

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

(51) Classificação Internacional:

C07C 49/83 (2014.01) **C07C 39/15** (2014.01)
C07C 49/835 (2014.01) **C07C 215/50** (2014.01)
C07C 235/34 (2014.01) **C07C 39/17** (2014.01)
C07C 43/23 (2014.01) **A61P 25/28** (2014.01)
A61K 31/05 (2014.01) **C07D 231/06** (2014.01)
C07D 213/84 (2014.01) **C07D 295/08** (2014.01)
C07D 487/04 (2014.01) **C07D 207/16** (2014.01)
C07D 217/26 (2014.01) **C07D 263/18** (2014.01)
C07D 333/16 (2014.01) **C07D 213/30** (2014.01)
C07D 498/08 (2014.01) **C07D 471/04** (2014.01)

(22) Data de pedido: **2003.05.30**

(30) Prioridade(s): **2002.05.31 US 385144 P**
2002.09.09 US 409100 P
2002.09.20 US 412272 P
2002.12.20 US 435880 P
2003.04.14 US 463104 P

(43) Data de publicação do pedido: **2012.11.28**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.03.19**
118/2014

(73) Titular(es):

PROTEOTECH INC.
12026, 115TH AVENUE N.E. KIRKLAND, WA
98034 **US**

(72) Inventor(es):

ALAN D. SNOW **US**
GERARDO M. CASTILLO **US**
THOMAS P. LAKE **US**
VIRGINIA J. SANDERS **US**
LESLEY LARSEN **NZ**

(74) Mandatário:

NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO
RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **COMPOSTOS, COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS DA AMILOIDE E SINUCLEÍNOPATIAS TAIS COMO DOENÇA DE ALZHEIMER, DIABETES DO TIPO 2, E DOENÇA DE PARKINSON**

(57) Resumo:

COMPOSTOS DE BIS- E TRIS-DIIDROXIARILLO E SEUS ANÁLOGOS DE METILENODIOXI E ÉSTERES FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEIS, SUA SÍNTESE, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO-OS, E SEU USO NO TRATAMENTO DE DOENÇAS DA AMILOIDE, ESPECIALMENTE AMILOIDOSE DA AΒ, TAL COMO OBSERVADA NA DOENÇA DE ALZHEIMER, AMILOIDOSE DO IAPP, TAL COMO OBSERVADA NA DIABETES DO TIPO 2, E SINUCLEÍNOPATIAS, TAIS COMO OBSERVADAS NA DOENÇA DE PARKINSON, E O FABRICO DE MEDICAMENTOS PARA TAL TRATAMENTO.

RESUMO

“COMPOSTOS, COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS DA AMILOIDE E SINUCLEÍNOPATIAS TAIS COMO DOENÇA DE ALZHEIMER, DIABETES DO TIPO 2, E DOENÇA DE PARKINSON”

Compostos de bis- e tris-diidroxiarilo e seus análogos de metilenodioxi e ésteres farmacêuticamente aceitáveis, sua síntese, composições farmacêuticas contendo-os, e seu uso no tratamento de doenças da amiloide, especialmente amiloidose da A β , tal como observada na doença de Alzheimer, amiloidose do IAPP, tal como observada na diabetes do tipo 2, e sinucleínoptias, tais como observadas na doença de Parkinson, e o fabrico de medicamentos para tal tratamento.

DESCRIÇÃO

“COMPOSTOS, COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS DA AMILOIDE E SINUCLEÍNOPATIAS TAIS COMO DOENÇA DE ALZHEIMER, DIABETES DO TIPO 2, E DOENÇA DE PARKINSON”

Área Técnica

Esta invenção relaciona-se com: novos compostos de bis-diidroxifenilo e seus sais farmacologicamente aceitáveis, composições farmacêuticas contendo os mesmos, e seu uso no tratamento de doenças da amiloide, especialmente doença da amiloide A β , tal como observada na doença de Alzheimer, doença da amiloide IAPP, tal como observada na diabetes do tipo 2, e sinucleíopatias, tais como observadas na doença de Parkinson, e no fabrico de medicamentos para tal tratamento.

Antecedentes da Invenção

A doença de Alzheimer é caracterizada pela acumulação de um péptido com 39-43 aminoácidos denominado a proteína β -amiloide ou A β , numa forma fibrilar, existindo como placas de amiloide extracelulares e como amiloide dentro das paredes dos vasos sanguíneos do cérebro. Acredita-se que a deposição de amiloide A β fibrilar na doença de Alzheimer é prejudicial para o paciente e leva eventualmente a toxicidade e morte de células neuronais, marcas características da doença de Alzheimer. Evidência crescente implica a amiloide, e mais especificamente, a formação, deposição, acumulação e/ou persistência de fibrilas de A β , como um grande fator causador da patogénese da doença de Alzheimer. Adicionalmente, para além da doença de Alzheimer, um número de outras doenças da amiloide envolve a formação, deposição, acumulação e persistência de fibrilas de A β , incluindo síndrome de Down, distúrbios envolvendo angiopatia congofílica, tais como mas não se

limitando a, hemorragia cerebral hereditária do tipo Dutch, miositose de corpos de inclusão, demência pugilística, angiopatia da β -amiloide cerebral, demência associada a paralisia supranuclear progressiva, demência associada a degeneração basal cortical e comprometimento cognitivo leve.

A doença de Parkinson é outro distúrbio humano caracterizado pela formação, deposição, acumulação e/ou persistência de depósitos de proteína fibrilar anormais que demonstram muitas das características da amiloide. Na doença de Parkinson, acredita-se que uma acumulação de corpos de Lewy citoplasmáticos consistindo em filamentos de α -sinucleína/NAC (componente não $A\beta$) é importante na patogênese e como alvos terapêuticos. Novos agentes ou compostos capazes de inibirem a formação, deposição, acumulação e/ou persistência de α -sinucleína e/ou NAC, ou romper fibrilas de α -sinucleína/NAC pré-formadas (ou suas porções) são considerados como terapêuticas potenciais para o tratamento do Parkinson e sinucleinopatias relacionadas. O NAC é um fragmento com 35 aminoácidos da α -sinucleína que tem a capacidade de formar fibrilas do tipo amiloide quer *in vitro* ou como observado nos cérebros de pacientes com doença de Parkinson. O fragmento de NAC da α -sinucleína é um alvo terapêutico relativamente importante pois acredita-se que esta porção da α -sinucleína é crucial para formação de corpos de Lewy como observado em todos os pacientes com doença de Parkinson, sinucleinopatias e distúrbios relacionados.

Uma variedade de outras doenças humanas demonstra também deposição da amiloide e envolve usualmente órgãos sistêmicos (i.e. órgãos ou tecidos situando-se fora do sistema nervoso central), com a acumulação de amiloide levando a disfunção ou falha do órgão. Estas doenças da

amiloide (discutidas em baixo) levando a acumulação da amiloide marcada num número de diferentes órgãos e tecidos são conhecidas como amiloidoses sistémicas. Noutras doenças da amiloide, podem ser afetados órgãos únicos tais como o pâncreas em 90% dos pacientes com diabetes do tipo 2. Neste tipo de doença da amiloide, acredita-se que as células beta nas ilhotas de Langerhans no pâncreas são destruídas pela acumulação de depósitos de amiloide fibrilar consistindo principalmente numa proteína conhecida como polipéptido amiloide das ilhotas (IAPP). Acredita-se que a inibição ou redução de tal formação, deposição, acumulação e persistência de fibrila da amiloide IAPP leva a novos tratamentos eficazes para a diabetes do tipo 2. Na doença de Alzheimer, Parkinson e doenças da amiloide "sistémicas", não existe correntemente nenhuma cura ou tratamento eficaz, e o paciente morre usualmente no espaço de 3 a 10 anos a partir do início da doença.

As doenças da amiloide (amiloidoses) são classificadas de acordo com o tipo de proteína amiloide presente bem como a doença subjacente. As doenças da amiloide têm um número de características comuns incluindo cada amiloide consistindo num único tipo de proteína amiloide. As doenças da amiloide incluem, mas não estão limitadas a, a amiloide associada à doença de Alzheimer, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose do tipo Dutch, demência pugilística, miositose de corpos de inclusão (Askanas *et al*, *Ann. Neurol.* 43:521-560, 1993) e comprometimento cognitivo leve (onde a amiloide específica é referida como proteína beta-amiloide ou A β), a amiloide associada a inflamação crónica, várias formas de malignidade e Febre Mediterrânea Familiar (onde a amiloide específica é referida como amiloide AA ou amiloidose associação a inflamação), a amiloide associada a mieloma múltiplo e outras discrasias das células B (onde a amiloide específica

é referida como amiloide AL), a amiloide associada a diabetes do tipo 2 (onde a proteína amiloide específica é referida como amilina ou polipeptídeo amiloide das ilhotas ou IAPP), a amiloide associada a doenças do prião incluindo doença de Creutzfeldt-Jakob, síndrome de Gerstmann-Straussler, kuru e tremor epizootico animal (onde a amiloide específica é referida como amiloide PrP), a amiloide associada a hemodiálise a longo prazo e síndrome do canal cárpico (onde a amiloide específica é referida como amiloide de α_2 -microglobulina), a amiloide associada a amiloidose cardíaca senil e Polineuropatia Amiloidótica Familiar (onde a amiloide específica é referida como transtiretina ou pré-albumina), e a amiloide associada a tumores endócrinos tais como carcinoma medular da tiroide (onde a amiloide específica é referida como variantes da pró-calcitonina). Adicionalmente, a proteína α -sinucleína que forma fibrilas do tipo amiloide, e é positiva quanto a vermelho do Congo e Tioflavina S (corantes específicos usados para detetar depósitos de amiloide fibrilares), é encontrada como parte de corpos de Lewy nos cérebros de pacientes com doença de Parkinson, doença dos corpos de Lewy (Lewy em *Handbuch der Neurologie*, M. Lewandowski, ed., Springer, Berlim 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 sistema múltiplos (Wakabayashi et al, *Acta Neuropath.* 96:445-452, 1998), demência com corpos de Lewy, e a variante de corpos de Lewy da doença de Alzheimer. Para propósitos desta divulgação, a doença de Parkinson, devido ao facto de as fibrilas se desenvolverem nos cérebros de pacientes com esta doença (que são positivas quanto a vermelho do Congo e Tioflavina S, e que contêm estrutura secundária beta-pregueada predominante), é agora considerada como uma

doença que também exhibe as características de uma doença do tipo amiloide.

Sabe-se que as amiloidoses sistémicas que incluem a amiloide associada a inflamação crónica, várias formas de malignidade e febre Mediterrânea familiar (i.e. amiloide AA ou amiloidose associada a inflamação) (Benson e Cohen, *Arth. Rheum.* 22:36-42, 1979; Kamei *et al*, *Acta Path. Jpn.* 32:123-133, 1982; McAdam *et al*, *Lancet* 2:572-573, 1975; Metaxas, *Kidney Int.* 20:676-685, 1981), e a amiloide associada a mieloma múltiplo e outras discrasias das células B (i.e. amiloide AL) (Harada *et al.*, *J. Histochem. Cytochem.* 19:1-15, 1971), como exemplos, envolvem deposição da amiloide numa variedade de diferentes órgãos e tecidos situando-se geralmente fora do sistema nervoso central. A deposição da amiloide nestas doenças pode ocorrer, por exemplo, no fígado, coração, baço, trato gastrointestinal, rim, pele, e/ou pulmões Johnson *et al*, *N. Engl. J. Med.* 321:513-518, 1989). Para a maioria destas amiloidoses, não existe cura aparente ou tratamento eficaz e as consequências da deposição da amiloide podem ser prejudiciais para o paciente. Por exemplo, a deposição da amiloide no rim pode levar a falha renal, ao passo que a deposição da amiloide no coração pode levar a falha cardíaca. Para estes pacientes, a acumulação da amiloide nos órgãos sistémicos leva a morte eventual geralmente no espaço de 3-5 anos. Outras amiloidoses podem afetar um único órgão ou tecido tal como observado com os depósitos de amiloide A β encontrados nos cérebros de pacientes com doença de Alzheimer e síndrome de Down; os depósitos de amiloide PrP encontrados nos cérebros de pacientes com doença de Creutzfeldt-Jakob, síndrome de Gerstmann-Straussler, e kuru; os depósitos de amiloide das ilhotas (IAPP) encontrados nas ilhotas de Langerhans no pâncreas de

90% dos pacientes com diabetes do tipo 2 (Johnson *et al*, *N. Engl. J. Med.* 321:513-518, 1989; *Lab. Invest.* 66:522-535, 1992); os depósitos de amiloide α_2 -microglobulina no nervo médio levando a síndrome do canal cárpico como observado em pacientes sendo submetidos a hemodiálise a longo prazo (Geyjo *et al*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 129:701-706, 1985; *Kidney Int.* 30:385-390, 1986); a amiloide pré-albumina/transtiretina observada nos corações de pacientes com amiloide cardíaca senil; e a amiloide pré-albumina/transtiretina observada em nervos periféricos de pacientes que têm polineuropatia amiloidótica familiar (Skinner e Cohen, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 99:1326-1332, 1981; Saraiva *et al*, *J. Lab. Clin. Med.* 102:590-603, 1983; *J. Clin. Invest.* 74:104-119, 1984; Tawara *et al*, *J. Lab. Clin. Med.* 98:811-822, 1989).

A doença de Alzheimer coloca também uma pesada carga económica na sociedade. Um estudo recente estimou que o custo de cuidado de um paciente com doença de Alzheimer com comprometimentos cognitivos graves em casa ou num hospital residencial é mais do que \$47.000 por ano (*A Guide to Understanding Alzheimer's Disease and Related Disorders*). Para uma doença que se pode estender de 2 a 20 anos, o custo global da doença de Alzheimer para famílias e para a sociedade é impressionante. O custo económico anual da doença de Alzheimer nos Estados Unidos em termos de despesas de cuidados de saúde e salários perdidos de pacientes e cuidadores é estimado em \$80 a \$100 mil milhões (*2003 Progress Report on Alzheimer's Disease*).

O hidrocloreto de tacrina ("Cognex"), o primeiro fármaco aprovado pela FDA para a doença de Alzheimer, é um inibidor da acetilcolinesterase (Cutler e Sramek, *N. Engl. J. Med.* 328:808-810, 1993). No entanto, este fármaco tem mostrado

sucesso limitado na produção de melhoria cognitiva em pacientes com doença de Alzheimer e teve inicialmente grandes efeitos secundários tais como toxicidade no fígado. O segundo fármaco aprovado pela FDA, donezepil ("Aricept"), que é também um inibidor da acetilcolinesterase, é mais eficaz do que a tacrina, por demonstração de ligeira melhoria cognitiva em pacientes com doença de Alzheimer (Barner e Gray, *Ann. Pharmacotherapy* 32:70-77, 1998; Rogers e Friedhoff, *Eur. Neuropsych.* 8:67-75, 1998), mas não se acredita que seja uma cura. Portanto, é evidente que existe uma necessidade de tratamentos mais eficazes para pacientes com doença de Alzheimer.

Amiloide como um alvo terapêutico para a doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é caracterizada pela deposição e acumulação de um péptido com 39-43 aminoácidos denominado a proteína beta-amiloide, A β ou β /A4 (Glenner e 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 A β é derivada por clivagem por protease de proteínas precursoras maiores denominadas proteínas precursoras da β -amiloide (APPs) das quais existem várias variantes alternativamente *spliced*. As formas mais abundantes das APPs incluem proteínas consistindo em 695, 751 e 770 aminoácidos (Tanzi *et al.*, *Nature* 31:528-530, 1988).

O péptido de A β pequeno é um componente principal que constitui os depósitos de amiloide de "placas" nos cérebros de pacientes com doença de Alzheimer. Adicionalmente, a doença de Alzheimer é caracterizada pela presença de numerosos "fios" neurofibrilares, consistindo em filamentos helicoidais emparelhados que se acumulam anormalmente no

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). A marca patológica da doença de Alzheimer é portanto a presença de "placas" e "fios", com a amiloide estando depositada no núcleo central das placas. O outro grande tipo de lesão encontrado no cérebro com doença de Alzheimer é a acumulação de amiloide nas paredes de vasos sanguíneos, quer dentro do parênquima do cérebro, quer nas paredes de vasos meníngeos que se situam fora do cérebro. Os depósitos de amiloide localizados nas paredes de vasos sanguíneos são referidos como amiloide cerebrovascular ou angiopatia congofílica (Mandybur, *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 45:79-90, 1986; Pardridge *et al.*, *J. Neurochem.* 49:1394-1401, 1987)

Durante muitos anos, tem existido um debate científico contínuo relativamente à importância da "amiloide" na doença de Alzheimer, e se as "placas" e "fios" característicos desta doença eram uma causa ou meramente uma consequência da doença. No espaço dos últimos anos, os estudos indicam agora que a amiloide é de facto um fator causador da doença de Alzheimer e não deve ser considerada como meramente um espectador inocente. Mostrou-se que a proteína A β na cultura de células causa degeneração de células do nervo no espaço de curtos períodos de tempo (Pike *et al.*, *Br. Res.* 563:311-314, 1991; *J. Neurochem.* 64:253-265, 1995). Os estudos sugerem que é a estrutura fibrilar (consistindo numa estrutura secundária em folha β -pregueada predominante), característica de todas as amiloides, que é responsável pelos efeitos neurotóxicos. Também se descobriu que a A β é neurotóxica em culturas laminares do hipocampo (Harrigan *et al.*, *Neurobiol. Aging* 16:779-789, 1995) e induz morte das células do nervo em

camundongos transgênicos (Games *et al.*, *Nature* 373:523-527, 1995; Hsiao *et al.*, *Science* 274:99-102, 1996). A injeção da A β do Alzheimer no cérebro de rato também causa comprometimento de memória e disfunção neuronal (Flood *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3363-3366, 1991; Br. Res. 663:271-276, 1994).

Provavelmente, a evidência mais convincente de que a amiloide A β está diretamente envolvida na patogênese da doença de Alzheimer vem de estudos genéticos. Descobriu-se que a produção de A β pode resultar de mutações no gene codificando o seu precursor, proteína precursora da 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). A identificação de mutações no gene da proteína precursora da beta-amiloide que causa início precoce da doença de Alzheimer familiar é o argumento mais forte de que a amiloide é fundamental para o processo patogênético subjacente a esta doença. Foram descobertas quatro mutações causadoras de doença relatadas que demonstram a importância da A β na causa da doença de Alzheimer familiar (revisto em Hardy, *Nature Genet.* 1:233-234, 1992). Todos estes estudos sugerem que proporcionar um fármaco para reduzir, eliminar ou prevenir a formação, deposição, acumulação e/ou persistência de A β fibrilar nos cérebros de pacientes humanos servirá como uma terapêutica eficaz.

Doença de Parkinson e Sinucleinopatias

A doença de Parkinson é um distúrbio neurodegenerativo que é patologicamente caracterizado pela presença de corpos de Lewy intracitoplasmáticos (Lewy em *Handbuch der Neurologie*, M. Lewandowski, ed., Springer, Berlim, pp. 920-933, 1912; Pollanen *et al.*, *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 52:183-191,

1993), os principais componentes dos quais são filamentos consistindo em α -sinucleína (Spillantini et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6469-6473, 1998; Arai et al., *Neurosci. Lett.* 259:83-86, 1999), uma proteína com 140 aminoácidos (Ueda et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11282-11286, 1993). Duas mutações dominantes na α -sinucleína causando doença de Parkinson de início precoce familiar foram descritas sugerindo que os corpos de Lewy contribuem mecanisticamente para a degeneração de neurónios na doença de Parkinson e distúrbios relacionados (Polymeropoulos et al., *Science* 276:2045-2047, 1997; Kruger et al., *Nature Genet.* 18:106-108, 1998). Recentemente, estudos *in vitro* demonstraram que a α -sinucleína recombinante pode de facto formar fibrilas do tipo corpos de Lewy (Conway et al., *Nature Med.* 4:1318-1320, 1998; Hashimoto et al., *Brain Res.* 99:301-306, 1998; Nahri et al., *J. Biol Chem.* 274:9843-9846, 1999). Mais importantemente, ambas as mutações de α -sinucleína ligadas à doença de Parkinson aceleram este processo de agregação, demonstrando que tais estudos *in vitro* podem ter relevância para a patogénese da doença de Parkinson. A agregação de alfa-sinucleína e formação de fibrilas preenche os critérios de um processo de polimerização dependente de nucleação (Wood et al, *J. Biol. Chem.* 274:19509-19512, 1999). A este respeito, a formação de fibrilas de α -sinucleína assemelha-se àquela das fibrilas de proteína β -amiloide (A β). A proteína recombinante alfa-sinucleína, e componente não A β (conhecido como NAC), que é um fragmento de péptido com 35 aminoácidos da α -sinucleína, têm ambos a capacidade de formar fibrilas quando encubados a 37°C, e são positivos com corantes de amiloide tais como vermelho do Congo (demonstrando uma birrefringência vermelha/verde quando vistos sob luz polarizada) e Tioflavina S (demonstrando fluorescência positiva) (Hashimoto et al., *Brain Res.*

799:301-306, 1998; Ueda *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11282-11286, 1993).

As sinucleínas são uma família de pequenas proteínas neuronais pré-sinápticas compostas por α -, β -, e γ -sinucleínas, das quais somente agregados de α -sinucleína foram associados a várias doenças neurológicas (Ian *et al.*, *Clinical Neurosc. Res.* 1:445-455, 2001; Trojanowski e Lee, *Neurotoxicology* 23:457-460, 2002). O papel das sinucleínas (e em particular, alfa-sinucleína) na etiologia de um número de doenças neurodegenerativas e/ou da amiloide desenvolveu-se a partir de várias observações. Patologicamente, a sinucleína foi identificada como um componente principal dos corpos de Lewy, as inclusões de marca da doença de Parkinson, e um seu fragmento foi isolado de placas amiloides de uma doença neurológica diferente, doença de Alzheimer. Bioquimicamente mostrou-se que a α -sinucleína recombinante forma fibrilas do tipo amiloide que recapitularam as características ultraestruturais da alfa-sinucleína isolada de pacientes com demência com corpos de Lewy, doença de Parkinson e atrofia de sistemas múltiplos. Adicionalmente, a identificação de mutações dentro do gene da sinucleína, ainda que em casos raros da doença de Parkinson familiar, demonstrou uma ligação inequívoca entre patologia da sinucleína e doenças neurodegenerativas. O envolvimento comum da α -sinucleína num espectro de doenças tais como doença de Parkinson, demência com corpos de Lewy, atrofia de sistemas múltiplos e a variante de corpos de Lewy da doença de Alzheimer levou à classificação destas doenças sob o termo global de "sinucleínopatias".

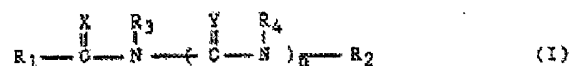
As fibrilas de α -sinucleína da doença de Parkinson, como as fibrilas de A β da doença de Alzheimer, consistem também

numa estrutura em folha predominantemente β -pregueada. Portanto, antecipa-se também que os compostos que se descobriu que inibem a formação de fibrilas de amiloide A β da doença de Alzheimer sejam eficazes na inibição da formação de fibrilas de α -sinucleína/NAC, como mostrado a partir dos Exemplos na presente invenção. Estes compostos serviriam também portanto como terapêuticos para a doença de Parkinson e outras sinucleinopatias, adicionalmente a terem eficácia como um terapêutico para a doença de Alzheimer, diabetes do tipo 2, e outros distúrbios da amiloide.

A descoberta e identificação de novos compostos ou agentes como terapêuticos potenciais para impedir a formação, deposição, acumulação e/ou persistência da amiloide que ocorrem na doença de Alzheimer, doença de Parkinson, diabetes do tipo II, e outras amiloidoses são desesperadamente procuradas.

WO 02/42429 divulga métodos para o isolamento de compostos que possuem atividade inibidora da amiloide a partir de matéria vegetal do género *Uncaria*, e o uso destes compostos no tratamento de uma amiloidose, ou uma doença relacionada com alfa-sinucleína.

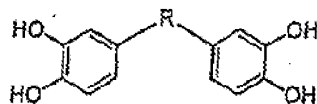
EP 0 324 521 divulga compostos da fórmula:



para uso no tratamento de doenças hematopoiéticas num ser vivo de sangue quente.

Sumário da Invenção

Num primeiro aspeto, a presente invenção relaciona-se com compostos da fórmula:

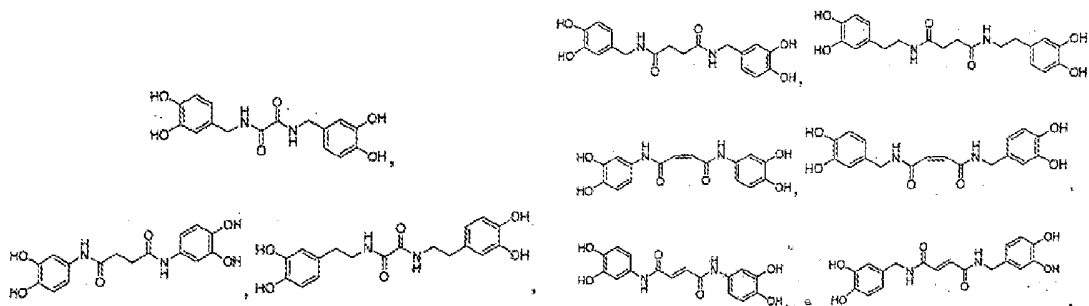


ou seu sais farmacologicamente aceitáveis, onde:

R é um grupo alquilenos C_6-C_{10} , no qual existem:

- i) opcionalmente 1 ou 2 ligações duplas não adjacentes;
- ii) 1 a 3 grupos metileno não adjacentes estão substituídos por NR' , O ou S, onde R' é H, acilo C_{2-4} ou alquilo C_{1-3} ; e
- iii) 2 grupos metileno estão substituídos por um grupo carbonilo ou hidroximetileno

Preferencialmente, o composto é selecionado de:



Num segundo aspeto, esta invenção é composições farmacêuticas compreendendo um composto do primeiro aspeto desta invenção e um excipiente farmacologicamente

aceitável, e composições farmacêuticas compreendendo um excipiente farmacêuticamente aceitável e, como o único ingrediente ativo, um composto do primeiro aspecto da invenção.

Num terceiro aspecto, os compostos do primeiro aspecto são para uso no tratamento de uma doença da amiloide ou uma sinucleínopatia num mamífero, especialmente um humano, por administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto do primeiro aspecto desta invenção, por exemplo como uma composição farmacêutica.

Num quarto aspecto, esta invenção é o uso de um composto do primeiro aspecto desta invenção no fabrico de um medicamento para os tratamentos de uma doença de amiloide, ou uma sinucleínopatia.

Num quinto aspecto, os compostos do primeiro aspecto são para uso no tratamento da formação, deposição, acumulação ou persistência de fibrilas de amiloide ou fibrilas de sinucleína.

Num sexto aspecto, esta invenção é um método *in vitro* de tratamento da formação, deposição, acumulação ou persistência de fibrilas de amiloide ou fibrilas de sinucleína tais como A β , IAPP, outras amiloides, e fibrilogénese de α -sinucleína ou NAC. O método inclui o passo de administração no ambiente *in vitro* de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto desta invenção.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 é quatro espectros de dicroísmo circular mostrando exemplos de disrupção de fibrilas de A β da doença de Alzheimer pelos compostos 4, 12, 51 e 61.

A Figura 2 é um espectro de dicroísmo circular mostrando exemplos de disrupção de fibrilas de A β da doença de Alzheimer pelo composto 78.

A Figura 3 é três espectros de dicroísmo circular mostrando exemplos de disrupção de fibrilas de A β da doença de Alzheimer (de um modo dependendo da dose) pelos compostos 12, 51 e 61.

Descrição Detalhada da Invenção

Definições

Neste pedido, os seguintes termos devem ter os seguintes significados, sem ter em conta se os termos são usados valentemente noutra literatura ou de outro modo na técnica conhecida.

"Análogos de metilenodioxí" referem-se a compostos nos quais cada um dos pares de frações de hidroxilo adjacentes dos grupos diidroxiarilo foi substituído por grupos metilenodioxí. Os compostos de metilenodioxí são ilustrados e referidos como compostos #1B a #86B ou DC-0001B a DC-0086B. Os grupos de metilenodioxí são também grupos protetores intermediários convenientes para as frações de diidroxí e portanto acredita-se que estes compostos divulgados servem também como pró-fármacos eficazes. Os análogos de metilenodioxí #1B a #80B são ilustrados no Exemplo 30.

"Ésteres farmacologicamente aceitáveis" referem-se a compostos onde as frações de hidroxilo dos grupos diidroxiarilo dos compostos estão esterificadas com um

ácido ou ácidos que resulta num poli(éster) farmacologicamente aceitável. Os compostos são mostrados no Exemplo 31 como acetilados, e estes compostos acetilados são ilustrados e referidos como compostos #1C a #86C ou DC-0001C a DC-0086C;

Espera-se que os grupos éster sirvam como grupos protetores intermediários para as frações de hidroxilo e portanto espera-se que os ésteres farmacologicamente aceitáveis sirvam como pró-fármacos eficazes para os seus compostos de bis- e tris-diidroxianilina.

As estruturas químicas para cada um dos compostos desta invenção são mostradas. Os nomes dos compostos são variavelmente nomes IUPAC [nomes derivados de acordo com o sistema IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) aceite estabelecido pela coligação da Commission on Nomenclature of Organic Chemistry e a Commission on Physical Organic Chemistry, como pode ser encontrado em <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac>], nomes derivados de nomes IUPAC por adição ou substituição (por exemplo, pelo uso de "3,4-metilenodioxifenilo" derivado de "fenilo" em vez de "benzo[1,3]dioxol-5-ilo"), e nomes derivados dos nomes de reagentes (por exemplo, pelo uso de "3,4-diidroxianilida do ácido 3,4-diidroxibenzoico" em vez de "N-(3,4-diidroxifenil)-3,4-diidroxibenzamida"). No entanto, os nomes usados são explicitamente equiparados a estruturas químicas, e acredita-se que são prontamente entendidos por uma pessoa de perícia vulgar na técnica.

"Mamífero" incluem mamíferos humanos e não humanos, tais como animais de companhia (gatos, cães, e similares), animais de laboratório (tais como camundongos, ratos, porquinhos-da-índia, e similares) e animais de quinta (gado, cavalos, ovelhas, cabras, suínos, e similares).

“Excipiente farmacêuticamente aceitável” significa um excipiente que é convencionalmente útil na preparação de uma composição farmacêutica que é geralmente seguro, não tóxico, e desejável, e inclui excipientes que são aceitáveis para uso veterinário bem como para uso farmacêutico humano. Tais excipientes podem ser sólidos, líquidos, semissólidos, ou, no caso de uma composição de aerossol, gasosos.

“Sal farmacêuticamente aceitável” significa um sal que é farmacêuticamente aceitável e tem as propriedades farmacológicas desejadas. Tais sais incluem sais que podem ser formados onde prótons ácidos presentes nos compostos são capazes de reagir com bases inorgânicas ou orgânicas. Sais inorgânicos adequados incluem aqueles formados com os metais alcalinos, p.ex. sódio e potássio, magnésio, cálcio, e alumínio. Sais orgânicos adequados incluem aqueles formados com bases orgânicas tais como as bases de amina, p.ex. etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina, e similares. Tais sais podem também incluir sais de adição ácida formados com ácidos inorgânicos (p.ex. ácidos clorídrico e bromídrico) e ácidos orgânicos (p.ex. ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico, e os ácidos alcano- e areno-sulfônicos tais como ácido metanossulfônico e ácido benzenossulfônico). Onde existem dois grupos ácidos presentes, um sal farmacêuticamente aceitável pode ser um mono-ácido-mono-sal ou um di-sal; e similarmente onde existem mais do que dois grupos ácidos presentes, alguns ou todos tais grupos podem estar salificados.

Uma “quantidade terapêuticamente eficaz” significa em geral a quantidade que, quando administrada a um sujeito ou animal para tratamento de uma doença, é suficiente para afetar o grau desejado de tratamento para a doença. Uma

"quantidade terapeuticamente eficaz" ou uma "dosagem terapeuticamente eficaz" inibe, reduz, perturba, desmonta preferencialmente a formação, deposição, acumulação e/ou persistência de fibrilas de amiloide ou sinucleína, ou trata uma doença associada a estas condições, tal como doença da amiloide ou uma sinucleinopatia, em pelo menos 20%, mais preferencialmente em pelo menos 40%, ainda mais preferencialmente em pelo menos 60%, e ainda mais preferencialmente em pelo menos 80%, em relação a um sujeito não tratado. Quantidades eficazes de um composto desta invenção ou sua composição para tratamento de um sujeito mamífero são cerca de 0,1 a cerca de 1000 mg/Kg de peso corporal do sujeito/dia, tal como de cerca de 1 a cerca de 100 mg/Kg/dia, especialmente de cerca de 10 a cerca de 100 mg/Kg/dia. Acredita-se que uma ampla gama de dosagens de composição divulgadas é segura e eficaz.

"Tratar" ou "tratamento" de uma doença inclui prevenção da ocorrência da doença num mamífero que possa estar predisposto para a doença mas não experiencia ou exhibe ainda sintomas da doença (tratamento profilático), inibição da doença (retardamento ou impedimento do seu desenvolvimento), proporcionar de alívio dos sintomas ou efeitos secundários da doença (incluindo tratamento paliativo), e alívio da doença (causando regressão da doença), tal como por disrupção das fibrilas de amiloide ou sinucleína pré-formadas. Um tal tratamento preventivo pode ser uso dos compostos divulgados para o tratamento de comprometimento Cognitivo Ligeiro (CCL).

"NAC" (componente não A β) é um fragmento de péptido com 35 aminoácidos da α -sinucleína, que como a α -sinucleína, tem a capacidade de formar fibrilas do tipo amiloide quando incubado a 37°C, e é positivo com corantes de amiloide tais como vermelho do Congo (demonstrando uma birrefringência

vermelha/verde quando visto sob luz polarizada) e Tioflavina S (demonstrando fluorescência positiva) (Hashimoto *et al*, *Brain Res.* 799:301-306, 1998; Ueda *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:11282-11286,1993). Acredita-se que a inibição da formação, deposição, acumulação, agregação, e/ou persistência das fibrilas de NAC é tratamento eficaz para um número de doenças envolvendo α -sinucleína, tais como doença de Parkinson, doença dos corpos de Lewy e atrofia dos sistema múltiplos.

"Fibrilogénese" refere-se à formação, deposição, acumulação e/ou persistência de fibrilas, filamentos, inclusões, depósitos de amiloide, bem como fibrilas, filamentos, inclusões, depósitos de sinucleína (usualmente envolvendo α -sinucleína) e/ou NAC ou similares.

A "inibição da fibrilogénese" refere-se à inibição da formação, deposição, acumulação e/ou persistência de tais fibrilas de amiloide ou depósitos do tipo fibrila de sinucleína.

"Disrupção de fibrilas ou fibrilogénese" refere-se à disrupção de fibrilas de amiloide ou sinucleína pré-formadas, que existem usualmente numa estrutura secundária em folha β -pregueada predominante. Tal disrupção por compostos da invenção pode envolver redução ou desmontagem marcada de fibrilas de amiloide ou sinucleína como avaliado por vários métodos tais como espectroscopia de dicroísmo circular, fluorometria de Tioflavina S, ligação do vermelho do Congo, SDS-PAGE/transferência de Western, como demonstrado pelos Exemplos apresentados neste pedido.

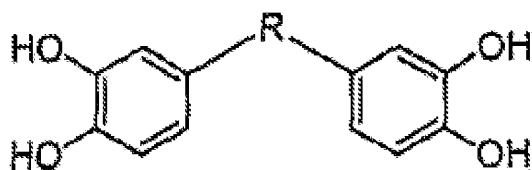
Um "agente farmacêutico" ou "agente farmacológico" ou "composição farmacêutica" refere-se a um composto ou combinação de compostos usado para tratamento,

preferencialmente numa forma pura ou quase pura. Na especificação, os agentes farmacêuticos ou farmacológicos incluem os compostos desta invenção. Os compostos são desejavelmente purificados até 80% de homogeneidade, e preferencialmente até 90% de homogeneidade. Acredita-se que os compostos e composições purificados até 99,9% de homogeneidade são vantajosos. Como um teste ou confirmação, um composto homogêneo adequado em CLAR originaria o que aqueles peritos na técnica identificariam como uma banda de pico agudo único.

Compostos da invenção

Os compostos desta invenção são:

Compostos da fórmula:



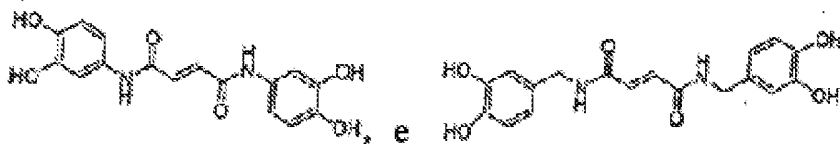
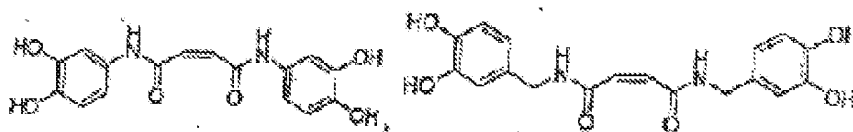
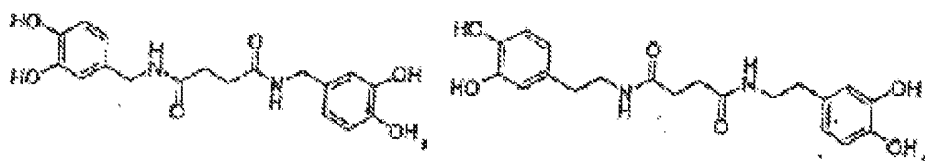
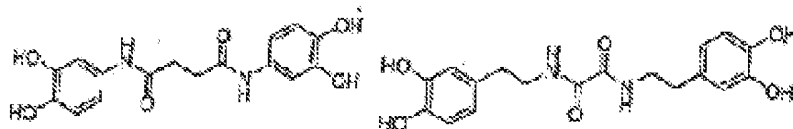
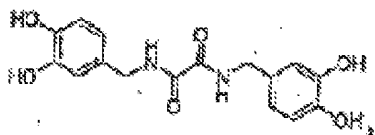
ou um seu sal farmacêuticamente aceitável onde:

R é um grupo alquileno C_6-C_{10} , no qual existem:

- i) opcionalmente 1 ou 2 ligações duplas não adjacentes;
- ii) 1 a 3 grupos metileno não adjacentes estão substituídos por NR' , O ou S, onde R' é H, acilo C_{2-4} ou alquilo C_{1-3} ; e
- iii) 2 grupos metileno estão substituídos por um grupo carbonilo ou hidroximetileno

Compostos particularmente preferenciais da invenção incluem:

(1) os compostos que são:



Síntese dos compostos da invenção

Os compostos desta invenção podem ser preparados por métodos geralmente conhecidos da pessoa de perícia vulgar na técnica, tendo em conta esse conhecimento e a divulgação deste pedido incluindo Exemplos 1-24.

Os materiais e reagentes de início usados na preparação destes compostos estão disponíveis de fornecedores comerciais tais como a Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Bachem (Torrance, CA), Sigma (St Louis, MO), ou Lancaster Synthesis Inc. (Windham, NH) ou são preparados por métodos bem conhecidos de uma pessoa de perícia vulgar na técnica, seguindo procedimentos descritos em tais referências como *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, vols. 1-17, John Wiley and Sons, Nova Iorque, NI, 1991; *Rodd's Chemistry of Carbon Compounds*, vols. 1-5 e sups., Elsevier Science Publishers, 1989; *Organic Reactions*, vols.1-40, John Wiley and Sons, Nova Iorque, NI, 1991; March J.: *Advanced Organic Chemistry*, 4^a ed., John Wiley and Sons, Nova Iorque, NI; e *Larock: Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers, Nova Iorque, 1989.

Na maioria dos casos, os grupos protetores para os grupos hidroxil são introduzidos e finalmente removidos. Grupos protetores adequados são descritos em Greene *et al.*, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Segunda Edição, John Wiley and Sons, Nova Iorque, 1991. Um grupo protetor preferencial é o grupo metilendioxi, como visto em muitos dos Exemplos 1-23, e uma ampla variedade de compostos de metilendioxifenilo (tais como 3,4-metilendioxiacetofenona, 3,4-metilendioxianilina, 3,4-metilendioxibenzaldeído, ácido 3,4-metilenedioxibenzoico, 3,4-metilendioxibenzonitrilo, ácido 3,4-metilendioxibenzoico, cloreto de 3,4-metilendioxibenzoílo, ácido 3,4-etilendioxicinâmico, 3,4-

metilenodioxinitrobenzeno, 3,4-metilenodioxifenol, ácido 3,4-metilenodioxifenilacético, 3,4-metilenodioxifenilacetoneitrilo, isocianato de 3,4-metilenodioxifenilo, brometo de 3,4-metilenodioxifenilmagnésio, e 3,4-metilenodioxifenilmetanol) está comercialmente disponível. Outros grupos protetores, tais como os grupos benzilo e metoximetilo, podem ser também usados.

Outros materiais de início ou intermediários iniciais podem ser preparados por elaboração dos materiais listados acima, por exemplo, por métodos bem conhecidos de uma pessoa de perícia vulgar na técnica.

Os materiais de início, intermediário, e compostos desta invenção podem ser isolados e purificados usando técnicas convencionais, incluindo precipitação, nitração, destilação, cristalização, cromatografia, e similares. Os compostos podem ser caracterizados usando métodos convencionais, incluindo constantes físicas e métodos espectroscópicos.

Farmacologia e Utilidade

Os compostos desta invenção atuam para inibirem ou prevenirem a formação de fibrilas de amiloide, inibirem ou prevenirem o crescimento de fibrilas de amiloide, e/ou causarem desmontagem, disrupção, e/ou desagregação de depósitos de fibrilas de amiloide e proteína amiloide pré-formados. A sua atividade pode ser medida *in vitro* por métodos tais como aqueles divulgados nos Exemplos 25-27, enquanto a sua atividade *in vivo* contra doenças da amiloide pode ser medida em modelos animais, tais como aqueles modelos de camundongo transgênico de APP que mimetizam

muitas das marcas neuropatológicas da doença de Alzheimer, e em humanos.

“Doenças da amiloide” ou “amiloidoses” adequadas para tratamento com os compostos desta invenção são doenças associadas à formação, deposição, acumulação, ou persistência de fibrilas de amiloide, especialmente das fibrilas de uma proteína amiloide selecionada do grupo consistindo em amiloide A β , amiloide AA, amiloide AL, amiloide IAPP, amiloide PrP, amiloide α_2 -microglobulina, transtiretina, pré-albumina, e pró-calcitonina, especialmente amiloide A β e amiloide IAPP. Tais doenças adequadas incluem doença de Alzheimer, síndrome de Down, demência pugilística, atrofia de sistemas múltiplos, miositose de corpos de inclusão, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose do tipo Dutch, doença de Nieman-Pick do tipo C, angiopatia β -amiloide cerebral, demência associada a degeneração basal cortical, a amiloidose da diabetes do tipo 2, a amiloidose da inflamação crônica, a amiloidose da malignidade e Febre Mediterrânea Familiar, a amiloidose do mieloma múltiplo e discrasias das células B, a amiloidose das doenças do prião, doença de Creutzfeldt-Jakob, síndrome de Gerstmann-Straussler, kuru, tremor epizootico, a amiloidose associada ao síndrome do canal cárpico, amiloidose cardíaca senil, polineuropatia amiloidótica familiar, e a amiloidose associada a tumores endócrinos, especialmente doença de Alzheimer e diabetes do tipo 2.

Os compostos também atuam para inibirem ou prevenirem a formação de fibrilas de α -sinucleína/NAC, inibirem ou prevenirem crescimento de fibrilas de α -sinucleína/NAC, e/ou causarem desmontagem, interrupção, e/ou desagregação de depósitos proteicos associados a α -sinucleína/NAC e de fibrilas de α -sinucleína/NAC pré-formados. A sua atividade

pode ser medida *in vitro* por métodos similares àqueles discutidos nos Exemplos 24-26, ou *in vivo* em modelos animais, tais como aqueles modelos de camundongo transgênico de α -sinucleína que mimetizam muitas das marcas neuropatológicas da doença de Parkinson, e em humanos.

"Doenças da sinucleína" ou "sinucleinopatias" adequadas para tratamento com os compostos desta invenção são doenças associadas à formação, deposição, acumulação, ou persistência de fibrilas de sinucleína, especialmente fibrilas de α -sinucleína. Tais doenças adequadas incluem doença de Parkinson, doença de Parkinson familiar, doenças dos corpos de Lewy, a variante dos corpos de Lewy da doença de Alzheimer, demência com corpos de Lewy, atrofia de sistemas múltiplos, e o complexo de Parkinsonismo-demência de Guam.

A razão terapêutica de um composto pode ser determinada, por exemplo, por comparação da dose que dá atividade anti-fibrila (anti-amiloide ou anti- α -sinucleína/NAC) eficaz num modelo *in vivo* adequado numa espécie de animal adequada tal como o camundongo, com a dose que dá perda de peso significativa (ou outros efeitos secundários observáveis) na espécie de animal de teste.

Composições Farmacêuticas e Administração

Em geral, os compostos da invenção serão administrados em quantidades terapêuticamente eficazes por qualquer um dos modos usuais conhecidos na técnica, ou individualmente ou em combinação com pelo menos um outro composto desta invenção e/ou pelo menos um outro agente terapêutico convencional para a doença sendo tratada. Uma quantidade terapêuticamente eficaz pode variar amplamente dependendo da doença, sua gravidade, da idade e saúde relativa do

animal sendo tratado, da potência do(s) composto(s), e outros fatores. Como agentes anti-fibrila, as quantidades terapêuticamente eficazes dos compostos desta invenção podem variar de 0,1-1000 mg/Kg de peso corporal/dia, tal como de 1-100 mg/Kg/dia; por exemplo, 10-100 mg/Kg/dia.

Uma pessoa de perícia vulgar na técnica será convencionalmente capaz, e sem experimentação indevida, tendo em conta essa perícia e esta divulgação, de determinar uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto para o tratamento de uma doença da amiloide tal como uma amiloidose ou formação de fibrilas de α -sinucleína/NAC.

Composições preferenciais conterão um composto desta invenção que é pelo menos substancialmente puro. Em geral, "puro" significa mais do que 95% puro, e "substancialmente puro" significa um composto sintetizado tal que o composto, como tornado disponível para consideração numa dosagem terapêutica, tenha somente aquelas impurezas que não podem ser prontamente ou razoavelmente removidas por processos de purificação convencionais.

Em geral, os compostos desta invenção serão administrados como composições farmacêuticas por uma das seguintes rotas: oral, tópica, sistêmica (p.ex. transdérmica, intranasal, ou por supositório), ou parenteral (p.ex. injeção intramuscular, subcutânea, ou intravenosa). As composições podem tomar a forma de comprimidos, pílulas, cápsulas, semissólidos, pós, formulações de libertação sustentada, soluções, suspensões, elixires, aerossóis, ou quaisquer outras composições apropriadas; e compreender pelo menos um composto desta invenção em combinação com pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável. Excipientes adequados são bem conhecidos de pessoas de perícia vulgar na técnica, e eles, e os métodos de formulação das

composições, podem ser encontrados em tais referências padrão como *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, A. Gennaro, ed., 20^a edição, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadélfia, PA. Transportadores líquidos adequados, especialmente para soluções injetáveis, incluem água, solução salina aquosa, solução de dextrose aquosa, e glicóis.

Em particular, o(s) composto(s) - otimamente somente um tal composto é administrado em qualquer forma de dosagem particular - pode(m) ser administrado(s); oralmente, por exemplo, como comprimidos, trociscos, pastilhas, suspensão aquosa ou oleosa, pós ou grânulos dispersíveis, emulsões, cápsulas duras ou moles, ou xaropes ou elixires. As composições destinadas a uso oral podem ser preparadas de acordo com qualquer método conhecido na técnica para o fabrico de composições farmacêuticas e tais composições podem conter um ou mais agentes selecionados do grupo consistindo em agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes corantes e agentes conservantes de modo a proporcionar preparações farmacêuticamente elegantes e saborosas.

Os comprimidos contêm o composto em mistura com excipientes farmacêuticamente aceitáveis não tóxicos que são adequados para o fabrico de comprimidos. Estes excipientes podem ser por exemplo, diluentes inertes, tais como carbonato de cálcio, carbonato de sódio, lactose, fosfato de cálcio ou fosfato de sódio; agentes granulantes e desintegrantes, por exemplo, amido de milho ou ácido algínico; agentes ligantes, por exemplo, amido de milho, gelatina ou acácia, e agentes lubrificantes, por exemplo, estearato de magnésio ou ácido esteárico ou talo. Os comprimidos podem estar não revestidos ou eles podem ser revestidos por técnicas conhecidas para atrasar a desintegração e absorção no trato

gastrointestinal e proporcionar desse modo uma ação sustentada ao longo de um período mais longo. Por exemplo, um material de atraso no tempo tal como monoestearato de glicerol ou diestearato de glicerol pode ser empregue. As formulações para uso oral podem ser também apresentadas como cápsulas duras de gelatina em que o composto é misturado com um diluente sólido inerte, por exemplo, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio ou caulim, ou como cápsulas moles de gelatina em que o ingrediente ativo é misturado com água ou um meio de óleo, por exemplo, óleo de amendoim, parafina líquida ou azeite.

As suspensões aquosas contêm o composto em mistura com excipientes adequados para o fabrico de suspensões aquosas. Tais excipientes são agentes de suspensão, por exemplo, carboximetilcelulose de sódio, metilcelulose, celulose de hidroxipropilmetilo, alginato de sódio, polivinilpirrolidona, goma tragancanto, e goma acácia; agentes dispersantes ou molhantes podem ser fosfatídeos que ocorrem naturalmente, por exemplo lecitina, ou produtos de condensação de um óxido de alquilenos com ácidos gordos, por exemplo estearato de polioxietileno, ou produtos de condensação do óxido de etileno com álcoois alifáticos de cadeia longa, por exemplo, heptadecaetilenooxicetanol, ou produtos de condensação do óxido de etileno com ésteres parciais derivados de ácidos gordos tais como hexitol tal como monooleato de sorbitol de polioxietileno, ou produtos de condensação do óxido de etileno com ésteres parciais a partir de ácidos gordos e anidridos de hexitol, por exemplo, monooleato de sorbitano de polietileno. As suspensões aquosas podem também conter um ou mais conservantes, por exemplo, p-hidroxibenzoato de etilo ou n-propilo, um ou mais agentes corantes, um ou mais agentes aromatizantes, ou um ou mais agentes edulcorantes, tais como sacarose ou sacarina.

As suspensões oleosas podem ser formuladas por suspensão do composto num óleo vegetal, por exemplo óleo de amendoim, azeite, óleo de sésamo, ou óleo de coco ou num óleo mineral tal como parafina líquida. As suspensões oleosas podem conter um agente espessante, por exemplo, cera de abelha, parafina dura ou álcool de cetilo. Agentes edulcorantes, tais como aqueles estabelecidos em baixo, e agentes corantes podem ser adicionados para proporcionar uma preparação oral saborosa. Estas composições podem ser conservadas pela adição de um antioxidante tal como ácido ascórbico. Pós e grânulos dispersíveis adequados para preparação de uma suspensão aquosa pela adição de água proporcionam o ingrediente ativo em mistura com um agente dispersante ou molhante, um agente de suspensão e um ou mais conservantes. Agentes dispersantes ou molhantes e agentes de suspensão adequados são exemplificados por aqueles já descritos acima. Excipientes adicionais, por exemplo agentes edulcorantes, e aromatizantes, podem também estar presentes.

Os compostos da invenção podem estar também na forma de emulsões óleo-em-água. A fase oleosa pode ser um óleo vegetal, por exemplo azeite ou óleos de amendoim, ou um óleo mineral, por exemplo parafina líquida ou misturas destas. Agentes emulsificantes adequados podem ser gomas que ocorrem naturalmente, por exemplo goma de acácia ou goma tragacanto, fosfatídeos que ocorrem naturalmente, por exemplo soja, lecitina, e fosfatídeos que ocorrem, por exemplo soja, lecitina, e ésteres ou ésteres parciais derivados de ácidos gordos e anidridos de hexitol, por exemplo monooleato de sorbitano, e produtos de condensação dos referidos ésteres parciais com óxido de etileno, por exemplo monooleato de sorbitano de polioxietileno. A emulsão pode também conter agentes edulcorantes e aromatizantes. Xaropes e elixires podem ser formulados com

agentes edulcorantes, por exemplo, glicerol, sorbitol ou sacarose. Tais formulações podem também conter um demulcente, um conservante e agentes aromatizantes e corantes.

Os compostos da invenção podem ser também administrados por injeção ou infusão, ou subcutaneamente ou intravenosamente, ou intramuscularmente, ou intrasternalmente, ou intranasalmente, ou por técnicas de infusão na forma de suspensão injetável ou oleaginosa estéril. O composto pode estar na forma de suspensões aquosas ou oleaginosas injetáveis estéreis. Estas suspensões podem ser formuladas de acordo com a técnica conhecida usando agentes dispersantes ou molhantes e agentes de suspensão adequados que foram descritos acima. A preparação injetável estéril pode ser também uma solução ou suspensão injetável estéril num diluente ou solvente parenteralmente aceitável não tóxico por exemplo, como uma solução em 1,3-butanodiol. Entre os veículos e solventes aceitáveis que podem ser empregues estão água, solução de Ringer e solução de cloreto de sódio isotónica. Adicionalmente, óleos estéreis, fixos são convencionalmente empregues como um solvente ou meio de suspensão. Para este propósito, quaisquer óleos fixos brandos podem ser convencionalmente empregues incluindo mono- ou diglicéridos sintéticos. Adicionalmente, ácidos gordos tais como ácido oleico encontram uso na preparação de injetáveis. Os regimes de dosagem podem ser ajustados para proporcionar a resposta terapêutica ótima. Por exemplo, várias dosagens divididas podem ser administradas diariamente ou a dosagem pode ser proporcionalmente reduzida como indicado pelas exigências da situação terapêutica.

É especialmente vantajoso formular os compostos na forma de dosagem unitária para facilidade de administração e

uniformidade de dosagem. A forma de dosagem unitária como usada aqui refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para os sujeitos a ser tratados; contendo cada uma uma quantidade terapêuticamente eficaz do composto e pelo menos um excipiente farmacêutico. Um produto de fármaco compreenderá uma forma de dosagem unitária dentro de um contentor que esteja marcado ou acompanhado por uma etiqueta indicando o método de tratamento pretendido, tal como o tratamento de uma doença da amiloide, por exemplo uma amiloidose tal como doença de Alzheimer ou uma doença associada a formação de fibrilas de α -sinucleína/NAC tal como doença de Parkinson.

Formulações de Libertação Sustentada

A invenção também inclui o uso de formulações de libertação sustentada para distribuir os compostos da presente invenção ao alvo desejado (*i.e.* cérebro ou órgãos sistémicos) a elevados níveis circulantes (entre 10^{-9} e 10^{-4} M) são também divulgadas. Numa forma de realização preferencial para o tratamento da doença de Alzheimer ou Parkinson, os níveis circulantes dos compostos são mantidos até 10^{-7} M. Os níveis estão ou circulantes no paciente sistemicamente, ou numa forma de realização preferencial, presentes no tecido do cérebro, e em formas de realização mais preferenciais, localizados nos depósitos de fibrilas de amiloide ou α -sinucleína no cérebro ou outros tecidos.

Entende-se que os níveis de composto são mantidos ao longo de um certo período de tempo como é desejado e podem ser facilmente determinados por um perito na técnica usando esta divulgação e compostos da invenção. Numa forma de realização preferencial, a invenção inclui uma característica única de administração compreendendo uma formulação de libertação sustentada tal que um nível

constante de composto terapêutico seja mantido entre 10^{-8} e 10^{-6} M entre 48 a 96 horas nos soros.

Tais formulações de libertação sustentada e/ou programada podem ser feitas por meios de libertação sustentada de dispositivos de distribuição que são bem conhecidos daqueles de perícia vulgar na técnica, tais como aqueles descritos nas Patentes dos EUA 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 e 5,733,566.

Estas composições farmacêuticas podem ser usadas para proporcionar libertação lenta ou sustentada de um ou mais compostos ativos usando, por exemplo, celulose de hidroxipropilmetilo, outras matrizes de polímero, géis, membranas permeáveis, sistemas osmóticos, revestimentos de multicamadas, micropartículas, lipossomas, microesferas, ou similares. Formulações de libertação sustentada adequadas conhecidas daqueles peritos na técnica, incluindo aquelas descritas aqui, podem ser prontamente selecionados para uso com as composições farmacêuticas da invenção. Assim sendo, formas de dosagem unitária adequadas para administração oral, tais como, mas não se limitando a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, pós e similares, que estão adaptadas para libertação sustentada são englobadas pela presente invenção.

Numa forma de realização preferencial, a formulação de libertação sustentada contém composto ativo tal como, mas não se limitando a, celulose microcristalina, maltodextrina, etilcelulose, e estearato de magnésio. Como descrito acima, todos os métodos conhecidos para encapsulação que sejam compatíveis com propriedades dos compostos divulgados são englobados por esta invenção. A

formulação de libertação sustentada é encapsulada por partículas ou grânulos de revestimento da composição farmacêutica da invenção com espessura variável de polímeros lentamente solúveis ou por microencapsulação. Numa forma de realização preferencial, a formulação de libertação sustentada é encapsulada por um material de revestimento de espessura variável (p.ex. cerca de 1 micron a 200 microns) que permite a dissolução da composição farmacêutica cerca de 48 horas a cerca de 72 horas após administração a um mamífero. Noutra forma de realização, o material de revestimento é um aditivo aprovado para alimentação.

Noutra forma de realização, a formulação de libertação sustentada é um dispositivo de dissolução de matriz que é preparado por compressão do fármaco com um transportador de polímero lentamente solúvel num comprimido. Numa forma de realização preferencial, as partículas revestidas têm uma gama de tamanhos entre cerca de 0,1 e cerca de 300 microns, como divulgado nas Patentes dos E.U.A. Nos. 4,710,384 e 5,354,556.

Cada uma das partículas está na forma de uma micromatriz, com o ingrediente ativo uniformemente distribuído ao longo do polímero.

Formulações de libertação sustentada tais como aquelas descritas na Patente dos E.U.A. No. 4,710,384, tendo uma percentagem relativamente elevada de plastificante no revestimento de modo a permitir suficiente flexibilidade para prevenir quebra substancial durante a compressão são divulgadas. A quantidade específica de plastificante varia dependendo da natureza do revestimento e do plastificante particular usado. A quantidade pode ser prontamente determinada empiricamente por teste das características de

libertação dos comprimidos formados. Se o medicamento for liberto demasiado rapidamente, então é usado mais plastificante. As características de libertação são também uma função da espessura do revestimento. Quando são usadas quantidades substanciais de plastificante, a capacidade de libertação sustentada do revestimento diminui. Assim sendo, a espessura do revestimento pode ser aumentada ligeiramente para compensar um aumento na quantidade de plastificante. Geralmente, o plastificante numa tal forma de realização está presente numa quantidade de cerca de 15 a 30 % do material de libertação sustentada no revestimento, preferencialmente 20 a 25 %, e a quantidade de revestimento será de 10 a 25% do peso do material ativo, preferencialmente 15 a 20 %. Qualquer plastificante farmacologicamente aceitável convencional pode ser incorporado no revestimento.

Os compostos da invenção podem ser formulados como uma formulação de libertação sustentada e/ou programada. Todos os produtos farmacêuticos de libertação sustentada têm um objetivo comum de melhoria da terapia do fármaco em relação àquela alcançada pelas suas contrapartes não sustentadas. Idealmente, o uso de uma preparação de libertação sustentada otimamente desenhada no tratamento médico é caracterizado por um mínimo de substância de fármaco sendo empregue para curar ou controlar a condição. As vantagens das formulações de libertação sustentada podem incluir: 1) atividade expandida da composição, 2) frequência de dosagem reduzida, e 3) adesão do paciente aumentada. Adicionalmente, as formulações de libertação sustentada podem ser usadas para afetar o tempo de início da ação ou outras características, tais como níveis no sangue da composição, e podem assim sendo afetar a ocorrência de efeitos secundários.

As formulações de libertação sustentada da invenção são desenhadas para libertarem inicialmente uma quantidade da composição terapêutica que produz prontamente o efeito terapêutico desejado, e gradualmente e continuamente libertam outras quantidades de composições para manter este nível de efeito terapêutico ao longo de um período de tempo prolongado. De modo a manter este nível constante no corpo, a composição terapêutica tem de ser liberta da forma de dosagem a uma taxa que substituirá a composição sendo metabolizada e excretada do corpo.

A libertação sustentada de um ingrediente ativo pode ser estimulada por vários indutores, por exemplo pH, temperatura, enzimas, água, ou outras condições fisiológicas ou compostos. O termo "componente de libertação sustentada" no contexto da presente invenção é definido aqui como um composto ou compostos, incluindo, mas não se limitando a, polímeros, matrizes de polímero, géis, membranas permeáveis, lipossomas, microesferas, ou similares, ou uma sua combinação; que facilita a libertação sustentada do ingrediente ativo.

Se o complexo for solúvel em água, pode ser formulado num tampão apropriado, por exemplo, tampão fosfato salino, ou outras soluções fisiologicamente compatíveis. Alternativamente, se o complexo resultante tiver fraca solubilidade em solventes aquosos, então pode ser formulado com um tensioativo não iónico tal como Tween, ou polietileno glicol. Assim sendo, os compostos e seus solventes fisiológicos podem ser formulados para administração por inalação ou insuflação (ou através da boca ou do nariz) ou administração oral, bocal, parenteral, ou retal, como exemplos.

Preparações para administração oral podem ser adequadamente formuladas para dar libertação controlada do composto ativo. Numa forma de realização preferencial, os compostos da presente invenção são formulados como pós de libertação controlada de micropartículas discretas que podem ser prontamente formuladas na forma líquida. O pó de libertação sustentada compreende partículas contendo um ingrediente ativo e opcionalmente, um excipiente com pelo menos um polímero não tóxico.

O pó pode ser disperso ou suspenso num veículo líquido e manterá as suas características de libertação sustentada durante um período de tempo útil. Estas dispersões ou suspensões têm estabilidade química e estabilidade em termos de taxa de dissolução. O pó pode conter um excipiente compreendendo um polímero, que pode ser solúvel, insolúvel, permeável, impermeável, ou biodegradável. Os polímeros podem ser polímeros ou copolímeros. O polímero pode ser um polímero natural ou sintético. Polímeros naturais incluem polipéptidos (p.ex., zeína), polissacarídeos (p.ex., celulose), e ácido algínico. Polímeros sintéticos representativos incluem aqueles descritos, mas não se limitando a, aqueles descritos na coluna 3, linhas 33-45 da Patente dos E.U.A. No. 5,354,556. Polímeros particularmente adequados incluem aqueles descritos, mas não se limitando a aqueles descritos na coluna 3, linha 46-coluna 4, linha 8 da Patente dos E.U.A. No. 5,354,556.

Os compostos de libertação sustentada da invenção podem ser formulados para administração parenteral, p.ex., por injeções ou implantes intramusculares para tecidos subcutâneos e várias cavidades corporais e dispositivos transdérmicos. Numa forma de realização, as injeções intramusculares são formuladas como suspensões aquosas ou

oleosas. Numa suspensão aquosa, o efeito de libertação sustentada é devido a, em parte, uma redução na solubilidade do composto ativo após complexação ou uma diminuição na taxa de dissolução. Uma abordagem similar é tomada com suspensões e soluções oleosas, em que a taxa de libertação de um composto ativo é determinada por particionamento do composto ativo para fora do óleo para o meio aquoso envolvente. Somente compostos ativos que sejam solúveis em óleo e tenham as características de partição desejadas são adequados. Óleos que podem ser usados para injeção intramuscular incluem, mas não se limitam a, óleo de sésamo, azeite, de amendoim, de milho, de amêndoa, de soja, de algodão e de rícino.

Uma forma altamente desenvolvida de distribuição de fármaco que concede libertação sustentada ao longo de períodos de tempo variando de dias a anos é implantar um dispositivo polimérico carregando o fármaco subcutaneamente ou em várias cavidades corporais. O material de polímero usado num implante, que tem de ser biocompatível e não tóxico, inclui mas não está limitado a hidrogéis, silicones, polietilenos, copolímeros de etileno-acetato de vinilo, ou polímeros biodegradáveis.

Exemplos

Procedimentos Experimentais Gerais

Todos os solventes foram destilados antes do uso e foram removidos por evaporação rotativa a temperaturas até 35°C. Sílica gel funcionalizada com octadecilo (C18) foi usada para cromatografia *flash* de fase reversa (RP), e sílica gel 60, malha 200-400, 40-63 µm, da Merck foi usada para cromatografia *flash* com sílica gel. A cromatografia de camada fina (TLC) foi levada a cabo usando DC-plastikfolien

Kieselgel 60 F₂₅₄ da Merck, primeiramente visualizado com uma lâmpada de UV, e depois por imersão numa solução de vanilina (vanilina a 1%, H₂SO₄ a 1% em etanol), e aquecimento. As rotações óticas foram medidas num polarímetro 214 da Perkin-Elmer. Os espectros de massa foram registados num instrumento MS-80 da Kratos. Os espectros de RMN, a 25°C, foram registados a 500 ou 300 MHz para ¹H e 125 ou 75 para ¹³C em espectrómetros Varian INOVA-500 ou VXR-300. Os desvios químicos são dados na escala delta referenciada em relação aos picos do solvente CHCl₃ a 7,25 e CDCl₃ a 77,0 ppm, (CH₃)₂CO a 2,15 e (CD₃)₂CO a 30,5 ppm, ou CH₃OD a 3,30 e CD₃OD a 39,0 ppm.

Condições de CLAR

O equipamento de CLAR analítica consistiu num autoamostrador Waters 717, bomba 600 e controlador, e um detector de UV 2487 controlado por *software* Omega. As amostras foram analisadas por uso de uma coluna semipreparativa RP-18 (C18 100A Prodigy de 5 mm, 250 x 4,6 mm, da Phenomenex) com uma coluna guarda (cartucho SecurityGuard contendo uma coluna de 5 mm, C18 ODS 4 x 3 mm, 5 mm, da Phenomenex) equipada a 30°C. As amostras (5 ml) foram analisadas usando um caudal de fase móvel de 5,0 mL/min, com detecção de UV a 280 nm.

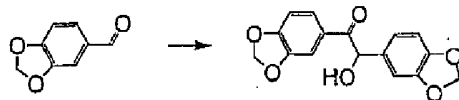
Método 1

Tempo (minutos)	CH ₃ CN	H ₂ O contendo TFA a 0,1%
0	11	89
20	11	89
30	100	0
31	11	89
40	11	89

Método 2

Tempo (minutos)	CH ₃ CN/H ₂ O (95:5) contendo TFA a 0,1%	H ₂ O contendo TFA a 0,1%
0	11	89
20	11	89
30	100	0
31	11	89
40	11	89

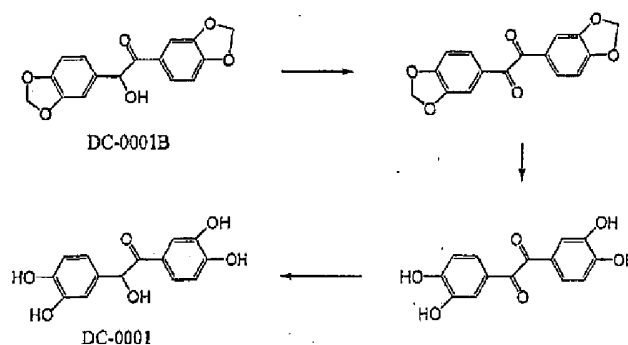
Exemplo Comparativo 1: 3,4,3',4'-Tetrahidroxibenzoína (Composto 1; DC-0001) Bis(3,4-metilenodioxi)benzoína (composto 1B; DC-0001B)



Uma solução de piperonal (5 g) em etanol (6,5 mL) foi tratada com uma solução de cianeto de potássio (0,5 g) em água (5 mL), depois submetida a refluxo durante 5 h. O precipitado resultante foi filtrado, lavado com água, depois cristalizado a partir de etanol para dar **DC-0001B** (2,24 g, 45%) como um sólido cristalino esbranquiçado.

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

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



Bis(3,4-metilenodioxi)benzilo

Uma mistura de acetato de cobre (20 mg), nitrato de amónio (660 mg) e **DC-0001B** (2 g) em ácido acético aq. (80%, 10 mL) foi submetida a refluxo durante 90 minutos. A mistura foi arrefecida, depois vertida em água (100 mL) e o produto extraído em acetato de etilo (2 x 100 mL), seco e evaporado *in vacuo* para dar uma goma amarela. A trituração a partir do etanol deu bis(3,4-metilenodioxi)benzilo (1,35 g, 68%) como um sólido amarelo-pálido.

$^1\text{H-RMN}$ 7,48 (2H, dd, J 2, 8Hz) 7,47 (2H, d, J 2Hz), 6,86 (2H, d, J 8Hz) e 6,08 (4H, s).

3,4,3',4'-Tetraidroxibenzilo

A uma solução agitada de bis(3,4-metilenodioxi)benzilo (500 mg) em CH_2Cl_2 seco (50 mL) sob nitrogénio, foi lentamente adicionado tribrometo de boro (1,6 mL), depois a agitação continuou durante 3,5 horas adicionais. Metanol (100 mL) foi adicionado cuidadosamente, depois o solvente evaporou *in vacuo* até um volume de 1 mL, esta adição e evaporação foi repetida duas vezes mais. O produto foi purificado por cromatografia em coluna sobre sílica gel quando a eluição com dietiléter em diclorometano deu 3,4,3',4'-tetraidroxibenzilo (217 mg, 47%) como um pó amarelo.

^1H -RMN 9,35 (2H, sl), 8,80 (2H, sl), 7,48 (2H, d, J 2Hz), 7,34 (2H, dd, J 2, 8Hz) e 7,02 (2H, d, J 8Hz). M/z 273 ((M-H)⁺, 100%).

CLAR (método 2) 31,3 minutos.

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

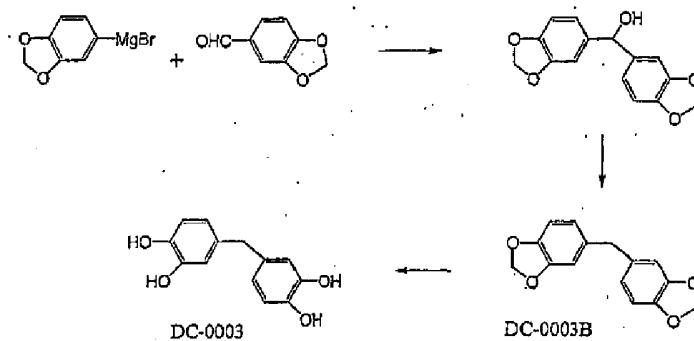
Uma solução do tetraidroxibenzilo (200 mg) em metanol (20 mL) com hidróxido de paládio em carbono (20%, 10 mg) foi agitada sob uma atmosfera de hidrogénio durante 5 minutos. A mistura foi filtrada através de Celite, e os solventes removidos *in vacuo* para dar uma goma laranja. A separação por cromatografia em coluna sobre sílica gel eluindo com acetato de etilo a 20% em diclorometano deu DC-0001 como uma goma esbranquiçada (55 mg, 27%). A recristalização a partir de metanol/diclorometano deu DC-0001 puro como um pó esbranquiçado (27 mg, 13%).

^1H -RMN ((CD₃)₂CO) 7,41 (1H, d, J 2Hz), 7,35 (1H, dd, J 2, 8Hz), 6,75 (1H, d, J 8Hz), 6,73 (1H, d, J 2Hz), 6,69 (1H, d, J 8Hz), 6,64 (1H, dd, J 2, 8Hz), 5,69 (1H, dl) e 4,60 (1H, dl).

^{13}C -RMN ((CD₃)₂CO) 198,22, 151,41, 145,77, 145,68, 145,43, 132,79, 127,07, 123,92, 120,52, 116,69, 116,20, 115,59, 115,36 e 75,97, M/Z 275 ((M-H)⁺, 100%).

CLAR (Método 1) 7,1 minutos.

**Exemplo Comparativo 2: 3,4,3',4'-Tetrahidroxidifenilmetano
(composto 3; DC-0003)**



Bis(3,4-metilenodioxifenil)metanol

A uma solução de piperonal (0,75g) em solução em diclorometano (25 mL) foi adicionado gota a gota brometo de 3,4-(metileno-dioxi)fenilmagnésio (5 mL, solução a 1M em tolueno/THF). A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante a noite, depois vertida sobre água, extraída com diclorometano, seca e evaporada *in vacuo* para dar o álcool em bruto como uma goma castanha. A purificação por cromatografia em coluna sobre sílica gel eluindo com acetato de etilo em CH₂Cl₂ (10 a 20%) deu o álcool puro como uma goma branca (1,18 g, 87%).

¹H-RMN (CDCl₃) 6,7-6,8 (6H, m), 5,93 (4H, s), 5,66 (1H, sl) e 2,18 (sl).

Bis(3,4-metilenodioxifenil)metano (composto 3B; DC-0003B)

Uma solução do álcool (2,61 g) em metanol (25 mL)/tetraidrofurano (30 mL) foi agitada com Pd(OH)₂/C (20%, 100 mg) sob uma atmosfera de hidrogénio durante 12 horas. A mistura foi filtrada através de Celite, depois os solventes removidos *in vacuo* para dar uma goma castanha (2,4 g). A

cristalização a partir da acetona deu **DC-0003B** como cristais brancos (1,14 g, 44%).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) 6,6-6,8 (6H, m), 5,90 (4H, s) e 3,79 (2H, s).

3,4,3',4'-Tetraidroxidifenilmetano (composto 3; DC-0003)

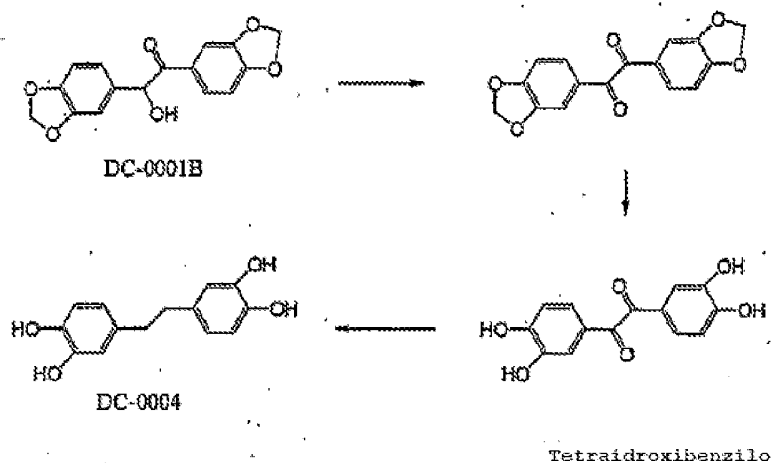
A uma solução agitada de **DC-0003B** (0,214 mg) em CH_2Cl_2 seco (25 mL) sob nitrogénio, foi lentamente adicionado tribrometo de boro (0,4 mL), depois a agitação continuou durante 3,5 horas adicionais. Metanol (50 mL) foi adicionado cuidadosamente, depois o solvente evaporou *in vacuo* até um volume de 1 mL; isto foi depois repetido 2 vezes mais. O produto foi purificado por cromatografia em coluna sobre sílica gel quando a eluição com acetato de etilo em diclorometano deu **DC-0003** (48%) como um sólido esbranquiçado.

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

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

CLAR (Método 1) 31,1 minutos.

Exemplo Comparativo 3: 1,2-bis(3,4-diidroxifenil)etano (composto 4; DC-0004)



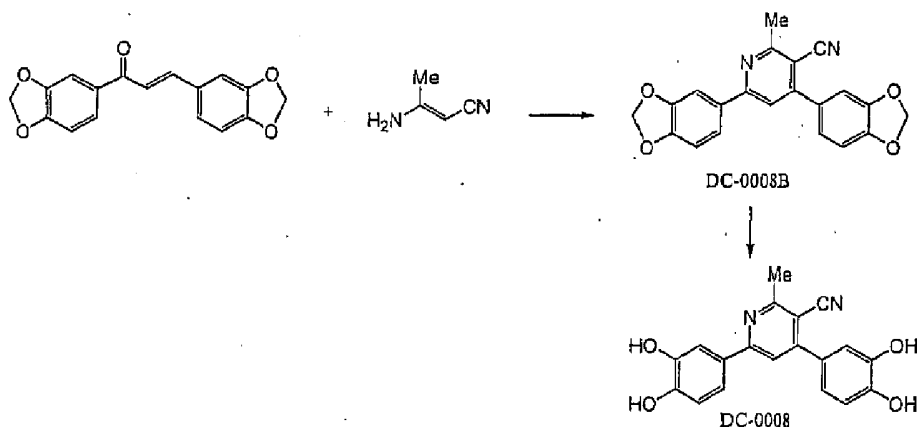
1,2-bis-(3,4-diidroxifenil)etano (composto 4; DC-0004)

Uma solução do tetraidroxibenzilo (ver Exemplo 1) (70 mg) em metanol (10 mL) com hidróxido de paládio em carbono (20%, 10 mg) foi agitada sob uma atmosfera de hidrogénio durante 2 horas. A mistura foi filtrada através de Celite, e os solventes removidos *in vacuo* para dar uma goma laranja. A separação por cromatografia em coluna sobre sílica gel eluindo com acetato de etilo a 20% em diclorometano deu **DC-0004** como uma goma esbranquiçada (43 g, 68%).

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

CLAR (Método 2) 31,7 minutos.

Exemplo Comparativo 4: 4,6-bis(3,4-diidroxifenil)-3-ciano-2-metilpiridina (composto 8; DC-0008)



4,6-bis(3,4-metilenodioxifenil)-3-ciano-2-metilpiridina (composto 8B; DC-0008B)

A uma solução da chalcona (ver em baixo) (300 mg, 1,0 mmol) e 3-aminocrotonitrilo (82 mg, 1,2 mmol) em acetonitrilo seco foi adicionado tert-butóxido de potássio (560 mg) e a mistura agitada durante 18 h. A mistura foi depois vertida em água, extraída com acetato de etilo, seca e evaporada *in vacuo*. A recristalização a partir de diclorometano/éter deu **DC-0008B** (152 mg, 42%) como um pó esbranquiçado.

$^1\text{H-RMN}(\text{CDCl}_3)$ 7,60 (2H, m), 7,52 (1H, s), 7,10 (2H, m), 6,93 (2H, m), 6,07 (2H, s), 6,05 (2H, s) e 2,87 (3H, s).
M/z 359 ((M+1)⁺, 100%).

4,6-bis(3,4-diidroxifenil)-3-ciano-2-metilpiridina (composto 8; DC-0008).

A uma solução agitada de **DC-0008B** (0,10 g) em CH_2Cl_2 seco (25 mL) sob nitrogénio, foi lentamente adicionado tribrometo de boro (0,2 mL), depois a agitação continuou durante 2 horas adicionais. Metanol (50 mL) foi adicionado

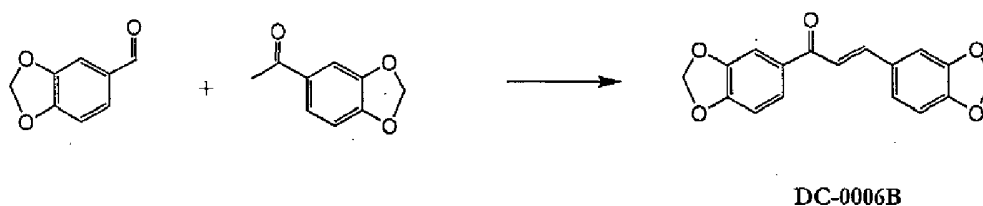
cuidadosamente, depois o solvente evaporou *in vacuo* até volume de 1 mL; isto foi depois repetido 2 vezes mais. O produto foi depois recristalizado a partir de metanol/acetona para dar **DC-0008** puro como pequenos cristais amarelos (64 mg, 69%).

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

M/z 335 ($(\text{M} + 1)^+$, 100%)

CLAR (método 2) 31,8 minutos.

Bis (3,4-metilenodioxi)chalcona (composto 6B; DC-0006B)



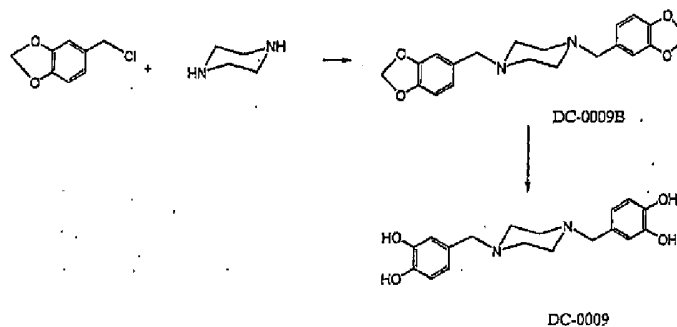
Uma mistura de piperonal (460 mg) e 3,4-metilenodioxiacetofenona (500 mg) em etanol (20 mL) foi tratada com solução de NaOH a 1M (4 mL), depois a mistura foi agitada durante a noite. O sólido cristalino amarelo-pálido foi filtrado, lavado com água, depois etanol aquoso frio e seco para dar bis(3,4-metilenodioxi)chalcona **DC-0006B** pura (476 mg, 53%).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) 7,72 (1H, d, J 16Hz), 7,64 (1H, dd, J 2, 8Hz), 7,52 (1H, d, J 2Hz), 7,33 (1H, d, J 16Hz), 7,16 (1H, d, J 2Hz), 7,12 (1H, dd, J 2, 8Hz), 6,89 (1H, d, J 8Hz), 6,84 (1H, d, J 8Hz), 6,06 (2H, s) e 6,03 (2H, s).

M/z 297 ($(\text{M} + 1)^+$, 100%).

Exemplo Comparativo 5: 1,4-bis(3,4-diidroxibenzil)piperazina (composto 9; DC-0009)

Método 1 - através de compostos protegidos por metilenodioxi



1,4-bis-(3,4-metilenodioxibenzil)piperazina (DC-0009B)

A uma solução de piperazina (207 mg) em DMF seco (5 mL) sob nitrogênio foi adicionado hidreto de sódio (80% p/p em óleo, 250 mg), seguido de cloreto de 3,4-metilenodioxibenzilo (0,90 g) e a mistura agitada à temperatura ambiente durante a noite. NaOH aquoso (50 mL, 1M) foi adicionado lentamente, depois solução de NaCl saturada (50 mL) e o produto extraído com diclorometano (2 x 100 mL). A camada orgânica foi lavada com água (2 x 100 mL), seca e evaporada *in vacuo* para dar um sólido branco. A cromatografia em coluna eluindo com proporções crescentes de éter em diclorometano deu **DC-0009B** puro (0,68 g, 80%) como um pó branco.

^1H RMN (CDCl_3) 6,85 (2H, s), 6,70 (4H, s), 5,94 (4H, s), 3,42 (4H, s) e 2,45 (8H, sl). M/z 355 ((M+1)⁺, 100%).

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

A uma solução agitada de **DC-0009B** (200 mg) em CH_2Cl_2 seco

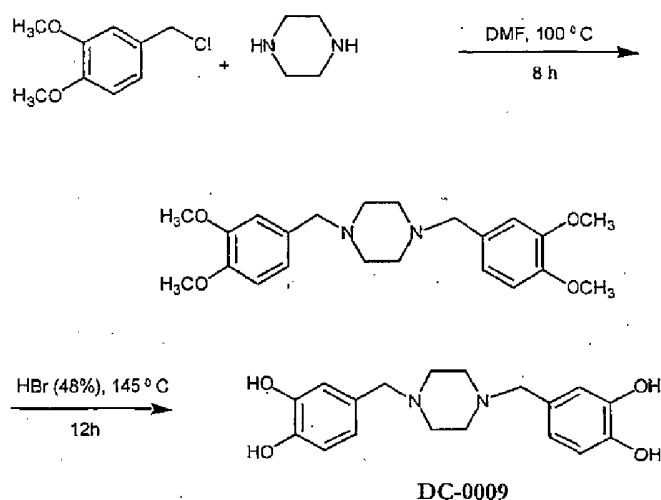
(25 mL) sob nitrogénio, foi lentamente adicionado tribrometo de boro (0,6 mL), depois a agitação continuou durante 30 minutos adicionais. Metanol (50 mL) foi adicionado cuidadosamente, depois o solvente evaporou *in vacuo* até um volume de 1 mL, e esta adição e evaporação foi repetida duas vezes mais. A purificação por cromatografia em coluna sobre sílica gel eluindo com metanol a 20% em clorofórmio deu uma fração contendo o produto **DC-0009** em bruto (51 mg, 27%) como um pó branco.

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

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

CLAR (Método 2) 3,79, 3,22 minutos para as formas mono e di protonadas.

Método 2 - através de compostos protegidos por metoxi



Cloreto de 3,4-dimetoxibenzilo

Álcool de 3,4-dimetoxibenzilo (20 g, 119 mmol) foi dissolvido em tolueno (60 mL) e arrefecido até 0°C. Cloreto de tionilo (7,48 g, 61,4 mmol) foi adicionado gota a gota à

solução arrefecida do álcool ao longo de um período de 30 minutos, e a reação foi mantida a 0°C durante 30 minutos adicionais. A reação foi extinta por derramamento em mistura de gelo/água (100 mL), e a fase orgânica foi separada. A fase aquosa foi depois extraída em tolueno (2 x 20 mL) e a solução de tolueno combinada foi seca sobre sulfato de sódio anidro. O tolueno foi removido a pressão reduzida para originar um óleo que solidificou após repouso, com um rendimento de 21 g. O material foi caracterizado como um ponto único por cromatografia de camada fina (TLC).

1,4-Bis(3,4-dimetoxibenzil)piperazina

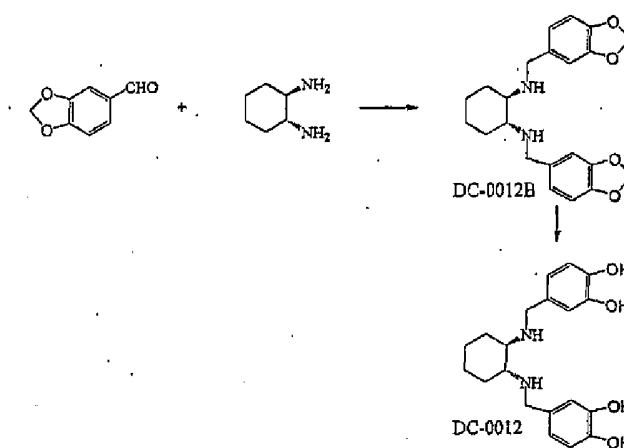
Cloreto de 3,4-dimetoxibenzilo (10 g, 53,6 mmol) foi combinado com piperazina (2,3 g, 26,8 mmol) em DMF anidro (30 mL) e aquecido com agitação sob nitrogénio durante 8 horas a 95-100°C. A mistura reacional arrefecida foi diluída com água (100 mL) e acidificada até pH 1 com ácido clorídrico concentrado. O precipitado branco foi recolhido por filtração e lavado com água (50 mL). O sólido foi ressuspenso em água (50 mL) e o pH ajustado para >9 pela adição gota a gota de solução de hidróxido de sódio (NaOH a 50% em água). O sólido branco resultante foi recolhido por filtração e seco sob vácuo a 50°C, rendimento 10 g.

1,4-Bis(3,4-diidroxibenzil)piperazina (DC-0009)

1,4-Bis(3,4-dimetoxibenzil)piperazina (5 g, 12,95 mmol) foi combinada com ácido bromídrico (50 mL de solução a 48% p/p em água) e a solução aquecida lentamente ao longo de 1 hora até 145°C. A reação foi mantida a 145°C durante 12 h, altura em que a TLC revelou desaparecimento do material de início. A solução arrefecida foi diluída com água (200 mL),

cuidadosamente neutralizada com hidrogenocarbonato de sódio aquoso saturado, e acetato de etilo (100 mL) adicionado. A mistura de solvente aquosa em bruto foi filtrada através de Celite e a camada de acetato de etilo separada. A camada aquosa foi extraída com acetato de etilo (2 x 50 mL), e os extratos combinados lavados com água (50 mL), e secos (Na_2SO_4). O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo recristalizou a partir de tolueno e cetona de metilo e etilo para originar o produto, **DC-0009**, 100 mg (98%, puro por análise de CLAR).

Exemplo Comparativo 6: N,N'-bis(3,4-diidroxibenzil)-trans-1,2-diaminociclohexano (composto 12; DC-0012)



N,N'-bis(3,4-metilenodioxibenzil)-trans-1,2-diaminociclohexano (composto 12B; DC-0012B)

A uma solução de piperonal (0,8 g, 5,3 mmol) e 1,2-diaminociclohexano (0,296 g, 2,6 mmol) em metanol seco (25 mL) foi adicionado cianoboroidreto de sódio (0,38 g, 6 mmol) e a mistura agitada durante 48 h. A mistura foi filtrada e os solventes removidos *in vacuo* para dar o produto em bruto. A cristalização a partir do metanol deu **DC-0012B** como um sólido cristalino esbranquiçado (0,298 g,

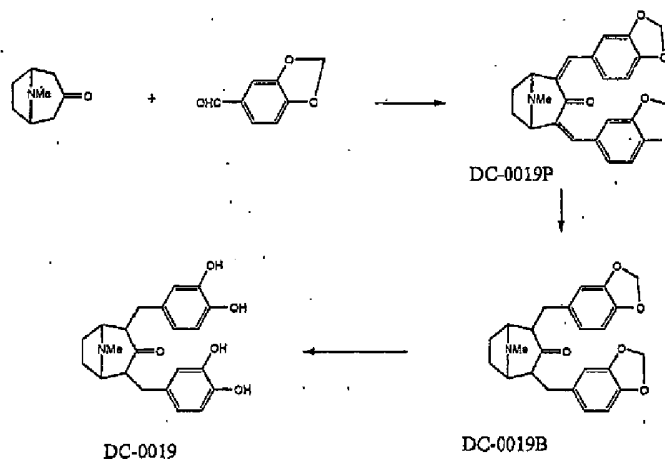
30%). ^1H -RMN (CDCl_3) 6,83 (2H, s), 6,75 (4H, s), 5,94 (4H, m), 3,80 (2H, d, J 13Hz), 3,56 (2H, d, J 13Hz), 2,22 (2H, m), 2,18 (2H, m), 1,74 (4H, m), 1,22 (2H, m) e 1,02 (2H, m).

**N,N'-bis(3,4-diidroxibenzil)-trans-1,2-diaminociclohexano
(composto 12; DC-0012)**

A uma solução agitada de **DC-0012B** (0,25 g) em CH_2Cl_2 seco (25 mL) sob nitrogénio, foi lentamente adicionado tribrometo de boro (0,31 mL), depois a agitação continuou durante 4 horas adicionais. Metanol (100 mL) foi adicionado cuidadosamente, depois o solvente evaporou *in vacuo* até um volume de 1 mL; esta adição e evaporação foi depois repetida duas vezes mais, e depois água (2 mL) foi adicionada e o produto liofilizado para dar **DC-0012** como um sólido castanho-pálido (150 mg, 64%).

^1H -RMN (D_2O) 6,88 (2H, s la), 6,84 (2H, d, J 8Hz), 6,76 (2H, d la, J 8Hz), 4,20 (2H, d, J 13 Hz), 3,98 (2H, d, J 13 Hz), 3,41 (2H, s la), 2,24 (2H, s la), 1,74 (2H, s la), 1,63 (2H, s la) e 1,40 (2H, s la). M/z 359 ($(\text{M}+1)^+$, 100%).
CLAR (Método 2) 8,2 minutos.

Exemplo Comparativo 7: 2,4-bis(3,4-diidroxibenzil)-3-tropinona (composto 19; DC-0019)



Uma mistura de tropinona (418 mg, 3 mmol) e 3,4-metilenodioxibenzaldeído (900 mg, 6 mmol) em etanol (20 mL) foi tratada com solução de NaOH a 1M (4 mL), e depois a mistura foi agitada durante a noite. O sólido cristalino amarelo foi filtrado, lavado com água, depois etanol aquoso frio, e seco para dar **DC-0019P** puro (938 mg, 77%).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) 7,73 (2H, s), 6,88 (6H, m), 6,02 (4H, s), 4,39 (2H, m), 2,60 (2H, m), 2,31 (3H, s) e 1,98 (2H, q, J 8Hz).

M/z 404 ((M+1)⁺, 100%).

2,4-bis(3,4-metilenodioxibenzil)-3-tropinona (composto 19B; DC-0019B)

Uma mistura de **DC-0019P** (500 mg, 1,24 mmol) e Pd/C a 10% (100 mg) em acetato de etilo (50 mL) foi agitada durante a noite sob uma atmosfera de hidrogénio. A mistura foi filtrada através de Celite e evaporada *in vacuo*. A cristalização do resíduo a partir de diclorometano/éter deu **DC-0019B** puro (366 mg, 72%) como um sólido cristalino branco.

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

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

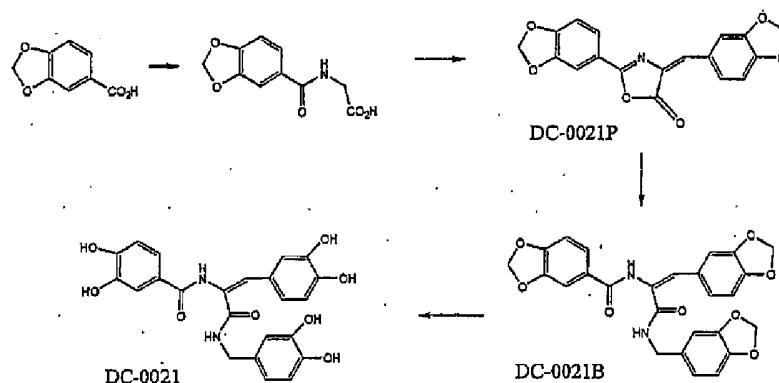
2,4-bis(3,4-diidroxibenzil)-3-tropinona (composto 19; DC-0019)

A uma solução agitada de **DC-0019B** (0,10 g) em CH_2Cl_2 seco (25 mL) sob nitrogénio, foi lentamente adicionado tribrometo de boro (0,2 mL), depois a agitação continuou durante 2 horas adicionais. Metanol (50 mL) foi adicionado cuidadosamente, depois o solvente evaporou *in vacuo* até um volume de 1 mL, isto foi repetido 2 vezes mais. O produto foi cristalizado a partir do metanol para dar **DC-0019** puro (42 mg, 45%) como um sólido branco.

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

CLAR (método 2) 30,9 minutos.

**Exemplo Comparativo 8: 3,4-diidroxibenzilamida do ácido α -
(3,4-diidroxibenzamido)-3,4-diidroxicinâmico (composto 21;
DC-0021)**



**2-(3,4-metilenodioxifenil)-4-(3,4-
metilenodioxibenzilamino)metileno-4H-oxazol-5-ona (DC-
0021P)**

A **DC-0021P** é também referida como **DC-0022B**, e está comercialmente disponível. Foi preparada a partir do ácido (3,4-metilenodioxibenzoil)aminoacético [ácido 3,4-metilenodioxihipúrico] (preparado pelo método de Acheson *et al.*, *J. Chem. Soc. Abstracts*, 1960:3457-3461, a partir do ácido 3,4-metilenodioxibenzoico), por reação com piperonaldeído usando o método descrito por Van der Eycken *et al.*, *Tet. Lett.*, 30(29):3873-3876, 1989.

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) 8,09 (1H, d, J 2Hz), 7,75 (1H, dd, J 2, 8Hz), 7,62 (1H, d, J 2Hz), 7,45 (1H, dd, J2, 8Hz), 7,12 (1H, s), 6,94 (1H, d, J 8Hz), 6,90 (1H, d, J 8Hz), 6,11 (2H, s) e 6,08 (2H, s).

m/z 338 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

3,4-metilenodioxibenzil-amida do ácido α -(3,4-metilenodioxibenzamido)-3,4-metilenodioxicinâmico (composto 21B; DC-0021B)

Uma mistura de **DC-0021P** (250 mg, 0,74 mmol) e 3,4-metilenodioxibenzilamina (0,112 g, 0,74 mmol) em ácido acético (glacial, 3 mL) foi aquecida sob refluxo durante 30 minutos. A reação foi extinta com acetato de etilo, lavada com bicarbonato de sódio, seca e evaporada *in vacuo* para dar o produto em bruto. A purificação por cromatografia em coluna, eluindo com hexano/acetato de etilo (50/50), seguida de recristalização a partir de etanol/água deu **DC-0021B** puro (218 mg, 60%).

$^1\text{H-RMN}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 9,09 (1H, sl), 8,06 (1H, t1, J 7Hz), 7,70 (1H, dd, J 2, 8Hz), 7,56 (1H, d, J 2Hz), 7,37 (1H, s), 7,16 (1H, d, J 2Hz), 7,08 (1H, dd, J 2, 8Hz), 7,00 (1H, d, J 8Hz), 6,94 (1H, d, J 2Hz), 6,86 (1H, d, J 8 Hz), 6,84 (1H, dd, J2, 8Hz), 6,77 (1H, d, J 8Hz), 6,14 (2H, s), 6,02 (2H, s), 5,98 (2H, s) e 4,43 (2H, d, J 7Hz).

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

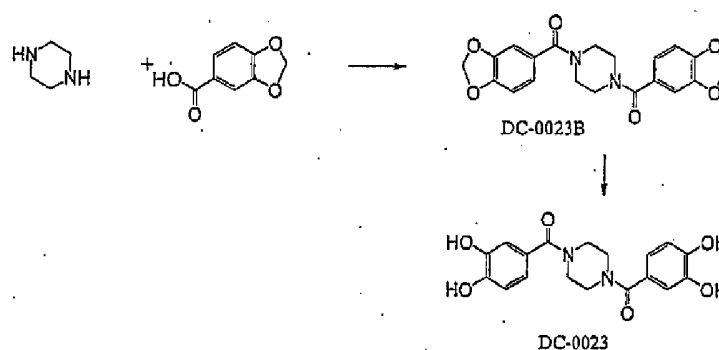
3,4-diidroxibenzilamida do ácido α -(3,4-diidroxibenzamido)-3,4-diidroxicinâmico (composto 21; DC-0021)

A uma solução agitada de **DC-0021B** (85 mg) em CH_2Cl_2 seco (20 mL) sob nitrogénio, foi lentamente adicionado tribrometo de boro (0,2 mL) depois a agitação continuou durante 2 horas adicionais. Metanol (50 mL) foi adicionado cuidadosamente, depois o solvente evaporado *in vacuo* até um volume de 1 mL; isto foi repetido 2 vezes mais. A purificação por cromatografia em coluna sobre sílica gel eluindo com metanol a 20% em clorofórmio deu **DC-0021** puro como um sólido amarelo-pálido (42 mg, 53%).

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

CLAR (método 2) 27,1 minutos.

Exemplo Comparativo 9: 1,4-bis(3,4-diidroxibenzoí) piperazina (composto 23; DC-0023)



1,4-bis(3,4-metilenodioxibenzoí) piperazina (composto 23B; DC-0023B)

Uma suspensão de ácido piperonílico (0,5 g) em cloreto de tionilo (15 mL) foi submetida a refluxo durante 1 h sob nitrogénio, quando uma solução límpida se formou. Os solventes foram removidos *in vacuo* para dar o cloreto de ácido como um sólido branco. O sólido foi dissolvido em diclorometano seco (7 mL) e adicionado gota a gota a uma solução agitada de piperazina (0,13 g) em diclorometano seco (20 mL) contendo piridina (0,5 mL). A mistura foi submetida ao refluxo durante 30 minutos, diluída com mais diclorometano (50 mL), depois lavada com HCl aquoso (1M, 50 mL) seguida de NaOH aquoso (1M, 50 mL), seca e evaporada *in vacuo* para dar o produto em bruto. A cristalização a partir de metanol/água deu DC-0023B como um sólido branco (532 mg,

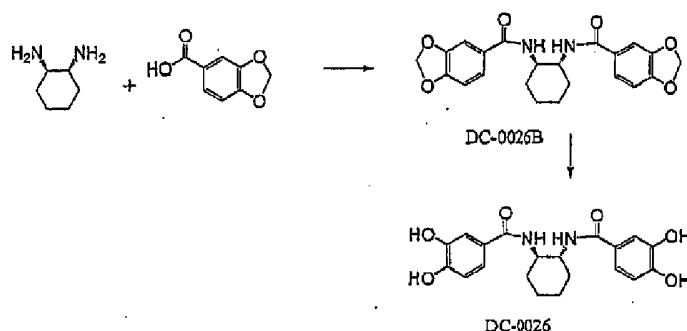
92%). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) 6,80 - 6,96 (6H, m), 6,00 (4H, s), e 3,62 (8H, s1).

1,4-bis(3,4-diidroxibenzoíl)piperazina (composto 23; DC-0023)

A uma solução agitada de **DC-0023B** (0,20 g) em CH_2Cl_2 seco (25 mL) sob nitrogénio, foi lentamente adicionado tribrometo de boro (0,4 mL), depois a agitação continuou durante 2 horas adicionais. Metanol (50 mL) foi adicionado cuidadosamente, depois o solvente evaporou *in vacuo* até um volume de 1 mL, isto foi repetido 2 vezes mais. O produto foi cristalizado a partir de metanol/diclorometano para dar **DC-0023** puro (141 mg, 75%) como um sólido branco.

$^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD) 6,88 (2H, s), 6,81 (4H, s) e 3,66 (8H, s).
M/z 357 ($(\text{M-H})^+$, 100%).

Exemplo Comparativo 10: N,N'-bis(3,4-diidroxibenzoíl)-trans-1,2-diaminociclohexano (composto 26; DC-0026)



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

Uma suspensão de ácido piperonílico (0,5 g) em cloreto de tionilo (15 mL) foi submetida a refluxo durante 1 h sob nitrogénio, quando uma solução límpida se formou. Os

solventes foram removidos *in vacuo* para dar o cloreto de ácido como um sólido branco. O sólido foi dissolvido em diclorometano seco (7 mL) e adicionado gota a gota a uma solução agitada de *trans*-1,2-diaminociclohexano (0,17 g) em diclorometano seco (20 mL) contendo piridina (0,5 mL). A mistura foi submetida ao refluxo durante 30 minutos, diluída com mais diclorometano (50 mL), depois lavada com HCl aquoso (1M, 50 mL), seguida de NaOH aquoso (1M, 50 mL), seca e evaporada *in vacuo* para dar o produto em bruto. A cristalização a partir de metanol/água deu **DC-0026B** como um sólido branco (544 mg, 94%).

^1H -RMN (CDCl_3) 7,27 (2H, m), 6,77 (2H, d, J 8Hz), 6,67 (2H, sl), 5,98 (4H, s), 3,92 (2H, sl), 2,20 (2H, dl), 1,80 (2H, sl) e 1,38 (4H, ml).

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

A uma solução agitada de **DC-0026B** (0,20 g) em CH_2Cl_2 seco (25 mL) sob nitrogénio, foi lentamente adicionado tribrometo de boro (0,4 mL), depois a agitação continuou durante 2 horas adicionais. Metanol (50 mL) foi adicionado cuidadosamente, depois o solvente evaporou *in vacuo* até um volume de 1 mL, esta adição e evaporação foi repetida duas vezes mais. O produto foi cristalizado a partir de metanol/diclorometano para dar **DC-0026** puro (161 mg, 86%) como um sólido branco.

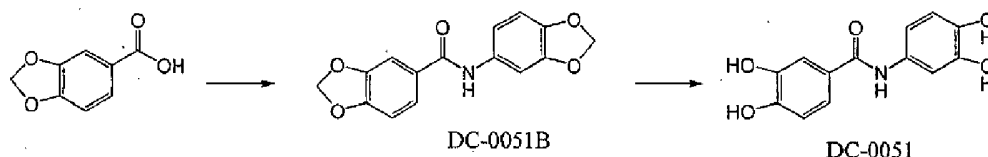
^1H -RMN (CD_3OD) 7,18 (2H, s), 7,11 (2H, d, J 8Hz), 6,73 (2H, d, J 8Hz), 3,89 (2H, m), 2,06 (2H, m), 1,83 (2H, m) e 1,44 (2H, m).

M/z 385 ($(\text{M} - \text{H})^+$, 100%).

CLAR (Método 1) 30,9 minutos.

Exemplo Comparativo 11: 3,4-diidroxianilida do ácido 3,4-diidroxibenzoico (composto 51; DC-0051)

Método 1 - através de compostos protegidos por metilenodioxí



3,4-metilenodioxianilida do ácido 3,4-metilenodioxibenzoico (composto 51; DC-0051B)

A uma solução de ácido piperonílico (500 mg, 3 mmol) em CH_2Cl_2 seco (25 mL) sob nitrogénio, foi adicionado cloreto de oxalilo (573 mg, 4,5 mmol) com três gotas de DMF seco, e a mistura foi agitada durante 1 hora. Os solventes foram removidos *in vacuo* dando o cloreto de ácido como um sólido branco. A uma solução do cloreto de ácido em CH_2Cl_2 seco (50 mL) sob nitrogénio, arrefecida até 0°C , foi adicionada gota a gota uma solução constituída por 3,4-(metilenodioxí)anilina (498 mg, 30,1 mmol) e piridina (0,5 mL) em CH_2Cl_2 (5 mL). A mistura reacional foi agitada durante 30 minutos à temperatura ambiente, depois diluída pela adição de CH_2Cl_2 (100 mL), lavada com HCl aquoso (50 mL, 10%) e solução de bicarbonato de sódio (50 mL), depois seca. Os solventes foram removidos *in vacuo* para dar o produto em bruto como um material cristalino castanho. A recristalização a partir de etanol aquoso deu **DC-0051B** como pequenos cristais prateados (0,516 g, 60%).

^1H -RMN (CDCl_3) 7,60 (1H, s la), 7,35 (3H, m), 6,88 (2H, m), 6,78 (1H, d, J 9Hz), 6,06 (2H, s) e 5,98 (2H, s).

3,4-diidroxianilida do ácido 3,4-diidroxibenzoico (composto 51; DC-0051)

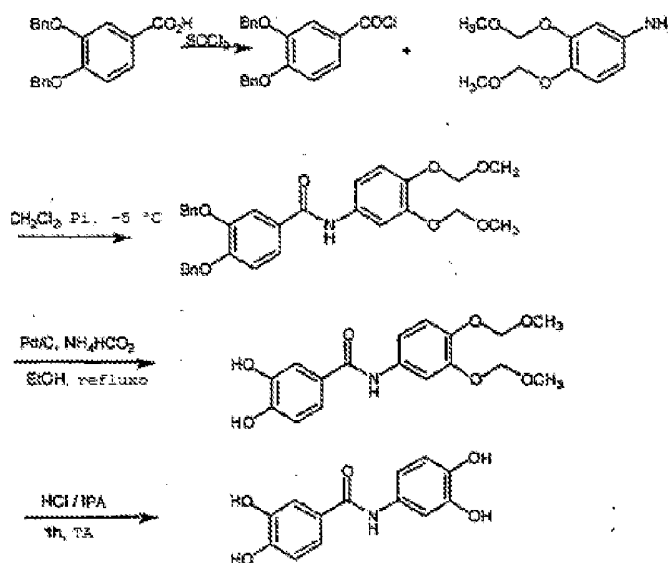
A uma solução de **DC-0051B** (100 mg) em CH_2Cl_2 seco (25 mL) sob nitrogénio foi adicionado BBr_3 (0,2 mL) e a mistura foi agitada durante 6 horas. Após agitação, HCl a 3M aquoso (25 ml) foi cuidadosamente adicionado à mistura reacional. O produto foi extraído em EtOAc (200 mL), seco e evaporado *in vacuo* para dar o produto em bruto. A purificação por cromatografia em coluna (Sílica: Hexano/ EtOAc 30:70) deu **DC-0051** como um sólido esbranquiçado (71 mg, 77%).

^1H -RMN (CD_3OD) 7,60 (1H, s 1a), 7,38 (1H, d, J 2Hz), 7,33 (1H, dd, J 2, 8 Hz), 7,21 (1H, d, J 2Hz), 6,89 (1H, dd, J 2, 8Hz), 6,86 (1H, d, J 8Hz) e 6,76 (1H, d, J 8Hz).

M/z 262 ($(\text{M}+1)^+$, 100%)

CLAR (método 2) 15,1 minutos.

Método 2 - através de compostos protegidos por benziloxi e metoximetoxi:



cloreto de 3,4-dibenziloxibenzoílo

Ácido 3,4-dibenziloxibenzoico (3,1 g, 9,3 mmol) foi combinado com piridina (5 gotas, catalítica) e cloreto de tionilo (15 mL, 205 mmol). A solução foi aquecida ao refluxo durante 4 h, arrefecida, e o cloreto de tionilo em excesso removido sob pressão reduzida. O produto em bruto foi dissolvido em benzeno (50 mL), e o solvente removido sob vácuo. O cloreto de benzoílo (rendimento teórico 3,4 g) foi depois dissolvido em diclorometano e usado diretamente no próximo passo.

3,4-di(metoximetoxi)anilida do ácido 3,4-dibenziloxibenzoico

3,4-di(metoximetoxi)anilina (0,484 g, 2,2 mmol) foi dissolvida em diclorometano (5 mL) e piridina (3 mL) e arrefecida até -5°C , enquanto se agitava sob nitrogénio. Uma solução de cloreto de 3,4-dibenziloxibenzoílo em diclorometano (0,8 g, 2,2 mmol de cloreto de ácido) foi adicionada gota a gota ao longo de 30 minutos. Permitiu-se que a reação agitasse a 0°C durante 30 minutos, depois foi aquecida até à temperatura ambiente ao longo de 30 minutos. A reação foi diluída com diclorometano (100 mL), lavada com ácido cítrico aquoso (3 x 300 mL de uma solução a 2% p/v), hidróxido de sódio aquoso (2 x 35 mL de uma solução a 2% p/v) e seca (Na_2SO_4). A remoção do solvente foi pressão reduzida originou um sólido, 0,97 g. O produto em bruto foi triturado com metanol quente (10 mL) e filtrado para originar o produto desejado, 0,5 g.

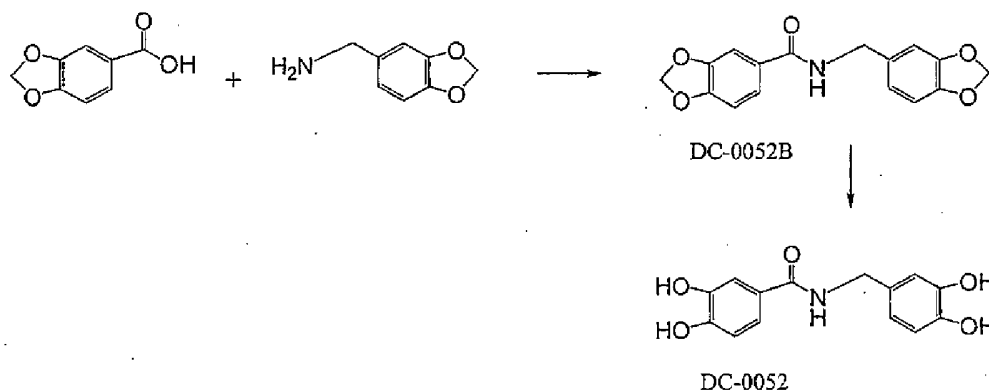
3,4-di(metoximetoxi)anilida do ácido 3,4-diidroxibenzoico

3,4-di(metoximetoxi)benzanilida do ácido 3,4-dibenziloxibenzoico (0,2 g, 0,4 mmol) foi combinada com etanol (10 mL), e paládio em carvão vegetal (40 mg de Pd/C a 10%). A reação foi aquecida até ao refluxo com agitação sob nitrogénio, e formato de amónio (0,8g, 12,7 mmol) foi adicionado porção a porção ao longo de 15 min e depois mantido ao refluxo durante duas horas. A solução de reação arrefecida foi filtrada para remover o catalisador e concentrada sob pressão reduzida para originar o produto em bruto, 0,13 g.

3,4-diidroxianilida do ácido 3,4-diidroxibenzoico (composto 51; DC-0051)

3,4-di(metoximetoxi)benzanilida do ácido 3,4-diidroxibenzoico (0,17 g, 0,49 mmol) foi combinada com uma solução a 25% de cloreto de hidrogénio em álcool de isopropilo (15 mL) e água (1 mL). A reação foi agitada à temperatura ambiente durante 1h e o solvente removido sob pressão reduzida. A trituração com éter de dietilo (5 mL) originou DC-0051 como um sólido que foi seco sob vácuo a 30°C, rendimento 60 mg.

Exemplo Comparativo 12: 3,4-diidroxibenzilamida do ácido 3,4-diidroxibenzoico (composto 52; DC-0052)



3,4-metilenodioxibenzilamida do ácido 3,4-metilenodioxibenzoico (composto 52B; DC-0052B)

Uma suspensão de ácido piperonílico (0,5 g) em cloreto de tionilo (15 mL) foi submetida ao refluxo durante 1 h sob nitrogénio, quando uma solução límpida se formou. Os solventes foram removidos *in vacuo* para dar o cloreto de ácido como um sólido branco. O sólido foi dissolvido em diclorometano seco (7 mL) e adicionado gota a gota a uma solução agitada de piperonilamina (0,45 g) em diclorometano seco (20 mL) contendo piridina (0,5 mL). A mistura foi submetida ao refluxo durante 30 minutos, diluída com mais diclorometano (50 mL), depois lavada com HCl aquoso (1M, 50 mL) seguida de NaOH (1M, 50 mL), seca e evaporada *in vacuo* para dar o produto em bruto. A cristalização a partir de metanol/água deu **DC-0052B** como um sólido branco (733 mg, 79%). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) 7,27 (2H, m), 6,79 (4H, m), 6,01 (2H, s), 5,94 (2H, s) e 4,51 (2H, d, J 5Hz).

3,4-diidroxibenzilamida do ácido 3,4-diidroxibenzoico (composto 52; DC-0052)

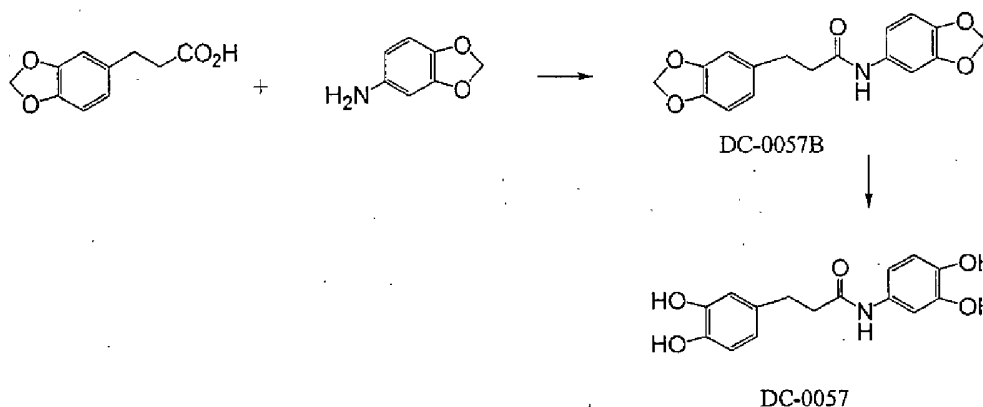
A uma solução agitada de **DC-0052B** (0,20 g) em CH₂Cl₂ seco (25 mL) sob nitrogénio, foi lentamente adicionado tribrometo de boro (0,4 mL) depois a agitação continuou durante 2 horas adicionais. Metanol (50 mL) foi adicionada cuidadosamente, depois o solvente evaporou *in vacuo* até um volume de 1 mL; isto foi depois repetido 2 vezes mais. O produto foi cristalizado a partir de etanol/diclorometano para dar **DC-0052** puro (65 mg, 35%) como um sólido branco.

¹H-RMN (CD₃OD) 7,29 (2H, s), 7,22 (2H, d, J 8Hz), 6,78 (4H, m), 6,67 (4H, m) e 4,38 (4H, d, J 5Hz).

M/z 274 ((M - H)⁺, 100%)

CLAR (Método 1) 10,4 minutos.

Exemplo Comparativo 13: 3,4-diidroxianilida do ácido 3-(3,4-diidroxifenil)propiónico (composto 57; DC-0057)



3,4-metilenodioxianilida do ácido 3-(3,4-metilenodioxifenil)propiónico (composto 57B; DC-0057B)

A uma solução de ácido 3,4-(metilenodioxi)diidrocinâmico (0,4 g) m CH₂Cl₂ seco (25 mL) sob nitrogénio, foi adicionado cloreto de oxalilo (0,5 mL) com três gotas de

DMF seco e a mistura foi agitada durante 1 hora. Os solventes foram removidos *in vacuo* dando o cloreto de ácido como um sólido amarelo. A uma solução do cloreto de ácido em CH₂Cl₂ seco (50 mL) sob nitrogénio, arrefecida até 0°C, foi adicionada gota a gota uma solução de 3,4-(metilenodioxo)anilina (0,35 g) e piridina (0,2 mL) em CH₂Cl₂ (5 mL). A mistura reacional foi agitada durante 30 minutos à temperatura ambiente, diluída com CH₂Cl₂ (100 mL), lavada com HCl aquoso (100 mL, 10%) e solução de bicarbonato de sódio (100 mL), depois seca e evaporada *in vacuo* para dar **DC-0057B** como um pó castanho-escuro (0,549g, 85%).

¹H-RMN (CDCl₃) 7,15 (1H, d, J 2Hz), 6,86 (1H, sl), 6,60 - 6,75 (5H, m), 5,93 (2H, s), 5,92 (2H, s), 2,95 (2H, t, J 4Hz) e 2,57 (2H, t, J 4Hz).

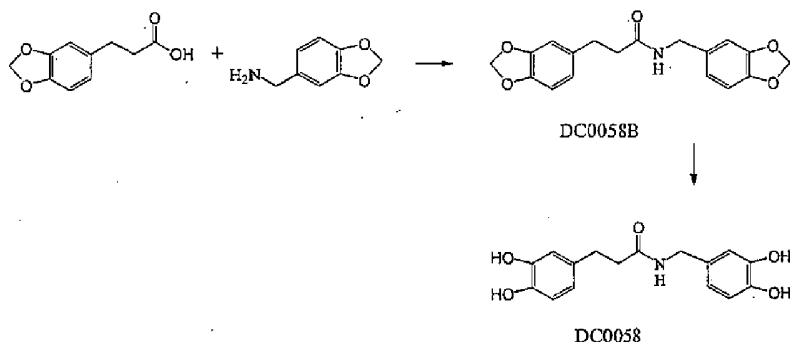
3,4-diidroxianilida do ácido 3-(3,4-diidroxifenil)propiónico (composto 57; DC-0057)

A uma solução agitada de **DC-0057B** (0,20 g) em CH₂Cl₂ seco (25 mL) sob nitrogénio, foi lentamente adicionado tribrometo de boro (0,4 mL), então a agitação continuou durante 2 horas adicionais. Metanol (50 mL) foi adicionado cuidadosamente, depois o solvente evaporou *in vacuo* até um volume de 1 mL, isto foi repetido 2 vezes mais para dar **DC-0057** puro como um sólido castanho (143 mg, 77%).

¹H-RMN ((CD₃)₂CO) 7,31 (1H, s), 6,98 (3H, m), 6,84 (1H, d, J 8Hz), 6,78 (1H, dd, J 2,8Hz), 3,24 (2H, m) e 3,16 (2H, m).
M/z 370, 368 (M+HBr)⁺, 288 ((M-H)⁺, 100%)

CLAR (Método 2) 20,6 minutos.

Exemplo Comparativo 14: 3,4-diidroxibenzilamida do ácido 3-(3,4-diidroxifenil)propiónico (composto 58; DC-0058)



3,4-metilenodioxibenzilamida do ácido 3-(3,4-metilenodioxifenil)propiónico (composto 58B; DC-0058B)

A uma solução de ácido 3,4-metilenodioxidiidrocinnâmico (0,4 g) em CH_2Cl_2 seco (25 mL) sob nitrogénio, foi adicionado cloreto de oxalilo (0,5 mL) com três gotas de DMF seco e a mistura foi agitada durante 1 hora. Os solventes foram removidos *in vacuo* dando o cloreto de ácido como um sólido amarelo. A uma solução do cloreto de ácido em CH_2Cl_2 seco (50 mL) sob nitrogénio, arrefecida até 0°C , foi adicionada gota a gota uma solução de 3,4-(metilenodioxi)benzilamina (0,35 g) e piridina (0,2 mL) em CH_2Cl_2 (5 mL). A mistura reacional foi agitada durante 30 minutos à temperatura ambiente, diluída com CH_2Cl_2 (100 mL), lavada com HCl aquosa (100 mL; 10%) e solução de bicarbonato de sódio (100 mL) depois seca e evaporada *in vacuo* para dar **DC-0058B** como um pós esbranquiçado (0,536g, 80%).

3,4-diidroxibenzilamida do ácido 3-(3,4-diidroxifenil)propiónico (composto 58; DC-0058)

A uma solução agitada de **DC-0058B** (0,20 g) em CH_2Cl_2 seco (25 mL) sob nitrogénio, foi lentamente adicionado

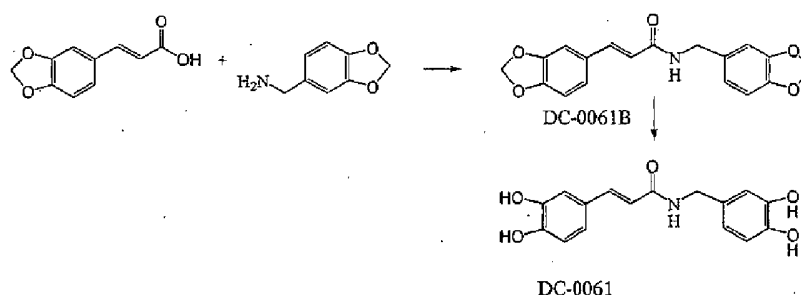
tribrometo de boro (0,4 mL), depois a agitação continuou durante 2 horas adicionais. Metanol (50 mL) foi adicionado cuidadosamente, depois o solvente evaporou *in vacuo* até um volume de 1 mL; isto foi repetido 2 vezes mais para dar **DC-0058** puro como sólido castanho (143 mg, 77%).

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

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

CLAR (Método 2) 19,4 minutos.

Exemplo Comparativo 15: 3,4-diidroxibenzilamida do ácido 3,4-diidroxicinâmico (composto 61; DC-0061)



3,4-metilenodioxibenzilamida do ácido 3,4-metilenodioxicinâmico (composto 61B; DC-0061B)

A uma solução de ácido 3,4-metilenodioxicinâmico (0,5 g, 2,6 mmol) em CH_2Cl_2 seco (25 mL) sob nitrogénio, foi adicionado cloreto de oxalilo (0,33 g, 2,6 mmol) com três gotas de DMF seco e a mistura foi agitada durante 1 hora. Os solventes foram removidos *in vacuo* dando o cloreto de ácido como um sólido amarelo. A uma solução do cloreto de ácido em CH_2Cl_2 seco (50 mL) sob nitrogénio, arrefecida até 0°C , foi adicionada gota a gota uma solução de 3,4-(metilenodioxi)benzilamina (0,393 g, 2,6 mmol) e piridina (0,205 g, 2,6 mmol em CH_2Cl_2 (5 mL)). A mistura reacional

foi agitada durante 30 minutos à temperatura ambiente, diluída com CH_2Cl_2 (100 mL), lavada com HCl aquoso (100 mL, 10%) e solução de bicarbonato de sódio (100 mL) depois seca e evaporada *in vacuo* para dar **DC-0061B** como um pó amarelo-turvo (0,523g, 62%).

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

M/z 326 ((M +1)⁺, 100%)

3,4-diidroxibenzilamida do ácido 3,4-diidroxicinâmico (composto 61; DC-0061)

A uma solução agitada de **DC-0061B** (0,3 g, 0,94 mmol) dissolvido em CH_2Cl_2 seco (25 mL) foi lentamente adicionado tribrometo de boro (1,16 g, 4,6 mmol), depois a agitação continuou durante 12 horas adicionais. HCl diluído (25 mL) foi cuidadosamente adicionado, depois 200 mL de água, e o produto foi extraído em acetato de etilo (2 x 100 mL), seco e evaporado *in vacuo* para dar o produto em bruto. A purificação por cromatografia em coluna eluindo com hexano/acetato de etilo (1:4) deu **DC-0061** como um sólido esbranquiçado (36 mg, 13%).

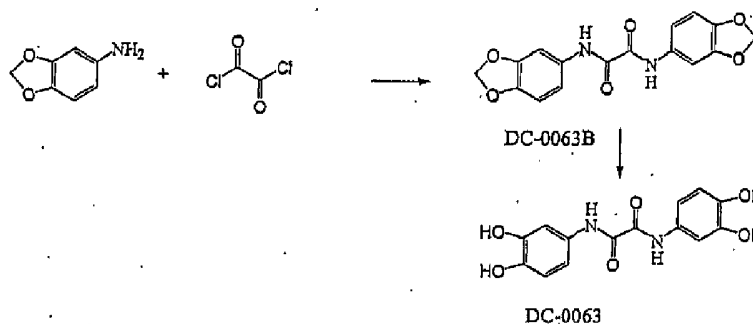
^1H -RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 7,54 (1H, d, J 16Hz), 7,12 (1H, d, J 2Hz), 6,96 (1H, dd, J 2, 8Hz), 6,85 - 6,94 (2H, m), 6,80 (1H, d, J 8Hz), 6,70 (1H, dd, J 2,8Hz), 6,58 (1H, d, J 16 Hz) e 4,41 (2H, s).

M/z 300 ((M -1)⁺, 100%)

CLAR (método 2) 30,0 minutos.

Exemplo Comparativo 16: Bis(3,4-diidroxianilida) do ácido oxálico (composto 63; DC-0063)

Método 1 - através de compostos protegidos por metilenodioxí



Bis(3,4-metilenodioxianilida) do ácido oxálico (composto 63B; DC-0063B)

A uma solução de cloreto de oxalilo (165 mg, 1,3 mmol) em CH_2Cl_2 seco (50 mL) sob nitrogénio, arrefecido até 0°C , foi adicionada gota a gota uma solução de 3,4-(metilenodioxí)anilina (400 mg, 2,92 mmol) e piridina (230 mg, 2,92 mmol)- dissolvida em CH_2Cl_2 seco (50 mL). A mistura reacional foi agitada durante 30 min adicionais à temperatura ambiente, depois lavada com HCl aquoso diluído (50 mL). A camada orgânica foi separada, seca e evaporada *in vacuo* para dar **DC-0063B** como um pó cinzento (0,351 g, 82%).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) 10,78 (2H, s), 7,53 (2H, d, J 2Hz), 7,39 (2H, dd, J 2,8Hz), 6,96 (2H, d, J 8Hz) e 6,06 (4H, s).

Bis(3,4-diidroxianilida) do ácido oxálico (composto 63: DC-0063)

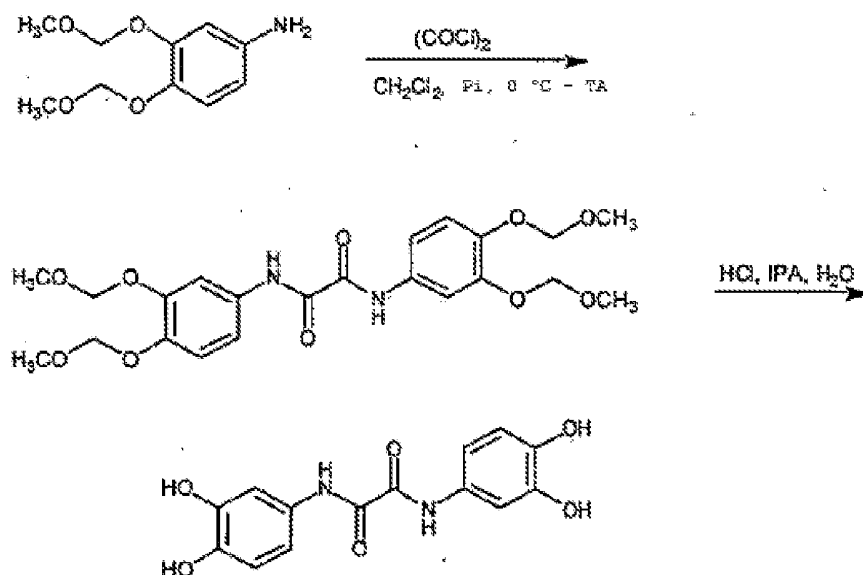
A uma solução agitada de **DC-0063B** (0,3 g, 0,91 mmol) dissolvido em CH_2Cl_2 seco (25 ml) foi lentamente adicionado tribrometo de boro (1,14 g, 4,7 mmol) depois a agitação continuou durante 4 horas adicionais. HCl diluído (25 mL) foi cuidadosamente adicionado, depois água (200 mL) e o produto extraído em acetato de etilo (2 x 200 mL), seco e evaporado *in vacuo* para dar o produto em bruto. O produto em bruto foi dissolvido em acetona (25 mL) e filtrado. A acetona foi evaporada *in vacuo* para dar **DC-0063** como um sólido esbranquiçado (171 mg, 62%).

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

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

CLAR (método 2) 29,1 minutos.

Método 2 - através de compostos protegidos por metoximetoxi:



Bis(3,4-di(metoximetoxi)anilida) do ácido oxálico

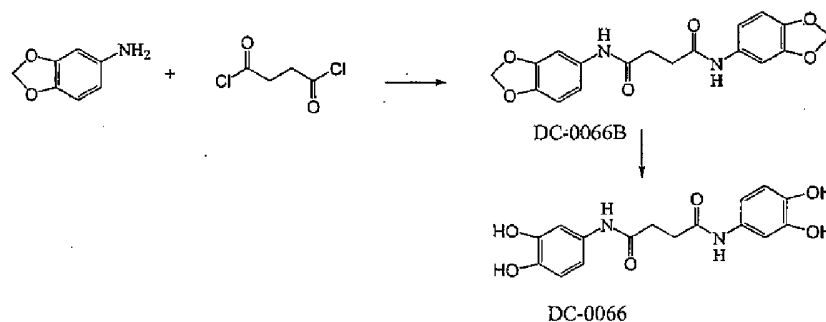
3,4-di(metoximetoxi)anilina (1,5 g, 7 mmol) foi dissolvida em diclorometano (50 mL) e arrefecida até 0°C, enquanto se agita sob nitrogénio. Piridina (3,75 mL, 46 mmol) foi adicionada seguida de adição gota a gota de cloreto de oxalilo (0,4 g, 3,5 mmol) em diclorometano (5 mL) ao longo de 20 minutos. A reação foi agitada durante 10 min adicionais e permitiu-se que aquecesse até à temperatura ambiente. A suspensão foi filtrada. O resíduo foi lavado com hexano (5 mL) para remover a piridina em excesso. O produto em bruto foi triturado com metanol (5 mL) e filtrado para originar a anilida protegida pura, 420 mg.

Bis(3,4-diidroxianilida) do ácido oxálico

Bis(3,4-di(metoximetoxi)anilida) do ácido oxálico (0,17 g, 0,36 mmol) foi combinada com uma solução a 25% de cloreto de hidrogénio em álcool de isopropilo (1,7 mL). A reação foi agitada à temperatura ambiente durante a noite, e o solvente foi removido sob pressão reduzida. A trituração com éter de dietilo (5 mL) originou **DC-0063**, 60 mgs.

Exemplo 17: Bis(3,4-diidroxianilida) do ácido succínico (composto 66; DC-0066)

Método 1 - através de compostos protegidos por metilenodioxí



Bis(3,4-metilenodioxianilida) do ácido succínico (composto 66B; DC-0066B)

A uma suspensão de ácido succínico (200 mg, 1,7 mmol) em CH_2Cl_2 seco (25 ml) sob nitrogénio foi adicionado cloreto de oxalilo (645 mg, 5,08 mmol) com três gotas de DMF seco, e a mistura foi agitada durante 1 hora. Os solventes foram removidos *in vacuo* dando o cloreto de ácido como um sólido amarelado. A uma solução agitada de 3,4-(metilenodioxí)anilina (582 mg, 4,25 mmol) e piridina (400 mg, 5,08 mmol) em CH_2Cl_2 seco (50 mL) sob nitrogénio a 0°C foi adicionada gota a gota uma solução do cloreto de ácido em CH_2Cl_2 seco (25 mL) e agitada durante 2 horas adicionais. Os solventes foram removidos *in vacuo* para dar o produto em bruto. O material em bruto foi ressuspenso em EtOAc (250 mL), depois lavado com HCl aquoso diluído (2 x 150 mL), bicarbonato de sódio saturado (2 x 150 mL) e água (1 x 150 mL). O EtOAc foi depois removido por evaporação rotativa. O produto foi colhido em papel de filtro e lavado

com água e permitiu-se que secasse para dar **DC-0066B** como um sólido branco (514 mg, 78%).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) 9,97 (2H, s), 7,34 (2H, d, J 2Hz), 6,99 (2H, dd, J 2,8Hz), 6,86 (2H, d, J 8Hz), 6,00 (4H, s) e 2,63 (4H, s).

Bis(3,4-diidroxianilida) do ácido succínico (composto 66; DC-0066)

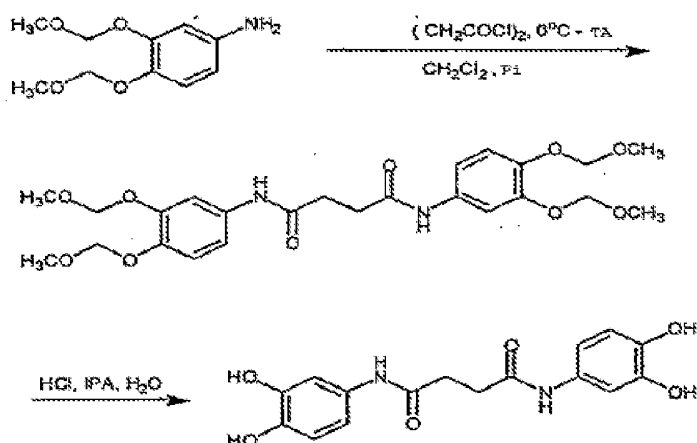
A uma solução agitada de **DC-0066B** (0,3 g, 0,78 mmol) em CH_2Cl_2 seco (25 mL) foi lentamente adicionado BBr_3 (0,978 g, 3,9 mmol) depois a agitação continuou durante 4 horas adicionais. HCl diluído (25 mL) foi cuidadosamente adicionado, depois 200 mL de água e o produto extraído em acetato de etilo (2 x 100 mL), seco e evaporado *in vacuo* para dar **DC-0066** como um sólido esbranquiçado (97 mg, 35%).

$^1\text{H-RMN}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 8,88 (2H, s la), 7,83 (2H, s la), 7,57 (2H, s la), 7,34 (2H, d, J 2Hz), 6,90 (2H, dd, J 2, 8Hz), 6,71 (2H, d, J 8Hz) e 2,65 (4H, s).

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

CLAR (método 2) 10,6 minutos.

Método 2 - através de compostos protegidos por metoximetoxi:



Bis(3,4-di(metoximetoxi)anilida) do ácido succínico

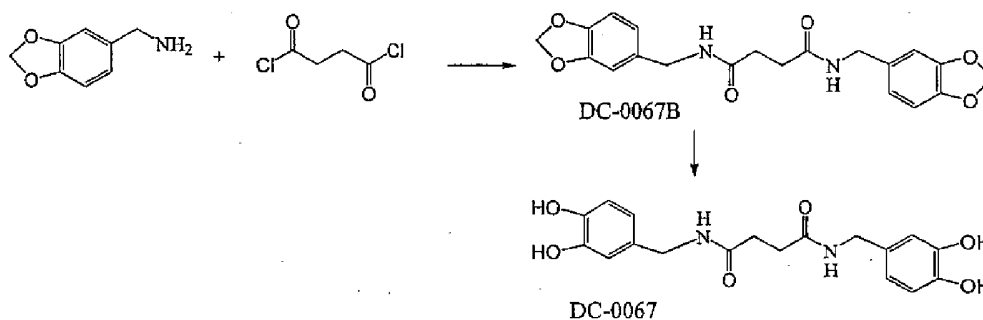
3,4-di(metoximetoxi)anilina (1 g, 4,7 mmol) foi dissolvida em diclorometano (25 mL) e arrefecida até 0°C, enquanto se agitava sob nitrogénio. Piridina (1 mL, 12 mmol) foi adicionada seguida pela adição gota a gota de cloreto de succinilo (0,35 g, 2,3 mmol) em diclorometano (10 mL) ao longo de 20 minutos. A reação foi agitada durante 2 horas adicionais e permitiu-se que aquecesse até à temperatura ambiente. A suspensão foi filtrada, e o sólido branco recolhido lavado com hexano (10 mL) e depois metanol (4 mL) para originar a anilida, 350 mg.

Bis(3,4-diidroxianilida) do ácido succínico (composto 66; DC-0066)

Bis(3,9-di(metoximetoxi)anilida) do ácido succínico (0,15 g, 0,3 mmol) foi combinada com uma solução a 25% de cloreto de hidrogénio em álcool de isopropilo (1,5 mL) e água (1,5 mL). A reação foi agitada à temperatura ambiente durante 3h e o solvente foi removido sob pressão reduzida. A trituração com éter de dietilo originou **DC-0066** como um sólido que foi seco sob vácuo a 30°C, rendimento 60 mg.

Exemplo 18: Bis(3,4-diidroxibenzilamida) do ácido succínico (composto 67; DC-0067)

Método 1 - através de compostos protegidos por metilenedioxi



**Bis(3,4-metilenodioxibenzilamida) do ácido succínico
(composto 67B; DC-0067B)**

A uma solução de ácido succínico (200 mg, 1,7 mmol) em CH_2Cl_2 seco (25 mL) sob nitrogénio, foi adicionado cloreto de oxalilo (645 mg, 5,1 mmol) com três gotas de DMF seco e a mistura foi agitada durante 1 hora. Os solventes foram removidos *in vacuo* dando o cloreto de ácido como um sólido amarelo. A uma solução do cloreto de ácido em CH_2Cl_2 seco (50 mL) sob nitrogénio, arrefecido até 0°C , foi adicionada gota a gota uma solução de 3,4-metilenodioxibenzilamina (634 mg, 4,2 mmol) e piridina (0,33 mL) em CH_2Cl_2 (50 mL). A mistura reacional foi agitada durante 2 horas à temperatura ambiente, depois os solventes removidos *in vacuo* para dar o produto em bruto. O material em bruto foi ressuspense em EtOAc (250 mL), depois lavado com HCl aquoso diluído (2 x 150 mL), bicarbonato de sódio saturado (2 x 150 mL) e água (1 x 150 mL). O EtOAc foi evaporado *in vacuo*. A recristalização a partir do etanol e água deu **DC-0067B** como cristais floculantes brancos (275 mg, 42%).

^1H -RMN (DMSO- d_6) 8,31 (2H, t, J 6Hz), 6,85 (4H, m), 6,74 (2H, dd, J 2, 8Hz), 6,01 (4H, s), 4,19 (4H, d, J 6Hz) e 2,42 (4H, s).

Bis(3,4-diidroxibenzilamida) do ácido succínico (composto 67; DC-0067)

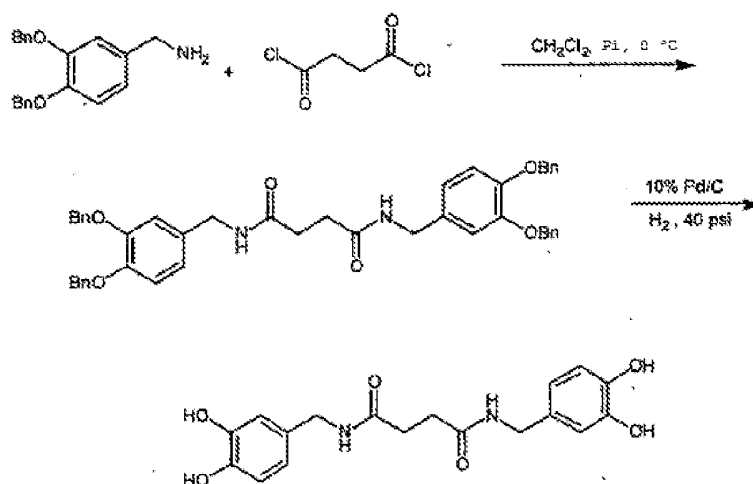
A uma solução agitada de **DC-0067B** (0,25 g, 0,65 mmol) dissolvido em CH₂Cl₂ seco (25 mL) foi lentamente adicionado tribrometo de boro (0,81 g, 0,31 mL), depois a agitação continuou durante 4 horas adicionais. HCl diluído (25 mL) foi cuidadosamente adicionado, depois salmoura (125 mL) e o produto extraído em acetato de etilo (2 x 100 mL), seco e evaporado *in vacuo* para dar **DC-0067** como um sólido esbranquiçado (180 mg, 77%).

¹H-RMN ((CD₃)₂CO) 7,90 (2H, s 1a), 7,74 (2H, s 1a), 7,42 (2H, s 1a), 6,79 (2H, d, *J* 2 Hz), 6,77 (2H, d, *J* 8 Hz), 6,62 (2H, dd, *J* 2, 8Hz), 4,22 (4H, d, *J* 7 Hz) e 2,53 (4H, s).

M/z 359 ((M - 1)⁺, 100%).

CLAR (método 2) 12,3 minutos.

Método 2 - através de compostos protegidos por benziloxi:



Bis(3,4-dibenziloxibenzilamida) do ácido succínico

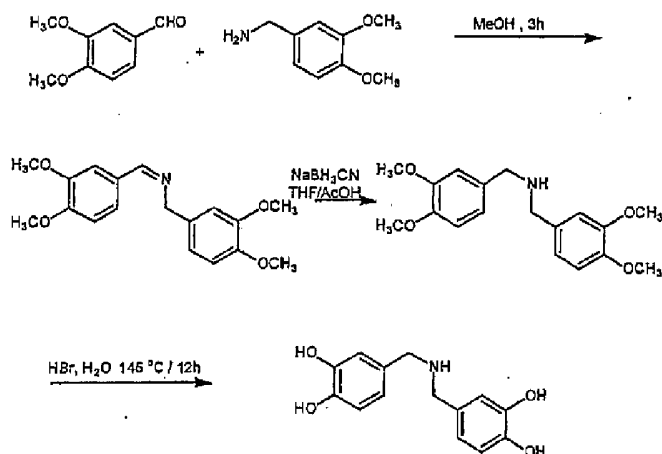
3,4-dibenziloxibenzilamina (1,1 g, 3,45 mmol) foi dissolvida em piridina anidra (8 mL) e arrefecida até 0°C

com agitação sob nitrogénio. A esta solução, cloreto de succinilo (0,23 g, 1,42 mmol) foi adicionado gota a gota ao longo de 30 minutos como uma solução em diclorometano (50 mL), enquanto se mantém a mistura reacional a 0°C. Permitiu-se que a reação aquecesse até à temperatura ambiente e agitada durante 45 minutos adicionais. A reação foi vertida em gelo moído (70 g) e a camada de diclorometano foi separada. O extrato orgânico foi lavado com ácido clorídrico aquoso diluído (2 x 20 mL da solução a 0,1M), água (20 mL), e seco (Na₂SO₄). A remoção do solvente a pressão reduzida originou um sólido em bruto, que foi triturado com metanol (5 mL) para originar após filtração a diamida protegida, rendimento 300 mg.

Bis(3,4-diidroxibenzilamida) do ácido succínico (composto 67; DC-0067)

Bis(3,4-dibenziloxibenzilamida) do ácido succínico (300 mg, 0,42 mmol) foi dissolvida em THF (50 mL) numa garrafa de pressão e aquecida até 35 C para assegurar dissolução do sólido. Paládio em carbono (50 mg Pd/C a 10%) foi adicionado, e o vaso foi pressurizado com hidrogênio (até 3 atm). A reação foi agitada durante 1 hora à temperatura ambiente, após o que a TLC revelou que a reação tinha chegado à completação. O catalisador foi removido por filtração, e o solvente removido sob pressão reduzida para originar **DC-0067** como um sólido em bruto (20 mg). Este material foi recristalizado a partir de tolueno e metanol para originar **DC-0067**.

**Exemplo Comparativo 19: Bis(3,4-diidroxibenzil)amina
(composto 73; DC-0073)**



Bis(3,4-dimetoxibenzil)amina

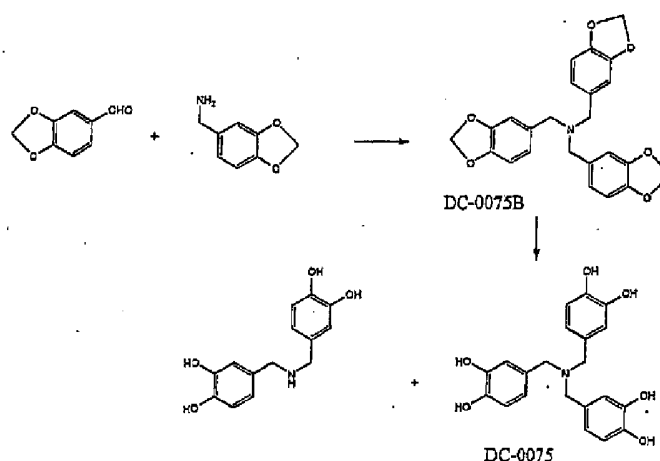
A uma solução de 3,4-dimetoxibenzaldeído (1 g, 6 mmol) em metanol anidro (10 mL) foi adicionada 3,4-dimetoxibenzilamina (1 g, 5,9 mmol) e a solução agitada sob nitrogénio à temperatura ambiente durante 3 horas. O metanol foi removido sob pressão reduzida para originar a imina em bruto, 1,9 g. A imina foi dissolvida em THF (10 mL) e ácido acético (4 mL), e cianoboroidreto de sódio (0,38 g, 6 mmol) foi adicionado porção a porção ao longo de 30 minutos. A solução foi agitada durante 30 minutos adicionais à temperatura ambiente, e os solventes foram removidos sob pressão reduzida. O resíduo foi neutralizado com hidrogenocarbonato de sódio aquoso saturado, e o produto em bruto sólido foi isolado por filtração, e seco sob vácuo a 50°C durante a noite, rendimento 0,6 g.

Bis(3,4-diidroxibenzil)amina (composto 73; DC-0073)

A bis(3,4-dimetoxibenzil)amina em bruto (0,6 g) foi combinada com ácido bromídrico (6 mL de solução a 48% p/p

em água) e lentamente aquecida com agitação até 145°C ao longo de 1 h. A reação foi mantida a 145°C durante 12 h, permitiu-se que arrefecesse até à temperatura ambiente, e vertida em água (25 mL). A mistura reacional foi neutralizada com hidrogenocarbonato de sódio aquoso saturado, e extraída com acetato de etilo (25 mL). A camada orgânica foi lavada em água (2 x 25 mL), seca (Na₂SO₄) e o solvente removido sob pressão reduzida para originar **DC-0073** como um sólido, 160 mg.

Exemplo Comparativo 20: Tris(3,4-diidroxibenzil)amina (composto 75; DC-0075)



Tris(3,4-metilenodioxibenzil)amina (composto 75B; DC-0075B)

A uma solução agitada de piperonal (0,9 g, 6 mmol) e acetato de amónio (0,15 g, 2 mmol) em acetonitrilo (25 mL) foi adicionado cianoboroidreto de sódio (0,44 g, 7 mmol) e a mistura foi agitada durante 4 dias. O solvente foi removido *in vacuo*, depois o resíduo dissolvido em diclorometano (100 mL) e lavado com bicarbonato de sódio sat, seco e o solvente removido *in vacuo* para dar uma goma castanha. A purificação por cromatografia em coluna sobre

sílica gel eluindo com diclorometano a 50% em hexano deu o **DC-0075B** puro como uma goma castanha-pálida (135 mg, 5%).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) 6,91 (3H, m), 6,73 - 6,80 (6H, m), 5,94 (6H, s) e 3,42 (2H, m)

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

Tris(3,4-diidroxibenzil)amina (composto 75; DC-0075)

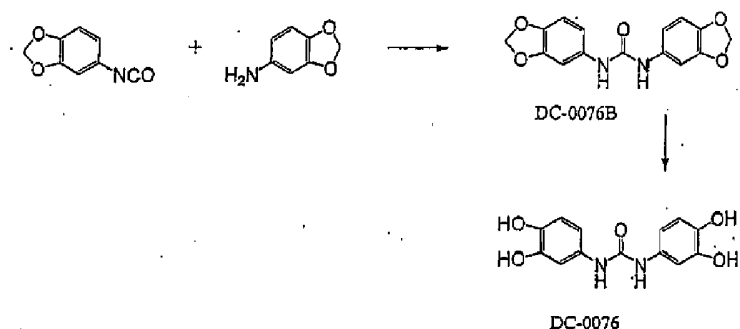
A uma solução agitada de **DC-0075B** (135 mg) em CH_2Cl_2 seco (20 mL) sob nitrogénio, foi lentamente adicionado tribrometo de boro (0,2 mL) depois a agitação continuou durante 2 horas adicionais. Metanol (50 mL) foi adicionado cuidadosamente, depois o solvente evaporou *in vacuo* até um volume de 1 mL, esta adição e evaporação foi repetida duas vezes mais. A purificação por cromatografia em coluna sobre sílica gel eluindo com metanol a 20% em clorofórmio deu **DC-0075** maioritariamente puro (72 mg, 58%) como uma goma castanha-pálida. A CLAR preparativa deu depois o **DC-0075** puro como uma goma branca (26 mg, 21%).

$^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD) 6,82 - 6,86 (2H, m), 6,74 (1H, dd, J 2,8Hz) e 4,07 (2H, s).

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

CLAR (método 2) 12,3 minutos.

Exemplo Comparativo 21: 1,3-Bis(3,4-diidroxifenil)ureia (composto 76; DC-0076)



1,3-Bis(3,4-metilenodioxifenil)ureia (composto 67B; DC-0076B)

Uma solução de 3,4-metilenodioxianilina (0,35 g) e isocianato de 3,4-metilenodioxifenilo (0,4 g) em benzeno (25 mL) foi submetida ao refluxo durante 1 hora. O precipitado formado foi filtrado, lavado com benzeno depois seco para dar **DC-0076B** puro (0,697 g, 95%) como um sólido castanho-pálido. $^1\text{H-RMN}$ ($\text{CDCl}_3/(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 7,35 (2H, sl), 6,93 (2H, s), 6,45 (4H, s) e 5,67 (4H, s).

1,3-Bis(3,4-diidroxifenil)ureia (composto 76; DC-0076)

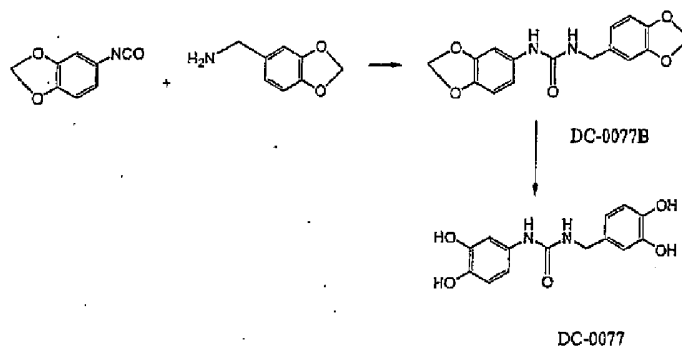
A uma solução agitada de **DC-0076B** (150 mg) em CH_2Cl_2 seco (20 mL) sob nitrogénio, foi lentamente adicionado tribrometo de boro (0,2 mL), depois a agitação continuou durante 2 horas adicionais. Metanol (50 mL) foi adicionado cuidadosamente, depois o solvente evaporou *in vacuo* até um volume de 1 mL, e esta adição e evaporação foi repetida duas vezes mais. A purificação por cromatografia em coluna sobre sílica gel eluindo com metanol a 20% em clorofórmio deu **DC-0076** puro (113 mg, 82%) como um sólido castanho-pálido.

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

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

CLAR (Método 2) 5,8 min.

Exemplo Comparativo 22: 1-(3,4-diidroxifenil)-3-(3,4-diidroxibenzil)ureia (DC-0077)



1-(3,4-metilenodioxifenil)-3-(3,4-metilenodioxibenzil)ureia (DC-0077B)

Uma solução de 3,4-metilenodioxibenzilamina (0,37 g) e isocianato de 3,4-metilenodioxifenilo (0,4 g) em benzeno (25 mL) foi submetida ao refluxo durante 1 hora. O precipitado formado foi filtrado, lavado com benzeno, depois seco para dar **DC-0077B** puro (0,78 g, 98%) como um sólido castanho-pálido.

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

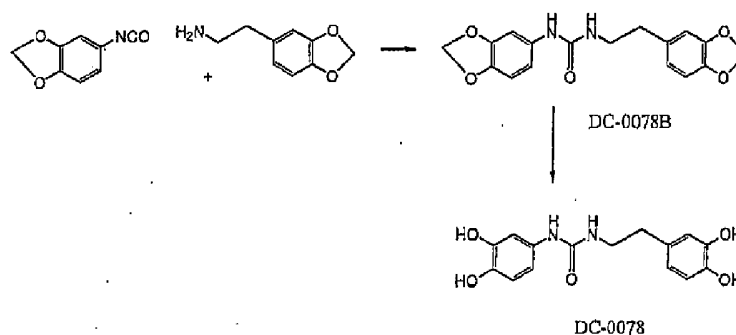
M/z 315 ($(\text{M}+1)^+$, 100%).

1-(3,4-diidroxifenil)-3-(3,4-diidroxibenzil)ureia (DC-0077)

A uma solução agitada de **DC-0077B** (200 mg) em CH_2Cl_2 seco (50 mL) sob nitrogênio, foi lentamente adicionado tribrometo de boro (0,4 mL), depois a agitação continuou durante 3 horas adicionais. Metanol (50 mL) foi adicionado cuidadosamente, depois o solvente evaporou *in vacuo* até um volume de 1 mL, isto foi repetido 2 vezes mais. A

purificação por cromatografia em coluna sobre sílica gel eluindo com metanol a 20% em clorofórmio deu uma fração contendo produto em bruto. A CLAR preparativa deu **DC-0077** puro (19 mg, 11%) como um sólido castanho-pálido. ^1H RMN (D_2O) 6,55 - 6,80 (6H, m) e 4,12 (2H, s). M/z 290 ($(\text{M})^+$, 100%). CLAR (método 2) 12,7 min.

Exemplo Comparativo 23: 1-(3,4-Diidroxifenil)-3-(3,4-diidroxifenetil)ureia (composto 78; DC-0078)



1-(3,4-metilenodioxifenil)-3-(3,4-metilenodioxifenetil)ureia (composto 78B; DC-0078B)

Uma solução de 3,4-metilenodioxifeniletilamina (0,25 g, 1,5 mmol) e isocianato de 3,4-metilenodioxifenilo (0,25 g, 1,5 mmol) em benzeno (25 mL) foi submetida ao refluxo durante 1 hora. O precipitado formado foi filtrado, lavado com benzeno, depois seco para dar **DC-0078B** puro (0,43 g, 98%) como um sólido castanho-pálido. ^1H -RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 7,83 (1H, sl), 7,31 (1H, d, J 2Hz), 6,72 - 6,82 (5H, m), 5,99 (2H, s), 5,95 (2H, s), 5,68 (1H, tl, J 7Hz), 3,44 (2H, q, J 7Hz), e 2,74 (2H, t, J 7Hz). M/z 327 ($(\text{M}-1)^+$, 100%).

**1-(3,4-diidroxifenil)-3-(3,4-diidroxifenetil)ureia
(composto 78: DC-0078)**

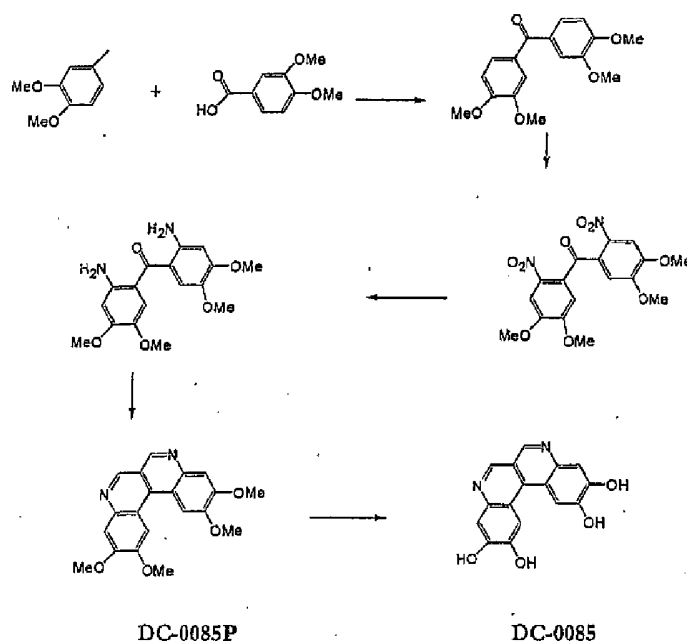
A uma solução agitada de **DC-0078B** (105 mg em CH₂Cl₂ seco (20 mL) sob nitrogénio, foi lentamente adicionado tribrometo de boro (0,2 mL), depois a agitação continuou durante 3 horas adicionais. Metanol (50 mL) foi adicionado cuidadosamente, depois o solvente evaporou *in vacuo* até um volume de 1 mL; esta adição e evaporação foi repetida duas vezes mais. A purificação por cromatografia em coluna sobre sílica gel eluindo com metanol a 20% em clorofórmio deu DC-0078 puro (78 mg, 80%) como um sólido castanho-pálido.

¹H-RMN ((CD₃)₂CO) 6,97 (2H, m), 6,86 - 6,89 (3H, m), 6,68 (1H, dd, J 2, 8Hz), 3,66 (2H, t, J 7Hz), e 2,87 (2H, t, J 7Hz).

M/z 303 ((M - 1)⁺, 100%).

CLAR (método 2) 33,7 min.

Exemplo Comparativo 24: Dibenzo[c,f][2,7]naftiridina-2,3,10,11-tetraol (composto 85; DC-0085).



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

A **DC-0085P** foi preparada como descrito por Upton *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**(5):475-482, 1998. O veratrol foi feito reagir com ácido verátrico para dar a benzofenona protegida, que foi nitrada para dar o composto de dinitro, e isto foi reduzido até à diamina por tratamento com estanho em ácido clorídrico e ácido acético. A diamina foi isolada, e depois condensada com bis(acetal de dimetilo) de malonaldeído para dar **DC-0085P**.

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

A uma solução agitada de **DC-0085P** (100 mg) em CH₂Cl₂ seco (20 mL) sob nitrogénio, foi lentamente adicionado tribrometo de boro (0,2 mL), depois a agitação continuou durante 2 horas adicionais. Metanol (50 mL) foi adicionado cuidadosamente, depois o solvente evaporou *in vacuo* até um volume de 1 mL, e esta adição e evaporação foi repetida duas vezes mais. A purificação por cristalização a partir de metanol/clorofórmio deu **DC-0085** puro (36 mg, 38%) como um sólido cristalino laranja.

¹H-RMN (CD₃OD) 9,63 (2H, s), 8,63 (2H, s) e 7,64 (2H, s).

M/z 296 ((M+2)⁺, 100%)

CLAR (método 1) 24,3 min.

Exemplo 25: Os compostos desta invenção são disruptores potentes das fibrilas 1-42 da A β do Alzheimer

Descobriu-se que os compostos e compostos comparativos preparados nos Exemplos precedentes eram maioritariamente disruptores/inibidores potentes das fibrilas da proteína β -

amiloide (A β) da doença de Alzheimer. Num conjunto de estudos, a eficácia dos compostos em causar uma desmontagem/disrupção das fibrilas de amiloide pré-formadas da doença de Alzheimer (i.e. consistindo em fibrilas 1-12 da A β) foi analisada.

Parte A - Dados de fluorometria da Tioflavina T

Num estudo, foi usada fluorometria da Tioflavina T para determinar o efeito dos compostos, e do EDTA (como um controlo negativo). Neste ensaio, a Tioflavina T liga-se especificamente à amiloide fibrilar, e esta ligação produz uma intensificação da fluorescência a 485 nm que é diretamente proporcional à quantidade de fibrilas de amiloide 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).

Neste estudo, 25 μ M das 1-42 da A β pré-fibrilizadas (Bachem Inc) foram incubados a 37°C durante 3 dias ou sozinhos, ou na presença de um dos compostos ou EDTA (às razões de peso de A β :composto de teste 1:1, 1:0,1, 1:0,01 ou 1:0,001). Após 3 dias de coincubação, 50 μ L de cada mistura de incubação foram transferidos para uma placa de microtitulação com 96 poços contendo 150 μ L de água destilada e 50 μ L de uma solução de Tioflavina T (i.e. Tioflavina T a 500 mM em tampão de fosfato a 250 mM, pH 6,8). A fluorescência foi lida a 485 nm (comprimento de onda de excitação 444 nm) usando um fluorómetro de placa de ELISA após subtração com tampão sozinho ou composto sozinho, como branco.

Os resultados das incubações de 3 dias são apresentados em baixo. Por exemplo, ao passo que o EDTA não causou inibição

significativa das fibrilas 1-42 da A β pré-formadas a todas as concentrações testadas, todos os compostos causaram uma disrupção/desmontagem dependente da dose das fibrilas 1-42 da A β pré-formadas até certo ponto. Os compostos mais eficazes a perturbarem as fibrilas de 1-42 da A β pré-formadas pareceram ser os compostos # 3, 4, 21, 51, 73 e 78. Por exemplo, o composto #4 causou uma inibição significativa de $97,4 \pm 0,40\%$ ($p < 0,01$) quando usado a uma razão p/p de A β :composto de teste de 1:0,1, e uma disrupção de $69,4 \pm 1,17\%$ quando usado a uma razão p/p de A β :composto de 1;0,01. Sob as mesmas condições (i.e. razão p/p de A β :composto de teste de 1:0,1), o composto #3 causou uma disrupção de $57,8 \pm 6,36\%$, o composto #21 causou uma disrupção de $81,0 \pm 1,31\%$, o composto #51 causou disrupção de $94,9 \pm 0,24\%$, o composto #73 causou uma disrupção de $70,9 \pm 3,04\%$, e o composto #78 causou uma disrupção de $89,7 \pm 1,8\%$. Este estudo indicou que os compostos desta invenção são disruptores/inibidores potentes das fibrilas do tipo A β da doença de Alzheimer, e exercem usualmente os seus efeitos de um modo dependente da dose.

Tabela 1: Dados da fluorometria da Tioflavina T - disrupção das fibrilas 1-42 da A β do Alzheimer

% Inibição da A β (resultado \pm D.P.) à razão p/p de A β :composto de teste dada				
Composto de Teste #	1:1	1:0,1	1:0,01	1:0,001
EDTA (controlo)	$11,3 \pm 9,67$	$0,0 \pm 7,12$	$0,0 \pm 4,88$	$0,0 \pm 3,01$
1*	$97,3 \pm 0,23$	$64,8 \pm 1,98$	$19,2 \pm 4,31$	$0,0 \pm 3,07$
3*	$99,5 \pm 0,10$	$57,8 \pm 6,36$	$53,1 \pm 1,67$	$5,5 \pm 1,99$
4*	$98,5 \pm 0,77$	$97,4 \pm 0,40$	$69,4 \pm 1,17$	$26,8 \pm 4,80$

% Inibição da Aβ (resultado\pmD.P.) à razão p/p de Aβ:composto de teste dada				
Composto de Teste #	1:1	1:0,1	1:0,01	1:0,001
8*	70,8 \pm 2,57	65,5 \pm 0,17	24,7 \pm 3,51	4,9 \pm 2,27
9*	95,1 \pm 0,13	34,9 \pm 1,69	20 \pm 10,75	10,6 \pm 0,93
12*	99,7 \pm 0,17	82,0 \pm 1,13	10,8 \pm 21,9	0,0 \pm 34,9
19*	99,1 \pm 0,56	91,1 \pm 0,66	46,2 \pm 2,98	10,8 \pm 1,38
21*	98,6 \pm 0,54	81,0 \pm 1,31	48,2 \pm 8,29	8,9 \pm 2,13
23*	46,7 \pm 4,62	26,2 \pm 4,37	16,5 \pm 4,02	0,0 \pm 3,72
26*	37,8 \pm 5,50	11,7 \pm 3,67	0,0 \pm 2,19	0,0 \pm 3,24
51*	99,4 \pm 0,05	94,9 \pm 0,24	55,3 \pm 5,23	29,0 \pm 25,2
52*	93,7 \pm 0,41	53,6 \pm 2,42	12,1 \pm 0,78	0,0 \pm 6,67
57*	88,4 \pm 2,73	60,2 \pm 3,12	19,0 \pm 6,33	17,7 \pm 7,43
58*	94,8 \pm 1,67	76,0 \pm 2,57	33,2 \pm 5,16	20,5 \pm 6,27
61*	100,0 \pm 0,41	80,1 \pm 4,76	16,9 \pm 1,39	26,0 \pm 7,51
63*	85,3 \pm 0,91	23,6 \pm 25,75	57,5 \pm 10,64	1,6 \pm 9,47
66	100,0 \pm 0,68	78,3 \pm 4,17	42,0 \pm 2,36	27,1 \pm 3,51
67	98,3 \pm 2,19	50,9 \pm 8,32	34,0 \pm 14,07	13,7 \pm 6,05
73*	99,4 \pm 0,42	70,9 \pm 3,04	28,7 \pm 10,27	0,0 \pm 29,43
75*	99,0 \pm 0,63	84,4 \pm 0,94	31,6 \pm 4,74	17,0 \pm 4,20
76*	99,3 \pm 1,35	86,5 \pm 1,18	40,9 \pm 3,76	12,2 \pm 5,98
78*	100 \pm 0,78	89,7 \pm 1,18	57,8 \pm 4,63	22,4 \pm 5,63

***= composto comparativo**

Parte B: Dados de SDS-PAGE/Transferência de Western

A disrupção das 1-42 da A β , mesmo na sua forma monomérica, foi confirmada por um estudo envolvendo o uso de métodos de SDS-PAGE e transferência de Western (não mostrados). Neste último estudo, amostras em triplicado das 1-42 da A β pré-fibrilizadas (25 μ M) foram incubadas a 37°C durante 3 dias, sozinhas ou na presença dos compostos ou EDTA. Cinco microgramas de cada amostra foram depois filtrados através de um filtro de 0,2 μ m. A proteína recuperada do filtrado foi depois carregada, e lida num SDS-PAGE de Tris-Tricina a 10-20%, transferida para nitrocelulose e detetada usando um anticorpo de A β (clone 6E10; Senetek). Neste estudo, as 1-42 da A β foram detetadas como uma banda com ~4 quilodalton (i.e. A β monomérica) após incubação somente, ou na presença de EDTA, aos 3 dias. Por exemplo, não foram detetados monómeros das 1-42 da A β após incubação das 1-42 da A β com os compostos 4, 19, 21, 51, 58, 66, 75, 76 e 78 sugerindo que estes compostos foram capazes de causar um desaparecimento das 1-42 da A β monomérica. Este estudo confirmou que estes compostos são também capazes de causar uma disrupção/remoção das 1-42 da A β monomérica.

Parte C: Dados da ligação do vermelho do Congo

No ensaio de ligação do vermelho do Congo, a capacidade de um composto de teste em alterar a ligação da amiloide (neste caso, A β) ao vermelho do Congo é quantificada. Neste ensaio, as 1-42 da A β e os compostos de teste foram incubados durante 3 dias e depois filtrados em vácuo através de um filtro de 0,2 μ m. A quantidade das 1-42 da A β retida no filtro foi depois quantificada após coloração do filtro com vermelho do Congo. Após lavagem apropriada do filtro, qualquer abaixamento da cor do vermelho do Congo no

filtro na presença do composto de teste (comparada com a coloração do vermelho do Congo da proteína amiloide na ausência do composto de teste) era indicativa da capacidade do composto de teste em diminuir/alterar a quantidade de A β agregada e congofílica.

Num estudo, a capacidade das fibrilas de A β em se ligarem ao vermelho do Congo na ausência ou presença de quantidades crescentes dos compostos ou EDTA (às razões de peso de A β :composto de teste de 1:1, 1:0,1, 1:0,01 ou 1:0,001) foi determinada. Os resultados das incubações de 3 dias são apresentados na Tabela 2 em baixo. Ao passo que o EDTA não causou inibição significativa da ligação das fibrilas 1-42 da A β ao vermelho do Congo a todas as concentrações testadas, os compostos causaram uma inibição dependente da dose da ligação da A β ao vermelho do Congo. Por exemplo, o composto #4 causou uma inibição significativa de 73,0 \pm 0,90% (p<0,01) da ligação do vermelho do Congo às fibrilas 1-42 da A β quando usado a uma razão p/p de A β :composto de teste de 1:1, e uma inibição significativa de 46,8 \pm 1,28% (p<0,01) da inibição do vermelho do Congo quando usado a uma razão p/p de A β :composto de teste de 1:0,1, e uma inibição significativa de 16,4 \pm 2,02% (p<0,01) da inibição do vermelho do Congo quando usado a uma razão p/p de A β :composto de teste de 1:0,01. Noutro exemplo, o composto análogo sintético #3 causou uma inibição significativa de 91,6 \pm 5,19% (p<0,01) da ligação do vermelho do Congo às fibrilas 1-42 da A β quando usado a uma razão p/p de A β :composto de teste de 1:1, e uma inibição significativa de 35,7 \pm 3,29% (p<0,01) da inibição do vermelho do Congo quando usado a uma razão p/p de A β :composto de teste de 1:0,01. Este estudo também indicou que os compostos desta invenção são inibidores potentes da ligação das fibrilas da A β ao vermelho do Congo, e exercem usualmente os seus efeitos de um modo dependente da dose.

Tabela 2: Dados da ligação do vermelho do Congo

% Inibição da A β (resultado \pm D.P.) à razão p/p de A β :composto de teste dada				
Composto de Teste #	1:1	1:0,1	1:0,01	1:0,001
EDTA (controle)	1,1 \pm 7,02	3,6 \pm 8,68	0,0 \pm 3,91	7,91 \pm 3,61
1*	42,4 \pm 1,58	8,0 \pm 1,80	3,9 \pm 0,66	0,0 \pm 3,54
3*	91,6 \pm 5,19	35,7 \pm 3,29	7,4 \pm 1,51	1,7 \pm 4,21
4*	73,0 \pm 0,90	46,8 \pm 1,28	16,4 \pm 2,02	2,3 \pm 1,80
8*	17,7 \pm 1,86	9,7 \pm 0,69	1,1 \pm 0,96	0,0 \pm 3,55
9*	46,8 \pm 1,50	10,9 \pm 2,18	0,0 \pm 2,15	3,1 \pm 3,66
12*	63,0 \pm 1,63	20,8 \pm 2,22	17,9 \pm 7,33	4,1 \pm 6,60
19*	48,1 \pm 2,00	22,4 \pm 2,19	7,4 \pm 2,20	0,0 \pm 1,01
21*	66,2 \pm 1,26	33,9 \pm 1,02	9,3 \pm 5,68	3,6 \pm 0,58
23*	10,7 \pm 2,84	2,9 \pm 0,43	0,0 \pm 0,72	12,3 \pm 6,57
26*	4,5 \pm 2,03	0,0 \pm 1,35	6,1 \pm 4,26	0,0 \pm 2,64
51*	78,6 \pm 1,49	46,7 \pm 1,29	20,5 \pm 11,48	6,0 \pm 11,47
52*	35,4 \pm 1,28	12,7 \pm 2,35	0,0 \pm 1,29	0,0 \pm 3,68
57*	44,8 \pm 0,77	14,2 \pm 1,56	0,1 \pm 2,09	0,0 \pm 4,73
58*	52,2 \pm 2,65	21,1 \pm 3,67	6,6 \pm 3,49	2,5 \pm 4,22
61*	48,9 \pm 4,69	24,6 \pm 10,85	2,0 \pm 2,89	0,0 \pm 4,06
63*	32,5 \pm 5,66	8,5 \pm 8,01	20,1 \pm 10,35	0,0 \pm 1,93
66	55,9 \pm 6,83	27,7 \pm 11,26	7,7 \pm 0,19	0,6 \pm 6,61
67	31,5 \pm 11,25	13,8 \pm 11,25	8,2 \pm 7,08	0,0 \pm 4,98
73*	53,4 \pm 1,84	22,6 \pm 3,51	0,6 \pm 5,04	0,0 \pm 15,17

% Inibição da Aβ (resultado\pmD.P.) à razão p/p de Aβ:composto de teste dada				
Composto de Teste #	1:1	1:0,1	1:0,01	1:0,001
75*	59,2 \pm 3,23	12,8 \pm 0,59	6,8 \pm 2,55	2,4 \pm 2,95
76*	66,6 \pm 0,68	27,8, \pm 7,71	4,1 \pm 2,23	0,3 \pm 5,1
78*	71,1 \pm 1,09	39,9 \pm 3,94	15,4 \pm 1,39	3,5 \pm 1,33

***= composto comparativo**

Parte D - Dados de espectroscopia de dicroísmo circular

A espectroscopia de dicroísmo circular (DC) é um método que pode ser usado para determinar os efeitos de compostos de teste na disrupção da conformação da estrutura secundária de fibrilas de amiloide. Num estudo, como descrito neste exemplo, foi usada espectroscopia de dicroísmo circular para determinar os efeitos de diferentes compostos da invenção na conformação em folha β das fibrilas 1-42 da A β . Para este estudo, as 1-42 da A β (Bachem Inc., Torrance, CA) foram primeiramente dissolvidas numa solução de NaOH a 2 mM, mantendo o pH destas soluções acima de 10. Péptidos de 1-42 da A β (a 25 μ M), na ausência ou presença de compostos de teste, foram constituídos em NaF a 150 mM, tampão fosfato a 50 mM, pH 7,4 com trifluoroetanol a 10%. As 1-42 da A β foram depois incubadas a 37°C na ausência ou presença de diferentes compostos a razões p/p de A β :composto de teste de 1:0,1, 1:1 e 1:10. Após 3 dias de incubação, foram registados espectros de DC num espetropolarímetro Jasco 810 (Easton, MD). Todos os espectros de DC foram recolhidos com células de quartzo de 0,05 cm. Os vestígios de comprimento de onda foram rastreados de 190-260 nm a aumentos de 0,5 nm com largura de banda de 5 nm, a uma velocidade de rastreio

de 10 nm/minuto, um tempo de resposta de 32 segundos, e um campo de dados de 0,5 nm. O sistema inteiro foi equilibrado e continuamente purgado com nitrogénio a 10 mL/minuto. Para o processamento de dados, a média de 5 replicados de espectros de "composto de teste" foi subtraída da média de 5 replicados de espectros de "1-42 de A β + composto de teste" para determinar os efeitos de cada composto de teste na disrupção das fibrilas 1-42 da A β . A elipticidade em graus foi convertida para ERM ([Q]; elipticidade residual molar) usando a fórmula $[Q] = 100 \cdot Q \cdot \text{PMR} / d \cdot c$; onde Q é a elipticidade em graus; PMR é o peso molecular residual médio (~107 daltons para 1-42 da A β); d é o caminho ótico em cm (i.e. 0,05 cm); e c é a concentração em mg/mL (i.e. 0,1 mg/mL).

A Figura 1 mostra alguns dos espectros de DC gerados neste estudo. As 1-42 da A β sozinhas em tampão TFE PBS a 10% demonstraram usualmente os espectros de DC típicos de uma proteína amiloide com estrutura em folha β significativa, como demonstrado pelo mínimo observado a 218 nm. No entanto, na presença de compostos de teste (tais como os compostos #4, 12, 51 e 61 mostrados na Figura 1), foi evidente uma disrupção marcada da estrutura em folha β nas fibrilas 1-42 da A β (com um aumento significativo em espiral aleatória ou hélice α) como mostrado pelo achatamento do mínimo observado a 218 nm (compare com 1-42 da A β sozinhas). Isto foi usualmente observado aos 3 dias (como visto na Figura 1) e aos 7 dias (não mostrado) após coincubação das fibrilas 1-42 da A β com os compostos.

A Figura 2 mostra o efeito do composto #78 na disrupção das fibrilas 1-42 da A β . Como mostrado nesta figura, as 1-42 da A β sozinhas demonstram os espectros de DC típicos de uma estrutura em folha β predominante, com um mínimo

marcado observado a 218 nm. No entanto, na presença do composto #78 aos 3 dias, existe uma diminuição marcada no mínimo usualmente observado a 218 nm (com 1-42 da A β somente), indicativa de uma disrupção da estrutura em folha β das fibrilas 1-42 da A β .

A Figura 3 mostra os efeitos de resposta à dose dos compostos #12, 51 e 61 na disrupção da estrutura em folha β das fibrilas 1-42 da A β . Como um exemplo, concentrações crescentes dos compostos de teste #12, 51 e 61 (às razões p/p de A β :compostos de teste de 1:0,1, 1:1 e 1:10) causaram uma disrupção geral da estrutura em folha β como demonstrado pela diminuição dependente da dose no mínimo observado a 218 nm (quando comparado com o mínimo a 218 nm observado com 1-42 da A β somente). O composto #51 foi particularmente eficaz quando usado a uma razão p/p de A β :composto de teste de 1:10 e mostrou-se que perturba completamente a estrutura em folha β das fibrilas 1-42 da A β como mostrado pelo achatamento completo do mínimo a 218 nm (compare com 1-42 da A β somente) (Fig. 3).

Os estudos do DC demonstram que os compostos desta invenção têm a capacidade de disruptir/desmontar a estrutura em folha β característica das fibrilas de A β do Alzheimer. Os resultados dos estudos confirmam também os exemplos prévios usando fluorometria de Tioflavina T, SDS-PAGE/ECL, e ensaios do tipo ligação do vermelho do Congo, que os compostos desta invenção são agentes anti-amiloide potentes.

Exemplo 26: Os compostos desta invenção são disruptores potentes das fibrilas de IAPP da diabetes do tipo 2

Descobriu-se também que os compostos preparados nos Exemplos sintéticos e Exemplos comparativos eram

disruptores/inibidores potentes das fibrilas de IAPP da diabetes do tipo 2. Num conjunto de estudos, a eficácia dos compostos em causar uma desmontagem/disrupção das fibrilas de IAPP pré-formadas da diabetes do tipo 2 foi analisada.

Parte A - Dados de fluorometria da Tioflavina T

Num estudo, foi usada fluorometria da Tioflavina T para determinar o efeito dos compostos, e do EDTA (como um controlo negativo). Neste ensaio, a Tioflavina T liga-se especificamente à amiloide fibrilar, e esta ligação produz uma intensificação da fluorescência a 485 nm que é diretamente proporcional à quantidade de fibrilas de IAPP presentes. Quanto maior a fluorescência, maior a quantidade de fibrilas de IAPP 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).

Neste estudo, 25 µM da IAPP pré-fibrilizada (Bachem Inc) foram incubados a 37°C durante 3 dias ou sozinhos, ou na presença de um dos compostos ou EDTA (às razões de peso de IAPP:composto de teste 1:1, 1:0,1, 1:0,01 ou 1:0,001). Após 3 dias de coincubação, 50 µL de cada mistura de incubação foram transferidos para uma placa de microtitulação com 96 poços contendo 150 µL de água destilada e 50 µL de uma solução de Tioflavina T (i.e. Tioflavina T a 500 mM em tampão de fosfato a 250 mM, pH 6,8). A fluorescência foi lida a 485 nm (comprimento de onda de excitação 444 nm) usando um fluorómetro de placa de ELISA após subtração com tampão sozinho ou composto sozinho, como branco.

Os resultados são apresentados na Tabela 3 em baixo. Por exemplo, ao passo que o EDTA não causou inibição significativa das fibrilas de IAPP a todas as concentrações

testadas, todos os compostos causaram uma disrupção/desmontagem dependente da dose das fibrilas de IAPP pré-formadas até certo ponto. Os compostos mais eficazes a perturbarem as fibrilas de IAPP pareceram ser os compostos # 3, 4, 23, 63, e 78. Por exemplo, o composto #3 causou uma inibição significativa de $97,7 \pm 0,19\%$ ($p < 0,01$) quando usado a uma razão de IAPP:composto de teste de 1:0,1, e uma disrupção de $79,9 \pm 1,47\%$ quando usado a uma razão p/p de IAPP:composto de 1:0,01. Sob as mesmas condições (i.e. razão p/p de IAPP:composto de teste de 1:0,1), o composto #4 causou uma disrupção de $96,0 \pm 1,0\%$, o composto #23 causou uma disrupção de $67,2 \pm 18,35\%$, o composto #63 causou uma disrupção de $84,2 \pm 1,16\%$, o composto #78 causou uma disrupção de $92,4 \pm 0,27\%$, e o composto #26 causou uma disrupção de $45,9 \pm 17,73\%$. Este estudo indicou que os compostos desta invenção são também disruptores/inibidores potentes das fibrilas de IAPP da diabetes do tipo 2, e exercem usualmente os seus efeitos de um modo dependente da dose.

Tabela 3: Dados da fluorometria da Tioflavina T - disrupção das fibrilas de IAPP da diabetes do tipo 2

% Inibição de IAPP (resultado \pm D.P.) à razão p/p de IAPP:composto de teste dada				
Composto de Teste #	1:1	1:0,1	1:0,01	1:0,001
EDTA (controlo)	4,4 \pm 9,23	0,1 \pm 2,59	0,0 \pm 5,23	4,2 \pm 1,05
1*	99,0 \pm 0,11	93,0 \pm 1,27	57,3 \pm 0,16	6,4 \pm 4,40
3*	100 \pm 0,20	97,7 \pm 0,19	79,9 \pm 1,47	30,7 \pm 6,71
4*	99,7 \pm 0,23	96,0 \pm 0,10	63,2 \pm 2,09	17,3 \pm 4,07
8*	72,8 \pm 1,77	67,8 \pm 1,74	29,6 \pm 5,97	11,4 \pm 12,78

% Inibição de IAPP (resultado±D.P.) à razão p/p de IAPP:composto de teste dada				
Composto de Teste #	1:1	1:0,1	1:0,01	1:0,001
12*	99,9±0,19	86,0±0,76	37,5±0,76	13,0±10,34
19*	100,0±0,24	94,0±0,10	51,7±2,98	16,7±10,20
21*	98,5±0,06	85,4±0,86	25,8±3,61	5,4±15,41
23*	85,2±0,55	67,2±18,35	44,3±32,47	27,3±45,38
26*	52,5±2,44	45,9±17,73	24,6±6,77	3,7±4,67
51*	99,9±0,11	96,6±1,00	56,6±1,69	11,8±6,45
52*	97,9±0,19	86,9±3,09	49,2±4,47	16,0±8,42
57*	94,1±0,46	73,2±1,19	37,3±0,78	1,9±5,24
58*	98,1±1,04	87,6±1,16	48,8±2,05	8,9±6,87
61*	96,8±0,47	83,6±1,27	35,4±5,68	0,5±6,33
63*	94,9±0,65	84,2±1,16	56,2±8,77	19,0±0,30
66	98,5±0,06	94,0±2,88	47,6±8,16	11,1±5,28
67	98,6±0,22	81,4±6,96	34,8±1,87	16,1±12,40
75*	100±0,35	90,0±0,27	43,9±5,34	6,0±6,46
76*	99,6±1,01	87,5±1,89	41,5±6,67	9,0±0,32
78*	99,5±0,26	92,4±0,27	58,3±1,20	15,3±4,73
*= composto comparativo				

Parte B: Dados da ligação do vermelho do Congo

No ensaio de ligação do vermelho do Congo, a capacidade de um dado composto de teste em alterar a ligação da amiloide (neste caso, IAPP) ao vermelho do Congo é quantificada. Neste ensaio, a IAPP e os compostos de teste foram

incubados durante 3 dias e depois filtrados em vácuo através de um filtro de 0,2 µm. A quantidade de IAPP retida no filtro foi depois quantificada após coloração do filtro com vermelho do Congo. Após lavagem apropriada do filtro, qualquer abaixamento da cor do vermelho do Congo no filtro na presença do composto de teste (comparada com a coloração do vermelho do Congo da proteína amiloide na ausência do composto de teste) era indicativa da capacidade do composto de teste em diminuir/alterar a quantidade de IAPP agregada e congofílica.

Num estudo, a capacidade das fibrilas de IAPP em se ligarem ao vermelho do Congo na ausência ou presença de quantidades crescentes dos compostos ou EDTA (às razões de peso de IAPP:composto de teste de 1:1, 1:0,1, 1:0,01 ou 1:0,001) foi determinada. Os resultados das incubações de 3 dias são apresentados na Tabela 4 em baixo. Ao passo que o EDTA não causou inibição significativa da ligação das fibrilas de IAPP ao vermelho do Congo a todas as concentrações testadas, os compostos causaram usualmente uma inibição dependente da dose da ligação das fibrilas de IAPP ao vermelho do Congo. Por exemplo, o composto #3 causou uma inibição significativa de 55,5±2,68% ($p < 0,01$) da ligação do vermelho do Congo às fibrilas de IAPP quando usado a uma razão p/p de IAPP:composto de teste de 1:0,1. O composto #4 causou uma inibição significativa de 68,9±1,22% ($p < 0,01$) da ligação do vermelho do Congo às fibrilas de IAPP quando usado a uma razão p/p de IAPP:composto de teste de 1:1, e uma inibição de 25,4±4,68% da inibição do vermelho do Congo quando usado a uma razão p/p de NAC:composto de teste de 1:0,01. Este estudo indicou que os compostos desta invenção são também inibidores potentes da ligação das fibrilas de IAPP da diabetes do tipo 2 ao vermelho do Congo, e exercem usualmente os seus efeitos de um modo dependente da dose.

Tabela 4: Dados da ligação do vermelho do Congo

% Inibição de IAPP (resultado±D.P.) à razão p/p de IAPP:composto de teste dada				
Composto de Teste #	1:1	1:0,1	1:0,01	1:0,001
EDTA (controlo)	0,0±3,69	0,0±1,91	3,6±2,83	6,6±2,27
1*	40,7±2,49	10,6±3,40	18,6±4,05	6,4±2,07
3*	55,5±2,68	37,9±3,10	16,3±1,13	11,1±5,26
4*	68,9±1,22	25,4±4,68	9,0±0,51	0,0±1,05
8*	0,0±2,84	0,0±2,94	7,2±2,27	0,0±6,46
12*	39,8±0,26	8,3±0,85	6,9±2,45	0,0±2,40
19*	49,3±3,97	21,0±3,70	6,0±0,78	2,9±4,40
21*	35,9±0,21	10,4±3,53	5,1±4,53	0,0±2,10
23*	5,5±2,33	4,5±4,12	9,3±1,40	5,1±2,45
26*	0,0±1,21	7,5±2,83	5,3±6,14	10,8±2,63
51*	55,6±1,48	27,5±3,49	3,6±2,59	1,6±1,01
52*	31,3±0,27	11,5±1,21	11,0±3,27	10,2±0,52
57*	15,7±3,77	8,9±3,90	8,5±3,19	4,5±0,64
58*	24,5±0,57	0,7±6,21	4,6±2,35	0,0±1,93
61*	23,7±0,39	0,0±7,07	4,0±1,78	0,0±3,87
63*	15,4±1,34	4,5±1,62	11,7±2,26	0,0±2,25
66	41,4±3,84	15,7±2,53	5,7±4,23	4,8±1,86
67	26,3±2,76	5,5±2,52	10,6±1,29	0,0±3,45
75*	49,0±1,17	7,4±0,70	11,3±2,24	2,9±0,69
76*	53,9±5,44	16,5±2,60	14,2±2,25	3,4±1,07
78*	56,3±5,32	16,7±6,80	19,9±2,12	6,6±3,04
* = composto comparativo				

Exemplo 27: Os compostos desta invenção são disruptores potentes das fibrilas de NAC da doença de Parkinson

Descobriu-se também que os compostos desta invenção e os compostos comparativos testados eram disruptores/inibidores potentes das fibrilas de NAC da doença de Parkinson. O NAC é um fragmento de 35 aminoácidos da α -sinucleína que se demonstrou que forma fibrilas do tipo amiloide quando incubado a 37°C durante alguns dias. É o fragmento amiloidogénico da α -sinucleína e postula-se que desempenha um papel importante da patogénese da doença de Parkinson e outras sinucleínopatias. Num conjunto de estudos, a eficácia dos compostos em causar uma desmontagem/disrupção das fibrilas de NAC pré-formadas da doença de Parkinson foi analisada.

Parte A - Dados de fluorometria da Tioflavina T

Num estudo, foi usada fluorometria da Tioflavina T para determinar o efeito dos compostos #1, 3, 23, 26, 52, 63, 66, 67, e do EDTA (como um controlo negativo). Neste ensaio, a Tioflavina T liga-se especificamente às fibrilas de NAC, e esta ligação produz uma intensificação da fluorescência a 485 nm que é diretamente proporcional à quantidade de fibrilas de NAC presentes. Quanto maior a fluorescência, maior a quantidade de fibrilas de NAC 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).

Neste estudo, 25 μ M do NAC pré-fibrilizado (Bachem Inc) foram incubados a 37°C durante 3 dias ou sozinhos, ou na presença dos compostos análogos sintéticos de diidroxí #1, 3, 23, 26, 52, 63, 66, 67, ou EDTA (às razões de peso de

NAC:composto de teste 1:1, 1:0,1, 1:0,01 ou 1:0,001). Após 3 dias de coincubação, 50 µL de cada mistura de incubação foram transferidos para uma placa de microtitulação com 96 poços contendo 150 µL de água destilada e 50 µL de uma solução de Tioflavina T (i.e. Tioflavina T a 500 mM em tampão de fosfato a 250 mM, pH 6,8). A fluorescência foi lida a 485 nm (comprimento de onda de excitação 444 nm) usando um fluorômetro de placa de ELISA após subtração com tampão sozinho ou composto sozinho, como branco.

Os resultados das incubações de 3 dias são apresentados em baixo na Tabela 5. Por exemplo, ao passo que o EDTA não causou inibição significativa das fibrilas de NAC a todas as concentrações testadas, os compostos 1, 3, 52, 63, 66, e 67 causaram todos uma disrupção/desmontagem dependente da dose das fibrilas de NAC pré-formadas até certo ponto. Por exemplo, o composto #3 causou uma inibição significativa de $91,0 \pm 1,99\%$ ($p < 0,01$) quando usado a uma razão de NAC:composto de teste de 1:0,1, e uma disrupção de $93,9 \pm 0,77\%$ quando usado a uma razão p/p de NAC:composto de 1:0,01. Sob as mesmas condições (i.e. razão p/p de NAC:composto de teste de 1:0,1), o composto #1 causou uma disrupção de $99,5 \pm 0,53\%$, o composto #26 causou uma disrupção de $61,3 \pm 6,52\%$, o composto #52 causou uma disrupção de $89,2 \pm 1,49\%$, o composto #66 causou uma disrupção de $82,5 \pm 5,37\%$, e o composto #67 causou uma disrupção de $50,0 \pm 7,03\%$. Este estudo indicou que os compostos desta invenção são disruptores/inibidores potentes das fibrilas de NAC da doença de Parkinson, e exercem usualmente os seus efeitos de um modo dependente da dose.

Tabela 5: Dados da fluorometria da Tioflavina T - disrupção das fibrilas de NAC da doença de Parkinson

% Inibição de NAC (resultado±D.P.) à razão p/p de NAC:composto de teste dada				
Composto de Teste #	1:1	1:0,1	1:0,01	1:0,001
EDTA (controle)	20,0±11,8	0,0±5,87	0,0±10,87	0,0±11,6
1*	100,0±1,00	99,5±0,53	68,2±2,55	0,0±7,14
3*	98,0±1,78	91,0±1,99	93,9±0,77	67,3±6,37
23*	58,0±8,43	53,3±12,02	35,6±9,73	0,0±26,42
26*	70,4±3,22	61,3±6,52	56,8±4,60	0,0±16,88
52*	99,7±1,93	89,2±1,49	79,6±6,43	13,8±10,49
63*	45,6±31,03	34,5±17,15	33,0±1,69	17,3±12,57
66	98,9±0,65	82,5±5,37	43,4±3,45	30,5±9,55
67	97,4±1,19	50,0±7,03	30,6±5,75	11,9±15,98
*= composto comparativo				

Parte B: Dados da ligação do vermelho do Congo

No ensaio de ligação do vermelho do Congo, a capacidade de um dado composto de teste em alterar a ligação da amiloide (neste caso, NAC) ao vermelho do Congo é quantificada. Neste ensaio, o NAC e os compostos de teste foram incubados durante 3 dias e depois filtrados em vácuo através de um filtro de 0,2 µm. A quantidade de NAC retida no filtro foi depois quantificada após coloração do filtro com vermelho do Congo. Após lavagem apropriada do filtro, qualquer abaixamento da cor do vermelho do Congo no filtro na presença do composto de teste (comparada com a coloração do

vermelho do Congo da proteína amiloide na ausência do composto de teste) era indicativa da capacidade do composto de teste em diminuir/alterar a quantidade de NAC agregado e congofílico.

Num estudo, a capacidade das fibrilas de NAC em se ligarem ao vermelho do Congo na ausência ou presença de quantidades crescentes dos compostos #1, 3, 23, 26, 63, 66, 67, ou EDTA (às razões de peso de NAC:composto de teste de 1:1, 1:0,1, 1:0,01 ou 1:0,001) foi determinada. Os resultados das incubações de 3 dias são apresentados na Tabela 6. Ao passo que o EDTA não causou inibição significativa da ligação das fibrilas de NAC ao vermelho do Congo a todas as concentrações testadas, os compostos testados causaram uma inibição dependente da dose da ligação de NAC ao vermelho do Congo como demonstrado na Tabela 6 em baixo. Por exemplo, o composto #3 causou uma inibição significativa de $94,4 \pm 2,48\%$ ($p < 0,01$) da ligação do vermelho do Congo às fibrilas de NAC quando usado a uma razão p/p de NAC:composto de teste de 1:0,1. Em comparação, o composto #1 causou uma inibição de $75,4 \pm 2,96\%$ da ligação do vermelho do Congo às fibrilas de NAC quando usado a uma razão p/p de NAC:composto de teste de 1:1, e uma inibição de $75,9 \pm 2,48\%$ da inibição do vermelho do Congo quando usado a uma razão p/p de NAC:composto de teste de 1:0,01. Noutro exemplo, o composto análogo sintético #67 causou uma inibição significativa de $81,2 \pm 2,87\%$ ($p < 0,01$) da ligação do vermelho do Congo às fibrilas de NAC quando usado a uma razão p/p de NAC:composto de teste de 1:1, e uma inibição significativa de $47,7 \pm 8,20\%$ ($p < 0,01$) da ligação do vermelho do Congo quando usado a uma razão p/p de NAC:composto de teste de 1:0,01. Noutro exemplo, o composto #26 causou uma inibição significativa de $34,4 \pm 10,19\%$ da ligação do vermelho do Congo quando usado a uma razão de NAC:composto de teste de 1:1, e uma inibição de $36,7 \pm 5,59\%$ da ligação do

vermelho do Congo quando usado a uma razão de NAC:composto de teste de 1:0,01. Este estudo também indicou que os compostos desta invenção são também inibidores potentes da ligação das fibrilas de NAC do tipo da doença de Parkinson ao vermelho do Congo, e exercem usualmente os seus efeitos de um modo dependente da dose.

Tabela 6: Dados da ligação do vermelho do Congo - disrupção das fibrilas de NAC da doença de Parkinson

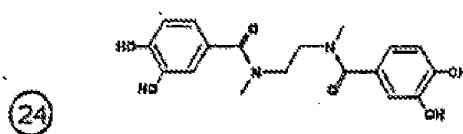
% Inibição de NAC (resultado±D.P.) à razão p/p de NAC:composto de teste dada				
Composto de Teste #	1:1	1:0,1	1:0,01	1:0,001
EDTA (controle)	0,2±7,33	0,0±38,26	0,0±22,0	0,0±20,57
1	75,4±2,96	75,9±2,58	40,7±4,23	0,0±11,39
3	94,4±2,48	83,2±3,57	81,7±2,82	65,2±5,40
23	41,0±8,54	30,3±12,06	25,6±5,37	0,0±9,00
26	34,4±10,19	36,7±5,59	36,4±0,67	0,0±27,34
52	73,8±3,15	71,2±7,17	78,9±4,76	0,0±24,43
63	54,5±7,56	9,3±10,5	34,0±3,66	0,0±30,84
66	81,1±1,74	72,4±1,79	51,0±9,50	19,5±37,59
67	81,2±2,87	47,7±8,20	39,2±10,25	15,5±41,42

Exemplo 28: Outros compostos de bis-diidroxifenilo) da invenção

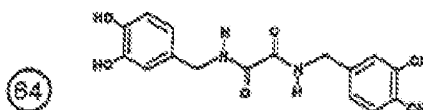
Para além dos 24 compostos descritos em detalhe nos Exemplos 1 - 24, este Exemplo descreve outros compostos de bis-(diidroxifenilo) que também servem como disruptores/inibidores potentes das fibrilas de amiloide na doença de Alzheimer (*i.e.* A β), diabetes do tipo 2 (*i.e.*

IAPP), outras doenças da amiloide, bem como na doença de Parkinson (*i.e.* α -sinucleína/NAC) e outras doenças de fibrilas de sinucleína.

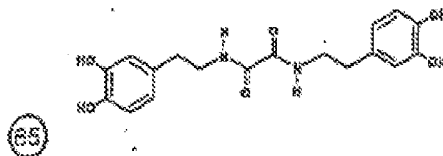
Estes compostos são os compostos # 24, 64, 65, 68, 69, 70, 71 e 72. Estes são também referidos respetivamente como DC-0024, DC-0064, DC-0065, DC-0068, DC-0069, DC-0070, DC-0071, e DC-0072, respetivamente.



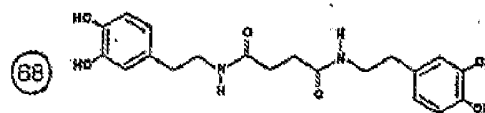
N,N'-bis(3,4-idroxibenzoíl)-N,N'-dimetil-etilenodiamina



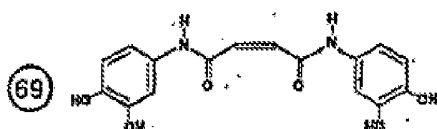
3,4-diidroxifenetilamida do ácido 3,4-diidroxifenoxiacético



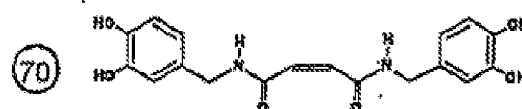
Bis(3,4-metileno-dioxifenetilamida) do ácido oxálico



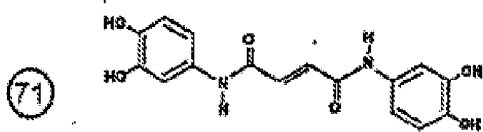
bis-(3,4-diidroxibenzil(-)amida) do ácido succínico



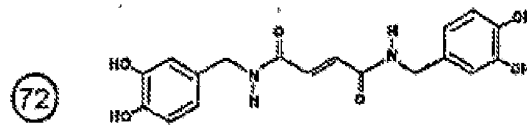
bis-(3,4-diidroxianilida) do ácido maleico



bis-(3,4-diidroxibenzilanilida) do ácido maleico



71
bis-(3,4-diidroxianilida) do ácido
fumárico



72
bis-(3,4-diidroxibenzilamida) do
ácido fumárico

Estes compostos podem ser preparados pelos métodos usados para produzir os compostos ilustrados nos Exemplos 1 até 23 e suas variações facilmente determináveis por uma pessoa de perícia vulgar na técnica. Assim sendo, por exemplo, o composto 24 : pode ser preparado pelo método usado para o composto 12, substituindo N,N'-dimetiletlenodiamina pelo *trans*-1,2-diaminociclohexano do Exemplo 6, e assim por diante. Uma pessoa de perícia vulgar na técnica não terá dificuldade, tendo em conta essa perícia e esta divulgação, na preparação dos compostos ilustrados acima ou os compostos da fórmula dada na reivindicação 1.

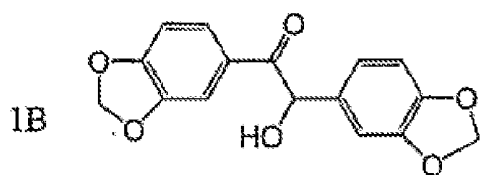
Exemplo Comparativo 29: Análogos de Metilenodioxi

Uma estratégia para a distribuição dos compostos de diidroxiarilo desta invenção para melhorar e/ou causar características de metabolismo e biodisponibilidade mais favoráveis envolve a proteção dos grupos hidroxí dos compostos de diidroxiarilo com grupos metilenodioxi. Esta estratégia é exemplificada nas 80 estruturas mostradas em baixo.

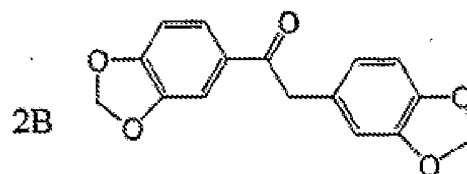
Os análogos de metilenodioxi representam estruturas de proteção de hidroxí intermediárias que são feitas para completar com sucesso a síntese dos compostos de diidroxiarilo descritos na invenção. Estes compostos de anel fechado tendem também a ser mais estáveis, e hidrofóbicos (insolúveis em água), e menos suscetíveis de

ser alterados ou degradados devido à oxidação que poderia ocorrer se estivessem presentes grupos hidroxilo. Adicionalmente, estes compostos fazem bons pró-fármacos especialmente para distribuição ao cérebro devido à sua natureza hidrofóbica. Os compostos hidrofóbicos que são solúveis em lípidos tendem a ser compostos atrativos para a distribuição ao cérebro uma vez que eles são usualmente capazes de penetrar a barreira sangue-cérebro.

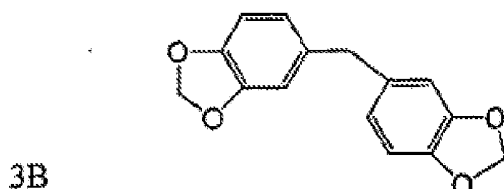
Os análogos de metilenodioxi estão geralmente disponíveis como intermediários na síntese dos correspondentes compostos de diidroxiarilo, como pode ser visto a partir das sínteses ilustradas nos Exemplos 1-23. É expetável que estes compostos sejam eficazes na sua capacidade de causar uma disrupção/desmontagem e inibição das fibrilas de amiloide e sinucleína, logo que as estruturas de metilenodioxi sejam clivadas para originar grupos hidroxilo. A conversão dos grupos hidroxilo em derivados de metilenodioxi origina também pró-fármacos que se acredita que melhoram a toxicidade (i.e. sendo menos tóxicos), metabolismo (uma vez será menos provável que os grupos OH sejam alterados por metilação, glucuronidação e sulfatação), e biodisponibilidade. Neste conceito de pró-fármaco, acredita-se que a conversão do pró-fármaco tem lugar no plasma (após a sua proteção através do intestino), e mais próxima do seu tecido alvo apropriado (órgãos sistémicos e/ou cérebro). Acredita-se que as enzimas no sangue e tecidos apropriados são capazes de clivar o grupo metilenodioxi nestes análogos para originar as estruturas de diidroxio para alcançar a eficácia observada contra as doenças descritas anteriormente no pedido tais como doença de Alzheimer, diabetes do tipo 2, doença de Parkinson e outras doenças da amiloide e sinucleínopatas.



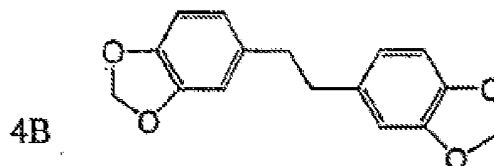
bis(3,4-metilenodioxifenil)benzoína



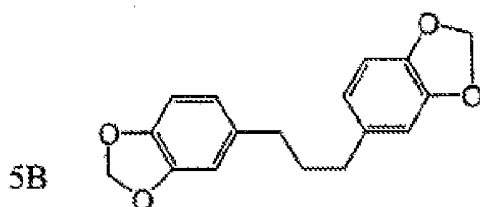
bis(3,4-metilenodioxifenil)desoxibenzoína



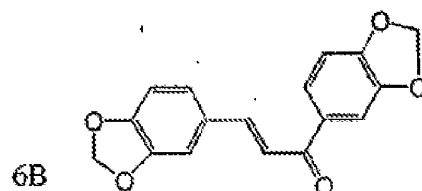
1,1-bis(3,4-metilenodioxifenil)metano



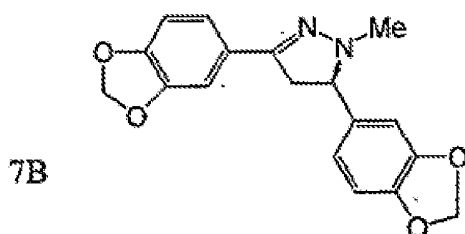
1,2-bis(3,4-metilenodioxifenil)etano



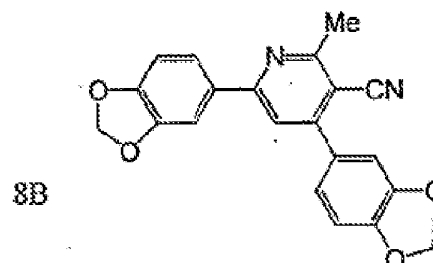
1,3-bis(3,4-metilenodioxifenil)propano



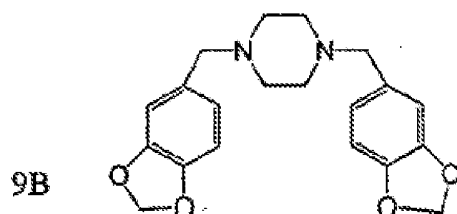
bis(3,4-metilenodioxifenil)chalcona



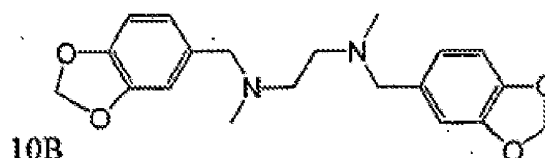
3,5-bis(3,4-metilenodioxifenil)-1-metil-2-pirazolina



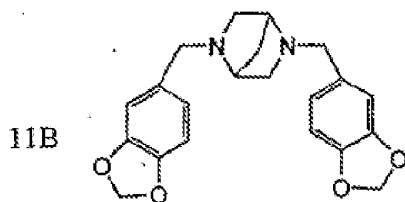
4,6-bis(3,4-metilenodioxifenil)-3-ciano-2-metipiridina



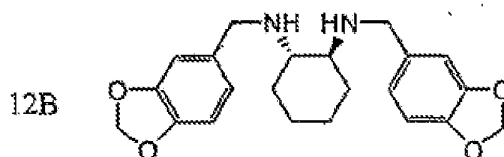
1,4-bis(3,4-metilenodioxibenzil)piperazina



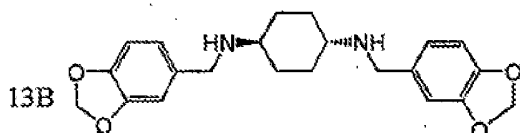
N,N'-bis(3,4-metilenodioxibenzil)-N,N'-dimetil-etilenodiamina



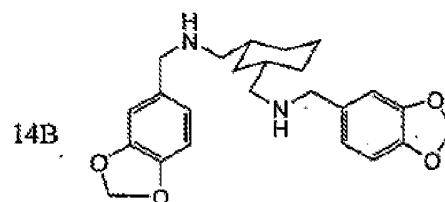
2,5-bis(3,4-metilenodioxibenzil)-2,5-diaza[2,2,1]-bicicloheptano



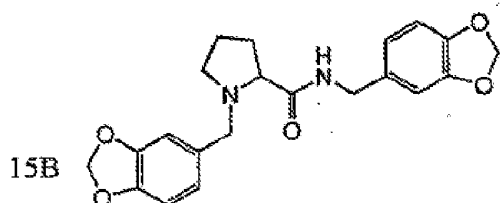
N,N'-bis(3,4-metilenodioxibenzil)-*trans*-1,2-diaminociclohexano



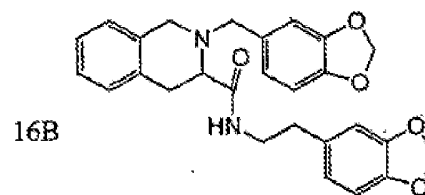
N,N'-bis(3,4-metilenodioxibenzil)-*trans*-1,4-diaminociclohexano



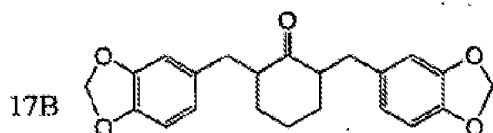
N,N'-bis(3,4-metilenodioxibenzil)-*cis*-1,3-bis-(aminometil)ciclohexano



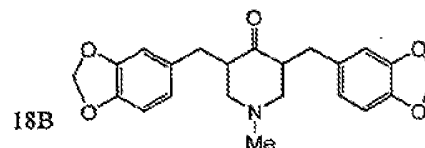
3,4-metilenodioxibenzilamida da *N*-(3,4-metilenodioxibenzil)prolina



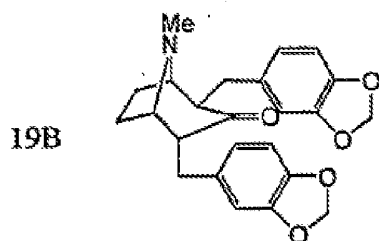
3,4-metilenodioxifenetilamida do ácido 2-(3,4-metilenodioxibenzil)isoquinolina-3-carboxílico



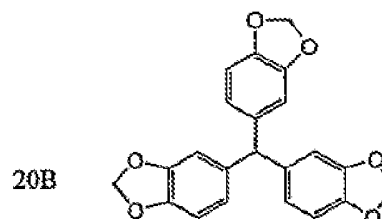
2,6-bis(3,4-metilenodioxibenzil)ciclohexanona



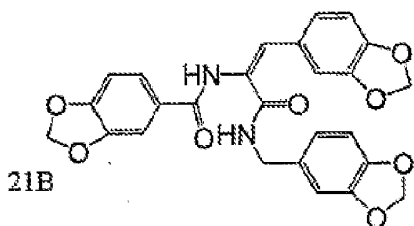
3,5-bis(3,4-metilenodioxibenzil)-1-metil-4-piperidinona



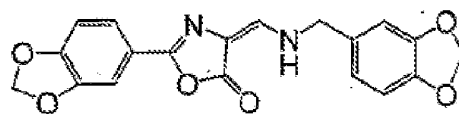
2,4-bis(3,4-metilenodioxibenzil)-3-tropinona



Tris-(3,4-metilenodioxifenil)metano

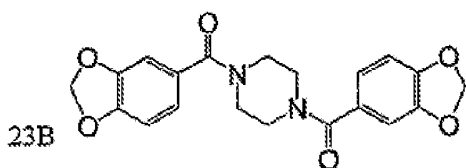


21B
3,4-metilenodioxibenzilamida do ácido
 α -(3,4-metilenodioxibenzamido)-3,4-
metilenodioxi (-) cinâmico



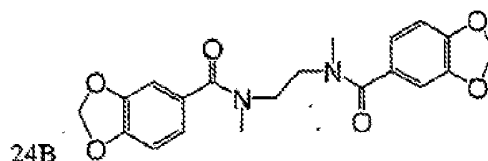
22B

4-(3,4-
metilenodioxibenzilaminometileno)-2-
(3,4-metilenodioxifenil) oxazolin-5-ona



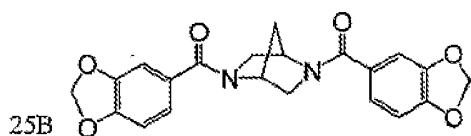
23B

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



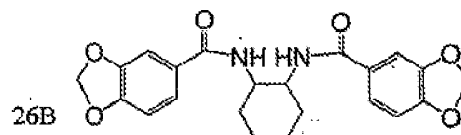
24B

N,N'-bis(3,4-metilenodioxibenzoíl) -
N,N'-dimetil (-) etilenodiamina



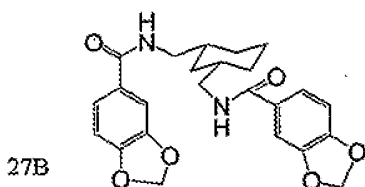
25B

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



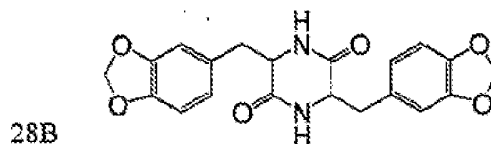
26B

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



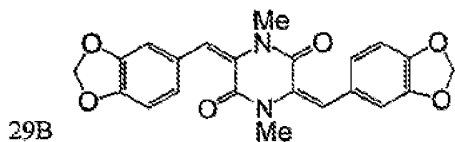
27B

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



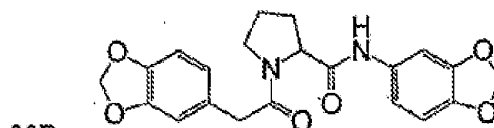
28B

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



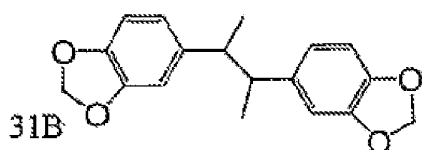
29B

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

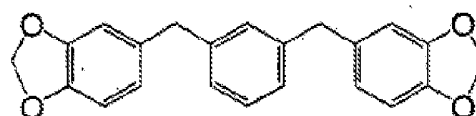


30B

N-(3,4-metilenodioxifenilcetil) -
prolina-3,4-metilenodioxianilida



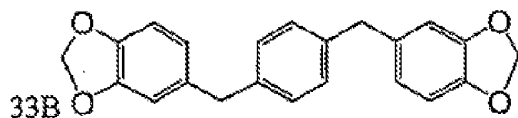
31B



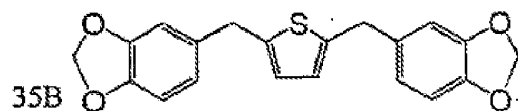
32B

1,3-bis(3,4-metilenodioxibenzil) -

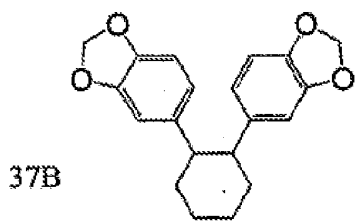
2,3-bis(3,4-metilenodioxifenil)-
butano



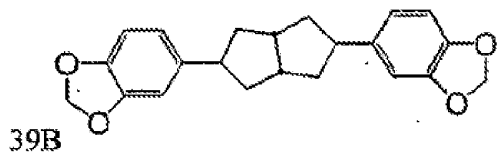
1,4-bis(3,4-metilenodioxibenzil)-
benzeno



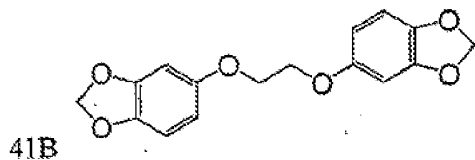
2,5-bis(3,4-metilenodioxibenzil)-
tiofeno



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

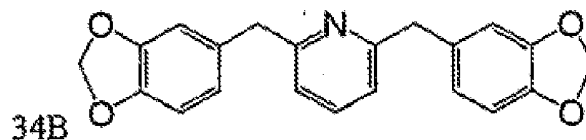


3,7-bis(3,4-metilenodioxifenil)-
biciclo[3,3,0](-)octano

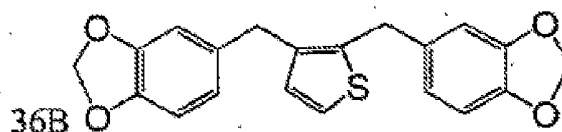


1,2-bis(3,4-metilenodioxifenoxi)-
etano

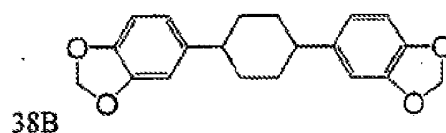
benzeno



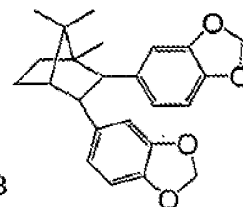
2,6-bis(3,4-metilenodioxibenzil)-
piridina



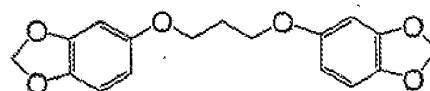
2,3-bis(3,4-metilenodioxibenzil)-
tiofeno



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



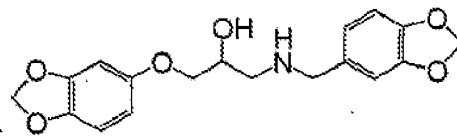
2,3-bis(3,4-metilenodioxifenil)-1,7,7-
trimetil-biciclo[2,2,1]heptano



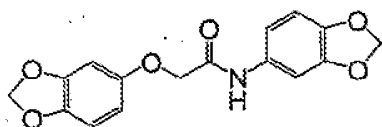
1,3-bis(3,4-metilenodioxifenoxi)-
propano



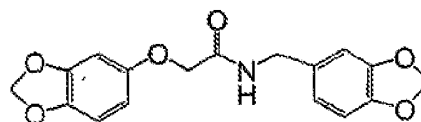
43B
trans-1,2-bis(3,4-
metilendioxiifenoxi)-(-)ciclopentano



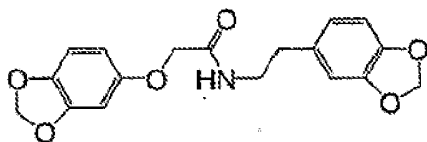
44B
N-(3,4-metilendioxi benzil)-3-(3,4-
metilendioxi (-) fenoxi)-2-
hidroxipropilamina



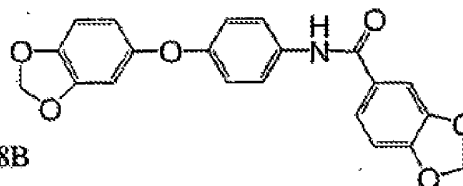
45B
3,4-metilendioxi anilida do ácido
3,4-metilendioxi fenoxi-acético



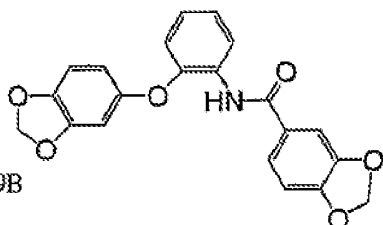
46B
3,4-metilendioxi benzilamida do ácido
3,4-metilendioxi fenoxiacético



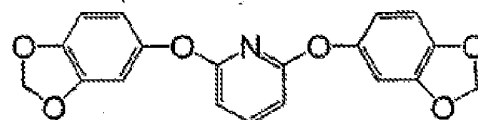
47B
3,4-metilendioxi fenetilamida do
ácido 3,4-metilendioxi fenoxi-acético



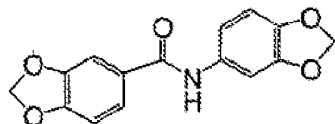
48B
p-(3,4-metilendioxi fenoxi) anilida do
ácido 3,4-metilendioxi benzoico



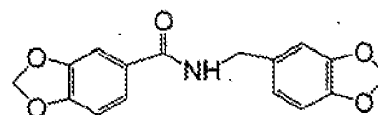
49B
o-(3,4-metilendioxi a fenoxi) anilida
do ácido 3,4-metilendioxi benzoico



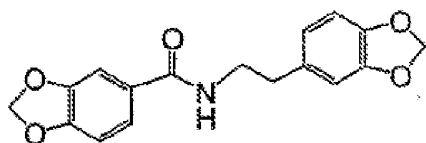
50B
2,6-bis(3,4-metilendioxi fenoxi)-
piridina



51B
3,4-metilendioxi anilida do ácido
3,4-metilendioxi benzoico

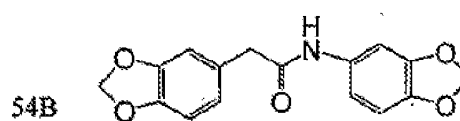


52B
3,4-metilendioxi benzilamida do ácido
3,4-metilendioxi benzoico



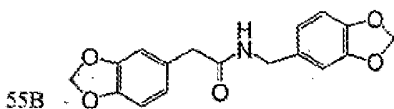
53B

3,4-metilenodioxifenetilamida do
ácido 3,4-metilenodioxibenzoico



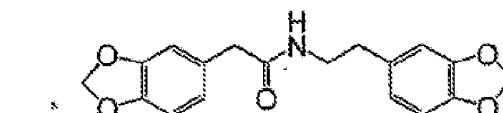
54B

3,4-metilenodioxianilida do ácido 3,4-
metilenodioxifenilacético



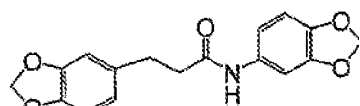
55B

3,4-metilenodioxibenzilamida do ácido
3,4-metilenodioxifenilacético



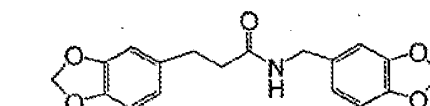
56B

3,4-metilenodioxifenetilamida do ácido
3,4-metilenodioxifenilacético



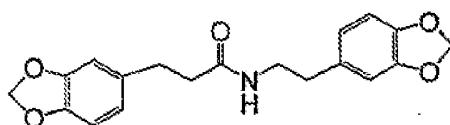
57B

3,4-metilenodioxianilida do ácido 3-
(3,4-metilenodioxifenil)-propiónico



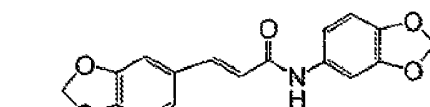
58B

3,4-metilenodioxibenzilamida do ácido
3-(3,4-metilenodioxifenil)-propiónico



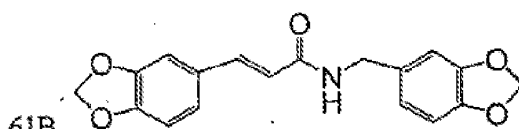
59B

3,4-metilenodioxifenetilamida do
ácido 3-(3,4-metilenodioxifenil)-
propiónico



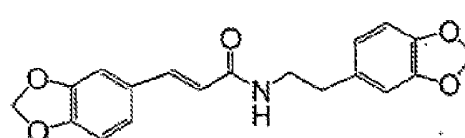
60B

3,4-metilenodioxianilida do ácido 3,4-
metilenodioxicinâmico



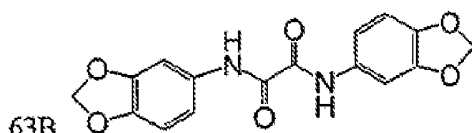
61B

3,4-metilenodioxibenzilamida do ácido
3,4-metilenodioxicinâmico



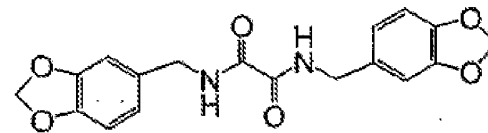
62B

3,4-metilenodioxifenetilamida do ácido
3,4-metilenodioxicinâmico



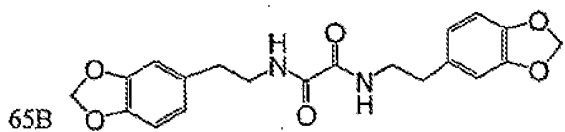
63B

Bis(3,4-metileno-dioxianilida) do
ácido oxálico

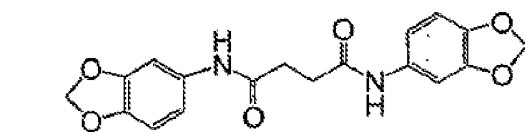


64B

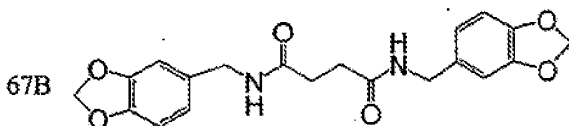
Bis(3,4-metileno-dioxibenzilamida) do
ácido oxálico



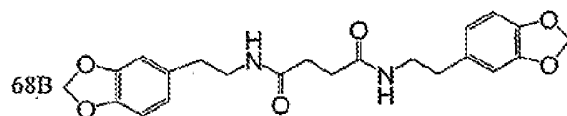
Bis(3,4-metileno-dioxifenetilamida)
do ácido oxálico



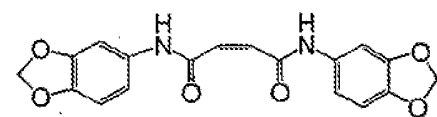
Bis(3,4-metileno-dioxianilida) do
ácido succínico



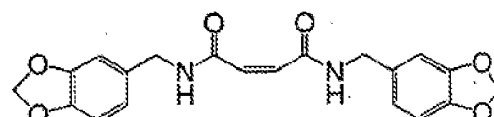
Bis(3,4-metileno-dioxibenzilamida) do
ácido succínico



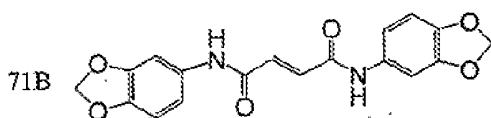
Bis(3,4-metileno-dioxifenetilamida) do
ácido succínico



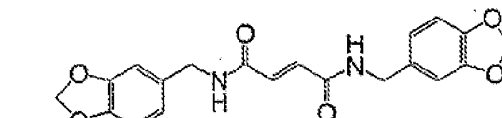
Bis(3,4-metileno-dioxianilida) do
ácido maleico



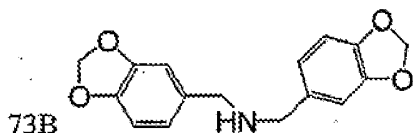
Bis(3,4-metileno-dioxibenzilamida) do
ácido maleico



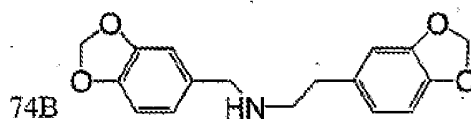
Bis-(3,4-metilenodioxi-anilida) do
ácido fumárico



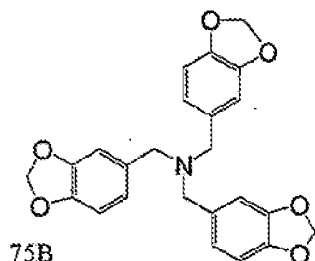
Bis-(3,4-metilenodioxi-benzilamida) do
ácido fumárico



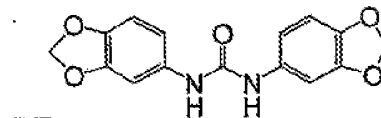
bis-(3,4-metilenodioxi-benzil)-amina



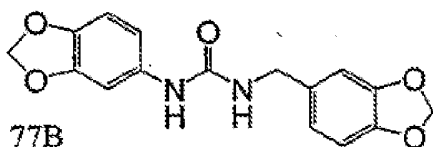
N-(3,4-metilenodioxi-benzil)-3,4-
metilenodioxi-fenetilamina



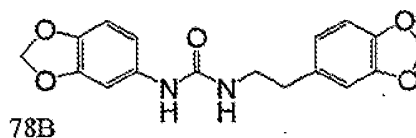
tris-(3,4-metilenodioxi-benzil)-amina



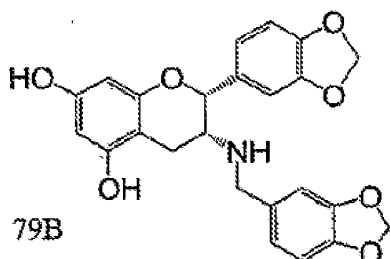
1,3-bis-(3,4-metilenodioxi-fenil)-ureia



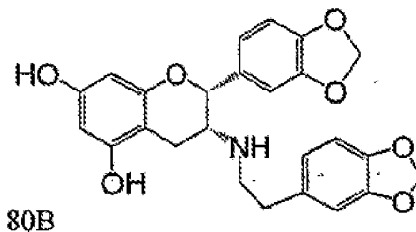
1-(3,4-metilenodioxifenil)-3-(3,4-metilenodioxibenzil)ureia



1-(3,4-metilenodioxifenil)-3-(3,4-metilenodioxifenetil)ureia



3-deoxi-3-(3,4-metilenodioxibenzil)-aminoepicatequina



3-deoxi-3-(3,4-metilenodioxifenetil)-aminoepicatequina

Exemplo Comparativo 30: Compostos acilados

Outra estratégia potencial para a distribuição dos compostos de bis-diidroxifenilo desta se esta invenção para melhorar e/ou causar características de metabolismo e biodisponibilidade mais favoráveis envolve métodos de proteção dos grupos hidroxil como seus ésteres farmacologicamente aceitáveis. Os grupos éster substituindo os grupos hidroxil tendem também a tornar os compostos mais estáveis, e menos suscetíveis de ser alterados ou degradados devido a oxidação dos grupos hidroxil.

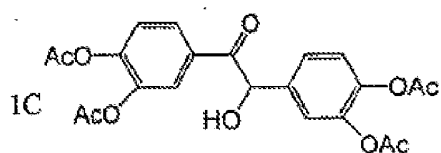
A tabela de compostos em baixo ilustra os ésteres de acetil dos 80 compostos de diidroxiarilo dos Exemplos 1 - 23 e 28 estão apresentados em baixo nos quais os grupos OH estão substituídos por grupos acetil. A ilustração dos ésteres de acetil é meramente exemplar para a classe de ésteres farmacologicamente aceitáveis que são parte dos compostos desta invenção e podem ser preparados por métodos análogos.

É expectável que estes compostos sejam eficazes na sua capacidade de tratar doenças da amiloide e sinucleinopatias logo que as ligações éster sejam clivadas (por enzimas no plasma ou no tecido do cérebro), e os grupos hidroxilo são regenerados. A substituição dos grupos hidroxilo por grupos éster originarão pró-fármacos que se acredita que melhoram a toxicidade (i.e. sendo menos tóxicos), metabolismo (uma vez será menos provável que os grupos OH sejam alterados por metilação, glucuronidação e sulfatação), e biodisponibilidade. Neste conceito de pró-fármaco, acredita-se que a conversão do pró-fármaco tem lugar no plasma (após a sua proteção através do intestino), e mais próxima do seu tecido alvo apropriado (órgãos sistémicos para o tratamento de doenças da amiloide sistémicas e/ou cérebro para o tratamento do Alzheimer, Parkinson, diabetes do tipo 2, e outras doenças da amiloide A β e sinucleína). Acredita-se que as enzimas no sangue e tecidos apropriados são capazes de clivar as ligações éster nestes ésteres farmacologicamente aceitáveis para originar as estruturas de dihidroxi importantes para a eficácia observada contra a doença de Alzheimer, outras doenças da amiloide (tais como fibrilas de IAPP na diabetes do tipo 2), e (fibrilas de α -sinucleína/NAC, tal como na doença de Parkinson, e outras sinucleinopatias).

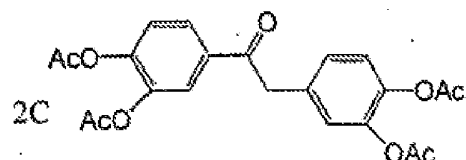
Os ésteres farmacologicamente aceitáveis dos compostos #1 até #86 são preparados por métodos bem conhecidos de pessoas de perícia vulgar na técnica, tais como por reação dos compostos de dihidroxiarilo com ácidos farmacologicamente aceitáveis, especialmente na forma ativada (tal como os haletos de ácido) e/ou na presença de reagentes facilitando a esterificação (tal como um catalisador ácido) e/ou sob condições favorecendo a esterificação (tal como por condução da reação sob reações onde a água formada na esterificação é removida, p.ex. por destilação). Os métodos

de esterificação dos grupos hidroxilo fenólicos são bem conhecidos de pessoas de perícia vulgar na técnica.

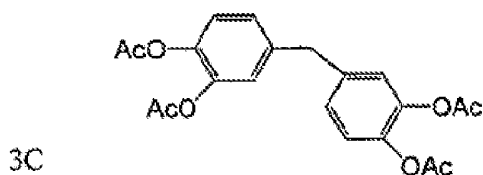
Ácidos adequados para a formação de ésteres farmacologicamente aceitáveis são os ácidos alcanóicos C₂₋₆ (ácido acético, ácido propiónico, e similares), ácido benzoico, ácidos arilalcanoicos (ácido fenilacético, e similares); embora muitos outros ácidos sejam adequados para a formação de ésteres farmacologicamente aceitáveis, e uma pessoa de perícia vulgar não terá dificuldade na escolha de um ácido adequado.



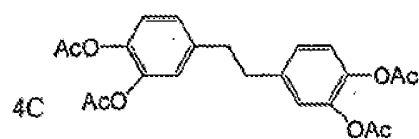
bis(3,4-diacetoxi)benzoína



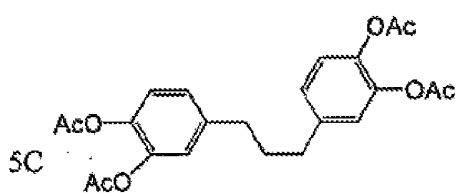
bis(3,4-diacetoxi)desoxibenzoína



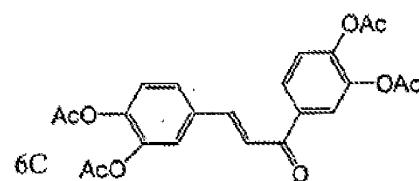
1,1-bis(3,4-diacetoxifenil)metano



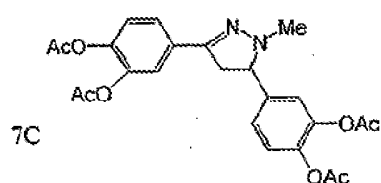
1,2-bis(3,4-diacetoxifenil)etano



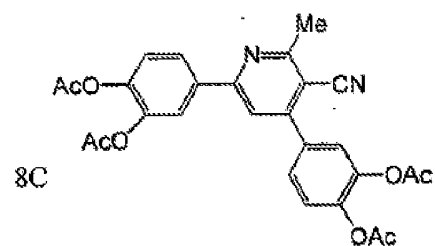
1,3-bis(3,4-diacetoxifenil)propano



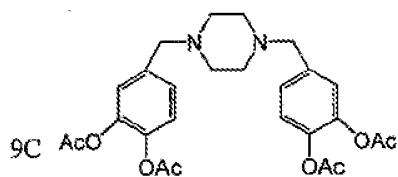
bis(3,4-diacetoxi)chalcona



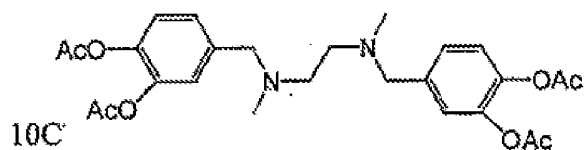
3,5-bis(3,4-diacetoxifenil)-1-metil-2-pirazolina



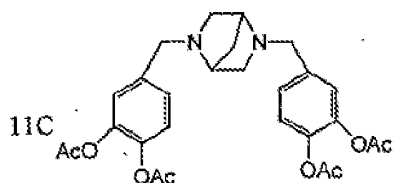
4,6-bis(3,4-diacetoxifenil)-3-ciano-2-metipiridina



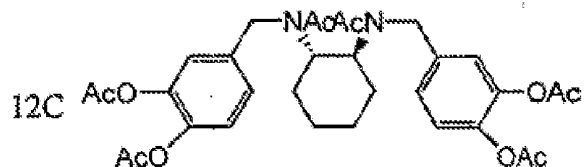
9C
1,4-bis(3,4-diacetoxibenzil)piperazina



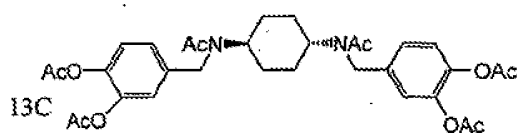
10C
N,N'-bis(3,4-diacetoxibenzil)-N,N'-dimetil-etilenodiamina



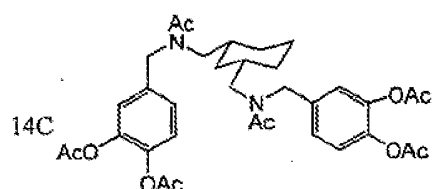
11C
2,5-bis(3,4-diacetoxibenzil)-2,5-diaza[2,2,1]-bicicloheptano



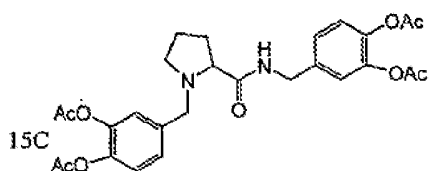
12C
N,N'-bis(acetil)-bis(3,4-diacetoxibenzil)-trans-1,2-diaminociclohexano



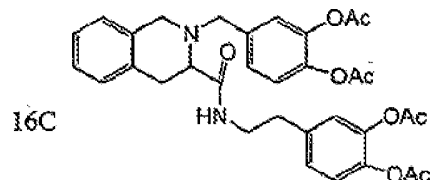
13C
N,N'-bis(acetil)-bis(3,4-diacetoxibenzil)-trans-1,4-diaminociclohexano



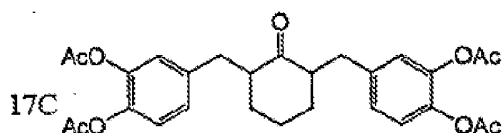
14C
N,N'-bis(acetil)-bis(3,4-diacetoxibenzil)-cis-1,3-bis(aminometil)ciclohexano



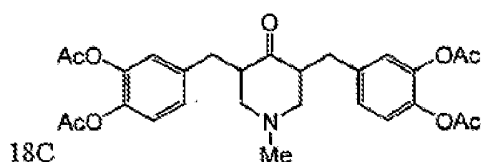
15C
3,4-diacetoxibenzilamida da N-(3,4-diacetoxibenzil)prolina



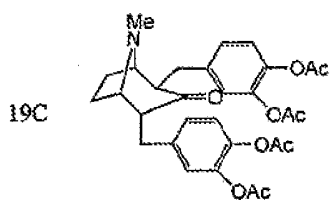
16C
3,4-diacetoxifenetilamida do ácido 2-(3,4-diacetoxibenzil)isoquinolina-3-carboxílico



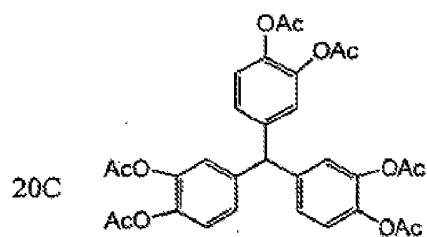
17C
2,6-bis(3,4-diacetoxibenzil)-ciclohexanona



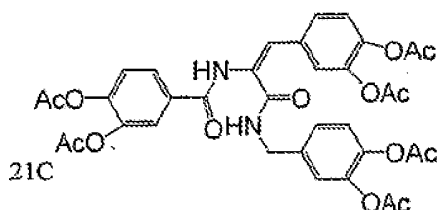
18C
3,5-bis(3,4-diacetoxibenzil)-1-metil-4-piperidinona



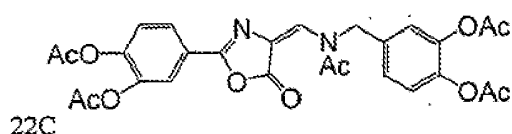
2,4-bis(3,4-diacetoxibenzil)-3-tropinona



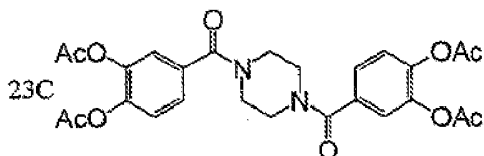
Tris-(3,4-diacetoxifenil)metano



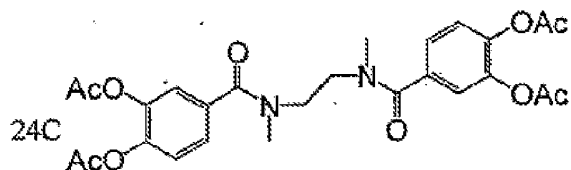
3,4-diacetoxibenzilamida do ácido α -(3,4-diacetoxibenzamido)-3,4-diacetoxi(-)cinâmico



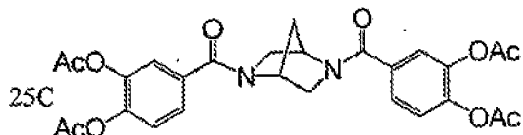
N-acetil-4-(3,4-diacetoxibenzilamino-metileno)-2-(3,4-diacetoxifenil)-oxazolin-5-ona



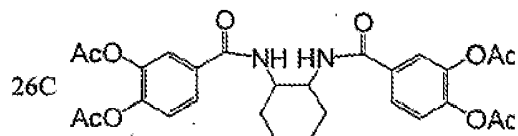
1,4-bis(3,4-diacetoxibenzoil)-piperazina



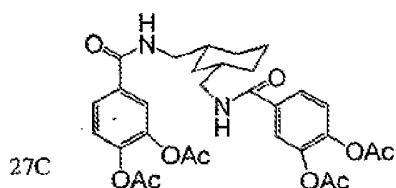
N,N'-bis(3,4-diacetoxibenzoil)-N,N'-dimetil(-)etilenodiamina



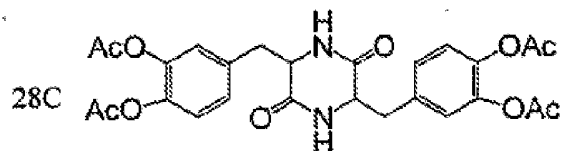
2,5-bis(3,4-diacetoxibenzoil)-2,5-diaza[2,2,1]-bicicloheptano



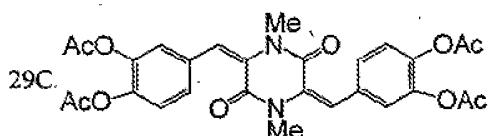
N,N'-bis(3,4-diacetoxibenzoil)-trans-diaminociclohexano



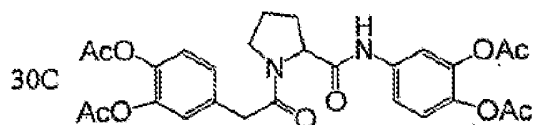
N,N'-bis(3,4-diacetoxibenzoil)-cis-1,3-bis-(aminometil)ciclohexano



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

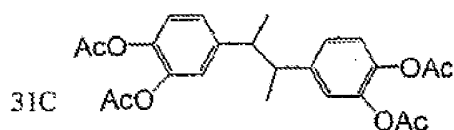


3,6-bis(3,4-diacetoxibenzilideno)-

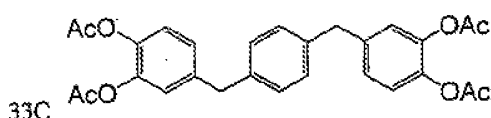


N-(3,4-diacetoxifenilacetil)-prolina-

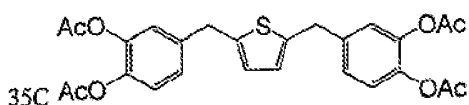
1,4-dimetil-2,5-dicetopiperazina



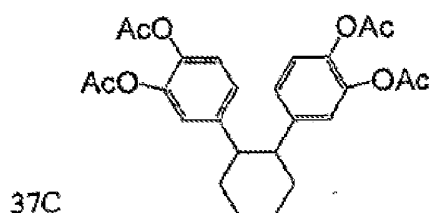
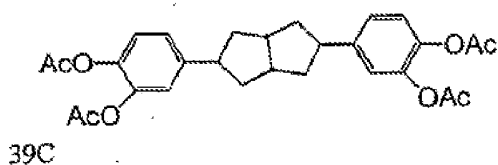
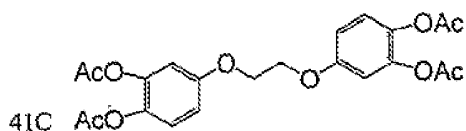
2,3-bis(3,4-diacetoxifenil)-butano



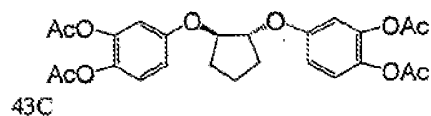
1,4-bis(3,4-diacetoxibenzil)-benzeno



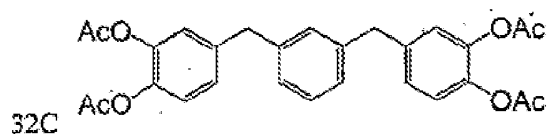
2,5-bis(3,4-diacetoxibenzil)-tiofeno

1,2-bis(3,4-diacetoxifenil)-
ciclohexano3,7-bis(3,4-diacetoxifenil)-
biciclo[3,3,0](-)octano

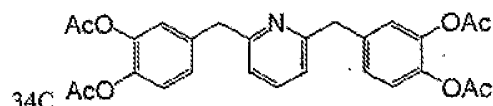
1,2-bis(3,4-diacetoxifenoxi)-etano

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

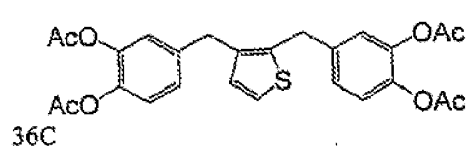
3,4-diacetoxianilida



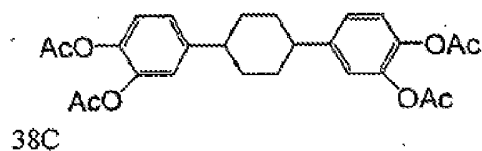
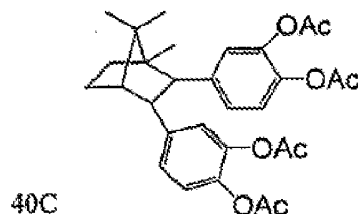
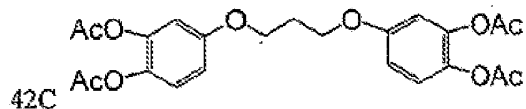
1,3-bis(3,4-diacetoxibenzil)-benzeno



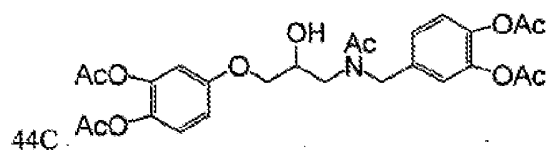
2,6-bis(3,4-diacetoxibenzil)-piridina



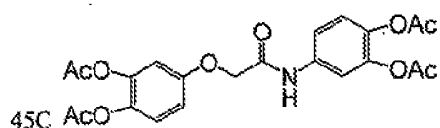
2,3-bis(3,4-diacetoxibenzil)-tiofeno

1,4-bis(3,4-diacetoxifenil)-
ciclohexano2,3-bis(3,4-diacetoxifenil)-1,7,7-
trimetil-biciclo[2,2,1]heptano

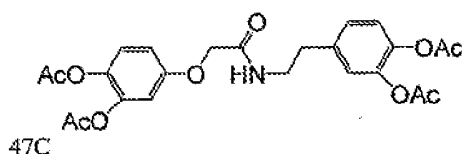
1,3-bis(3,4-diacetoxifenoxi)-propano



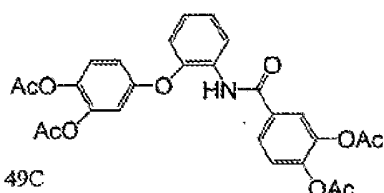
N-acetil-N-(3,4-diacetoxibenzil)-3-



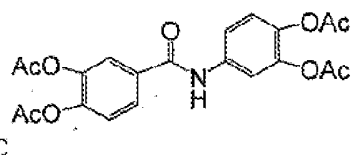
45C 3,4-diacetoxianilida do ácido 3,4-diacetoxifenoxi-acético



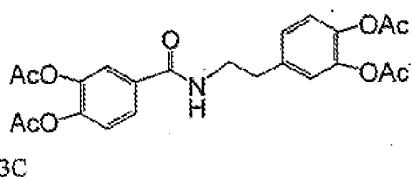
47C 3,4-diacetoxifenetilamida do ácido 3,4-diacetoxifenoxi-acético



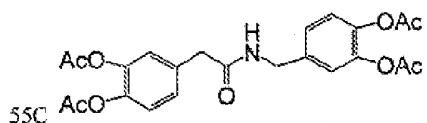
49C o-(3,4-diacetoxiafenoxi)anilida do ácido 3,4-diacetoxibenzoico



51C 3,4-diacetoxianilida do ácido 3,4-diacetoxibenzoico

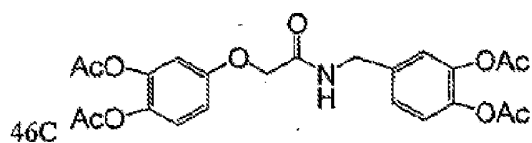


53C 3,4-diacetoxifenetilamida do ácido 3,4-diacetoxibenzoico

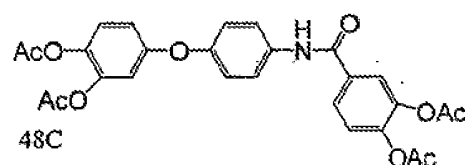


55C 3,4-diacetoxibenzilamida do ácido 3,4-diacetoxifenilacético

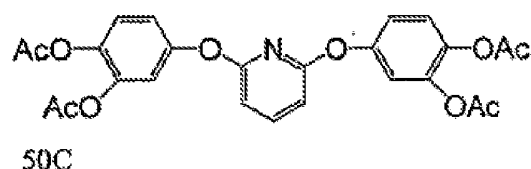
(3,4-diacetoxi (-) fenoxi) -2-
hidroxipropilamina



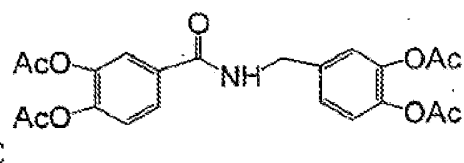
46C 3,4-diacetoxibenzilamida do ácido 3,4-diacetoxifenoxiacético



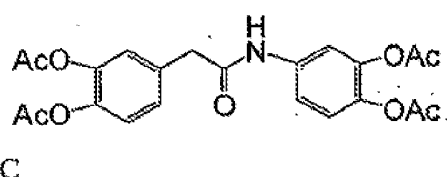
48C p-(3,4-diacetoxifenoxi)anilida do ácido 3,4-diacetoxibenzoico



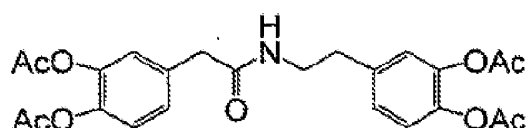
50C 2,6-bis(3,4-diacetoxifenoxi)-piridina



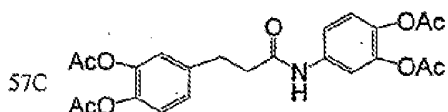
52C 3,4-diacetoxibenzilamida do ácido 3,4-diacetoxibenzoico



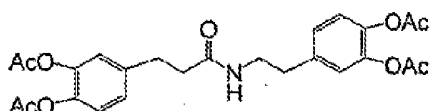
54C 3,4-diacetoxianilida do ácido 3,4-diacetoxifenilacético



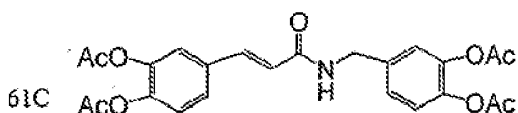
56C 3,4-diacetoxifenetilamida do ácido



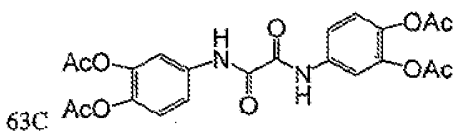
3,4-diacetoxianilida do ácido 3-(3,4-diacetoxifenil)-propiónico



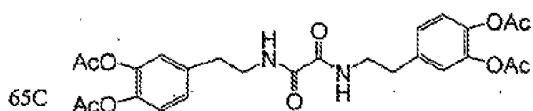
3,4-diacetoxifenetilamida do ácido 3-(3,4-diacetoxifenil)propiónico



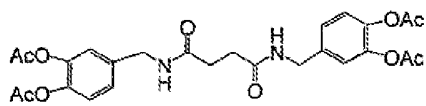
3,4-diacetoxibenzilamida do ácido 3,4-diacetoxicinâmico



Bis(3,4-diacetoxianilida) do ácido oxálico

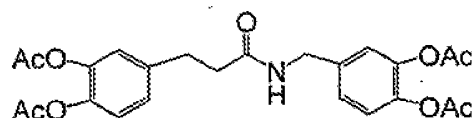


Bis(3,4-diacetoxi-fenetilamida) do ácido oxálico

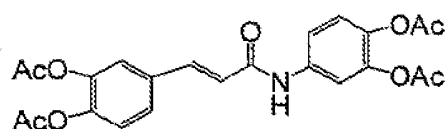


Bis(3,4-diacetoxi-benzilamida) do ácido succínico

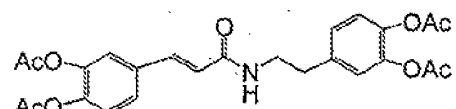
3,4-diacetoxifenilacético



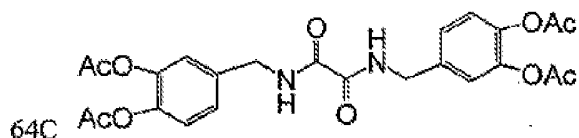
3,4-diacetoxibenzilamida do ácido 3-(3,4-diacetoxifenil)-propiónico



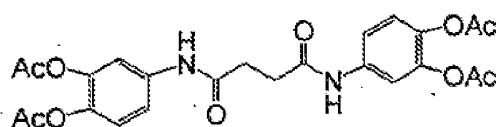
3,4-diacetoxianilida do ácido 3,4-diacetoxicinâmico



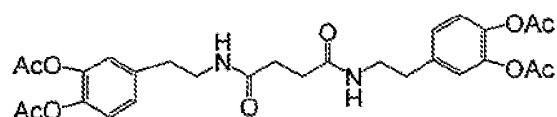
3,4-diacetoxifenetilamida do ácido 3,4-diacetoxicinâmico



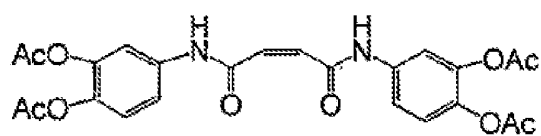
Bis(3,4-diacetoxibenzilamida) do ácido oxálico



Bis(3,4-diacetoxianilida) do ácido succínico

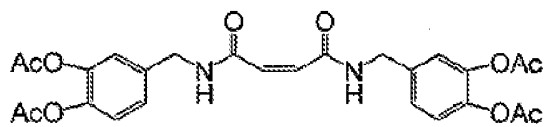


Bis(3,4-diacetoxi-fenetilamida) do ácido succínico



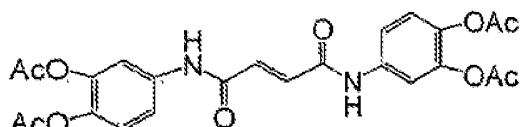
69C

Bis(3,4-diacetoxianilida) do ácido maleico



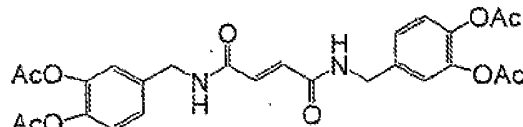
70C

Bis(3,4-diacetoxibenzilamida) do ácido maleico



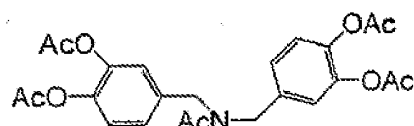
71C

Bis-(3,4-diacetoxi-anilida) do ácido fumárico



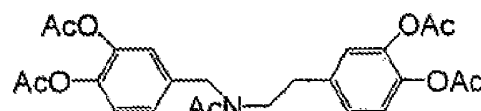
72C

Bis-(3,4-diacetoxi-benzilamida) do ácido fumárico



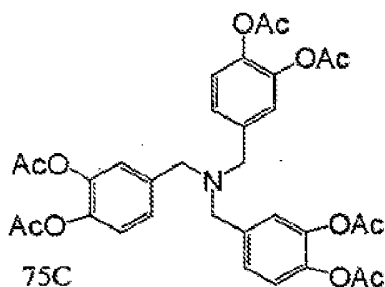
73C

N-acetil-bis-(3,4-diacetoxibenzil)-amina



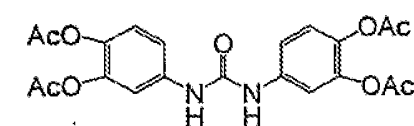
74C

N-acetil-N-(3,4-diacetoxibenzil)-3,4-diacetoxifenetilamina



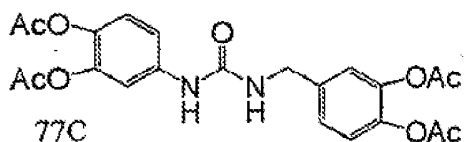
75C

tris-(3,4-diacetoxibenzil)-amina



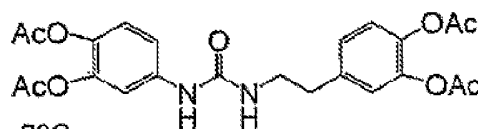
76C

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



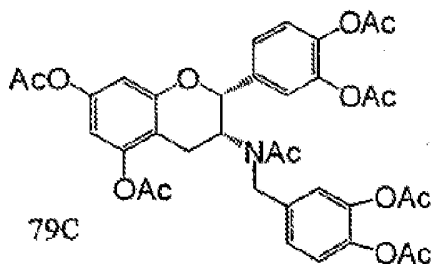
77C

1-(3,4-diacetoxifenil)-3-(3,4-diacetoxibenzil)ureia

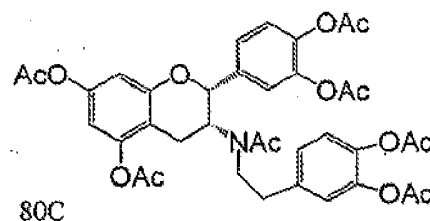


78C

1-(3,4-diacetoxifenil)-3-(3,4-diacetoxifenetil)ureia



79C
N-acetil-3-deoxi-3-(3,4-diacetoxi-
benzil)-amino-5,7,3',4'-tetracetil-
epicatequina



80C
N-acetil-3-deoxi-3-(3,4-diacetoxi-
fenetil)-amino-5,7,3',4'-tetracetil-
epicatequina

Exemplo 32: Composições de compostos desta invenção

Os compostos desta invenção, como mencionado previamente, são desejavelmente administrados na forma de composições farmacêuticas. Composições farmacêuticas adequadas, e o método da sua preparação, são bem conhecidas de pessoas de perícia vulgar na técnica e são descritas em tais tratados como *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, A. Gennaro, ed., 20^a edição, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadélfia, PA.

Composições representativas são como se segue:

Formulação de comprimido oral

Uma formulação de comprimido oral de um composto desta invenção é preparada como se segue:

	% p/p
Composto desta invenção	10,0
Estearato de magnésio	0,5
Amido	2,0
Hidroxipropilmetilcelulose	1,0

	<u>% p/p</u>
Celulose microcristalina	86,5

Os ingredientes são misturados até à homogeneidade, depois granulados com o auxílio de água, e os granulados secos. O granulado é depois comprimido em comprimidos dimensionados para dar uma dose adequada do composto. O comprimido é opcionalmente revestido por aplicação de uma suspensão de um agente formador de filme (p.ex. hidroxipropilmetilcelulose), pigmento (p.ex. óxido de titânio), e plastificante (p.ex. ftalato de dietilo), e secagem do filme por evaporação do solvente. O revestimento de filme pode compreender, por exemplo, 2-6% do peso do comprimido.

Formulação de cápsula oral

O granulado da secção prévia deste Exemplo é enchido em cápsulas duras de gelatina de um tamanho adequado à dose pretendida. A cápsula é unida por selagem, se desejado.

Formulação de gel suave

Uma formulação de gel suave é preparada como se segue:

	<u>% p/p</u>
Composto desta invenção	20,0
Polietileno glicol 400	80,0

O composto é dissolvido ou disperso no polietileno glicol, e um agente espessante adicionado se requerido. Uma quantidade da formulação suficiente para proporcionar a dose desejada do composto é depois enchida em géis suaves.

Formulação parenteral

Uma formulação parenteral é preparada como se segue:

	<u>% p/p</u>
Composto desta invenção	1,0
Salino normal	99,0

O composto é dissolvido no salino, e a solução resultante é esterilizada e enchida em frascos, ampolas, e seringas pré-cheias, como apropriado.

Formulação oral de libertação controlada

Uma formulação de libertação sustentada pode ser preparada pelo método da Patente dos EUA No. 4,710,384, como se segue:

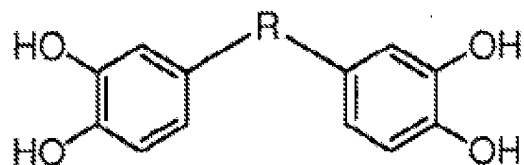
Um Kg de um composto desta invenção é revestido num revestidor de pó Uni-Glatt modificado com celulose de etilo Tipo 10 da Dow. A solução pulverizante é uma solução a 8% da celulose de etilo em acetona a 90% a etanol a 10%. Foi adicionado óleo de rícino como plastificante numa quantidade igual a 20% da celulose de etilo presente. As condições de pulverização são como se segue: 1) velocidade, 1 litro/hora; 2) batimento, 10-15%; 3) temperatura de entrada, 50°C, 4) temperatura de saída, 30°C, 5) percentagem de revestimento, 17%. O composto revestido é crivado até tamanhos de partícula entre 74 e 210 microns. É tomada atenção para assegurar uma boa mistura de partículas de diferentes tamanhos dentro dessa gama. Quatrocentos mg das partículas revestidas são misturados com 100 mg de

amido e a mistura é comprimida numa prensa manual até 1,5 tons para produzir um comprimido de libertação controlada de 500 mg.

Lisboa, 09 de Junho de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Um composto da fórmula:

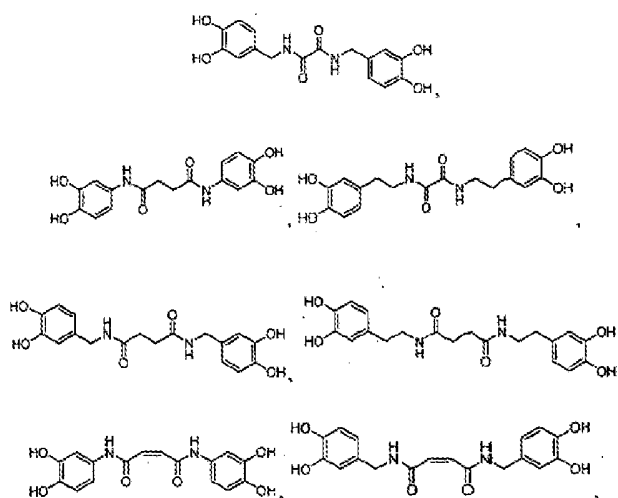


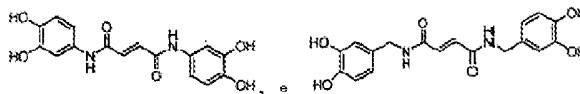
ou um seu sal farmacêuticamente aceitável, onde:

R é um grupo alquilenos C_6-C_{10} , no qual existem:

- i) opcionalmente 1 ou 2 ligações duplas não adjacentes;
- ii) 1 a 3 grupos metileno não adjacentes estão substituídos por NR' , O ou S, onde R' é H, acilo C_{2-4} ou alquilo C_{1-3} ; e
- iii) 2 grupos metileno estão substituídos por um grupo carbonilo ou hidroximetileno

2. O composto da reivindicação 1 selecionado de:





ou um seu sal farmacêuticamente aceitável.

3. Uma composição farmacêutica compreendendo o composto da reivindicação 1 ou 2 e um excipiente farmacêuticamente aceitável.
4. Um composto de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2 para uso no tratamento da formação, deposição, acumulação, ou persistência de fibrilas de amiloide ou fibrilas de sinucleína.
5. Um método *in vitro* de tratamento da formação, deposição, acumulação, ou persistência de fibrilas de amiloide ou fibrilas de sinucleína, compreendendo tratamento das fibrilas com uma quantidade eficaz de um composto de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2.
6. O composto da reivindicação 4 ou o método da reivindicação 5, em que as fibrilas de amiloide são fibrilas de amiloide A β ou fibrilas de amiloide IAPP.
7. O composto da reivindicação 4 ou o método da reivindicação 5, em que as fibrilas de sinucleína são fibrilas de α -sinucleína.
8. Um composto de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2 para uso no tratamento de uma doença da amiloide ou uma sinucleinopatia num mamífero sofrendo da mesma.

9. O composto da reivindicação 8, em que a doença da amiloide é uma doença associada à formação, deposição, acumulação, ou persistência de uma proteína amiloide selecionada do grupo consistindo em amiloide A β , amiloide AA, amiloide AL, amiloide IAPP, amiloide PrP, amiloide β 2-microglobulina, transtiretina, pré-albumina, e pró-calcitonina.
10. O composto da reivindicação 8, em que a doença da amiloide é selecionada do grupo de doenças consistindo em doença de Alzheimer, síndrome de Down, demência pugilística, atrofia de sistemas múltiplos, miositose de corpos de inclusão, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose do tipo Dutch, doença de Nieman-Pick do tipo C, angiopatia β -amiloide cerebral, demência associada a degeneração basal cortical, a amiloidose da diabetes do tipo 2, a amiloidose da inflamação crônica, a amiloidose da malignidade e Febre Mediterrânea Familiar, a amiloidose do mieloma múltiplo e discrasias das células B, a amiloidose das doenças do prião, doença de Creutzfeldt-Jakob, síndrome de Gerstmann-Straussler, kuru, tremor epizoótico, a amiloidose associada ao síndrome do canal cárpico, amiloidose cardíaca senil, polineuropatia amiloidótica familiar, e a amiloidose associada a tumores endócrinos.
11. O composto da reivindicação 8, em que a sinucleinopatia é uma doença associada à formação, deposição, acumulação, ou persistência de fibrilas de sinucleína, preferencialmente fibrilas de α -sinucleína.
12. O composto da reivindicação 8, em que a sinucleinopatia é selecionada do grupo de doenças consistindo em doença de Parkinson, doença de Parkinson familiar, doenças dos

corpos de Lewy, a variante dos corpos de Lewy da doença de Alzheimer, demência com corpos de Lewy, atrofia de sistemas múltiplos, e o complexo de Parkinsonismo-demência de Guam.

13. O composto da reivindicação 8, em que o mamífero é um humano.
14. O composto da reivindicação 8, que é para administração numa quantidade entre 0,1 mg/kg/dia e 1000 mg/kg/dia, preferencialmente entre 1 mg/kg/dia e 100 mg/kg/dia, mais preferencialmente entre 10 mg/kg/dia e 100 mg/kg/dia.
15. Uso de um composto de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2 no fabrico de um medicamento para tratamento
 - a) da formação, deposição, acumulação, ou persistência de fibrilas de amiloide ou fibrilas de sinucleína, ou
 - b) de uma doença da amiloide ou uma sinucleinopatia num mamífero sofrendo da mesma, preferencialmente em que a) é modificado pelas características das reivindicações 6 ou 7 ou em que b) é modificado pelas características de qualquer uma das reivindicações 9 a 14.

Lisboa, 09 de Junho de 2014

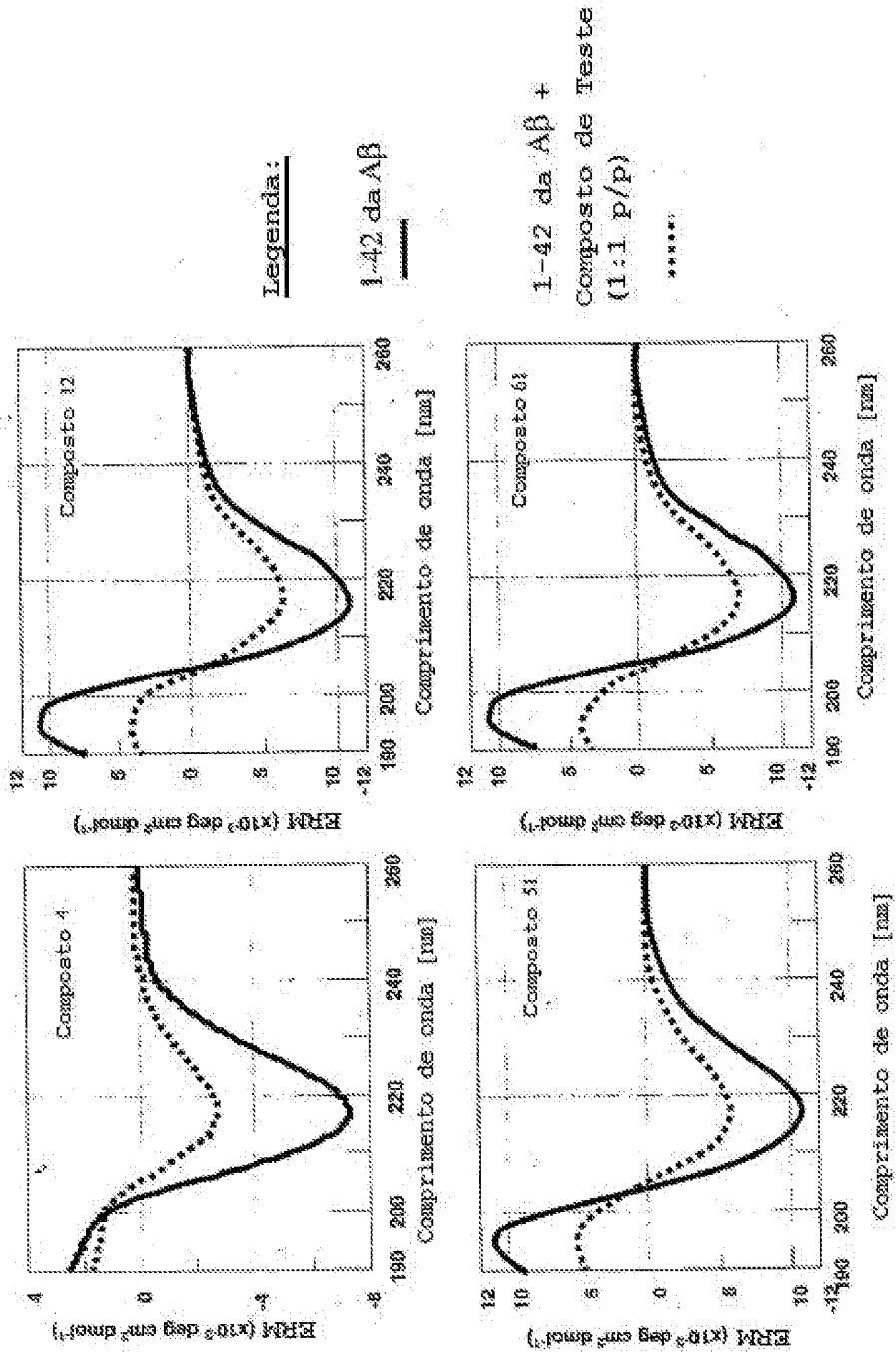


Figura 1

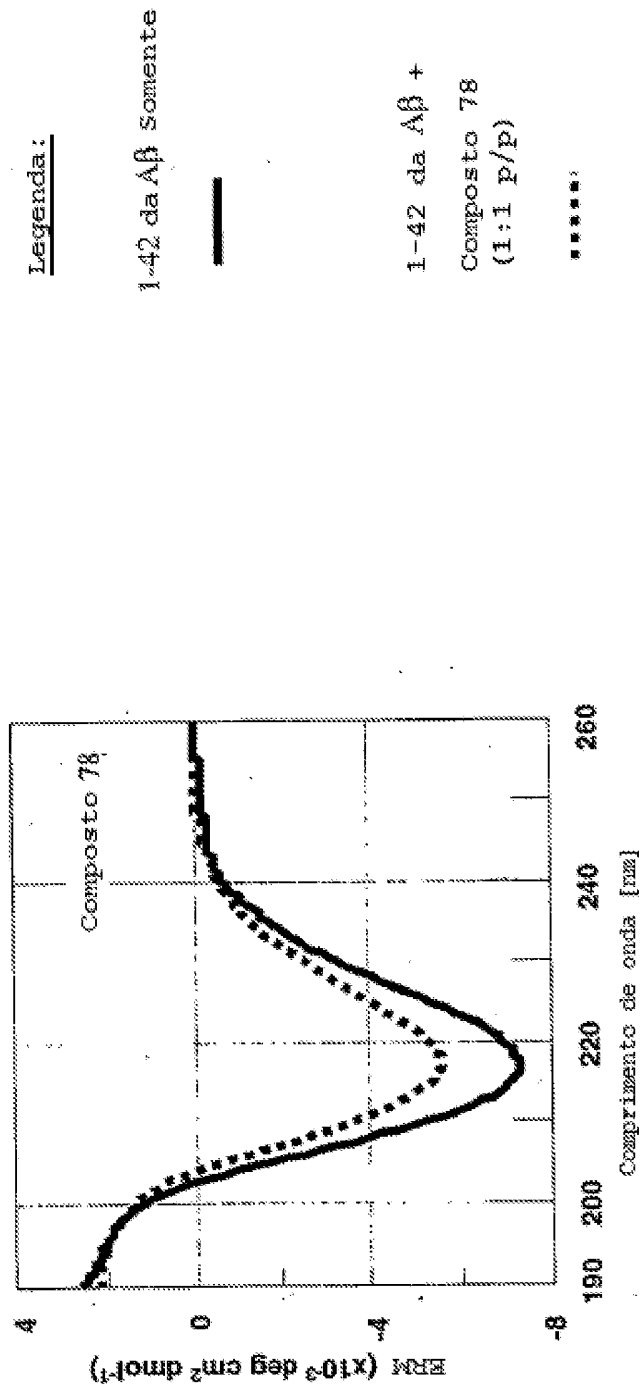


Figura 2

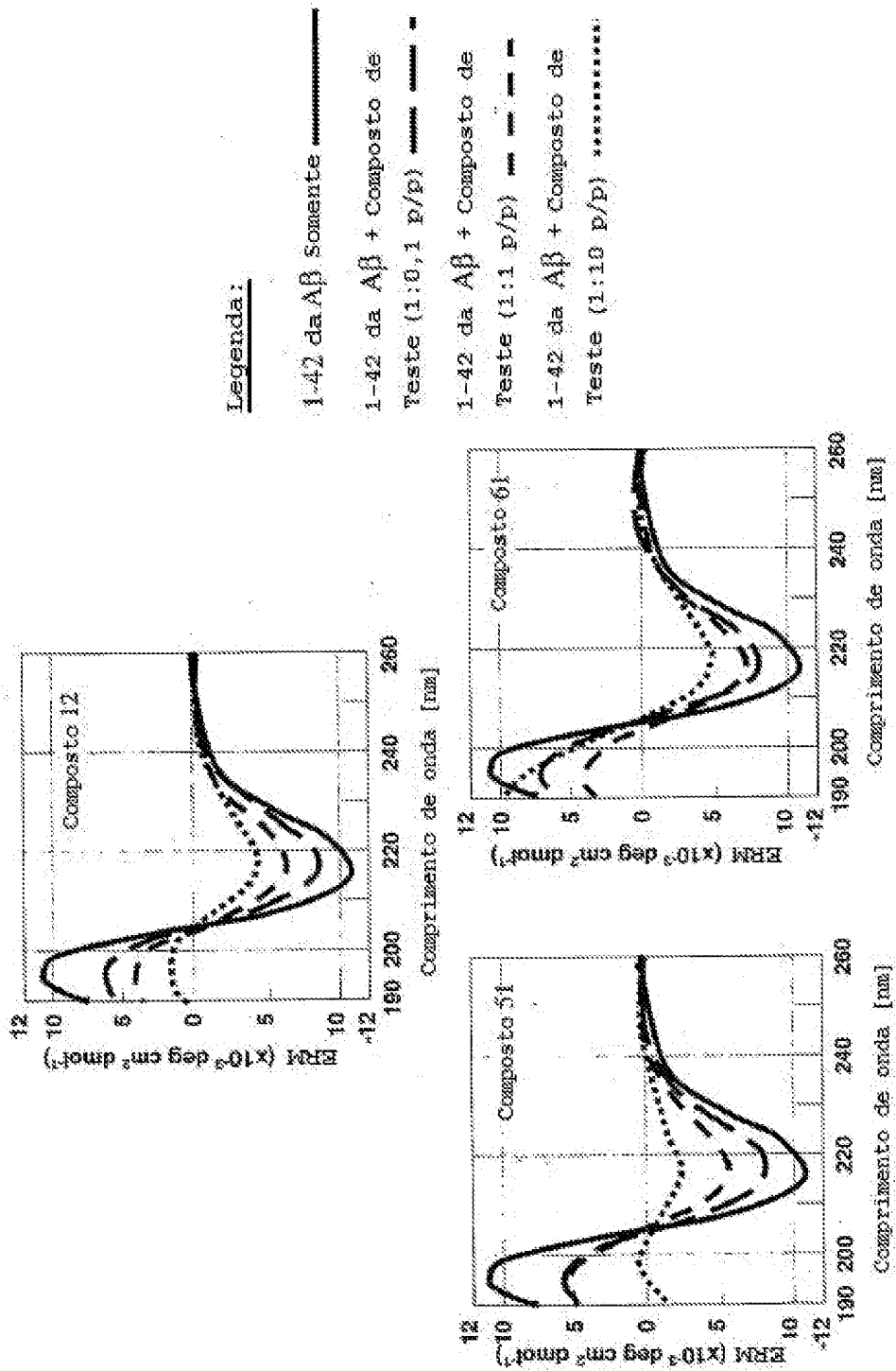


Figura 3