



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0408274-5 B1



(22) Data do Depósito: 15/03/2004

(45) Data de Concessão: 26/02/2019

(54) Título: COMPOSTOS DE LIGAÇÃO DE AMILOIDE E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: C07D 277/66; A61K 31/428; A61P 25/28.

(30) Prioridade Unionista: 14/03/2003 US 10/388,173; 22/08/2003 US 10/645,847.

(73) Titular(es): UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION.

(72) Inventor(es): WILLIAM E. KLUNK; CHESTER A. MATHIS JR; YANMING WANG.

(86) Pedido PCT: PCT US2004007797 de 15/03/2004

(87) Publicação PCT: WO 2004/083195 de 30/09/2004

(85) Data do Início da Fase Nacional: 12/09/2005

(57) Resumo: "COMPOSTO DE LIGAÇÃO DE AMILÓIDE, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E MÉTODO DE DETECÇÃO DE DEPÓSITO DE AMILÓIDE IN VIVO". A invenção proporciona compostos derivados do benzotiazol, composições que compreendem esses compostos, métodos de preparação desses compostos e métodos de uso desses compostos para detectar depósito(s) de amilóides e para diagnose de uma doença, desordem ou condição caracterizada por depósito(s) de amilóides. Os compostos encontram uso particular no diagnóstico e tratamento de pacientes com doenças onde a acumulação de placas neuríticas é prevalente. Os estados doentes ou doenças incluem, mas, sem limitação, a doença de Alzheimer, a doença familiar de Alzheimer, a síndrome de Down e homocigotos para o alelo E4 da apolipoproteína.

“COMPOSTOS DE LIGAÇÃO DE AMILOIDE**E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA”****RELATÓRIO DESCRITIVO****REFERÊNCIA REMISSIVA****A PEDIDOS DE PATENTE CORRELATOS**

[0001] Este é uma continuação em parte do Pedido de Patente US 10/388.173, depositado em 14 de março de 2003, e Pedido de Patente US 10/645.847, depositado em 22 de agosto de 2003, ambos os quais são incorporados como referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] A presente invenção refere-se a compostos de tioflavina e derivados específicos que são adequados para imageologia de depósitos de amilóides em pacientes vivos. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a um método para imageologia *in vivo* de depósitos de amilóides no cérebro para permitir o diagnóstico *ante-mortem* da doença de Alzheimer com derivados de tioflavina. A presente invenção refere-se também aos usos terapêuticos de tais compostos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0003] A doença de Alzheimer (“AD”) é um mal neurodegenerativo caracterizado por perda de memória e outras deficiências cognitivas. McKhann e colaboradores, *Neurology* **34**:939 (1984). É a causa mais comum de demência nos Estados Unidos. A AD pode atingir pessoas tão jovens quanto 40-50 anos de idade, ainda, porque a presença da doença é difícil de se determinar sem uma biópsia cerebral perigosa, a momento de instalação é desconhecido. Predominantemente a AD aumenta com a idade, com uma estimativa da população afetada

atingindo até 40-50% na idade de 85-90 anos. Evans e colaboradores, *JAMA* **262**:2551 (1989); Katzman, *Neurology* **43**:13 (1993).

[0004] Estudos sugerem que a deposição amiloidótica no cérebro é um evento causativo precoce na patogênese da doença de Alzheimer (AD). A progressão da deposição amiloidótica resulta na formação de placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares em regiões do cérebro que estão envolvidas no aprendizado e memória. Uma placa neurítica de Alzheimer típica compreende neuritos distróficos circundando um núcleo de material amilóide. O componente principal do núcleo amilóide é uma proteína chamada de beta-amilóide (A β).

[0005] Na prática, a AD é definitivamente diagnosticada através do exame do tecido cerebral, usualmente na autópsia. Khachaturian, *Arch. Neurol.* **42**:1097(1985); McKhann e colaboradores, *Neurology* **34**:939 (1984). Neuropatológica-mente, esta doença é caracterizada pela presença de placas neuríticas (NP), emaranhados neurofibrilares (NFT), e perda neuronal, em conjunto com uma variedade de outras observações. Mann, *Mech. Ageing Dev.* **31**:213 (1985). Amostras *post-mortem* de tecido cerebral de vítimas da doença de Alzheimer exibem a presença de amilóide na forma de núcleos extracelulares proteináceos de placas neuríticas que são características da AD.

[0006] Os núcleos amilóides destas placas neuríticas são compostos de uma proteína chamada β -amilóide (A β) que é disposta predominantemente em uma configuração em placa beta. Mori e colaboradores, *Journal of Biological Chemistry* **267**:17082 (1992); Kirschner e colaboradores, *PNAS* **83**:503 (1986). Placas neuríticas são um aspecto precoce e invariável da doença. Mann e colaboradores, *J. Neurol. Sci.* **89**:169; Mann, *Mech. Ageing Dev.* **31**:213 (1985); Terry e colaboradores, *J. Neuropathol. Exp. Neurol* **46**:262 (1987).

[0007] A deposição inicial de A β ocorre provavelmente muito antes que os sintomas clínicos sejam observáveis. O “critério microscópico mínimo” atualmente recomendado para o diagnóstico de AD é baseado no número de placas neuríticas encontradas no cérebro. Khachaturian,

Arch. Neurol., supra (1985). O acesso à contagem de placas neuríticas deve ser retardada até após a morte, entretanto.

[0008] Placas neuríticas contendo amilóide são características predominantes de áreas seletivas do cérebro na AD, bem como na síndrome de Down e em indivíduos homocigotos para o alelo da apolipoproteína E4, os quais são muito prováveis de desenvolver a AD. Corder e colaboradores, *Science* **261**:921 (1993); Divry, P., *J. Neurol. Psych.* **27**:643-657 (1927); Wisniewski e colaboradores, em Zimmerman, H. M. (ed.): *PROGRESS IN NEUROPATHOLOGY* (Grune and Stratton, N. Y. 1973) pgs. 1-26.

[0009] O amilóide cerebral é facilmente demonstrado pela marcação de seções cerebrais com tioflavina S ou vermelho do Congo. Puchtler e colaboradores, *J. Histochem. Cytochem.* **10**:35 (1962). O amilóide marcado com vermelho do Congo é caracterizado por um aparecimento dicróico, exibindo uma polarização colorida amarelo-verde. A ligação dicróica é o resultado da estrutura em placa beta das proteínas amilóides. Glenner, G.N. *Eng. J. Med.* **302**:1283 (1980). Uma discussão detalhada da bioquímica e histoquímica de amilóide pode ser encontrada em Glenner, N. *Eng. J. Med.*, **302**:1333 (1980).

[00010] Até hoje, o diagnóstico da AD foi obtido principalmente através da avaliação de critérios clínicos, biópsia cerebral e estudos de tecidos *post-mortem*. Esforços de pesquisa para desenvolver métodos para o diagnóstico da doença de Alzheimer *in vivo* incluem (teste genético), (2) métodos de imunensaio e (3) técnicas de imageologia.

[00011] A evidencia de que anomalias no metabolismo de A β são necessárias e suficientes para o desenvolvimento de AD é baseada na descoberta de mutações pontuais na proteína precursora de A β em várias famílias raras com uma forma dominante autossômica de AD. Hardy, *Nature Genetics* **1**:233 (1992); Hardy e colaboradores, *Science* **256**:184 (1992). Estas mutações ocorrem próximas aos pontos de clivagem terminais necessários para a geração de A β a partir de sua proteína precursora. St. George-Hyslop e colaboradores, *Science*

235:885 (1987); Kang e colaboradores, *Nature* **325:733**(1987); Potter WO 92/17152. A análise genética de um grande número de famílias AD demonstrou, entretanto, que a AD é geneticamente heterogênea. St. George-Hyslop e colaboradores, *Nature* **347:194** (1990). A ligação a marcadores do cromossomo 21 é demonstrada em apenas algumas famílias com AD instalada precocemente e em nenhuma família com AD instalada tardiamente. Mais recentemente foi identificado por Sherrington e colaboradores, *Nature* **375:754-760** (1995), um gene no cromossomo 14 cujo produto prevê-se conter domínios transmembrana múltiplos e se assemelha a uma proteína de membrana integral. Este gene pode ser responsável por até 70% da AD dominante autossômica instalada precocemente. Dados preliminares sugerem que esta mutação do cromossomo 14 provoca um aumento na produção de A β . Scheuner e colaboradores, *Soc. Neurosci. Abstr.* **21:1500** (1995). Uma mutação em um gene muito semelhante foi identificada no cromossomo 1 de famílias volga-alemãs com AD instalada precocemente. Levy-Lahad e colaboradores, *Science* **269:973-977** (1995).

[00012] A varredura para o genótipo da apolipoproteína E foi sugerida como um auxílio no diagnóstico da AD. Scott, *Nature* **366:502** (1993); Roses, *Ann. Neurol.* **38:6-14** (1995). No entanto, ocorrem dificuldades com esta tecnologia, tendo em vista que o alelo da apolipoproteína E4 é apenas um fator de risco para a AD, não um marcador da doença. Está ausente em muitos pacientes de AD e presente em muitos indivíduos idosos não demenciados. Bird, *Ann. Neurol.* **38:2-4** (1995).

[00013] Foram desenvolvidos métodos de imunoensaio para a detecção da presença de marcadores neuroquímicos em pacientes de AD e para detectar uma proteína amilóide relacionada com AD em fluido espinal. Warner, *Anal. Chem.* **59:1203A** (1987); Patente Internacional 92/17152 por Potter; Glenner e colaboradores, documento de Patente US 4.666.829. Não se provou que estes métodos para o diagnóstico de AD detectam AD em todos os pacientes,

particularmente nos estágios iniciais da doença e são relativamente invasivos, requerendo punção lombar. Da mesma forma, foram realizadas tentativas para se desenvolver anticorpos monoclonais como sondas para a imageologia de A β . Majocha e colaboradores, *J. Nucl. Med.*, **33**:2184 (1992); Majocha e colaboradores, WO 89/06242 e Majocha e colaboradores, Patente US 5.231.000. A principal desvantagem das sondas de anticorpos é a dificuldade em fazer-se que estas moléculas grandes atravessem a barreira hematoencefálica. A utilização de anticorpos para o diagnóstico *in vivo* de AD requer anomalias marcadas na barreira hematoencefálica de maneira a ter-se acesso ao cérebro. Não existe qualquer evidencia funcional convincente de que anomalias na barreira hematoencefálica existam seguramente na AD. Kalaria, *Cerebrovascular & Brain Metabolism Reviews* **4**:226 (1992).

[00014] Peptídeo A β radiomarcado foi utilizado para marcar placas compactas e do tipo neurítico em seções de cérebro com AD. Ver Maggio e colaboradores, WO 93/04194. Entretanto, estes peptídeos compartilham todas as desvantagens dos anticorpos. Especificamente, os peptídeos normalmente não atravessam a barreira hematoencefálica em quantidades necessárias para imageologia e, tendo em vista que estas sondas reagem com placas difusas, podem não ser específicas para AD.

[00015] Placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares são as duas indicações patológicas mais características da AD. Klunk e Abraham, *Psychiatric Development*, **6**:121-152 (1988). As placas ocorrem inicialmente no neocórtex onde são relativamente distribuídas de modo homogêneo. Thal e colaboradores, *Neurology* **58**:1791-1800 (2002). Os emaranhados aparecem primeiro nas áreas límbicas, tais como o córtex transentorrinal e progridem em um padrão topográfico previsível para o neocórtex. Braak e Braak, *Acta Neuropathologica* **82**:239-259 (1991). Arnold e colaboradores mapearam a distribuição de ENF e placas neuríticas nos cérebros de pacientes com AD. Arnold e

colaboradores, *Cereb. Cortex* **1**: 103-116 (1991). Em comparação com ENF, as placas neuríticas eram, em geral, distribuídas mais uniformemente através do córtex, com a exceção de umas poucas placas neuríticas notadamente no perialocórtex e alocórtex límbicos (as áreas com maior densidade de ENF). Pela marcação com tioflavina S, os lóbulos temporal e occipital apresentaram as densidades de placa neurítica mais elevadas, os lóbulos límbico e frontal apresentaram as mais baixas, e o lóbulo parietal foi intermediário. Arriagada e colaboradores, *Neurology* **42**:1681-1688 (1992). Arriagada *et al* estudaram a distribuição topográfica das alterações patológicas do tipo AD nos cérebros de indivíduos idosos presumidamente não demenciados. Suas observações sugerem que a maioria dos indivíduos com idade acima de 55 anos apresenta pelo menos um pouco de ENF e placas. Subtipos imunohistoquimicamente definidos de SP apresentaram padrões distintos de distribuição com placas A β imunoreativas presentes nas áreas neocorticais muito maiores que nas áreas límbicas e placas Alz-50 imunoreativas sendo não freqüentes e se limitando àquelas áreas que contêm neurônios Alz-50-positivos e ENF. Estes padrões sugerem uma existência de atributos comuns nos processos patológicos que levam ao ENF e SP tanto no envelhecimento quanto na AD.

[00016] Permanece o debate quanto a se as placas e emaranhados são sub-produtos do processo neurodegenerativo encontrado na AD ou se são a causa de morte celular neuronal. Ross, *Current Opinion in Neurobiol.* **96**:644-650(1996); Terry, *J. of Neuropath. & Exp. Neurol.* **55**:1023-1025(1996); Terry, *J. Neural Transmission-Suppl.* **53**:141-145 (1998). É clara a evidência de que a perda sináptica neocortical e hipocampal se correlaciona bem com status cognitivo pré-mórbido. Alguns pesquisadores sugerem que a ruptura da estrutura e função microtubular, causada pela hiperfosforilação da proteína associada a microtúbulos, tau, representa o papel etiológico chave na perda sináptica em particular e na AD em geral. Terry, *J. of Neuropath. & Exp. Neurol.* **55**:1023-1025 (1996); Terry, *J. of Neural*

Transmission-Suppl. **53**:141-145 (1998). Dano oxidativo e ruptura de membrana foram propostos como representando papéis importantes na AD. Perry, *Free Radical Biology & Medicine* **28**:831-834 (2000); Pettegrew e colaboradores, *Annals of the New York Academy of Sciences* **826**: 282-306 (1997). Fatores vasculares incluindo hipoperfusão cerebral sutil crônica foram também implicados na patogênese da AD. De la Torre, *Annals of the New York Academy of Sciences* **903**:424-436 (2000); Di Iorio e colaboradores, *Aging (Milano)* **11**:345-352 (1999). Enquanto todos estes fatores são prováveis de representar algum papel na patogênese da AD, aumentam as evidências apontando para anomalias no processamento do peptídeo beta-amilóide (A β), um peptídeo de 4 kD que se agrega em uma estrutura em placa β fibrilar. Glenner e Wong, *Biochemical & Biophysical Research Communications* **120**:885-890 (1984). Foi proposto que a A β representa um papel importante na patogênese da AD por várias razões: 1) depósitos de A β são os marcadores neuropatológicos mais precoces da AD na síndrome de Down, e pode preceder a formação de ENF por várias décadas; Mann e colaboradores, *Neurodegeneration* **1**:201-215 (1992); Naslund, e colaboradores, *JAMA* **283**:1571-1577 (2000). 2) a β -amiloidose é relativamente específica para AD e distúrbios proximamente relacionados; Selkoe, *Trends in Neurosciences* **16**:403-409 (1993). 3) a A β é tóxica para neurônios cultivados, Yankner, *Neurobiol. Aging* **13**:615-616 (1992); Mattson e colaboradores, *J. Neuroscience* **12**:376-389 (1992); Shearman e colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:1470-1474 (1994), uma toxidez que aparentemente é dependente da estrutura secundária em placa β e agregação em pelo menos oligômeros. Lambert e colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:6448-6453 (1989); Pike e colaboradores, *J. Neuroscience* **13**:1676-1687 (1993); Simmons e colaboradores, *Molecular Pharmacology* **45**:373-379 (1994). Embora seja certo que a A β existe em um equilíbrio distribuído por frações monoméricas, oligoméricas e fibrilar/placa, a forma oligomérica da A β foi fortemente implicada como sendo o componente neurotóxico chave.

Selkoe, *Alzheimer disease*, editado por R.D. Terry, e colaboradores, pp. 293-310 Lippincott Williams e Wilkins, Filadélfia (1999); Selkoe, *Science* **298**,789-91 (2002). O reconhecimento dos efeitos tóxicos da A β oligomérica formou uma base para a solução para alguns oponentes da “hipótese da cascata amilóide” da AD. Terry, *Ann. Neurol.*, **49**:684 (2001). Talvez a evidência mais forte do papel da A β na patogênese da AD venha da descoberta de mutações no gene da proteína precursora amilóide (APP) o que levou a algumas formas de AD familiar instalada precocemente. Goate e colaboradores, *Nature* **349**:704-706 (1991). Adicionalmente, todas as formas familiares de AD dominante autossômica têm em comum um nível elevado da forma da A β de 42 aminoácidos que agrega mais rapidamente. Younkin *Rinsho Shinkeigaku - Clinical Neurology* **37**:1099 (1997). Em contraste, nenhuma mutação na proteína tau mostrou-se como sendo causadora da AD. Em vez disto, as mutações na tau (cromossomo 17) são ligadas à demência fronto-temporal com parkinsonismo. Goedert e colaboradores, *Neuron* **21**:955-958 (1998). Evidência recente mostrou uma boa correlação entre os níveis de A β no cérebro e o declínio cognitivo na AD, e a deposição de amilóide aparenta ser um evento muito precoce, talvez mesmo o primeiro, na patogênese da AD, precedendo qualquer diminuição da capacidade cognitiva. Naslund, e colaboradores, *JAMA* **283**:1571-1577 (2000). Sua presença pode modular um número de rotas bioquímicas que resultam na deposição de ainda outras proteínas, na ativação da astroglia e microglia, e eventualmente morte celular neuronal e consequente disfunção cognitiva.

[00017] Dados sugerem que compostos que se ligam a amilóide apresentam potencial terapêutico na AD e diabetes melito tipo 2. Reações morfológicas, incluindo astrocitose reativa, neurites distróficas, células de microglia ativadas, perda sináptica, e ativação complementar completa encontrada em torno de placas neuríticas, todas significam que processos neurotóxicos e degenerativos celulares estão ocorrendo nas áreas adjacentes a estes depósitos de A β . Joachim e colaboradores,

Am. J. Pathol. **135**:309 (1989); Masliah e colaboradores, *loc. cit.* **137**:1293 (1990); Lue e Rogers, *Dementia* **3**:308 (1992). Neurotoxicidade induzida por A β e degeneração celular foram reportadas em um número de tipos celulares *in vitro*. Yankner e colaboradores, *Science* **250**:279 (1990); Roher e colaboradores, *BBRC* **174**:572 (1991); Frautschy e colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**:83362 (1991); Shearman e colaboradores, *loc. cit.* **91**:1470 (1994). Foi demonstrado que a agregação do peptídeo A β é necessária para a neurotoxicidade *in vitro*. Yankner, *Neurobiol. Aging* **13**:615 (1992). Recentemente, três laboratórios reportaram resultados que sugerem que o vermelho do Congo inibe neurotoxicidade induzida por A β e degeneração celular *in vitro*. Burgevin e colaboradores, *Neuro Report* **5**:2429 (1994); Lorenzo e Yankner, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**:12243 (1994); Pollack e colaboradores, *Neuroscience Letters* **184**:113 (1995); Pollack e colaboradores, *Neuroscience Letters* **197**:211 (1995). O mecanismo parece envolver tanto a inibição da formação de fibrila quanto a prevenção das propriedades neurotóxicas das fibrilas formadas. Lorenzo e Yankner, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**:12243 (1994). Demonstrou-se que o vermelho do Congo protege as células da ilhota pancreática contra a toxidez causada pela amilina. Lorenzo e Yankner, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**:12243 (1994). Amilina é um peptídeo fibrilar semelhante à A β que é acumulado no pâncreas em diabetes melito tipo 2.

[00018] É conhecido na técnica que certos corantes azo, tais como vermelho do Congo, podem ser carcinogênicos. Morgan e colaboradores, *Environmental Health Perspectives*, 102 (supl.) **2**:63-78, (1994). Este potencial carcinogênico parece ser grandemente baseado no fato de corantes azo serem extensivamente metabolizados à amina parental pelas bactérias intestinais. Cerniglia e colaboradores, *Biochem. Biophys. Res.Com.*, **107**:1224-1229, (1982). No caso de corantes de benzidina (e muitas outras benzidinas substituídas), é a amina livre que é carcinogênica. Estes fatos têm poucas implicações para os estudos de imageologia de amilóide nos quais uma quantidade

extremamente pequena do corante radiomarcado com atividade específica alta é diretamente injetada na corrente sanguínea. Neste caso, a quantidade administrada é desprezível e o corante não é atacado pelas bactérias intestinais.

[00019] No caso de uso terapêutico, estes fatos apresentam importância crítica. A liberação de um carcinogênico conhecido a partir de um composto terapêutico é inaceitável. Um segundo problema com o metabolismo de corante diazo é que a maior parte da droga administrada é metabolizada pelas bactérias intestinais antes de sua absorção. Esta biodisponibilidade diminuída permanece uma desvantagem mesmo que os metabólitos liberados sejam inócuos.

[00020] A tioflavina T é um corante básico primeiro descrito como um corante seletivo de amilóide em 1959 por Vassar e Culling, *Arch. Pathol.* **68**:487 (1959). Schwartz e colaboradores, *Zbl. Path.* **106**:320 (1964), foram os primeiros a demonstrar o uso da tioflavina S, um corante ácido, como um corante de amilóide em 1964. As propriedades tanto da tioflavina T quanto da tioflavina S têm sido desde então estudadas em detalhes. Kelenyi, *J. Histochem. Cytochem.* **15**:172 (1967); Burns e colaboradores, *J. Path. Bact.* **94**:337(1967); Guntern e colaboradores, *Experientia* **48**:8 (1992); LeVine, *Meth. Enzymol.* **309**:274 (1999). A tioflavina S é comumente utilizada no estudo *post-mortem* da deposição amiloidótica em cérebro com AD, onde se mostrou como sendo uma das técnicas mais sensíveis para se demonstrar placas senis. Vallet e colaboradores, *Acta Neuropathol.* **83**:170 (1992). A tioflavina T tem sido freqüentemente utilizada como um reagente para se estudar a agregação de proteínas amilóides solúveis em fibrilas em placa beta. Levine, *Proc. Sci.* **2**:404 (1993). Derivados de amina quaternária relacionados à tioflavina T foram propostos com agentes de imageologia de amilóide, embora nenhuma evidencia da absorção cerebral destes agentes tenha sido apresentada. Caprathe e colaboradores, Patente US 6.001.331.

[00021] Uma vez que a deposição de amilóide pode ocorrer antes

que os sintomas clínicos da AD sejam observáveis, a detecção e quantificação dos depósitos amiloidóticos poderia facilitar o diagnóstico da AD em seus estágios iniciais pré-sintomáticos. Ver Patente US 6.417.178. Técnicas de imageologia, tais como tomografia por emissão positrônica (PET) e tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT), são efetivas no monitoramento do acúmulo de depósitos amiloidóticos no cérebro e na correlação destes com a progressão da AD. a aplicação destas técnicas requer o desenvolvimento de radioligantes que entrem facilmente no cérebro e seletivamente se liquem aos depósitos amiloidóticos *in vivo*.

[00022] A incapacidade de se acessar a deposição amiloidótica na AD até após a morte impede o estudo desta doença devastadora. Um método para quantificar a deposição amiloidótica antes da morte é necessário tanto como uma ferramenta de diagnóstico em casos brandos ou clinicamente confusos quanto no monitoramento da eficácia de terapias destinadas a prevenir a deposição de A β . Desta forma, perma-nece da maior importância desenvolver-se um método seguro e específico para o diagnóstico de AD antes da morte, por imageologia amiloidó-tica no cérebro *in vivo*. Mesmo embora várias tentativas tenham sido realizadas para se diagnosticar a AD *in vivo*, atualmente, não existe qualquer sonda *ante-mortem* para amilóide cerebral. Nenhum método utilizou uma sonda de alta afinidade para amilóide que tivesse baixa toxidez, pudesse atravessar a barreira hematoencefálica, e se ligasse mais efetivamente ao cérebro com AD que ao cérebro normal de maneira a identificar depósitos amiloidóticos deAD antes da morte do paciente. Assim, nenhum método *in vivo* para o diagnóstico de AD mostrou atender estes critérios.

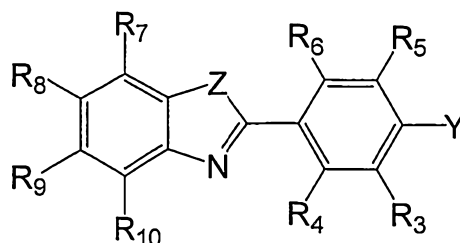
[00023] Existe a necessidade de compostos que se liguem a amilóide que não sejam tóxicos e possam atravessar a barreira hematoencefálica, e, conseqüentemente, possam ser utilizados em diagnósticos. Com esta finalidade, os presentes inventores determinaram que variando substituições em diferentes posições pode aumentar

a afinidade ligante dependendo da posição do substituinte.

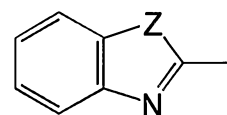
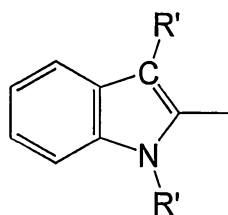
[00024] Adicionalmente, os presentes inventores desenvolveram uma série de derivados não carregados de tioflavina T como agentes de imageologia amiloidótica que exibem alta afinidade por depósitos amiloidóticos e alta permeabilidade através da barreira hematoencefálica. Estudos intensivos *in vitro* e *in vivo* destes agentes de imageologia amiloidótica sugerem que estes se ligam especificamente aos depósitos amiloidóticos a concentrações típicas daquelas obtidas durante os estudos de tomografia por emissão positrônica. No ambiente complexo do cérebro humano, ligação não específica dos compostos de imageologia amiloidótica é baixa, mesmo em cérebros de controle destituídos de depósitos amiloidóticos. A concentrações nanomolares, estes compostos parecem não se ligar aos emaranhados neurofibrilares.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[00025] Desta forma é uma realização da presente invenção prover compostos que permitem um método seguro e específico para o diagnóstico da AD antes da morte, por imageologia *in vivo* do amilóide no parênquima cerebral. Os compostos úteis para este propósito apresentam a seguinte fórmula:

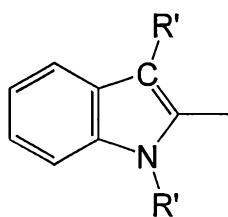


onde Z is S, NR', O ou C(R')₂ caso em que a forma tautomérica do anel heterocíclico pode se tornar um indol no qual R' é H ou um grupo alquil inferior:



onde Y é NR^1R^2 , OR^2 , ou SR^2 ; onde o nitrogênio de

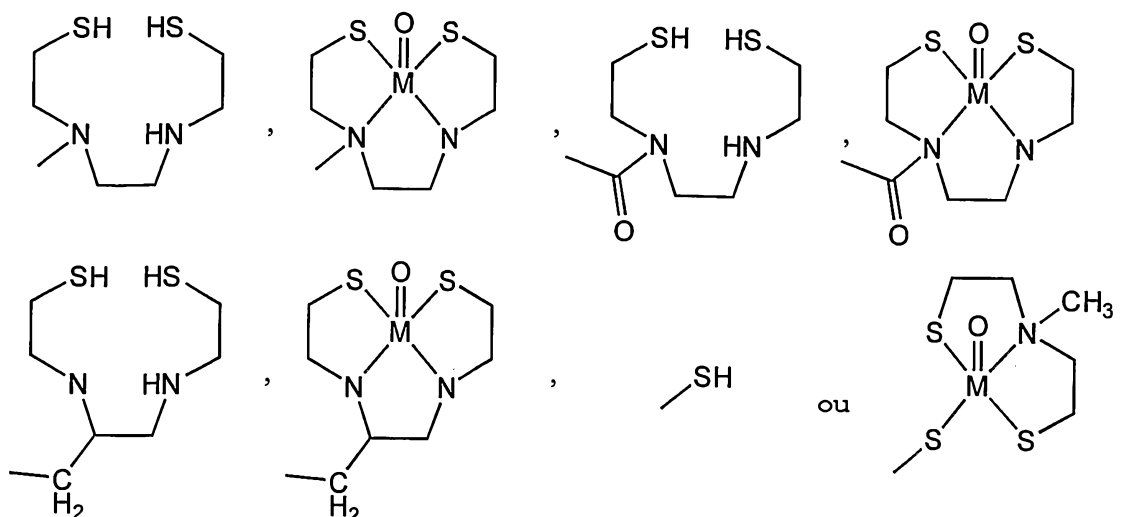
ou



não é uma amina quaternária;

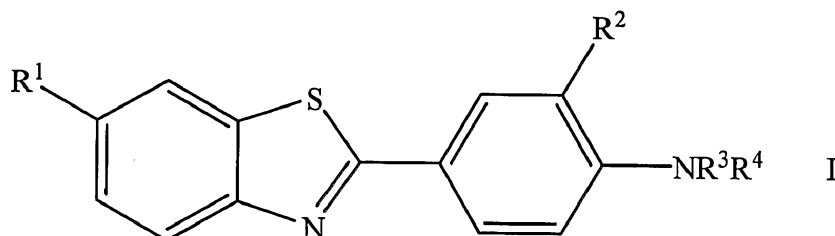
onde cada R^1 e R^2 é selecionado independentemente do grupo consistindo em H, um grupo alquil inferior, $(\text{CH}_2)_n\text{OR}'$ (onde $n = 1, 2$, ou 3), CF_3 , $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{X}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{X}$ (onde $\text{X} = \text{F}, \text{Cl}, \text{Br}$ ou I), $(\text{C}=\text{O})\text{-R}'$, R_{ph} , e $(\text{CH}_2)_n\text{R}_{\text{ph}}$ (onde $n = 1, 2, 3$, ou 4 e R_{ph} representa um grupo fenil não substituído ou substituído com os substituintes do fenil sendo escolhidos de qualquer dos substituintes não fenil definidos abaixo para $\text{R}^3\text{-R}^{10}$ e R' is H ou um grupo alquil inferior);

cada $\text{R}^3\text{-R}^{10}$ independentemente é selecionado do grupo consistindo em H, F, Cl, Br, I, um grupo alquil inferior, $(\text{CH}_2)_n\text{OR}'$ (onde $n = 1, 2$, ou 3), CF_3 , $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{X}$, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{X}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{X}$, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{X}$ (onde $\text{X} = \text{F}, \text{Cl}, \text{Br}$ ou I), CN , $(\text{C}=\text{O})\text{-R}'$, $\text{N}(\text{R}')_2$, NO_2 , $(\text{C}=\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$, $\text{O}(\text{CO})\text{R}'$, OR' , SR' , COOR' , R_{ph} , $\text{CR}'=\text{CR}'\text{-R}_{\text{ph}}$, $\text{CR}'_2\text{-CR}'_2\text{-R}_{\text{ph}}$ (onde R_{ph} representa um grupo fenil não substituído ou substituído com os substituintes do fenil sendo escolhidos de qualquer dos substituintes não fenil definidos para $\text{R}^1\text{-R}^{10}$ e onde R' é H ou um grupo alquil inferior), um tri-alkil estanho e um grupo quelante (com ou sem um grupo metálico quelante) da forma W-L ou V-W-L , onde V é selecionado do grupo consistindo em -COO- , -CO- , $\text{-CH}_2\text{O-}$ e $\text{-CH}_2\text{NH-}$; W é $\text{-(CH}_2)_n$ onde $n = 0, 1, 2, 3, 4$, ou 5 ; e L são:



onde M é selecionado do grupo consistindo em Tc e Re.

[00026] Outra realização refere-se a compostos de fórmula I:



ou um sal, hidrato, solvato ou pró-droga do composto, onde:

R¹ é hidrogênio, -OH, -NO₂, -CN, -COOR, -OCH₂OR, alquil C₁-C₆, alquenil C₂-C₆, alquinil C₂-C₆, alcoxi C₁-C₆ or halogênio, onde um ou mais dos átomos de R' podem ser um átomo radiomarcado;

R é alquil C₁-C₆, onde um ou mais dos átomos de carbono podem ser um átomo radiomarcado;

R² é hidrogênio, um halogênio não radioativo ou um halogênio radioativo;

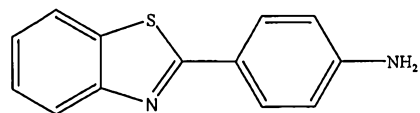
R³ é hidrogênio, alquil C₁-C₆, alquenil C₂-C₆ ou alquinil C₂-C₆; e

R⁴ é hidrogênio, alquil C₁-C₆, alquenil C₂-C₆ or alquinil C₂-C₆, onde alquil, alquenil ou alquinil compreende carbono radioativo ou é substituído com um halogênio radioativo quando R² é hidrogênio ou um halogênio não radioativo;

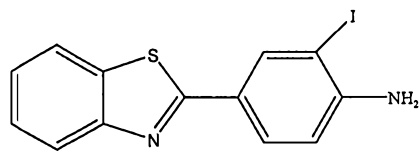
desde que quando R¹ é hidrogênio ou -OH, R² é hidrogênio e R⁴ é -¹¹CH₃, então R³ é alquil C₂-C₆, alquenil C₂-C₆ or alquinil C₂-C₆; e

ainda desde que quando R¹ é hidrogênio, R² hidrogênio e R⁴ é -CH₂CH₂CH₂¹⁸F, então R³ é alquil C₂-C₆, alquenil C₂-C₆ ou alquinil C₂-C₆.

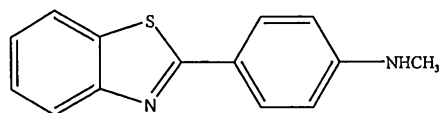
[00027] Outra realização refere-se a compostos selecionados do grupo consistindo nas estruturas 1-45, os quais são úteis nos métodos descritos:



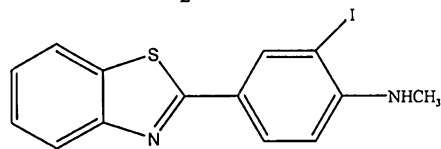
1



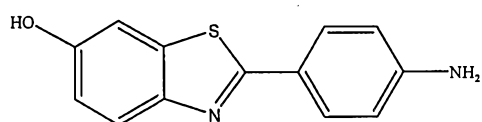
2



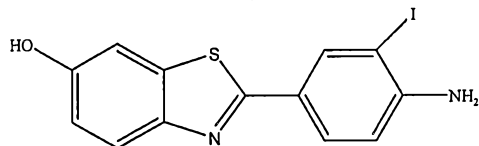
3



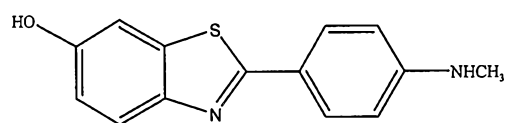
4



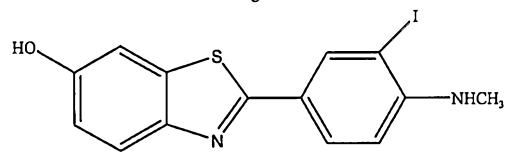
5



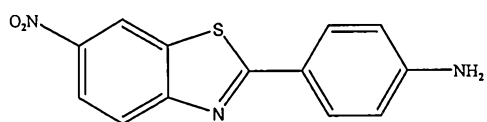
6



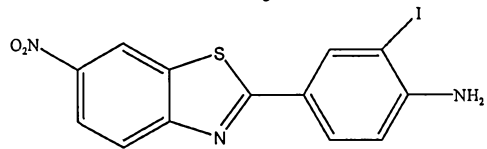
7



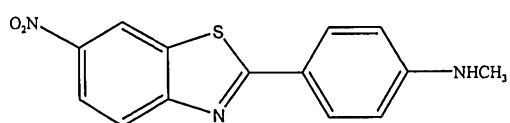
8



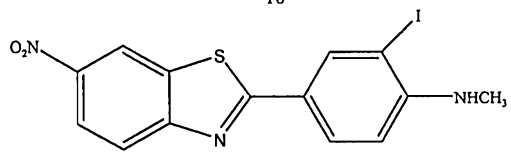
9



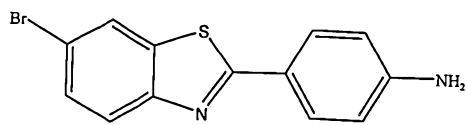
10



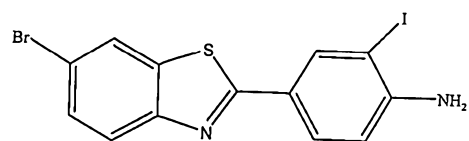
11



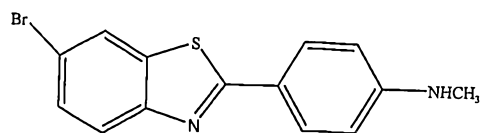
12



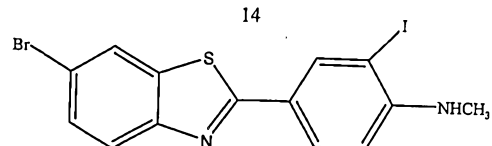
13



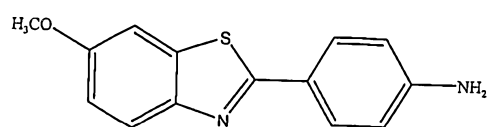
14



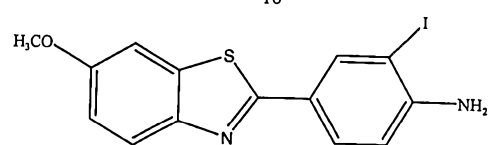
15



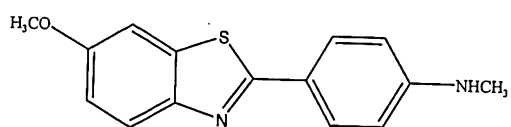
16



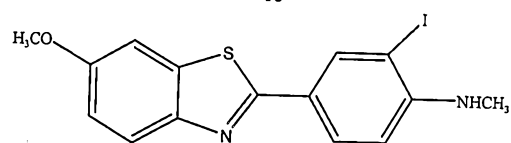
17



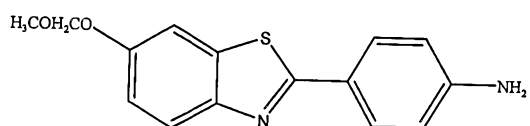
18



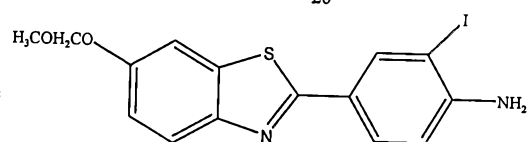
19



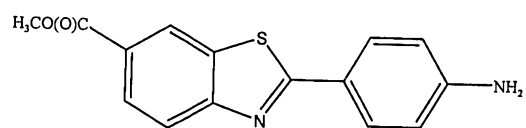
20



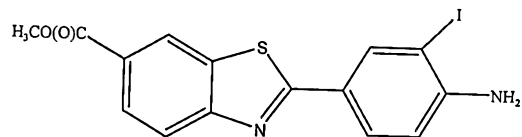
21



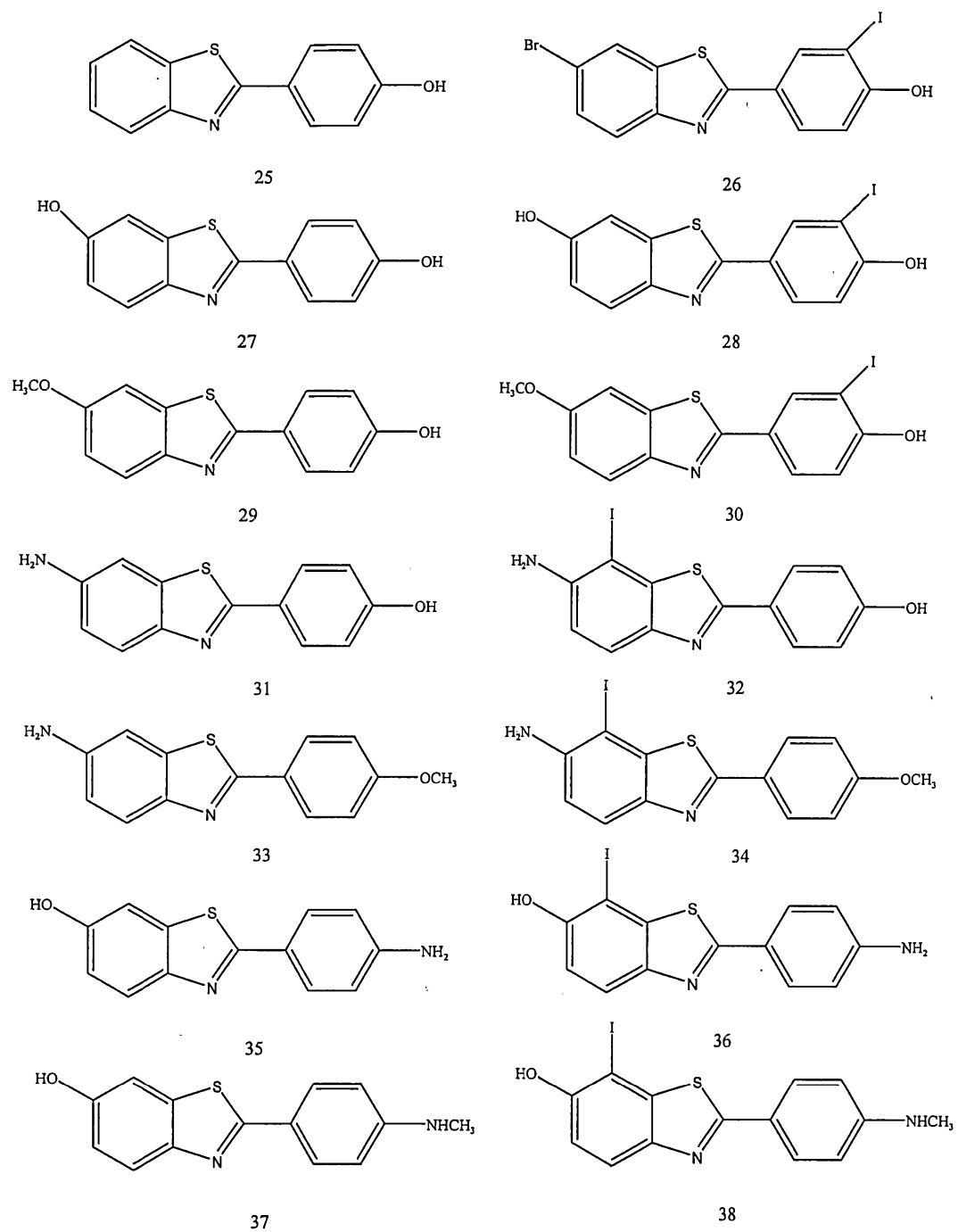
22

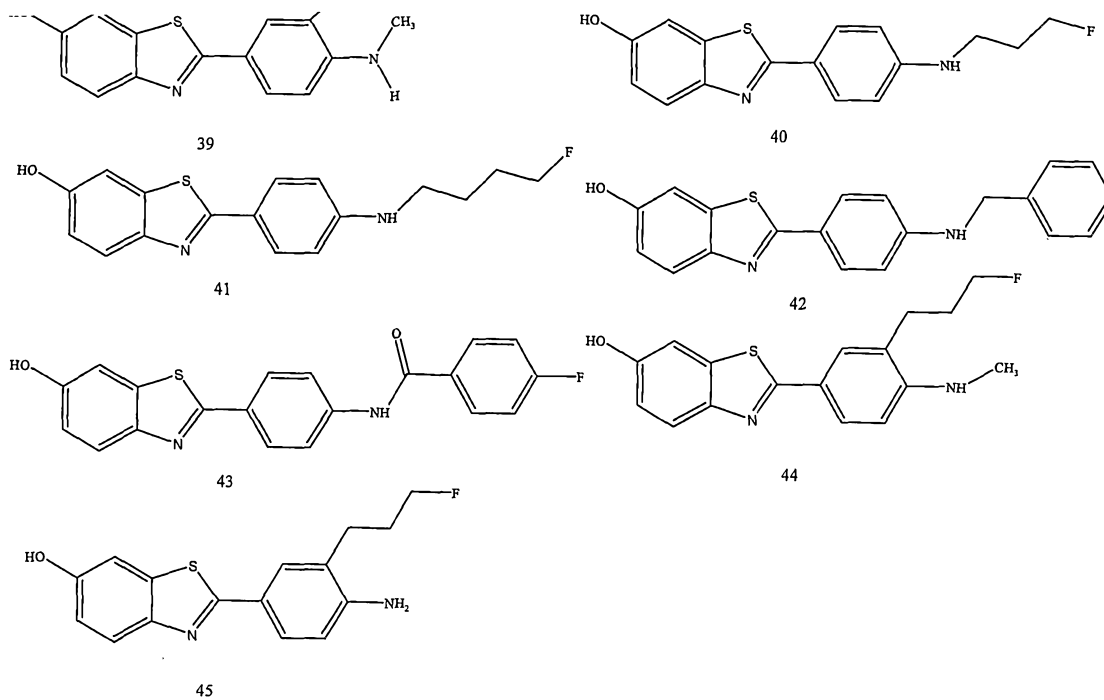


23

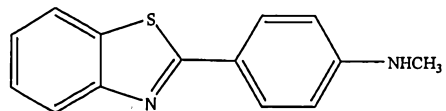


24

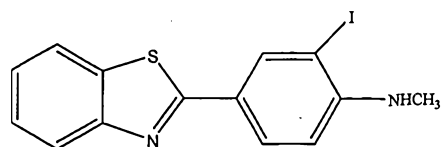




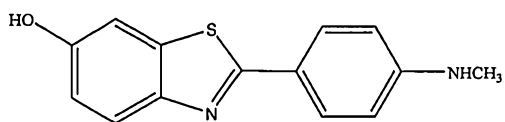
[00028] Ainda outra realização refere-se a um composto ligante de amilóide apresentando uma estrutura selecionada do grupo consistindo em:



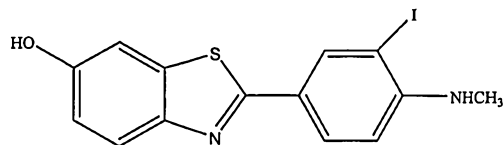
3



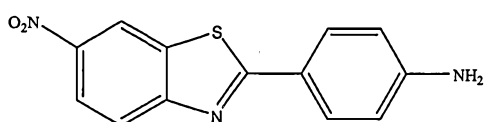
4



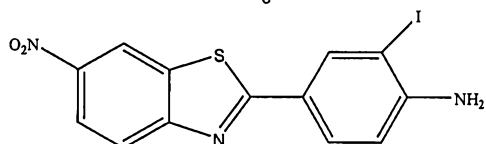
7



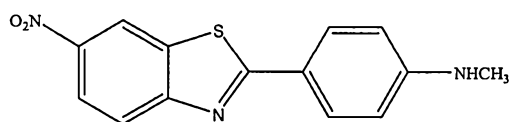
8



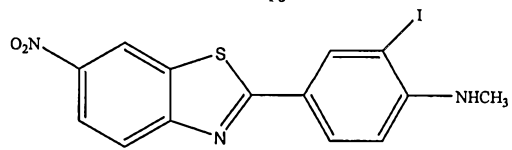
9



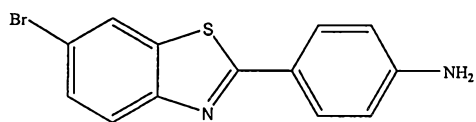
10



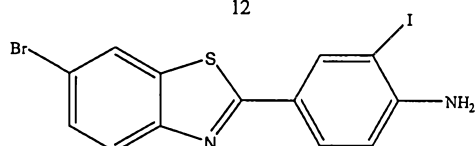
11



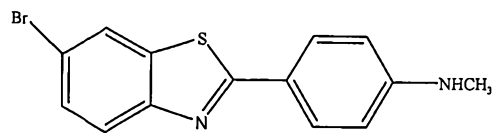
12



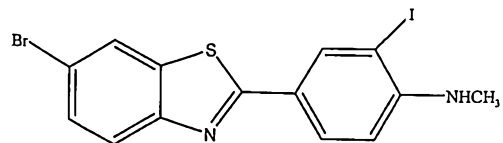
13



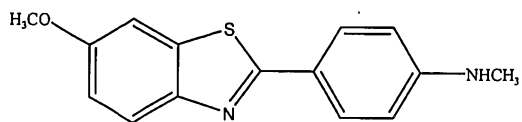
14



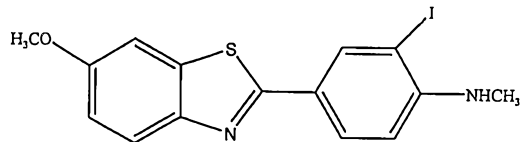
15



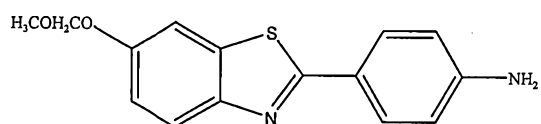
16



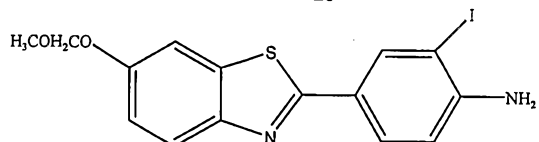
19



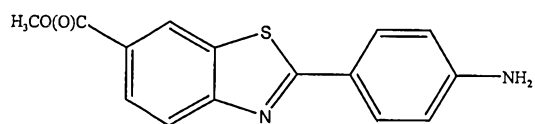
20



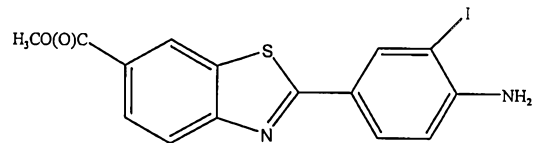
21



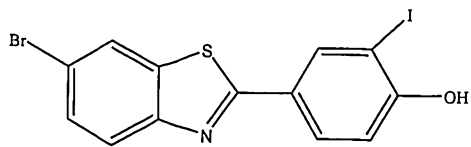
22



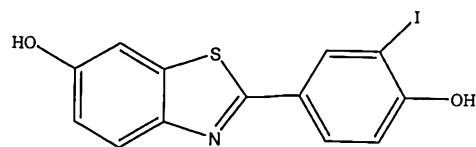
23



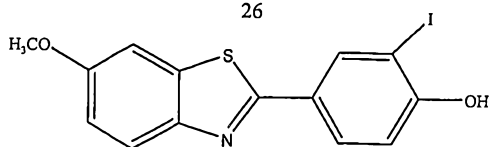
24



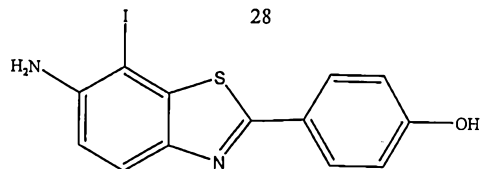
26



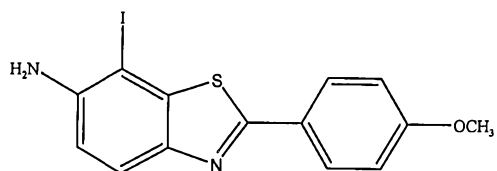
28



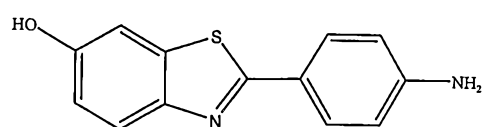
30



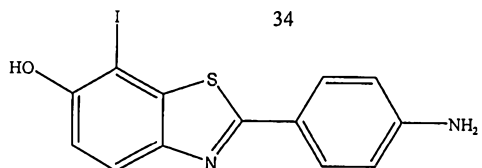
32



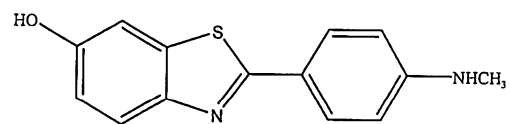
34



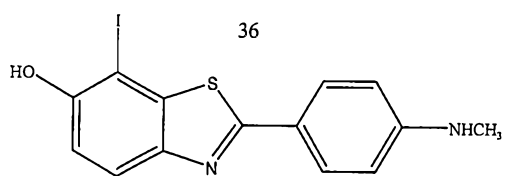
35



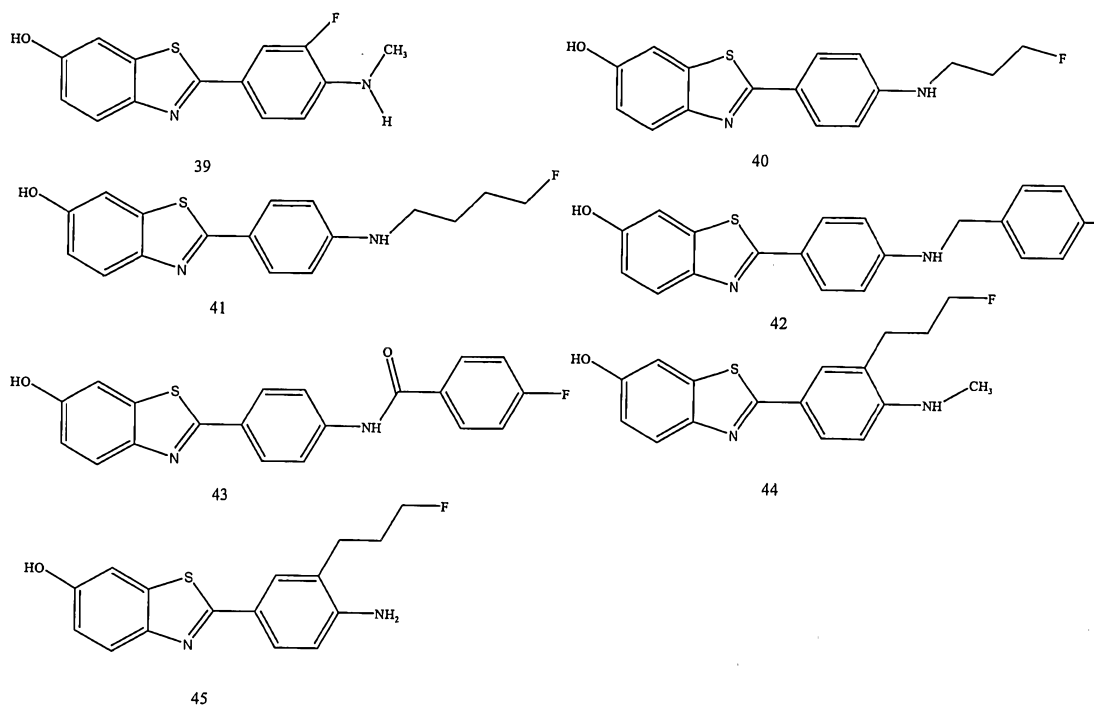
36



37



38



[00029] Ainda noutra realização, os compostos ligantes a amilóide da invenção se liga a A β com uma constante de dissociação (K_D) entre 0,0001 e 10,0 μ M quando medida pela ligação ao peptídeo A β sintético ou tecido cerebral com doença de Alzheimer.

[00030] Outra realização da invenção refere-se a um método para a síntese de compostos ligantes de amilóide da presente invenção apresentando pelo menos um dos substituintes selecionados do grupo consistindo em ¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ⁷⁶Br, ⁷⁵Br, ¹⁸F, ¹⁹F, compreendendo a etapa de marcação do composto ligante de amilóide, onde pelo menos um dos substituintes é um tri-álquil estanho, pela reação do composto com uma substância contendo ¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ⁷⁶Br, ⁷⁵Br, ¹⁸F, ¹⁹F.

[00031] Uma realização adicional da presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica para a imageologia *in vivo* de depósitos amiloidóticos, compreendendo (a) um composto ligante de amilóide da presente invenção e (b) um veículo farmacêuticamente aceitável.

[00032] Outra realização da invenção é um método *in vivo* para a detecção de depósitos amiloidóticos, que compreende as etapas de: (a) administrar uma quantidade detectável de uma composição

farmacêutica compreendendo o composto ligante de amilóide marcado, e detectar a ligação do composto ao depósito amiloidótico no indivíduo. Em um aspecto preferido desta realização, o depósito amiloidótico está localizado no cérebro do indivíduo. Em um aspecto particularmente preferido desta realização, o indivíduo é suspeito de apresentar uma doença ou síndrome selecionada do grupo consistindo em doença de Alzheimer, doença de Alzheimer familiar, síndrome de Down e homocigotos para o alelo E4 da apolipoproteína. Ainda noutro aspecto particularmente preferido desta realização, a detecção é selecionada do grupo consistindo em imageologia gama, imageologia por ressonância magnética e espectroscopia por ressonância magnética. Em um aspecto preferido desta realização, a imageologia gama é ou PET ou SPECT. Em outro aspecto preferido desta realização, a composição farmacêutica é administrada por injeção intravenosa. Noutro aspecto preferido desta realização, a razão entre (i) ligação do composto a uma área cerebral outra que não o cerebelo e (ii) ligação do composto ao cerebelo, em um indivíduo, é comparada com a razão em um indivíduo normal.

[00033] Noutra realização, a detecção dos depósitos amiloidóticos *in vivo* é utilizada no diagnóstico da doença de Alzheimer.

[00034] Outra realização refere-se a um método para detectar depósitos amiloidóticos tecido de biópsia ou tecido humano ou animal *post-mortem* compreendendo as etapas de: (a) incubar tecido fixado a formalina ou congelado recente com uma solução de um composto ligante de amilóide da presente invenção para formar um depósito marcado e então, (b) detectar os depósitos marcados. Num aspecto preferido desta realização, a solução é composta de 25-100% de etanol, com o restante da solução sendo água, onde a solução é saturada com um composto ligante de amilóide de acordo com a presente invenção. Em um aspecto particularmente preferido desta realização, a solução é composta de um tampão aquoso (tal como tris ou fosfato) contendo 0-50% de etanol, onde a solução contém 0,0001 a 100 μM de um composto ligante de amilóide de acordo com a presente invenção. Em

um aspecto particularmente preferido desta realização, a detecção é realizada por técnicas de microscopia selecionadas do grupo consistindo em microscopia de campo claro, de fluorescência, a laser confocal, e por polarização cruzada.

[00035] Uma realização adicional refere-se a um método para quantificar a quantidade de amilóide em tecido de biópsia ou tecido *post-mortem*, que compreende as etapas de: a) incubar um derivado radiomarcado de um composto ligante de amilóide da presente invenção com um homogenato de biópsia ou tecido *post-mortem*, b) separar o tecido ligado do tecido não ligado ao derivado radiomarcado de um composto ligante de amilóide da presente invenção, c) quantificar o tecido ligado ao derivado radiomarcado de um composto ligante de amilóide da presente invenção, e d) converter as unidades de tecido ligado ao derivado radiomarcado de um composto ligante de amilóide da presente invenção para unidades de microgramas de amilóide por 100 mg de tecido por comparação com um padrão.

[00036] Outra realização refere-se a um método para se distinguir um cérebro com doença de Alzheimer de um cérebro normal compreendendo as etapas de: a) obtenção de tecido de (i) cerebelo e (ii) uma outra área do mesmo cérebro que não o cerebelo, de indivíduos normais e indivíduos sob suspeita de apresentarem a doença de Alzheimer; b) incubação dos tecidos com um derivado radiomarcado de um composto de tioflavina ligante de amilóide de acordo com a presente invenção de tal forma que o amilóide no tecido se ligue com o derivado de um composto ligante de amilóide da presente invenção; c) quantificação da quantidade de amilóide ligado ao derivado radiomarcado de um composto ligante de amilóide da presente invenção de acordo com o método descrito acima; d) cálculo da razão entre a quantidade de amilóide na área do cérebro outra que não o cerebelo e a quantidade de amilóide no cerebelo; e) comparação da razão para a quantidade de amilóide no tecido de indivíduos normais com a razão para a quantidade de amilóide em tecido de indivíduos sob suspeita de

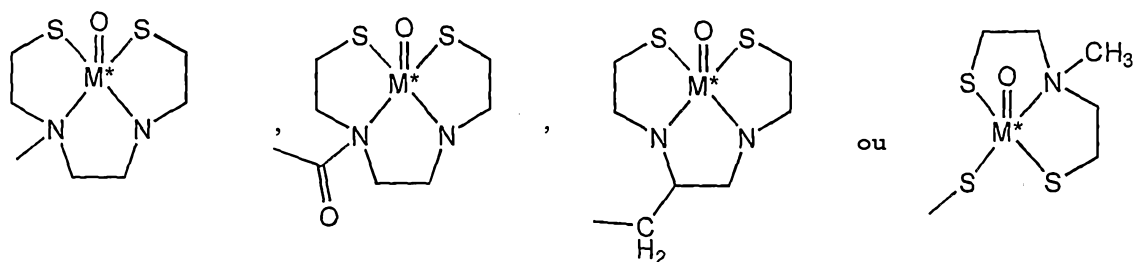
apresentarem doença de Alzheimer; e f) determinação da presença da doença de Alzheimer se a razão do cérebro de um indivíduo sob suspeita de apresentar a doença de Alzheimer for acima de 90% das razões obtidas a partir de cérebros de indivíduos normais.

[00037] Outra realização da presente invenção refere-se a compostos da presente invenção que são úteis na ligação específica a depósitos amiloidóticos em relação aos emaranhados neurofibrilares.

[00038] Outra realização refere-se a um método para ligação seletiva a placas amiloidóticas, mas não a emaranhados neurofibrilares *in vivo*, em tecido cerebral que contém ambas, pela administração de uma quantidade efetiva de um composto da presente invenção de tal forma que a concentração sanguínea do composto administrado permaneça abaixo de 10 nM *in vivo*.

[00039] Ainda outra realização refere-se a novos compostos da presente invenção, onde pelo menos um dos átomos das fórmulas é substituído com um radiomarcador, em particular, onde o dito radiomarcador é ^{11}C .

[00040] Ainda outra realização refere-se a novos compostos da presente invenção, onde pelo menos um dos átomos das fórmulas é selecionado do grupo consistindo em ^3H , ^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{76}Br , ^{75}Br , ^{18}F , $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-X}^*$, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-X}^*$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-X}^*$, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-X}^*$ (onde $\text{X}^* = ^{131}\text{I}$, ^{123}I , ^{76}Br , ^{75}Br ou ^{18}F), ^{19}F , ^{125}I , um substituinte contendo carbono selecionado do grupo consistindo em alquil inferior, $(\text{CH}_2)_n\text{OR}'$, CF_3 , $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{X}$, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{X}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{X}$, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{X}$ (onde $\text{X} = \text{F}$, Cl , Br ou I), CN , $(\text{C}=\text{O})\text{-R}'$, $(\text{C}=\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$, $\text{O}(\text{CO})\text{R}'$, COOR' , $\text{CR}'=\text{CR}'\text{-R}_{\text{ph}}$, onde pelo menos um carbono é ^{11}C , ^{13}C ou ^{14}C e um grupo quelante (com um grupo metálico quelatado) da forma W-L^* ou V-W-L^* , onde V é selecionado do grupo consistindo em -COO- , -CO- , $\text{-CH}_2\text{O-}$ e $\text{-CH}_2\text{NH-}$; W é $\text{-(CH}_2)_n$ onde $n = 0, 1, 2, 3, 4$, ou 5 ; e L^* é:



onde M^* é ^{90m}Tc .

[00041] Outra realização refere-se ao uso dos compostos de fórmulas 1-45 ou um composto de fórmula I para o diagnóstico da doença de Alzheimer em um paciente necessitando de tal.

[00042] Outra realização refere-se ao uso dos compostos de fórmulas 1-45 ou um composto de fórmula I para a preparação de um medicamento para o diagnóstico da doença de Alzheimer em um paciente necessitando de tal.

[00043] Outras realizações da invenção serão óbvias àqueles especialistas na técnica a partir da consideração do relatório e prática da invenção, descritos aqui. Pretende-se que o relatório seja considerado apenas como exemplo, com o escopo e espírito da invenção sendo indicados nas reivindicações que se seguem. Adicionalmente, todos os documentos a que se faz referência aqui são expressamente incorpo-rados como referência.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00044] A **Figura 1** mostra as estruturas de uma tiflavina S e de uma tioflavina T;

[00045] A **Figura 2** mostra as estruturas de duas tioflavinas de acordo com a invenção;

[00046] A **Figura 3** mostra quatro seções em série de córtex frontal cerebral corado por fluorescência de um paciente AD;

[00047] A **Figura 4** mostra locais propostos de ligação de crisamina G e tioflavina T em fibrilas em placa β ;

[00048] A **Figura 5** mostra um ensaio de competição utilizando crisamina G, tioflavina S e tioflavina T, e derivados da presente invenção (BTA-0, BTA-1 e BTA-2);

[00049] A **Figura 6** mostra o curso no tempo da radioatividade no córtex frontal de babuínos injetados com BTA-1, 6-MeO-BTA-1 e 6-Me-BTA-1 marcados; e

[00050] A **Figura 7** mostra uma imagem de tomografia por emissão positrônica transversa de dois níveis de cérebro de babuíno seguinte à injeção de [N-metil-¹¹C]BTA-1.

[00051] A **Figura 8** mostra seções *post-mortem* de cérebro humano e de camundongo transgênico marcadas com um derivado da presente invenção (BTA-1).

[00052] A **Figura 9** mostra a marcação *in vivo* de placas amiloidóticas e amilóide vascular com um derivado da presente invenção (BTA-1) em camundongos transgênicos vivos observados por microscopia multifotônica.

[00053] A **Figura 10A** mostra uma comparação de dados de ligação de [³H] a homogenatos de um cérebro de controle, cérebro com doença de Alzheimer e cérebro demenciado não com doença de Alzheimer.

[00054] A **Figura 10B** mostra a razão de dados a partir de uma comparação do córtex frontal e cerebelo para cada cérebro individual em um cérebro de controle, cérebro com doença de Alzheimer e cérebro demenciado não com doença de Alzheimer.

[00055] As **Figuras 11A-F** mostram a especificidade dos compostos da invenção para placas amiloidóticas em relação a emaranhados neurofibrilares, onde A e B mostram o córtex entorrinal, C e D mostram o córtex frontal e E e F mostram o cerebelo de um cérebro de controle em estágio II de Braak.

[00056] A **Figura 12** é uma tabela mostrando a ligação de [³H]BTA-1 a áreas específicas de um cérebro de controle Braak II e um cérebro AD Braak VI (AD02).

[00057] A **Figura 13** mostra uma plotagem de Scratchard da ligação de [^3H]BTA-1 a homogenatos de substância cinzenta frontal de AD e destacando a substância branca do mesmo cérebro com AD.

[00058] A **Figura 14** mostra um auto-radiograma e micrografia fluorescente mostrando a sobreposição da ligação de [I-125]6-OH-BTA-0-3'-I a placas e amilóide cerebrovascular e depósitos amiloidóticos marcados pelo corante de amilóide, X-34. Esquerda: auto-radiograma da ligação de [I-125]6-OH-BTA-0-3'-I a tecido congelado recente de cérebro com AD *post-mortem*. As áreas escuras mostram a localização do [I-125]6-OH-BTA-0-3'-I e são destacadas em vermelho. A estrutura do [I-125]6-OH-BTA-0-3'-I é mostrada na parte de baixo à esquerda. Direita: a mesma peça de tecido de cérebro com AD *post-mortem* marcada com o corante de amilóide, X-34. As áreas claras indicam placas amiloidóticas e amilóide cerebrovascular. Centro: sobreposição do destaque em vermelho do auto-radiograma da esquerda com a marcação de X-34 mostrando uma correspondência de aproximadamente 1:1 de ligação de [I-125]6-OH-BTA-0-3'-I às placas e amilóide cérebro-vascular. A barra representa 1000 μm .

[00059] A **Figura 15** mostra as curvas de atividade no tempo da penetração e liberação da radioatividade de três regiões de cérebro de babuíno seguindo à injeção do composto B(2-(3-[^{18}F]-fluor-4-metilamino-fenil)-benzotiazol-6-ol).

[00060] A **Figura 16** mostra as curvas de atividade no tempo da penetração e liberação da radioatividade de cerebelo de babuíno (região de referência destituída de ligação específica) seguinte à injeção dos radioligantes [carbonil- ^{11}C]WAY100635, [^{11}C](+)-McN5652 e [^{18}F]altanse-rina em comparação com o comportamento do composto B.

[00061] A **Figura 17** mostra as curvas de atividade no tempo da penetração e liberação da radioatividade de três regiões de cérebro de babuíno seguindo à injeção do composto C (2-[4-(3-[^{18}F]-fluor-propilamino)-fenil]benzotiazol-6-ol).

[00062] A **Figura 18** mostra as curvas de atividade no tempo da

penetração e liberação da radioatividade de cerebelo de babuíno (região de referência destituída de ligação específica) seguinte à injeção dos radioligantes [carbonil- ^{11}C]WAY100635, [^{11}C](+)-McN5652 e [^{18}F]altanserina em comparação com o comportamento do composto C.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[00063] A presente invenção explora a capacidade dos compostos de tioflavina e derivados radiomarcados destes de atravessar a barreira hematoencefálica *in vivo* e de se ligarem a A β depositada em placas neuríticas (mas não difusas), a A β depositada em amilóide cerebrovascular, e ao amilóide consistindo na proteína depositada em ENF. Os presentes compostos são derivados não amino-quaternários de tioflavinas S e T que são conhecidas como marcadoras de amilóide em seções de tecido e se ligam a A β sintética *in vitro*. Kelenyi, J. *Histochem. Cytochem.* **15**:172 (1967); Burns e colaboradores, *J. Path. Bact.* **94**:337 (1967); Guntern e colaboradores, *Experientia* **48**:8 (1992); LeVine, *Meth. Enzymol.* **309**:274 (1999).

[00064] Os derivados de tioflavina da presente invenção apresentam cada uma das seguintes características: (1) ligação específica a A β sintética *in vitro* e (2) capacidade de atravessar uma barreira hematoencefálica não compromissada *in vivo*.

MODELAGEM MOLECULAR

[00065] A modelagem molecular foi realizada, utilizando-se o programa de computador para modelagem Alchemy2000, um produto da Tripost, Inc. (St. Louis, MO), para gerar as cadeia peptídicas de A β na conformação em placa beta anti-paralela. Kirschner e colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**:503 (1986). Os peptídeos amiloidóticos foram colocados em "hairpin loops", ver Hilbich e colaboradores, *J. Mol. Biol.* **218**:149 (1991), e foram utilizados sem refino estrutural adicional. Os peptídeos A β foram alinhados de tal forma que

cadeias alternadas foram espaçadas de 4,76 Å entre si, característica das fibrilas em placa beta. Kirschner, *supra*. Os derivados de tioflavina T foram minimizados em energia e alinhados com o modelo fibrila para maximizar o contato com Asp-23/Gln-15/His-13 de A β (1-42).

Caracterização de Ligação Específica a Peptídeo A β Sintético: Afinidade, Cinética, Ligação Máxima

[00066] As características do derivado de tioflavina foram analisadas utilizando-se A β (1-40) sintética e 2-(4'-[¹¹C] metilamino-fenil)-benzotiazol ([N-metil-¹¹C]BTA-1) em tampão fosfato salino (pH 7,0) ou tampão de glicina/etanol 20% (pH 8,0), conforme descrito previamente para a ligação de crisamina G. Klunk e colaboradores, *Neurobiol. Aging* **15**:691 (1994).

A seqüência de aminoácidos para A β é como se segue:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
His	His	Gln	Lys	Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala	Ile	Ile	Gly	Leu	Met	Val
37	38	39	40								
Gly	Gly	Val	Val								

DEFINIÇÕES

[00067] “Alquil” refere-se a um radical hidrocarboneto de cadeia linear ou ramificada saturado. Exemplos incluem, sem limitação, metil,

etil, propil, iso-propil, butil, iso-butil, *tert*-butil, n-pentil e n-hexil.

[00068] “Alquenil” refere-se a um radical hidrocarboneto de cadeia linear ou ramificada insaturado compreendendo pelo menos uma dupla ligação carbono-carbono. Exemplos incluem, sem limitação, etenil, propenil, iso-propenil, butenil, iso-butenil, *tert*-butenil, n-pentenil e n-hexenil.

[00069] “Alquinil” refere-se a um radical hidrocarboneto de cadeia linear ou ramificada insaturado compreendendo pelo menos uma tripla ligação carbono-carbono. Exemplos incluem, sem limitação, etinil, propinil, iso-propinil, butinil, iso-butinil, *tert*-butinil, pentinil e n-hexinil.

[00070] “Alcoxi” refere-se a um grupo alquil ligado através de uma ligação oxigênio.

[00071] “Halogênio” refere-se a um radical flúor, cloro, bromo ou iodo.

[00072] “Halogênio radioativo” refere-se a um radical halogênio, isto é, radioflúor, radiocloro, radiobromo ou radioiodo.

[00073] “Quantidade efetiva” refere-se a uma quantidade exigida para produzir um efeito desejado. Exemplos de uma “quantidade efetiva” incluem quantidades que possibilitam a imageologia de depósito(s) amiloidótico(s) *in vivo*, que produzam níveis de toxidez de biodisponibilidade aceitáveis para uso farmacêutico, e/ou previnam a degeneração celular e toxidez associadas com a formação de fibrila.

[00074] “Veículo farmacêuticamente aceitável” refere-se a um material, composição ou veículo farmacêuticamente aceitável, tal como um enchimento, diluente, excipiente ou solvente líquido ou sólido que encapsula o material, envolvido no transporte do composto em questão de um órgão, ou parte do corpo, para outro órgão ou parte do corpo. Cada veículo é “aceitável” no sentido de ser compatível com os outros ingredientes da formulação e adequado para uso com o paciente. Exemplos de materiais que podem servir como veículo farmacêuticamente aceitável incluem, sem limitação: (1) açúcares, tais como lactose,

glicose e sacarose; (2) amidos, tais como amido de milho amido de batata; (3) celulose e seus derivados, tais como carboximetilcelulose sódica, etilcelulose e acetato de celulose; (4) tragacanto em pó; (5) malte; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes tais como manteiga de cacau e ceras de supositório; (9) óleos, tais como óleo de amendoim, óleo de algodão, óleo de girassol, óleo de gergelim, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de soja; (10) glicóis, tais como propilenoglicol; (11) polióis, tais como glicerina, sorbitol, manitol e polietilenoglicol; (12) ésteres, tais como oleato de etila e laurato de etila; (13) agar; (14) agentes tampão, tais como hidróxido de magnésio e hidróxido de alumínio; (15) ácido algínico; (16) água livre de pirogênio; (17) solução salina isotônica; (18) solução de Ringer; (19) álcool etílico; (20) soluções pH tamponadas; (21) poliésteres, policarbonatos e/ou polianidridos; e (22) outras substâncias não tóxicas compatíveis empregadas em formulações farmacêuticas conforme identificadas, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Sciences, 15^a ed. (Mack Publishing Co., 1975), nas páginas 1405-1412 e 1461-1487, e The National Formulary XIV, 14^a ed. (American Pharmaceutical Association, 1975).

[00075] “Sal farmacêuticamente aceitável” refere-se a um sal ácido ou básico do composto inventivo, que possui a atividade farmacológica desejada e não é biologicamente indesejável nem de qualquer outra forma. O sal pode ser formado com ácidos que incluem, sem limitação, acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, benzenesulfonato, bisulfato butirato, citrato, camforato, camforsulfonato, ciclopentanopropio-nato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucohepta-noato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hydroclorito hidrobrometo, hidriodeto, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, tiocianato, tosilato e undecanoato. Exemplos de um sal básico incluem, sem limitação, sais de amônio, sais de metais alcalinos tais como sais de sódio e potássio, sais de metais alcalino terrosos tais como sais de cálcio e magnésio,

sais com bases orgânicas tais como sais de dicitlohexilamina, N-metil-D-glucamina, e sais com aminoácidos tais como arginina e lisi-na. Em algumas realizações, os grupos nitrogênio básicos podem ser quaternizados com agentes incluindo haletos de alquila inferior tais como cloretos, brometos e iodetos de metila, etila, propila e butila; sulfatos de dialquila tais como sulfatos de dimetila, dietila, dibutila e diamila; haletos de cadeia longa tais como cloretos, brometos e iodetos de decila, laurila, miristila e estearila; e haletos de aralquila tais como brometos de fenetila.

[00076] “Pró-droga” refere-se a um derivado do composto inventivo que sofre biotransformação, tal como metabolismo, antes de exibir seu(s) efeito(s) farmacológico(s). A pró-droga é formulada com o(s) objetivo(s) de aumentar a estabilidade química, aumentar a aceitação e condescendência do paciente, aumentar a biodisponibilidade, prolongar a duração da ação, aumentar a seletividade ao órgão, melhorar a formulação (por exemplo, aumentar a hidrossolubilidade) e/ou reduzir os efeitos colaterais (por exemplo, toxidez). A pró-droga pode ser facilmente preparada a partir do composto inventivo utilizando-se métodos convencionais, tais como o descrito em Burger’s Medicinal Chemistry And Drug Chemistry, 5ª ed., vol. 1 (1995), páginas 172-178 e 949-982.

[00077] “Animal” refere-se a um organismo vivo apresentando sensações e o poder de movimento voluntário, e que requer para sua existência oxn e alimento orgânico. Exemplos incluem, sem limitação, membros das espécies humana, eqüina, suína, bovina, murina, canina e felina. No caso de um humano, um “animal” pode também ser referido como um “paciente”.

[00078] “Mamífero” refere-se a um animal vertebrado de sangue quente.

[00079] “Tratamento” refere-se a:

(i) prevenção da ocorrência de uma doença, distúrbio ou condição em um animal que pode ser predisposto à doença, distúrbio

ou condição, mas que não foi ainda diagnosticado como a apresentando;

(ii) inibição da doença, distúrbio ou condição, isto é, interrupção de seu desenvolvimento; e/ou

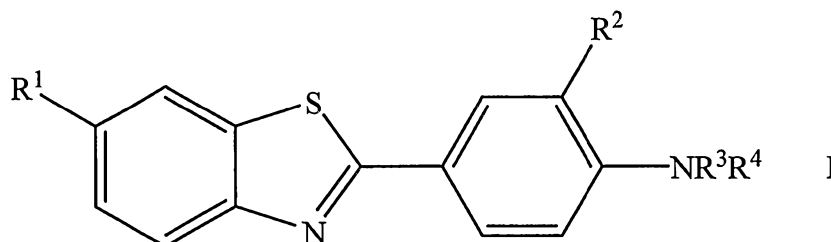
(iii) alívio da doença, distúrbio ou condição, isto é, provocar a regressão da doença, distúrbio e/ou condição.

[00080] A não ser que claramente dito em contrário, as definições dos termos no singular podem ser extrapoladas para aplicar-se às suas contrapartes no plural conforme aparecem no pedido; da mesma forma, as definições dos termos no plural podem ser extrapolados para aplicar-se a suas contrapartes no singular conforme aparecem no pedido.

COMPOSTOS

[00081] A invenção provê compostos derivados de benzotiazol radiomarcados como agentes de imageologia de amilóide.

[00082] Especificamente, a invenção provê um composto de fórmula I:



ou um sal, hidrato, solvato ou pró-droga farmacologicamente aceitável do composto, onde:

R¹ é hidrogênio, -OH, -NO₂, -CN, -COOR, -OCH₂OR, alquil C₁-C₆, alquênil C₂-C₆, alquínil C₂-C₆, alcoxi C₁-C₆ ou halogênio, onde um ou mais dos átomos de R¹ podem ser um átomo radiomarcado;

R é alquil C₁-C₆, onde um ou mais dos átomos de carbono podem ser um átomo radiomarcado;

R² é hidrogênio, um halogênio não radioativo ou um halogênio radioativo;

R³ é hidrogênio, alquil C₁-C₆, alquenil C₂-C₆ ou alquinil C₂-C₆;

R⁴ é hidrogênio, alquil C₁-C₆, alquenil C₂-C₆ ou alquinil C₂-C₆, onde o alquil, alquenil ou alquinil compreendem um carbono radioativo ou é substituído com um halogênio radioativo quando R² é hidrogênio ou um halogênio não radiotivo;

desde que quando R¹ é hidrogênio ou -OH, R² é hidrogênio e R⁴ é -¹¹CH₃, então R³ é alquil C₂-C₆, alquenil C₂-C₆ ou alquinil C₂-C₆; e

ainda desde que quando R¹ é hidrogênio, R² é hidrogênio e R⁴ é - (CH₂)₃¹⁸F, então R³ é alquil C₂-C₆, alquenil C₂-C₆ ou alquinil C₂-C₆.

[00083] Exemplos de um carbono radioativo incluem, sem limitação, ¹¹C, ¹³C e ¹⁴C. Exemplos de um halogênio radioativo incluem, sem limitação, ¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²⁴I, ¹²³I, ⁷⁶Br, ⁷⁵Br, ¹⁸F. Em uma realização, o halogênio radioativo é ¹³¹I, ¹²⁴I, ¹²⁴I ou ¹⁸F. Noutra realização, R¹ é -OH.

[00084] Ainda noutra realização, R¹ é hidrogênio, -OH, -CN, alquil C₁-C₆, alquenil C₂-C₆, alquinil C₂-C₆, alcoxi C₁-C₆, ou halogênio; R² é hidrogênio; e R⁴ é alquil C₁-C₆, alquenil C₂-C₆ ou alquinil C₂-C₆, onde o alquil, alquenil ou alquinil compreendem um carbono radioativo. Como um exemplo desta realização, R¹ é hidrogênio, -OH, -CN, -OCH₃, -CH₃ ou -Br; R³ é hidrogênio ou -CH₃; e R⁴ é -¹¹CH₃.

[00085] Ainda noutra realização, R² é um halogênio não radioativo ou um halogênio radioativo, onde o halogênio é iodo; e R⁴ é hidrogênio, alquil C₁-C₆, alquenil C₂-C₆ ou alquinil C₂-C₆, onde o alquil, alquenil ou alquinil compreendem um carbono radioativo quando R² é um halogênio não radioativo. Como um exemplo desta realização, R é -

CH₃; e o carbono radioativo em R⁴ é ¹¹C. Como um outro exemplo, R¹ é -OH ou alcoxi C₁-C₆; R² é um iodo radioativo; e R³ e R⁴ são independentemente hidrogênio ou alquil C₁-C₆. Como um exemplo adicional, R¹ é -OH; R² é ¹²³I ou ¹²⁵I; e R³ e R⁴ são cada um hidrogênio.

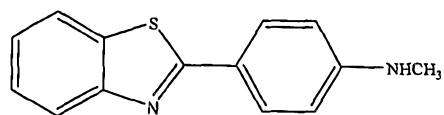
[00086] Ainda noutra realização, R² é hidrogênio, radiobromo, radiocloro ou radiofluor.

[00087] Ainda noutra realização, R² é um radiofluor. Como um exemplo desta realização, R¹ é -OH ou alcoxi C₁-C₆; R³ é ¹⁸F; e R³ e R⁴ são independentemente hidrogênio ou alquil C₁-C₆. Como outro exemplo, R¹ é -OH; R³ é hidrogênio; e R⁴ é -CH₃.

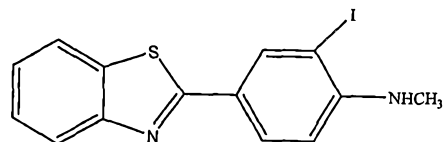
[00088] Ainda noutra realização, R⁴ é alquil C₁-C₆, alquenil C₂-C₆ ou alquinil C₂-C₆, onde o alquil, alquenil ou alquinil é substituído com um halogênio radioativo. Como um exemplo desta realização, R¹ é -OH ou alcoxi C₁-C₆; R² é hidrogênio; R³ é hidrogênio ou alquil C₁-C₆; e R⁴ é alquil C₁-C₆ substituído com ¹⁸F. Como outro exemplo, R¹ é -OH; R³ é hidrogênio; e R⁴ é CH₂CH₂CH₂¹⁸F.

[00089] Ainda noutra realização, os compostos inventivos se ligam seletivamente a amilóide, particularmente Aβ sintética *in vitro* ou Aβ depositada em placas neuríticas; atravessam uma barreira hematoencefálica não comprometida *in vivo*; são biodisponíveis; e/ou não são tóxicos.

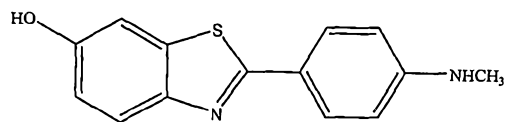
[00090] Ainda noutra realização refere-se a um composto ligante de amilóide apresentando uma estrutura selecionada do grupo consistindo em:



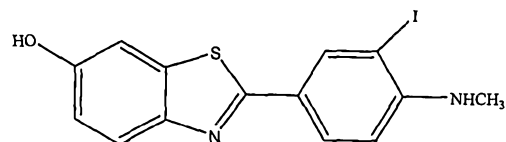
3



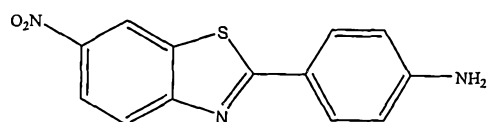
4



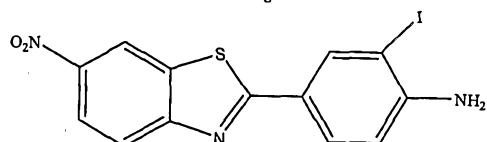
7



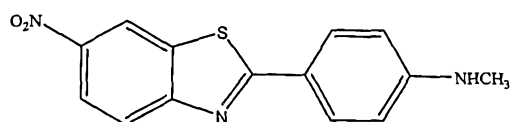
8



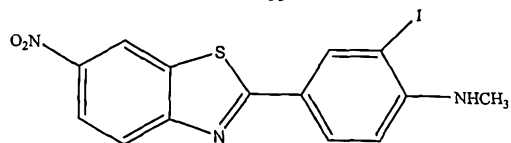
9



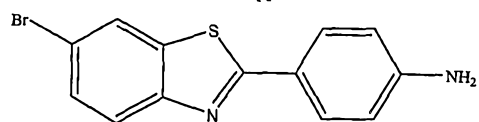
10



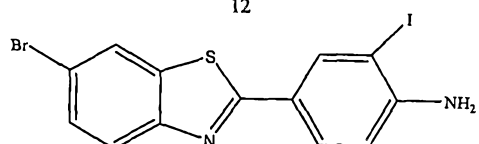
11



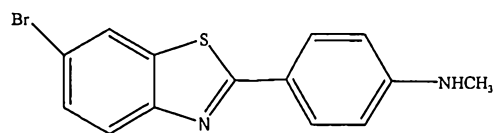
12



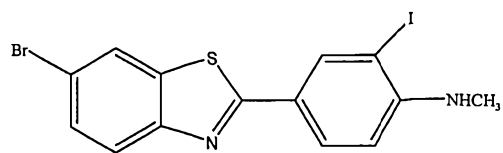
13



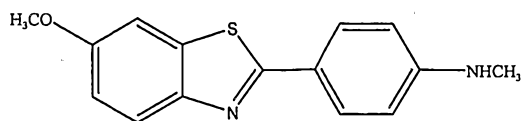
14



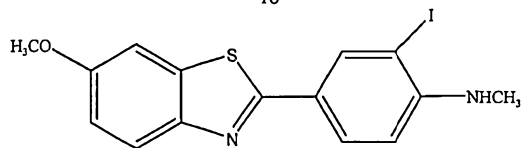
15



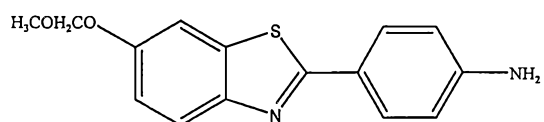
16



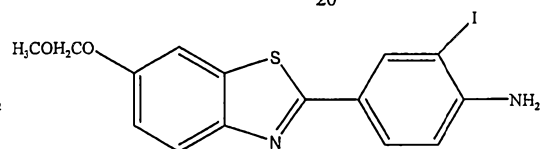
19



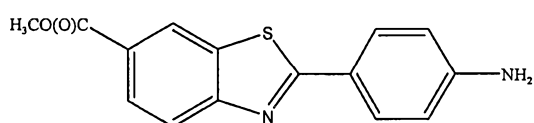
20



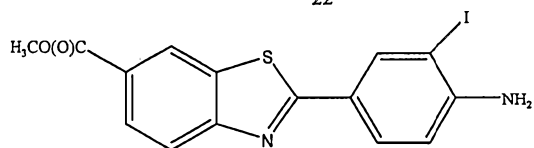
21



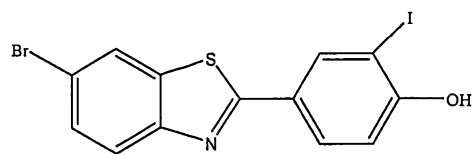
22



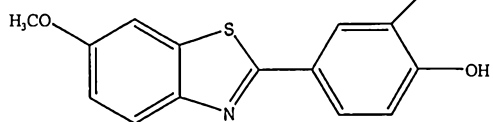
23



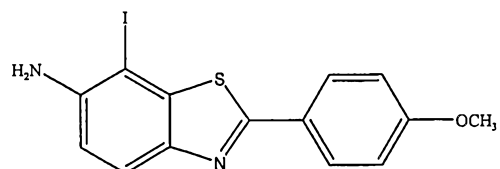
24



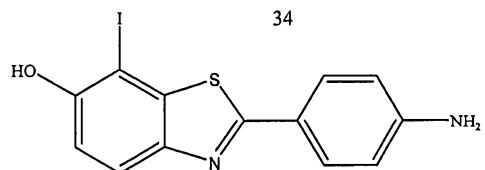
26



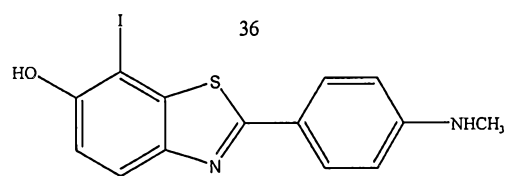
30



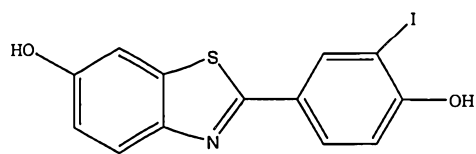
34



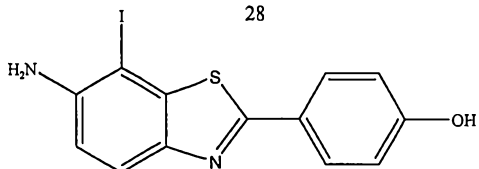
36



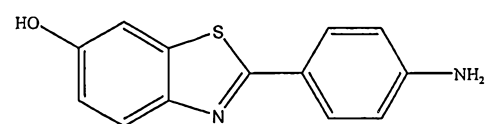
38



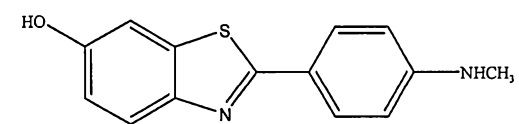
28



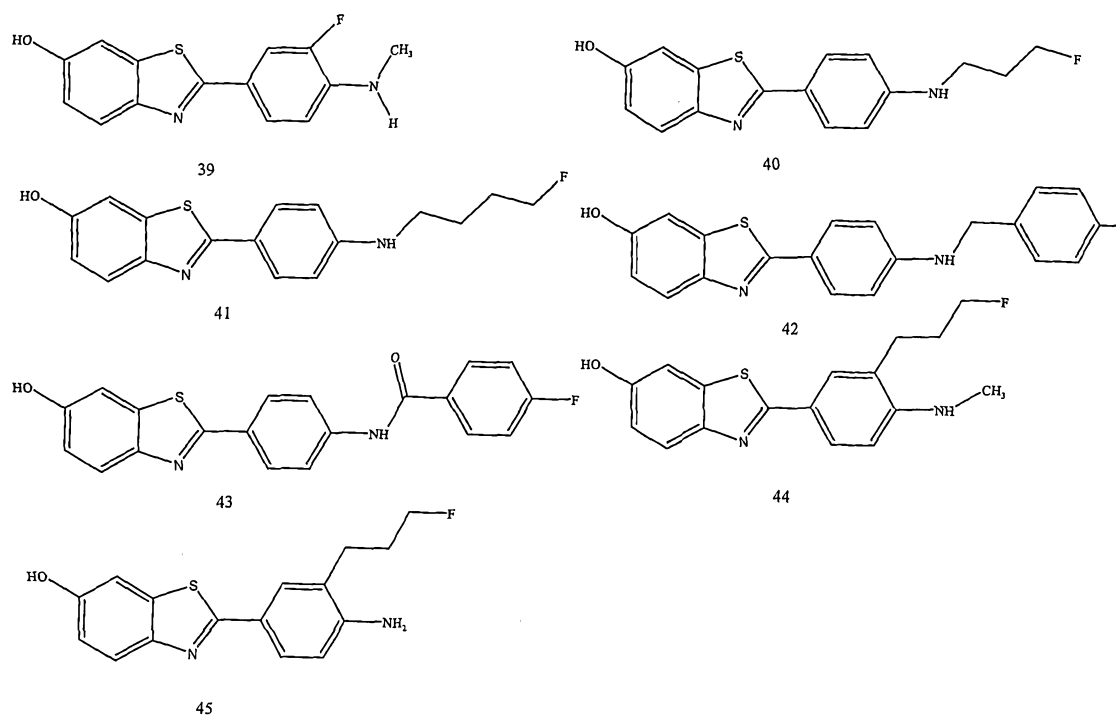
32



35



37



Métodos De Uso

[00091] Os compostos inventivos podem ser utilizados para determinar a presença, localização e/ou quantidade de um ou mais depósitos amiloidóticos em um órgão ou área corporal, incluindo o cérebro, de um animal. Depósitos amiloidóticos incluem, sem limitação, depósitos de A β . Ao permitir-se que a seqüência no tempo da deposição amiloidótica seja seguida, o composto inventivo pode adicionalmente ser utilizado para se correlacionar a deposição amiloidótica com a instalação de sintomas clínicos associados com a doença, distúrbio ou condição. Em resumo, os compostos inventivos podem ser utilizados para, e para diagnosticas, uma doença, distúrbio ou condição caracterizada pela deposição amiloidótica, tal como AD, AD familiar, síndrome de Down, amiloidose, diabetes melito tipo II, e homozigotos para o alelo E4 da apolipoproteína.

[00092] O método desta invenção determina a presença e localização de depósitos amiloidóticos em um órgão ou área corporal, de preferência o cérebro de um paciente. O presente método compreende a administração de uma quantidade detectável de uma composição

farmacêutica contendo um composto ligante de amilóide da presente invenção chamado de “composto detectável” ou um sal solúvel em água farmacêuticamente aceitável deste. Uma “quantidade detectável significa que a quantidade do composto detectável que é administrada é suficiente para possibilitar a detecção de ligação do composto ao amilóide. Uma “quantidade efetiva para imageologia” significa que a quantidade do composto detectável que é administrada é suficiente para possibilitar a imagem da ligação do composto ao amilóide.

[00093] A invenção emprega sondas de amilóide que, em conjunto com técnicas de neuroimageologia não invasivas, tais como espectroscopia ou imageologia de ressonância magnética (MRS) ou (MRI), ou imageologia gama tal como tomografia por emissão positrônica (PET) ou tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT), são utilizadas para quantificar a deposição amiloidótica *in vivo*. O termo “imageologia *in vivo*” refere-se a qualquer método que permita a detecção de um derivado de tioflavina marcado conforme descrito aqui. Para imageologia gama, a radiação emitida a partir do órgão ou área sendo examinada é medida e expressa ou como ligação total ou como uma razão na qual a ligação total em um tecido é normalizada (por exemplo, dividida por) em relação à ligação total em um outro tecido do mesmo indivíduo durante o mesmo procedimento de imageologia *in vivo*. A ligação total *in vivo* é definida como o sinal completo detectado em um tecido por uma técnica de imageologia *in vivo* sem a necessidade de correção por uma segunda injeção de uma quantidade idêntica do composto marcado juntamente com um grande excesso de composto não marcado, mas de qualquer forma quimicamente idêntico. Um “indivíduo” é um mamífero, preferivelmente humano e, com maior preferência, um humano sob suspeita de apresentar demência.

[00094] Para os propósitos de imageologia *in vivo*, o tipo de instrumento de detecção disponível é um fator preponderante na seleção de um dado marcador. Por exemplo, isótopos radioativos e ^{19}F são particularmente adequados para imageologia *in vivo* nos métodos da

presente invenção. O tipo de instrumento utilizado irá orientar a seleção do radionuclídeo ou isótopo estável. Por exemplo, o radionuclídeo escolhido deve apresentar um tipo de decaimento detectável por um dado tipo de instrumento. Outra consideração refere-se à meia-vida do radionuclídeo. A meia-vida deve ser longa o suficiente de tal forma que ainda seja detectável no tempo da absorção máxima pelo alvo, mas curta o suficiente de tal forma que o hospedeiro não seja submetido a radiação deletéria. Os compostos radiomarcados da invenção podem ser detectados utilizando-se imageologia gama, onde a irradiação gama emitida com comprimento de onda apropriado é detectada. Métodos de imageologia gama incluem, mas não se limitam a, SPECT e PET. Preferivelmente, para detecção por SPECT, o radiomarcador escolhido não apresenta uma emissão particulada, mas irá produzir um grande número de fótons na faixa de 140-200 keV. Para a detecção por PET, o radiomarcador será um radionuclídeo emissor de positron tal como ^{19}F que irá se anular para formar dois raios gama de 511 keV que serão detectados por uma câmera PET.

[00095] Na presente invenção, os compostos ligantes de amilóide/sondas são obtidos para serem úteis para a imageologia *in vivo* e quantificação da deposição amiloidótica. Estes compostos são para serem utilizados em conjunto com técnicas de neuroimageologia não invasivas tais como espectroscopia ou imageologia de ressonância magnética (MRS) ou (MRI), tomografia por emissão positrônica (PET) e tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT). De acordo com esta invenção, os derivados de tioflavina podem ser marcados com ^{19}F ou ^{13}C para MRS/MRI por técnicas de química orgânica gerais conhecidas na técnica. Por exemplo, ver *Advanced Organic Chemistry; Reaction, Mechanisms, And Structure*, 3^a ed. (1985), cujo conteúdo é aqui incorporado como referência. Os derivados de tioflavina podem também ser radiomarcados com ^{18}F , ^{11}C , ^{75}Br , ou ^{76}Br para PET por técnicas bem conhecidas na técnica e são descritas por Fowler, J. e Wolf, A. em *Positron Emission Tomography And*

Autoradiography 391-450 (Raven Press, 1986), cujo conteúdo é aqui incorporado como referência. Os derivados de tioflavina podem ser também radiomarcados com ^{123}I para SPECT por qualquer de várias técnicas conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, Kulkarni, *Int. J. Rad. Appl. & Inst.* (Parte B) **18**:647 (1991), cujo conteúdo é incorporado aqui como referência. Adicionalmente, os derivados de tioflavina podem ser também marcados com qualquer isótopo de iodo radioativo adequado, tal como, mas não limitado a, ^{131}I , ^{125}I ou ^{123}I , por iodinação de um derivado amino diazotado diretamente através de um iodeto de diazônio, ver Greenbaum, *F. Am.J. Pharm.* **108**:17 (1936), ou pela conversão de uma amina diazotada instável para o triazeno estável, ou pela conversão de um precursor halogenado não radioativo para um derivado de tri-alquil estanho estável que então pode ser convertido para o composto de iodo por vários métodos bem conhecidos na técnica. Ver, Satyamurthy e Barrio, *J. Org. Chem.* **48**:4394 (1983), Goodman e colaboradores, *J. Org. Chem.* **49**:2322 (1984), e Mathis e colaboradores, *J. Labell. Comp. and Radiopharm.* **1994**:905; Chumpradit e colaboradores, *J. Med. Chem.* **34**:877(1991); Zhuang e colaboradores, *J. Med. Chem.* **37**:1406 (1994); Chumpradit e colaboradores, *J. Med. Chem.* **37**: 4245 (1994). Por exemplo, um derivado de triazeno estável ou de tri-alquil estanho de tioflavina ou seus análogos é reagido com um agente de halogenização contendo ^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{76}Br , ^{75}Br , ^{18}F ou ^{19}F . Desta forma, os derivados de tri-alquil estanho de tioflavina e seus análogos são novos precursores úteis para a síntese de muitos dos compostos radiomarcados da presente invenção. Como tal, estes derivados tri-alquil estanho são uma realização desta invenção.

[00096] Os derivados de tioflavina podem também ser radiomarcados com radiomarcadores metálicos conhecidos, tais como tecnécio $^{99\text{m}}\text{Tc}$. A modificação dos substituintes para introduzir ligantes que se liguem a tais íons metálicos pode ser realizada sem experimentação excessiva por um especialista normal na técnica de radiomarcagem. O derivado de tioflavina radiomarcado com metal pode

então ser utilizado para detectar depósitos amiloidóticos. A preparação de derivados radiomarcados de ^{99m}Tc é bem conhecida na técnica. Ver, por exemplo, Zhuang e colaboradores, “Neutral and stereospecific Tc-99m complexes: [99mTc] N-benzyl-3,4-di-(N-2-mercaptoetil)-amino-pyrrolidines (P-BAT)” *Nuclear Medicine & Biology* **26(2)**:217-24, (1999); Oya e colaboradores, “Small and neutral Tc(v)O BAT, bisaminoethanethiol (N2S2) complexes for developing new brain imaging agents” *Nuclear Medicine & Biology* **25(2)**:135-40, (1998); e Hom e colaboradores, “Technetium-99m-labeled receptor-specific small-molecule radiopharmaceuticals: recent developments e encouraging results” *Nuclear Medicine & Biology* **24(6)**:485-98, (1997).

[00097] Os métodos da presente invenção podem utilizar isótopos detectáveis por espectroscopia por ressonância magnética para o propósito de imageologia e espectroscopia *in vivo*. Elementos particularmente úteis em espectroscopia por ressonância magnética incluem ^{19}F e ^{13}C .

[00098] Radioisótopos adequados para os propósitos desta invenção incluem emissores beta, emissores gama, emissores de positrons, e emissores de raio-X. Estes radioisótopos incluem ^{131}I , ^{123}I , ^{18}F , ^{11}C , ^{75}Br , e ^{76}Br . Isótopos estáveis adequados para uso em imageologia por ressonância magnética (MRI) ou espectroscopia por ressonância magnética (MRS), de acordo com esta invenção, incluem ^{19}F e ^{13}C . Radioisótopos adequados para a quantificação *in vitro* de amiloide em homogenatos de biópsia ou tecido *post-mortem* incluem ^{125}I , ^{14}C , e ^3H . Os radiomarcadores preferidos são ^{11}C ou ^{18}F para uso em imageologia PET *in vivo*, ^{123}I para uso em imageologia SPCT, ^{19}F para MRS/MRI, e ^3H ou ^{14}C para estudos *in vitro*. No entanto, qualquer método convencional para a visualização de sondas de diagnóstico pode ser utilizado de acordo com esta invenção.

[00099] De acordo com o aspecto da invenção que se relaciona a um método de detecção de depósitos amiloidóticos em biópsia ou tecido *post-mortem*, o método envolve a incubação de tecido fixado em

formalina com uma solução de um composto de tioflavina ligante de amilóide da presente invenção. Preferivelmente, a solução é etanol 25-100%, (com o restante sendo água), saturada com um composto de tioflavina ligante de amilóide de acordo com a presente invenção. Pela incubação, o composto marca ou rotula o depósito amiloidótico no tecido e o depósito marcado ou rotulado pode ser detectado ou visualizado por qualquer método padrão. Tal detecção inclui técnicas de microscopia tal como microscopia de campo claro, de fluorescência, a laser confocal e de polarização cruzada.

[000100] O método de quantificação da quantidade de amilóide na biópsia ou tecido *post-mortem* envolve a incubação de um derivado marcado de tioflavina de acordo com a presente invenção, ou um sal solúvel em água não tóxico deste. O tecido é obtido e homogeneizado por métodos bem conhecidos na técnica. O marcador preferido é um radiomarcado, embora outros marcadores tais como enzimas, compostos quimioluminescentes e imunofluorescentes sejam bem conhecidos a um especialista na técnica. O radiomarcador preferido é ^{125}I , ^{14}C ou ^3H que é contido em um substituinte em um dos compostos da presente fórmula apresentada aqui. O tecido contendo depósitos amiloidóticos irá se ligar aos derivados marcados dos compostos de tioflavina ligantes de amilóide da presente invenção. O tecido ligado é então separado do tecido não ligado por qualquer mecanismo conhecido a um especialista na técnica, tal como filtração. O tecido ligado pode então ser quantificado através de quaisquer meios conhecidos a um especialista na técnica. As unidades de derivado de tioflavina radiomarcado ligado ao tecido são então convertidas para unidades de microgramas de amilóide por 100 mg de tecido por comparação com uma curva padrão gerada pela incubação de quantidades conhecidas de amilóide com o derivado de tioflavina radiomarcado.

[000101] O método para se distinguir um cérebro com doença de Alzheimer de um cérebro normal envolve a obtenção de tecido de (a) cerebelo e (b) outra área do mesmo cérebro, outra que não o cerebelo,

de indivíduos normais e de indivíduos sob suspeita de apresentarem a doença de Alzheimer. Esses tecidos são convertidos em homogenados separados utilizando-se métodos bem conhecidos a um especialista na técnica, e então são incubados com um composto de tioflavina ligante de amilóide radiomarcado. A quantidade de tecido que se liga ao composto de tioflavina ligante de amilóide radiomarcado é então calculada para cada tipo de tecido (por exemplo, cerebelo, não cerebelo, norma, anormal) e é calculada a razão de ligação para o tecido de não cerebelo para tecido de cerebelo para tecido de pacientes normais e tecido de pacientes sob suspeita de apresentarem a doença de Alzheimer. Estas razões são então comparadas. Se a razão do cérebro sob suspeita de apresentar doença de Alzheimer estiver acima de 90% das razões obtidas a partir de cérebros normais, é feito o diagnóstico da doença de Alzheimer. As razões normais podem ser obtidas a partir de dados obtidos previamente ou alternativamente podem ser recalculados ao mesmo tempo que o cérebro sob suspeita é estudado.

[000102] A capacidade dos presentes compostos para se ligarem especificamente a emaranhados neurofibrilares em relação a placas amiloidóticas é particularmente verdadeira a concentrações menores de 10 nM, o que inclui a faixa de concentração *in vivo* de radiotraços de PET. A estas concentrações baixas, que contêm apenas emaranhados e não placas, não resulta em ligação significativa quando comparada com tecido cerebral de controle não contendo placas ou emaranhados. No entanto, a incubação dos homogenatos de tecido cerebral que contêm principalmente placas e alguns emaranhados com compostos radiomarcados da fórmula descrita aqui, resulta num aumento significativo na ligação quando em comparação com tecido cerebral de controle sem placas ou emaranhados. Este dado sugere a vantagem de que estes compostos são específicos para depósitos de A β a concentrações menores que 10 nM. Estas baixas concentrações são detectáveis em estudos PET, tornando possível a detecção por PET utilizando compostos radiomarcados da fórmula descrita aqui que são específicos

para depósitos de A β . A utilização de tais compostos permite a detecção por PET em depósitos de A β tais como aqueles encontrados em placas e amiloide cerebrovascular. Uma vez tendo sido reportado que níveis de A β no córtex frontal são aumentados antes da formação de emaranhados, isto sugere que os compostos radiomarcados da presente invenção, utilizados como traçadores por PET, são específicos para as alterações iniciais em córtex de AD. Naslund e colaboradores, *JAVA* 283:1571 (2000).

Método de Detecção de Depósitos Amiloidóticos *In Vivo*

[000103] Esta invenção provê adicionalmente um método para a detecção de depósito(s) amiloidótico(s) *in vivo*, compreendendo:

(i) administração a um animal de uma quantidade efetiva de um composto inventivo, onde o composto se liga a quaisquer depósitos amiloidóticos no animal; e

(ii) detecção da ligação do composto ao depósito(s) amiloidótico(s) no animal.

[000104] Após um tempo suficiente ter passado para o composto se ligar com o(s) depósito(s) amiloidótico(s), por exemplo, 30 minutos a 48 horas seguintes à administração, a ligação pode ser detectada por quaisquer meios conhecidos na técnica. Exemplos de meios de detecção incluem, sem limitação, ensaios (tais como ensaios imunométricos, calorimétricos, densiométricos, espectrográficos e cromatográficos), técnicas de neuroimageologia não invasiva (tais como espectroscopia por ressonância magnética (MRS), imageologia por ressonância magnética (MRI), e técnicas de imageologia gama tais como tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) e tomografia por emissão positrônica (PET)). Para imageologia gama, a radiação emitida a partir do órgão ou área sendo examinada é medida e

expressa ou como ligação total ou como uma razão na qual a ligação total em um tecido é normalizada (por exemplo, dividida) à ligação total noutro tecido do mesmo indivíduo durante o mesmo procedimento de imageologia *in vivo*. A ligação total *in vivo* é definida como o sinal detectado completo em um tecido por uma técnica de imageologia *in vivo* sem a necessidade de correção por uma segunda injeção de uma quantidade idêntica do composto marcado juntamente com um grande excesso de composto não marcado, mas de qualquer forma quimicamente idêntico.

[000105] O tipo de instrumento de detecção disponível pode ser um fator na seleção do halogênio ou isótopo de carbono radioativo. Por exemplo, o radioisótopo selecionado deve apresentar um tipo de decaimento que seja detectável por um dado instrumento. Outra consideração refere-se à meia-vida do radioisótopo. A meia-vida deve ser longa o suficiente de tal forma que o radioisótopo ainda seja detectável ao tempo da absorção máxima pelo alvo, mas curta o suficiente de tal forma que o hospedeiro não seja submetido a radiação deletéria. Para a detecção por SPECT, o radioisótopo selecionado pode não apresentar emissão particulada, mas pode produzir um grande número de fótons na faixa de 140-200 keV. Para a detecção por PET, o radioisótopo selecionado pode ser um radioisótopo emissor de positron, que se anula para formar dois raios gama de 511 keV, detectáveis por uma câmera PET.

[000106] Radioisótopos úteis incluem, sem limitação: ^{125}I , ^{14}C , e ^3H para quantificação de amilóide *in vitro* em homogenatos de biópsia ou tecido *post-mortem*; ^{11}C e ^{18}F para imageologia PET *in vivo*; ^{123}I para imageologia SPECT; ^{18}F para MRS/MRI; ^3H para estudos *in vivo*; e ^{18}F e ^{13}C para espectroscopia por ressonância magnética. Numa realização, a detecção é realizada por imageologia gama, imageologia por ressonância magnética ou espectroscopia por ressonância magnética. Em uma outra realização, a imageologia gama é PET ou SPECT.

[000107] O composto inventivo pode ser administrado por

quaisquer meios conhecidos a um especialista normal na técnica. Por exemplo, a administração ao animal pode ser local ou sistêmica e obtida oralmente, parenteralmente, por spray de inalação, topicamente, retal, nasal, bucal, vaginal, ou via um reservatório implantado. O termo “parenteral” com-forme utilizado aqui inclui técnicas de injeção e infusão subcutânea, intravenosa, intra-arterial, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intracisternal, intracraniana, e intraossea. O protocolo de administração exato irá variar dependendo de vários fatores incluindo a idade, peso corporal, saúde geral, sexo e dieta do paciente; a determinação dos procedimentos específicos é rotina de um especialista normal na técnica.

[000108] Níveis de dosagem da ordem de cerca de 0,001 µg/kg/dia a cerca de 10000 mg/kg/dia de um composto inventivo são úteis para os métodos inventivos. Numa realização, o nível de dosagem é de cerca de 0,001 µg/kg/dia a cerca de 10 µg/kg/dia. Noutra realização, o nível de dosagem é de cerca de 0,01 µg/kg/dia a cerca de 1,0 µg/kg/dia. Ainda noutra realização, o nível de dosagem é de cerca de 0,1 mg/kg/dia a cerca de 100 mg/kg/dia.

[000109] O nível de dosagem específico para qualquer paciente em particular irá variar dependendo de vários fatores, incluindo a atividade e a possível toxidez do composto específico empregado; da idade, peso corporal, saúde geral, sexo e dieta do paciente; do tempo de administração; da taxa de excreção; da combinação de drogas; e da forma de administração. Tipicamente, resultados de dosagem efetiva *in vitro* provém orientação útil para as doses apropriadas para a administração ao paciente. Estudos em modelos animais são também úteis. As considerações para se determinar os níveis de dosagem apropriados são bem conhecidas na técnica e do conhecimento de um médico especialista normal.

[000110] Qualquer regime de administração conhecido para regular o tempo e seqüência da liberação da droga pode ser utilizado e

repetido conforme necessário para se efetuar o tratamento nos métodos inventivos. O regime pode incluir o pré-tratamento e/ou co-administração com agentes terapêuticos adicionais.

[000111] Numa realização, os compostos inventivos são administrados a um animal que está sob suspeita de apresentar ou sob o risco de desenvolver uma doença, distúrbio ou condição caracterizada pela deposição amiloidótica. Por exemplo, o animal pode ser um humano idoso.

[000112] Noutra realização, os compostos inventivos se ligam a A β com uma constante de dissociação (K_D) de cerca de 0,0001 μ M a cerca de 10,0 μ M quando medida pela ligação ao peptídeo A β sintético ou tecido cerebral com AD.

Método de Detecção de Depósito(s) Amiloidótico(s) *In Vitro*

[000113] Esta invenção provê adicionalmente um método para a detecção de depósito(s) amiloidótico(s) *in vitro* compreendendo:

(i) o contato de um tecido corporal com uma quantidade efetiva de um composto inventivo, onde o composto se liga a quaisquer depósitos amiloidóticos no tecido; e

(ii) detecção da ligação do composto ao(s) depósito(s) amiloidótico(s) no tecido.

[000114] A ligação pode ser detectada por quaisquer meios conhecidos na técnica. Exemplos de meios de detecção incluem, sem limitação, técnicas de microscopia, tais como microscopia de campo claro, de fluorescência, a laser confocal e de polarização cruzada.

[000115] Numa realização, o tecido é tecido de biópsia ou tecido *post-mortem* que é fixado em formalina ou congelado recente. Em uma outra realização, o tecido é homogeneizado. Ainda noutra realização, o composto inventivo está em uma solução que compreende ainda 25-

99% de etanol, com o restante da solução sendo água. Ainda noutra realização, a solução compreende 0-50% de etanol e de 0,0001 a 100 μM do composto. Ainda noutra realização, o método compreende ainda (iii) a separação do(s) depósito(s) amiloidótico(s) ligado(s) ao composto do tecido; e (iv) a quantificação do(s) depósito(s) amiloidótico(s) ligado(s) ao composto inventivo. O(s) depósito(s) amiloidótico(s) ligado(s) pode(m) ser separado(s) do tecido por qualquer meio conhecido na técnica, tal como filtração. A quantidade de depósito(s) amiloidótico(s) ligado(s) pode ser convertida para unidades de μg de depósito(s) amiloidótico(s) por 100 mg de tecido por comparação com uma curva padrão gerada pela incubação de quantidades conhecidas de amilóide com o composto inventivo ou sal, hidrato, solvato ou pro-droga farmacologicamente aceitável deste.

Método para Distinguir Cérebro com Doença de Alzheimer de Cérebro Normal

[000116] Esta invenção provê adicionalmente um método para a distinção de um cérebro doente de Alzheimer de um cérebro normal compreendendo:

(i) obtenção de tecidos de (a) cerebelo e (b) uma outra área do mesmo cérebro, de um animal normal e de um animal sob suspeita de apresentar doença de Alzheimer;

(ii) contato dos tecidos com um composto inventivo;

(iii) quantificação do amilóide ligado ao composto;

(iv) cálculo da razão da quantidade de amilóide na área do cérebro outra que não o cerebelo para a quantidade de amilóide no cerebelo;

(v) comparação da razão para um animal normal com a

razão para um animal sob suspeita de apresentar a doença de Alzheimer.

[000117] Um diagnóstico da doença de Alzheimer pode ser realizado se a razão para um animal sob suspeita de apresentar a doença de Alzheimer for, por exemplo, acima de 90% da razão para um animal normal. Para este método, um animal “normal” é um que não sofra da doença de Alzheimer.

Composições Farmacêuticas

[000118] Esta invenção provê adicionalmente uma composição farmacêutica compreendendo:

(i) uma quantidade efetiva de pelo menos um composto inventivo; e

(ii) um veículo farmacêuticamente aceitável.

[000119] A composição pode compreender um ou mais ingredientes farmacêuticamente aceitáveis, incluindo, sem limitação, um ou mais agentes umectantes, agentes tampão, agentes de suspensão, agentes lubrificantes, emulsificantes, absorventes, conservantes, surfactantes, corantes, flavorizantes, adoçantes e agentes terapêuticos.

[000120] A composição pode ser formulada na forma sólida, líquida, gel ou suspensão para: (1) administração oral como, por exemplo, um líquido (solução ou suspensão aquosa ou não aquosa), tablete (por exemplo, para absorção bucal, sublingual ou sistêmica), bolus, pó, grânulo, pasta para aplicação à língua, cápsula de gelatina dura, cápsula de gelatina mole, spray bucal, emulsão e micro-emulsão; (2) administração parenteral por injeção subcutânea, intramuscular, intravenosa ou epidural como, por exemplo, uma solução, suspensão ou formulação de liberação prolongada estéril; (3) aplicação tópica como,

por exemplo, um creme, unguento, emplastro de liberação prolongada ou spray aplicado à pele; (4) administração intra-vaginal ou intra-retal como, por exemplo, um pessário, creme ou espuma; (5) administração sublingual; (6) administração ocular; (7) administração transdérmica; ou (8) administração nasal.

[000121] Numa realização, a composição é formulada para administração intravenosa e o veículo inclui um fluido e/ou um repositivo nutricional. Ainda noutra realização, a composição é capaz de ligar-se especificamente a amilóide *in vivo*, é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, não é tóxica nos níveis apropriados de dosagem e/ou apresenta uma duração do efeito satisfatória. Ainda noutra realização, a composição compreende cerca de 10 mg de albumina de soro humana e de cerca de 0,5 a 500 mg do composto inventivo por mililitro de tampão fosfato contendo NaCl.

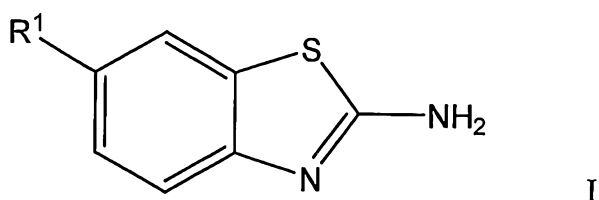
[000122] Os exemplos a seguir são fornecidos para ilustrar a presente invenção. Deve ser entendido, no entanto, que a invenção não é limitada às condições ou detalhes específicos descritos nos exemplos. Por todo o relatório, quaisquer e todas as referências a um documento publicamente disponível, incluindo as patentes US, são especificamente incorporadas neste pedido de patente como referência.

EXEMPLOS

[000123] Todos os reagentes utilizados na síntese foram adquiridos da Aldrich Chemical Company e utilizados sem purificação adicional, a não ser que de outra forma especificado. Os pontos de fusão foram determinados em um Mel-TEMP II e não foram corrigidos. Os espectros de ¹H NMR de todos os compostos foram medidos em um Bruker 300 utilizando TMS como referência interna e estavam de acordo com as estruturas apresentadas. A TLC foi realizada utilizando-se sílica gel 60

F₂₅₄ da EM Sciences e detectada sob lâmpada UV. A cromatografia flash foi realizada em sílica gel 60 (230-400 mesh. Adquirida da Mallinckrodt Company). A TLC em fase reversa foi adquirida da Whiteman Company.

Metodologia Geral para a Síntese do Composto de Fórmula I:



R¹ é hidrogênio, -OH, -NO₂, -CN, -COOR, -OCH₂OR, alquil C₁-C₆, alquenil C₂-C₆, alquinil C₂-C₆, alcoxi C₁-C₆ ou halogênio, onde um ou mais dos átomos de R¹ podem ser um átomo radiomarcado;

R é alquil C₁-C₆, onde um ou mais dos átomos de carbono podem ser um átomo radiomarcado;

é hidrolisado por um dos procedimentos a seguir:

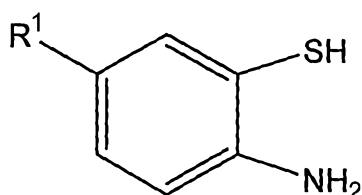
Preparação de 2-aminotiofenol por hidrólise:

[000124] O 2-aminobenzotiazol 6-substituído (172 mmol) é suspenso em KOH 50% (180g de KOH dissolvidos em 180 ml de água) e etileno glicol (40 ml). A suspensão é aquecida ao refluxo por 48 horas. No resfriamento para a temperatura ambiente, é adicionado tolueno (300 ml) e a mistura reacional é neutralizada com ácido acético (180 ml). A camada orgânica é separada e a camada aquosa é extraída com mais 200 ml de tolueno. As camadas de tolueno são combinadas e lavadas com água e secadas sobre MgSO₄. A evaporação do solvente produz o produto desejado.

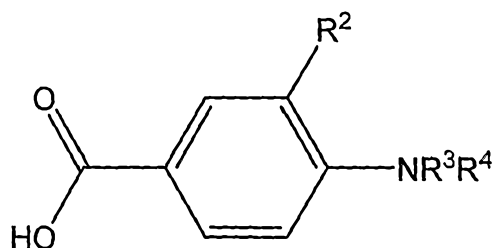
Preparação de 2-aminotiofenol por hidrazinólise

[000125] O benzotiazol 6-substituído (6,7 mmol) é suspenso em etanol (11 ml, anidro) e é adicionada hidrazina (2,4 ml) sob atmosfera de nitrogênio à temperatura ambiente. A mistura reacional é aquecida ao refluxo por 1 hora. O solvente é evaporado e o resíduo é dissolvido em água (10 ml) e o pH é ajustado para 5 com ácido acético. O precipitado é coletado por filtração e lavado com água para produzir o produto desejado.

[000126] O 2-amino-1-tiofenol 5-substituído da fórmula



é acoplado a um ácido benzóico de fórmula



onde R^2 é hidrogênio, e R^3 e R^4 são independentemente hidrogênio, alquil C_1-C_6 , alquênil C_2-C_6 ou alquinil C_2-C_6 , pela reação a seguir:

[000127] Uma mistura do 2-aminotiofenol 5-substituído (4,0 mmol), do ácido benzóico (4,0 mmol), e ácido polifosfórico (PPA) (10 g) é aquecida para 220°C por 4 horas. A mistura reacional é resfriada para a temperatura ambiente e derramada em uma solução de carbonato de potássio 10% (~400 ml). O precipitado é coletado por filtração sob pressão reduzida para produzir o produto desejado, o qual pode ser purificado por cromatografia flash ou recristalização.

[000128] O hidrogênio de R² pode ser substituído com um halogênio não radioativo ou um halogênio radioativo pela reação que se segue:

[000129] A uma solução do 2-(4'-aminofenil)-benzotiazol 6-substituído (1 mg) em 250 µl de ácido acético em um frasco vedado são adicionados 40 µl de uma solução de cloramina-T (28 mg dissolvidos em 500 µl de ácido acético) seguida por 27 µl (ca. 5 mCi) de [¹²⁵I]iodeto de sódio (atividade específica 2175 Ci/mmol). A mistura reacional é posta sob agitação a temperatura ambiente por 2,5 horas e interrompida com uma solução saturada de hidrogenossulfito de sódio. Após diluição com 20 ml de água, a mistura reacional foi carregada a um C8 Plus SepPak e eluída com 2 ml de metanol. Dependendo da natureza do substituinte na posição 6, pode ser necessário empregar-se grupos protetores. Por exemplo, o grupo 6-hidroxi é protegido como o derivado metanosulfonil (mesiloxi). Para a desproteção do grupo metanosulfonil, são adicionados 0,5 ml de NaOH 1M à solução eluída do intermediário radiomarcado com iodo. A mistura é aquecida a 50°C por 2 horas. Após ser interrompida por 500 µl de ácido acético 1M, a mistura reacional é diluída com 40 ml de água e carregada a um C8 Plus SepPak. O produto radiomarcado com iodo, apresentando uma radioatividade de aproximadamente 3 mCi, é eluído da SepPak com 2 ml de metanol. A solução é condensada por uma corrente de nitrogênio para 300 µl e o produto bruto é purificado por HPLC em uma coluna Phenomenex ODS (MeCN/tampão TEA, 35:65, pH 7,5, taxa de fluxo 0,5 ml/minuto até 4 minutos, 1,0 ml/minuto aos 4-5 minutos, e 2,0 ml/minuto após 6 minutos, tempo de retenção 23,6). As frações coletadas são carregadas em um C8 Plus SepPak. A eluição com 1 ml de etanol produziu aproximadamente 1 mCi do produto radiomarcado com iodo final.

[000130] Quando um ou ambos R³ e R⁴ são hidrogênio, então R³ e R⁴ podem ser convertidos para o alquil C₁-C₆, alquenil C₂-C₆ ou alquinil C₂-C₆ por reação com um haleto de alquila, alquenila ou alquinila sob

as condições a seguir:

[000131] Para dialquilação: A uma solução do 2-(4'-aminofenil)-benzotiazol 6-substituído (0,59 mmol) em DMSO (anidro, 2 ml) é adicionado haleto de alquila, alquenila ou alquinila (2,09 mmol), e K_2CO_3 (500 mg, 3,75 mmol). A mistura reacional é aquecida a 140°C por 16 horas. No resfriamento para a temperatura ambiente, a mistura reacional é derramada em água e extraída com acetato de etila (3 x 10 ml). As camadas orgânicas são combinadas e o solvente é evaporado. O resíduo é purificado por coluna flash para produzir o (dimetilamino-fenil)-benzotiazol 6-substituído.

[000132] Para monoalquilação: A uma solução do 2-(4'-aminofenil)-benzotiazol 6-substituído (0,013 mmol) em DMSO (anidro, 0,5 ml) é adicionado haleto de alquila, alquenila ou alquinila (0,027 mmol), e K_2CO_3 anidro (100 mg, 0,75 mmol). A mistura reacional é aquecida a 100°C por 16 horas. No resfriamento para a temperatura ambiente, a mistura reacional é diretamente purificada por TLC preparativa de fase normal para produzir os derivados 2-(4'-metilaminofenil)-benzotiazol 6-substituídos.

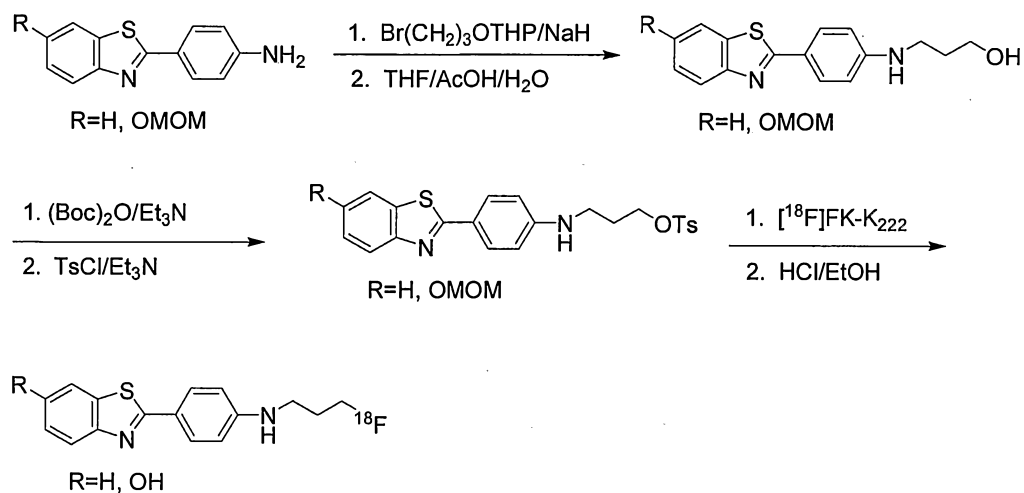
[000133] Quando R^2 é hidrogênio ou um halogênio não radioativo, R^4 é alquil C_1-C_6 , alquenil C_2-C_6 ou alquinil C_2-C_6 , onde o alquil, alquenil ou alquinil compreende um carbono radioativo ou é substituído com um halogênio radioativo, o composto pode ser sintetizado por uma das seguintes seqüências:

Para a incorporação de carbono radioativo:

[000134] Aproximadamente 1 Ci de dióxido de $[^{11}C]$ carbono é produzido utilizando-se um ciclotron de íon negativo CTI/Siemens RDS 112 por irradiação de um gás nitrogênio ($^{14}N_2$) alvo contendo 1% de gás oxigênio com uma corrente de feixe de 40 μA de prótons 11 MeV por 60 minutos. O dióxido de $[^{11}C]$ carbono é convertido ao iodeto de $[^{11}C]$ metila o reagindo primeiro com uma solução saturada de hidreto de

lítio alumínio em THF seguido pela adição de ácido hidriódico à temperatura de refluxo para gerar iodeto de [^{11}C]metila. O iodeto de [^{11}C]metila é carregado em uma corrente de gás nitrogênio para um frasco reacional contendo o precursor para a radiomarcagem. O precursor, 2-(4'-amino-fenil)-benzotiazol 6-substituído (~3,7 μmoles), é dissolvido em 400 μl de DMSO. É adicionado KOH seco (10 mg), e o frasco V de 3 ml é vortexado por 5 minutos. O iodeto de [^{11}C]metila sem adição de veículo é borbulhado através da solução a 30 ml/minuto à temperatura ambiente. A reação é aquecida por 5 minutos a 95°C utilizando-se um banho de óleo. O produto reacional é purificado por HPLC semi-preparativa utilizando uma coluna Prodigy ODS-Prep eluída com acetonitrila 60%/tampão fosfato de trietilamônio 40% pH 7,2 (fluxo a 5 ml/minuto por 0-7 minutos então aumentado para 15 ml/minuto por 7-30 minutos). A fração contendo 2-(4'-aminofenil)-benzotiazol [N-metil- ^{11}C] 6-substituído (a cerca de 15 minutos) é coletada e diluída com 50 ml de água e eluída através de um cartucho Waters C18 SepPak Plus. O C18 SepPak é lavado com 10 ml de água, e o produto é eluído com 1 ml de etanol (absoluto) em um frasco estéril seguido por 14 ml de solução salina. As purezas radioquímica e química são > 95% conforme determinado por HPLC analítica ($k' = 4,4$ utilizando a coluna analítica Prodigy ODS(3) eluída com 65/35 de acetonitrila/tampão fosfato de trietilamônio pH 7,2). O rendimento radioquímico fica na média de 17% em EOS com base em iodeto de [^{11}C]metila, e a atividade específica fica na média de cerca de 160 GBq/ μmol (4,3 Ci/ μmol) no final da síntese.

Para a incorporação de halogênio radioativo:



[000135] Uma mistura do 2-(4'-aminofenil)-benzotiazol 6-substituído (podem ser necessários grupos protetores dependendo da natureza do 6-substituinte como indicado acima) (0,22 mmol), NaH (4,2 mmol) e 2-(3-bromopropoxi)tetrahidro-2-H-pirano (0,22 mmol) em THF (8 ml) é aquecida ao refluxo por 23 horas. O solvente é removido por destilação e o resíduo é dissolvido em acetato de etila e água, a camada orgânica é separada e a camada aquosa é extraída com acetato de etila (10 ml x 6). A camada orgânica é combinada e secada sobre MgSO₄ e evaporada à secura. O resíduo é adicionado a uma solução de AcOH/THF/H₂O (5 ml, 4/2/1) e aquecido para 100°C por 4 horas. O solvente é removido por evaporação e o resíduo é dissolvido em acetato de etila (~10 ml) lavado por uma solução de NaHCO₃, secado sobre MgSO₄ e evaporado à secura para produzir um resíduo que é purificado com TLC preparativa (hexano:acetato de etila = 60:40) para produzir o 2-(4'-(3"-hidroxipropilamino)-fenil)-benzotiazol 6-substituído (45%).

[000136] A uma solução de 2-(4'-(3"-hidroxipropilamino)-fenil)-benzotiazol 6-substituído (0,052 mmol) e Et₃N (0,5 ml) dissolvido em acetona (5 ml) é adicionado (Boc)₂O (50 mg, 0,22 mmol). A mistura reacional é posta sob agitação a temperatura ambiente por 6 horas seguida pela adição de cloreto de tosila (20 mg, 0,11 mmol). A mistura reacional é posta sob agitação a temperatura ambiente por mais 24 horas. O solvente é removido e o resíduo é dissolvido em acetato de

etila (10 ml), lavado com uma solução de NaCO₃, secado sobre MgSO₄, evaporado, e purificado com coluna flash (hexano/acetato de etila = 4/1) para produzir o 2-(4'-(3"-toluenosulfonoxipropilamino)-fenil)-benzotiazol 6-substituído (13%). Este 2-(4'-(3"-toluenosulfonoxipropilamino)-fenil)-benzotiazol 6-substituído é então radiofluretado por métodos padrão como se segue:

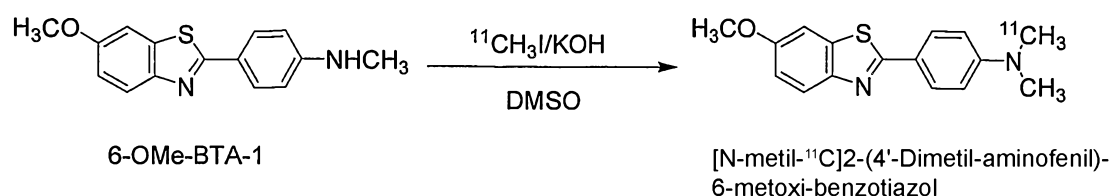
[000137] Um alvo ciclotron contendo 0,35 ml de água enriquecida com [O-18] é irradiado com prótons 11 MeV a uma corrente de feixe de 20 µA por 60 minutos, e os conteúdos são transferidos para um frasco reacional de 5 ml contendo Kryptofix 222 (22,3 mg) e K₂CO₃ (7,9 mg) em acetonitrila (57 µl). A solução é evaporada à secura três vezes a 110°C sob uma corrente de argônio seguida da adição de alíquotas de 1 ml de acetonitrila. Ao [F-18]fluoreto são adicionados 3 mg do 2-(4'-(3"-toluenosulfonoxipropilamino)-fenil)-benzotiazol 6-substituído em 1 ml de DMSO, e o frasco reacional é selado e aquecido para 85°C por 30 minutos. Ao frasco reacional, são adicionados 0,5 ml de MeOH/HCl (concentrado) (2/1 v/v), e o frasco é aquecido a 120°C por 10 minutos. Após o aquecimento, são adicionados 0,3 ml de tampão acetato de sódio 2M à solução reacional seguida da purificação por HPLC semi-preparativa utilizando uma coluna Phenomenex Prodigy ODS-prep C18 (10 µm 250x10 mm) eluída com acetonitrila 40%/tampão fosfato de trietilamina 60 mM 60% (v/v) pH 7,2 a uma taxa de fluxo de 5 ml/minuto por 15 minutos, então o fluxo é aumentado para 8 ml/minuto para o restante da separação. O produto, 2-(4'-(3"-fluorpropilamino)-fenil)-benzotiazol [F-18]6-substituído, é eluído a ~20 minutos em um volume de cerca de 16 ml. A fração contendo 2-(4'-(3"-fluorpropilamino)-fenil)-benzotiazol [F-18]6-substituído é diluída com 50 ml de água e eluída através de um cartucho Waters C18 SepPak Plus. O cartucho SepPak é então lavado com 10 ml de água, e o produto é eluído utilizando-se 1 ml de etanol (absoluto) em um frasco estéril. A solução é diluída com 10 ml de solução salina normal estéril para injeção intravenosa em animais. O produto 2-(4'-(3"-fluorpropilamino)-fenil)-

benzotiazol [F-18]6-substituído é obtido com um rendimento radioquímico de 2-12% no final da radiosíntese de 120 minutos (sem correção de decaimento) com uma atividade específica média de 1500 Ci/mmol.

Exemplos de Síntese

Exemplo 1: [N-Metil- ^{11}C]2-(4'-Dimetilaminofenil)-6-metoxi-benzotiazol foi sintetizado de acordo com o Esquema I

ESQUEMA I

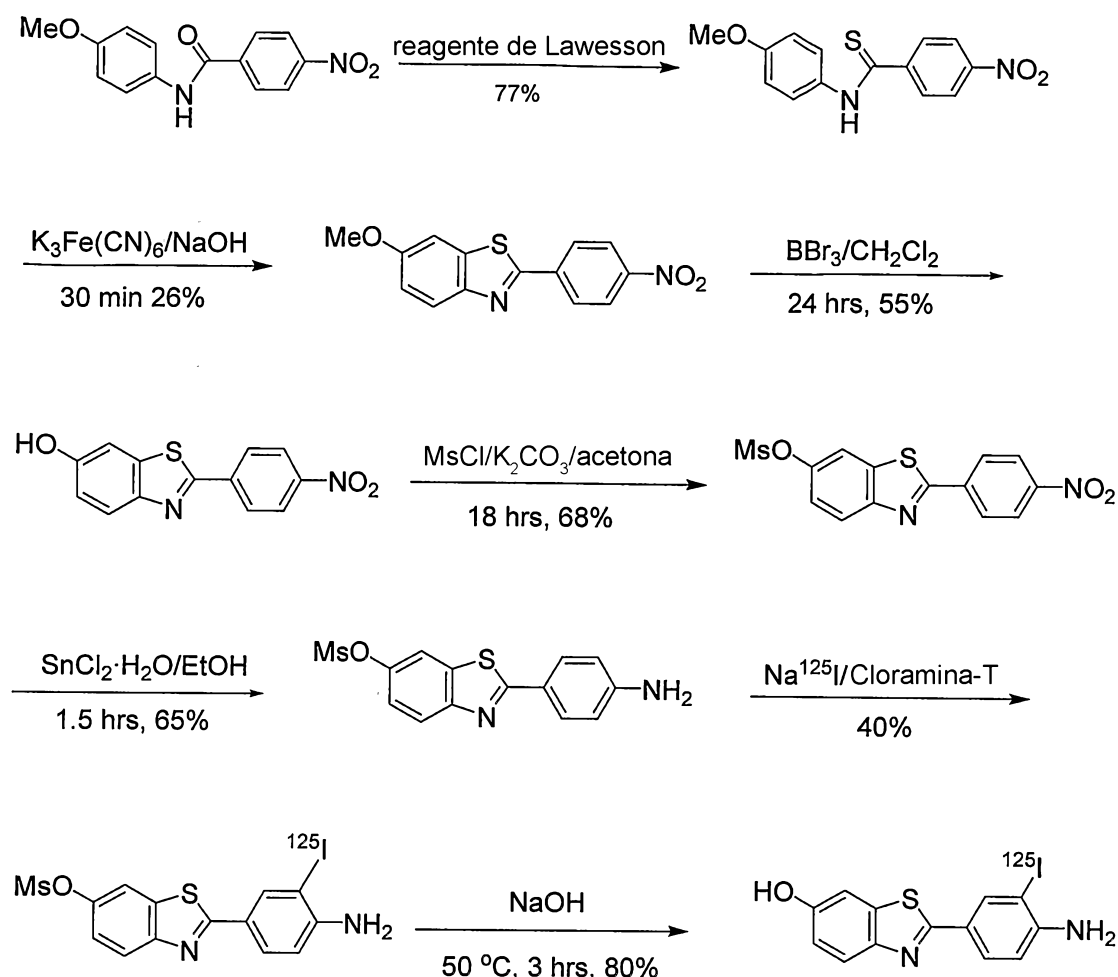


[000138] Aproximadamente 1 Ci de dióxido de [^{11}C]carbono foi produzido utilizando-se um ciclotron de íon negativo CTI/Siemens RDS 112 por irradiação de um gás nitrogênio ($^{14}\text{N}_2$) alvo contendo 1% de gás oxigênio com uma corrente de feixe de 40 μA de prótons 11 MeV por 60 minutos. O dióxido de [^{11}C]carbono é convertido ao iodeto de [^{11}C]metila reagindo primeiro com uma solução saturada de hidreto de lítio alumínio em THF seguido pela adição de ácido hidriódico à temperatura de refluxo para gerar iodeto de [^{11}C]metila. O iodeto de [^{11}C]metila é carregado em corrente de gás nitrogênio para um frasco reacional contendo o precursor para a radiomarcação. O precursor, 6- CH_3O -BTA-1 (1,0 mg, 3,7 μmoles), foi dissolvido em 400 μl de DMSO. É adicionado KOH seco (10 mg), e o frasco V de 3 ml foi vortexado por 5 minutos. O iodeto de [^{11}C]metila sem adição de veículo foi borbulhado através da solução a 30 ml/minuto à temperatura ambiente. A reação foi aquecida por 5 minutos a 95°C utilizando-se um banho de óleo. O produto reacional foi purificado por HPLC semi-preparativa utilizando uma coluna Prodigy ODS-Prep eluída com acetonitrila 60%/tampão

fosfato de trietilamônio 40% pH 7,2 (fluxo a 5 ml/minuto por 0-7 minutos então aumentado para 15 ml/minuto por 7-30 minutos). A fração contendo [N-metil- ^{11}C]2-(4'-dimetilaminofenil)-6-metoxibenzotiazol (a cerca de 15 minutos) foi coletada e diluída com 50 ml de água e eluída através de um cartucho Waters C18 SepPak Plus. O C18 SepPak é lavado com 10 ml de água, e o produto é eluído com 1 ml de etanol (absoluto) num frasco estéril seguido por 14 ml de solução salina. As purezas radioquímica e química são > 95% conforme determinado por HPLC analítica ($k' = 4,4$ utilizando a coluna analítica Prodigy ODS(3) eluída com 65/35 de acetonitrila/tampão fosfato de trietilamônio pH 7,2). O rendimento radioquímico fica na média de 17% em EOS com base em iodeto de [^{11}C]metila, e a atividade específica fica na média de cerca de 160 GBq/ μmol (4,3 Ci/ μmol) no final da síntese.

Exemplo 2: 2-(3'- ^{125}I -iodo-4'-amino-fenil)-benzotiazol-6-ol foi sintetizado de acordo com o Esquema II

ESQUEMA II



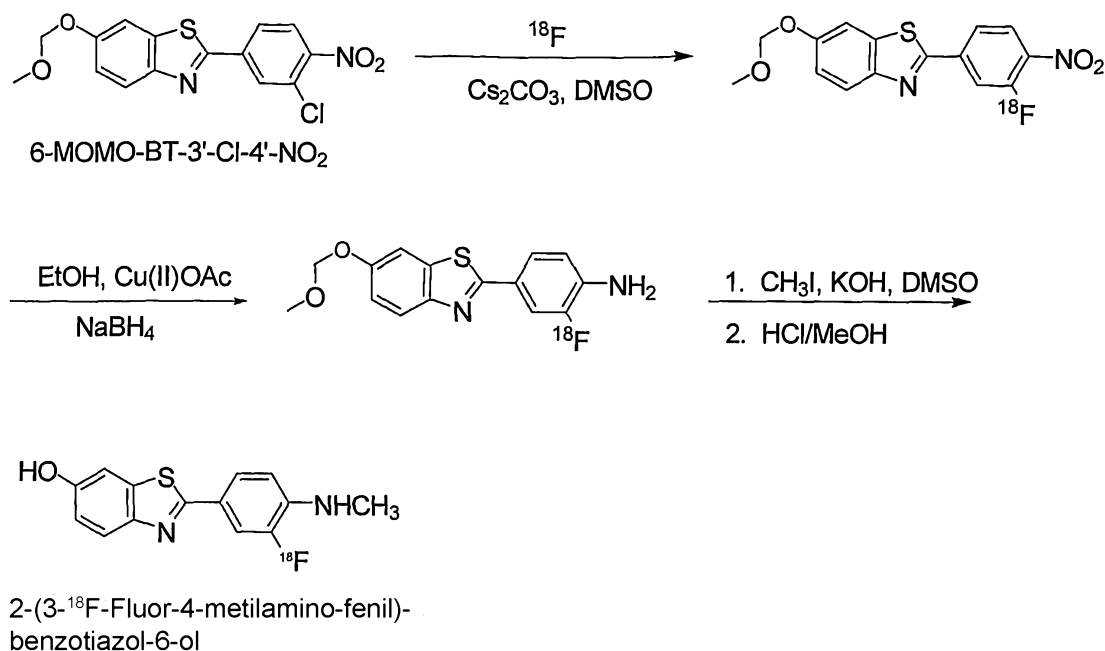
[000139] A uma solução de 2-(4'-aminofenil)-6-metanosulfoxi-benzotiazol (1 mg) em 250 µl de ácido acético em um frasco selado foram adicionados 40 µl de uma solução de cloramina T (28 mg dissolvidos em 500 µl de ácido acético) seguida de 27 µl (ca. 5 mCi) de $[^{125}\text{I}]$ iodeto de sódio (atividade específica 2175 Ci/mmol). A mistura reacional foi posta sob agitação a temperatura ambiente por 2,5 horas e interrompida com uma solução saturada de hidrogenossulfito de sódio. Após diluição com 20 ml de água, a mistura reacional foi carregada a um C8 Plus SepPak e eluída com 2 ml de metanol. Para a desproteção do grupo metanosulfo-nil, são adicionados 0,5 ml de NaOH 1M à solução eluída do intermediário radiomarcado com iodo. A mistura é aquecida a 50°C por 2 horas. Após ser interrompida por 500 µl de ácido acético 1M, a mistura reacional é diluída com 40 ml de água e

carregada a um C8 Plus SepPak. O produto radiomarcado com iodo, apresentando uma radioatividade de aproximadamente 3 mCi, foi eluído do SepPak com 2 ml de metanol. A solução foi condensada por uma corrente de nitrogênio para 300 µl e o produto bruto foi purificado por HPLC em uma coluna Phenomenex ODS (MeCN/tampão TEA, 35:65, pH 7,5, taxa de fluxo 0,5 ml/minuto até 4 minutos, 1,0 ml/minuto aos 4-5 minutos, e 2,0 ml/minuto após 6 minutos, tempo de retenção 23,6). As frações coletadas foram carregadas em um C8 Plus SepPak. A eluição com 1 ml de etanol produziu aproximadamente 1 mCi do produto radiomarcado com iodo final.

[000140] A preparação dos derivados radiomarcados com ^{123}I , é realizada de forma semelhante à síntese mostrada acima. Por exemplo, substituindo-se o ^{125}I iodeto de sódio por ^{123}I iodeto de sódio no método de síntese, isto provê o composto radiomarcado com ^{123}I . Tal substituição de um átomo de radiohalogênio por um outro é bem conhecida na técnica, ver, por exemplo, Mathis C.A., Taylor S.E., Biegon A., Enas J.D. “[^{125}I]5-Iodo-6-nitroquipazine: a potent e selective ligand for the 5- hydroxytryptamine uptake complex I. In vitro studies.” *Brain Research* 1993; **619**:229-235; Jagust W., Eberling J.L., Roberts J.A., Brennan K.M., Hanrahan S.M., Van Brocklin H., Biegon A., Mathis C.A. “In vivo imaging of the 5-hydroxytryptamine reuptake site in primate brain using SPECT and [^{123}I]5-iodo-6-nitroquipazine.” *European Journal of Pharmacology* 1993; **242**:189-193; Jagust W.J., Eberling J.L., Biegon A., Taylor S.E., Van Brocklin H., Jordan S., Hanrahan S.M., Roberts J.A., Brennan K.M., Mathis C.A. “[Iodine-123]5-Iodo-6-Nitroquipazine: SPECT Radiotracer to Image the Serotonin Transporter.” *Journal of Nuclear Medicine* 1996; **37**:1207-1214.

Exemplo 3: 2-(3- ^{18}F -Fluor-4-metilamino-fenil)-benzo-tiazol-6-ol foi sintetizado de acordo com o Esquema III

ESQUEMA III



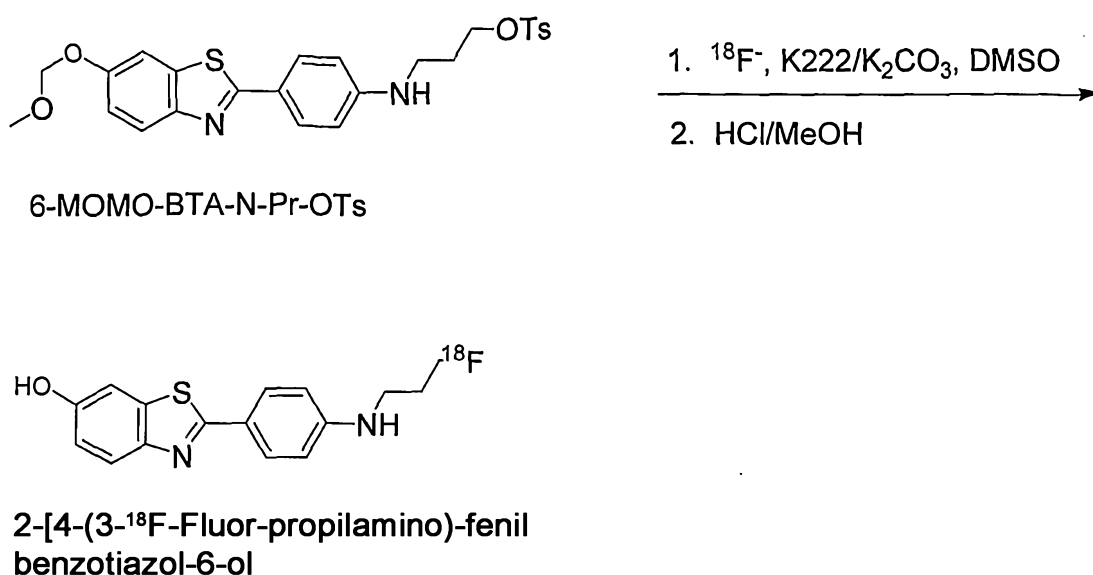
[000141] Um alvo ciclotron contendo 0,35 ml de água enriquecida com [O-18] foi irradiado com prótons 11 MeV a uma corrente de feixe de 20 µA por 60 minutos, e os conteúdos foram transferidos para um frasco reacional de 5 ml contendo 2 mg de Cs₂CO₃ em acetonitrila (57 µl). A solução foi evaporada à secura a 110°C sob uma corrente de argônio três vezes utilizando-se alíquotas de 1 ml de acetonitrila. Ao [F-18]fluoreto seco foram adicionados 6 mg de 6-MOMO-BT-3'-Cl-4'-NO₂ em 1 ml de DMSO, e o frasco reacional foi selado e aquecido para 120°C por 20 minutos (a incorporação radioquímica para esta primeira etapa da radiosíntese foi de cerca de 20% do [F-18]fluoreto). À mistura reacional bruta foram adicionados 8 ml de água e 6 ml de éter dietílico, a mistura foi agitada e deixada separar. A fase éter foi removida e evaporada à secura sob uma corrente de argônio a 120°C. À amostra seca, foram adicionados 0,5 ml de EtOH absoluto juntamente com 3 mg de acetato de cobre (II) e 8 mg de NaBH₄. A reação de redução foi deixada prosseguir por 10 minutos a temperatura ambiente (o rendimento bruto para a etapa de redução foi de cerca de 40%). À mistura reacional foram adicionados 8 ml de água e 6 ml de éter

dietílico, a mistura foi agitada e a fase éter foi separada. A fase de éter dietílico foi secada sob uma corrente de argônio a 120°C. Ao frasco reacional foram adicionados 700 µl de DMSO contendo 30 micromoles de CH₃I e 20 mg de KOH seco. O frasco reacional foi aquecido a 120°C por 10 minutos. Uma solução de 700 µl de MeOH/HCl (concentrado) 2:1 foi adicionada e aquecida por 15 minutos. Após o aquecimento, foi adicionado 1 ml de tampão acetato de sódio 2M à solução reacional seguida da purificação por HPLC semi-preparativa utilizando uma coluna Phenomenex Prodigy ODS-prep C18 (10 µm 250x10 mm) eluída com acetonitrila 35%/tampão fosfato de trietilamina 60 mM 65% (v/v) pH 7,2 a uma taxa de fluxo de 5 ml/minuto por 2 minutos, então o fluxo foi aumentado para 15 ml/minuto para o restante da separação. O produto, 2-(3-¹⁸F-fluor-4-metilamino-fenil)-benzotiazol-6-ol, foi eluído a ~15 minutos em um volume de cerca de 16 ml. A fração contendo 2-(3-¹⁸F-fluor-4-metilamino-fenil)-benzo-tiazol-6-ol foi diluída com 50 ml de água e eluída através de um cartucho Waters C18 SepPak Plus. O cartucho SepPak foi então lavado com 10 ml de água, e o produto foi eluído utilizando-se 1 ml de etanol (absoluto) para um frasco estéril. A solução foi diluída com 10 ml de solução salina normal estéril para injeção intravenosa em animais. O produto 2-(3-¹⁸F-fluor-4-metilamino-fenil)-benzo-tiazol-6-ol foi obtido em um rendimento radioquímico de 0,5% (n = 4) no final da radiosíntese de 120 minutos (sem correção de decaimento) com uma atividade específica média de 1000 Ci/mmol. As purezas radioquímica e química do 2-(3-¹⁸F-fluor-4-metilamino-fenil)-benzo-tiazol-6-ol foram obtidas por radio-HPLC com detecção UV a 350 nm utilizando uma coluna Phenomenex Prodigy ODS(3) C18 (5 µm, 250x4,6 mm) eluída com acetonitrila 40%/tampão fosfato de trietilamina 60 mM 60% (v/v) pH 7,2. O 2-(3-¹⁸F-fluor-4-metilamino-fenil)-benzo-tiazol-6-ol apresentou um tempo de retenção de ~11 minutos a uma taxa de fluxo de 2 ml/minuto (k' = 5,5). A pureza radioquímica foi > 99%, e a pureza química foi > 90%. A identidade radio do 2-(3-¹⁸F-fluor-4-metilamino-fenil)-benzo-tiazol-6-ol foi confirmada por radio-

HPLC em fase reversa utilizando uma amostra de controle de qualidade do produto radioquímico final co-injetado com um padrão autêntico (frio).

Exemplo 4: 2-[4-(3-¹⁸F-Fluoro-propilamino)-fenil]-benzotiazol-6-ol foi sintetizado de acordo com o Esquema IV

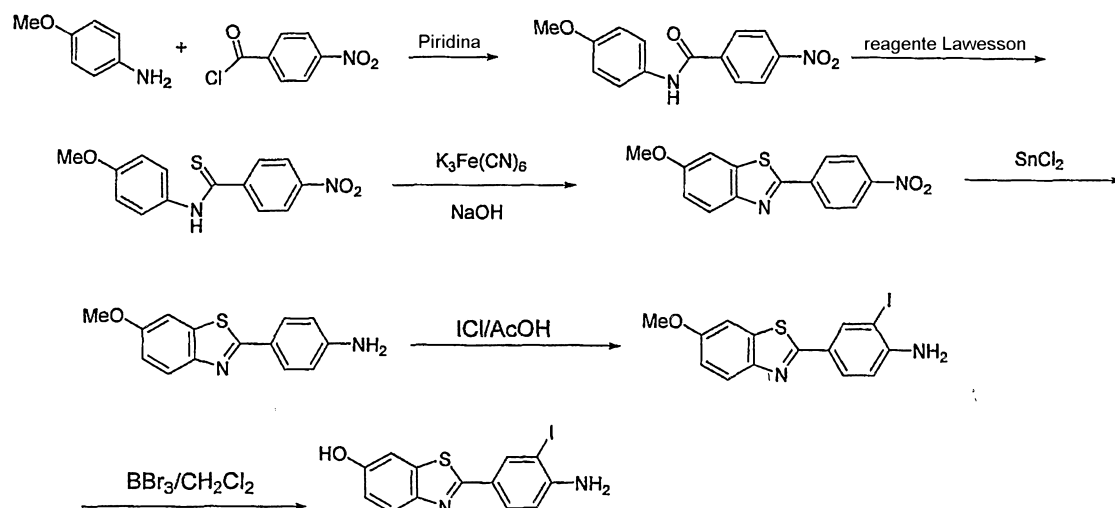
ESQUEMA IV



[000142] Um alvo ciclotron contendo 0,35 ml de água enriquecida com [O-18] foi irradiado com prótons 11 MeV a uma corrente de feixe de 20 µA por 60 minutos, e os conteúdos foram transferidos para um frasco reacional de 5 ml contendo Kryptofix 222 (22,3 mg) e K₂CO₃ (7,9 mg) em acetonitrila (57 µl). A solução é evaporada à secura três vezes a 110°C sob uma corrente de argônio seguida da adição de alíquotas de 1 ml de acetonitrila. Ao [F-18]fluoreto seco foram adicionados 3 mg de 6-MOMO-BTA-N-Pr-Ots em 1 ml de DMSO, e o frasco reacional foi selado e aquecido para 85°C por 30 minutos. Ao frasco reacional, são adicionados 0,5 ml de MeOH/HCl (concentrado) (2/1 v/v), e o frasco foi aquecido a 120°C por 10 minutos. Após o aquecimento, foram adicionados 0,3 ml de tampão acetato de sódio 2M à solução reacional

seguida da purificação por HPLC semi-preparativa utilizando uma coluna Phenomenex Prodigy ODS-prep C18 (10 μ m 250x10 mm) eluída com acetonitrila 40%/tampão fosfato de trietilamina 60 mM 60% (v/v) pH 7,2 a uma taxa de fluxo de 5 ml/minuto por 15 minutos, então o fluxo foi aumentado para 8 ml/minuto para o restante da separação. O produto, [F-18]6-HO-BTA-N-PrF, foi eluído a ~20 minutos em um volume de cerca de 16 ml. A fração contendo [F-18]6-HO-BTA-N-PrF foi diluída com 50 ml de água e eluída através de um cartucho Waters C18 SepPak Plus. O cartucho SepPak é então lavado com 10 ml de água, e o produto foi eluído utilizando-se 1 ml de etanol (absoluto) em um frasco estéril. A solução foi diluída com 10 ml de solução salina normal estéril para injeção intravenosa em animais. O produto [F-18]6-HO-BTA-N-PrF foi obtido em um rendimento radioquímico de $8\pm 4\%$ (n = 8) no final da radiosíntese de 120 minutos (sem correção de decaimento) com uma atividade específica média de 1500 Ci/mmol. As purezas radioquímica e química do [F-18]6-HO-BTA-N-PrF foram obtidas por radio-HPLC com detecção UV a 350 nm utilizando uma coluna Phenomenex Prodigy ODS(3) C18 (5 μ m, 250x4,6 mm) eluída com acetonitrila 40%/tampão fosfato de trietilamina 60 mM 60% (v/v) pH 7,2. O [F-18]6-HO-BTA-N-PrF apresentou um tempo de retenção de ~12 minutos a uma taxa de fluxo de 2 ml/minuto ($k' = 6,1$). A pureza radioquímica foi > 99%, e a pureza química foi > 90%. A identidade radio do [F-18]6-HO-BTA-N-PrF foi confirmada por radio-HPLC em fase reversa utilizando uma amostra de controle de qualidade do produto radioquímico final co-injetado com um padrão autêntico (frio).

Exemplo 5: Síntese do 2-(3'-iodo-4'-aminofenil)-6-hidroxi-benzotiazol



Preparação de 4-metoxi-4'-nitrobenzanilida

[000143] p-Anisidina (1,0 g, 8,1 mmol) foi dissolvida em piridina anidra (15 ml), foi adicionado cloreto de 4-nitrobenzoila (1,5 g, 8,1 mmol). A mistura reacional foi deixada em repouso a temperatura ambiente por 16 horas. A mistura reacional foi derramada em água e o precipitado foi coletado com filtrado sob pressão de vácuo e lavado com bicarbonato de sódio a 5% (2 x 10 ml). O produto foi utilizado na etapa seguinte sem purificação adicional.

[000144] $^1\text{H NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ : 10,46 (s, 1H, NH); 8,37 (d, $J=5,5\text{Hz}$, 2H, H-3',5'); 8,17 (d, $J=6,3\text{Hz}$, 2H, H-2',6'); 7,48 (d, $J=6,6\text{Hz}$, 2H); 6,97 (d, $J=6,5\text{Hz}$, 2H); 3,75 (s, 3H, MeO).

Preparação de 4-metoxi-4'-nitrobenzanilida

[000145] Uma mistura de 4-metoxi-4'-nitrobenzanilina (1,0 g, 3,7 mmol) e reagente de Lawesson (0,89 g, 2,2 mmol, 0,6 equiv.) em clorobenzeno (15 ml) foi aquecida ao refluxo por 4 horas. O solvente foi evaporado e o resíduo foi purificado com coluna flash (hexano:acetato de etila = 4:1) para produzir 820 mg (77.4%) do produto como um sólido laranja.

[000146] $^1\text{H NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ : 8,29 (d, 2H, H-3',5'); 8,00

(d, J=8,5Hz, 2H, H-2',6'); 7,76 (d, 2H); 7,03 (d, J=8,4Hz, 2H); 3,808-3,7 (d, J=5,5Hz, 2H, H-3',5'); 8,17 (d, J=6,3Hz, 2H, H-2',6'); 7,48 (d, J=6,6Hz, 2H); 6,97 (d, J=6,5Hz, 2H); 3,75 (s, 3H, MeO); (s, 3H, MeO).

Preparação de 6-metoxi-2-(4-nitrofenil)benzotiazol

[000147] 4-Metoxi-4'-nitrotiobenzanilidas (0,5 g, 1,74 mmol) foi umedecida com um pouco de etanol (~0,5 ml), e foi adicionada uma solução aquosa a 30% de hidróxido de sódio (556 mg, 13,9 mmol, 8 equiv.). A mistura foi diluída com água para produzir uma solução/suspensão final aquosa a 10% de hidróxido de sódio. Alíquotas deste mistura foram adicionadas a intervalos de 1 minuto a uma solução sob agitação de ferricianeto de potássio (2,29 g, 6,9 mmol, 4 equiv.) em água (5 ml) a 80-90°C. A mistura reacional foi aquecida por mais 0,5 h e então deixada resfriar. O precipitado foi coletado por filtração sob pressão de vácuo e lavado com água, purificado com coluna flash (hexano:acetato de etila = 4:1) para produzir 130 mg (26%) do produto.

[000148] ¹H NMR(300MHz, Acetona-d₆) δ: 8,45 (m, 4H); 8,07 (d, J=8,5Hz, 1H, H-4); 7,69 (s, 1H, H-7); 7,22 (d, J=9,0Hz, 1H, H-5); 3,90 (s, 3H, MeO).

Preparação de 6-metoxi-2-(4-aminofenil)benzotiazol

[000149] Uma mistura de 6-metoxi-2-(4-nitrofenil)benzotiazóis (22 mg, 0,077 mmol) e cloreto de estanho (II) Demography (132 mg, 0,45 mmol) em etanol em ebulição foi posta sob agitação sob atmosfera de nitrogênio por 4 horas. O etanol foi evaporado e o resíduo foi dissolvido em acetato de etila (10 ml), lavado com hidróxido de sódio 1N (2 ml) e água (5 ml), e secado sobre MgSO₄. A evaporação do solvente produziu 19 mg (97%) do produto como um sólido amarelo.

Preparação de 2-(3'-Iodo-4'-aminofenil)-6-metoxi-benzotiazol

[000150] A uma solução de 2-(4'-aminofenil)-6-metoxibenzotiazol (22 mg, 0,09 mmol) em ácido acético glacial (2,0 mL) foi injetada uma solução de cloreto de iodo 1M em CH₂Cl₂ (0,10 ml, 0,10 mmol, 1,2 equiv.) sob atmosfera de N₂. A mistura reacional foi posta sob agitação a temperatura ambiente por 16 horas. O ácido acético glacial foi removido sob pressão reduzida e o resíduo foi dissolvido em CH₂Cl₂. Após a neutralização da solução com NaHCO₃, a camada aquosa foi separada e extraída com CH₂Cl₂. As camadas orgânicas foram combinadas e secadas sobre MgSO₄. Seguindo à evaporação do solvente, o resíduo foi purificado por TLC preparativa (hexanos:acetato de etila = 6:1) para produzir 2-(4'-amino-3'-iodofenil)-6-metoxibenzotiazol (25 mg, 76%) como um sólido marrom.

[000151] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,35 (d, J=2,0 Hz, 1H); 7,87 (dd, J₁=2,0Hz, J₂=9,0Hz, 1H); 7,31 (d, J=2,2Hz, 1H); 7,04 (dd, J₁=2,2Hz, J₂=9,0 Hz, 1H); 6,76 (d, J=9,0Hz, 1H); 3,87 (s, 3H).

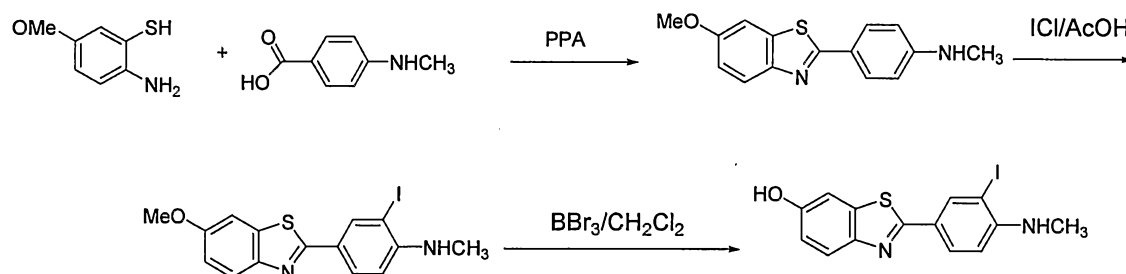
Preparação de 2-(3'-iodo-4'-aminofenil)-6-hidroxi-benzotiazol

[000152] A uma solução de 2-(4'-amino-3'-iodofenil)-6-metoxiben-zotiazol (5) (8,0 mg, 0,02 mmol) em CH₂Cl₂ (2,0 mL) foi injetada uma solução de BBr₃ 1M em CH₂Cl₂ (0,20 ml, 0,20 mmol) sob atmosfera de N₂. A mistura reacional foi posta sob agitação a temperatura ambiente por 18 horas. Após a reação ter sido interrompi-da com água, a mistura foi neutralizada com NaHCO₃. A camada aquo-sa foi extraída com acetato de etila (3 x 3 ml). As camadas orgânicas foram combinadas e secadas sobre MgSO₄. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por TLC (hexanos: acetato de etila = 7:3) para produzir 2-(3'-iodo-4'-aminofenil)-6-hidroxibenzotiazol (4,5 mg, 58%) na forma de um sólido marrom.

[000153] ¹H NMR (300 MHz, acetona-d₆) δ (ppm): 8,69 (s, 1H); 8,34 (d, J=2,0Hz, 1H); 7,77 (dd, J₁=2,0 Hz, J₂=8,4Hz, 1H); 7,76 (d, J=8,8Hz, 1H); 7,40 (d, J=2,4Hz, 1H); 7,02 (dd, J₁=2,5Hz, J₂=8,8Hz, 1H); 6,94 (d,

$J=8,5\text{Hz}$, 1H); 5,47 (br., 2H). HRMS m/z 367,9483 (M^+ calcd. para $C_{13}H_9N_2OS$ 367,9480).

Exemplo 6: Síntese de 2-(3'-iodo-4'-metilaminofenil)-6-hidroxibenzotiazol



Preparação de 6-metoxi-2-(4-metilaminofenil)benzo-tiazol

[000154] Uma mistura de ácido 4-metilaminobenzóico (11,5 g, 76,2 mmol) e 5-metoxi-2-aminotiofenol (12,5 g, 80 mmol) foi aquecida em PPA (~30 g) para 170°C sob atmosfera de N_2 por 1,5 hora. A mistura reacional foi então resfriada para a temperatura ambiente e derramada em uma solução de K_2CO_3 10%. O precipitado foi filtrado sob pressão reduzida. O produto bruto foi recristalizado duas vezes a partir de acetona/água e THF/água seguindo-se tratamento com carbono ativo para produzir 4,6 g (21%) de 6-metoxi-2-(4-metilaminofenil)benzotiazol como um sólido amarelo.

[000155] 1H NMR (300 MHz, acetona- d_6) δ : 7,84 (d, $J=8,7\text{Hz}$, 2H, H-2',6'); 7,78 (dd, $J_1=8,8\text{Hz}$, $J_2=1,3\text{Hz}$, 1H, H-4); 7,52 (d, $J=2,4\text{Hz}$, 1H, H-7); 7,05 (dd, $J_1=8,8\text{Hz}$, $J_2=2,4\text{Hz}$, H-5); 6,70 (d, $J=7,6\text{Hz}$, 2H, H-3'5'); 5,62 (s, 1H, NH); 3,88 (s, 3H, OCH_3); 2,85 (d, $J=6,2\text{Hz}$, 3H, NCH_3).

Preparação de 2-(3'-iodo-4'-metilaminofenil)-6-metoxi benzotiazol

[000156] A uma solução de 2-(4'-metilaminofenil)-6-metoxi benzotiazol (20 mg, 0,074 mmol) dissolvido em ácido acético glacial (2ml) foi adicionado ICl (90 μl , 0,15 mmol, 1,2 equiv., 1M em CH_2Cl_2) sob

atmosfera de N₂. A reação foi deixada sob agitação a temperatura ambiente por 18 horas. O ácido acético glacial foi removido sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em CH₂Cl₂ e neutralizado com NaHCO₃. A camada aquosa foi extraída com CH₂Cl₂ e as camadas orgânicas foram combinadas, secadas sobre MgSO₄ e evaporadas. O resíduo foi purificado com TLC preparativa (hexano:EA = 2:1) para produzir 2-(4'-metilamino-3'-iodofenil)-6-metoxibenzotiazol (8 mg, 27%) como um sólido marrom.

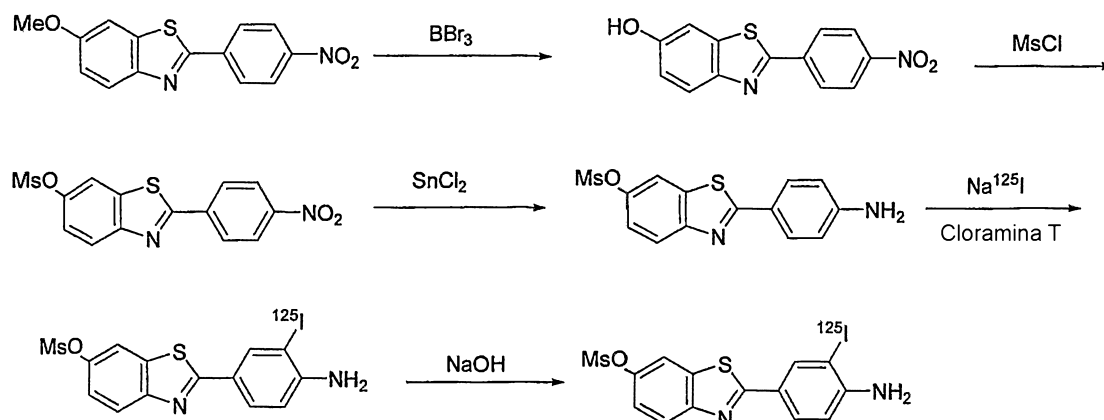
[000157] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,39 (d, J=2,0Hz, 1H); 7,88 (d, J=9,0Hz, 1H); 7,33 (d, J=2,2Hz, 1H); 7,06 (dd, J₁=2,2Hz, J₂=9,0Hz, 1H); 6,58 (d, J=9,0Hz, 1H); 3,89 (s, 3H, OCH₃).

Preparação de 2-(3'-iodo-4'-metilamino-fenil)-6-hidroxibenzotiazol

[000158] A uma solução de 2-(4'-metilamino-3'-iodofenil)-6-metoxibenzotiazol (12 mg, 0,03 mmol) dissolvido em CH₂Cl₂ (4 ml) foi adicionado BBr₃ (400 µl, 0,4 mmol), 1M em CH₂Cl₂) sob atmosfera de N₂. A reação foi deixada sob agitação a temperatura ambiente por 18 horas. Foi, então, adicionada água para interromper a reação e a solução foi neutralizada com NaHCO₃, extraída com acetato de etila (3 x 5 ml). As camadas orgânicas foram combinadas, secadas sobre MgSO₄ e evaporadas. O resíduo foi purificado por TLC preparativa (hexano:EA = 7:3) para produzir 2-(4'-metilamino-3'-iodofenil)-6-hidroxibenzotiazol (5 mg, 43%) como um sólido marrom.

[000159] ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,37 (d, H=2,0Hz, 1H); 7,88 (dd, J₁=2,0Hz, J₂=8,4Hz, 1H); 7,83 (d, J=8,8Hz, 1H); 7,28 (d, J=2,4Hz, 1H); 6,96 (dd, J₁=2,5Hz, J₂=8,8Hz, 1H); 6,58 (d, J=8,5Hz, 1H); 2,96(s, 3H, CH₃).

Exemplo 7: Radiossíntese de [¹²⁵I]6-OH-BTA-0-3'-I



Preparação de 2-(4'-nitrofenil)-6-hidroxibenzotiazol

[000160] A uma suspensão de 2-(4'-nitrofenil)-6-metoxibenzotiazol (400 mg, 1,5 mmol) em CH_2Cl_2 (10 ml) foi adicionado BBr_3 (1M em CH_2Cl_2 , 10 ml, 10 mmol). A mistura reacional foi posta sob agitação a temperatura ambiente por 24 horas. A reação foi então interrompida com água, e extraída com acetato de etila (3 x 20 ml). As camadas orgânicas foram combinadas e lavadas com água, secadas sobre MgSO_4 e evaporadas. O resíduo foi purificado por cromatografia flash (sílica gel, hexanos:acetato de etila = 1:1) para produzir o produto como um sólido amarelo (210 mg, 55%).

[000161] ^1H NMR (300MHz, acetona- d_6) δ (ppm): 9,02 (s, OH); 8,41 (d, $J=9,1\text{Hz}$, 1H); 8,33 (d, $J=9,1\text{Hz}$, 1H); 7,96 (d, $J=8,6\text{Hz}$, 1H); 7,53 (d, $J=2,4\text{Hz}$, 1H); 7,15 (dd, $J_1=8,6\text{Hz}$, $J_2=2,4\text{Hz}$, 1H).

Preparação de 2-(4'-nitrofenil)-6-metilsulfoxi benzotiazol

[000162] A uma solução de 2-(4'-nitrofenil)-6-hidroxi benzotiazol (50 mg, 0,18 mmol) dissolvido em acetona (7 ml, anidra) foi adicionado K_2CO_3 (100 mg, 0,72 mmol, em pó) e MsCl (200 μl). Após agitação por 2 horas, a mistura reacional foi filtrada. O filtrado foi concentrado e o resíduo foi purificado por coluna flash (sílica gel, hexano:acetato de etila = 4:1) para produzir 2-(4'-nitrofenil)-6-metilsulfoxibenzotiazol (44 mg, 68%) como um sólido amarelo claro.

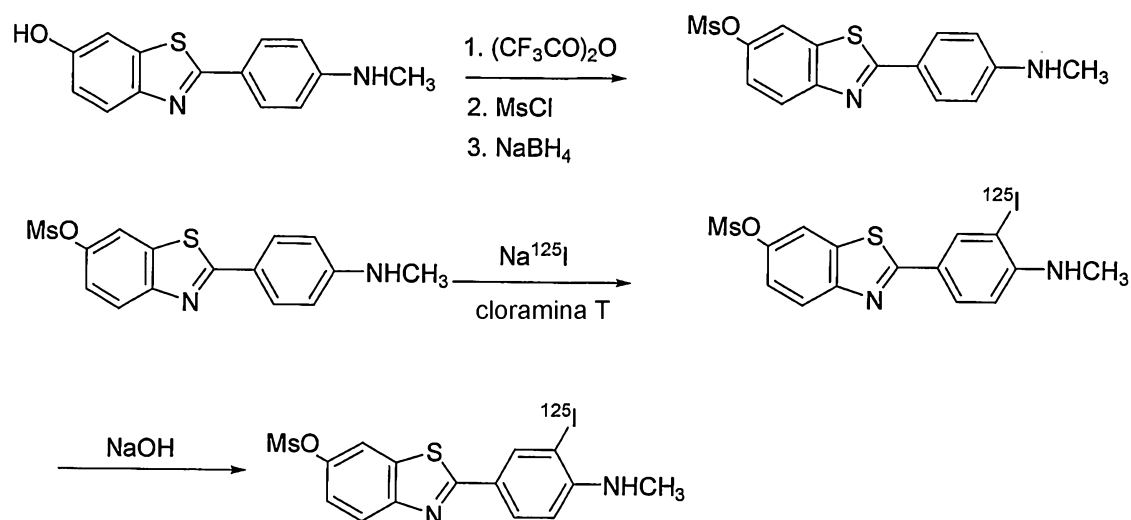
[000163] ^1H NMR (300MHz, acetona- d_6) δ (ppm): 8,50-8,40 (m, 4H); 8,29 (d, $J=2,3\text{Hz}$, 1H); 8,23 (d, $J=8,9\text{Hz}$, 1H); 7,61 (dd, $J_1=2,3\text{Hz}$, $J_2=8,9\text{Hz}$, 1H).

Preparação de 2-(4'-aminofenil)-6-metilsulfoxi benzotiazol

[000164] A uma solução de 2-(4'-nitrofenil)-6-metilsulfoxi benzotiazol (35 mg, 0,10 mmol) dissolvido em etanol (10 ml) foi adicionado $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (50 mg). A mistura reacional foi aquecida ao refluxo por 1,5 hora. O solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em acetato de etila (10 ml), lavado com NaOH 1N, água, secado sobre MgSO_4 . A evaporação do solvente produziu 2-(4'-aminofenil)-6-metilsulfoxi benzotiazol (21 mg, 65%) como um sólido marrom claro.

[000165] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,02 (d, $J=6,2\text{Hz}$, 1H); 7,92 (d, $J=8,7\text{Hz}$, 2H); 7,84 (d, $J=2,4\text{Hz}$, 1H); 7,38 (dd, $J_1=2,4\text{Hz}$, $J_2=6,2\text{Hz}$, 1H); 6,78 (d, $J=8,7\text{Hz}$, 2H); 2,21 (s, 3H, CH_3).

Exemplo 8: Radiossíntese de [^{125}I]-6-OH-BTA-1-3'I



[000166] A uma solução de 2-(4'-metilaminofenil)-6-hidroxi-benzotiazol (300 mg, 1,17 mmol) dissolvido em CH_2Cl_2 (20 ml) foi adicionado

Et₃N (2 ml) e ácido trifluoracético (1,5 ml). A mistura reacional foi posta sob agitação a temperatura ambiente por 3 horas. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo foi dissolvido em acetato de etila (30 ml), lavado com uma solução de NaHCO₃, salmoura, água, e secado sobre MgSO₄. Após a evaporação do solvente, o rãs foi dissolvido em acetona (20 ml, pré-secada sobre K₂CO₃), foi adicionado K₂CO₃ (1,0 g, pó) seguido de MsCl (400 mg, 3,49 mmol). A mistura reacional foi posta sob agitação a temperatura ambiente e monitorada com TLC até o desaparecimento do material de partida. O resíduo foi então filtrado. O filtrado foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em acetato de etila (30 ml), lavado com uma solução de NaHCO₃, salmoura, água, e secado sobre MgSO₄. Após a evaporação do solvente, o resíduo foi dissolvido em EtOH e foi adicionado NaBH₄. A mistura reacional foi posta sob agitação a temperatura ambiente por 2 h. O solvente foi evaporado e o resíduo foi dissolvido em água, extraído com acetato de etila (3 x 20 ml), os extratos foram combinados e secados sobre MgSO₄. Após evaporação do solvente, o resíduo foi purificado com coluna flash (hexanos/acetato de etila = 8:1) para produzir o produto (184 mg, 47,0%) como um sólido marrom.

[000167] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,94 (d, J=8,8Hz, 1H); 7,87 (d, J=8,7Hz, 2H); 7,77 (d, J=2,3Hz, 1H); 7,30(dd, J₁=8,8Hz, J₂=2,3Hz, 1H); 6,63(d, J=8,7Hz, 2H); 3,16(s, CH₃); 2,89 (s, NCH₃).

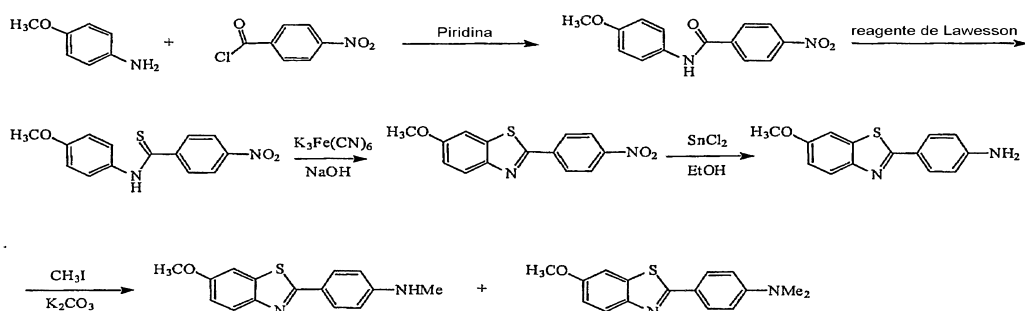
Procedimento geral para a radiomarcção:

[000168] A uma solução de 2-(4'-aminofenil)-6-metanosulfonoxibenzotiazol ou 2-(4'-metilaminofenil)-6-metilsolfoxibenzo-tiazol (1 mg) em 250 µl de ácido acético em um frasco selado foram adicionados 40 µl de uma solução de cloraminas T (28 mg dissolvidos em 500 µl de ácido acético) seguida de 27 µl (ca. 5 mCi) de [¹²⁵I]iodeto de sódio (atividade específica de 2175 Ci/mmol). A mistura reacional foi posta sob agitação a temperatura ambiente por 2,5 horas e interrompida com

uma solução saturada de hidrogenossulfito de sódio. Após a diluição com 20 ml de água, a mistura reacional foi carregada a um C8 Plus SepPak e eluída com 2 ml de metanol. Para a desproteção do grupo metanosulfonyl, foram adicionados 0,5 ml de NaOH 1M à solução eluída do intermediário radiomarcado com iodo. A mistura foi aquecida a 50°C por 2 horas. Após ser interrompida com 500 µl de ácido acético, a mistura reacional foi diluída com 40 ml de água e carregada a um C8 Plus SepPak. O produto radiomarcado com iodo, apresentando uma radioatividade de aproximadamente 3 mCi, foi eluído do SepPak com 2 ml de metanol. A solução foi condensada por uma corrente de nitrogênio para 300 µl e o produto bruto foi purificado por HPLC em uma coluna Phenomenex ODS (MeCN/tampão TEA, 35:65, pH 7,5, taxa de fluxo 0,5 ml/minuto até 4 minutos, 1,0 ml/minuto aos 4-6 minutos, e 2,0 ml/minuto após 6 minutos, tempo de retenção 23,6). As frações coletadas foram carregadas a um C8 Plus SepPak. Eluição com 1 ml de etanol produziu aproximadamente 1 mCi do produto radiomarcado com iodo.

Exemplo 9: Síntese de derivados de 2-(4'-aminofenil)-benzotiazol)

[000169] Rota 1: Exemplo de síntese de 6-MeO-BTA-0, -1, -2, que são representativos do grupo dos compostos de tioflavina (Shi e colaboradores, "Antitumor Benzothiazoles. 3. Synthesis of 2-(4-Aminophenyl)benzothiazoles e Evaluation of Their Activities against Breast Cancer Cell Lines *in Vitro* and *in Vivo*" *J. Med. Chem.* **39**:3375-3384, 1996).



Preparação de 4-metoxi-4'-nitrobenzanilida

[000170] p-Anisidina (1,0 g, 8,1 mmol) foi dissolvida em piridina anidra (15 ml), foi adicionado cloreto de nitrobenzoila (1,5 g, 8,1 mmol). A mistura reacional foi deixada em repouso a temperatura ambiente por 16 horas. A mistura reacional foi derramada em água e o precipitado foi coletado com filtrado sob pressão de vácuo e lavado com bicarbonato de sódio 5% (2 x 10 ml). O produto foi utilizado na etapa seguinte sem purificação adicional.

[000171] ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ : 10,46 (s, 1H, NH); 8,37 (d, $J=5,5\text{Hz}$, 2H, H-3',5'); 8,17 (d, $J=6,3\text{Hz}$, 2H, H-2',6'); 7,48 (d, $J=6,6\text{Hz}$, 2H); 6,97 (d, $J=6,5\text{Hz}$, 2H); 3,75 (s, 3H, MeO).

Preparação de 4-metoxi-4'-nitrotiobenzanilida

[000172] Uma mistura de 4-metoxi-4'-nitrotiobenzanilina (1,0 g, 3,7 mmol) e reagente de Lawesson (0,89 g, 2,2 mmol, 0,6 equiv.) em clorobenzeno (15 ml) foi aquecida ao refluxo por 4 horas. O solvente foi evaporado e o resíduo foi purificado com coluna flash (hexano:acetato de etila = 4:1) para produzir 820 mg (77,4%) do produto como um sólido laranja.

[000173] ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ : 8,29 (d, 2H, H-3',5'); 8,00 (d, $J=8,5\text{Hz}$, 2H, H-2',6'); 7,76 (d, 2H); 7,03 (d, $J=8,4\text{Hz}$, 2H); 3,808-3,7 (d, $J=5,5\text{Hz}$, 2H, H-3',5'); 8,17 (d, $J=6,3\text{Hz}$, 2H, H-2', 6'); 7,48 (d, $J=6,6\text{Hz}$, 2H); 6,97 (d, $J=6,5\text{Hz}$, 2H); 3,75 (s, 3H, MeO); (s, 3H, MeO).

Preparação de 6-metoxi-2-(4-nitrofenil)benzotiazol

[000174] 4-Metoxi-4'-nitrotiobenzanilidas (0,5 g, 1,74 mmol) foram umedecidas com um pouco de etanol (~0,5 ml), e foi adicionada uma solução aquosa a 30% de hidróxido de sódio (556 mg, 13,9 mmol, 8 equiv.). A mistura foi diluída com água para prover uma solução/suspensão aquosa a 10% final de hidróxido de sódio. Alíquotas desta mis-

tura foram adicionadas a intervalos de 1 minuto a uma solução sob agitação de ferricianeto de potássio (2,29 g, 6,9 mmol, 4 equiv.) em água (5 ml) a 80-90°C. A mistura reacional foi aquecida por mais 0,5 h e então deixada resfriar. O precipitado foi coletado por filtração sob pressão de vácuo e lavado com água, purificado com coluna flash (hexano :acetato de etila = 4:1) para produzir 130 mg (26%) do produto.

[000175] ^1H NMR (300MHz, acetone- d_6) δ : 8,45 (m, 4H); 8,07 (d, $J=8,5\text{Hz}$, 1H, H-4); 7,69 (s, 1H, H-7); 7,22 (d, $J=9,0\text{Hz}$, 1H, H-5); 3,90 (s, 3H, MeO).

Preparação de 6-metoxi-2-(4-aminofenil)benzotiazol

[000176] Uma mistura de 6-metoxi-2-(4-nitrofenil)benzotiazóis (22 mg, 0,077 mmol) e cloreto de estanho (II) Demography (132 mg, 0,45 mmol) em etanol em ebulição foi posta sob agitação sob atmosfera de nitrogênio por 4 horas. O etanol foi evaporado e o resíduo foi dissolvido em acetato de etila (10 ml), lavado com hidróxido de sódio 1N (2 ml) e água (5 ml), e secado sobre MgSO_4 . A evaporação do solvente produziu 19 mg (97%) do produto como um sólido amarelo.

Preparação de 6-metoxi-2-(4-metilaminofenil)benzotiazol e 6-metoxi-2-(4-dimetilaminofenil)benzotiazol

[000177] Uma mistura de 6-metoxi-2-(4-aminofenil)benzotiazol (15 mg, 0,059 mmol), MeI (8,3 mg, 0,060 mmol) e K_2CO_3 (100 mg, 0,72 mmol) em DMSO (anidro, 0,5 ml) foi aquecida a 100°C por 16 horas. A mistura reacional foi purificada por TLC em fase reversa (MeOH:H₂O = 7:1) para produzir 2,0 mg (13,3%) de 6-metoxi-2-(4-metilaminofenil)benzotiazol e 6 mg (40%) de 6-metoxi-2-(4-dimetilamino-fenil)benzotiazol.

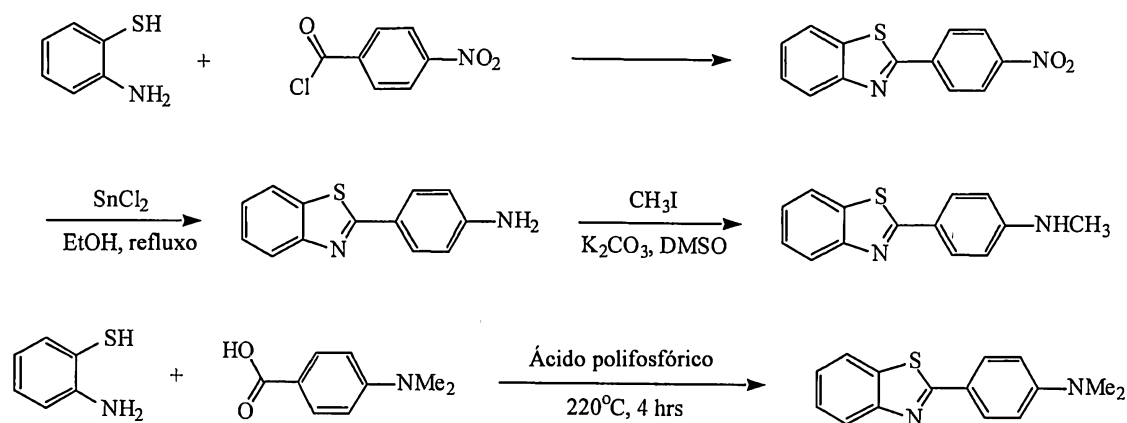
[000178] ^1H NMR do 6-metoxi-2-(4-metilaminofenil)benzotiazol (300MHz, acetone- d_6) δ : 7,85 (d, $J=8,7\text{Hz}$, 2H, H-2',6'), 7,75 (dd, $J=8,8\text{Hz}$, $J=1,3\text{Hz}$, 1H, H-4), 7,49 (d, $J=2,4\text{Hz}$, 1H, H-7), 7,01 (dd,

$J=8,8\text{Hz}$, $J=2,4\text{Hz}$, H-5), 6,78 (d, $J=7,6\text{Hz}$, 2H, H-3',5'), 3,84 (s, 3H,,MeO), 2,91 (s, 3H,,Nme), ^1H NNM do 6-metoxi-2-(4-dimetilaminofenil)benzotiazol (300MHz, acetone- d_6) δ : 7,85 (d, $J=8$, 7Hz, 2H, H-2',6'); 7,75 (dd, $J=8,8\text{Hz}$, $J=1,3\text{Hz}$, 1H, H-4); 7,49 (d, $J=2,4\text{Hz}$, 1H, H-7); 7,01 (dd, $J=8,8\text{Hz}$, $J=2,4\text{Hz}$, H-5); 6,78 (d, $J=7,6\text{Hz}$, 2H, H-3'5'); 3,84 (s, 3H, MeO); 3,01 (s, 6H, Nme $_2$).

[000179] Seguindo a mesma estratégia que acima, os outros deriva-dos 2-(4'-aminofenil)benzotiazol podem ser sintetizados substituindo-se o derivado de anilina substituída apropriado (por exemplo, 2-, 3- ou 4-metilanilina) e o derivado de cloreto de 4-nitrobenzoila apropriado (por exemplo, cloreto de 2- ou 3-metil-4-nitrobenzoila).

Exemplo 10: Síntese de derivados de BTA sem substituição

[000180] Rota 2: Exemplo da síntese de compostos BTA-0, -1, -2, que são representativos do grupo de compostos de tioflavina (Garmaise e colaboradores, "Anthelmintic Quaternary Salts. III. Benzotiazolium Salts" *J. Med Chem.* **12**:30-36 1969) (as referências numéricas dos nomes dos compostos abaixo referem-se ao esquema de síntese mostrado):



Preparação de 2-(4-nitrofenil)benzotiazol

[000181] Uma solução de cloreto de 4-nitrobenzoila (1,49 g, 8,0

mmol) em benzeno (anidro, 10 ml) dói adicionada gota-a-gota a 2-aminotiofenol (1,0 g, 8,0 mmol em 10 ml de benzeno) à temperatura ambiente. A mistura reacional foi deixada sob agitação por 16 horas. A reação foi interrompida com água (20 ml). A camada aquosa foi separada e extraída com acetato de etila (3 x 10 ml). As camadas orgânicas combinadas foram secadas e evaporadas. O produto bruto foi purificado com coluna flash (hexano:acetato de etila = 85:15) para produzir 1,5 g (73,2%) do produto como um sólido amarelo claro.

Preparação de 2-(4-aminofenil)benzotiazol

[000182] Uma mistura de 2-(4-nitrofenil)benzotiazol (105 mg, 0,40 mmol) em cloreto de estanho (II) Demography (205 mg, 0,91 mmol) em etanol (20 ml) foi posta em refluxo sob atmosfera de N₂ por 4 horas. Após a remoção do etanol por evaporação a vácuo, o resíduo foi dissolvido em acetato de etila (20 ml), e lavado com uma solução de NaOH (1N, 3 x 20 ml) e água (3 x 20 ml), secado e evaporado à secura para produzir 102 mg (97%) do produto.

Preparação de 2-(4-metilaminofenil)benzotiazol e 2-(4-dimetilaminofenil)benzotiazol

[000183] Uma mistura de 2-(4-aminofenil)benzotiazol (15 mg, 0,066 mmol), MeI (9,4 mg, 0,066 mmol) e K₂CO₃ (135 mg, 0,81 mmol) em DMSO (anidro, 0,5 ml) foi aquecida a 100°C por 16 horas. A mistura reacional foi purificada por TLC em fase reversa (MeOH:H₂O = 6:1) para produzir 1,5 mg (10%) de 2-(4-metilaminofenil)benzotiazol e 2,5 mg (16,7%) de 2-(4-dimetilaminofenil)benzotiazol.

Preparação de 2-(4-dimetilaminofenil)benzotiazol

[000184] A mistura de 2-aminotiofenol (0,5 g, 4,0 mmol), ácido 4-dimetilaminobenzóico (0,66 g, 4,0 mmol) e PPA (10 g) foi aquecida para 220°C por 4 horas. A mistura reacional foi resfriada para a

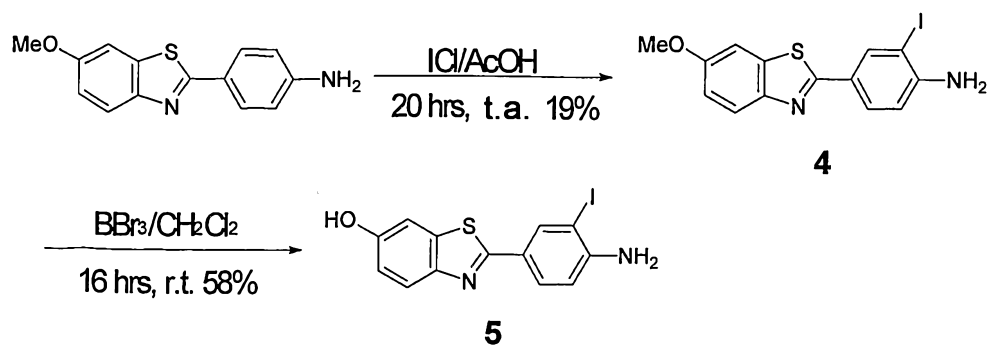
temperatura ambiente e derramada em uma solução de carbonato de potássio 10% (~400 ml). O resíduo foi coletado por filtração sob pressão de vácuo para produzir 964 mg do produto, o qual era aproximadamente 90% puro com base na análise de ^1H NMR. A recristalização de 100 mg em MeOH produziu 80 mg do produto puro.

[000185] ^1H NMR (300MHz, acetone- d_6) δ : 7,12 (d, $J=7,7\text{Hz}$, 1H, H-7); 7,01 (d, $J=9,0\text{Hz}$, 1H, H-4); 6,98 (d, $J=9,1\text{Hz}$, 2H, H-2',6'); 6,56 (t, $J=7,8\text{Hz}$, $J=7,3\text{Hz}$, 1H, H-5 ou H-6); 5,92 (d, $J=8,9\text{Hz}$, 1H, H-3',5'); 2,50 (s, 6H, Nme $_2$).

[000186] Seguindo a mesma estratégia que acima, os outros derivados de 2-(4'-aminofenil)benzotiazol podem ser sintetizados substituindo-se o derivado de cloreto de 4-nitro-benzoila apropriado (por exemplo, cloreto de 2- ou 3-metil-4-nitro-benzoila) ou o derivado de ácido 4-dimetilamino-benzóico apropriado (por exemplo, ácido 2- ou 3-metil-4-dimetilamino-benzóico).

Exemplo 11: Síntese de compostos iodados

[000187] Rota 3: Exemplo da síntese de 2-(3'-iodo-4'-aminofenil)-6-hidroxibenzotiazol, a qual é representativa para a síntese de outros compostos iodados (as referências numéricas dos nomes dos compostos abaixo referem-se ao esquema de síntese mostrado).



Preparação de 2-(3'-iodo-4'-aminofenil)-6-metoxi-benzotiazol

[000188] A uma solução de 2-(4'-aminofenil)-6-metoxibenzotiazol (22 mg, 0,09 mmol) em ácido acético glacial (2,0 mL) foi injetada uma solução de cloreto de iodo 1M em CH₂Cl₂ (0,10 ml, 0,10 mmol, 1,2 equiv.) sob atmosfera de N₂. A mistura reacional foi posta sob agitação a temperatura ambiente por 16 horas. O ácido acético glacial foi removido sob pressão reduzida e o resíduo foi dissolvido em CH₂Cl₂. Após a neutralização da solução com NaHCO₃, a camada aquosa foi separada e extraída com CH₂Cl₂. As camadas orgânicas foram combinadas e seca-das sobre MgSO₄. Seguindo à evaporação do solvente, o resíduo foi purificado por TLC preparativa (hexanos:acetato de etila = 6:1) para produzir 2-(4'-amino-3'-iodofenil)-6-metoxibenzotiazol (25 mg, 76%) como um sólido marrom.

[000189] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,35 (d, J=2,0 Hz, 1H); 7,87 (dd, J₁=2,0Hz, J₂=9,0Hz, 1H); 7,31 (d, J=2,2Hz, 1H); 7,04 (dd, J₁=2,2Hz, J₂=9,0 Hz, 1H); 6,76 (d, J=9,0Hz, 1H); 3,87 (s, 3H).

Preparação de 2-(3'-iodo-4'-aminofenil)-6-hidroxi-benzotiazol

[000190] A uma solução de 2-(4'-amino-3'-iodofenil)-6-metoxibenzotiazol (8,0 mg, 0,02 mmol) em CH₂Cl₂ (2,0 mL) foi injetada uma solução de BBr₃ 1M em CH₂Cl₂ (0,20 ml, 0,20 mmol) sob atmosfera de N₂. A mistura reacional foi posta sob agitação a temperatura ambiente por 18 horas. Após a reação ter sido interrompida com água, a mistura foi neutralizada com NaHCO₃. A camada aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 3 ml). As camadas orgânicas foram combinadas e secadas sobre MgSO₄. O solvente foi então evaporado sob pressão redu-zida e o resíduo foi purificado por TLC (hexanos:acetato de etila = 7:3) para produzir 2-(3'-iodo-4'-aminofenil)-6-hidroxibenzotiazol (4,5 mg, 58%) como um sólido marrom.

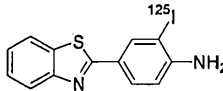
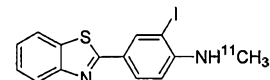
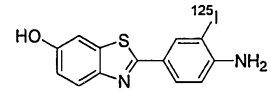
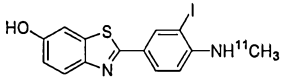
[000191] ¹H NMR (300 MHz, acetona-d₆) δ (ppm): 8,69 (s, 1H); 8,34 (d, J=2,0Hz, 1H); 7,77 (dd, J₁=2,0 Hz, J₂=8,4Hz, 1H); 7,76 (d, J=8,8Hz, 1H); 7,40 (d, J=2,4Hz, 1H); 7,02 (dd, J₁=2,5Hz, J₂=8,8Hz, 1H); 6,94 (d,

J=8,5Hz, 1H); 5,47 (br., 2H). HRMS m/z 367,9483 (M^+ calcd. para $C_{13}H_9N_2OSI$ 367,9480).

Exemplos Biológicos

Exemplo 1: Determinação da Afinidade para A β e Absorção Cerebral de Derivados de Tioflavina

[000192] Estudos iniciais quanto a ligação utilizando A β (1-40) foram conduzidos para se determinar se os quatro compostos mostrados abaixo se ligam significativamente aos locais de depósitos amiloidóticos no cérebro.

Estruturas	K _i (nM)	logP	2 min (%ID/g)	30 min (%ID/g)	razão 2:30 min
	8,32	3,17	9,08	3,4	2,7
	4,94	3,90	4,40	2,68	1,6
	11,1	1,65	5,64	0,36	15,7
	3,22	2,35	7,76	2,66	2,91

[000193] Os dados mostrados na Tabela 1 indicam que estes compostos mostram uma afinidade relativamente alta para A β , com valores K_i < 10 nM, e facilmente entraram em cérebro de camundongo com valores de absorção > 0,4% ID/g*kg (ou > 13% ID/g para 30 g de animais). Além disto, os valores da concentração de radioatividade

cerebral foram menores que 0,1% ID/g*kg, resultando em razões 2 min/30 min > 4.

Exemplo 2: Marcação de depósitos amiloidóticos em cérebro AD *post-mortem* e cérebro de camundongo Tg

[000194] Seções de tecido cerebral *post-mortem* de cérebro com AD e em um camundongo PS1/APP transgênico de 8 meses de idade foram marcadas com BTA-1 não marcado. O modelo camundongo PS1/APP combina duas mutações de gene humano conhecidas como causadoras da doença de Alzheimer em um camundongo duplamente transgênico com fibrilas de depósito A β em placas amiloidóticas no cérebro iniciando-se tão cedo quanto 3 meses de idade. Micrografias de fluorescência típicas são mostradas na Figura 8, e a marcação das placas amiloidóticas por BTA-1 tanto em tecido cerebral *post-mortem* com AD quanto em tecido cerebral de PS1/APP é claramente visível. O amiloide cerebrovascular foi também claramente marcado (Fig. 8, à direita). A outra marca neuropatológica característica de cérebro com AD, emaranhados neurofibrilares (ENF), são marcadas mais fracamente por BTA-1 em cérebro com AD (Fig. 8, à esquerda). Os ENF não foram observados em modelos de camundongo transgênico de deposição amiloidótica.

Exemplo 3: Marcação *in vivo* e detecção de depósitos amiloidóticos em camundongos transgênicos

[000195] Três camundongos transgênicos PS1/APP de 17 meses de idade foram injetados intraperitonealmente (ip) com uma dose única de 10 mg/kg de BTA-1 em uma solução de DMSO, propilenoglicol, e PBS com pH 7,5 (v/v/v 10/45/45). Vinte e quatro horas mais tarde, foi empregada microscopia de fluorescência multifotônica para se obter imagens de alta resolução nos cérebros de camundongos vivos utilizando-se uma técnica de janela craniana. Imagens *in vivo* típicas de BTA-1 em um camundongo PS1/APP vivo são mostradas na Figura

9, e placas amiloidóticas e amilóide cerebrovascular são claramente distinguíveis. Os estudos de microscopia multifotônica demonstram a especificidade *in vivo* do BTA-1 para A β em camundongos transgênicos PS1/ APP.

Exemplo 4: Especificidade dos Compostos Inventivos para placas Alzheimer em relação a emaranhados Alzheimer

[000196] De maneira obter-se as contribuições relativas da ligação de [³H]BTA-1 a depósitos A β e tau na substância cinzenta frontal de cérebro com AD, a ligação de [³H]BTA-1 foi comparada em homogenatos de córtex entorrinal (EC), substância cinzenta frontal e cerebelo de um cérebro com AD típico e um cérebro de controle no estágio II de Braak. Este cérebro de controle apresentava números freqüentes de ENF no córtex entorrinal (Fig. 5A), mas sem placas neuríticas ou difusas em qualquer área do cérebro (Fig. 11C). Os números de ENF no EC do controle 04 foram semelhantes aos números encontrados em muitos casos de AD (Fig. 11B). A ligação de [³H]BTA-1 na região do EC rica em ENF deste cérebro de controle 04 não foi maior que a ligação de [³H]BTA-1 no cerebelo e substância cinzenta frontal sem livre de placa e ENF deste cérebro (Figura 11, Tabela). Uma vistória semelhante destas mesmas áreas do cérebro em um cérebro Braak VI AD (Figura 11, Tabela), mostrou baixa ligação no cerebelo e no EC e níveis acima de dez vezes mais altos na substância cinzenta frontal onde há números freqüentes de placas neuríticas (Fig. 11D). A patologia extensiva de ENF no EC dos cérebros de controle e AD, em conjunto com a baixa ligação de [³H]BTA-1 no EC, sugere que ou a ligação de BTA-1 ao ENF observada a concentrações de BTA-1 de 100 nM não ocorre a 1,2 nM, ou que, a concentrações nanomolares baixas, a quantidade absoluta total de ligação de [³H]BTA-1 aos depósitos de ENF é pequena em comparação com a quantidade de [³H]BTA-1 ligado aos depósitos de A β nas placas amiloidóticas e amilóide cerebrovascular da substância

cinzenta frontal de AD. O cérebro com AD mostrou depósitos de placas amiloidóticas difusos no EC (Fig. 11B) que parecem não produzir ligação de [³H]BTA-1 significativa. O córtex frontal apresentou placas amiloidóticas extensivas que eram tanto compactas quanto difusas e foram associadas com níveis altos de ligação de [³H]BTA-1 (Fig. 11D e Tabela).

Exemplo 5: Estudos De Entrada Em Cérebro De Camundongo *In Vivo*

[000197] Experimentos para se acessar a penetração cerebral de 2-(3'-¹²⁵I-iodo-4'-aminofenil)-benzotiazol-6-ol (composto A), 2-(3-[¹⁸F]-flur-4-metilamino-fenil)-benzotiazol-6-ol (composto B), e 2-[4-(3-¹⁸F-flur-propilamino)-fenil] benzotiazol-6-ol (composto C), foram conduzidos em camundongos jovens do tipo selvagem que não apresentavam depósitos amiloidóticos em seus cérebros. Este estudo reflete a entrada cerebral e a liberação do tecido cerebral normal. Um critério necessário para um bom agente de imageologia PET é a rápida liberação das áreas cerebrais que não contêm o sítio de ligação alvo. Uma medida da taxa de liberação de ligação não específica é provida pela razão dos valores para 2 minutos/30 minutos (%ID-kg)/g.

[000198] Os estudos foram conduzidos em camundongos fêmeas Swiss-Webster (23-35 g) de acordo com o "Guide for the Care e Use of Laboratory Animals" adotado pelo NIH e com a aprovação do Institutional Animal Care e Use Committee local. Os camundongos foram injetados em uma veia lateral da cauda com 0,37-3,7 MBq (10-100 µCi) do composto A, composto B ou composto C com alta atividade específica (~2,0/µmol) contido em ≤ 0,10 ml de uma solução salina isotônica 95% e 5% de etanol. Os camundongos foram anestesiados e mortos por excisão cardíaca seguinte a punctura cardíaca para se obter amostras de sangue arterial a 2 minutos ou 30 minutos após a injeção. Os cérebros de camundongo foram rapidamente retirados e divididos

em frações de cerebelo e cérebro total restante (incluindo tronco encefálico). As amostras de cérebro foram contadas em um contador de poço gama, e as contagens foram corrigidas quanto ao decaimento para o tempo da injeção em relação aos padrões ^{125}I ou ^{18}F preparados a partir da solução de injeção para se determinar a dose injetado por cento (%ID) nas amostras. As amostras de cérebro foram pesadas para se determinar a dose injetada por cento por grama de tecido (%ID/g), e esta quantidade foi multiplicada pelo peso corporal total (em kg) para se determinar a concentração de radioatividade normalizada para o peso corporal [(%ID-kg/g) de cada amostra de tecido. Os compostos A, B e C mostraram entrada cerebral relativamente alta em pontos iniciais no tempo e rápida liberação a pontos no tempo tardios. As concentrações de radioatividade (%ID-kg/g) a 2 minutos e 30 minutos e nas razões 2 minutos/30 minutos são apresentadas na Tabela 2 abaixo.

TABELA 2

	Conc. Radioat. a 2 min (%ID-kg/g)	Conc. Radioat. a 30 min (%ID-kg/g)	razão 2 min/30 min
Composto A	0,141	0,009	16
Composto B	0,29	0,030	10
Composto C	0,17	0,011	16

Exemplo 7: Estudos de imageologia *in vivo* de babuíno

[000199] Estudos de imageologia PET em babuínos adultos (*Papioanúbis*) (pesando 15-35 kg, idades 6-12 anos) foram conduzidos com os compostos B e C de acordo com o “Guide for the Care e Use of Laboratory Animals” adotado pelo NIH e com a aprovação do Institutional Animal Care e Use Committee local. Antes da formação da

imagem PET, os animais foram inicialmente sedados com cetamina (10-15 mg/kg, i.m.), sendo administrada atropina (0,5 mg, i.m.) para controlar a salivação e a taxa cardíaca, e entubados. Os babuínos foram subseqüentemente mantidos em um ventilador com anestésico de isofluorano (0,5-1,25%) e ar médico. Foi administrado brometo de pancurônio conforme necessário (de forma intravenosa, até 0,06 mg/kg/hora, titulado para o efeito) para manter os animais imobilizados durante o estudo. Foi inserido um cateter arterial femoral para se monitorar a pressão sanguínea e amostra de sangue arterial, e um cateter intravenoso foi colocado na veia antecubital para injeção de radio-traçador e para se administrar fluidos conforme necessário durante o curso do estudo de imageologia. A pressão sanguínea, taxas cardíaca e respiratória, e CO₂ expirado e níveis de saturação de oxigênio foram monitorados continuamente durante os estudos PET. A temperatura corporal retal base (~37°C) foi mantida utilizando-se um cobertor de aquecimento (Gaymar, Orchard Park, NY) e um regulador de temperatura (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH). Antes da varredura, a cabeça do babuíno foi fixada de tal forma que os planos de imagem foram obtidos aproximadamente paralelos à linha orbital-meatal.

[000200] Os dados PET foram obtidos utilizando-se um scanner ECAT HR+PET (CTI PET Systems, Knoxville, TN) e modo de imagem em 3D (63 lâminas paralelas; campo de visão axial de 15,2 cm; resolução no plano metade da máxima para largura total). Foi utilizado um Neuro-Insert (CTI PET Systems) para reduzir a contribuição de eventos de espalhamento de fóton. Após os babuínos terem sido posicionados no scanner PET, foi obtida uma varredura por transmissão em janela (10-15 minutos) para correção de atenuação dos dados de emissão PET utilizando-se bastões giratórios ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga. O composto B e o composto C foram administrados de forma intravenosa durante 20 segundos, e uma série dinâmica de varreduras PET foi obtida durante 90 minutos utilizando-se 26 quadros de comprimento crescente (6 x 20 segundos; 4

x 30 segundos; 6 x 60 segundos; 4 x 5 minutos; 6 x 10 minutos). Aproximadamente 185 MBq (~5 mCi) de um composto B ou composto C com alta atividade específica (> 14,8 GBq/ μ mol) foram injetados em um babuíno. Em outros estudos, foram injetados 148-296 MBq (4-8 mCi) de um radio-traçador PET referência com alta atividade específica (> 18,5 GBq/ μ mol), incluindo ou [^{11}C](+)-McN5652, [carbonil- ^{11}C]WAY100635 ou [^{18}F]altanserina. Os dados PET foram reconstruídos utilizando-se um filtro Hanning (corte Nyquist) e corrigidos para o decaimento, atenuação fotônica e espalhamento.

[000201] Uma varredura MRI foi obtida para cada babuíno utilizando-se um scanner 1.5T GE Sigma (GE Medical Systems, Milwaukee, WI) equipado com uma bobina padrão. Uma seqüência RM volumétrica do tipo “spoiled gradient recalled” (SPGR) com parâmetros para alto contraste entre a matéria cinzenta, matéria branca e fluido espino-cerebral (CSF) foi obtida no plano coronal (TE = 5, TR = 24, ângulo de arremesso = 40°, espessura de lâmina = 1,5 mm, NEX = 2, campo de visão 12 cm, tamanho de voxel = 0,94 x 1,25 x 1,5 mm). A imagem de RM para cada babuíno individual foi co-registrada para os dados PET utilizando-se um algoritmo de registro de imagem automático (AIR) para realinhamento e refatiamento de imagem no modo cruzado. Os 16 quadros iniciais (0-9 minutos pós injeção) das imagens PET dinâmicas foram somados em conjunto em imagens consistindo de um único quadro. Antes do co-registro, tanto aminoácidos imagens RM quanto as imagens PET foram editadas utilizando-se o pacote de programas ANALYZE (Mayo Clinic, Rochester, MN) para remover tecidos extra-cerebrais que poderiam possivelmente confundir o processo de co-registro. As imagens de RM editadas foram então co-registradas para a imagem somada PET e refatiadas para produzir imagens de RM com a mesma orientação espacial e resolução das imagens PET somadas. O co-registro de conjuntos de dados de RM e PET no babuíno demonstrou ser uma aplicação confiável e robusta do método AIR.

[000202] As regiões de interesse (ROIs) foram definidas na imagem de RM co-registrada e aplicadas aos conjuntos de dados de PET dinâmica para se determinar os dados de atividade no tempo regional para a matéria branca (matéria branca cerebral posterior para córtex pré-frontal e anterior para ventrículos laterais), córtex temporal, cerebelo (córtex cerebelar) e outras áreas do cérebro (dados não mostrados). Os dados PET de atividade no tempo foram convertidos para unidades de micro-curies por mililitro utilizando-se um fator de calibração baseado em espectro e foram subsequenteemente normalizados para a dose injetada e massa corporal do animal ((%ID-kg)/g).

[000203] A Figura 15 mostra uma curva de atividade no tempo PET representativa (TAC) de radioatividade em três regiões cerebrais de um babuíno seguindo à injeção intravenosa do composto B. As TACs indicam uma excelente penetração no cérebro da radioatividade a pontos no tempo iniciais (cerca de 0,40% ID-kg/g, em acordo razoável com a penetração cerebral do composto B em camundongos a 2 minutos pós injeção) em todas as três regiões e liberação relativamente rápida da radioatividade regional de 0-90 minutos após a injeção no cérebro deste babuíno de controle. As regiões do cérebro contendo níveis mais altos de matéria branca demonstraram concentrações algo mais elevadas (~30%) de radioatividade aos 90 minutos que as regiões que eram dominadas pela matéria cinzenta tal como o córtex temporal. A concentração de radioatividade no córtex de babuíno foi aproximadamente idêntica à do córtex cerebelar em todos os pontos no tempo. A taxa de liberação da radioatividade foi consideravelmente mais lenta no cérebro de babuíno que no cérebro de camundongo, com o composto B exibindo um meio-tempo de liberação de cerca de 17 minutos da matéria cinzenta de babuíno. O radio-traçador composto B exibiu uma concentração de radioatividade no cérebro de precoce a tardia no cérebro de babuíno de cerca de 4, indicando que apenas cerca de 25% da radioatividade máxima permanecia no cérebro a pontos no

tempo tardios. Estes resultados foram consistentes com a ausência esperada de placas amiloidóticas nos cérebros destes animais de controle e indicaram que muito pouca radioatividade foi retida no cérebro de babuíno normal. A comparação do comportamento *in vivo* do composto B em cérebro de babuíno ao da entrada e liberação de outros radioligantes PET de sucesso em uma região cerebral de referência destituída de sítios de ligação específica (isto é, cerebelo) foi útil.

[000204] A Figura 16 compara as TACs cerebelares em babuínos de [carbonil-¹¹C]WAY100635, [¹¹C](+)-McN5652, [¹⁸F]altanserina e composto B. As taxas de liberação de ligação não específica relativamente rápidas de [carbonil-¹¹C]WAY100635 e [¹⁸F]altanserina são importantes para o sucesso destes radioligantes de PET para a imageologia de sistemas de receptor de serotonina 5-HT_{1A} e serotonina 5-HT_{2A}. Em contraste, a liberação relativamente lenta *in vivo* de [¹¹C](+)-McN5652 limitou a utilidade deste radioligante para a imageologia do sistema transportador de serotonina. As propriedades de liberação cerebral do composto B indicaram que a taxa relativamente rápida de liberação não específica deste radio-traçador ($t_{1/2} = 17$ minutos) era semelhante à de outros agentes de imageologia neuroreceptores PET úteis.

[000205] A Figura 17 mostra uma TAC PET representativa da radioatividade em três regiões do cérebro de um babuíno seguinte à injeção intravenosa do composto C. As TACs indicam excelente penetração cerebral da radioatividade a pontos no tempo iniciais (cerca de 0,22% ID-kg/g, bem de acordo com a penetração cerebral do composto C em camundongos a 2 minutos após a injeção) em todas as três regiões e liberação relativamente alta da radioatividade regional de 0-90 minutos pós injeção no cérebro deste babuíno de controle. As regiões do cérebro contendo níveis mais elevados de matéria branca demonstraram concentrações ligeiramente mais altas (< 10%) de radioatividade aos 90 minutos que as regiões que eram dominadas pela

matéria cinzenta tal como o córtex temporal. A concentração da radioatividade no córtex de babuíno foi aproximadamente idêntica à do córtex cerebelar em todos os pontos no tempo. A taxa de liberação de radioatividade foi considerávelmente mais lenta do cérebro de babuíno que a de cérebro de camundon-go, com o composto C exibindo um meio-tempo de liberação de cerca de 10 minutos da matéria cinzenta de babuíno. O radio-traçador composto C exibiu uma concentração de radioatividade no cérebro de precoce a tardia no cérebro de babuíno de cerca de 6, indicando que apenas cerca de 15% da radioatividade máxima permanecia no cérebro a pontos no tempo tardios. Estes resultados foram consistentes com a ausência esperada de placas amiloidóticas nos cérebros destes animais de controle e indicaram que muito pouca radioatividade foi retida no cérebro de babuíno normal. A comparação do comportamento *in vivo* do composto C em cérebro de babuíno ao da entrada e liberação de outros radioligantes PET de sucesso em uma região cerebral de referência destituída de sítios de ligação específica (isto é, cerebelo) foi útil.

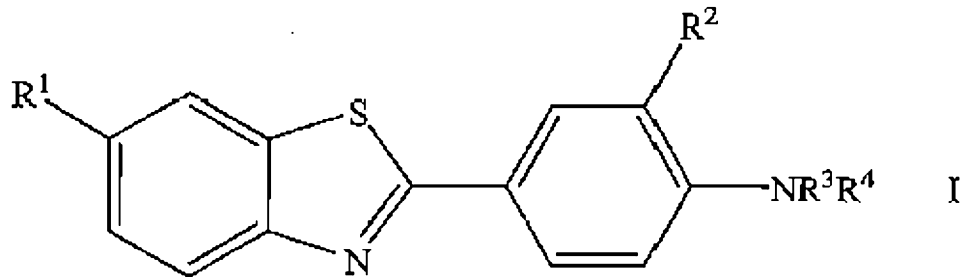
[000206] A Figura 18 compara as TACs cerebelares em babuínos de [carbonil-¹¹C]WAY100635, [¹¹C](+)-McN5652, [¹⁸F]altanserina e composto C. As taxas de liberação de ligação não específica relativamente rápidas de [carbonil-¹¹C]WAY100635 e [¹⁸F]altanserina são importantes para o sucesso destes radioligantes de PET para a imageologia de sistemas de receptor de serotonina 5-HT_{1A} e serotonina 5-HT_{2A}. Em contraste, a liberação relativamente lenta *in vivo* de [¹¹C](+)-McN5652 limitou a utilidade deste radioligante para a imageologia do sistema transportador de serotonina. As propriedades de liberação cerebral do composto C indicaram que a taxa relativamente rápida de liberação não específica deste radio-traçador ($t_{1/2} = 10$ minutos) era semelhante à de outros agentes de imageologia neuroreceptores PET úteis.

[000207] Todas as publicações, patentes e pedidos de patente indicados acima são aqui incorporados como referência.

[000208] A invenção sendo assim descrita, será óbvio aos especialistas na técnica que essa pode ser variada de muitas formas sem que se afaste do espírito e escopo da invenção. Tais variações estão incluídas no escopo da invenção reivindicada.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto, caracterizado por que tem a fórmula I



ou um sal farmacologicamente aceitável dos mesmos, em que:

R^1 é hidrogênio, -OH, ou C_1 - C_6 alcoxi;

R^2 é um radioflúor;

R^3 é hidrogênio ou C_1 - C_6 alquil; e

R^4 é hidrogênio ou C_1 - C_6 alquil, C_2 - C_6 alquênil ou C_2 - C_6 alquínil;

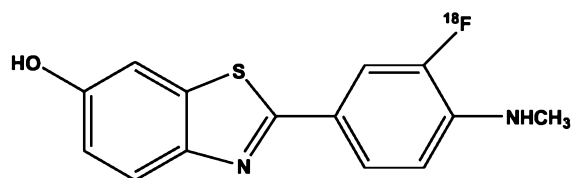
2. Composto, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por que:

R^1 é -OH ou C_1 - C_6 alcoxi;

R^2 é ^{18}F ; e

R^3 e R^4 são independentemente hidrogênio ou C_1 - C_6 alquil.

3. Composto, de acordo com a Reivindicação 2, **caracterizado** por que tem a seguinte estrutura:

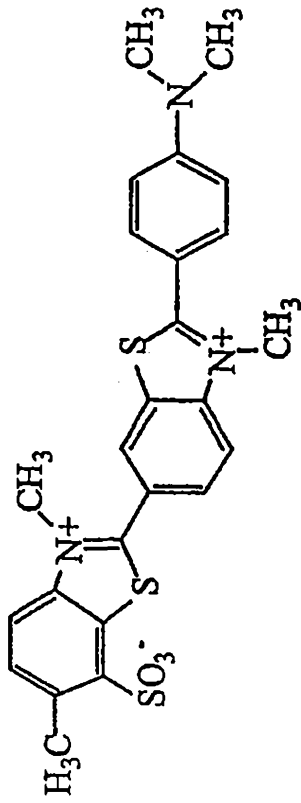


4. Composição Farmacêutica, caracterizada por que compreende:

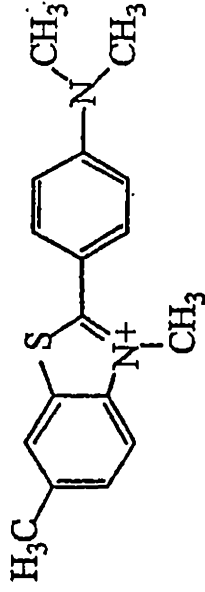
(i) uma quantidade efetiva de um composto de qualquer uma das Reivindicações de 1-3 e

(ii) um portador farmacêuticamente aceitável.

FIG. 1

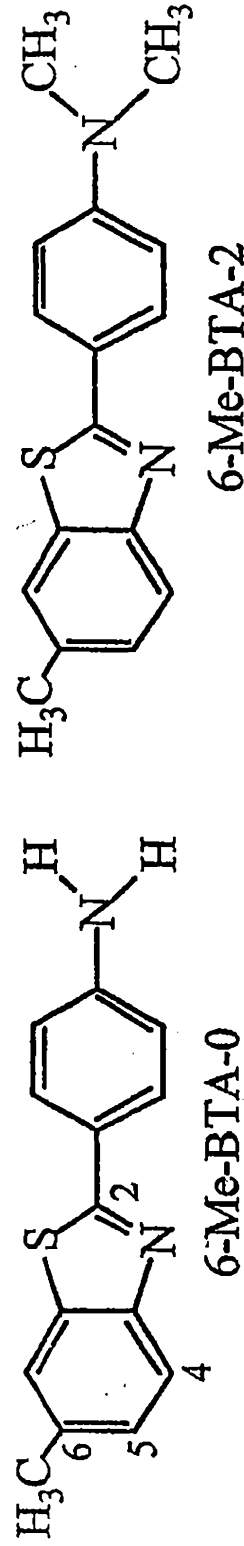


Tioflavina T (ThT)



Estrutura Proposta de um Componente Majoritário da Tioflavina S (ThS)

FIG. 2



128

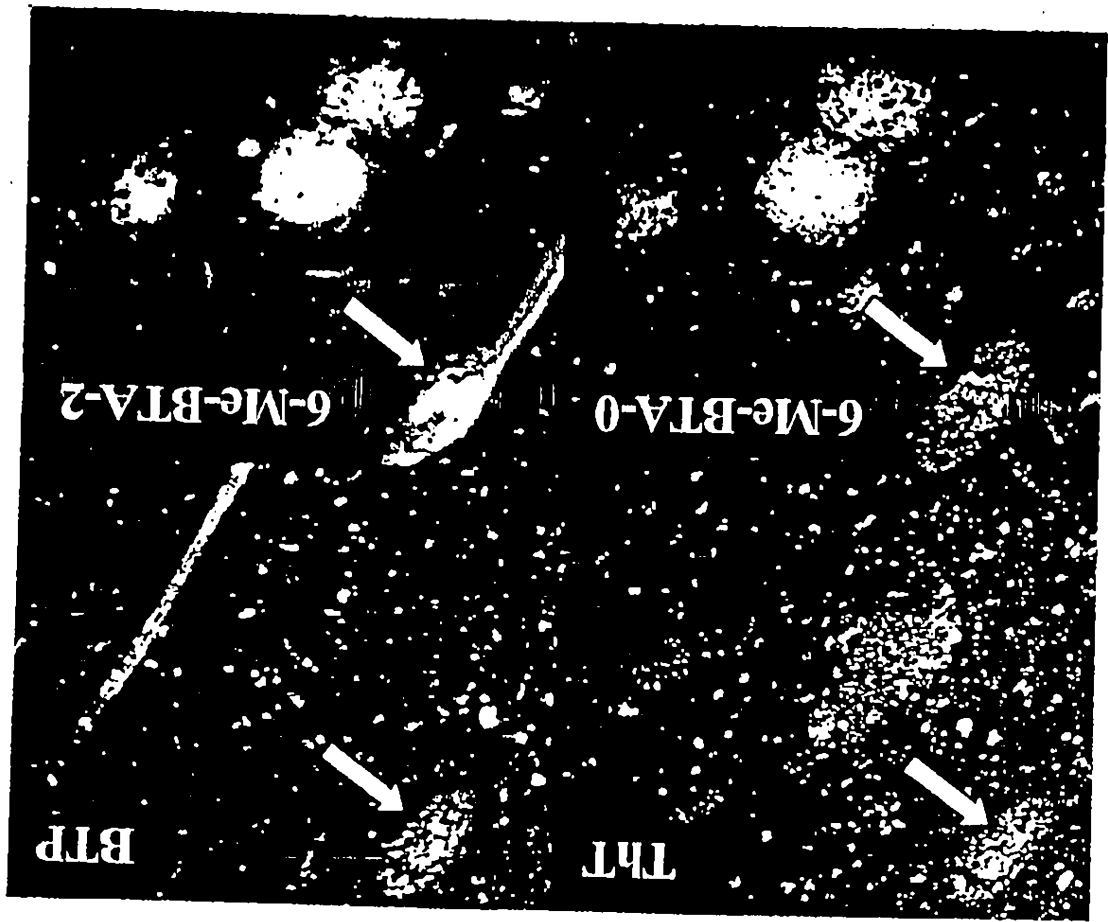
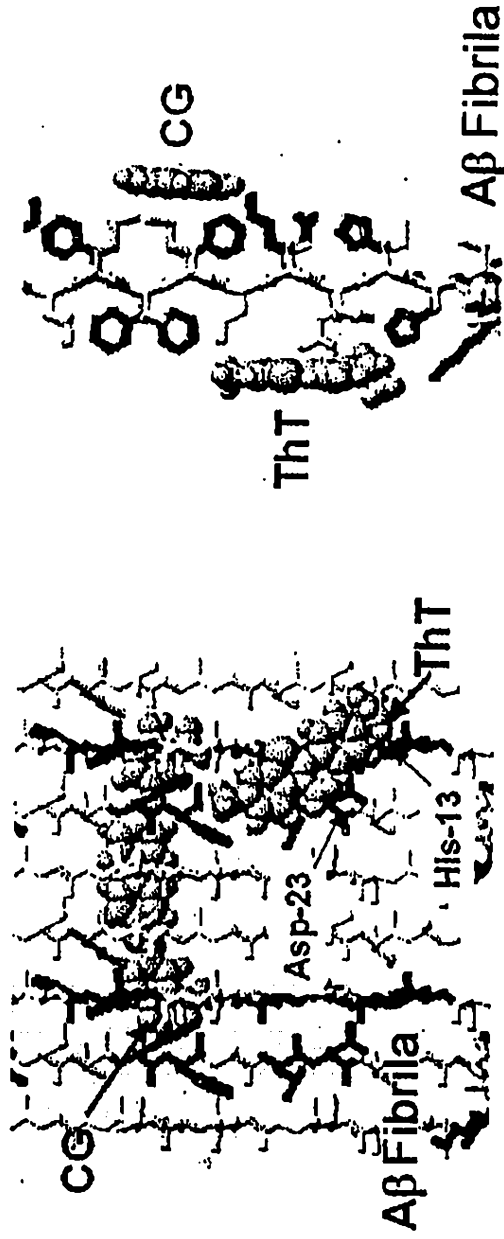


FIG. 3

1139
1139

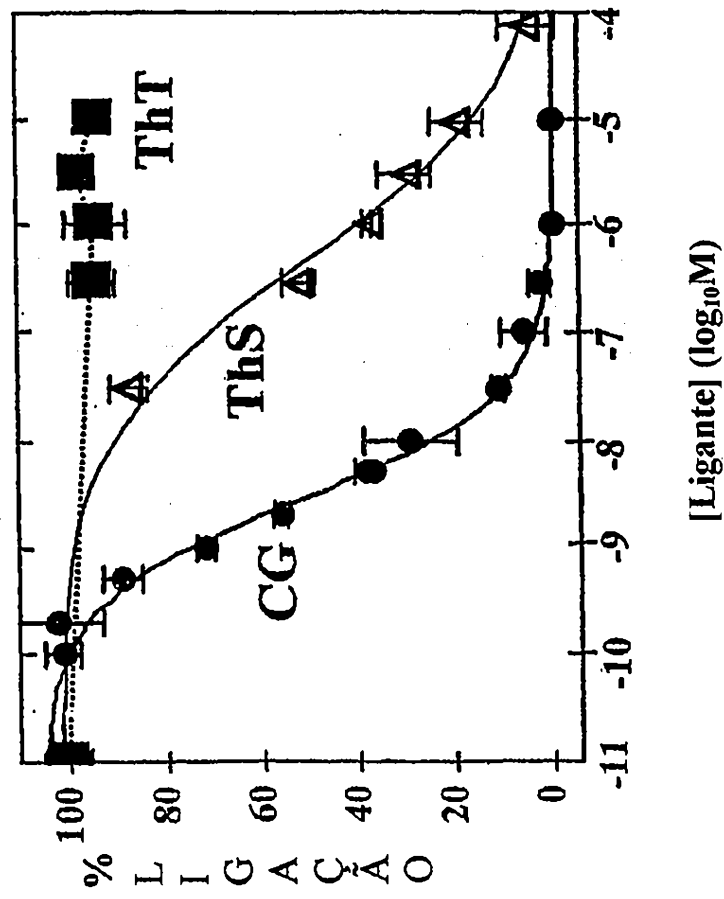
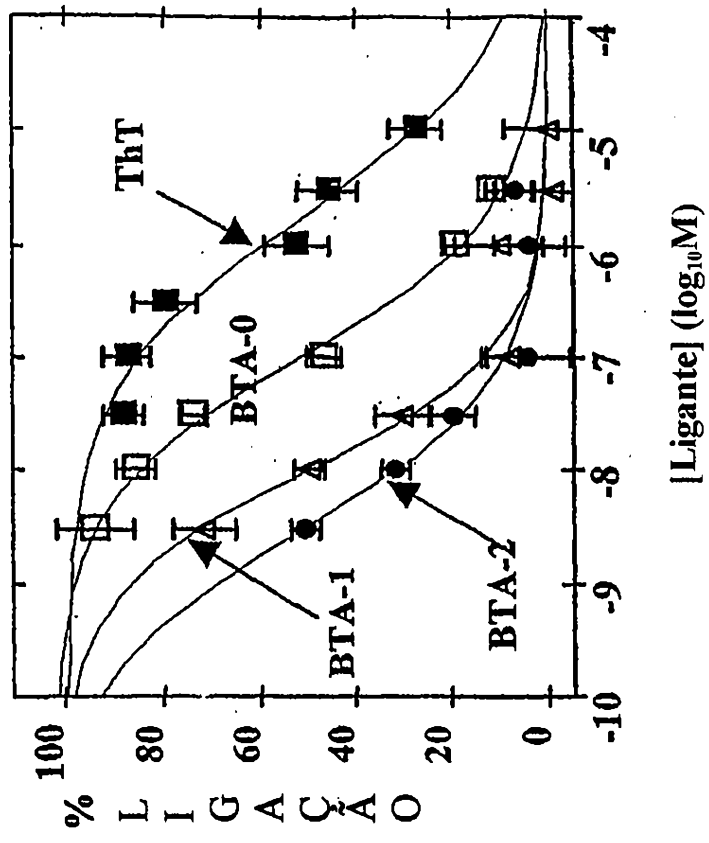
130
2

FIG. 4



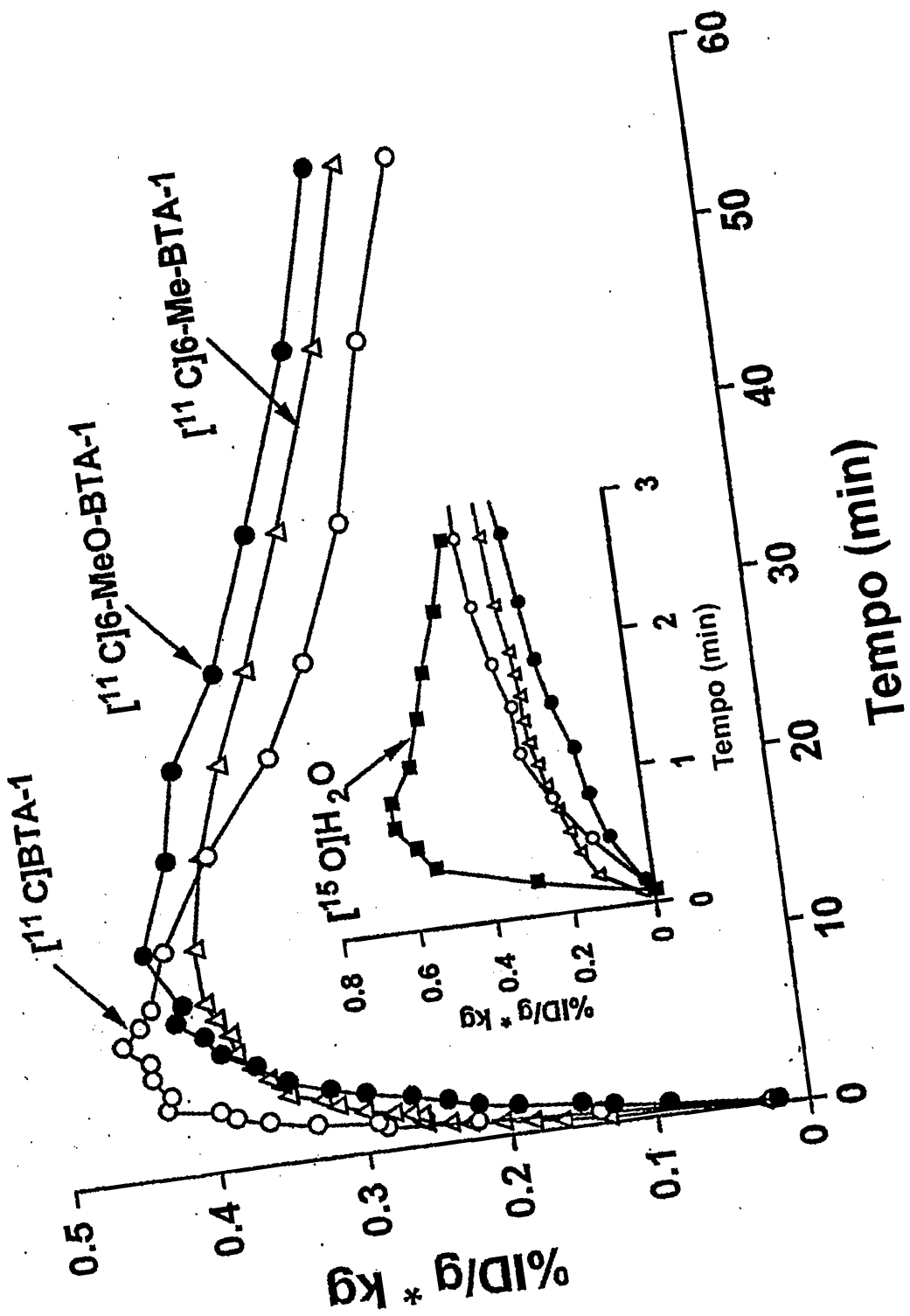
131

FIG. 5



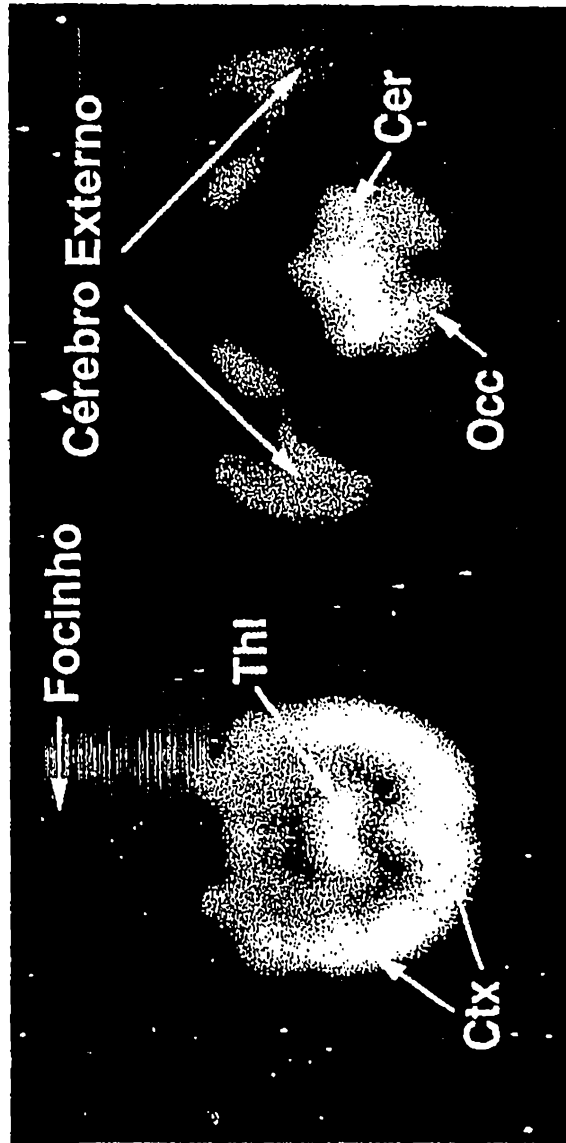
132

FIG. 6



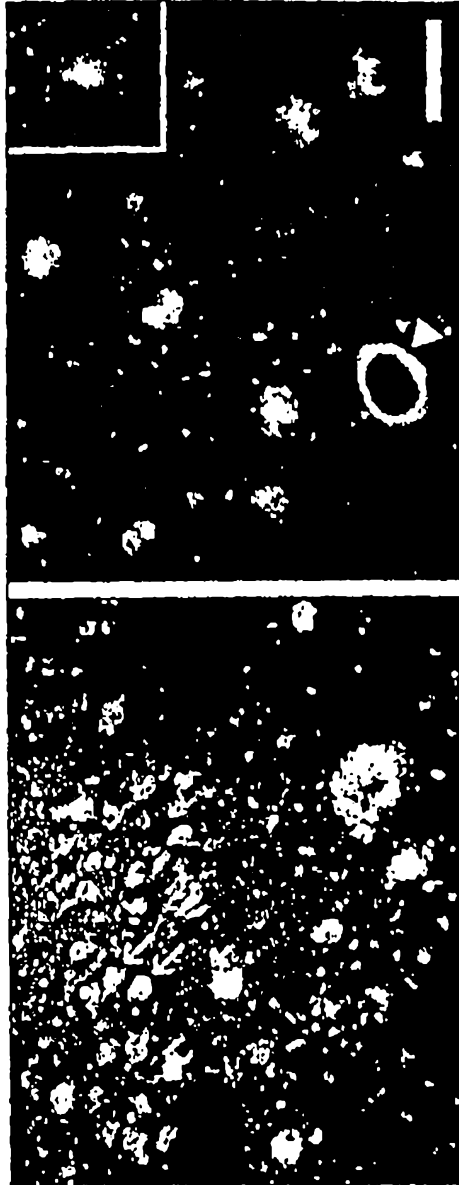
133
27

FIG. 7



134
A

FIG. 8



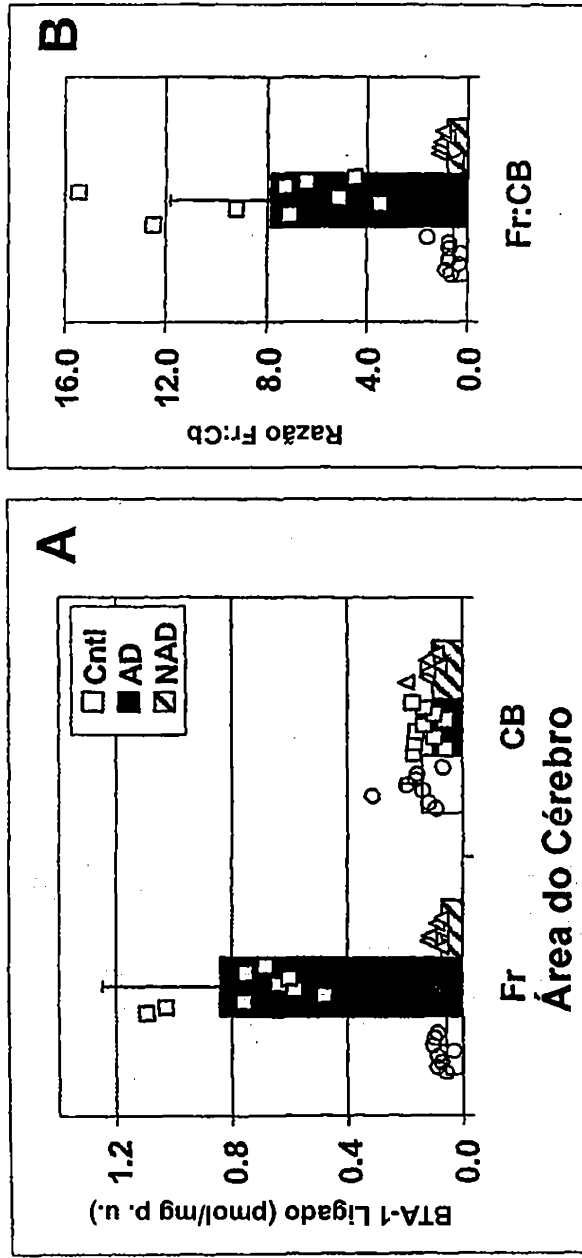
135
27

FIG. 9



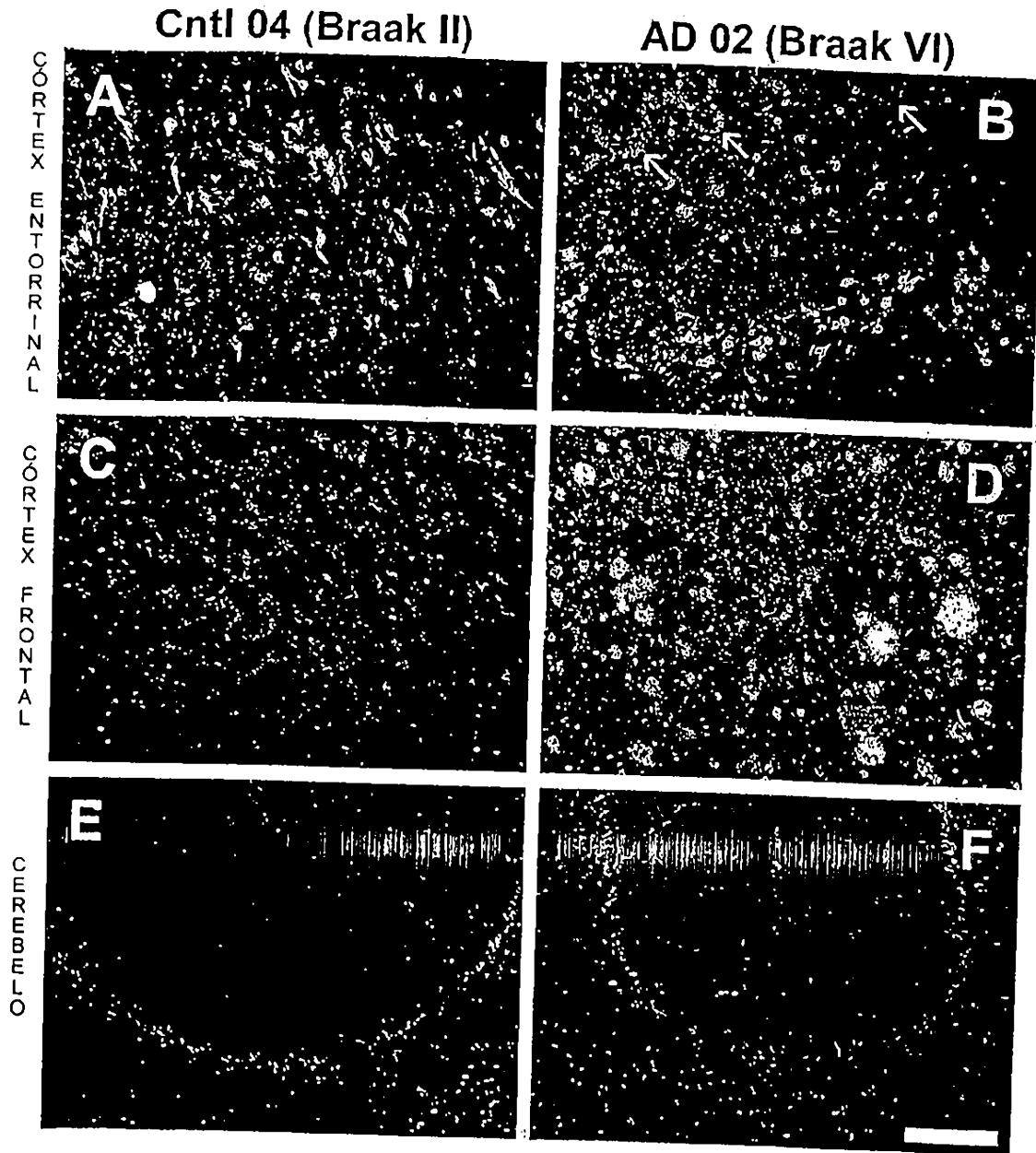
136
2

Figura 10



132

Figura II



138

FIGURA 12

Ligação de [³H]BTA-1 a Áreas Específicas de um Cérebro Braak II de Controle (Controle 04) e um Cérebro Braak VI com AD (AD 02)

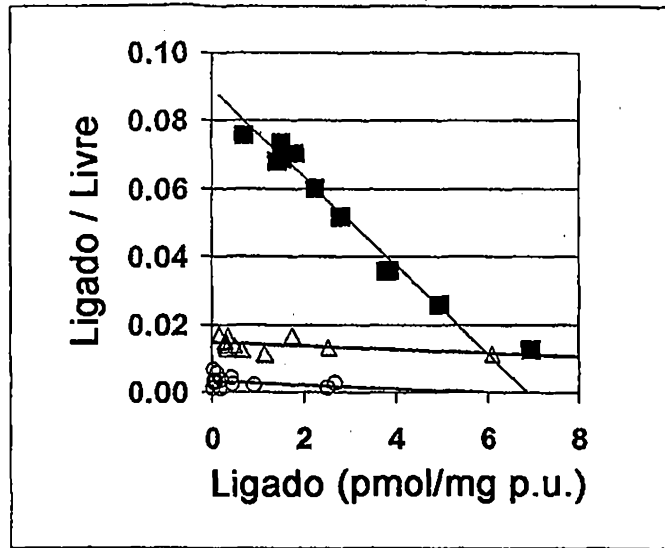
Área do Cérebro	pmol BTA-1/mg p.u. (media±DP)		Valor p**
	Contl 04	AD 02	
EC*	0,078 ± 0,006	0,082 ± 0,008	0,489
Fr*	0,093 ± 0,004	0,887 ± 0,011	0,00001
Cb*	0,078 ± 0,0001	0,043 ± 0,004	0,005

*EC: córtex entorrinal; Fr: córtex frontal; Cb: cerebelo

**Comparação do teste t de Student entre os valores de controle e AD

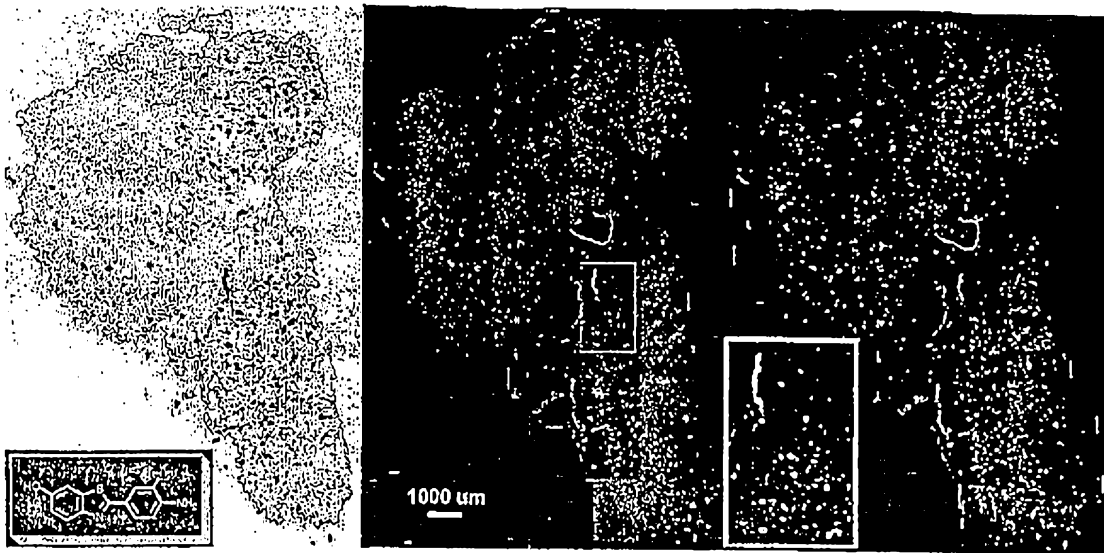
139

Figura 13



140
27

Figura 14



14/17

Composto B

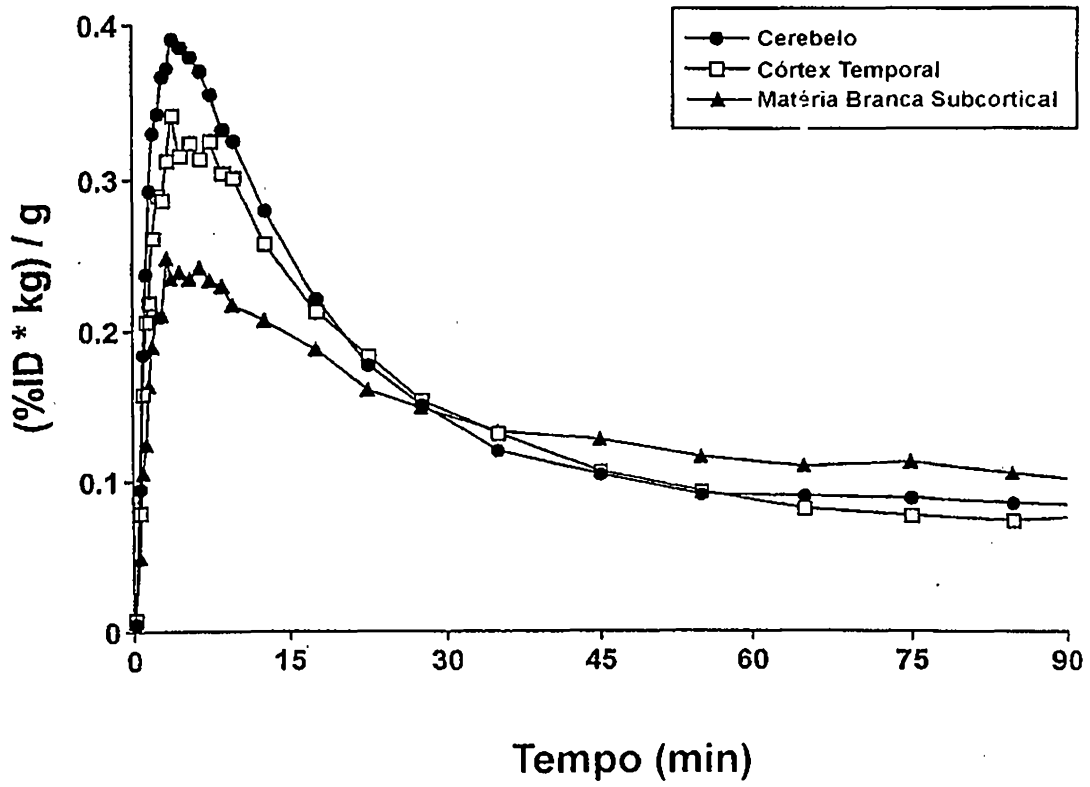


FIGURA 15

142

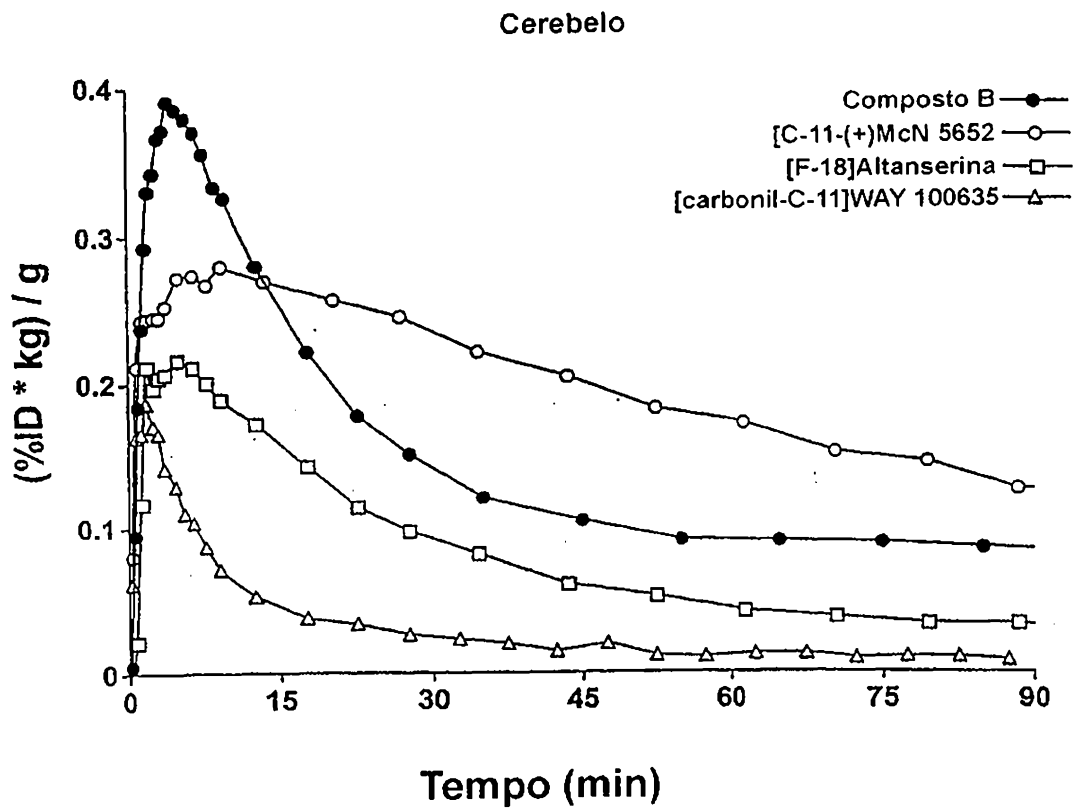


FIGURE 16

143
2

Composto C

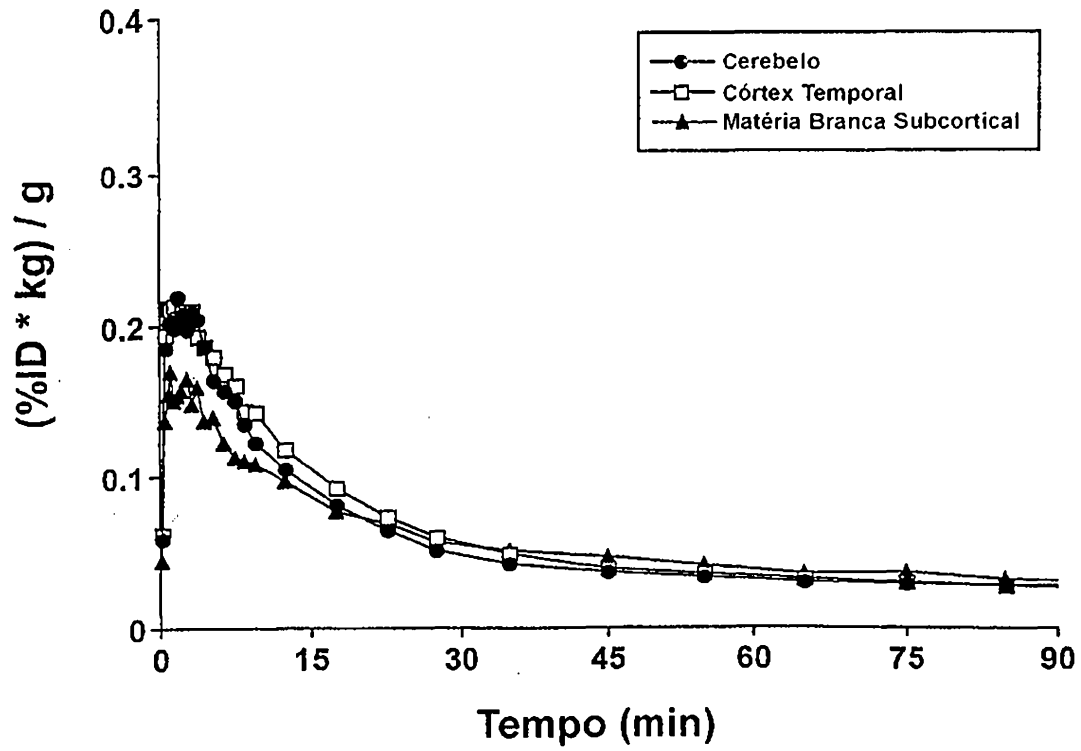
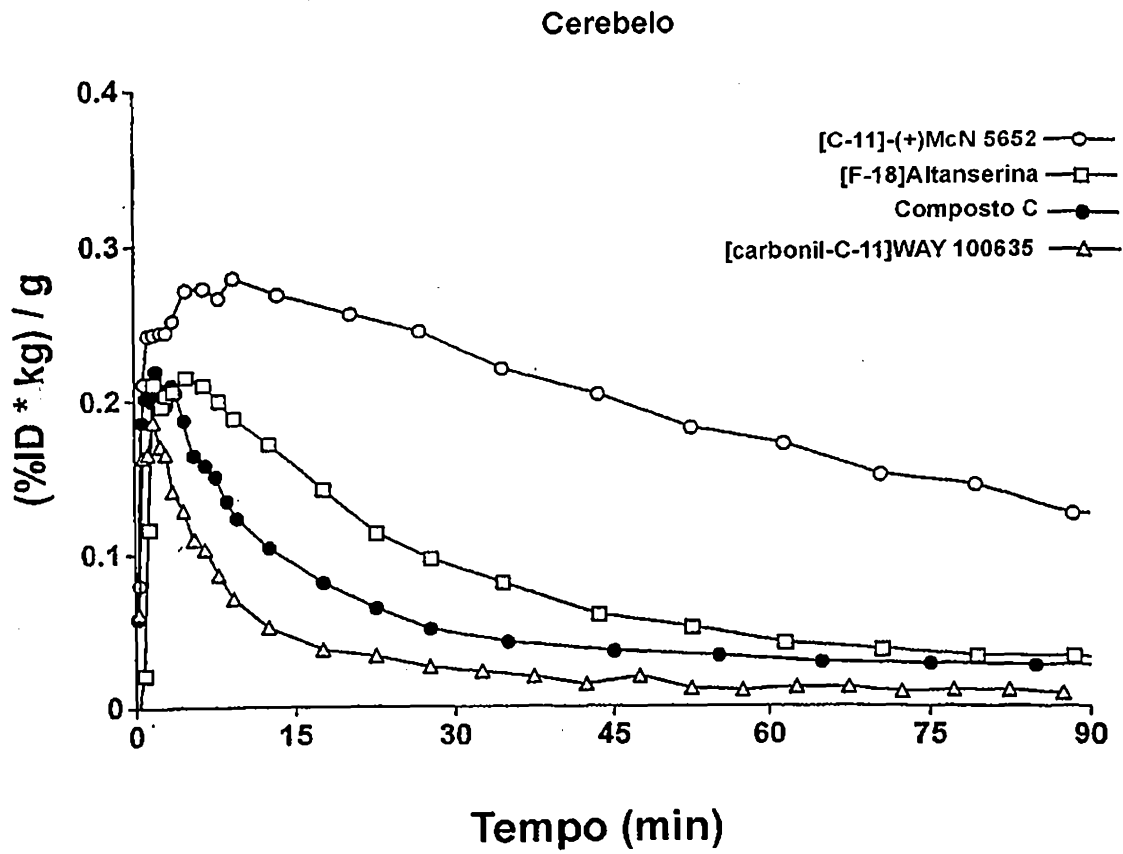


FIGURA 17

MY

**FIGURA 18**