfonic acid (2 ml) was heated to 80°C for 3 hours, then left at room temperature overnight. Water was added and the mixture extracted into 10% methanol in chloroform which was dried and evaporated *in vacuo* to give a white solid. Purification by column chromatography over silica gel eluting with 0 – 20% methanol in chloroform gave the product as a white solid. Crystallisation from diethyl ether/40% petroleum ether then gave the pure product **10** as a white crystalline solid (210 mg, 20%).

HPLC 29.8 minutes 98%

¹H NMR (CD₃OD) 6.82 (2H, t, J 1.5Hz), 6.68 (4H, d, J 1.5Hz), 2.22 (2H, bs), 1.87 (8H, m) and 1.77 (2H, bs).

HREIMS Found, 387.1369; MCl⁻, C₂₂H₂₄ClO₄ requires, 387.1369.

Example 6: Compounds of this invention are potent disrupters of Alzheimer's Aβ 1-42 fibrils or aggregates

The compounds prepared in the preceding Examples were found to be potent disruptors/inhibitors of Alzheimer's disease β-amyloid protein (Aβ) fibrils or aggregates. In a set of studies, the efficacy of the compounds to cause a disassembly/disruption of pre-formed amyloid fibrils of Alzheimer's disease (i.e. consisting of Aβ 1-42 fibrils) was analyzed.

Part A – Thioflavin T fluorometry

In one study, Thioflavin T fluorometry was used to determine the effects of the compounds, and of EDTA (as a negative control). In this assay Thioflavin T binds specifically to

fibrillar amyloid, and this binding produces a fluorescence enhancement at 485 nm that is directly proportional to the amount of amyloid fibrils formed. The higher the fluorescence, the greater the amount of amyloid fibrils formed (Naki et al., *Lab. Invest.* 65:104-110, 1991; Levine III, *Protein Sci.* 2:404-410, 1993; *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* 2:1-6, 1995).

In this study, 30 μ L of a 1 mg/mL solution (in distilled water) of pre-fibrillized A β 1-42 (rPeptide) was incubated at 37°C for 3 days either alone, or in the presence of one of the compounds or EDTA (at A β :test compound weight ratios of 1:1, 1:0.1, 1:0.01 or 1:0.001). Following 3-days of co-incubation, 50 μ L of each incubation mixture was transferred into a 96-well microtiter plate containing 150 μ L of distilled water and 50 μ L of a Thioflavin T solution (i.e. 500 mM Thioflavin T in 250 mM phosphate buffer, pH 6.8). The emission fluorescence was read at 485 nm (444 nm excitation wavelength) using an ELISA plate fluorometer after subtraction with buffer alone or compound alone, as blank.

The results of the 3-day incubations are illustrated graphically in Figure 5. For example, whereas EDTA ('-C' in Figure 5) caused no significant inhibition of A β 1-42 fibrils at all concentrations tested, the compounds all caused a dose-dependent disruption/disassembly of preformed A β 1-42 fibrils. All of the compounds tested were effective in disrupting pre-formed A β 1-42 fibrils similar to the results obtained from a positive control compound ('+C' in Figure 5). For example, all of the compounds caused at least 96% inhibition when used at an A β :test compound wt/wt ratio of 1:1 compared to 99% for the control. At an A β :test compound wt/wt ratio of 1:0.1 the levels of inhibition ranged from 86 to 95% compared to 92% for the control. This study indicated that the compounds of this invention are potent disruptors/inhibitors of Alzheimer's disease type A β fibrils, and usually exert their effects in a dose-dependent manner.

Part B: Congo red

In the Congo red binding assay the ability of a test compound to alter β -amyloid binding to Congo red is quantified. In this assay, A β 1-42 (as prepared for the Thio T assay) and test compounds were incubated for 3 days and then vacuum filtered through a 0.2 μ m filter. The amount of A β 1-42 retained in the filter was then quantitated following staining of the filter with Congo red. After appropriate washing of the filter, any lowering of the Congo red color on the filter in the presence of the test compound (compared to the Congo red staining of the amyloid

protein in the absence of the test compound) was indicative of the test compound's ability to diminish/alter the amount of aggregated and congophilic A β .

In one study, the ability of A β fibrils to bind Congo red in the absence or presence of increasing amounts of the compounds or EDTA (at A β :test compound weight ratios of 1:1, 1:0.1, 1:0.01 or 1:0.001) was determined. The results of 3-day incubations are illustrated graphically in Figure 6. Whereas EDTA ('-C' in Figure 6) caused no significant inhibition of A β 1-42 fibril binding to Congo red at all concentrations tested, the compounds caused a dose-dependent inhibition of A β binding to Congo red, some exceeding the effects of the positive control compound ('+C' in Figure 6). For example, the positive control compound caused a significant ($p < 0.01$) 73.5% inhibition of Congo red binding to A β 1-42 fibrils when used at an A β :test compound wt/wt ratio of 1:1, and a significant ($p < 0.01$) 10.4% inhibition of Congo red binding when used at an A β :test compound wt/wt ratio of 1:0.1. Compounds 6, 8 and 9 exceed the results of the positive control compound at both the above noted ratios. Similar to the results for Thio T assay, this study also indicated that compounds of this invention are potent inhibitors of A β fibril binding to Congo red, and usually exert their effects in a dose-dependent manner.

Part D – Circular dichroism spectroscopy data

Circular dichroism (CD) spectroscopy is a method that can be used to determine the effects of test compounds on disruption of the secondary structural conformation of amyloid fibrils. In one study, as described in this example, circular dichroism spectroscopy was used to determine the effects of different compounds of the invention on the β -sheet conformation of A β ₁₋₄₂ fibrils. For this study, A β ₁₋₄₂ (rPeptide Inc., Bogart, GA) was first lyophilized from a 50 mM NaOH solution, the pH being maintained above 10 prior to freezing and lyophilization. The peptide was then reconstituted in 20 mM acetate buffer, pH 4.0, at a concentration of 1 mg/ml. Dilution and addition of test compounds or vehicle was performed such that the final concentration of peptide was 0.5 mg/ml and the A β ₁₋₄₂:test compound wt/wt ratios were 1:1 and 1:0.1. When no test compounds were added, the amount of vehicle added to the reaction mixture was equal to the amount used to deliver the test compounds. After 5 days of incubation at 37°C in the presence of compounds or vehicle, CD spectra were recorded on a Jasco 810 spectropolarimeter (Easton, MD). All CD spectra were collected in 0.05 or 0.1 cm quartz cells. Wavelength traces were scanned from 190-270 nm at 0.1 nm increments with a bandwidth of 2

nm, at a scan speed of 50 nm per minute, a response time of 1 second, and a data pitch of 0.1 nm. The whole system was equilibrated and continuously flushed with nitrogen at 10 L/min. For data processing, 10 replicate spectra of A β ₁₋₄₂ with vehicle added were acquired before incubation, averaged, and subtracted from 10 averaged spectra of "A β ₁₋₄₂ + test compound" or vehicle after the incubation period. Average spectra were converted from ellipticity in degrees to specific ellipticity using the formula $[\Psi] = (\Psi'/d) \times c$ where Ψ' is the ellipticity in degrees, d is the pathlength in mm and c is the concentration in mg/ml. In this manner, the change in the structure of the peptide that occurs between that found at the time of initial dissolution and that found after incubation can be assessed.

Figure 1A shows some of the CD spectra generated in this study. A β ₁₋₄₂ alone (vehicle in Figure 1A) in 20mM acetate buffer after incubation usually demonstrated the typical CD spectrum of an amyloid protein with significant β -sheet structure, as demonstrated by the minimum observed at 218 nm. However, in the presence of some of the compounds, a marked disruption of the β -sheet structure in A β ₁₋₄₂ fibrils was evident (with a significant increase in random coil or α -helix) as shown by the reduction in the magnitude of the minimum observed at 218 nm (compare to A β ₁₋₄₂ alone).

Figure 1B shows the effects of compounds 1 and 2 on inhibition of the β -sheet structure of A β ₁₋₄₂ fibril formation when compared to a positive control compound. The CD studies demonstrate that the compounds of this invention have the ability to disrupt/disassemble the β -sheet structure characteristic of Alzheimer's A β fibrils. The results of the studies also confirm the previous examples using Thioflavin T fluorometry and Congo red binding type assays.

Example 7: Compounds of this invention are potent disrupters of Parkinson's disease α -synuclein fibrils or aggregates

The tested compounds of this invention were found also to be potent disruptors/inhibitors of Parkinson's disease α -synuclein fibrils or aggregates. α -synuclein has been demonstrated to form fibrils or aggregates when incubated at 37°C for several days. α -synuclein is postulated to play an important role in the pathogenesis of Parkinson's disease and other synucleinopathies. In this set of studies, the efficacy of the compounds to cause a disassembly/disruption of pre-formed α -synuclein fibrils or aggregates of Parkinson's disease was analyzed.

Part A – Thioflavin T fluorometry

In one study, Thioflavin T fluorometry was used to determine the effects of the compounds and EDTA (as a negative control, (-C)). In this assay, Thioflavin T binds specifically to α -synuclein fibrils or aggregates, and this binding produces a fluorescence enhancement at 485 nm that is directly proportional to the amount of α -synuclein fibrils or aggregates present. The higher the fluorescence, the greater the amount of α -synuclein fibrils or aggregates present (Naki et al, *Lab. Invest.* 65:104-110, 1991; Levine III, *Protein Sci.* 2:404-410, 1993; *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* 2:1-6, 1995).

In this study, 30 μ L of a 1 mg/mL solution of α -synuclein (rPeptide) was pre-fibrillized at 37°C with agitation at 1400 rpm for 4 days and subsequently incubated at 37°C for 3 days either alone or in the presence of the compounds or EDTA (at α -synuclein:compound weight ratios of 1:1, 1:0.1, 1:0.01 or 1:0.001). Following 3-days of co-incubation, 50 μ l of each incubation mixture was transferred into a 96-well microtiter plate containing 150 μ l of distilled water and 50 μ l of a Thioflavin T solution (i.e. 500 mM Thioflavin T in 250 mM phosphate buffer, pH 6.8). The emission fluorescence was read at 485 nm (444 nm excitation wavelength) using an ELISA plate fluorometer after subtraction with buffer alone or compound alone, as blank.

The results of the 3-day incubations are graphically illustrated in Figure 7. For example, whereas EDTA caused no significant inhibition of α -synuclein fibrils or aggregates at all concentrations tested, all of the compounds caused a dose-dependent disruption/disassembly of pre-formed α -synuclein fibrils or aggregates to various extents. For example, at an α -synuclein:compound ratio of 1:0.01 the positive control compound (+C in figure 7) caused a significant ($p < 0.01$) 77.4% inhibition whereas the other compounds tested displayed a range from 45 to 83%. Compounds 1, 4, 5 and 6 displayed results very similar to the positive control compound. This study indicated that compounds of this invention are potent disruptors/inhibitors of Parkinson's disease α -synuclein fibrils or aggregates, and usually exert their effects in a dose-dependent manner.

Part B: Congo red

In the Congo red binding assay, the ability of a given test compound to alter α -synuclein binding to Congo red is quantified. In this assay, α -synuclein (pre-fibrillized as prepared in the Thio T assay) and compounds were incubated for 3 days and then vacuum filtered through a 0.2 μ m filter. The amount of α -synuclein retained in the filter was then quantitated following staining

of the filter with Congo red. After appropriate washing of the filter, any lowering of the Congo red color on the filter in the presence of the compound (compared to the Congo red staining of the amyloid protein in the absence of the compound) was indicative of the test compound's ability to diminish/alter the amount of aggregated and congophilic α -synuclein.

In one study, the ability of α -synuclein fibrils or aggregates to bind Congo red in the absence or presence of increasing amounts of compounds or EDTA (at α -synuclein:compound weight ratios of 1:1, 1:0.1, 1:0.01 or 1:0.001) was determined. The results of 3-day incubations are graphically illustrated in Figure 8. Whereas EDTA (-C) caused no significant inhibition of α -synuclein fibril binding to Congo red at all concentrations tested, the compounds tested caused a dose-dependent inhibition of α -synuclein binding to Congo red. For example, the positive control compound (+C) caused a significant ($p < 0.01$) 78.5% inhibition of Congo red binding to α -synuclein fibrils or aggregates at a wt/wt ratio of 1:1. The range of inhibition at the same ratio for the all of the compounds tested was from 60 to 100%. This study indicated that compounds of this invention are also potent inhibitors of Parkinson's disease type α -synuclein fibril binding to Congo red, and usually exert their effects in a dose-dependent manner.

Part C – Circular dichroism

Circular dichroism (CD) spectroscopy is a method that can be used to determine effects of test compounds on the secondary structural conformation of α -synuclein. Since the self-assembly of α -synuclein monomers into aggregates or fibrils is not possible without the formation of secondary structure, namely beta sheet, CD spectroscopy can be used to measure the ability of test compounds to inhibit the fibrilization or aggregation process.

In one study, as described in this example, circular dichroism spectroscopy was used to determine the effects of different compounds of the invention on the β -sheet conformation of α -synuclein. For this study, α -synuclein (rPeptide Inc., Bogart, GA) was dissolved in 9.5 mM phosphate buffer (PBS) to 1 mg/ml. The resulting stock was diluted in the same buffer and either test compounds or vehicle added such that the final concentration of peptide was 0.25 mg/ml and the α -synuclein:compound wt/wt ratios were 1:1 and 1:0.1. A CD spectrum was recorded of the vehicle treated sample prior to incubation of all samples for 4 days, after which spectra for all α -synuclein/compound or vehicle reactions were acquired. CD spectra were recorded on a Jasco 810 spectropolarimeter (Easton, MD). All CD spectra were acquired using 0.10 cm quartz cells.

Wavelength traces were scanned from 190-270 nm at 0.1 nm increments with a bandwidth of 2 nm, at a scan speed of 50 nm/minute, a response time of 32 seconds, and a data pitch of 0.5 nm. The whole system was equilibrated and continuously flushed with nitrogen at 10 L/min. For data processing, 10 replicate spectra of the buffer with vehicle added were acquired before incubation, averaged, and subtracted from 10 averaged spectra of "α-synuclein + test compound" or vehicle after the incubation period. Average spectra were converted from ellipticity in degrees to specific ellipticity using the formula $[\Psi] = (\Psi^\circ/d) \times c$ where Ψ° is the ellipticity in degrees, d is the pathlength in mm and c is the concentration in mg/ml. In this manner, the change in the structure of the peptide that occurs between that found at the time of initial dissolution and that found after incubation can be assessed.

Figure 2 shows the CD spectra generated for α-synuclein at time zero and after 4 days of incubation at 37°C. α-synuclein alone in vehicle treated PBS buffer demonstrated the random coil signature at time zero and after 4 days of incubation demonstrated the typical CD spectrum of a protein with significant β-sheet structure, as demonstrated by the minimum observed at 218 nm. However, in the presence of some of the compounds, a marked inhibition of the formation of β-sheet structure by α-synuclein was evident as shown by the reduction in the magnitude of the minimum observed at 218 nm (compare to α-synuclein alone).

Figure 3A shows some of the CD spectra generated in this study. α-synuclein at time zero produces the spectrum indicative of a random coil peptide and also provides the 100% inhibition control data. After incubation, the spectrum of α-synuclein is what would be expected for a β-sheet structure, indicating higher order aggregates have formed and is used to provide the 0% inhibition control data. Samples used for the controls are vehicle treated to assure a quantitative relationship between these samples and the test compound treated samples. These two spectra allow for the precise quantitation of the percent inhibition of fibril formation in the test compound treated samples due to their establishing of the positive and negative controls, which are assumed to be 100% and 0% fibrillar respectively. Despite these control percentages being only estimates, there is insufficient uncertainty to make them suspect, ie the lower end may be 0-5% inhibition while the upper end may be 95-100% inhibition. The controls are generated in each batch run, using the same stock solution of α-synuclein which is fractioned into aliquots of equal volume to which the individual test compound or vehicle are added and run in parallel to assure the accuracy of the quantitation. The spectra shown in figure 3A were acquired with an α-synuclein/test

compound ratio of 1:1 wt/wt. These CD spectra demonstrate that the compounds of this invention have the ability to inhibit the formation of β -sheet structure characteristic of Parkinson's disease α -synuclein fibrils or aggregates.

Figure 3B shows the effects of compounds on inhibition of the β -sheet structure of α -synuclein when compared to a positive control compound (+C). The positive control (+C1) is, as stated, the time zero vehicle treated spectrum while the negative control (-C) is the 4 day vehicle treated spectrum.

Figure 4A shows some of the CD spectra that were acquired in this study. These spectra were acquired and processed in the same manner as those presented in Figure 3A. These spectra lack the β -sheet signature found in the spectrum of the vehicle treated sample.

Figure 4B shows the effects of compounds on inhibition of the β -sheet structure of α -synuclein when compared to a positive control compound (+C). The positive control (+C1) is, as stated, the time zero vehicle treated spectrum while the negative control (-C) is the 4 day vehicle treated spectrum.

The results of the studies also confirm the previous examples using Thioflavin T fluorometry and Congo red binding type assays, that the compounds of this invention are potent anti- α -synuclein fibrilization agents.

Example 8: Compounds of this invention are potent disruptors/inhibitors of α -synuclein aggregates associated with Parkinson's disease

Parkinson's Disease is characterized by the accumulation of insoluble intraneuronal aggregates called Lewy Bodies, a major component of which is α -synuclein (reviewed in Dauer et al., *Neuron*, 39:889-909, 2003). Since autosomal dominant mutations in α -synuclein cause a subset of cases of familial Parkinson's disease, and since these mutations increase the likelihood of α -synuclein to aggregate and form Lewy Bodies, aggregated α -synuclein is proposed to be directly involved in the etiology and disease progression (Polymeropoulos et al., *Science* 276:1197-1199, 1997; Papadimitriou et al., *Neurology* 52:651-654, 1999). Structural studies have revealed that intracellular Lewy bodies contain a large proportion of misfolded proteins with a high degree of β -pleated sheet secondary structure. These studies were conducted to determine the efficacy of the test compounds in the inhibition/disruption of α -synuclein aggregates associated with Parkinson's disease.

Therefore, to test the therapeutic potential of the compounds, two cell-based assays were utilized. In both assays, rotenone is used to induce mitochondrial oxidative stress and α -synuclein aggregation. The first assay utilizes the binding of the fluorescent dye thioflavin S to structures with high β -sheet content including α -synuclein fibrils and aggregates. Therefore, quantitative assessment of the extent of thioflavin S-positive staining of fixed cells is used to test the ability of the compounds to decrease the amount of α -synuclein aggregates. In the second assay, cell viability is assessed using the XTT Cytotoxicity assay, which is dependent on intact, functional mitochondria in live cells. Thus, the XTT Cytotoxicity assay is used to test the ability of the compounds to ameliorate the mitochondrial toxicity and resulting loss of viability associated with the accumulation of α -synuclein aggregates. Phrased another way, the XTT Cytotoxicity assay is used to gauge the compounds neuroprotective efficacy. These studies are presented in the following examples.

To carry out these studies, a cell culture model was used in which human α -synuclein aggregation is experimentally induced. BE-M17 human neuroblastoma cells stably transfected with A53T-mutant human α -synuclein were obtained. Cell culture reagents were obtained from Gibco/Invitrogen, and cells were grown in OPTIMEM supplemented with 10% FBS, Penicillin (100 units/ml), Streptomycin (100 μ g/ml) and 500 μ g/ml G418 as previously described (Ostrerova-Golts et al., *J. Neurosci.*, 20:6048-6054, 2000).

Thioflavin S is commonly used to detect amyloid-containing structures *in situ*, including in brain tissue (Vallet et al., *Acta Neuropathol.*, 83:170-178, 1992), and cultured cells (Ostrerova-Golts et al., *J. Neurosci.*, 20:6048-6054, 2000), whereas thioflavin T is often used as an *in vitro* reagent to analyze the aggregation of soluble amyloid proteins into fibrils enriched in β -pleated sheet structures (LeVine III, *Prot. Sci.*, 2:404-410, 1993). Therefore, Thioflavin S histochemistry was used on cultured cells to detect aggregates containing a high degree of β -pleated structures that formed in response to oxidative stress-inducing agents (in this case rotenone) as previously described, with minor modifications (Ostrerova-Golts et al., *J. Neurosci.*, 20:6048-6054, 2000). Briefly, for these studies, cells were grown on Poly-D- Lysine coated glass slide chambers at approximately 3×10^4 cells/cm². After 24 hours, cells were treated with 500 nM, 1 μ M or 5 μ M rotenone (Sigma) or vehicle (0.05% DMSO) as indicated. Immediately after rotenone (or vehicle) addition, compounds were added at the indicated concentration, or cell culture media only (no

compound) in the presence of rotenone was added. Identical treatments were repeated after 48 hours. After an additional 48 hours, cells were fixed for 25 minutes in 3% paraformaldehyde. After a PBS wash, the cells were incubated with 0.015% thioflavin S in 50% ethanol for 25 minutes, washed twice for four minutes in 50% ethanol and twice for five minutes in deionized water and then mounted using an aqueous-based mountant designed to protect against photobleaching. Aggregates that bind to thioflavin S were detected with a fluorescent microscope using a High Q FITC filter set (480 to 535 nm bandwidth) and a 20X objective lens unless otherwise indicated. Between 8 and 16 representative images per condition were selected, imaged and processed by an experimenter who was blinded to treatment conditions. To assess the amount of thioflavin S-positive aggregates, the total area per field covered by thioflavin S-positive inclusions was determined. For this purpose, background fluorescence that failed to exceed pre-set size or pixel intensity threshold parameters was eliminated using Q-capture software. Spurious, non-cell associated fluorescence was manually removed. Unless indicated otherwise, data represent group means $\pm$ SEM. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism (GraphPad Inc). Differences between means (two samples) were assessed by the Student's *t* test. Differences among multiple means were assessed by one-factor ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

To validate the ability of the assay to quantitatively detect aggregates that bind thioflavin S, staining of BE-M17 cells overexpressing A53T α -synuclein was carried out and the results revealed a rotenone dose-dependent increase in thioflavin S-positive aggregates relative to vehicle-treated control cells (Figure 9A-D). Higher magnification images obtained with a 40X objective indicated that the thioflavin S-positive aggregates were intracellular and cytoplasmic (Figure 9D), analogous to the accumulation of intracytoplasmic Lewy bodies which are pathological hallmarks associated with Parkinson's disease. Quantitation of the area covered by thioflavin-S-positive aggregates established that 5 μ M of rotenone was sufficient to induce robust aggregation (Figure 9E) and thus is an effective dose to test the ability of compounds to attenuate the formation of these aggregates.

Using the protocol described above, several compounds were tested for their ability to reduce, prevent or eliminate thioflavin S-positive aggregates in rotenone-treated BE-M17 cells overexpressing A53T α -synuclein. Examples of results obtained from experiments using these compounds are described below.

In cells treated with 1 μ M rotenone only, there was a robust presence of thioflavin S-positive aggregates (Figure 10A). Addition of 500 ng/ml (Figure 10B) or 1 μ g/ml (Figure 10C) of positive control compound markedly reduced the abundance of these rotenone-induced aggregates by 87% and 91% respectively (as shown in Figure 10D) relative to rotenone only-treated cells. Therefore, the positive control compound is highly effective at the reduction, prevention and/or elimination of thioflavin S-positive aggregates in cells that express human A53T α -synuclein.

Addition of from 500 ng/ml up to 2 μ g/ml (Figures 11B-D) of compound 1 did not reduce the abundance of rotenone-induced aggregates relative to rotenone only-treated cells (Figures 11D and E).

As shown in figure 12, in cells treated with 1 μ M rotenone the addition of 500 ng/ml and 2 μ g/ml of compound 2 reduced the abundance of rotenone-induced aggregates by 39-44%, and in cells treated with 5 μ M rotenone the addition of 1 μ g/ml of compound 2 markedly reduced the abundance of rotenone-induced aggregates by 67% (Figure 12E).

Figures 13 A-E show the effects of compound 3. In cells treated with 1 μ M rotenone the addition of 500 ng/ml up to 2 μ g/ml of compound 3 reduced the abundance of rotenone-induced aggregates by 41 to 63% relative to rotenone only-treated cells.

Addition of 500 ng/ml up to 2 μ g/ml of compound 4 did not reduce the abundance of rotenone-induced aggregates relative to rotenone only-treated cells (Figures 14A-E).

Figures 15 A-E show the effects of compound 5. In cells treated with 1 μ M rotenone the addition of 1- 2 μ g/ml of compound 3 reduced the abundance of rotenone-induced aggregates by 25 to 49% relative to rotenone only -treated cells.

The addition of compound 6 did not have significant effects on the abundance of rotenone-induced aggregates relative to rotenone only-treated cells (Figures 16A-E).

The addition of 500 ng/ml and 2 μ g/ml of compound 7 markedly reduced the abundance of rotenone-induced aggregates by 60 and 74% (respectively) relative to rotenone only-treated cells in cells treated with 1 μ M rotenone only. In cells treated with 5 μ M rotenone the addition of 500 ng/ml and 2 μ g/ml of compound 7 reduced the abundance of rotenone-induced aggregates by 31 and 67% (respectively) (Figures 17A-E).

Figures 18 A-E show the effects of compound 8. In cells treated with 1 μ M rotenone the addition of 1 μ g/ml of compound 8 reduced the abundance of rotenone-induced aggregates by 56% relative to rotenone only-treated cells. In cells treated with 5 μ M rotenone the addition of 1 or 2 μ g/ml of compound 8 reduced the abundance of rotenone-induced aggregates by 48 and 38% (respectively).

The addition of 500 ng/ml up to 2 μ g/ml of compound 9 reduced the abundance of rotenone-induced aggregates from 19 to 60% relative to rotenone only-treated cells in cells treated with 1 μ M rotenone (Figures 19A-E). The addition of compound 9 did not reduce the abundance of rotenone-induced aggregates in cells treated with 5 μ M rotenone although baseline staining was lower than expected at this rotenone dose.

In conclusion, many of the compounds tested, especially compounds 2, 3, 5, 7, 8 and 9 effectively and potently reduced, prevented, inhibited and/or eliminated the formation, deposition and/or accumulation of α -synuclein aggregates in A53T α -synuclein-expressing BE-M17 cells.

Example 9: Compounds of this invention protect against rotenone-induced cytotoxicity

The XTT Cytotoxicity Assay (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) was previously used to demonstrate that A53T α -synuclein potentiates cell death in BE-M17 cells through an oxidative stress-dependent mechanism (Ostrerova-Golts et al., *J. Neurosci.*, **20**:6048-6054, 2000). Research has shown that the accumulation of α -synuclein aggregates into Lewy bodies contributes mechanistically to the degradation of neurons in Parkinson's disease and related disorders (Polymeropoulos et al., *Science* **276**:2045-2047, 1997; Kruger et al., *Nature Genet.* **18**:106-108, 1998). Here, the XTT Cytotoxicity assay (hereafter referred to as the XTT assay) was used to measure the ability of test compounds to protect against rotenone-induced cytotoxicity (neuroprotective ability). The assay is based on the principle that conversion of the yellow tetrazolium salt XTT to form an orange formazan dye (that absorbs light around 490 nm) occurs only in metabolically active, viable cells. Therefore, light absorbance at 490 nm is proportional to cell viability. For this assay, cells were plated in 96 well tissue culture dishes at 10^4 cells per well. After 24 hours, cells were treated with 500 nM or 2 μ M rotenone, or vehicle (0.05% DMSO) as indicated. Immediately after rotenone addition, compounds were added at the indicated concentration. As a control, compounds were added without rotenone (vehicle only, 0.05% DMSO) and resulted in no toxicity at the doses tested. Untreated cells received cell culture

media only (no compound, with or without rotenone). After 40-44 hours of treatment, conditioned media was removed and replaced with 100 μ l fresh media and 50 μ l XTT labeling reaction mixture according to the manufacturer's recommendations. Five to six hours later, the absorbance at 490 nm was measured and corrected for absorbance at the 700 nm reference wavelength. Treatment with 500 nM and 2 μ M rotenone usually decreased viability by 35-45% relative to untreated cell without rotenone (Figure 20). Percent inhibition of cell death was calculated as the proportion of the rotenone-induced absorbance (viability) decrease that was eliminated by test compound treatment.

Treatment with positive control compound at 10-25 μ g/ml inhibited the rotenone-induced loss of viability by 25-33% at both rotenone doses (Figure 21).

The experiment was performed with each compound and the results are shown in Figures 22-30. Figures 22-30, panel A graphically illustrates the toxicity of the compound whereas figures 22-30, panel B show inhibition by the compound of the rotenone-induced loss of viability measured at both rotenone doses.

Treatment with 10 μ g/ml of compound 1 indicates that this compound is non-toxic, whereas higher doses displayed some toxicity (Figure 22A). Treatment with 10 μ g/ml of compound 1 inhibited the rotenone-induced loss of viability by approximately 18 to 27 % at both rotenone doses (Figure 22B).

Treatment with 10-25 μ g/ml of compound 2 indicates that this compound is non-toxic, whereas a dose of 50 μ g/ml displayed some toxicity (Figure 23A). Treatment with 25 μ g/ml of compound 2 inhibited the rotenone-induced loss of viability by approximately 20 to 28 % at both rotenone doses (Figure 23B).

Treatment with 10 to 50 μ g/ml of compound 3 indicates that this compound is relatively non-toxic at all the doses tested (Figure 24A). Treatment with 10 to 50 μ g/ml of compound 3 inhibited the rotenone-induced loss of viability by approximately 17 to 28 % at both rotenone doses (Figure 24B).

Treatment with 10 and 25 μ g/ml of compound 4 indicates that this compound is non-toxic, whereas a dose of 50 μ g/ml displayed minimal toxicity (Figure 25A). Treatment with 25 μ g/ml of compound 4 was particularly effective and inhibited the rotenone-induced loss of viability by

approximately 50 % at the 500nM dose of rotenone, whereas at 2 μ M the inhibition observed was approximately 26% (Figure 25B).

Treatment with 10 or 25 μ g/ml of compound 5 indicates that this compound is non-toxic, whereas a dose of 50 μ g/ml displayed minimal toxicity (Figure 26A). Treatment with compound 5 did not cause any inhibition of the rotenone-induced loss of viability at either rotenone dose (Figure 26B).

Treatment with 10 to 50 μ g/ml of compound 6 indicates that this compound is non-toxic at all the doses tested (Figure 27A). Treatment with 50 μ g/ml of compound 6 at the 500nM dose of rotenone inhibited the rotenone-induced loss of viability by approximately 10% whereas at 2 μ M rotenone, the inhibition observed was approximately 12-16% for all doses of the compound tested (Figure 27B).

Treatment with 1 to 50 μ g/ml of compound 7 indicates that this compound is non-toxic, and even higher doses (100-150 μ g/ml) displayed only very minimal toxicity (Figure 28A). Treatment with 50 μ g/ml of compound 7 showed the highest inhibition of the rotenone-induced loss of viability at approximately 25% at the 500nM dose of rotenone (Figure 28B).

Treatment with 10 to 25 μ g/ml of compound 8 indicates that this compound is relatively non-toxic (Figure 29A). Despite some minor toxicity at 50 μ g/ml, the compound apparently affords some protection against the strong rotenone toxicity. This conclusion is supported by morphological analysis (not shown). Treatment with 50 μ g/ml of compound 1 at 2 μ M rotenone showed inhibition of the rotenone-induced loss of viability by approximately 18% (Figure 29B).

Treatment with 10 to 25 μ g/ml of compound 9 indicates that this compound is relatively non-toxic, whereas the higher dose displayed some toxicity (Figure 30A). Treatment with compound 9 did not cause any appreciable inhibition of the rotenone-induced loss of viability at either rotenone dose (Figure 30B).

In conclusion, many of the tested compounds were efficacious in inhibiting rotenone-induced cytotoxicity demonstrating neuroprotective activity against α -synuclein toxicity.

Example 10 : Improved motor performance of α -synuclein transgenic mice treated with compounds of this invention

To assess the potential efficacy of compounds in a Parkinson's disease-relevant mouse model, transgenic mice overexpressing wild-type human α -synuclein under the control of the

mouse Thy-1 promoter (Rockenstein E, et al., 2002. *J Neurosci Res* 68:568-578) were used. Human α -synuclein transgenic mice have proven to be useful models for Parkinson's disease, and thus a suitable system for testing potential therapeutic agents, for a number of reasons including the following. (1) The presence of α -synuclein aggregates that are detectable by both immunohistochemical (staining) and biochemical (western blot) methods. These aggregates are similar to the Lewy bodies (intracellular inclusions comprised primarily of α -synuclein) that are the pathological hallmark of Parkinson's disease (Rockenstein E, et al., 2002. *J. Neurosci. Res.* 68:568-578 and Hashimoto M, et al., 2003 *Ann N Y Acad Sci* 991:171-188). (2) The mice experience a dopaminergic deficit in the nigrostriatal pathway, as indicated by loss of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neuronal projections in the striatum (Hashimoto M, et al., 2003 *Ann N Y Acad Sci* 991:171-188). This deficit is also seen in human PD patients. (3) The mice show deficits, including slowness of movement, loss of balance and coordination and muscle weakness in a motor function-dependent behavioral test such as the beam traversal test (Fleming SM, et al., 2004 *J Neurosci* 24:9434-9440 and Fleming SM, et al., 2006 *Neuroscience* 142:1245-1253).

Similar motor dysfunction is seen in human PD patients. To assess the potential efficacy of compounds to improve motor performance or minimize deficits, the challenging beam traversal test was conducted on compound-treated and vehicle-treated mice assessed prior to treatment at 0 months and again at 3 and 6 months of treatment. If compounds were effective, one would expect that mice administered these compounds would perform better than vehicle-treated mice at the same age, and/or that test compound treatment might ameliorate age-dependent decline in performance within a given group. For example, if test compounds were effective, one might expect compound treated-mice to cross the beam more quickly, relative to vehicle-treated mice. Or one might expect age-dependent impairments within a group to be lessened (for example performance after compound treatment might be similar to performance prior to treatment, or even better, whereas vehicle-treated mice perform progressively worse over the same period of time).

Beam Traversal Test

In the beam traversal test, which is one measure of motor performance, mice are trained over two days, with five trials per day, to cross a narrowing beam (separated into four segments) with support ledges attached along each side, and leading to the animal's home cage. On the third

day, the test is made more challenging by placing a mesh grid over the beam surface, leaving a small space of about 1 cm between the grid and the surface of the beam. Animals are then videotaped over a period of five trials, and the time to cross, number of steps taken and number of slips are recorded by an investigator blind to drug treatment (Fleming SM, et al., 2006. Neuroscience 142:1245-1253).

Transgenic mice administered compound 2 for three months showed a marked, significant 49% improvement (time to cross the beam) relative to vehicle-treated, age-matched (15 months of age), control mice (figure 31). After six months of treatment, however, performance was similar to vehicle-treated mice at this age (figure 31). Taken together, these data show that compound 2 delays the onset of behavioral deficits in the beam traversal test.

Transgenic mice administered compound 7 for six months showed a marked, significant 35% improvement (time to cross the beam) relative to vehicle-treated, age-matched (15 months of age), control mice (figure 31). In addition, after only three months of compound 7 treatment, performance was 39% improved relative to vehicle-treated controls (figure 31). Taken together, these data show that compound 7 treatment prevents the age-dependent progression of deficits in the beam traversal test.

Example 11: Improved motor performance of α -synuclein transgenic mice treated with compounds of this invention

To assess the potential efficacy of compounds in the pole test, compound-treated and vehicle-treated mice were assessed prior to treatment (at 0 months) and again at 3 and 6 months of treatment. The transgenic mice were those described in Example 10 above and received daily i.p. injections at 50 mg/kg/day. To assess the potential efficacy in the beam test, compound-treated and vehicle-treated mice were assessed at 5-6 weeks of treatment. If compounds were effective, one would expect that mice administered test compound would perform better than vehicle-treated mice at the same age, and/or that test compound treatment might ameliorate deficits (improve performance) over time within a given group. For example, if test compounds were effective, one might expect compound-treated mice to cross the beam more quickly, relative to vehicle-treated mice. Or one might expect improvement of impairments within a group over time (for example performance after compound treatment might be better than before compound

treatment whereas vehicle-treated mice perform similarly, or progressively worse, over the same time period.

A) Pole Test

In the pole test, which is one measure of motor performance, mice are trained on day one (in 2 trials) to descend a wooden pole after being placed head up at the top of the pole. On day two, mice are tested in five trials and the latency to turn downward (turn time), time to descend (travel time), and total time on the pole is recorded by an investigator blind to drug treatment.

Transgenic mice administered compound 7 for 3 months (n=11) (15 months of age) showed a trend towards an improvement in pole test performance (decreased turn time) relative to their performance prior to treatment. After 6 months of treatment (n=11) with compound 7, mice (18 months of age) showed a significant 41% improvement in the pole test relative to their performance prior to treatment and their performance was similar to 16 month old non-transgenic mice (Figure 32). By contrast, the performance of vehicle-treated mice at 3 and 6 months of treatment was similar to their performance prior to treatment. These results show that compound 7 improves performance in the pole test.

B) Beam Traversal Test in Younger Transgenic Mice

A slightly modified beam traversal test (2-day instead of 3-day experiment) was used to measure motor performance in younger α -synuclein transgenic mice (at 3 months of age) treated for 6 weeks with compound 7 (or vehicle control) (n=8 per group). Mice are trained on day one, in six trials, to cross a narrowing beam (separated into four segments) with support ledges attached along each side, and leading to the animal's home cage. On the second day, the test is made more challenging by placing a mesh grid over the beam surface, leaving a small space of about 1 cm between the grid and the beam surface. Mice are then videotaped over a period of five trials, and the time to cross, number of steps taken and number of slips are recorded by an investigator blind to drug treatment (Fleming SM, et al., 2006. *Neuroscience* 142:1245-1253).

Transgenic mice administered Compound 7 for 6 weeks showed a significant 36% improvement (time to cross the beam) relative to vehicle-treated, age-matched (4-5 months of age) control mice (Figure 33). There was no significant effect on the number of steps taken, or the slips per step (error rate). Taken together, these results indicate that Compound 7 improves performance in the beam traversal test.

Example 12: Reduction of α -synuclein-positive intraneuronal immunostaining in brains of α -synuclein transgenic mice

α -synuclein immunostaining and image analysis was carried out to determine whether compound 7 treatment reduces α -synuclein levels in aged α -synuclein transgenic mice (described above). Following blocking for non-specific antibody binding, mouse brain sections were incubated overnight at 4°C with a rabbit polyclonal antibody raised against human α -synuclein (Chemicon AB5038P; 1:500 dilution). On day 2, after thorough rinses in phosphate-buffered saline (PBS) the sections were incubated with a biotinylated secondary antibody (goat anti-rabbit, VectorLabs) at 1:200 dilution for 1 hour at room temperature. After thorough rinses in PBS the sections were incubated with Vector labs avidin biotin complex (ABC) for 30 minutes at room temperature. The sections were then rinsed in PBS three times and reacted for 4 minutes in Vector DAB (according to the manufacturer's recommendations). The DAB reaction was quenched by two Tris-buffer rinses. Sections were mounted onto charged slides and dried overnight. The slides were cover slipped and imaged.

For image analysis and quantitation, three images of cortex, anatomically balanced between mice, were digitized (100X magnification) with a Q-Image digital camera and Q-Capture software. Each image was processed using Image-Pro software. A pre-determined threshold for pixel color segmentation and minimal object area was applied to each image. Imaging artifacts were removed and the data was exported and processed for determination of percent (%) area occupied by α -synuclein positive immuno-labeled objects.

Mice were treated for 6 months receiving daily i.p. injections at 50 mg/kg/day from 12 months of age to 18 months of age. Figure 34 shows Compound 7-treated mice (panels C-D) exhibit significantly less intraneuronal human α -synuclein in the frontal cortex compared to vehicle-treated mice (panels A-B). Non-transgenic wild-type mouse brains are devoid of human α -synuclein staining and are shown as a control for the specificity of the antibody for transgene-derived human α -synuclein (E and F). Image analysis and quantitation reveals that compound 7 treatment causes a significant 81% reduction of α -synuclein-positive objects.

Compound 7 treatment for 6 months dramatically reduces α -synuclein levels in the frontal cortex of human α -synuclein transgenic mice, relative to vehicle-treated controls. This data

correlates well with our data showing improved motor performance from transgenic mice treated for 6 months with compounds of this invention.

Example 13: Reduction of α -synuclein levels in α -synuclein transgenic mouse brain

Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting was used to analyze the concentration of α -synuclein in both particulate (membrane) and cytosolic fractions of anterior brain regions from both 18-month-old and 4-5 month old transgenic (described above) and non-transgenic mice. Both fractions contain potentially pathogenic pools of aggregated α -synuclein that is mostly reduced to monomer under SDS-PAGE reducing conditions.

Upon sacrifice of α -synuclein transgenic mice following either 6-months of compound treatment (when animals were 18 months of age) or 6-weeks of compound treatment (when animals were 4-5 months of age), brains were removed and bisected along the midline (treatment regimen as described above). Vehicle-treated controls at both ages were processed identically. The right hemisphere was bisected coronally to yield an anterior and posterior portion. Bisected hemibrains were then flash frozen on a dry ice/ethanol bath and stored at -80°C . Brains were subjected to biochemical fractionation to separate the soluble cytosolic fraction from the insoluble, particulate (membrane). Briefly, brains were homogenized in 9 volumes of HEPES buffer (detergent-free), supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Calbiochem). Gentle homogenization was facilitated with a Teflon pestle in a fitted glass homogenizer (Kontes #19) to minimize the disruption of the α -synuclein/membrane interactions during lysis. The whole cell lysate was then centrifuged at low speed to pellet (P1) unbroken cells and organelles (such as nuclei). The supernatant (S1) was then centrifuged at $225,000 \times g$ for 1 hour at 4°C in order to pellet membranes (P2) (this fraction may include organelles such as mitochondria). The supernatant (S2) was the "cytosolic" fraction. The pellet (P2) was resuspended by pipeting in 2.5 volumes of homogenization buffer, sonication on ice for 5×1 sec and referred to as the "particulate" or "membrane" fraction. Total protein concentration was determined by the MicroBCA assay (Pierce). Equal amounts of protein per lane ($25 \mu\text{g}$) were run on SDS-PAGE (Bio-Rad Criterion 4-12% Bis-Tris gels, 26 wells per gel), and transferred to nitrocellulose (BioRad). Consistent transfer efficiency across the blot was confirmed by reversible staining with Ponceau S dye and imaging on a flatbed scanner. De-stained blots were blocked, and probed with

purified rabbit polyclonal antibody AB5038P (Chemicon) followed by anti-rabbit IgG/HRP secondary antibody (Abcam) and SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) to detect α -synuclein. Specificity of the AB5038P antibody for α -synuclein on western blots was confirmed by pre-absorption of the antibody with 50X molar excess of purified human α -synuclein, which abolished all signal except for a band migrating at 25 kDa (herein denoted the 25 kDa non-specific band).

Animals were treated with compounds for 6 months of daily i.p. injections at 50 mg/kg/day from 12 months of age to 18 months of age. Compound 7 significantly reduced α -synuclein levels by 69% in the particulate fraction (Figure 35) and significantly reduced α -synuclein levels by 73% in the cytosolic fraction (Figure 36) relative to vehicle-treated mice. Since these cohorts are of mixed gender (there are usually 2 males per group), and since gender-related variability in α -synuclein levels is sometimes seen, we analyzed females separately. Importantly, compound 7 significantly reduced α -synuclein levels by 58% in the particulate fraction (Figure 35) and 48% in the cytosolic fraction (Figure 36) when females only were analyzed.

To test whether the compounds would result in a similar reduction in α -synuclein in younger animals, treated for a shorter time, compounds (or vehicle) were administered for 6 weeks of daily i.p. injections, in female mice only, at 50 mg/kg/day from approximately 3 months of age to approximately 4-5 months of age. Compound 7 treatments significantly reduced α -synuclein levels by 45% in the particulate fraction (Figure 37) and significantly reduced α -synuclein levels by 71% in the cytosolic fraction (Figure 38) relative to vehicle-treated mice. Similar reductions in α -synuclein levels with compound 7 treatment (relative to vehicle-treated controls) were seen when the posterior portion of the brain (minus the cerebellum) was analyzed (data not shown).

Taken together, these results suggest that by disrupting or reducing α -synuclein aggregation compound treatment may result in more soluble α -synuclein forms (including monomer) that are better substrates for clearance.

Example 14: Compositions of compounds of this invention

The compounds of this invention, as mentioned previously, are desirably administered in the form of pharmaceutical compositions. Suitable pharmaceutical compositions, and the method

of preparing them, are well-known to persons of ordinary skill in the art and are described in such treatises as *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, A. Gennaro, ed., 20th edition, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

Representative compositions are as follows:

Oral tablet formulation

An oral tablet formulation of a compound of this invention is prepared as follows:

	<u>% w/w</u>
Compound of this invention	10.0
Magnesium stearate	0.5
Starch	2.0
Hydroxypropylmethylcellulose	1.0
Microcrystalline cellulose	86.5

The ingredients are mixed to homogeneity, then granulated with the aid of water, and the granulates are dried. The dried granulate is then compressed into tablets sized to give a suitable dose of the compound. The tablet is optionally coated by applying a suspension of a film forming agent (e.g. hydroxypropylmethylcellulose), pigment (e.g. titanium dioxide), and plasticizer (e.g. diethyl phthalate), and drying the film by evaporation of the solvent. The film coat may comprise, for example, 2-6% of the tablet weight.

Oral capsule formulation

The granulate from the previous section of this Example is filled into hard gelatin capsules of a size suitable to the intended dose. The capsule is banded for sealing, if desired.

Softgel formulation

A softgel formulation is prepared as follows:

	<u>% w/w</u>
Compound of this invention	20.0
Polyethylene glycol 400	80.0

The compound is dissolved or dispersed in the polyethylene glycol, and a thickening agent added if required. A quantity of the formulation sufficient to provide the desired dose of the compound is then filled into softgels.

Parenteral formulation

A parenteral formulation is prepared as follows:

	<u>% w/w</u>
Compound of this invention	1.0
Normal saline	99.0

The compound is dissolved in the saline, and the resulting solution is sterilized and filled into vials, ampoules, and prefilled syringes, as appropriate.

Controlled-release oral formulation

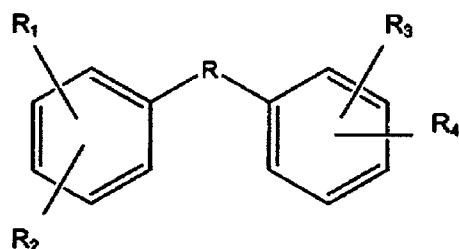
A sustained release formulation may be prepared by the method of US Patent No. 4,710,384, as follows:

One Kg of a compound of this invention is coated in a modified Uni-Glatt powder coater with Dow Type 10 ethyl cellulose. The spraying solution is an 8% solution of the ethyl cellulose in 90% acetone to 10% ethanol. Castor oil is added as plasticizer in an amount equal to 20% of the ethyl cellulose present. The spraying conditions are as follows: 1) speed, 1 liter/hour; 2) flap, 10-15%; 3) inlet temperature, 50°C, 4) outlet temperature, 30°C, 5) percent of coating, 17%. The coated compound is sieved to particle sizes between 74 and 210 microns. Attention is paid to ensure a good mix of particles of different sizes within that range. Four hundred mg of the coated particles are mixed with 100 mg of starch and the mixture is compressed in a hand press to 1.5 tons to produce a 500 mg controlled release tablet.

The present invention is not limited in scope by the specific embodiments described herein. Indeed, various modifications of the invention in addition to those described will become apparent to those skilled in the art from the foregoing descriptions. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims. Various publications are cited herein, the disclosures of which are incorporated by reference in their entireties.

We claim:

1. A compound selected from the group consisting of:



where R₁, R₂, R₃, and R₄ are independently positioned hydroxyl groups and R is a heteroaryl selected from the group consisting of imidazoles, triazoles and pyrazoles or pharmaceutically acceptable salts thereof.

2. The compound of claim 1 where R is an imidazole.
3. The compound of claim 1 where R is a triazole.
4. The compound of claim 1 where R is a pyrazoles.
5. The compound of claim 1 where the compound is selected from the group consisting of:
2,4-bis(3,4-dihydroxyphenyl)imidazole;
3,5-bis(3,4 dihydroxyphenyl) 1,2,4 triazole;
3,5-bis(3,4 dihydroxyphenyl)pyrazole and pharmaceutically acceptable salts thereof.
6. A pharmaceutical composition comprising the compound of claim 1 and a pharmaceutically acceptable excipient.
7. A method of inhibiting the formation, deposition, accumulation, or persistence of A β amyloid or α -synuclein aggregatess, comprising treating the aggregatess with an effective amount of the compound of claim 1.
8. The method of claim 7 where the compound is selected from the group consisting of:
2,4-bis(3,4 dihydroxyphenyl) imidazole,
3,5-bis(3,4 dihydroxyphenyl) 1,2,4 triazole, and

3,5-bis(3,4 dihydroxyphenyl) pyrazole, and pharmaceutically acceptable salts thereof.

9. A method of treating a β -amyloid disease or a synucleinopathy in a mammal suffering therefrom, comprising administration of a therapeutically effective amount of the compound of claim 1.
10. The method of claim 9 where the β -amyloid disease is selected from the group of diseases consisting of Alzheimer's disease, Down's syndrome, hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of the Dutch type, and cerebral β -amyloid angiopathy.
11. The method of claim 10 where the β -amyloid disease is Alzheimer's disease.
12. The method of claim 9 where the synucleinopathy is selected from the group consisting of Parkinson's disease, familial Parkinson's disease, Lewy body disease, the Lewy body variant of Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, multiple system atrophy, and the Parkinsonism-dementia complex of Guam.
13. The method of claim 12 where the synucleinopathy is Parkinson's disease.
14. The method of claim 9 where the compound is selected from the group consisting of
2,4-bis (3,4 dihydroxyphenyl)imidazole,
3,5-bis (3,4 dihydroxyphenyl)1,2,4 triazole, and
3,5-bis (3,4 dihydroxyphenyl)pyrazole, and pharmaceutically acceptable salts thereof.
15. A method of improving motor performance in a mammal suffering from a synucleinopathy, comprising administration of a therapeutically effective amount of the compound of claim 1.
16. A method of arresting the progression of motor deficits in a mammal suffering from Parkinson's disease, comprising administration of a therapeutically effective amount of the compound of claim 1.

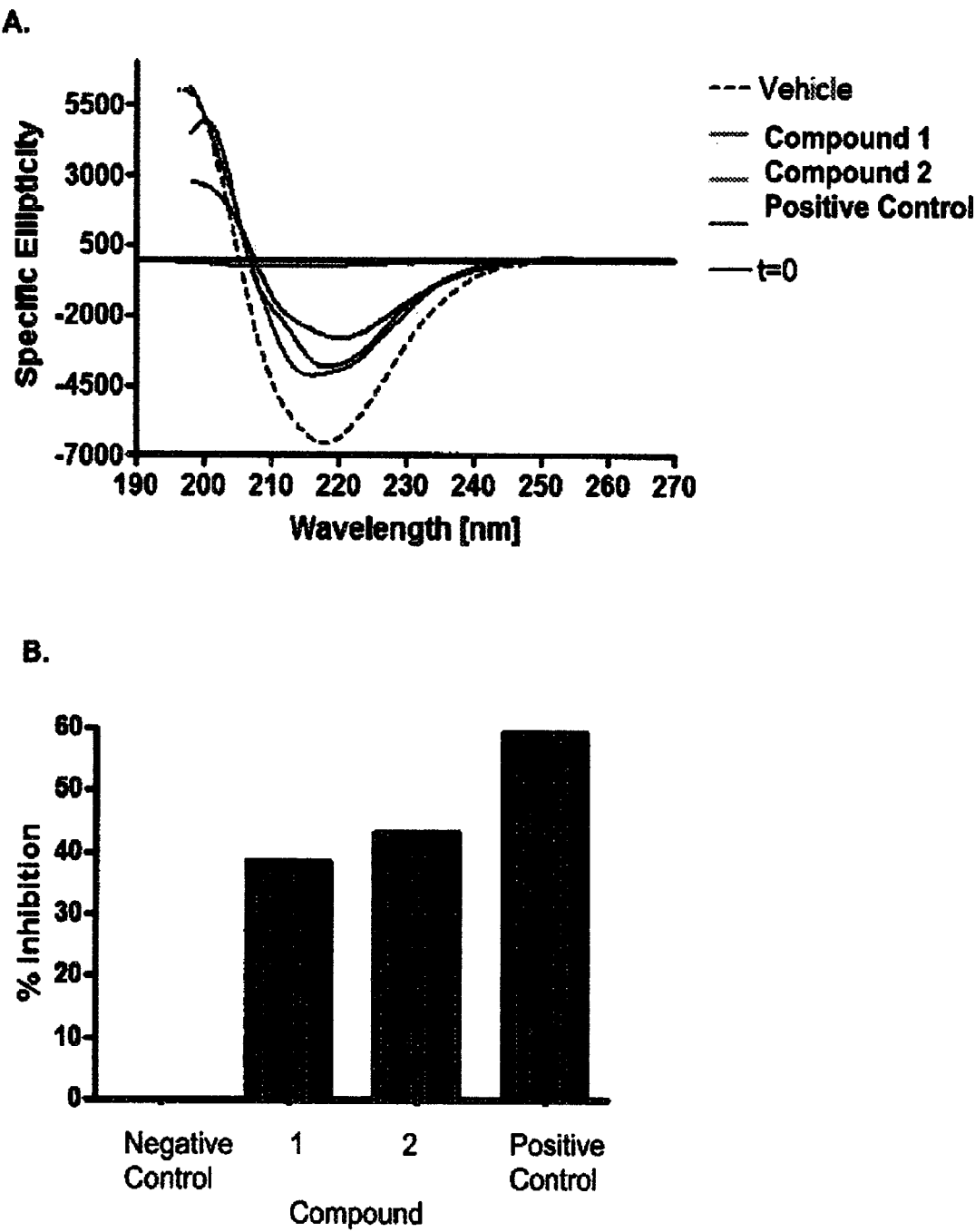


Figure 1

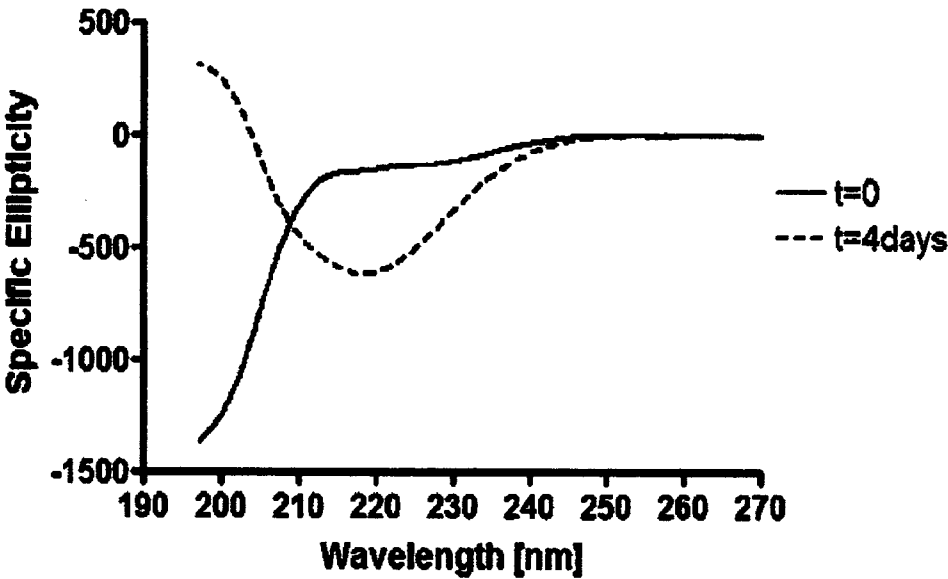


Figure 2

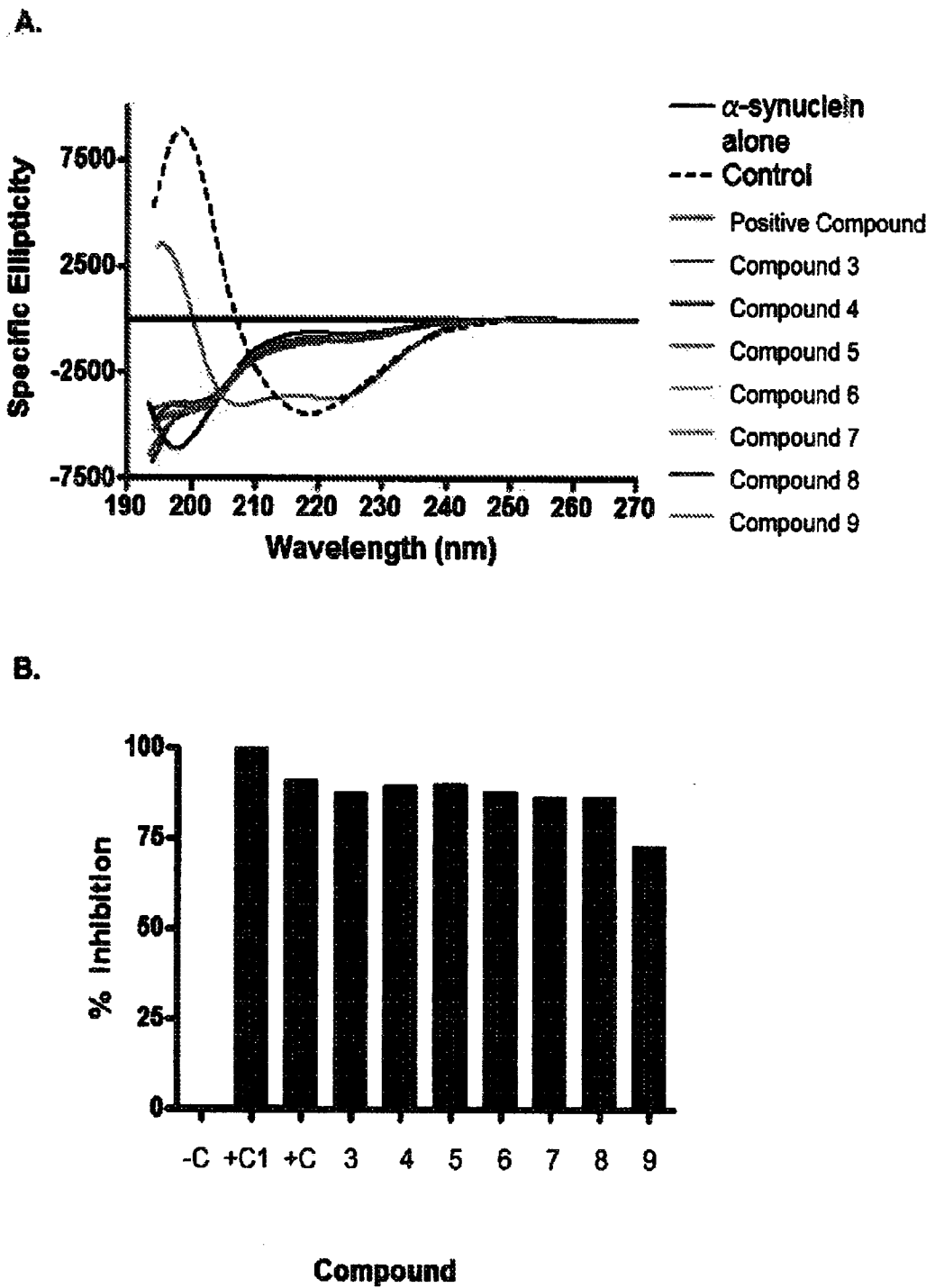


Figure 3

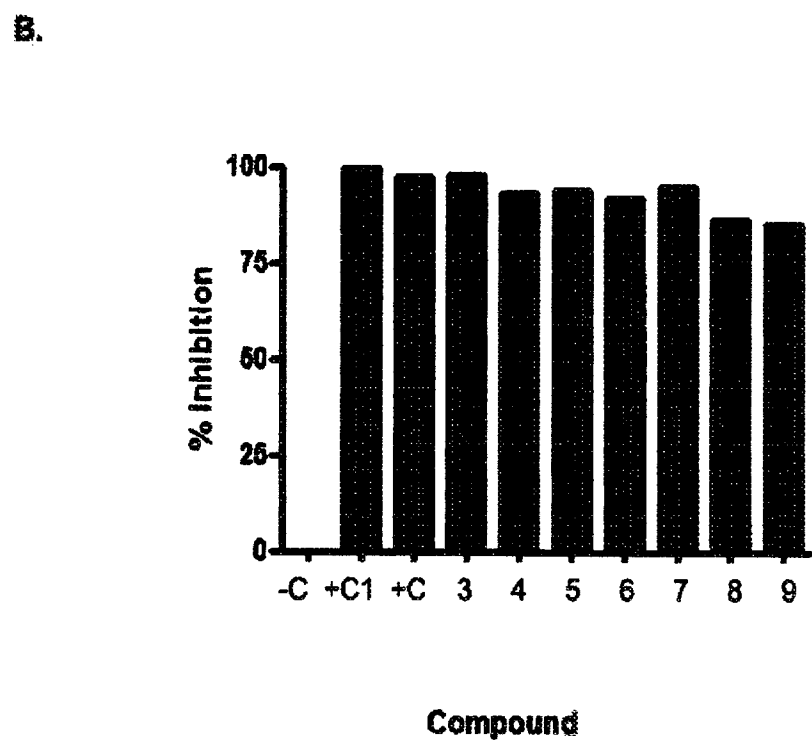
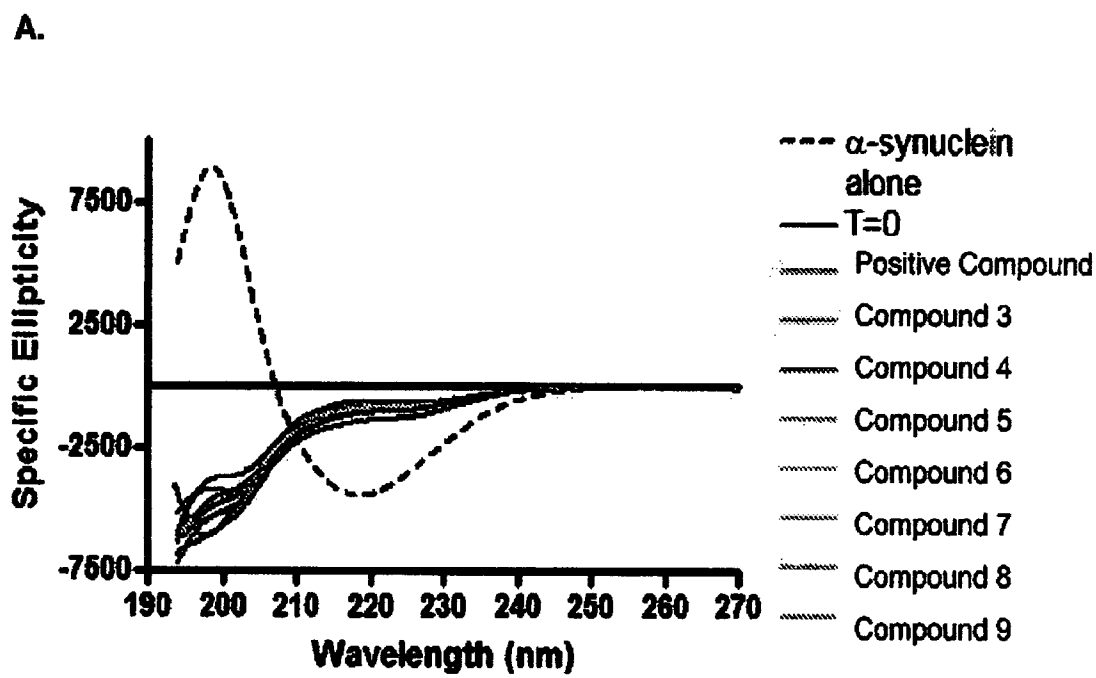
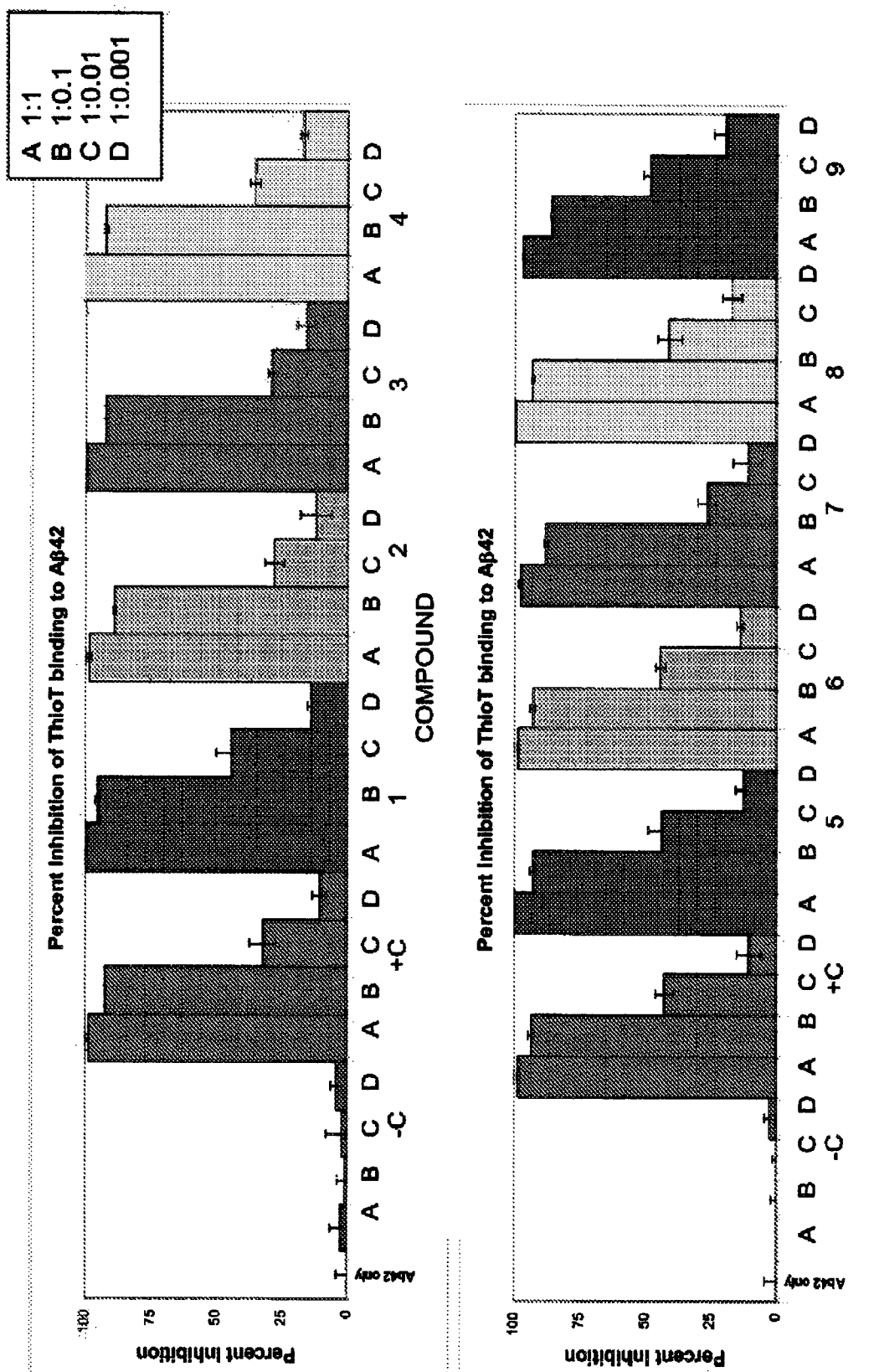


Figure 4



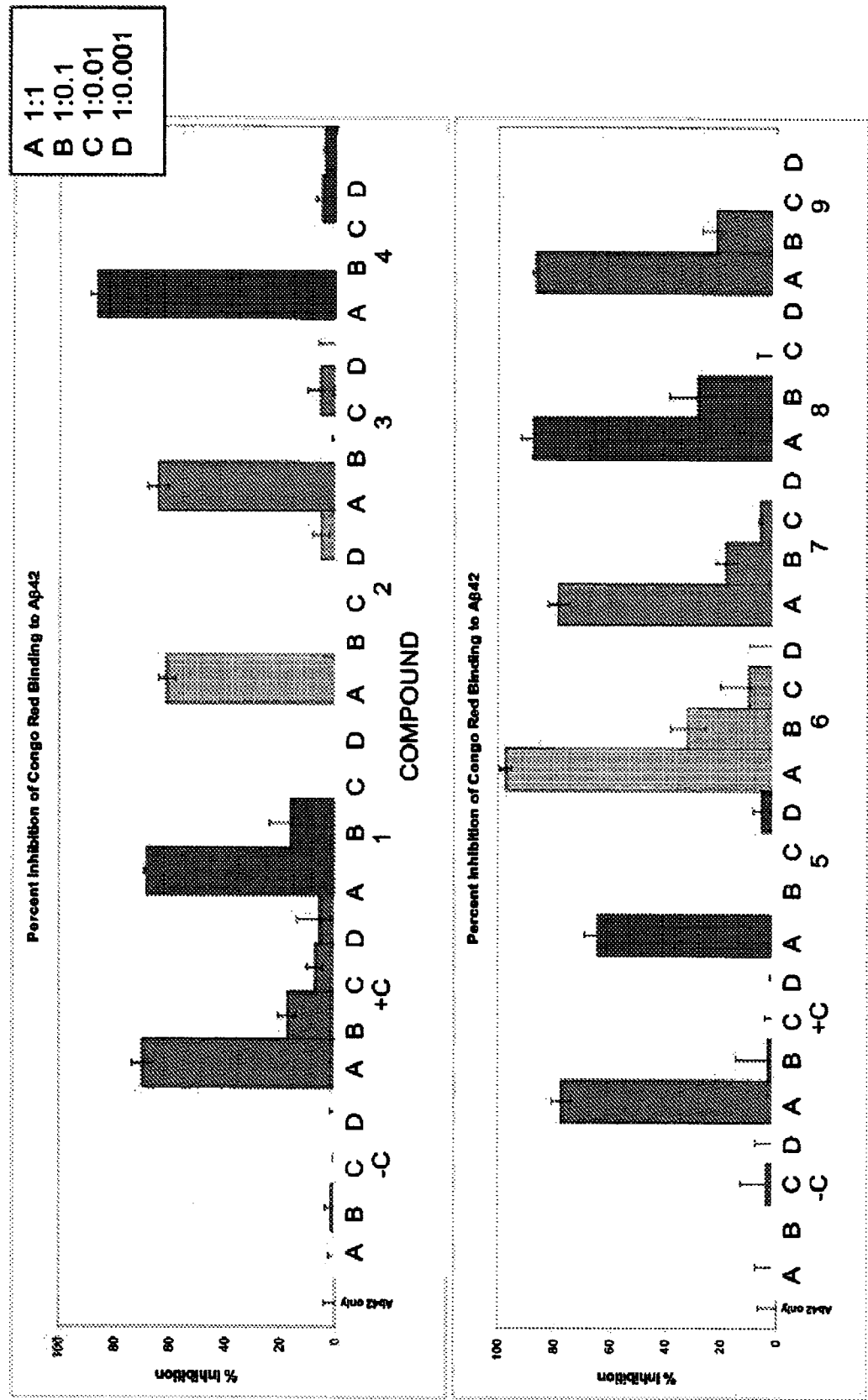


Figure 6

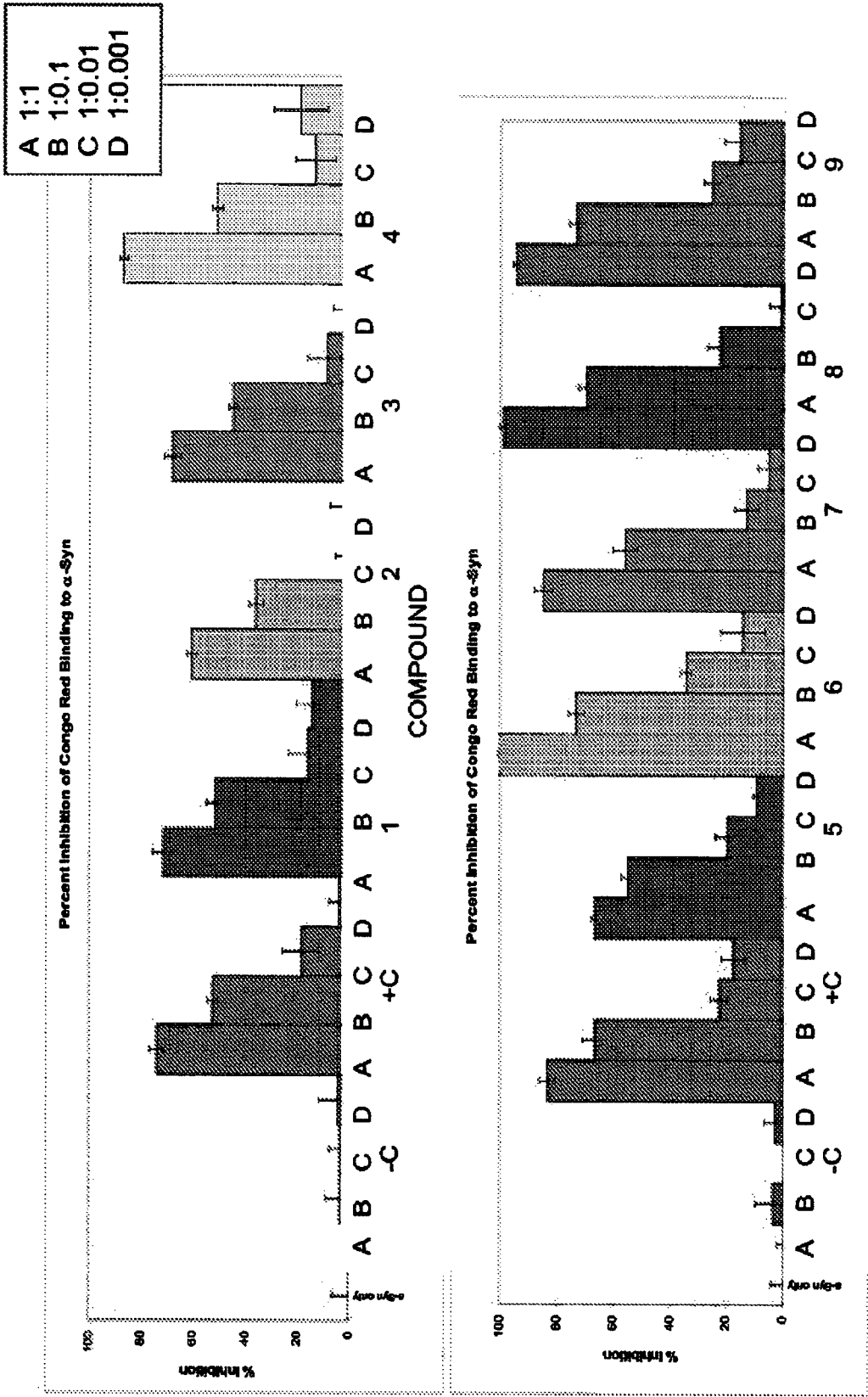


Figure 8

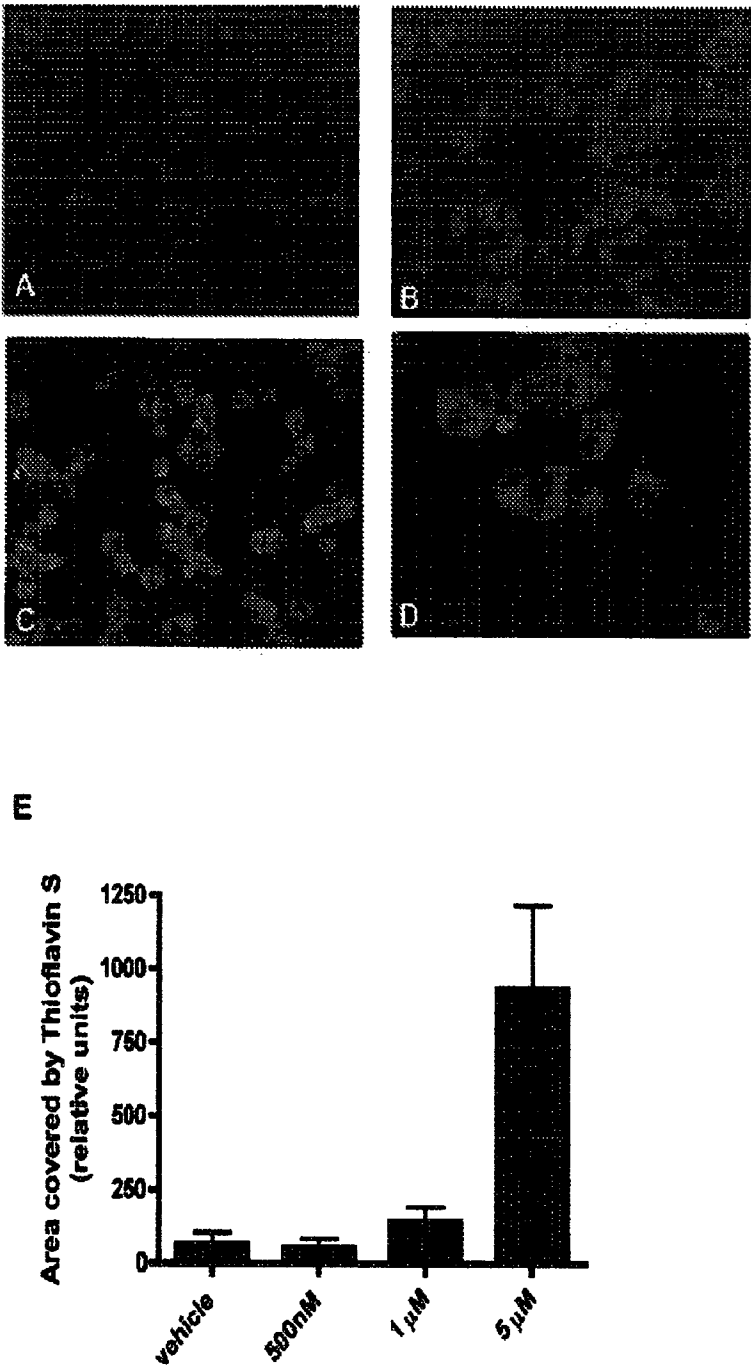


Figure 9

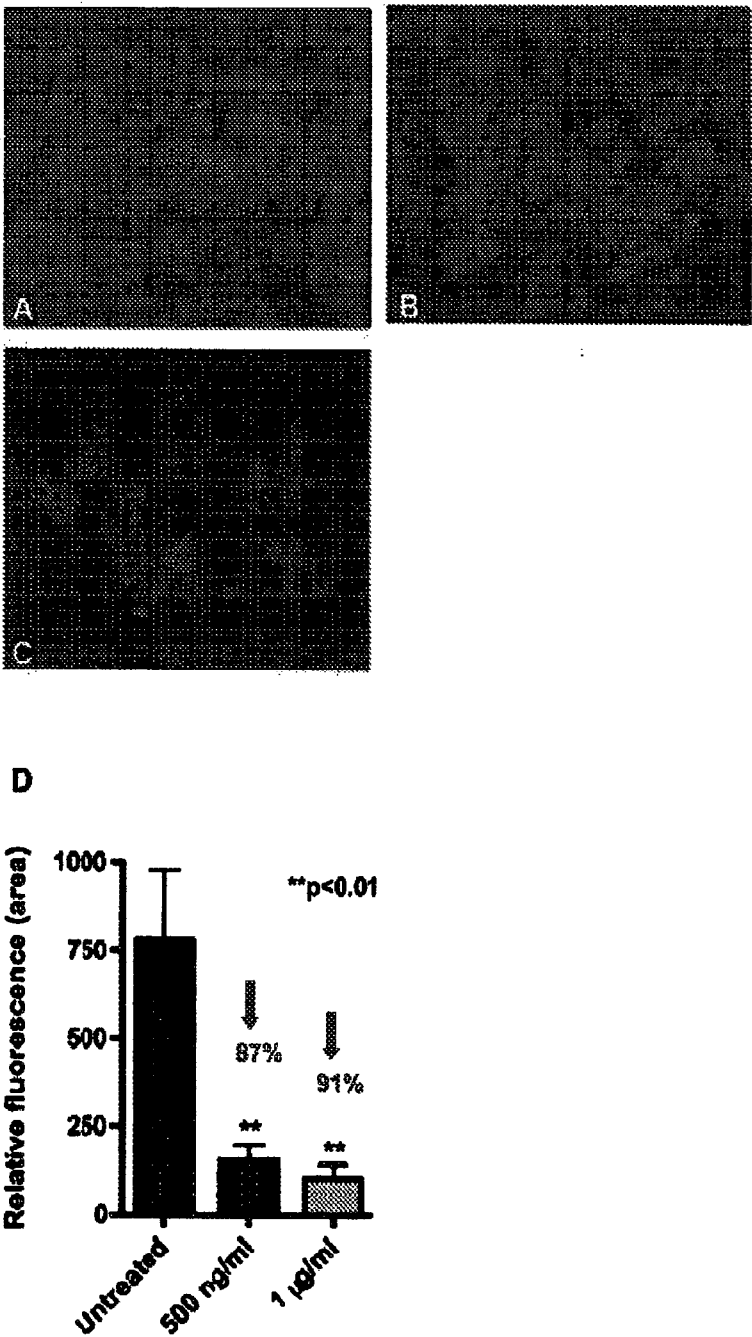


Figure 10

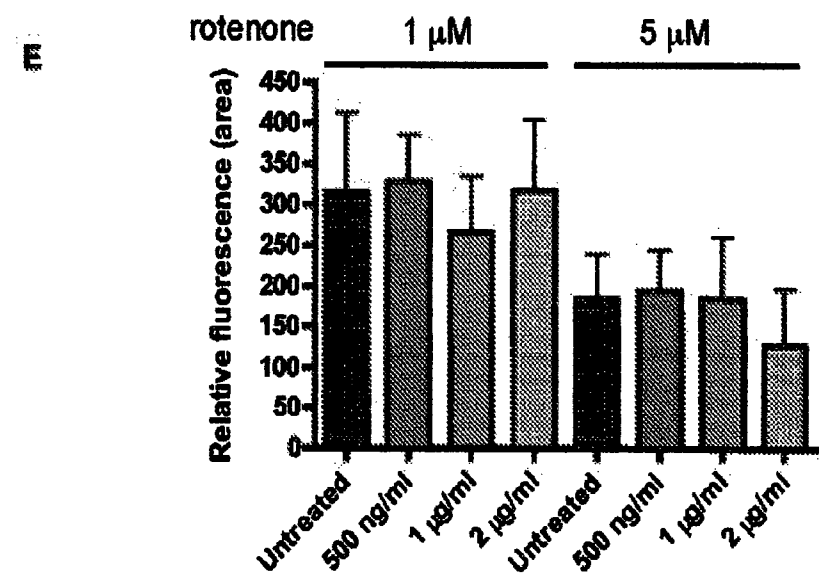
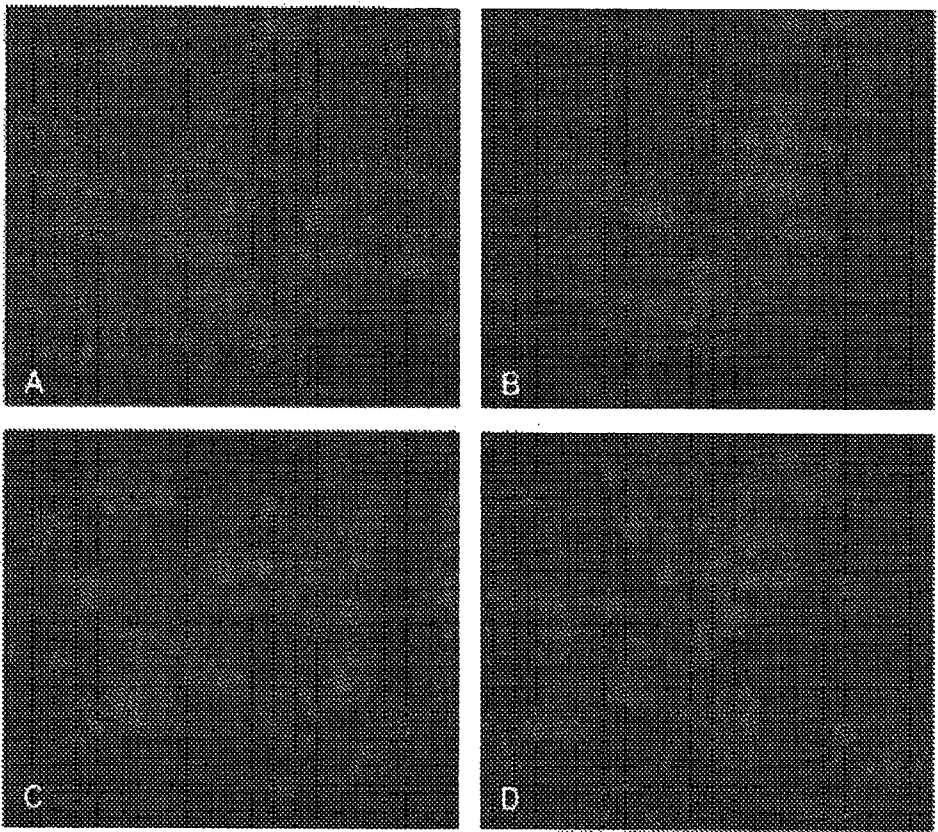
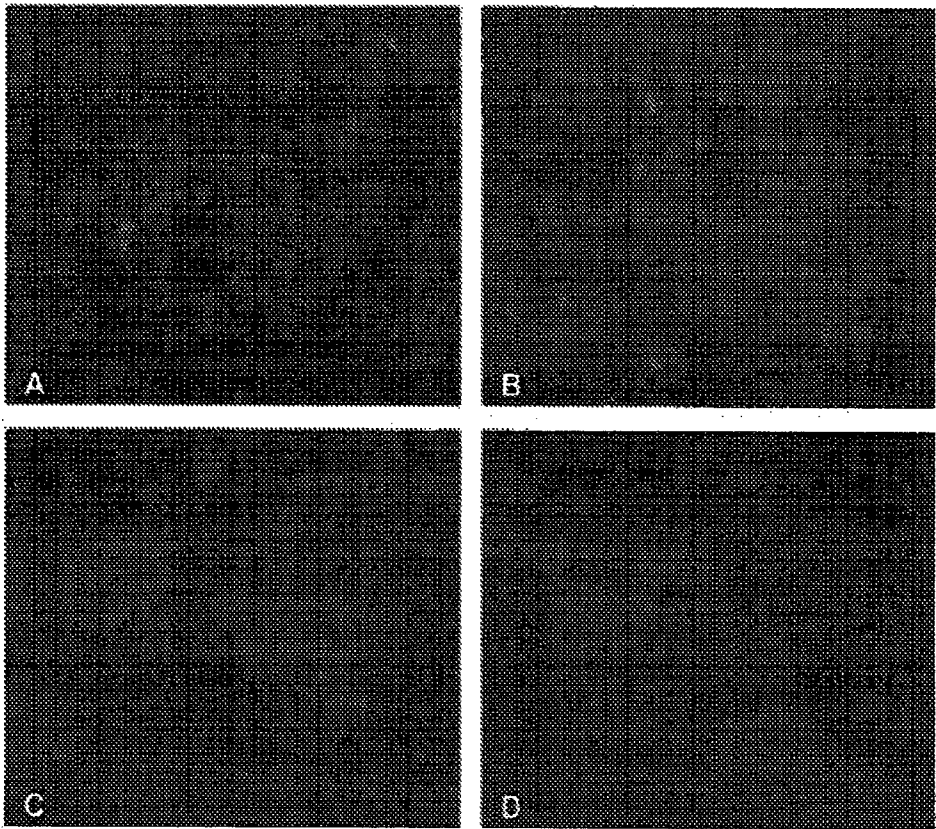


Figure 11



FIG

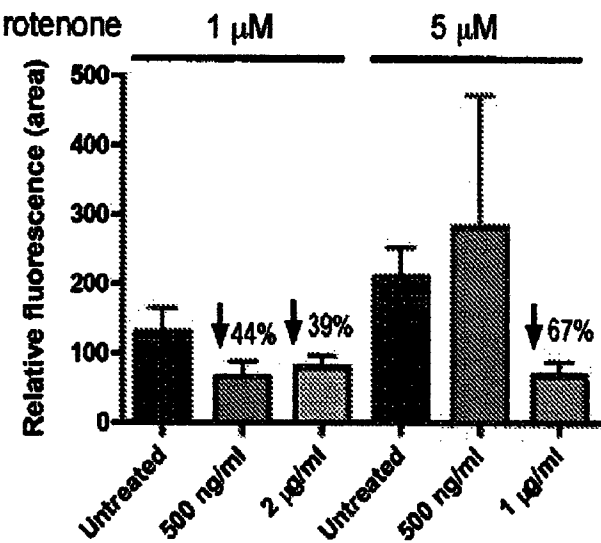


Figure 12

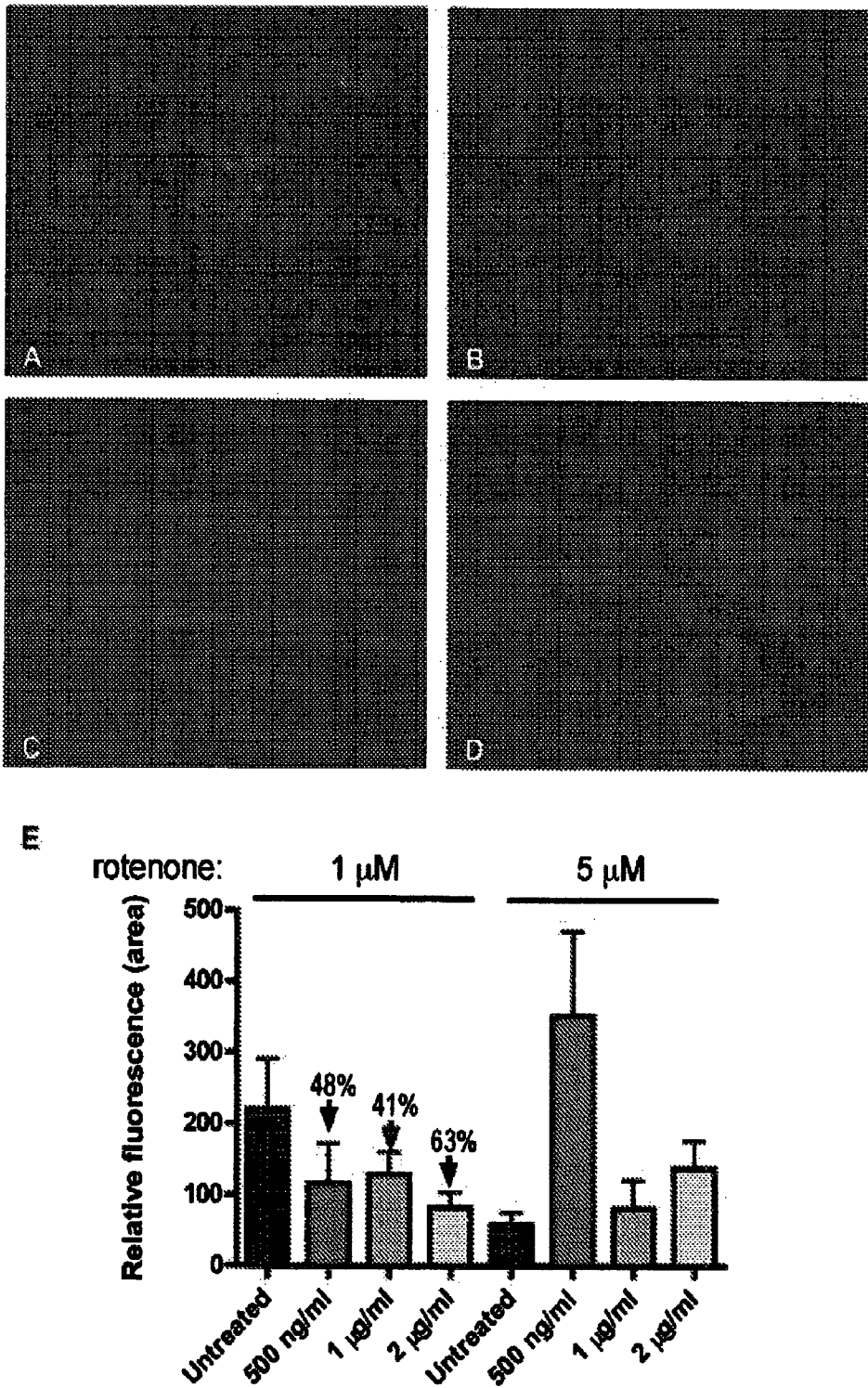


Figure 13

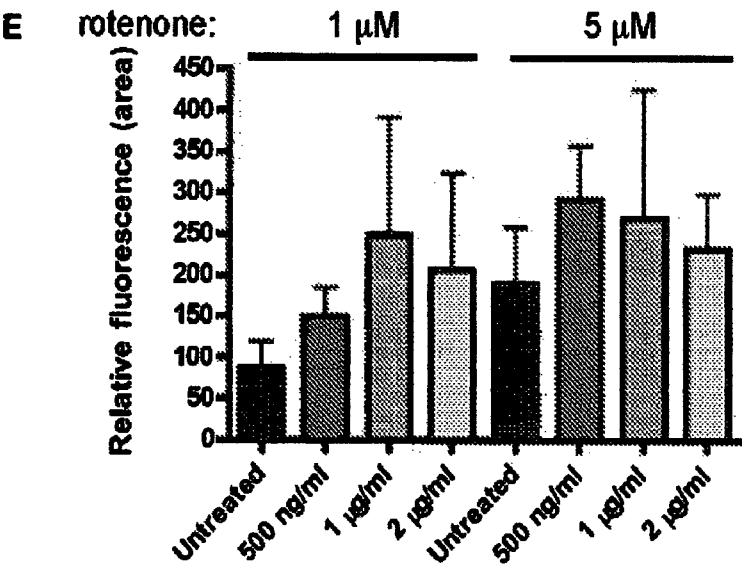
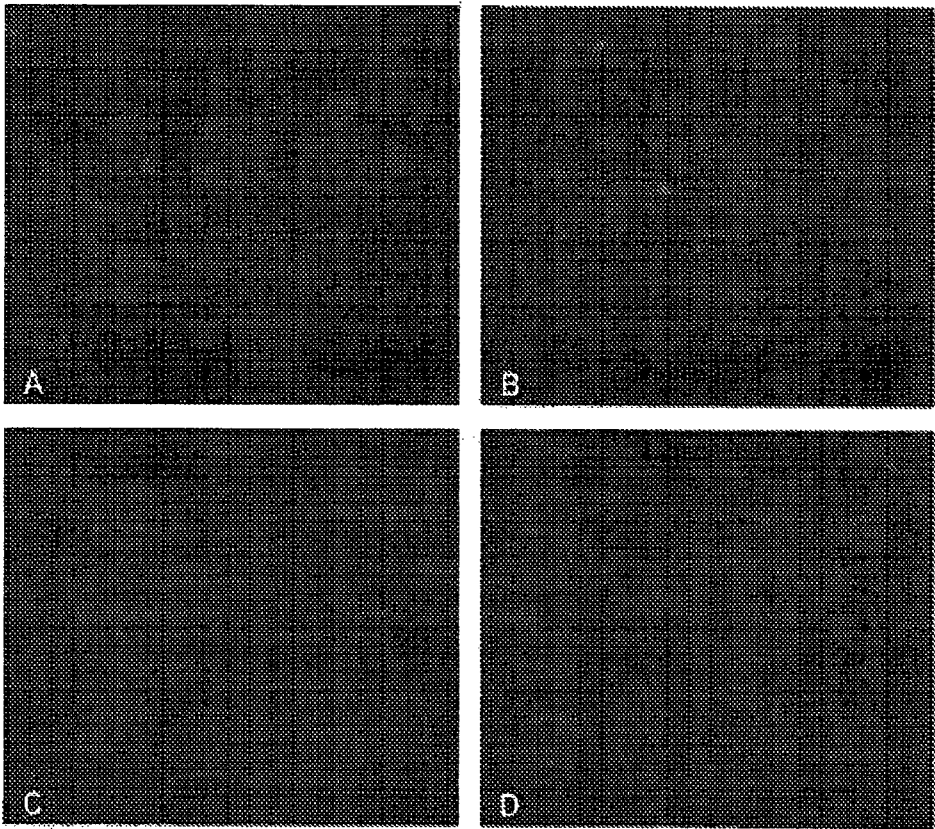


Figure 14

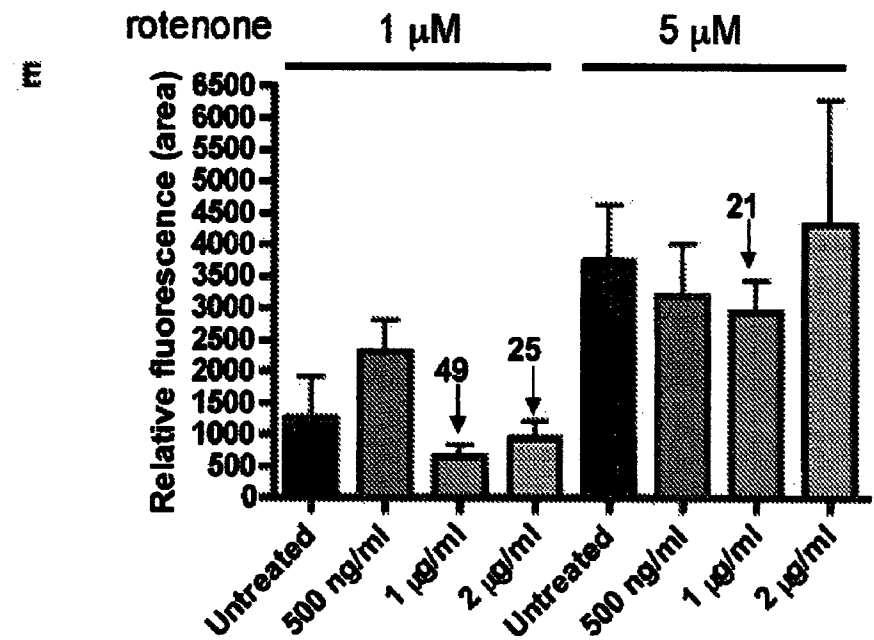
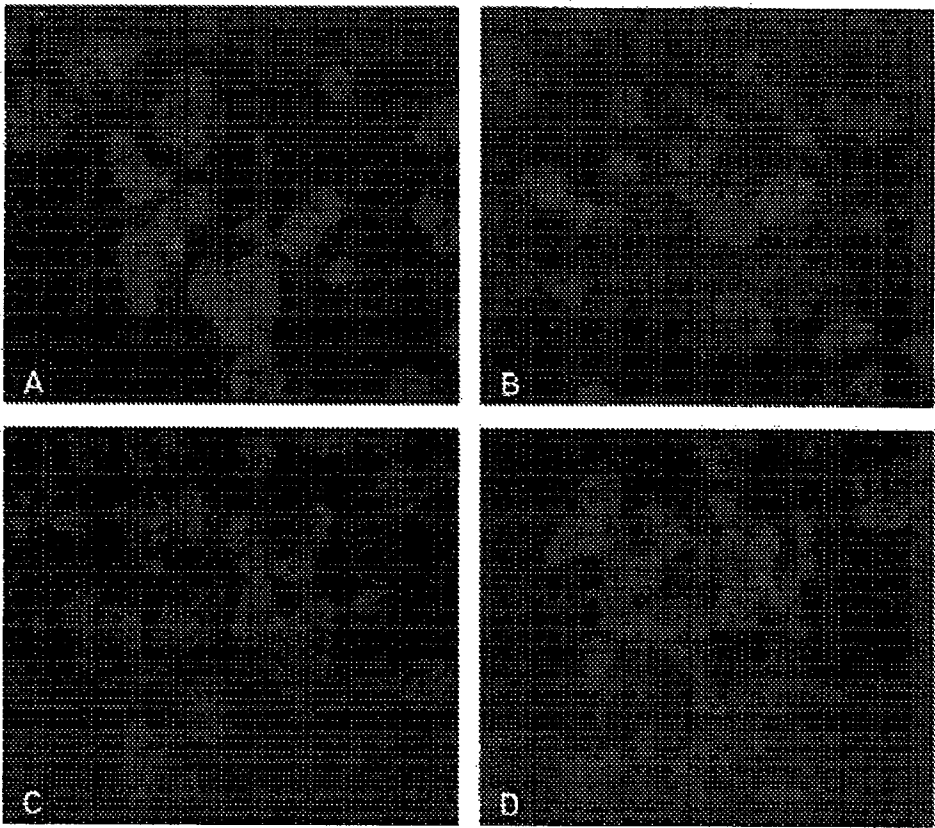


Figure 15

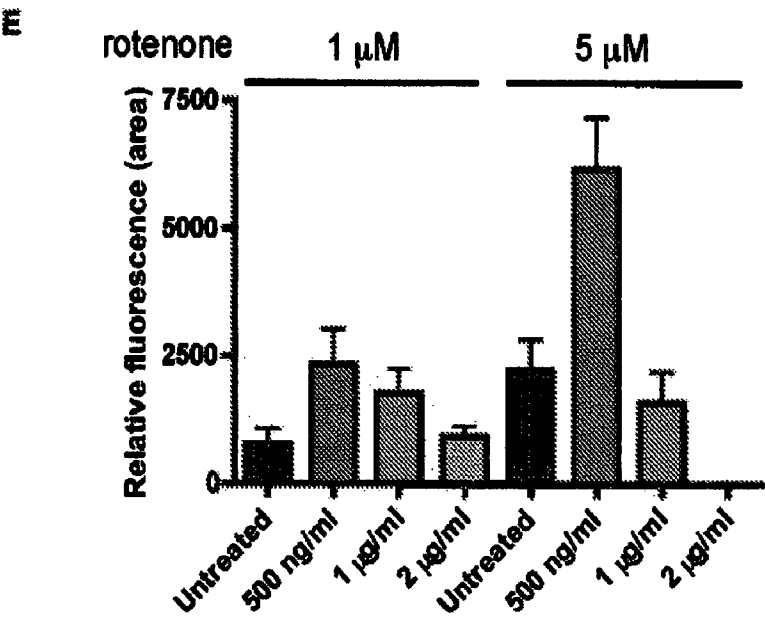
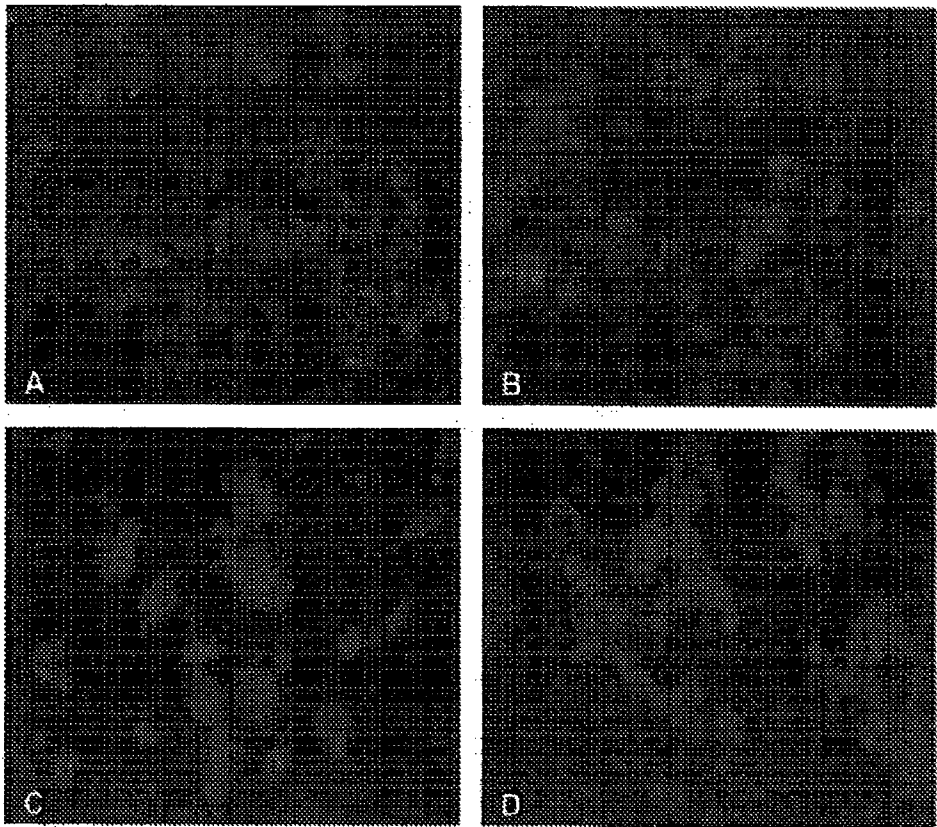


Figure 16

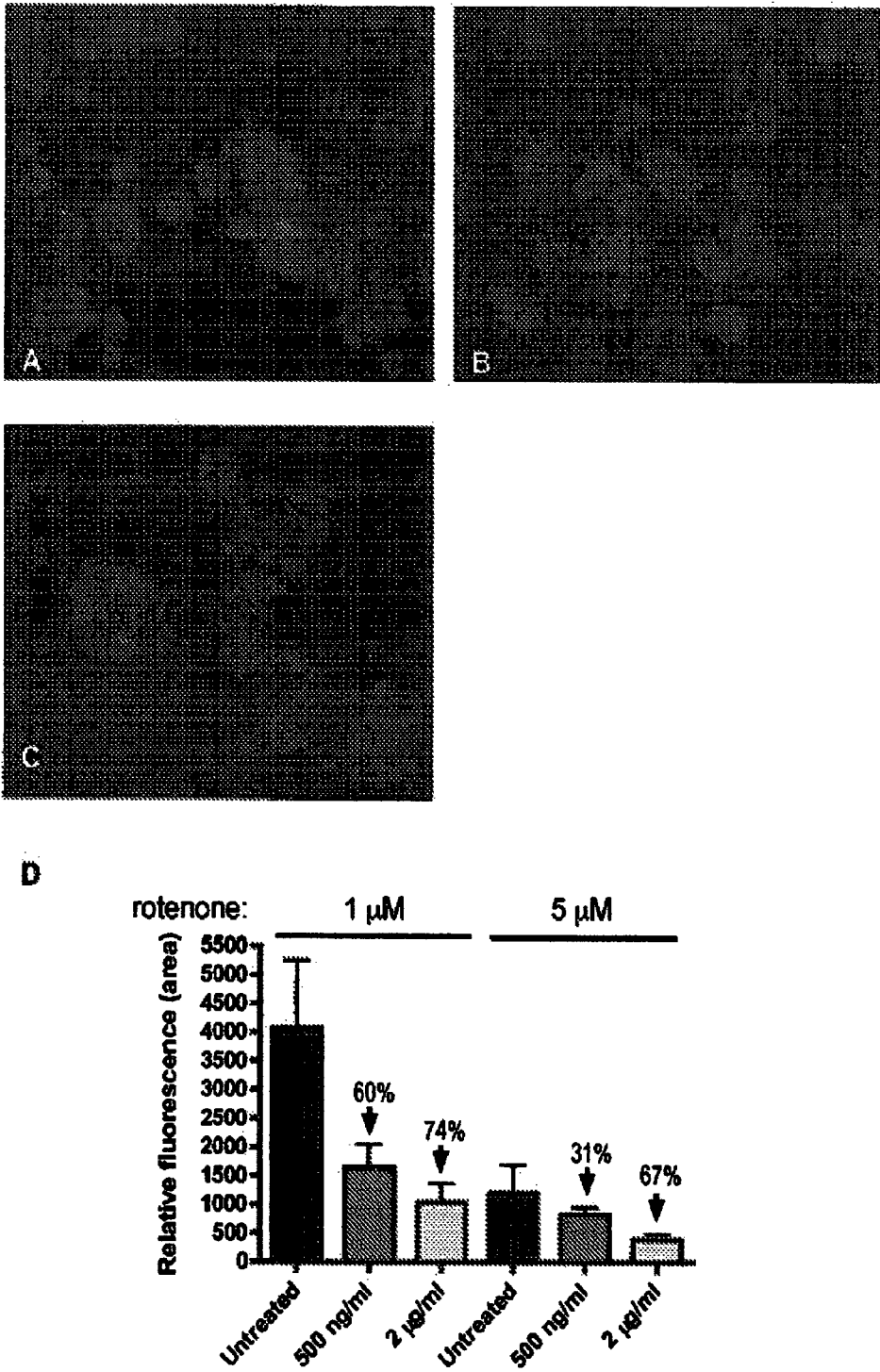


Figure 17

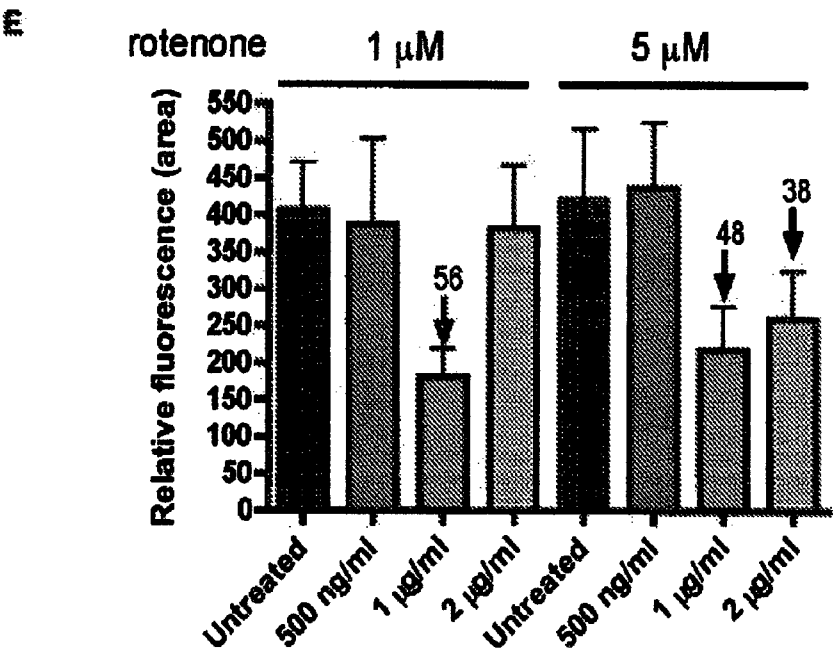
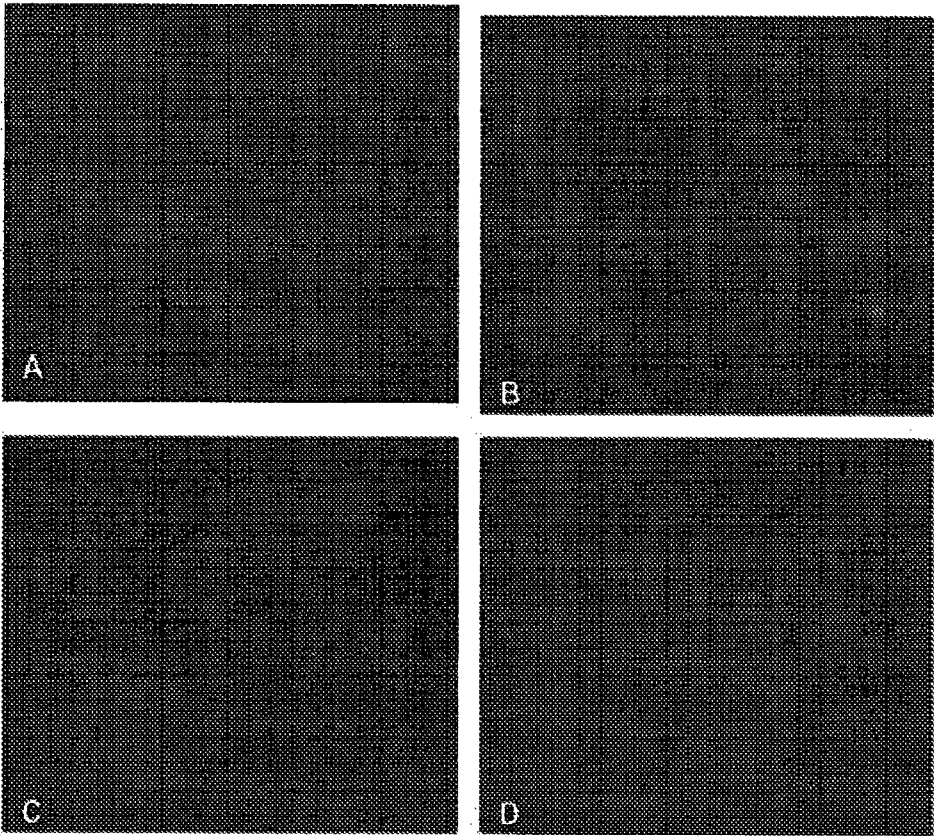


Figure 18

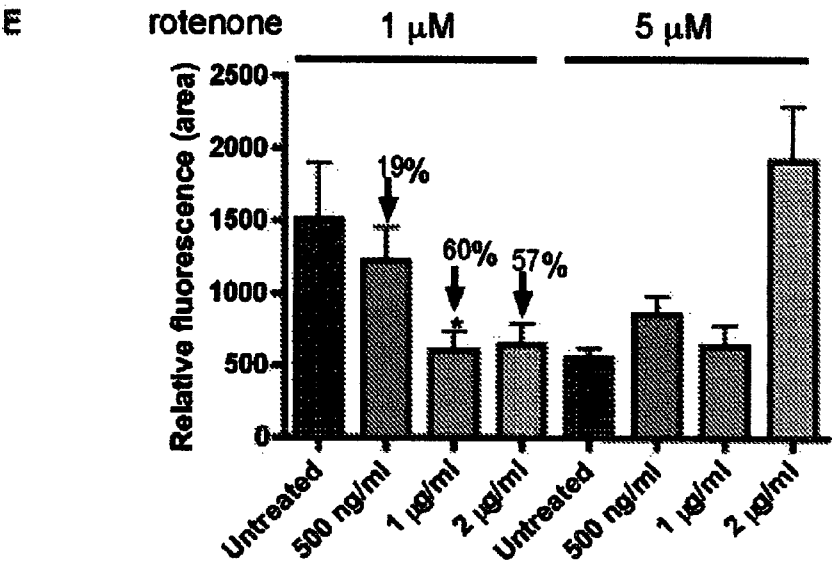
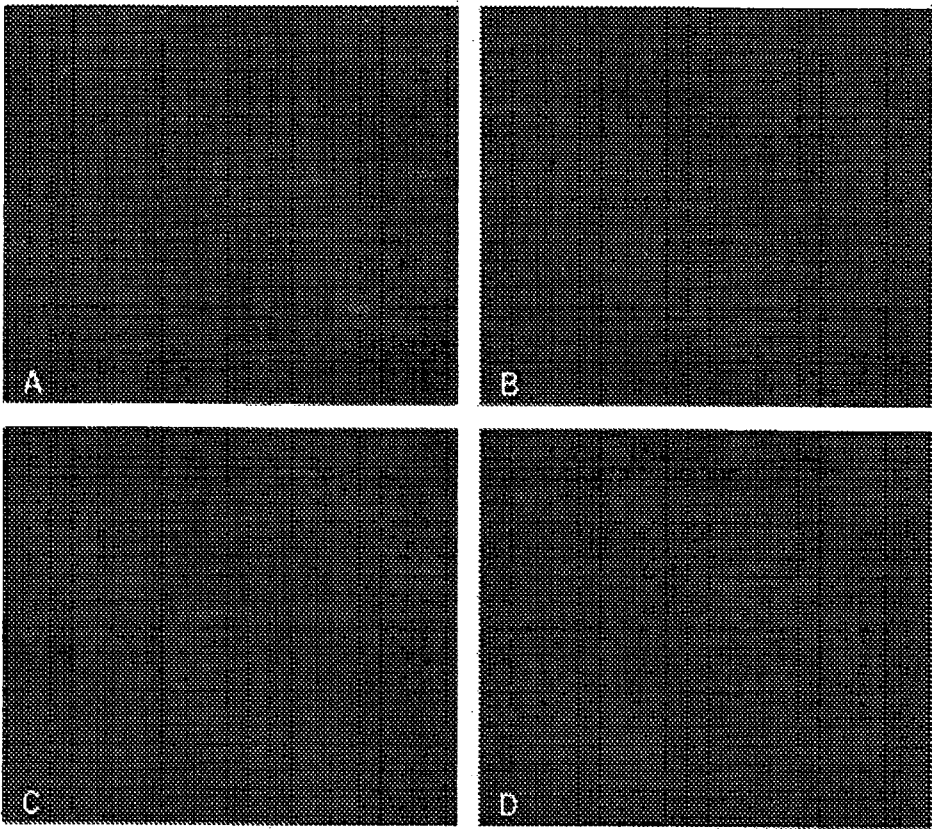


Figure 19

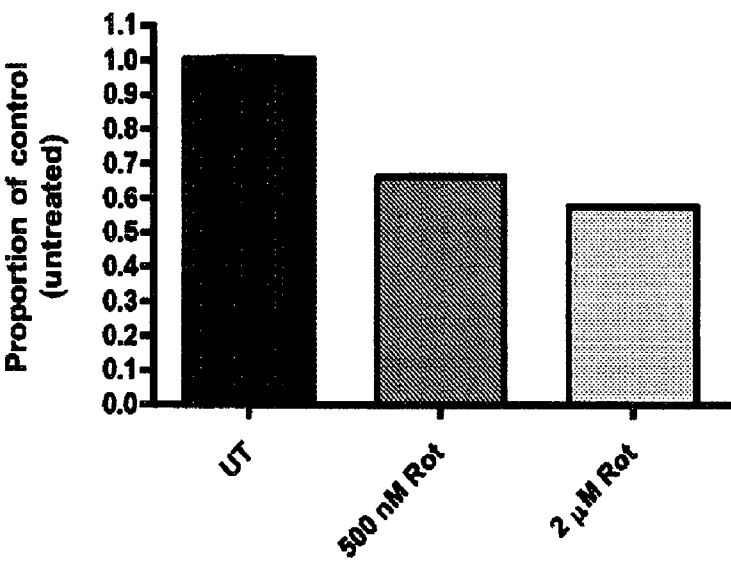


Figure 20

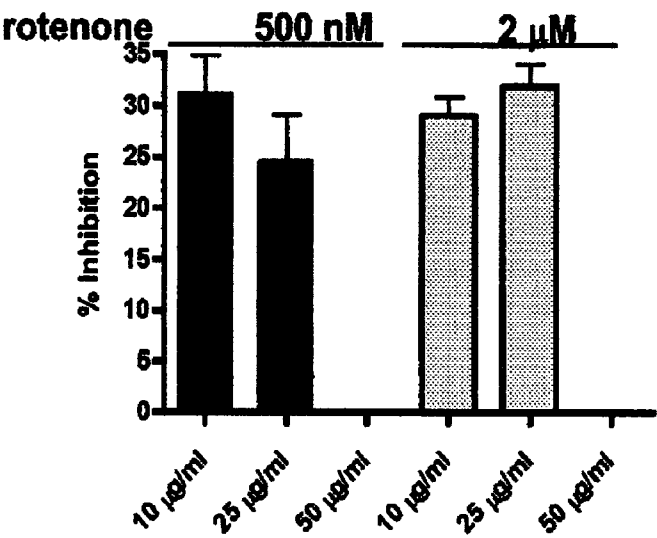


Figure 21

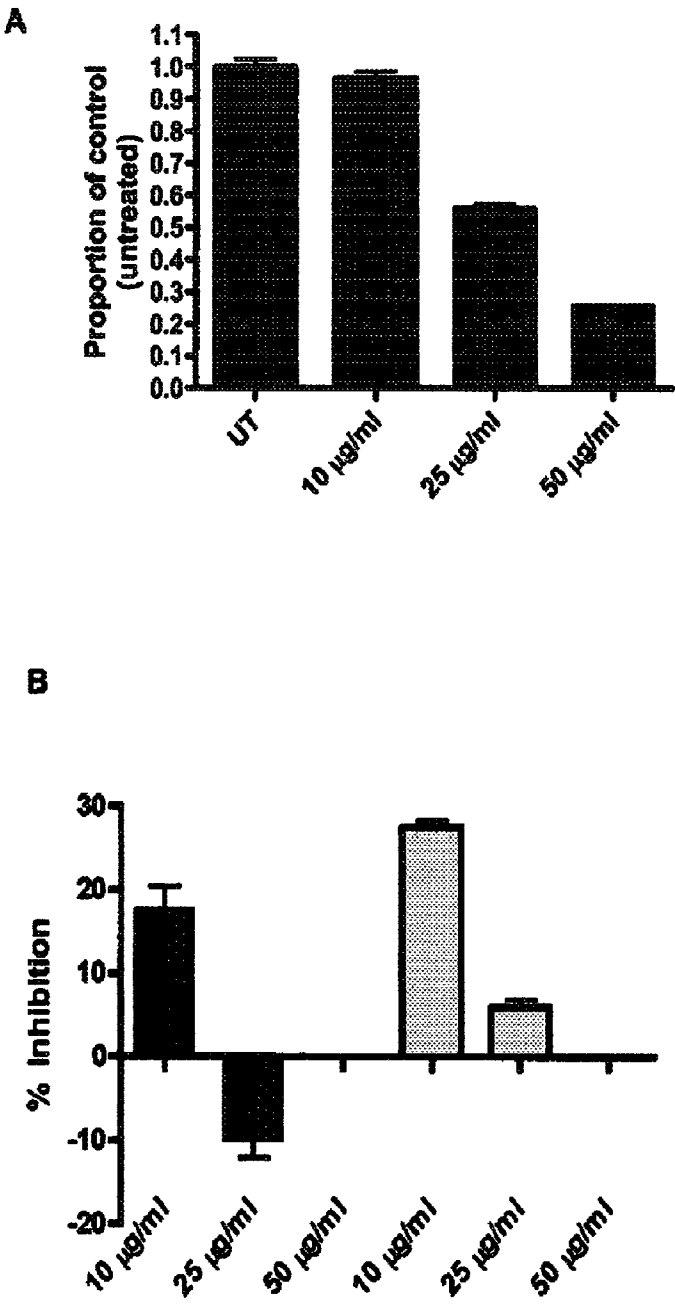


Figure 22

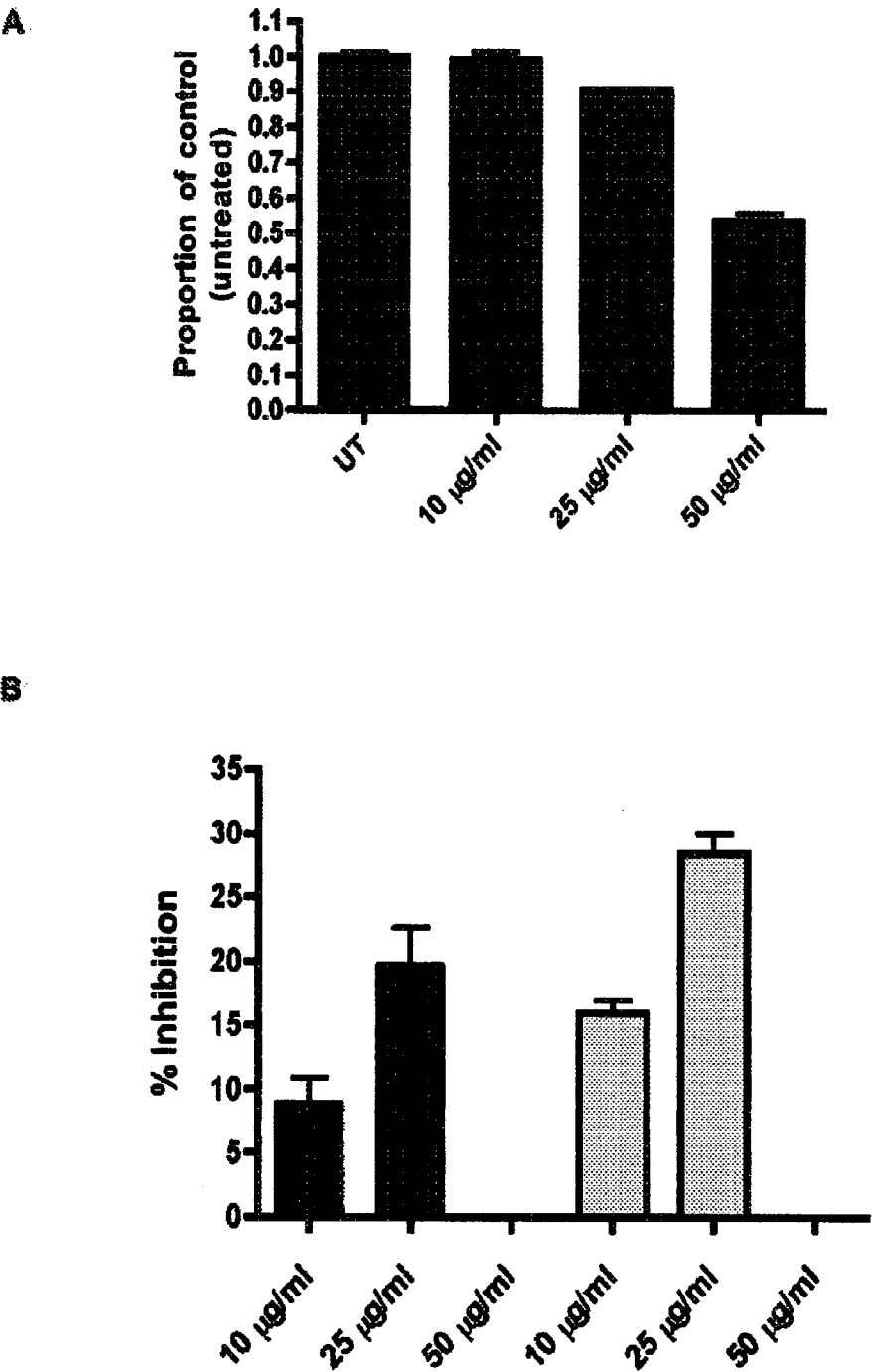


Figure 23

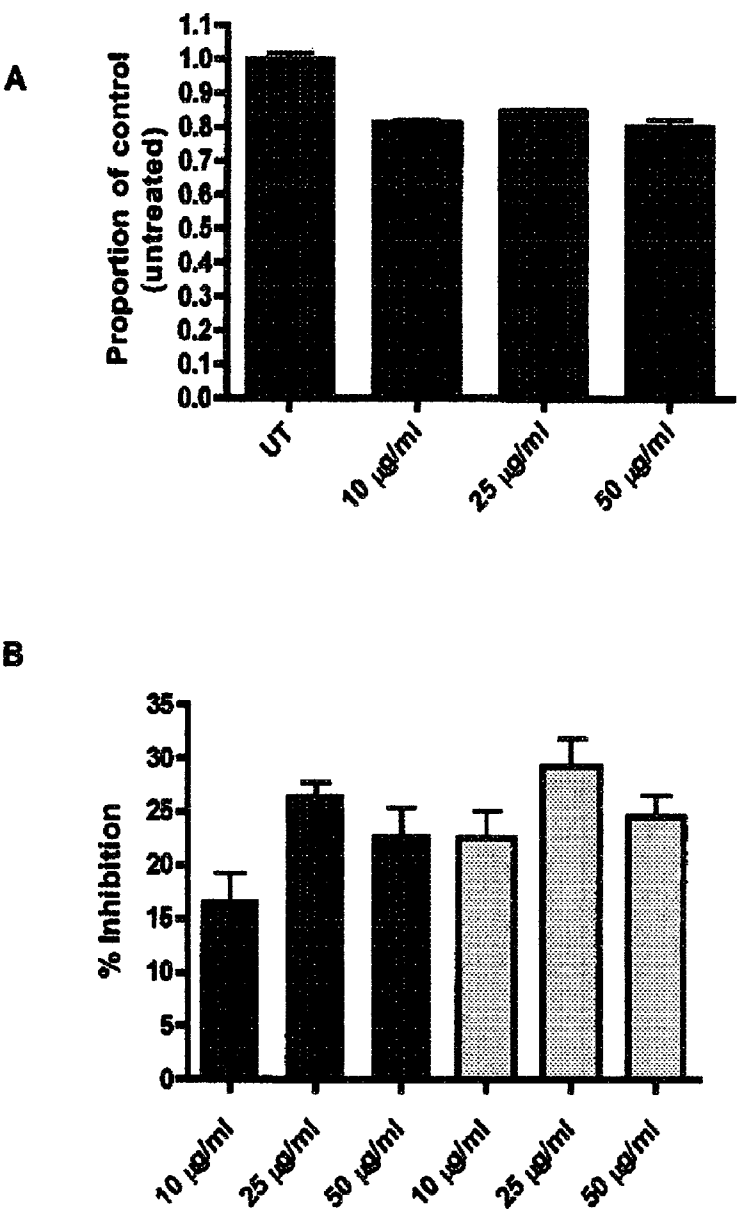


Figure 24

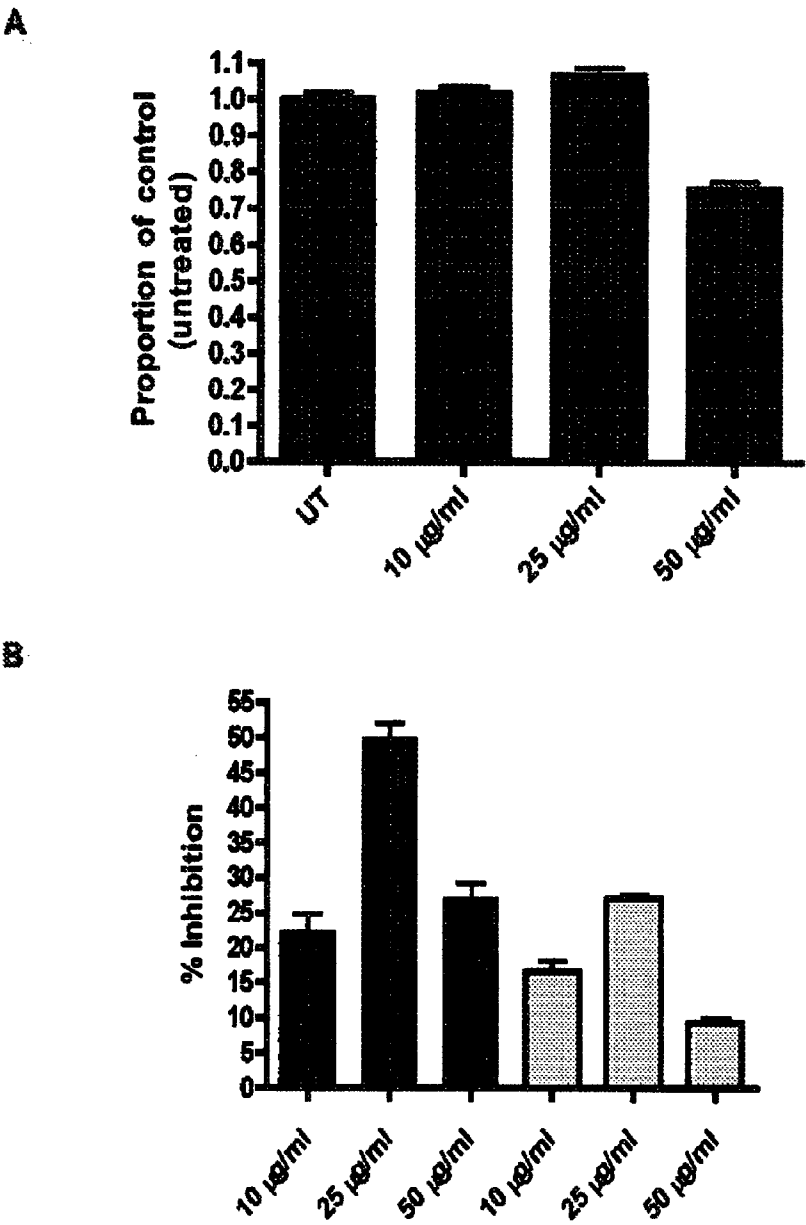
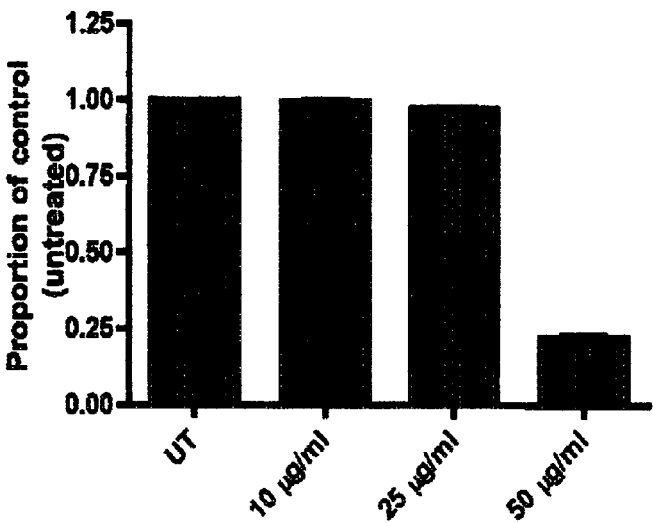


Figure 25

A



B

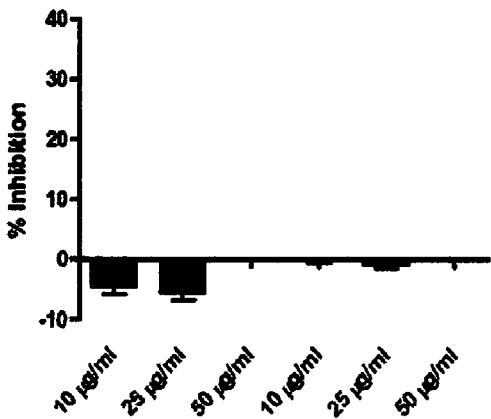


Figure 26

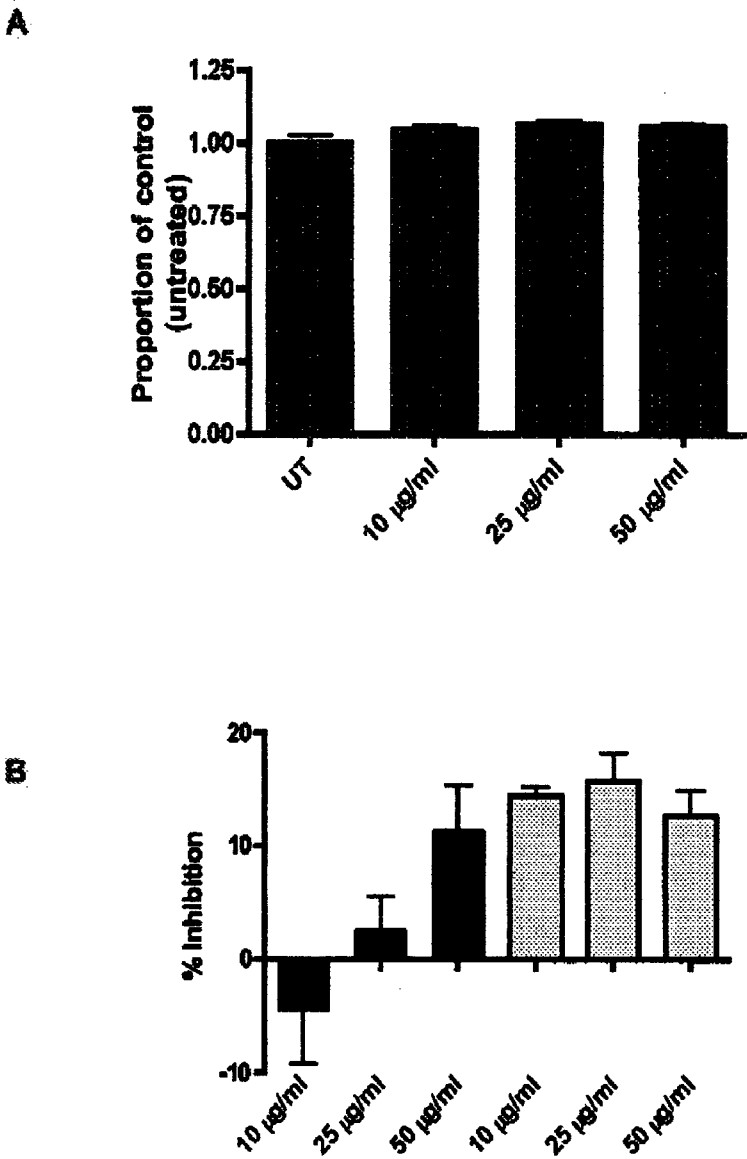


Figure 27

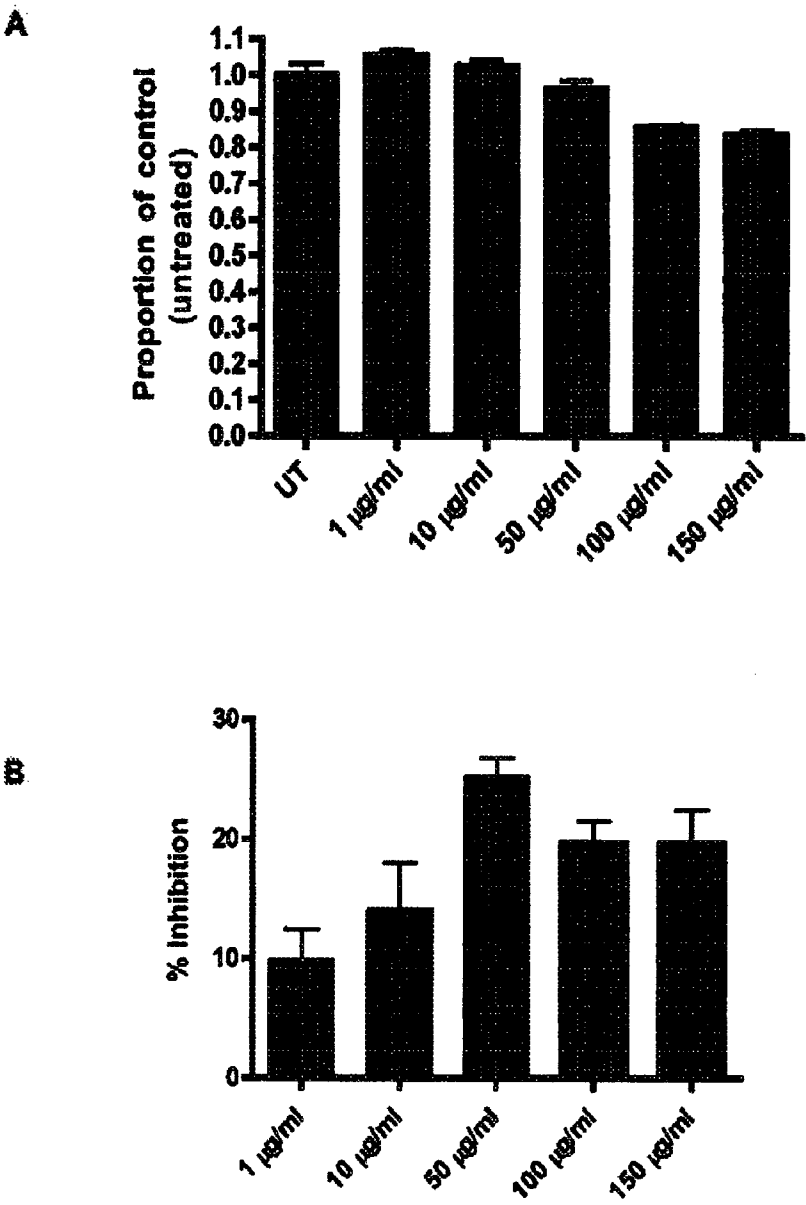


Figure 28

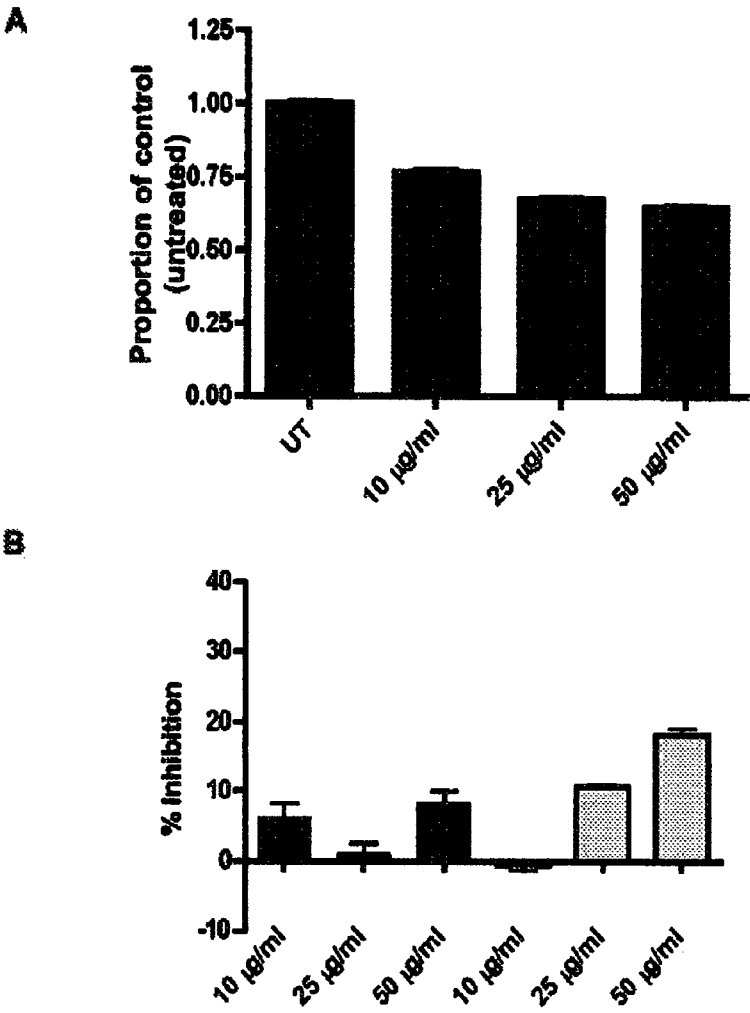


Figure 29

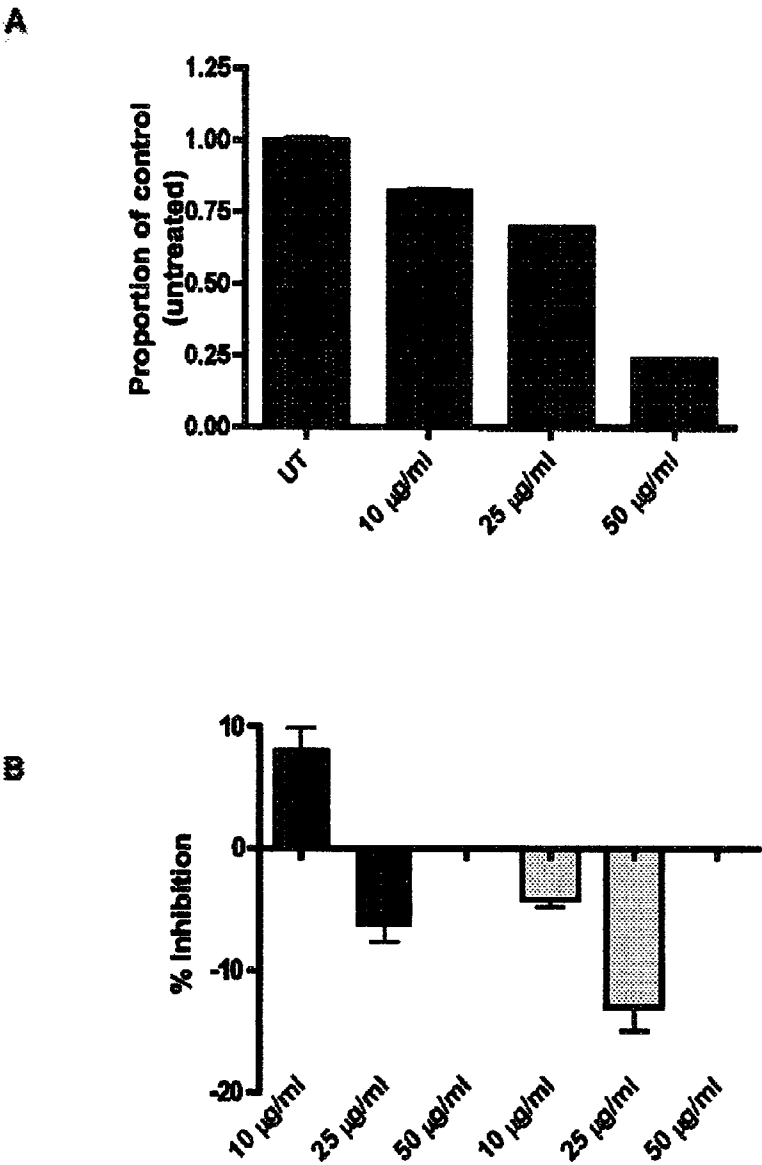
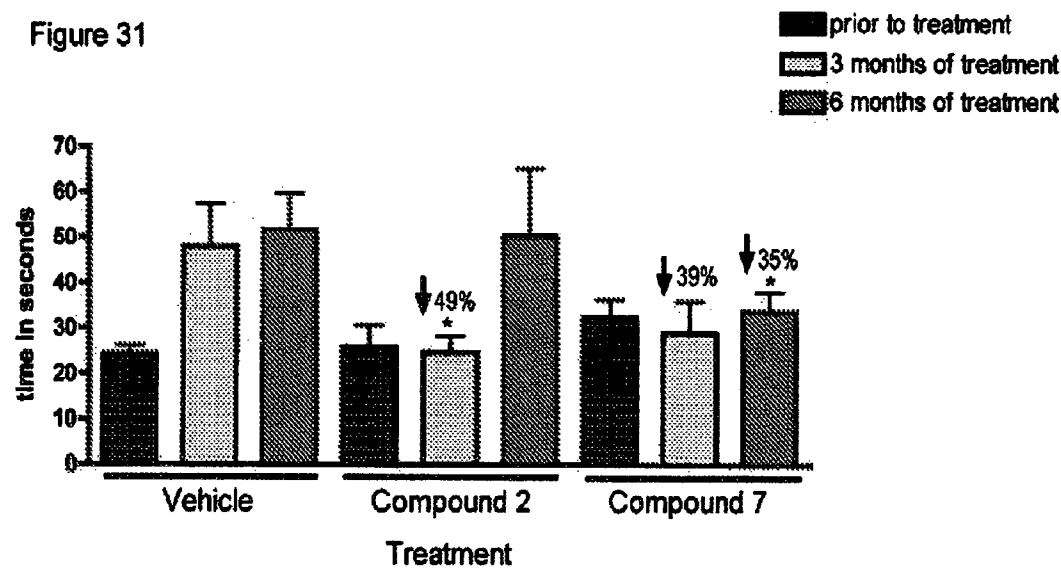


Figure 30

Figure 31



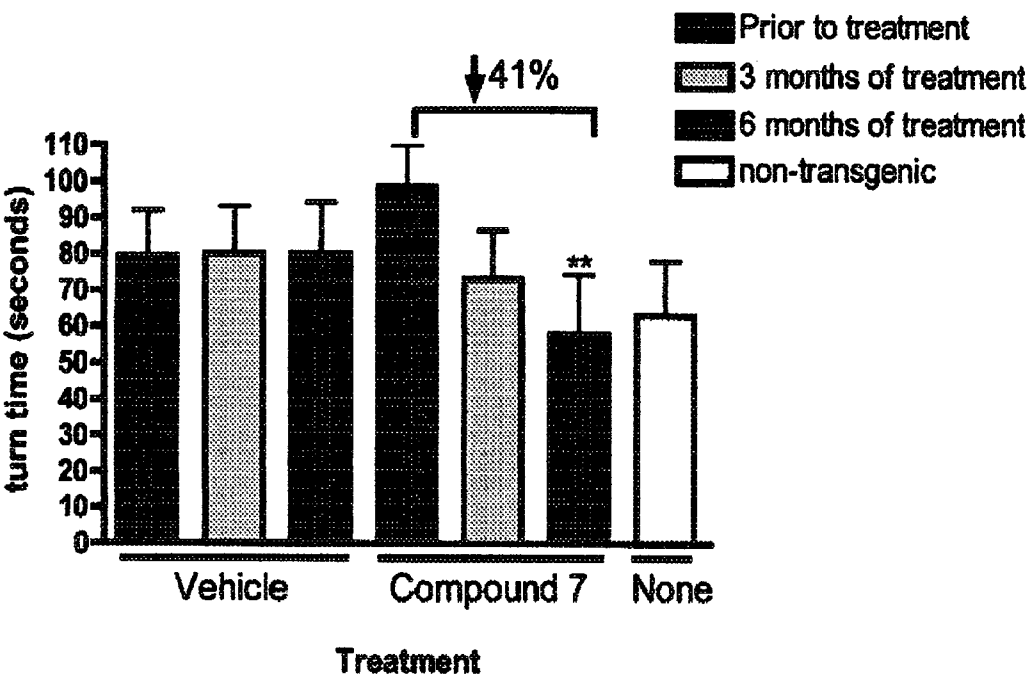


Figure 32

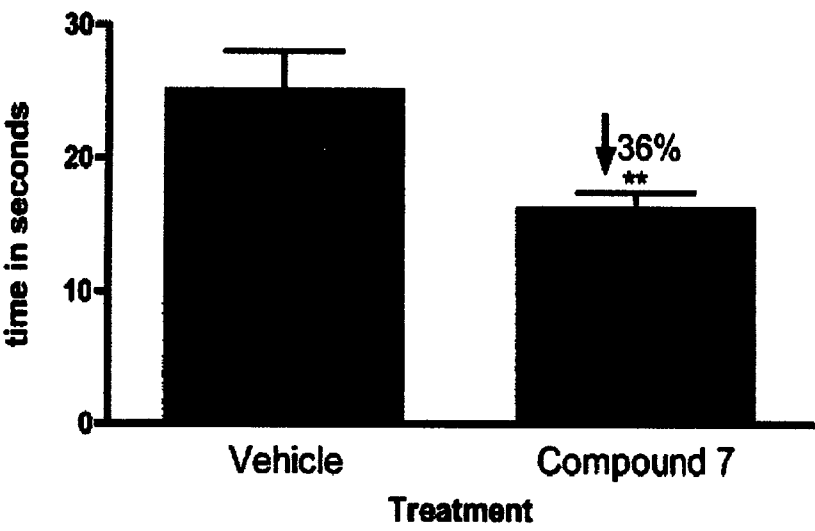


Figure 33

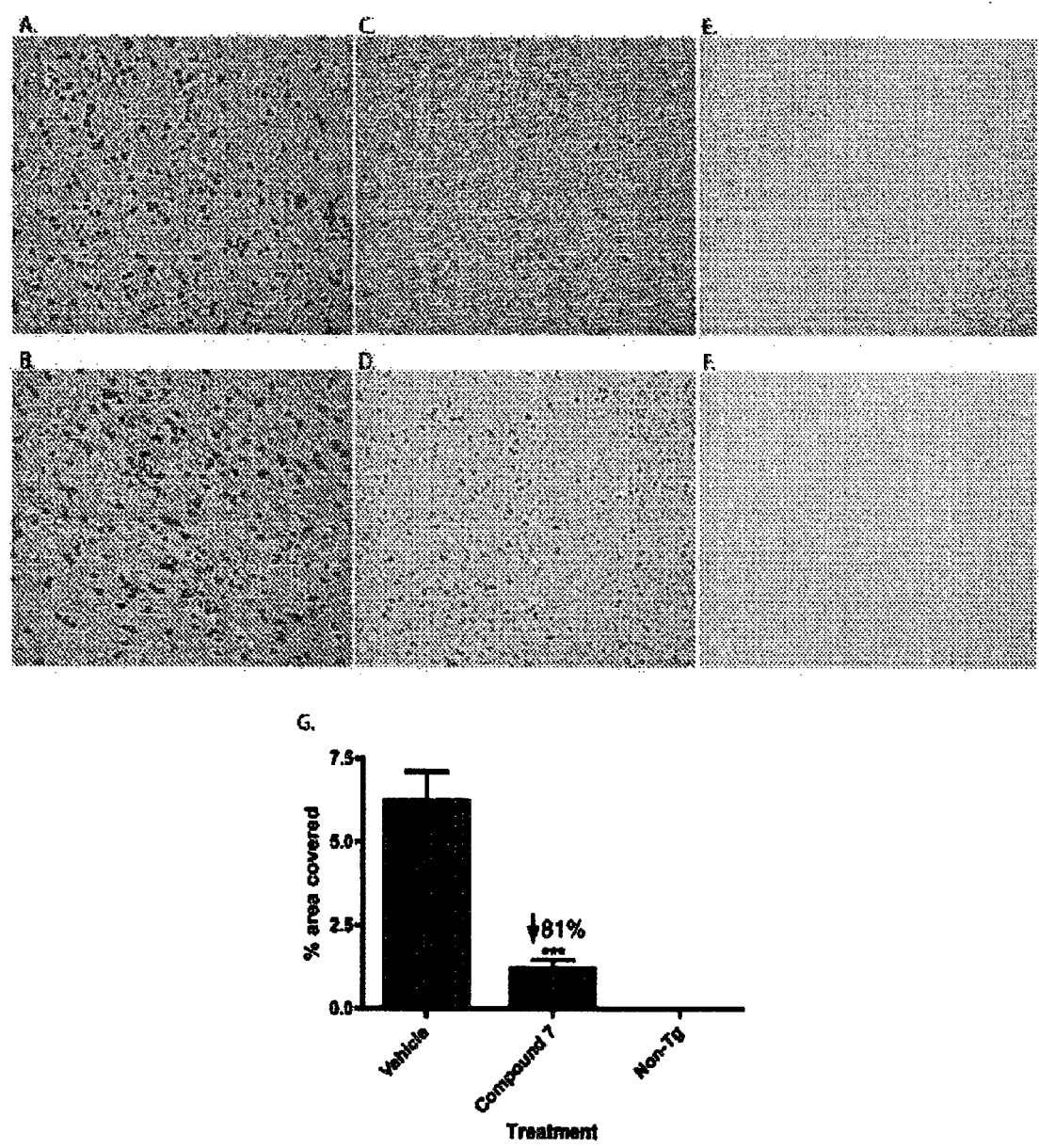


Figure 34

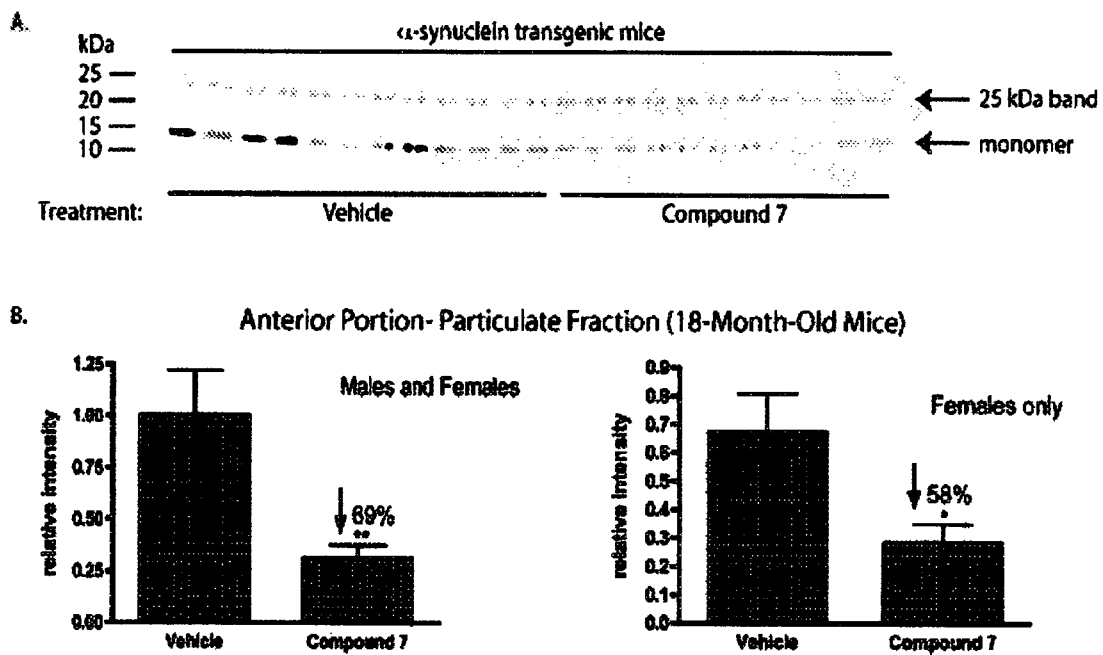


Figure 35

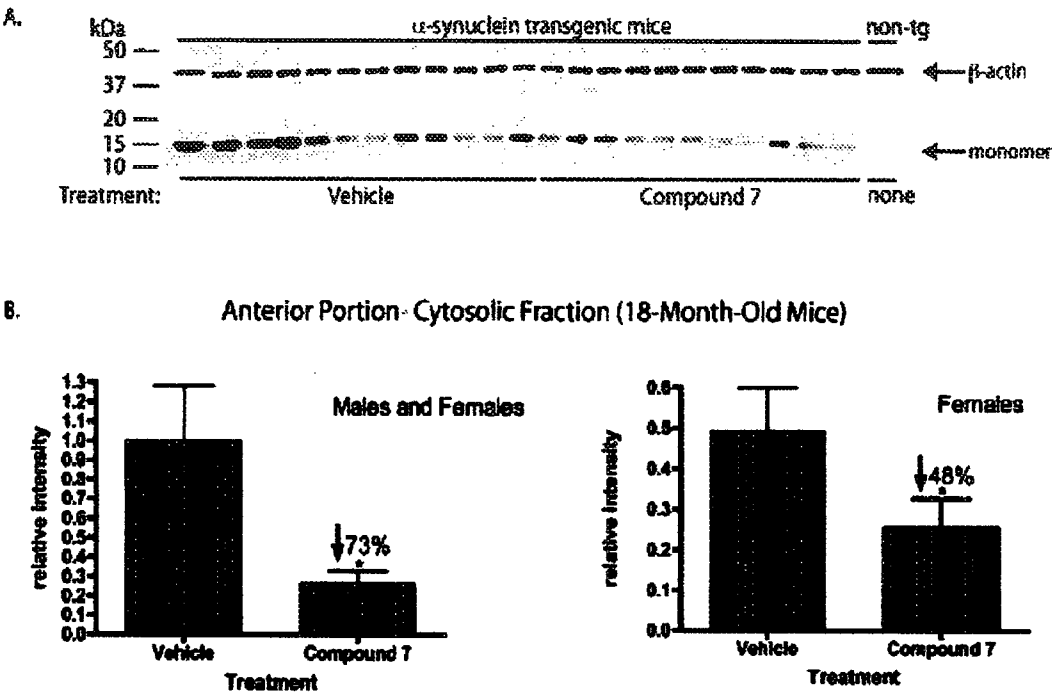


Figure 36

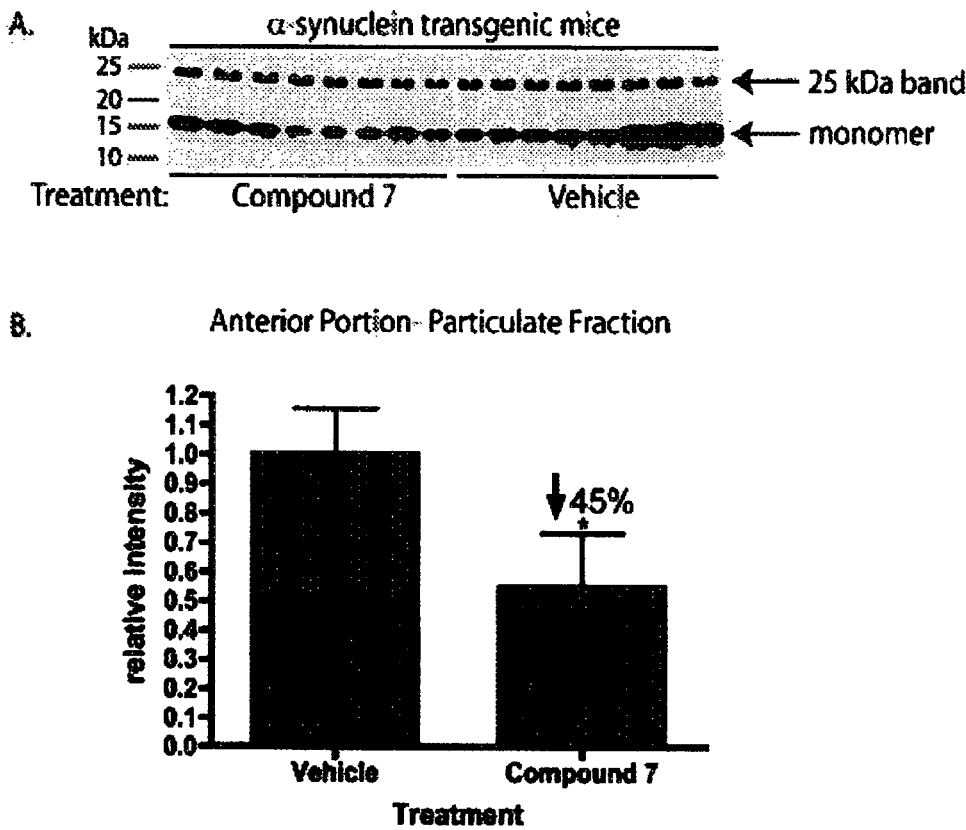


Figure 37

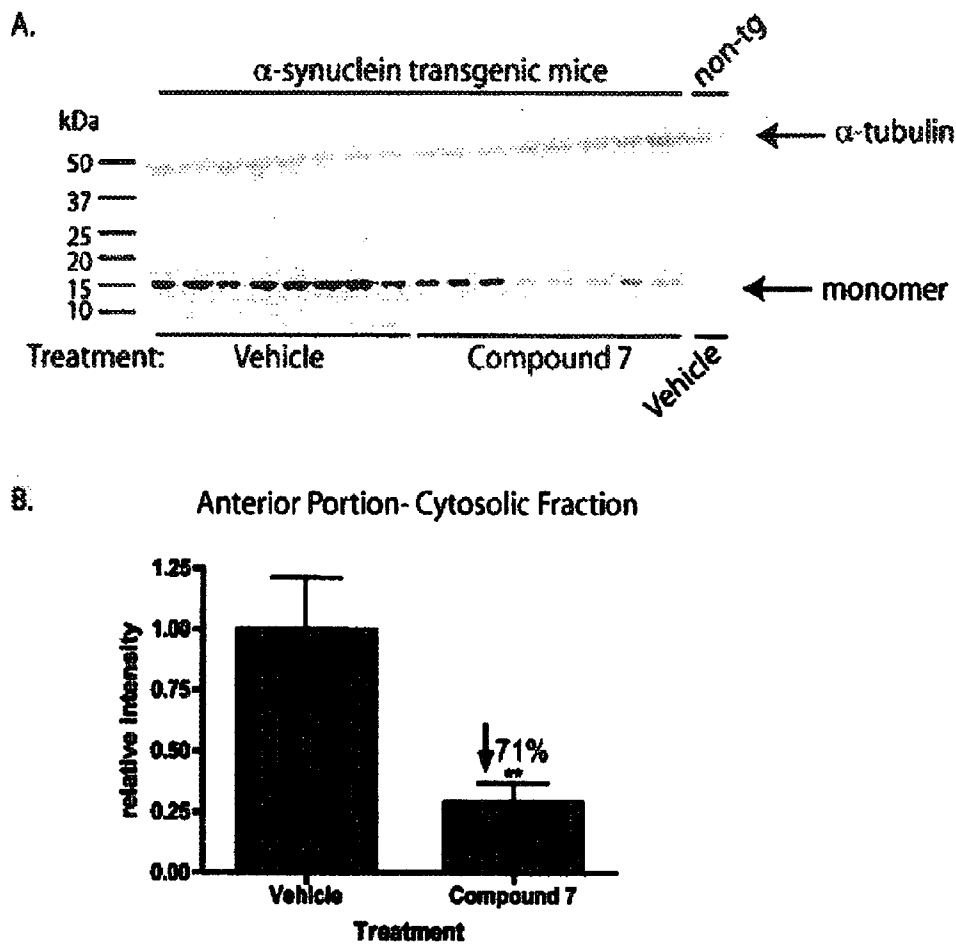


Figure 38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/48855

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A01N 47/28 (2009.01) USPC - 514/598 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 514/598 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 514/598,616;564/158,52 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB); Google Scholar Search terms: amyloid, amyloid diseases, alzheimer's, parkinson's lewy body, aggregates, synuclein, imidazole, triazoe, pyrazole, dihydroxyphenyl, dihydroxyanilide		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2004/0127555 A1 (SNOW et al) 01 July 2004 (01.07.2004); entire document, especially para [0384]	1-16
Y	US 6,288,061 B1 (SUEOKA et al) 11 September 2001 (11.09.2001); entire document, especially col 4, ln 1-10	1-16
A	US 7,531,669 B2 (SCHUBERT et al) 12 May 2009 (12.05.2009); entire document	1-16
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 04 September 2009 (04.09.2009)		Date of mailing of the international search report 16 SEP 2009
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY (Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 44bis)

Applicant's or agent's file reference P30CIP2PCT	FOR FURTHER ACTION		See item 4 below
International application No. PCT/US2009/048855	International filing date (<i>day/month/year</i>) 26 June 2009 (26.06.2009)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 03 October 2008 (03.10.2008)	
International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated) See relevant information in Form PCT/ISA/237			
Applicant PROTEOTECH INC.			

1.	This international preliminary report on patentability (Chapter I) is issued by the International Bureau on behalf of the International Searching Authority under Rule 44 bis.1(a).		
2.	This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet. In the attached sheets, any reference to the written opinion of the International Searching Authority should be read as a reference to the international preliminary report on patentability (Chapter I) instead.		
3.	This report contains indications relating to the following items:		
☒	Box No. I	Basis of the report	
☐	Box No. II	Priority	
☐	Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability	
☐	Box No. IV	Lack of unity of invention	
☒	Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement	
☐	Box No. VI	Certain documents cited	
☐	Box No. VII	Certain defects in the international application	
☐	Box No. VIII	Certain observations on the international application	
4.	The International Bureau will communicate this report to designated Offices in accordance with Rules 44bis.3(c) and 93bis.1 but not, except where the applicant makes an express request under Article 23(2), before the expiration of 30 months from the priority date (Rule 44bis .2).		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland		Date of issuance of this report 05 April 2011 (05.04.2011)
Facsimile No. +41 22 338 82 70		Authorized officer Masashi Honda
Form PCT/IB/373 (January 2004)		e-mail: pt08.pct@wipo.int

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: REBECCA EAGEN
12040 115TH AVE. NE
KIRKLAND, WA 98034-6931

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year)

16 SEP 2009

Applicant's or agent's file reference
P30CIP2PCT

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.

PCT/US 09/48855

International filing date (day/month/year)

26 June 2009 (26.06.2009)

Priority date (day/month/year)

03 October 2008 (03.10.2008)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

IPC(8) - A01N 47/28 (2009.01)

USPC - 514/598

Applicant PROTEOTECH INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Date of completion of this opinion

04 September 2009 (04.09.2009)

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITYInternational application No.
PCT/US 09/48855

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed.
 - ☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a)).
3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - b. (time)
 - ☐ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 09/48855

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-16	YES
	Claims	None	NO
Inventive step (IS)	Claims	None	YES
	Claims	1-16	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims	None	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1-16 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over US 2004/0127555 A1 to Snow et al, hereinafter ('Snow') in view of US 6,288,061 B1 to Sueoka et al, hereinafter ('Sueoka')

As per claims 1-4, Snow discloses a similar compound selected from the group consisting of the formula of claim 1 (para [0068]); where R1, R2, R3 and R3 are independently positioned hydroxyl groups (para [0068]); and R is a heteroaryl (para [0074]) or pharmaceutically acceptable salts thereof (para [0024]). Snow does not explicitly disclose wherein R is selected from the group consisting of imidazole, triazole and pyrazole. However, Snow discloses similar heteroaryl compounds such as pyrazolines (para [0384]). Additionally, Sueoka discloses similar compounds wherein R is an imidazole ring (col 4, ln 1-10). Therefore, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to combine the heteroaryl R group as taught by Sueoka with the invention of Snow to arrive at the claimed invention without undue experimentation as these would have been known equivalents in the art with similar chemical and pharmacological properties such steric inhibition of the molecule.

As per claim 5, Snow as modified by Sueoka discloses the compound of claim 1. Neither Snow nor Sueoka explicitly disclose the compounds found in this claim. However, these compounds are encompassed in the general formula of compounds as taught by Snow as modified by Sueoka as discussed in claims 1-4 above. Therefore, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to combine the heteroaryl R group as taught by Sueoka with the invention of Snow to arrive at the claimed invention without undue experimentation as these would have been known equivalents in the art with similar chemical and pharmacological properties such steric inhibition of the molecule.

As per claim 6, Snow as modified by Sueoka discloses the compound of claim 1. Snow further discloses a pharmaceutical composition comprising the compound of claim 1 and a pharmaceutically acceptable excipient (para [0032]).

As per claim 7, Snow as modified by Sueoka discloses the compound of claim 1. Snow further discloses a method of inhibiting the formation, deposition, accumulation or persistence of AB amyloid or alpha-synuclein aggregates, comprising treating the aggregates with an effective amount of the compound of claim 1 (para [0093]).

As per claims 8 and 14, Snow as modified by Sueoka discloses the method of claim 7 and claim 9. Neither Snow nor Sueoka explicitly disclose the compounds found in this claim. However, these compounds are encompassed in the general formula of compounds as taught by Snow as modified by Sueoka as discussed in claims 1-4 above. Therefore, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to combine the heteroaryl R group as taught by Sueoka with the invention of Snow to arrive at the claimed invention without undue experimentation as these would have been known equivalents in the art with similar chemical and pharmacological properties such steric inhibition of the molecule.

As per claim 9, Snow as modified by Sueoka discloses the compound of claim 1. Snow further discloses a method of treating a B-amyloid disease or a synucleinopathy in a mammal suffering therefrom, comprising administration of a therapeutically effective amount of the compound of claim 1 (abstract).

As per claims 10 and 11, Snow as modified by Sueoka discloses the method of claim 9. Snow further discloses where the B-amyloid disease is selected from the group of diseases consisting of Alzheimer's disease, Down's syndrome, hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of the Dutch type, and cerebral B-amyloid angiopathy (para [0094]).

As per claims 12 and 13, Snow as modified by Sueoka discloses the method of claim 9. Snow further discloses where the synucleinopathy is selected from the group consisting of Parkinson's disease, familial Parkinson's disease, Lewy body disease, the Lewy body variant of Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, multiple system atrophy, and the Parkinsons dementia complex of Guam (para [0096]).

As per claims 15 and 16, Snow as modified by Sueoka discloses the compound of claim 1. Snow further discloses a method of improving motor performance in a mammal suffering from a synucleinopathy and a method of arresting the progression of motor deficits in a mammal suffering from Parkinson's disease (para [0020], [0096]), comprising administration of a therapeutically effective amount of the compound of claim 1 (para [0068]).

Claims 1-16 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry.

TABLA DE CONTENIDO

Documento	Página
Formulario Solicitud	1
Comprobante de pago de la Tasa por Presentación de la Solicitud	3
Título y Resumen	4
Descripción	5
Reivindicaciones	99
Dibujos	102
Copia de la Solicitud Internacional	134
Copia del Reporte Internacional de Búsqueda (ISR)	246
Copia del Reporte Preliminar Internacional de Patentabilidad Capítulo I	247
Copia de la Opinión Escrita de la ISA	248



No. 11-044322-00000-0000

Fecha: 2011-04-11 11:12:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 251

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO D

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
 - ☐ Datos de identificación del solicitante
 - ☐ Descripción de la invención
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas es
- Completa ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-044322-00000-0000

Fecha: 2011-04-11 11:12:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 252

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
 - ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
ROJAS ROJAS MARCELA
Apoderado(a) y/o Representante de
PROTEOTECH INC.

REFERENCIA	Radicación No.	11 044322
	Solicitud internacional	PCT/US2009/48855
	Fecha inicio fase nacional	03/05/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

08141

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos 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.

Continúa en la página siguiente...



Continuación radicado No: 11 044322



Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

19 MAYO 2011

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.
adpa11