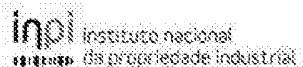

(11) Número de Publicação: **PT 2264018 E**



(51) Classificação Internacional:

C07D 277/66 (2015.01) **C07D 277/64** (2015.01)
A61K 49/00 (2015.01) **A61K 31/428** (2015.01)
A61K 51/04 (2015.01) **A61P 25/28** (2015.01)
G01N 33/534 (2015.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2001.08.24**

(30) Prioridade(s): **2000.08.24 US 227601 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2010.12.22**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.02.11**
107/2015

(73) Titular(es):

**UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE
COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER
EDUCATION**

**200 GARDNER STEEL CONFERENCE CENTER,
THACKERAY & O`HARA STREETS**

PITTSBURGH, PA 15260

US

(72) Inventor(es):

WILLIAM E. KLUNK

US

CHESTER A MATHIS

US

YANMING WANG

US

(74) Mandatário:

MARIA TERESA DELGADO

AVENIDA DA LIBERDADE, Nº 69, 3º D 1250-140 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **DERIVADOS DE TIOFLAVINA PARA USO NO DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

(57) Resumo:

ESTA INVENÇÃO RELACIONA-SE COM NOVOS DERIVADOS DE TIOFLAVINA DA ESTRUTURA ÚTEIS, POR EXEMPLO, NA IMAGIOLOGIA IN VIVO DE PACIENTES TENDO PLACAS NEURÍTICAS, BEM COMO COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO OS DERIVADOS DE TIOFLAVINA E MÉTODO PARA SINTETIZAR OS COMPOSTOS. OS COMPOSTOS ENCONTRAM USO PARTICULAR NO DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE PACIENTES TENDO DOENÇAS ONDE A ACUMULAÇÃO DE PLACAS NEURÍTICAS É PREDOMINANTE. A DOENÇA, DOENÇA DE ALZHEIMER FAMILIAR, SÍNDROME DE DOWN E HOMOZIGOTOS PARA O ALELO E4 DA APOLIPOPROTEÍNA.

RESUMO**"DERIVADOS DE TIOFLAVINA PARA USO NO DIAGNÓSTICO DA DOENÇA
DE ALZHEIMER"**

Esta invenção relaciona-se com novos derivados de tioflavina da estrutura úteis, por exemplo, na imagiologia *in vivo* de pacientes tendo placas neuríticas, bem como composições farmacêuticas compreendendo os derivados de tioflavina e método para sintetizar os compostos. Os compostos encontram uso particular no diagnóstico e tratamento de pacientes tendo doenças onde a acumulação de placas neuríticas é predominante. A Doença, Doença de Alzheimer familiar, síndrome de Down e homozigotos para o alelo E4 da apolipoproteína.

DESCRIÇÃO

"DERIVADOS DE TIOFLAVINA PARA USO NO DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER"

Área da invenção

A presente invenção relaciona-se com compostos que são adequados para imagiologia de depósitos amiloides em pacientes vivos. Mais especificamente, a presente invenção relaciona-se com um método de imagiologia de depósitos amiloides no cérebro *in vivo* para permitir o diagnóstico *ante mortem* da Doença de Alzheimer.

Antecedentes da invenção

A Doença de Alzheimer ("DA") é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda de memória e outras deficiências cognitivas. McKhann et al., *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, no entanto, porque a presença da doença é difícil de determinar sem uma biopsia ao cérebro perigosa, o tempo de início é desconhecido. O prevalência da DA aumenta com a idade, com estimativas da população afetada alcançando os 40-50% nas idades 85-90. Evans et al., *JAMA* 262: 2551 (1989); Katzman, *Neurology* 43: 13 (1993).

Na prática, a DA é definitivamente diagnosticada através do exame do tecido do cérebro, usualmente na autópsia. Khachaturian, *Arch. Neurol.* 42: 1097 (1985); McKhann et al., *Neurology* 34: 939 (1984). Neuropatologicamente, esta doença é caracterizada pela presença de placas neuríticas (PN), emaranhados neurofibrilares (ENF), e perda neuronal, juntamente com uma variedade de outras descobertas. Mann, *Mech. Ageing Dev.* 31: 213 (1985). Fatias *post mortem* de tecido cerebral de vítimas da doença de Alzheimer exibem a

presença de amiloide na forma de núcleos extracelulares proteináceos de placas neuríticas que são características da DA.

Os núcleos amiloides destas placas neuríticas são compostos por uma proteína chamada de β -amiloide ($A\beta$) que está arranjada numa configuração predominantemente de folha beta-pregueada. Mori et al., *Journal of Biological Chemistry* 267: 17082 (1992); Kirschner et al., *PNAS* 83: 503 (1986). As placas neuríticas são um aspeto inicial e invariante da doença. Mann et al., *J. Neurol. Sci.* 89: 169; Mann, *Mech. Ageing Dev.* 31: 213 (1985); Terry et al., *J. Neuropathol. Exp. Neurol* 46: 262 (1987).

A deposição inicial da $A\beta$ provavelmente ocorre muito antes dos sintomas clínicos serem percetíveis. O “critério microscópico mínimo” correntemente recomendado para o diagnóstico da DA é baseado no número de placas neuríticas encontradas no cérebro. Khachaturian, *Arch. Neurol.*, supra (1985). Infelizmente, a avaliação das contagens de placas neuríticas tem que ser adiada até depois da morte.

As placas neuríticas contendo amiloide são uma característica proeminente de áreas seletivas do cérebro na DA bem como na Síndrome de Down e em pessoas homozigotas para o alelo E4 da apolipoproteína as quais são muito propensas a desenvolver a DA. Corder et al., *Science* 261: 921 (1993); Divry, P., *J. Neurol. Psych.* 27: 643-657 (1927); Wisniewski et al., em Zimmerman, H.M. (ed.): *PROGRESS IN NEUROPATHOLOGY* (Grune and Stratton, N.Y. 1973) pp. 1-26. A amiloide do cérebro é prontamente demonstrada pela coloração de secções do cérebro com tioflavina S ou vermelho do Congo. Puchtler et al., *J. Histochem. Cytochem.* 10: 35 (1962). A amiloide corada pelo vermelho do Congo é

caracterizada por uma aparência dicroica, exibindo uma cor de polarização amarelo-verde. A ligação dicroica é o resultado da estrutura em folha beta-pregueada das proteínas amiloides. Glenner, *G. N. Eng. J. Med.* 302: 1283 (1980). Uma discussão detalhada da bioquímica e histoquímica da amiloide pode ser encontrada em Glenner, *N. Eng. J. Med.*, 302: 1333 (1980).

Até agora, o diagnóstico da DA tem sido alcançado principalmente através de critérios de avaliação clínica, biopsias ao cérebro e estudos *post mortem* do tecido. Os esforços de pesquisa para desenvolver métodos para diagnosticar a doença de Alzheimer *in vivo* incluem (1) testes genéticos, (2) métodos de imunoensaios e (3) técnicas de imagiologia.

A evidência de que anormalidades no metabolismo da A β são necessárias e suficientes para o desenvolvimento da DA é baseada na descoberta de mutações pontuais na proteína precursora da A β em várias famílias raras com uma forma autossómica dominante da DA. Hardy, *Nature Genetics* 1: 233 (1992); Hardy et al., *Science* 256: 184 (1992). Estas mutações ocorrem perto dos pontos de clivagem N- e C-terminal necessários para a geração da A β a partir da sua proteína precursora. St. George-Hyslop et al., *Science* 235: 885 (1987); Kang et al., *Nature* 325: 733 (1987); Potter WO 92/17152. A análise genética de um grande número de famílias de DA tem demonstrado, contudo, que a DA é geneticamente heterogénea. St. George-Hyslop et al., *Nature* 347: 194 (1990). A ligação a marcadores do cromossoma 21 é mostrada em somente algumas famílias com DA de início precoce e em nenhuma das famílias com DA de início tardio. Mais recentemente, um gene no cromossoma 14 cujo produto prevê-se que contenha múltiplos domínios transmembranares e

se assemelha a uma proteína integral da membrana foi identificado por Sherrington et al., *Nature* 375: 754-760 (1995). Este gene pode representar até 70% da DA autossómica dominante de início precoce. Dados preliminares sugerem que esta mutação do cromossoma 14 causa um aumento na produção de A_β. Scheuner et al., *Soc. Neurosci. Abstr.* 21: 1500 (1995). Uma mutação num gene muito similar foi identificada no cromossoma 1 em famílias Alemãs do Volga com DA de início precoce. Levy-Lahad et al., *Science* 269: 973-977 (1995).

O rastreio para o genótipo da apolipoproteína E tem sido sugerido com uma ajuda no diagnóstico da DA. Scott, *Nature* 366: 502 (1993); Roses, *Ann. Neurol.* 38: 6-14 (1995). Dificuldades surgem com esta tecnologia, no entanto, porque o alelo E4 da apolipoproteína é somente um fator de risco para a DA, não um marcador da doença. Está ausente em muitos pacientes com DA e presente em muitas pessoas idosas não dementes. Bird, *Ann. Neurol.* 38: 2-4 (1995).

Métodos de imunoensaios têm sido desenvolvidos para detetar a presença de marcadores neuroquímicos em pacientes com DA e para detetar uma proteína amiloide relacionada com a DA no líquido cefalorraquidiano. Warner, *Anal. Chem.* 59: 1203A (1987); Patente Mundial No. 92/17152 por Potter; Glenner et al., Patente E.U.A. No. 4,666,829. Não foi provado que estes métodos para diagnosticar a DA detetem a DA em todos os pacientes, particularmente em fases iniciais da doença e são relativamente invasivos, requerendo uma punção lombar. Também, têm sido feitas tentativas para desenvolver anticorpos monoclonais como sondas para a imagiologia da A_β. Majocha et al., *J. Nucl. Med.*, 33: 2184 (1992); Majocha et al., WO 89/06242 e Majocha et al., Patente E.U.A. 5,231,000. A maior desvantagem das sondas de anticorpo é a

dificuldade destas grandes moléculas em atravessar a barreira sangue-cérebro. Usar anticorpos para o diagnóstico *in vivo* da DA requereria anormalidades marcadas na barreira sangue-cérebro a fim de se ter acesso ao cérebro. Não existe nenhuma evidência funcional convincente de que as anormalidades na barreira sangue-cérebro existam na DA. Kalaria, *Cerebrovascular & Brain Metabolism Reviews* 4: 226 (1992).

Um péptido de A β radiomarcado tem sido usado para marcar placas do tipo difusas, compactas e neuríticas em secções do cérebro com DA. Ver Maggio et al., WO93/04194. No entanto, estes péptidos partilham todas as desvantagens dos anticorpos. Especificamente, os péptidos normalmente não atravessam a barreira sangue-cérebro em quantidades necessárias para a imagiologia e porque estas sondas reagem com placas difusas, elas podem não ser específicas para a DA.

A incapacidade de avaliar a deposição de amiloide na DA até depois da morte impede o estudo desta doença devastadora. Um método para quantificar a deposição de amiloide antes da morte é necessário tanto como uma ferramenta de diagnóstico em casos ligeira ou clinicamente confusos, bem como na monitorização da eficácia de terapias direcionadas para a prevenção da deposição de A β . Assim sendo, continua a ser de extrema importância desenvolver um método seguro e específico para diagnosticar a DA antes da morte pela imagiologia da amiloide no parênquima do cérebro *in vivo*. Apesar de várias tentativas terem sido feitas para diagnosticar a DA *in vivo*, correntemente, não existem sondas ante mortem para a amiloide do cérebro. Nenhum método tem utilizado uma sonda de alta afinidade para a amiloide que tenha uma toxicidade baixa, possa atravessar a barreira sangue-cérebro, e se ligue mais eficazmente ao

cérebro com DA do que a um cérebro normal a fim de identificar os depósitos amiloïdes na DA antes da morte de um paciente. Portanto, nenhum método *in vivo* para o diagnóstico da DA tem-se demonstrado como satisfazendo estes critérios.

Os dados sugerem que os compostos que se ligam à amiloide irão ter potencial terapêutico na DA e na diabetes mellitus tipo 2. Reações morfológicas incluindo astrocitose reativa, neurites distróficas, células da mioglia ativadas, perda de sinapse, e ativação completa do complemento encontrada em redor das placas neuríticas significam que processos neurotóxicos e degenerativos da célula estão a ocorrer nas áreas adjacentes a estes depósitos de A_β. Joachim et al., *Am. J. Pathol.* 135: 309 (1989); Masliah et al., *loc. cit.* 137: 1293 (1990); Lue e Rogers, *Dementia* 3: 308 (1992). Têm sido reportados neurotoxicidade induzida pela A_β e degeneração da célula num número de tipos celulares *in vitro*. Yankner et al., *Science* 250: 279 (1990); Roher et al., *BBRC* 174: 572 (1991); Frautschy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 83362 (1991); Shearman et al., *loc. cit.* 91: 1470 (1994). Tem sido mostrado que a agregação do péptido de A_β é necessária para a neurotoxicidade *in vitro*. Yankner, *Neurobiol. Aging* 13: 615 (1992). Recentemente, três laboratórios têm reportado resultados que sugerem que o vermelho do Congo inibe a neurotoxicidade induzida pela A_β e a degeneração da célula *in vitro*. Burgevin et al., *NeuroReport* 5: 2429 (1994); Lorenzo e Yankner, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 12243 (1994); Pollack et al., *Neuroscience Letters* 184: 113 (1995); Pollack et al., *Neuroscience Letters* 197: 211 (1995). O mecanismo parece envolver quer a inibição da formação de fibrilas, quer a prevenção das propriedades neurotóxicas das fibrilas formadas. Lorenzo e Yankner, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 12243 (1994). Tem

igualmente sido mostrado que o vermelho do Congo protege as células dos ilhéus pancreáticos da toxicidade causada pela amilina. Lorenzo e Yankner, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 12243 (1994). A amilina é um péptido fibrilar similar à A β a qual se acumula no pâncreas na diabetes mellitus tipo 2.

É conhecido na técnica que certos corantes azoicos, tal como o vermelho do Congo, podem ser carcinogénicos. Morgan et al. *Environmental Health Perspectives*, 102 (sup.) 2: 63-78, (1994). Esta carcinogenicidade potencial parece ser baseada largamente no facto de os corantes azoicos serem extensivamente metabolizados até à amina mãe livre por bactérias intestinais. Cerniglia et al., *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 107: 1224-1229, (1982). No caso dos corantes de benzidina (e muitas outras benzidinas substituídas), é a amina livre que é o carcinogéneo. Estes factos têm poucas implicações para os estudos de imagiologia da amiloide nos quais uma quantidade extremamente minúscula do corante radiomarcado com uma alta atividade específica seria diretamente injetada na corrente sanguínea. Neste caso, a quantidade administrada seria negligenciável e o corante iria contornar as bactérias intestinais.

No caso do uso terapêutico, estes factos têm importância crítica. A libertação de um carcinogéneo conhecido de um composto terapêutico é inaceitável. Um segundo problema com o metabolismo do corante diazoico é que grande parte do medicamento administrado é metabolizada por bactérias intestinais antes da absorção. Esta biodisponibilidade reduzida permanece uma desvantagem mesmo se os metabólitos libertos são inócuos.

A tioflavina T é um corante básico descrito pela primeira vez como um corante da amiloide seletivo em 1959 por Vassar e Culling (*Arch. Pathol.* 68: 487 (1959)). Schwartz et al.

(*Zbl. Path.* 106: 320 (1964)) demonstraram pela primeira vez o uso da Tioflavina S, um corante ácido, como um corante da amiloide em 1964. As propriedades quer da Tioflavina T, quer da Tioflavina S têm sido estudadas desde aí em detalhe. Kelenyi *J. Histochem. Cytochem.* 15: 172 (1967); Burns et al. *J. Path. Bact.* 94:337 (1967); Guntern et al. *Experientia* 48: 8 (1992); LeVine *Meth. Enzymol.* 309: 274 (1999). A Tioflavina S é comumente usada no estudo *post mortem* da deposição da amiloide no cérebro com DA onde tem mostrado ser uma das técnicas mais sensíveis para demonstrar placas senis. Vallet et al. *Acta Neuropathol.* 83: 170 (1992). A Tioflavina T tem sido frequentemente usada como um reagente para estudar a agregação de proteínas da amiloide sensíveis em fibrilas com folha-beta. LeVine *Prot. Sci.* 2: 404 (1993). Derivados de amina quaternária relacionados com a Tioflavina T têm sido propostos como agentes de imaciologia da amiloide, embora nenhuma evidência de captação no cérebro destes agentes tenha sido apresentada. Caprathe et al. Patente E.U.A. 6,001,331.

WO 97/26919 descreve, entre outras coisas, um método de imaciologia dos depósitos amiloïdes pela administração de compostos de benzotiazólio em que os átomos de nitrogénio dos anéis de tiazol são quaternizados.

WO 01/14354 descreve certos compostos de benzotiazol para uso como agentes anti-tumor. Os compostos contêm opcionalmente o isótopo ^{18}F para avaliar, através de técnicas de imaciologia, a eficácia dos compostos contra os tumores.

Portanto, existe uma necessidade para compostos de ligação à amiloide que entrem no cérebro e se liguem seletivamente à amiloide.

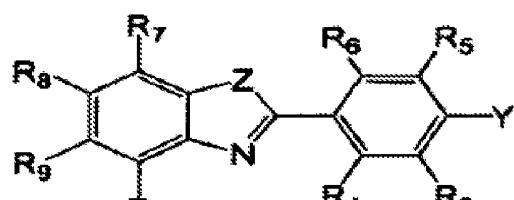
Uma necessidade existe ainda para compostos de ligação à amiloide que sejam não tóxicos e biodisponíveis e, consequentemente, possam ser usados na terapêutica.

Sumário da invenção

É portanto um propósito da presente invenção proporcionar compostos que permitam um método seguro e específico para diagnosticar a DA antes da morte pela imagiologia *in vivo* da amiloide no parênquima do cérebro.

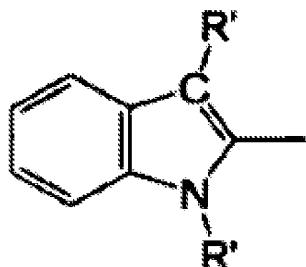
É outro propósito da presente invenção proporcionar uma abordagem para identificar depósitos amiloïdes na DA no cérebro antes da morte de um paciente, usando uma sonda de alta afinidade para a amiloide que tenha baixa toxicidade, possa atravessar a barreira sangue-cérebro, e possa distinguir o cérebro com DA de um cérebro normal.

No alcance destes e outros objetivos da invenção é proporcionado, de acordo com um aspeto da invenção, um composto de ligação à amiloide da fórmula seguinte ou um seu sal solúvel em água, não tóxico:



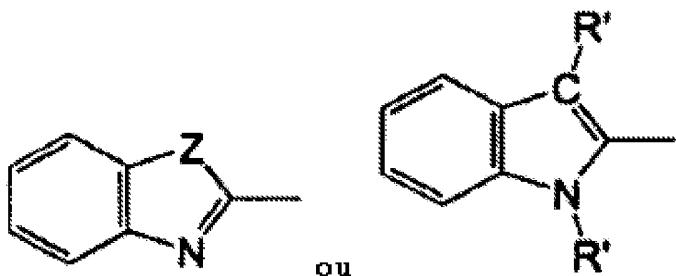
(I)

em que Z é S, NR', O ou CR', caso em que a forma tautomérica correta do anel heterocíclico se torna um indole no qual R' é H ou um grupo alquilo C₁-C₈:



Y é NR¹R², OR², ou SR²;

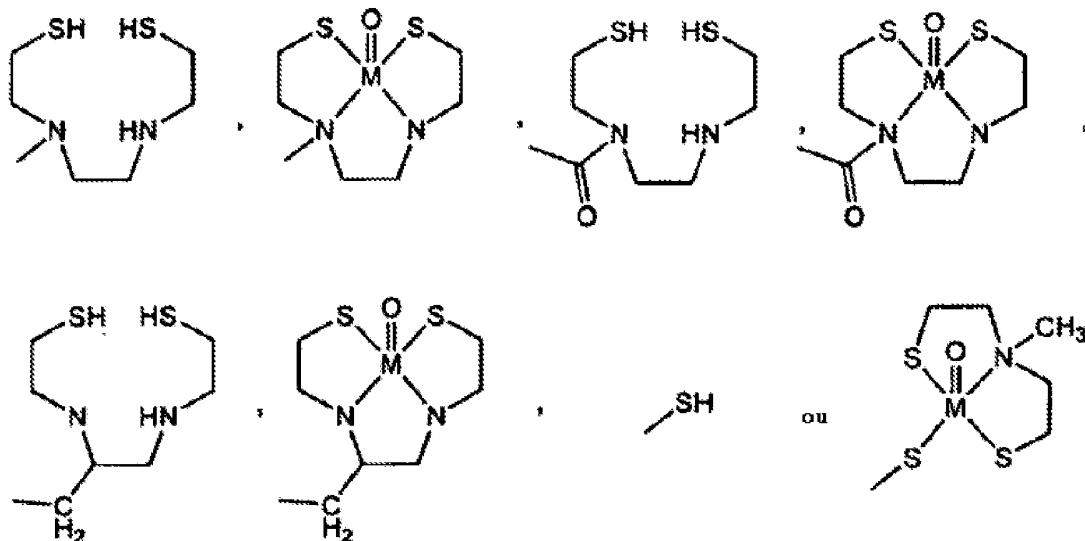
em que o nitrogénio de



não é uma amina quaternária;

cada R¹ e R² independentemente é selecionado do grupo consistindo em H, um grupo alquilo C₁-C₈, (CH₂)_nOR' (em que n=1, 2, ou 3), CF₃, CH₂-CH₂X, CH₂-CH₂-CH₂X (em que X=F, Cl, Br ou I), (C=O)-R', R_{fe}, (CH₂)_nR_{fe} (em que n= 1, 2, 3, ou 4 e R_{fe} representa um grupo fenilo não substituído ou substituído, em que os substituintes de R_{fe} são selecionados do grupo consistindo em F, Cl, Br, I, um grupo alquilo C₁-C₈), (CH₂)_nOR' (em que n=1, 2, ou 3), CF₃, CH₂-CH₂X, OCH₂-CH₂X, CH₂-CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂-CH₂X (em que X=F, Cl, Br ou I), CN, (C=O)-R', N(R')₂, NO₂, (C=O)N(R')₂, O(CO)R',

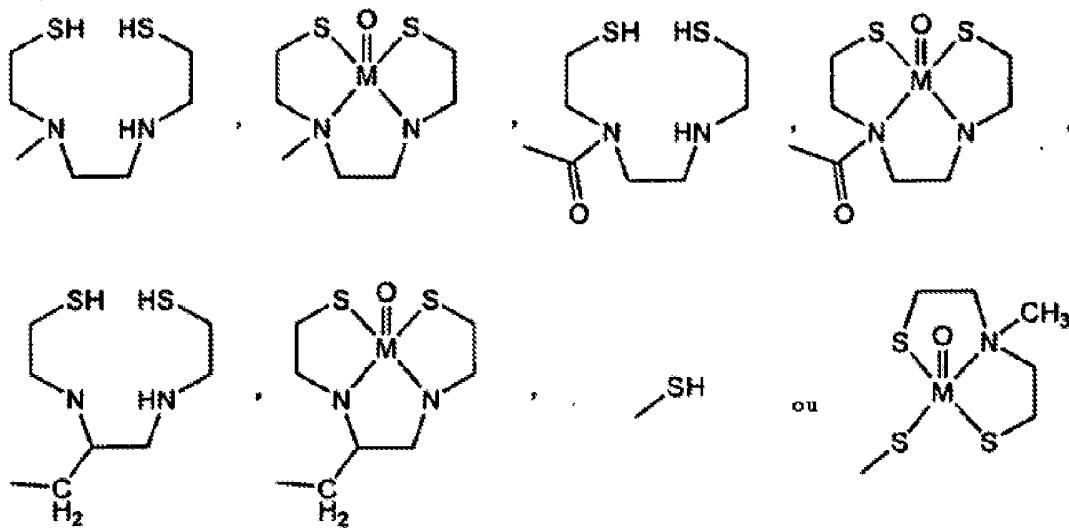
OR', SR', COOR' (em que R' é H ou um grupo alquilo C₁-C₈), um estanho tri-alquilo e um grupo quelante (com ou sem um grupo metálico quelado) da forma W-L ou V-W-L, em que V é selecionado do grupo consistindo em -COO-, -CO-, -CH₂O- e -CH₂NH-; W é -(CH₂)_n em que n=0,1,2,3,4, ou 5; e L é:



em que M é selecionado do grupo consistindo em Tc e Re;

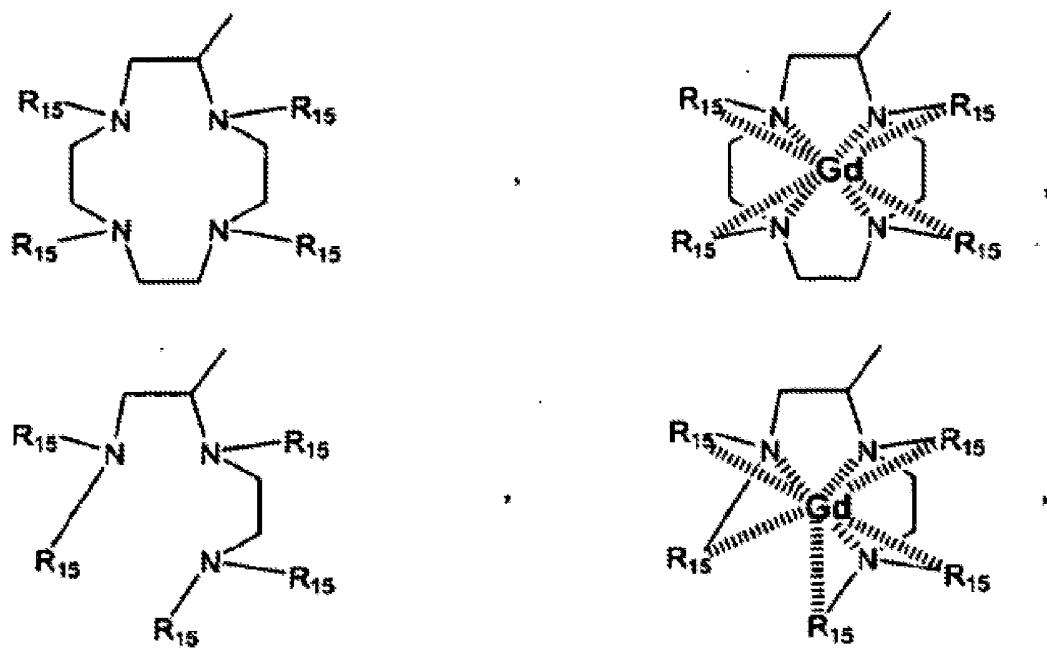
e R' é H ou um grupo alquilo C₁-C₈;

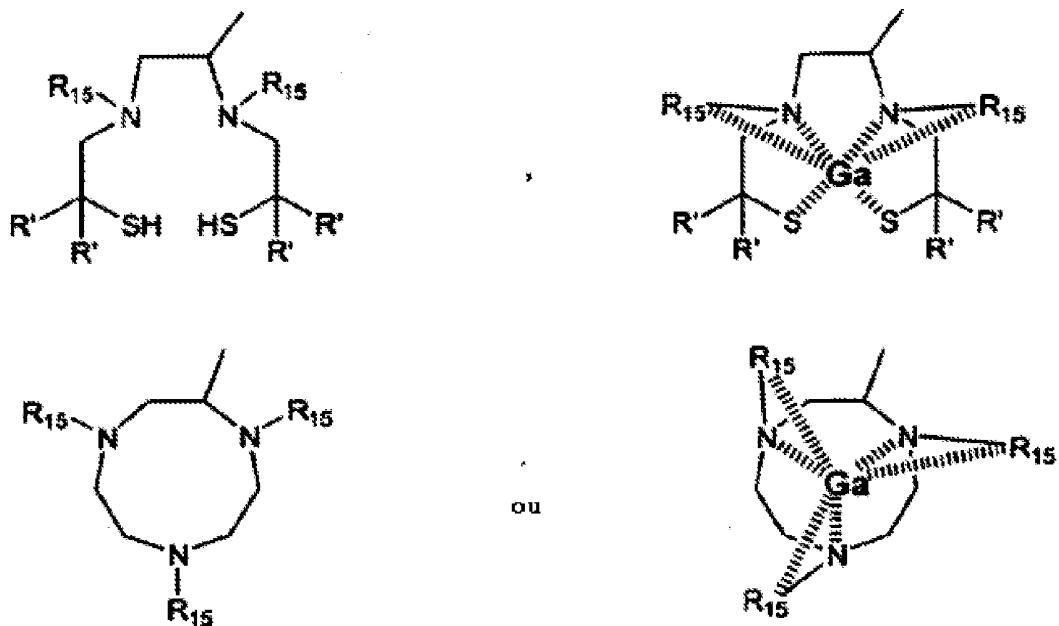
cada R³-R¹⁰ independentemente é selecionado do grupo consistindo em H, F, Cl, Br, I, um grupo alquilo C₁-C₈, (CH₂)_nOR' (em que n=1, 2, ou 3), CF₃, CH₂-CH₂X, CF₃, CH₂-CH₂X, OCH₂-CH₂X, CH₂-CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂-CH₂X (em que X=F, Cl, Br ou I), CN, (C=O)-R', N(R')₂, NO₂, (C=O)N(R')₂, O(CO)R', OR', SR', COOR', R_{fe}, CR'=CR'-R_{fe}, CR₂'=CR₂'-R_{fe}, um estanho tri-alquilo e um grupo quelante (com ou sem um grupo metálico quelado) da forma W-L ou V-W-L, em que V é selecionado do grupo consistindo em -COO-, -CO-, -CH₂O- e -CH₂NH-; W é -(CH₂)_n em que n=0,1,2,3,4, ou 5; e L é:



em que M é selecionado do grupo consistindo em Tc e Re;

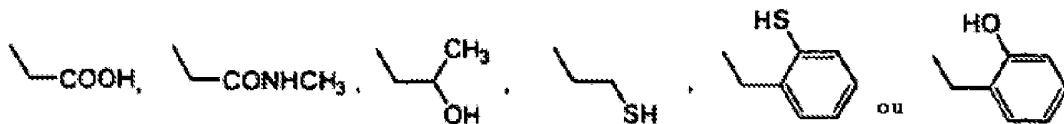
ou em que cada R¹-R¹⁰ independentemente é selecionado do grupo consistindo num grupo quelante (com ou sem um ião metálico quelado) da forma W-L e V-W-L, em que V é selecionado do grupo consistindo em -COO-, e -CO-; W é - (CH₂)_n em que n=0,1,2,3,4, ou 5; L é:



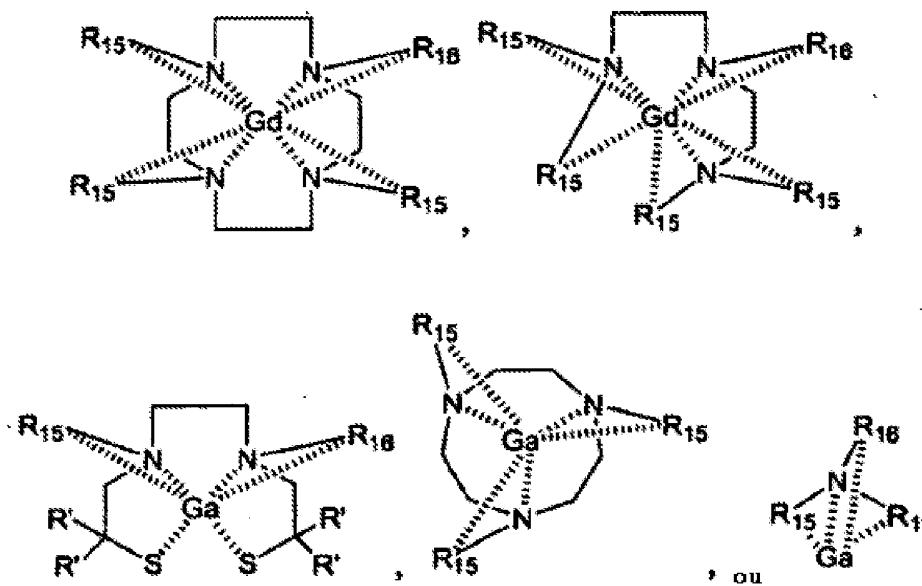


e em que R¹⁵ independentemente é selecionado dos seguintes:

H,

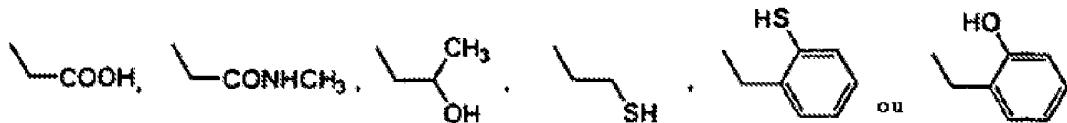


ou uma ligação à amiloide, composto quelante (com um grupo metálico quelado) ou um seu sal solúvel em água, não tóxico da forma:

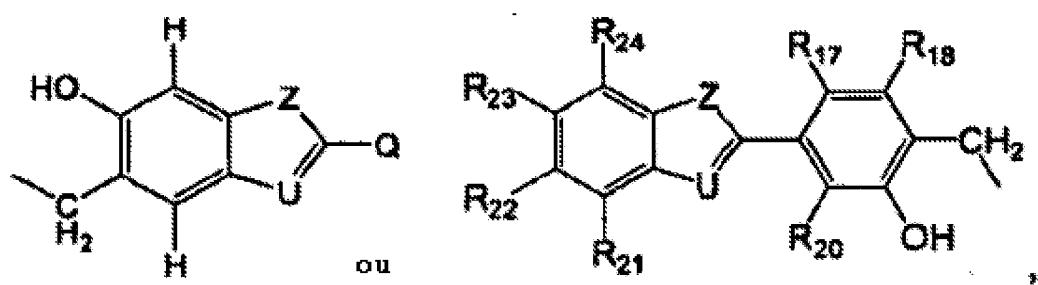


em que R^{15} independentemente é selecionado dos seguintes:

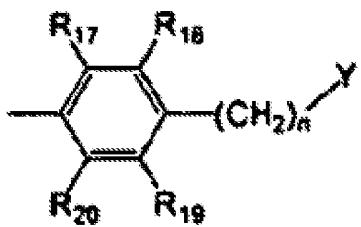
H,



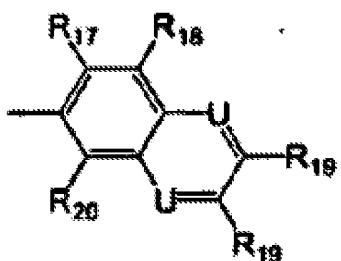
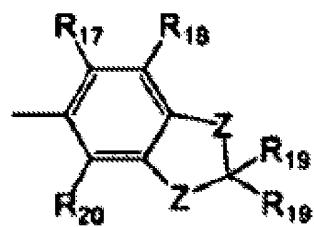
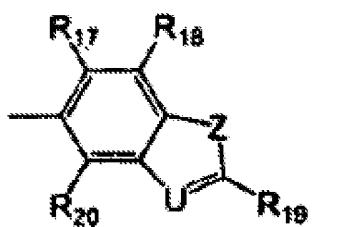
e R^{16} é



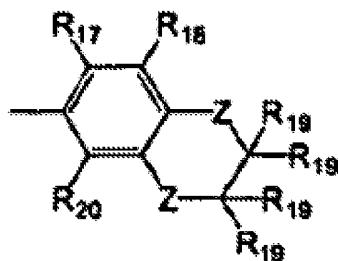
em que Q é independentemente selecionado de uma das seguintes estruturas:



em que n=0, 1, 2, 3, ou 4,



ou



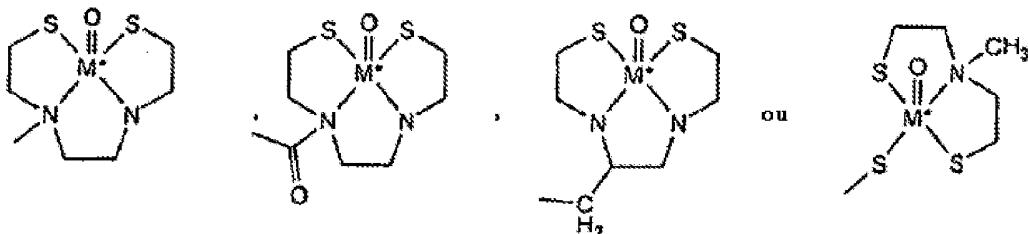
Z é S, NR', O, ou C(R')₂, no qual R' é H ou um grupo alquilo C₁-C₈;

U é N ou CR';

Y é NR¹R², OR², ou SR²;

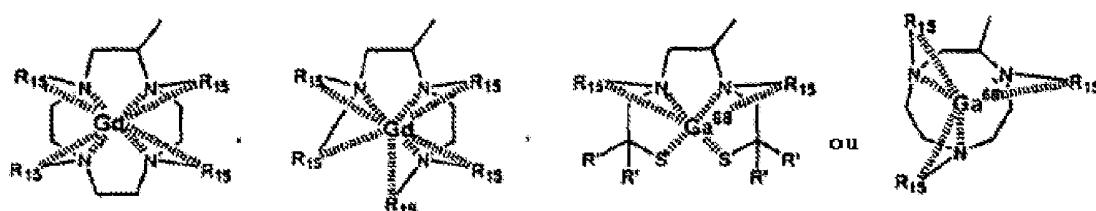
cada R¹⁷-R²⁴ independentemente é selecionado do grupo consistindo em H, F, Cl, Br, I, um grupo alquilo C₁-C₈, (CH₂)_nOR' (em que n=1, 2, ou 3), CF₃, CH₂-CH₂X, OCH₂-CH₂X, CH₂-CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂-CH₂X (em que X=F, Cl, Br ou I), CN, (C=O)-R', N(R')₂, NO₂, (C=O)N(R')₂, O(CO)R', OR', SR', COOR', R_{fe}, CR'=CR'-R_{fe} e CR₂'=CR₂'-R_{fe};

em que pelo menos um dos substituintes R^1-R^{10} é selecionado do grupo consistindo em 3H , ${}^{131}I$, ${}^{125}I$, ${}^{123}I$, ${}^{76}Br$, ${}^{75}Br$, $CH_2-CH_2-X^*$, $O-CH_2-CH_2-X^*$, $CH_2-CH_2-CH_2-X^*$, $O-CH_2-CH_2-CH_2-X^*$ (em que $X^* = {}^{131}I$, ${}^{123}I$, ${}^{76}Br$ ou ${}^{75}Br$), ${}^{19}F$, um substituinte contendo um carbono selecionado de um grupo consistindo em alquilo C_1-C_8 , $(CH_2)_nOR'$, CF_3 , CH_2-CH_2X , OCH_2-CH_2X , $CH_2-CH_2-CH_2X$, $O-CH_2-CH_2-CH_2X$ (em que $X=F$, Cl , Br ou I), CN , $(C=O)-R'$, $N(R')_2$, NO_2 , $(C=O)N(R')_2$, $O(CO)R'$, $COOR'$, $CR'=CR'-R_{fe}$ e $CR_2'=CR_2'-R_{fe}$ em que pelo menos um carbono é ${}^{11}C$, ${}^{13}C$ ou ${}^{14}C$ e um grupo quelante (com grupo metálico quelado) da forma $W-L^*$ ou $V-W-L^*$, em que V é selecionado do grupo consistindo em $-COO-$, $-CO-$, $-CH_2O-$ e $-CH_2NH-$; W é $-(CH_2)_n$ onde $n=0,1,2,3,4$, ou 5; e L^* é:



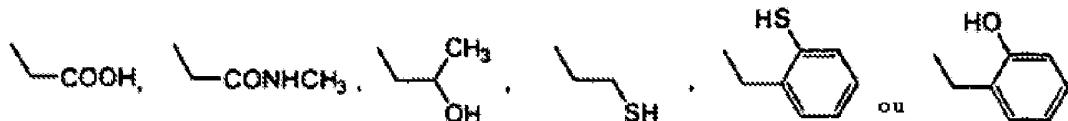
em que M^* é ${}^{99m}TC$;

ou L^* é:

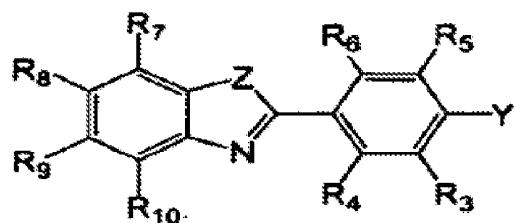


e em que R^{15} independentemente é selecionado dos seguintes:

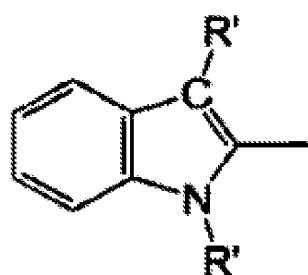
H ,



Noutra forma de realização, a invenção relaciona-se com um método para sintetizar um composto da fórmula seguinte ou um seu sal solúvel em água, não tóxico:

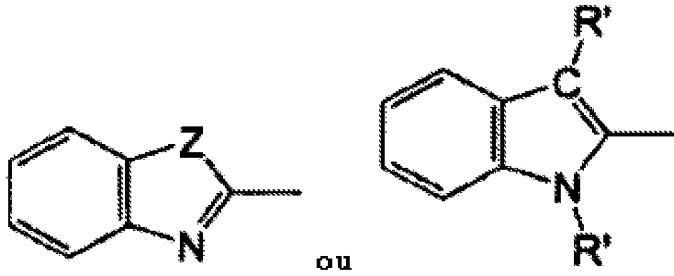


em que Z é S, NR', O ou CR', caso em que a forma tautomérica correta do anel heterocíclico se torna um indole no qual R' é H ou um grupo alquilo C₁-C₈:



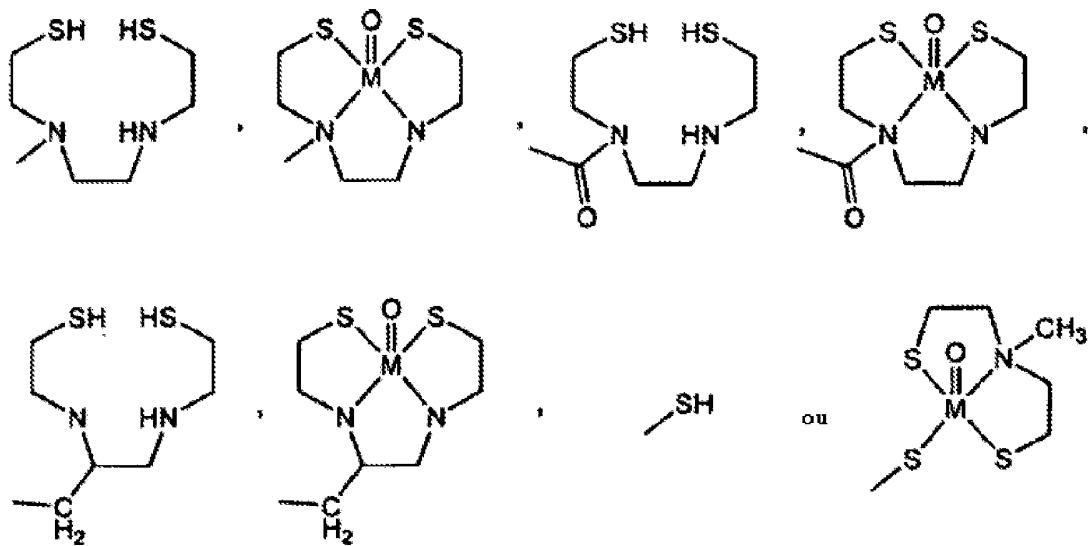
Y é NR¹R², OR², ou SR²;

em que o nitrogénio de



não é uma amina quaternária;

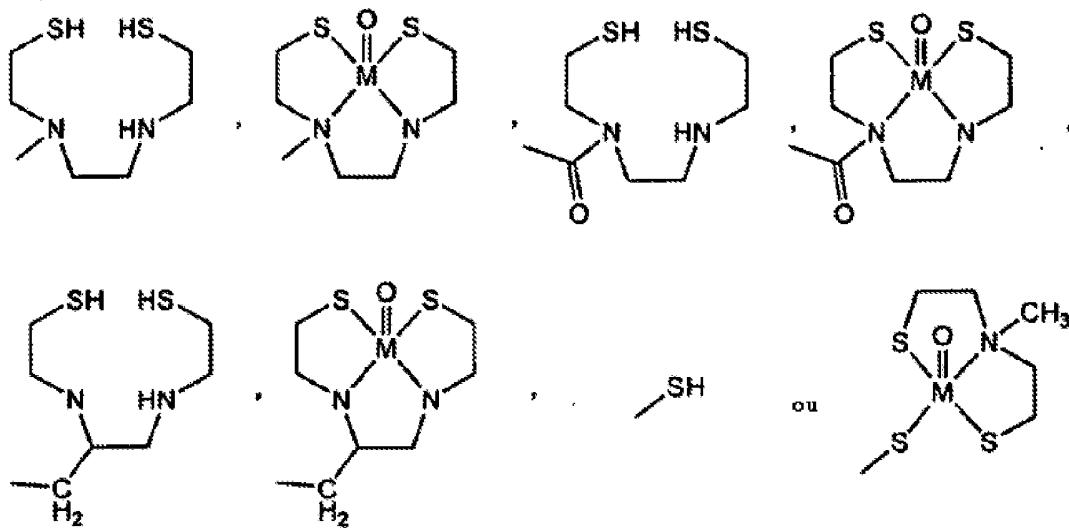
cada R^1 e R^2 independentemente é selecionado do grupo consistindo em H, um grupo alquilo C_1-C_8 , $(CH_2)_nOR'$ (em que $n=1, 2$, ou 3), CF_3 , CH_2-CH_2X , $CH_2-CH_2-CH_2X$ (em que $X=F$, Cl, Br ou I), $(C=O)-R'$, R_{fe} , $(CH_2)_nR_{fe}$ (em que $n=1, 2, 3$, ou 4 e R_{fe} representa um grupo fenilo não substituído ou substituído, em que os substituintes de R_{fe} são selecionados do grupo consistindo em F, Cl, Br, I, um grupo alquilo C_1-C_8 , $(CH_2)_nOR'$ (em que $n=1, 2$, ou 3), CF_3 , CH_2-CH_2X , OCH_2-CH_2X , $CH_2-CH_2-CH_2X$, $O-CH_2-CH_2-CH_2X$ (em que $X=F$, Cl, Br ou I), CN, $(C=O)-R'$, $N(R')_2$, NO_2 , $(C=O)N(R')_2$, $O(CO)R'$, OR' , SR' , $COOR'$ (em que R' é H ou um grupo alquilo C_1-C_8), um estanho tri-alquilo e um grupo quelante (com ou sem um grupo metálico quelado) da forma W-L ou V-W-L, em que V é selecionado do grupo consistindo em $-COO-$, $-CO-$, $-CH_2O-$ e $-CH_2NH-$; W é $-(CH_2)_n$ em que $n=0, 1, 2, 3, 4$, ou 5; e L é:



em que M é selecionado do grupo consistindo em Tc e Re;

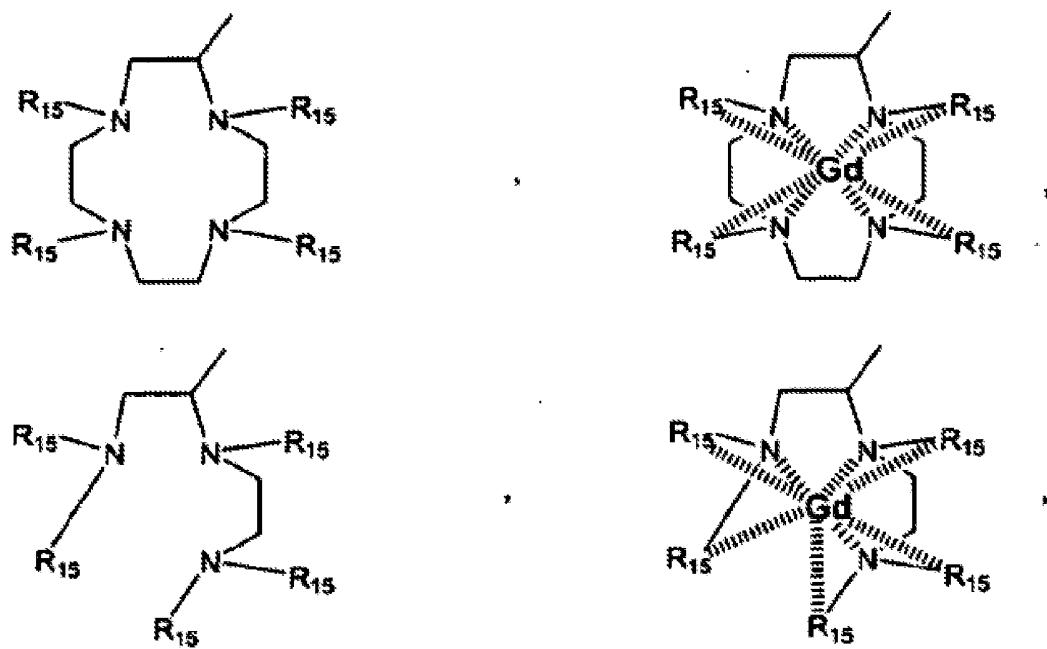
e R' é H ou um grupo alquilo C₁-C₈;

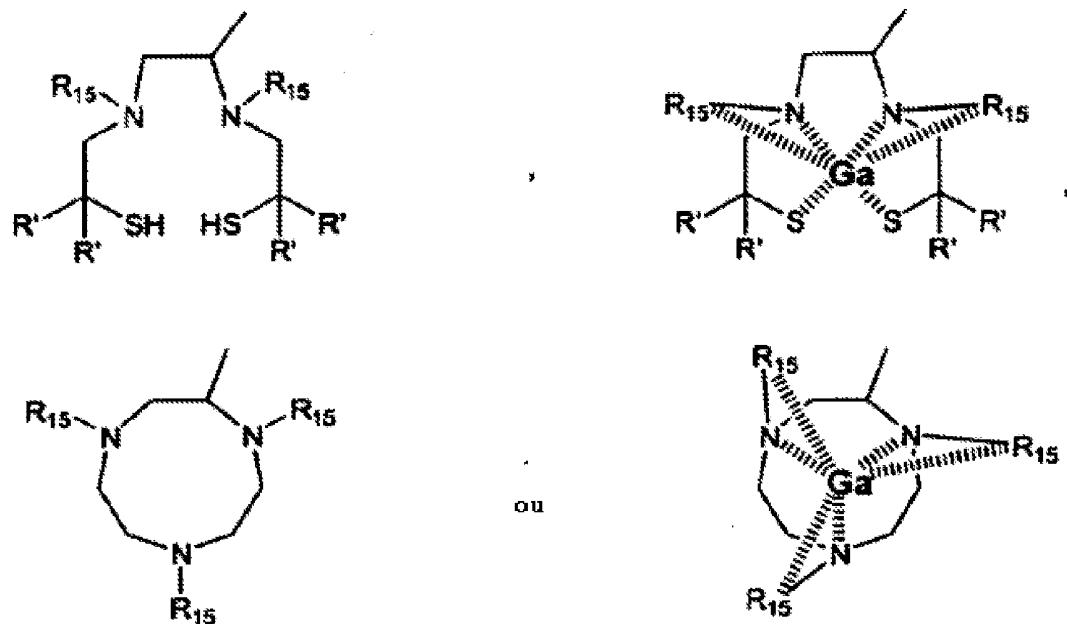
cada R³-R¹⁰ independentemente é selecionado do grupo consistindo em H, F, Cl, Br, I, um grupo alquilo C₁-C₈, (CH₂)_nOR' (em que n=1, 2, ou 3), CF₃, CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂X, CH₂-CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂-CH₂X (em que X=F, Cl, Br ou I), CN, (C=O)-R', N(R')₂, NO₂, (C=O)N(R')₂, O(CO)R', OR', SR', COOR', R_{fe}, CR'=CR'-R_{fe}, CR₂'=CR₂'-R_{fe}, um estanho tri-alquilo e um grupo quelante (com ou sem um grupo metálico quelado) da forma W-L ou V-W-L, em que V é selecionado do grupo consistindo em -COO-, -CO-, -CH₂O- e -CH₂NH-; W é -(CH₂)_n em que n=0,1,2,3,4, ou 5; e L é:



em que M é selecionado do grupo consistindo em Tc e Re;

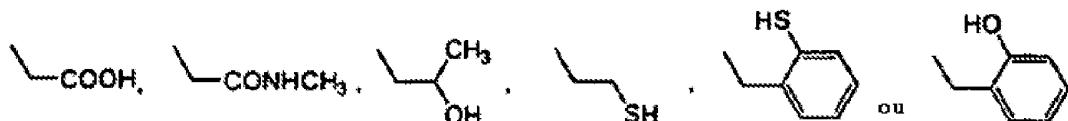
ou em que cada R¹-R¹⁰ independentemente é selecionado do grupo consistindo num grupo quelante (com ou sem um ião metálico quelado) da forma W-L e V-W-L, em que V é selecionado do grupo consistindo em -COO-, e -CO-; W é - (CH₂)_n em que n=0,1,2,3,4, ou 5; L é:



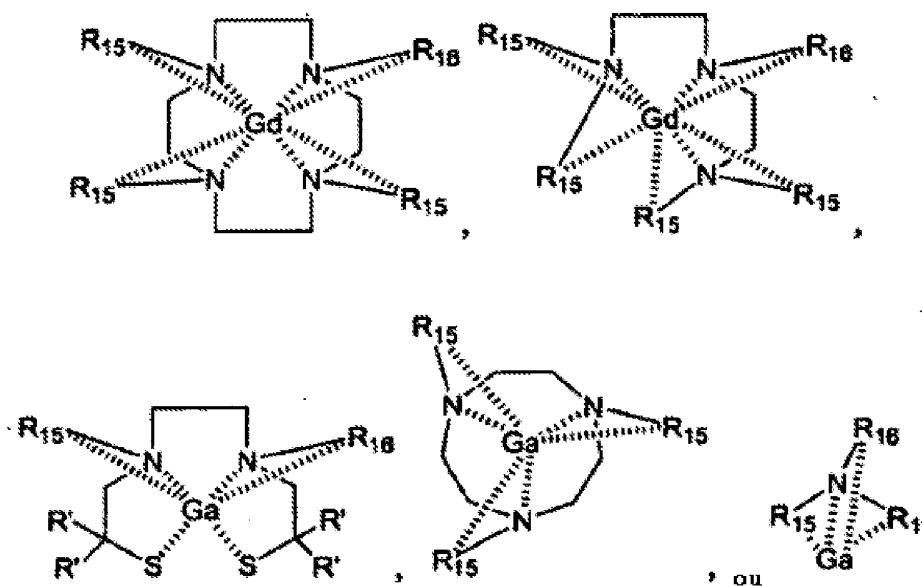


e em que R^{15} independentemente é selecionado dos seguintes:

H,

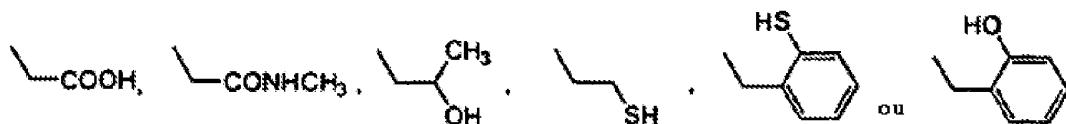


ou uma ligação à amiloide, composto quelante (com um grupo metálico quelado) ou um seu sal solúvel em água, não tóxico da forma:

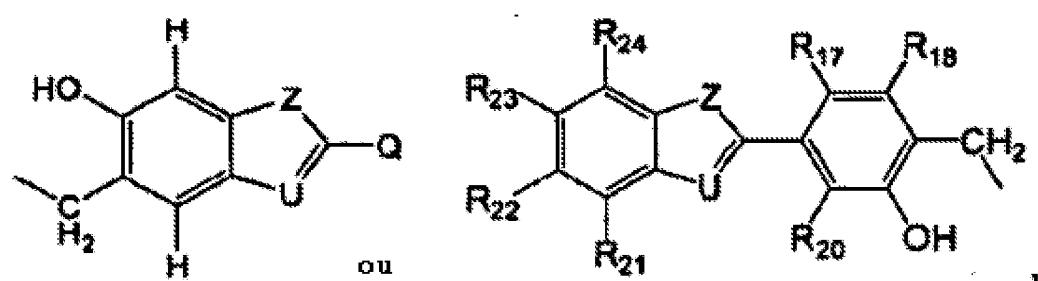


em que R^{15} independentemente é selecionado dos seguintes:

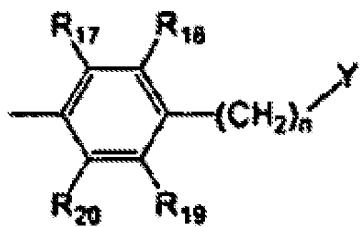
H,



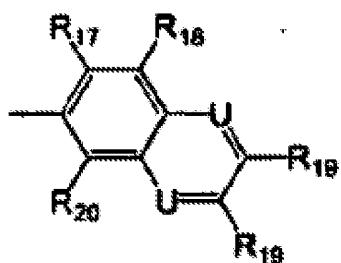
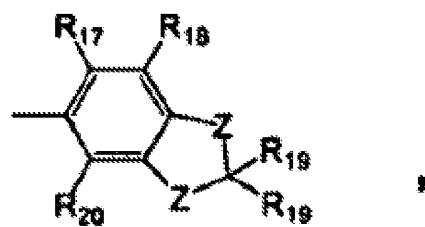
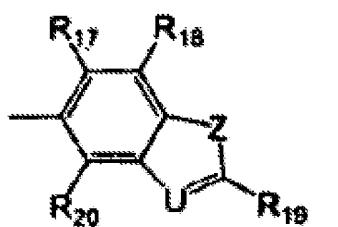
e R^{16} é



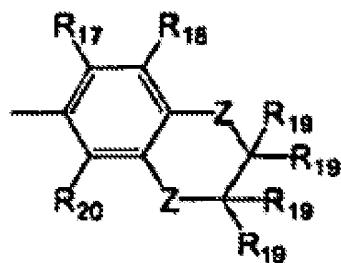
em que Q é independentemente selecionado de uma das seguintes estruturas:



em que n=0, 1, 2, 3, ou 4,



ou



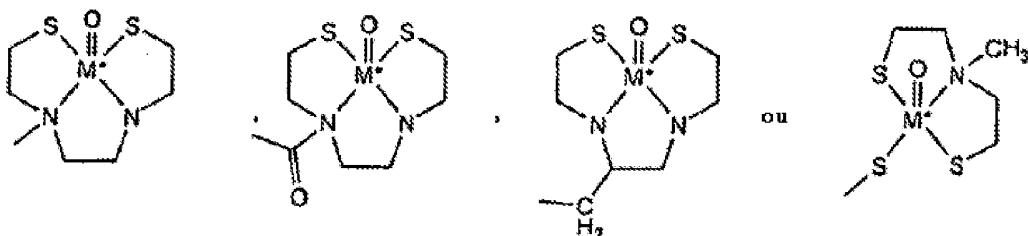
Z é S, NR', O, ou C(R')₂, no qual R' é H ou um grupo alquilo C₁-C₈;

U é N ou CR';

Y é NR¹R², OR², ou SR²;

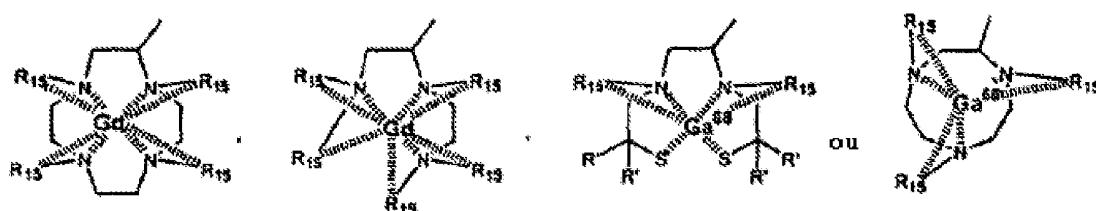
cada R¹⁷-R²⁴ independentemente é selecionado do grupo consistindo em H, F, Cl, Br, I, um grupo alquilo C₁-C₈, (CH₂)_nOR' (em que n=1, 2, ou 3), CF₃, CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂X, CH₂-CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂-CH₂X (em que X=F, Cl, Br ou I), CN, (C=O)-R', N(R')₂, NO₂, (C=O)N(R')₂, O(CO)R', OR', SR', COOR', R_{fe}, CR'=CR'-R_{fe} e CR₂'=-CR₂'-R_{fe};

em que pelo menos um dos substituintes R^1-R^{10} é selecionado do grupo consistindo em 3H , ^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{76}Br , ^{75}Br , $CH_2-CH_2-X^*$, $O-CH_2-CH_2-X^*$, $CH_2-CH_2-CH_2-X^*$, $O-CH_2-CH_2-CH_2-X^*$ (em que $X^* = ^{131}I$, ^{123}I , ^{76}Br , ^{75}Br ou ^{18}F), ^{19}F , um substituinte contendo um carbono selecionado de um grupo consistindo em alquilo C_1-C_8 , $(CH_2)_nOR'$, CF_3 , CH_2-CH_2X , OCH_2-CH_2X , $CH_2-CH_2-CH_2X$, $O-CH_2-CH_2-CH_2X$ (em que $X=F$, Cl , Br ou I), CN , $(C=O)-R'$, $(C=O)N(R')_2$, $O(CO)R'$, $COOR'$, $CR'=CR'-R_{fe}$ e $CR_2'=CR_2'-R_{fe}$ em que pelo menos um carbono é ^{11}C , ^{13}C ou ^{14}C e um grupo quelante (com grupo metálico quelado) da forma $W-L^*$ ou $V-W-L^*$, em que V é selecionado do grupo consistindo em $-COO-$, $-CO-$, $-CH_2O-$ e $-CH_2NH-$; W é $-(CH_2)_n$ onde $n=0,1,2,3,4$, ou 5; e L^* é:



em que M^* é ^{99m}Tc ;

ou L^* é:



e em que R^{15} independentemente é selecionado dos seguintes:

H ,



tendo pelo menos um dos substituintes R^3-R^{10} selecionados do grupo consistindo em ^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{76}Br , ^{75}Br , ^{18}F , e ^{19}F , compreendendo o passo de marcação de um composto como definido antes, em que pelo menos um dos substituintes R^3-R^{10} é um estanho tri-alquilo, pela reação do composto com uma substância contendo ^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{76}Br , ^{75}Br , ^{18}F , ou ^{19}F .

Numa forma de realização adicional, a invenção relaciona-se com um método *in vivo* para detetar depósitos amiloïdes num sujeito, compreendendo os passos de: (a) administrar uma quantidade detetável de uma composição farmacêutica compreendendo (a) um composto de ligação à amiloide como preparado acima ou um seu sal solúvel em água, não tóxico, e (b) um transportador farmaceuticamente aceitável, e

(b) detetar a ligação do composto ao depósito amiloide no sujeito.

Num aspeto preferencial desta forma de realização, o depósito amiloïde está localizado no cérebro de um sujeito. Num aspeto particularmente preferencial desta forma de realização, o sujeito é suspeito de ter uma doença ou síndrome selecionados do grupo consistindo em Doença de Alzheimer, Doença de Alzheimer familiar, Síndrome de Down e homozigotos para o alelo E4 da apolipoproteína. Noutro aspeto particularmente preferencial desta forma de realização, a deteção é selecionada do grupo consistindo de imagiologia de raios gama, imagiologia por ressonância magnética e espetroscopia por ressonância magnética. Num

aspeto preferencial desta forma de realização, a imagiologia de raios gama é PET ou TCEFU. Num outro aspetto preferencial desta forma de realização, a composição farmacêutica é administrada por injeção intravenosa. Num outro aspetto preferencial desta forma de realização, a razão da (i) ligação do composto a uma área do cérebro excetuando o cerebelo à (ii) ligação do composto ao cerebelo, num sujeito, é comparada à razão num sujeito normal.

Outra forma de realização relaciona-se com um método de deteção de depósitos amiloïdes na biopsia ou em tecido *post mortem* humano ou animal compreendendo os passos de: (a) incubar tecido fixo em formalina ou congelado fresco com uma solução de um composto de ligação à amiloide como preparado acima para formar um depósito marcado e depois, (b) detetar os depósitos marcados. Num aspetto preferencial desta forma de realização, a solução é composta por 25-100% de etanol, com o restante da solução sendo água, em que a solução está saturada com um composto de ligação à amiloide de acordo com a presente invenção. Num aspetto particularmente preferencial desta forma de realização, a solução é composta por um tampão aquoso (tais como tris ou fosfato) contendo 0-50% de etanol, em que a solução contém 0,0001 a 100 μM de um composto de ligação à amiloide de acordo com a presente invenção. Num aspetto particularmente preferencial desta forma de realização, a deteção é efetuada por técnicas microscópicas selecionadas do grupo consistindo em microscopia sobre fundo claro, de fluorescência, laser confocal, e por polarização cruzada.

Uma forma de realização adicional relaciona-se com um método para quantificar a quantidade de amiloide na biopsia ou em tecido *post mortem* compreendendo os passos de: a) incubar um derivado radiomarcado de um composto de ligação

à amiloide como preparado acima com um homogeneizado na biopsia ou tecido *post mortem* b) separar o derivado radiomarcado ligado ao tecido do não ligado ao tecido de um composto de ligação à amiloide da presente invenção, c) quantificar o derivado radiomarcado ligado ao tecido de um composto de ligação à amiloide da presente invenção, e d) converter as unidades do derivado radiomarcado ligado ao tecido de um composto de ligação à amiloide da presente invenção às unidades de microgramas de amiloide por 100 mg de tecido por comparação com um padrão.

Outra forma de realização relaciona-se com um método para distinguir um cérebro com doença de Alzheimer de um cérebro normal compreendendo os passos de: a) incubar tecido (i) do cerebelo e (ii) de outra área do mesmo cérebro excetuando o cerebelo, de sujeitos normais e de sujeitos suspeitos de ter doença de Alzheimer com um composto de ligação à amiloide como preparado acima tal que a amiloide no tecido se ligue ao derivado radiomarcado de um composto de ligação à amiloide da presente invenção; b) quantificar a quantidade de amiloide ligada ao derivado radiomarcado de um composto de ligação à amiloide da presente invenção de acordo com o método recitado acima; c) calcular a razão da quantidade de amiloide na área do cérebro excetuando o cerebelo e da quantidade de amiloide no cerebelo; d) comparar a razão da quantidade de amiloide em tecido de sujeitos normais com a razão da quantidade de amiloide em tecido de sujeitos suspeitos de ter doença de Alzheimer; e e) determinar a presença da doença de Alzheimer se a razão do cérebro de um sujeito suspeito de ter a doença de Alzheimer é maior do que 90% das razões obtidas dos cérebros de sujeitos normais.

Outras formas de realização da invenção serão aparentes para aqueles peritos na técnica pela consideração da

especificação e prática da invenção divulgada aqui. Pretende-se que a especificação seja considerada como somente exemplar, com o verdadeiro âmbito da invenção estando indicado pelas seguintes reivindicações.

Breve descrição dos desenhos

Figura 1 Ilustra as estruturas de uma Tioflavina S e uma Tioflavina T;

Figura 2 Ilustra as estruturas de dois derivados de tioflavina de acordo com a invenção;

Figura 3 Ilustra quatro secções seriadas do córtex frontal do cérebro corado com fluorescente de um paciente com DA;

Figura 4 Ilustra locais propostos de ligação da Crisamina G e Tioflavina T em fibrilas em folha- β ;

Figura 5 Ilustra ensaio de competição usando Crisamina G, Tioflavina S e Tioflavina T, e derivados da presente invenção (BTA-0, BTA-1 e BTA-2);

Figura 6 Ilustra a radioatividade ao longo do tempo no córtex frontal de babuínos injetados com BTA-1, 6-Meo-BTA-1 e 6-Me-BTA-1; e

Figura 7 Ilustra uma imagem de tomografia por emissão de positrões de dois níveis de cérebro de babuíno depois da injeção i.v. de [N-metilo- ^{11}C]BTA-1.

Figura 8 Ilustra secções *post mortem* do cérebro humano e de camundongo transgénico coradas

com um derivado da presente invenção (BTA-1).

Figura 9 Ilustra a marcação *in vivo* das placas de amiloide e amiloide vascular coradas por um derivado da presente invenção (BTA-1) em camundongos transgénicos vivos visualizados com microscopia multifotónica.

Descrição detalhada da invenção

A presente invenção explora a faculdade dos compostos de Tioflavina e seus derivados radiomarcados em atravessar a barreira sangue cérebro *in vivo* e em se ligarem à A β depositada em placas neuríticas (mas não difusas), à A β depositada na amiloide cerebrovascular, e à amiloide consistindo na proteína depositada nos ENF. Os compostos presentes são derivados de amina não quaternária da Tioflavina S e T os quais são conhecidos por corar a amiloide em secções de tecido e por se ligarem à A β sintética *in vitro*. Kelenyi *J. Histochem. Cytochem.* 15: 172 (1967); Burns et al. *J. Path. Bact.* 94:337 (1967); Guntern et al. *Experientia* 48: 8 (1992); LeVine *Meth. Enzymol.* 309: 274 (1999).

Os derivados de tioflavina da presente invenção têm cada uma das características seguintes: (1) ligação específica à A β sintética *in vitro* e (2) faculdade para atravessar uma barreira sangue cérebro não comprometida *in vivo*.

Como usado aqui para descrever os derivados de tioflavina, "alquilo baixo" é uma cadeia C₁-C₈ ramificada ou linear, preferencialmente C₁-C₆ e mais preferencialmente C₁-C₄ (e.g., metilo, etilo, propilo ou butilo). Quando R¹-R¹⁴ é definido como "estanho tri-alquilo", a fração é uma fração

tri-C₁-C₈ alquilo Sn, preferencialmente fração tri-C₁-C₆ alquilo Sn, mais preferencialmente fração tri-C₁-C₄ alquilo Sn (e.g., metilo, etilo, propilo ou butilo).

O método desta invenção determina a presença e localização dos depósitos amiloides num órgão ou área do corpo, preferencialmente cérebro, de um paciente. O presente método compreende a administração de uma quantidade detetável de uma composição farmacêutica contendo um composto de ligação à amiloide como preparado acima, chamado um "composto detetável", ou um seu sal solúvel em água farmaceuticamente aceitável, a um paciente. Uma "quantidade detetável" significa que a quantidade do composto detetável que é administrada é suficiente para permitir a deteção da ligação do composto à amiloide. Uma "quantidade eficaz de para imagiologia" significa que a quantidade do composto detetável que é administrada é suficiente para permitir a imagiologia da ligação do composto à amiloide.

A invenção emprega sondas de amiloide as quais, em conjugação com técnicas de neuroimagiologia não invasivas tais como espetroscopia por ressonância magnética (ERM) ou imagiologia por ressonância magnética (IRM), ou imagiologia de raios gama tais como tomografia por emissão de positrões (TEP) ou tomografia computorizada por emissão de fotão único (TCEFU), são usadas para quantificar a deposição de amiloide *in vivo*. O termo "imagiologia *in vivo*" refere-se a qualquer método que permita a deteção de um derivado de tioflavina radiomarcado o qual é escolhido das estruturas A-E ou F-J, como definidas acima. Para a imagiologia de raios gama, a radiação emitida do órgão ou da área a ser examinada é medida e expressa quer como ligação total, quer como uma razão na qual a ligação total num tecido é normalizada à (por exemplo, dividida pela) ligação total

noutro tecido do mesmo sujeito durante o mesmo procedimento de imagiologia de raios gama. A ligação total *in vivo* é definida como o sinal inteiro detetado num tecido por uma técnica de imagiologia *in vivo* sem a necessidade de correção por uma segunda injeção de uma quantidade idêntica de composto marcado juntamente com um grande excesso de composto não marcado, mas de outra forma quimicamente idêntico. Um "sujeito" é um mamífero, preferencialmente um humano, e mais preferencialmente um humano suspeito de ter demência.

Para propósitos da imagiologia *in vivo*, o tipo de instrumento de deteção disponível é um fator importante na seleção de um dado marcador. Por exemplo, isótopos radioativos e ^{19}F são particularmente adequados para a imagiologia *in vivo* nos métodos da presente invenção. O tipo de instrumento usado irá guiar a seleção do radionuclídeo ou isótopo estável. Por exemplo, o radionuclídeo escolhido tem de ter um tipo de decaimento detetável por um dado tipo de instrumento. Outra consideração relaciona-se com a meia-vida do radionuclídeo. A meia-vida deve ser longa o suficiente para que seja ainda detetável no tempo de máxima captação pelo alvo, mas curta o suficiente para que o hospedeiro não sustente radiação deletéria. Os compostos radiomarcados da invenção podem ser detetados usando imagiologia de raios gama em que a irradiação gama emitida do comprimento de onda apropriado seja detetada. Métodos de imagiologia de raios gama incluem, mas não se limitam a, TCEFU e TEP. Preferencialmente, para a deteção por TCEFU, o radiomarcador escolhido não terá uma emissão de particulados, mas irá produzir um grande número de fotões numa gama de 140-220 keV. Para a deteção por TEP, o radiomarcador será um radionuclídeo emissor de positrões

tal como ^{19}F o qual se irá aniquilar para formar dois raios gama de 511 keV que serão detetados pela câmara de TEP.

Na presente invenção, são elaborados compostos/sondas de ligação à amiloide que são úteis para a imagiologia *in vivo* e quantificação da deposição amiloide. Estes compostos são para ser usados em conjunção com técnicas de neuroimagiologia não invasivas tais como espetroscopia por ressonância magnética (ERM) ou imagiologia por ressonância magnética (IRM), tomografia por emissão de positrões (TEP), e tomografia computorizada por emissão de fotão único (TCEFU). De acordo com esta invenção, os derivados de tioflavina podem ser marcados com ^{19}F ou ^{13}C para ERM/IRM por técnicas gerais de química orgânica conhecidas na técnica. Ver, e.g., March, *J. ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY: REACTIONS, MECHANISMS, AND STRUCTURE* (3^a Edição, 1985). Os derivados de tioflavina podem também ser radiomarcados com ^{18}F , ^{11}C , ^{75}Br , ou ^{76}Br para TEP por técnicas bem conhecidas na técnica e são descritas por Fowler, J. e Wolf, A. em *POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY AND AUTORADIOGRAPHY* (Phelps, M., Mazziota, J., and Schelbert, H. eds.) 391-450 (Raven Press, NY 1986). Os derivados de tioflavina podem também ser radiomarcados com ^{123}I para TCEFU por qualquer das várias técnicas conhecidas na técnica. Ver, e.g., Kulkarni, *Int. J. Rad. Appl. & Inst.* (Parte B) 18: 647 (1991). Além disso, os derivados de tioflavina podem ser marcados com qualquer isótopo de iodo radioativo adequado, tais como, mas não se limitando a, ^{131}I , ^{125}I , ou ^{123}I , por iodação de um derivado de amino diazotizado diretamente através de um iodeto de diazónio, ver Greenbaum, *F. Am. J. Pharm.* 108: 17 (1936), ou por conversão da amina diazotizada instável ao triazeno estável, ou pela conversão do precursor halogenado não radioativo a um derivado de estanho tri-alquilo estável o qual depois pode ser convertido ao composto de iodo por vários métodos bem conhecidos na técnica. Ver, Satyamurthy

e Barrio *J. Org. Chem.* 48: 4394 (1983), Goodman et al., *J. Org. Chem.* 49: 2322 (1984), e Mathis et al., *J. Label Comp. And Radiopharm.* 1994: 905; Chumpradit et al., *J. Med. Chem.* 34: 877 (1991); Zhuang et al., *J. Med. Chem.* 37: 1406 (1994); Chumpradit et al., *J. Med. Chem.* 37: 4245 (1994). Por exemplo, um triazeno estável ou um derivado de estanho tri-alquilo da tioflavina ou seus análogos reage com um agente de halogenação contendo ^{131}I , ^{126}I , ^{123}I , ^{76}Br , ^{75}Br , ^{18}F ou ^{19}F . Portanto, os derivados de estanho tri-alquilo da tioflavina estáveis e seus análogos são precursores novos úteis para a síntese de muitos dos compostos radiomarcados no âmbito da presente invenção.

Os derivados de tioflavina podem também ser radiomarcados com radiomarcadores metálicos conhecidos, tal como Tecnécio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$). A modificação dos substituintes para introduzir ligandos que se ligam a tais iões metálicos pode ser efetuada sem experimentação indevida por um dos vulgares peritos na técnica de radiomarcação. O derivado de tioflavina radiomarcado com o metal pode então ser usado para detetar depósitos amiloides. A preparação de derivados radiomarcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é bem conhecida no estado da técnica. Ver, por exemplo, Zhuang et al., "Neutral and stereospecific Tc-99m complexes: [99mTc]N-benzyl-3,4-di-(N-2-mercaptopethyl)-amino-pyrrolidines (P-BAT)" *Nuclear Medicine & Biology* 26(2):217-24, (1999); Oya et al., "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 et al., "Technetium-99m-labeled receptor-specific small-molecule radiopharmaceuticals: recent developments and encouraging results" *Nuclear Medicine & Biology* 24(6):485-98, (1997).

Os métodos da presente invenção podem usar isótopos detetáveis por espetroscopia por ressonância magnética nuclear para propósitos de imagiologia e espetroscopia *in vivo*. Elementos particularmente úteis na espetroscopia por ressonância magnética incluem ^{19}F e ^{13}C .

Radioisótopos adequados para propósitos desta invenção incluem emissores beta, emissores gama, emissores de positrões, e emissores de raios X. Estes radioisótopos incluem ^{131}I , ^{123}I , ^{18}F , ^{11}C , ^{75}Br , e ^{76}Br . Isótopos estáveis adequados para uso na Imagiologia por Ressonância Magnética (IRM) ou Espetroscopia por Ressonância Magnética (ERM), de acordo com esta invenção, incluem ^{19}F e ^{13}C . Radioisótopos adequados para quantificação *in vitro* da amiloide em homogeneizados na biopsia ou em tecido *post mortem* incluem ^{125}I , ^{14}C , e ^3H . Os radiomarcadores preferenciais são ^{11}C ou ^{18}F para uso na imagiologia *in vivo* por PET, ^{123}I para uso na imagiologia de TCEFU, ^{19}F para ERM/IRM, e ^3H ou ^{14}C para estudos *in vitro*. No entanto, qualquer método convencional para visualização das sondas de diagnóstico pode ser utilizado de acordo com esta invenção.

O método pode ser usado para diagnosticar a DA em casos ligeira ou clinicamente confusos. Esta técnica permitiria também estudos longitudinais da deposição amiloide em populações humanas com alto risco para a deposição amiloide, tais como síndrome de Down, DA familiar, e homozigotos para o alelo E4 da apolipoproteína. Corder et al., *Science* 261: 921 (1993). Um método que permita que a sequência temporal da deposição amiloide seja seguida pode determinar se a deposição ocorre muito antes de a demência começar ou se a deposição não está relacionada com a demência. Este método pode ser usado para monitorizar a

eficácia das terapias direcionadas à prevenção da deposição amiloide.

Geralmente, a dosagem do derivado de tioflavina detetavelmente marcado irá variar dependendo de considerações tais como idade, condição, sexo e extensão da doença no paciente, contraindicações, se algumas, terapias concomitantes e outras variáveis, a serem ajustadas por um médico perito na técnica. A dosagem pode variar de 0,001 µg/kg a 10 µg/kg, preferencialmente 0,01 µg/kg a 1,0 µg/kg.

A administração ao sujeito pode ser local ou sistémica e realizada intravenosamente, intraarterialmente, intratecal (através do fluido raquidiano) ou similares. A administração podem também ser intradermal ou intracavitária, dependendo do local do corpo sob exame. Depois de um tempo suficiente ter decorrido para que o composto se ligue com a amiloide, por exemplo 30 minutos a 48 horas, a área do sujeito sob investigação é examinada por técnicas de imagiologia rotineiras tais como ERM/IRM, TCEFU, imagiologia de cintilação planar, TEP, e quaisquer técnicas de imagiologia emergentes, também. O protocolo exato irá necessariamente variar dependendo de fatores específicos do paciente, como mencionado acima, e dependendo do local do corpo sob exame, método de administração e tipo de marcador usado; a determinação dos procedimentos específicos será rotina para os especialistas peritos. Para a imagiologia do cérebro, preferencialmente, a quantidade (ligação total ou específica) de derivado de tioflavina radioativamente marcado ligado ou análogo da presente invenção é medida e comparada (como uma razão) com a quantidade de derivado de tioflavina marcado ligado ao cerebelo do paciente. Esta razão é então comparada com a mesma razão num cérebro normal com a mesma idade.

As composições farmacêuticas da presente invenção são vantajosamente administradas na forma de composições injetáveis, mas podem também ser formuladas em sistemas de distribuição de medicamentos bem conhecidos (e.g., oral, retal, parenteral (intravenoso, intramuscular, subcutâneo), intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, local (pós, pomadas ou gotas), ou como um pulverizador bucal ou nasal). Uma composição típica para tal propósito compreende um transportador farmaceuticamente aceitável. Por exemplo, a composição pode conter cerca de 10 mg de albumina do soro humano e de cerca de 0,5 a 500 microgramas do derivado de tioflavina marcado por mililitro de tampão fosfato contendo NaCl. Outros transportadores farmaceuticamente aceitáveis incluem soluções aquosas, excipientes não tóxicos, incluindo sais, conservantes, tampões e similares, como descrito, por exemplo, em *REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 15^a Ed. Easton: Mack Publishing Co. pp. 1405-1412 e 1461-1487 (1975) e *THE NATIONAL FORMULARY XIV.*, 14^a Ed. Washington: American Pharmaceutical Association (1975).

Exemplos de solventes não aquosos são propileno glicol, polietileno glicol, óleo vegetal e ésteres orgânicos injetáveis tal como oleato de etilo. Os transportadores aquosos incluem água, soluções alcoólicas/aquosas, soluções salinas, veículos parenterais tais como cloreto de sódio, dextrose de Ringer, etc. Os veículos intravenosos incluem reabastecedores de fluido e nutriente. Os conservantes incluem antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes e gases inertes. O pH e a concentração exata dos vários componentes da composição farmacêutica são ajustados de acordo com perícias de rotina na técnica. Ver, Goodman e Gilman's *THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICS* (7^a Ed.).

Composições farmacêuticas particularmente preferenciais da presente invenção são aquelas que, além de se ligaram especificamente à amiloide *in vivo* e capazes de atravessar a barreira sangue cérebro, são também não tóxicas a níveis de dosagem apropriados e têm uma duração satisfatória do efeito.

De acordo com a presente invenção, uma composição farmacêutica compreendendo compostos de tioflavina que se ligam à amiloide, é administrada a sujeitos nos quais a formação da amiloide ou das fibrilas de amiloide é antecipada. Na forma de realização preferencial, tal sujeito é um humano e inclui, por exemplo, aqueles que estão em risco de desenvolver amiloide cerebral, incluindo a população idosa, não demente e pacientes tendo doenças associadas à amiloidose e diabetes mellitus Tipo 2. O termo "prevenindo" destina-se a incluir a melhoria da degeneração celular e toxicidade associadas com a formação de fibrilas. Por "melhoria" entende-se o tratamento ou prevenção das formas mais severas da degeneração celular e toxicidade em pacientes manifestando já sinais de toxicidade, tal como demência.

A composição farmacêutica compreende compostos de tioflavina que se ligam à amiloide descritos acima e um transportador farmaceuticamente aceitável. Numa forma de realização, tal composição farmacêutica compreende albumina do soro, compostos de tioflavina que se ligam à amiloide e um tampão fosfato contendo NaCl. Outros transportadores farmaceuticamente aceitáveis incluem soluções aquosas, excipientes não tóxicos, incluindo sais, conservantes, tampões e similares, como descrito, por exemplo, em *REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 15^a Ed. Easton: Mack Publishing Co. pp. 1405-1412 e 1461-1487 (1975) e *THE NATIONAL FORMULARY XIV.*, 14^a Ed. Washington: American

Pharmaceutical Association (1975) e *the UNITED STATES PHARMACOPEIA XVIII.* 18^a Ed. Washington: American Pharmaceutical Association (1995) os conteúdos dos quais são deste modo incorporados por referência.

Exemplos de solventes não aquosos são propileno glicol, polietileno glicol, óleo vegetal e ésteres orgânicos injetáveis tal como oleato de etilo. Os transportadores aquosos incluem água, soluções alcoólicas/aquosas, soluções salinas, veículos parenterais tais como cloreto de sódio, dextrose de Ringer, etc. Os veículos intravenosos incluem reabastecedores de fluido e nutriente. Os conservantes incluem antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes e gases inertes. O pH e a concentração exata dos vários componentes da composição farmacêutica são ajustados de acordo com perícias de rotina na técnica. Ver, Goodman e Gilman's *THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICS* (7^a Ed.).

De acordo com a invenção, a composição farmacêutica inventiva poderia ser administrada oralmente, na forma de um líquido ou de um sólido, ou injetada intravenosamente ou intramuscularmente, na forma de uma suspensão ou de uma solução. Pelo termo "quantidade farmaceuticamente eficaz" entende-se uma quantidade que previne a degeneração celular e toxicidade associadas com a formação de fibrilas. Tal quantidade iria necessariamente variar dependendo da idade, peso e condição do paciente e seria ajustada por aqueles vulgares peritos na técnica de acordo com protocolos bem conhecidos. Numa forma de realização, a dosagem seria entre 0,1 e 100 mg/kg por dia, ou dividida em dosagens mais pequenas a serem administradas duas a quatro vezes por dia. Tal regime seria continuado numa base diária para a vida do paciente. Alternativamente, a composição farmacêutica

poderia ser administrada intramuscularmente em dosagens de 0,1 a 100 mg/kg cada uma a seis semanas.

De acordo com o aspetto da invenção descrito acima que se relaciona com um método de deteção dos depósitos amiloïdes na biopsia ou tecido *post mortem*, o método envolve incubar tecido fixo em formalina com uma solução de um composto de tioflavina de ligação à amiloide como preparado acima. Preferencialmente, a solução é 25-100% de etanol (com o restante sendo água), saturada com um composto de tioflavina de ligação à amiloide de acordo com a invenção. Após a incubação, o composto cora ou marca o depósito amiloide no tecido, e o depósito corado ou marcado pode ser detetado ou visualizado por qualquer método padrão. Tais meios de deteção incluem técnicas microscópicas tais como microscopia sobre fundo claro, de fluorescência, laser confocal, e por polarização cruzada.

O método de quantificação da quantidade de amiloide na biopsia ou em tecido *post mortem* envolve incubar um derivado marcado de tioflavina de acordo com a presente invenção, ou um seu sal solúvel em água, não tóxico, com um homogeneizado na biopsia ou em tecido *post mortem*. O tecido é obtido e homogeneizado por métodos bem conhecidos na técnica. O marcador preferencial é um radiomarcador, embora outros marcadores tais como enzimas, compostos quimioluminescentes e imunofluorescentes são bem conhecidos dos especialistas peritos. O marcador preferencial é ^{125}I , ^{14}C ou ^3H , o substituinte de marcador preferencial de um composto de ligação à amiloide é pelo menos um de R^3-R^{10} . O tecido contendo os depósitos amiloïdes irá ligar-se aos derivados marcados dos compostos de tioflavina de ligação à amiloide da presente invenção. O tecido ligado é então separado do tecido não ligado por qualquer mecanismo conhecido do especialista perito, tal como filtração. O

tecido ligado pode então ser quantificado através de quaisquer meios conhecidos do especialista perito. As unidades do derivado de tioflavina radiomarcado ligado ao tecido são então convertidas às unidades de microgramas de amiloide por 100 mg de tecido por comparação com uma curva padrão gerada pela incubação de quantidades conhecidas de amiloide com o derivado de tioflavina radiomarcado.

O método de distinção de um cérebro doente com Alzheimer de um cérebro normal envolve a obtenção de tecido (i) do cerebelo e (ii) de outra área do mesmo cérebro, excetuando o cerebelo, de sujeitos normais e de sujeitos suspeitos de ter doença de Alzheimer. Tais tecidos são elaborados em homogeneizados separados usando métodos bem conhecidos do especialista perito, e então são incubados com um composto radiomarcado de tioflavina de ligação à amiloide. A quantidade de tecido que se liga ao composto radiomarcado de tioflavina de ligação à amiloide é então calculada para cada tipo de tecido (e.g., cerebelo, não cerebelo, normal, anormal) e a razão para a ligação de tecido do cerebelo e do tecido não do cerebelo é calculada para o tecido de pacientes normais e para o tecido de pacientes suspeitos de ter doença de Alzheimer. Estas razões são então comparadas. Se a razão do cérebro suspeito de ter doença de Alzheimer é maior do que 90% das razões obtidas dos cérebros normais, é feito o diagnóstico da doença de Alzheimer. As razões normais podem ser obtidas de dados previamente obtidos, ou alternativamente, podem ser recalculadas ao mesmo tempo que o tecido do cérebro suspeito é estudado.

Modelação Molecular

A modelação molecular foi feita usando o programa de modelação de computador Alchemy2000 Tripost, Inc. St. Louis, MO) para gerar as cadeias peptídicas da A β na conformação de folha-beta antiparalela. Kirschner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 83: 503 (1986). Os péptidos

da amiloide foram colocados em laços em grampo (Hilbich et al., *J. Mol. Biol.* 218: 149 (1991)) e usados sem mais refinamento estrutural. Os péptidos da A β foram alinhados de modo a que as cadeias alternadas estivessem espaçadas de 4,76 Å entre si, característica das fibrilas em folha-beta. Kirschner, *supra*. Os derivados de Tioflavina T foram minimizados energeticamente e alinhados com o modelo de fibrila para maximizar o contacto com Asp-23/Gln-15/His-13 da A β (1-42).

Caracterização da Ligação Específica ao Péptido Sintético da A β : Afinidade, Cinética, Ligação Máxima

As características da ligação dos derivados de tioflavina foram analisadas usando A β sintética (1-40) e 2-(4'-[11C]metilamino-fenilo)-benzotiazol ([N-metilo-11C]BTA-1) em salino tamponizado com fosfato (pH 7,0) ou tampão de glicina/20% etanol (pH 8,0) como previamente descrito para a ligação da Crisamina G. Klunk et al. *Neurobiol. Aging* 15: 691 (1994).

A sequência de aminoácidos para a A β (1-40) é a seguinte:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
As p	Al a	Gl u	Ph e	Ar g	Hi s	As p	Se r	Gl y	Ty r	Gl u	Va l
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Hi s	Hi s	Gl n	Ly s	Le u	Va l	Ph e	Ph e	Al a	Gl u	As p	Va l
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Gl Y	Se r	As n	Ly s	Gl Y	Al a	Il e	Il e	Gl Y	Le u	Me t	Va l
37	38	39	40								
Gl Y	Gl Y	Va l	Va l								

Preparação dos Derivados de Tioflavina para Coloração do Tecido

Ambas as Tioflavina S (TS) e Tioflavina T (TT) foram utilizadas como farmacóforos (ver, e.g., Fig. 1). É de notar que ambos os compostos contém aminas quaternárias e são, assim, muito hidrofílicos como resultado.

A [C-14]TT foi sintetizada e usada para determinar a lipofilicidade relativa dividindo entre octanol e salino tamponizado com fosfato. O log do coeficiente de partição, $\log P_{\text{oct}}$, verificou-se ser 0,57 para a [C-14]TT. Foi determinado que a amina quaternária torna a TT muito polar para uso como um agente de imagiologia do cérebro eficaz. Baseando-se nos resultados dos derivados de vermelho do Congo lipofílicos (fenóis não carregados a pH fisiológico, mas potencialmente ionizáveis com um pK_a de ~8,5) (Klunk et al. WO09634853A1, WO09847969A1, WO09924394A2), os

inventores removeram o grupo metilo do nitrogénio do benzotiazol para os derivados de TT. A remoção da fração de metilo eliminou a amina quaternária carregada da porção do heterocíclico da molécula, deixando uma amina aromática a qual tipicamente tem valores de pK_b de ~5,5. É usada nomenclatura abreviada para os derivados de TT em que a espinha dorsal básica é designada BTA (para **Benzotiazol-Anilina**). Os substituintes no anel do benzotiazol são colocados antes do "B" e o número de grupos metilo no nitrogénio da anilina é colocado depois do "A" (ver, e.g., Fig. 2).

i. Coloração Preliminar do Tecido com TT e Derivados

A TT (ver, e.g., Fig. 1) é um corante fluorescente que tem sido usado como um corante histológico (Burns et al., "The specificity of the staining of amyloid deposits with thioflavine T" *Journal of Pathology & Bacteriology* 94:337-344; 1967.). A TT cora fracamente placas (ver, e.g., Fig. 3), emaranhados, filamentos de neurópilos e amiloide cerebrovascular (ACV) no cérebro com DA. A coloração preliminar do tecido mostra que quer a amina primária 2-(4'-aminofenilo)-6-metilo-benzotiazol (6-Me-BTA-0), quer a amina terciária 2-(4'-dimetiloaminofenilo)-6-metilo-benzotiazol (6-Me-BTA-2) também coram placas e emaranhados no cérebro com DA *post mortem* (ver, e.g., Fig. 3). Experiências nas quais as concentrações de 6-Me-BTA-0 e 6-Me-BTA-2 eram progressivamente diminuídas mostraram que a coloração quer pela 6-Me-BTA-0, quer pela 6-Me-BTA-1 podia ainda ser detetada com soluções de coloração contendo somente 10 nM do composto de BTA. Em contraste, o BTF (2-fenilobenzotiazol) não parece corar as placas, no entanto, este composto não é tão fluorescente como os derivados de BTA. Portanto, no desenvolvimento destes compostos, a coloração do tecido tem servido o duplo propósito de

avaliar a especificidade da coloração em tecido do cérebro com DA bem como de avaliar a afinidade de ligação pelo rastreio de soluções de coloração ao longo de uma gama de concentrações similares às empregues nos ensaios de ligação.

ii. Modelos de Ligação dos Derivados de Vermelho do Congo e TT à A_β

Existem algumas teorias sobre o mecanismo de ligação da TT à β-amiloide, mas nenhuma teoria específica tem sido provada ou aceite. No entanto, o mecanismo parece ser específico e saturável (LeVine, "Quantification of betasheet amyloid fibril structures with thioflavin T" *Meth. Enzymol.* 309:272-284;1999). Portanto, deveria ser possível localizar o(s) potencial(ais) local(ais) de ligação na A_β e desenvolver um modelo de ligação de uma maneira análoga àquela usada para desenvolver o modelo de ligação vermelho do Congo (VC)/Crisamina-G (CG) (Klunk et al., "Developments of small molecule probes for the betaamyloid protein of Alzheimer's disease" *Neurobiol. Aging* 15:691-698;1994.) baseado nas seguintes propriedades estruturais e de ligação. Primeiro, a TT e a CG têm cargas opostas a pH fisiológico, e não é provável que elas partilhem um local de ligação comum. Isto é suportado pela falta de competição da TT para a ligação de [³H]CG às fibrilas de A_β (ver, e.g., Fig. 5).

Estudos estruturais prévios de fibrilas de A_β (Hilbich et al., "Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid beta A4 peptides of Alzheimer's disease" *Journal of Molecular Biology* 218:149-63;1991.) e da ligação do VC e da CG às fibrilas de A_β sugeriram um modelo molecular no qual a CG se liga através de uma combinação de interação eletrostática e hidrofóbica à área de Lys-16 (ver, e.g.,

Fig. 4). Os estudos de LeVine (LeVine *ibid*) ajudaram a localizar o local da ligação da TT à A β mostrando que a TT se liga bem à β A12-28, mas negligentemente à A β 25-35. Isto sugere que o local de ligação da TT se situa algures entre os resíduos 12 e 24 da A β . É provável que a TT positivamente carregada (uma amina quaternária) irá ser atraída aos resíduos negativamente carregados (ácidos) na A β . Entre os aminoácidos 12 e 24, os únicos resíduos ácidos são Glu-22 e Asp-23. Enquanto ambos são candidatos, o modelo existente prevê que Glu-22 esteja envolvida muito perto do local de ligação de Lys-16 para a CG. O modelo "de trabalho" corrente localiza a ligação da TT à área de Asp-23 no lado oposto da fibrila do local de CG proposto. Uma vez que o elemento-chave da ligação da TT (e da CG) é a presença de uma fibrila em folha-beta, a ligação tem que requerer mais do que somente um resíduo de aminoácido único. O local de ligação existe quando resíduos que normalmente não interagem em monómeros são reunidos na fibrila em folha-beta. Assim sendo, sem estar vinculado a qualquer uma teoria, acredita-se que a TT também interage através das ligações de hidrogénio com His-13 e Gln-15 de uma molécula separada, adjacente à A β compreendendo a fibrila em folha-beta.

iii. Radiomarcação da TT e Ensaios de Ligação de Radioligandos

A avaliação da ligação por coloração do tecido é útil, particularmente para a avaliação da especificidade. O composto BTF, o qual não é muito fluorescente, pode não mostrar coloração quer porque não se liga suficientemente bem, quer porque não é suficientemente fluorescente. Além da coloração do tecido com DA, podem ser conduzidos espetrofotometricamente ensaios de ligação quantitativos (LeVine *ibid*). Este ensaio depende da mudança espectral metacromática que ocorre quando a TT se liga à fibrila de

amiloide. Enquanto este ensaio pode ser útil para compostos altamente fluorescentes individualmente rastreados que mostram esta mudança metacromática, não foi determinado ser útil para ensaios de competição. Por exemplo, é comumente observado que os compostos do teste (e.g., CG) extinguem a fluorescência do complexo TT- $\text{A}\beta$ (bem como da TT sozinha). Compostos que extinguem, mas não se ligam ao local da TT, irão falsamente parecer que se ligam. Assim sendo, é preferível usar TT radiomarcada em ensaios de ligação da radioligandos típicos com $\text{A}\beta$ agregada. Neste ensaio, a inibição da ligação de TT radiomarcada à $\text{A}\beta$ presa em filtros representaria a verdadeira inibição da ligação da TT e não requer que o composto do teste seja altamente fluorescente.

Os exemplos seguintes são dados para ilustrar a presente invenção. Deve ser percebido, no entanto, que a invenção não se limita às condições ou detalhes específicos descritos nestes exemplos.

Os exemplos 1, 2 e 5 não formam parte da invenção reivindicada.

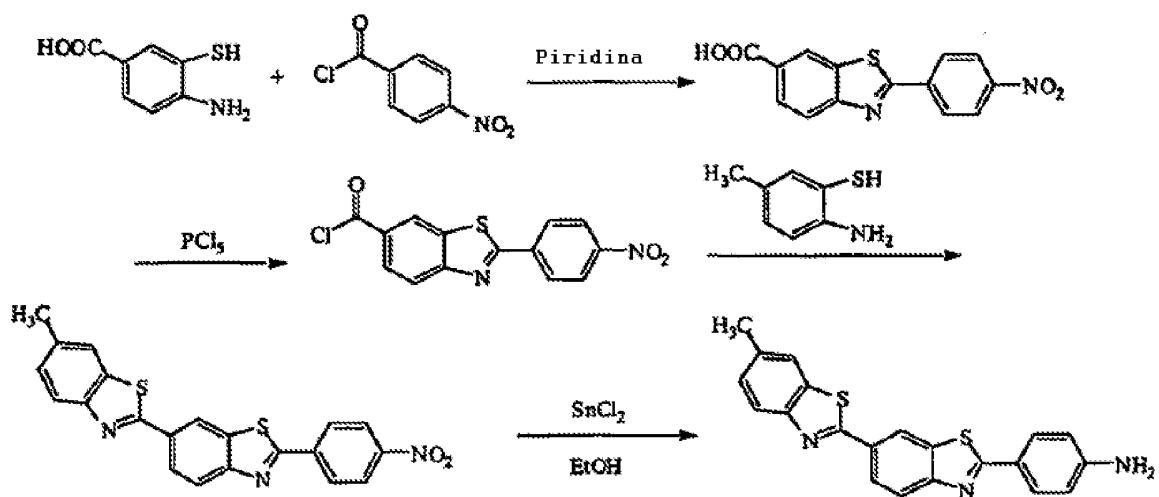
EXEMPLOS

Todos os reagentes usados na síntese foram adquiridos da Aldrich Chemical Company e usados sem purificação adicional. Os pontos de fusão foram determinados no Mel-Temp II e não foram corrigidos. Os espetros de ^1H RMN de todos os compostos foram medidos no Bruker 300 usando TMS como referência interna e estavam de acordo com as estruturas atribuídas. A CCF foi realizada usando Sílica Gek 60 F₂₅₄ da EM Sciences e detetada sob lâmpada UV. A cromatografia flash foi realizada em sílica gel 60 (malha 230-400) adquirida da Mallinckrodt Company. A CCF de fase reversa foi adquirida da Whiteman Company.

Exemplos de Síntese

Exemplo 1: Síntese de derivados baseados na primulina:

Rota 1: O exemplo da síntese de compostos de Primulina é de acordo com o esquema de reação ilustrado abaixo:



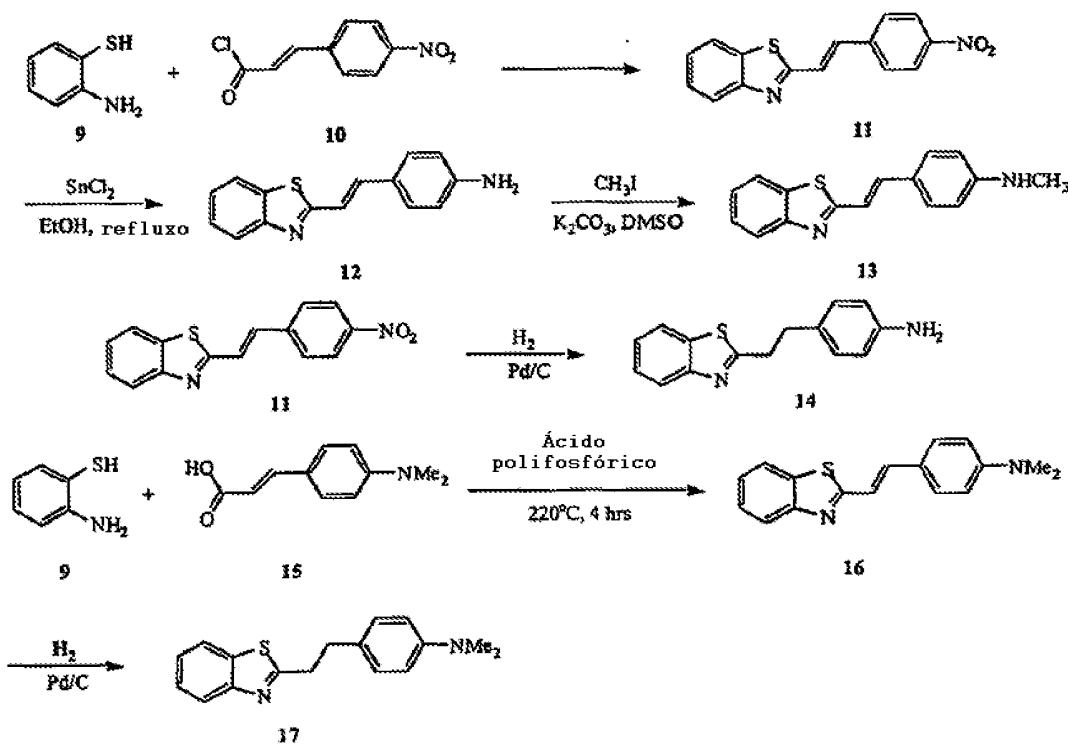
Os derivados de primulina são preparados baseando-se no método de Schubert (Schubert, M. *Zur Kenntnis der Dehydrothiotolidin- and Primulin-sulfosäuren, Justus Liebigs Ann. Chem.* 558, 10-33, 1947) através da condensação de 2-amino-5-metilotiofenol com cloreto de 2-(p-nitrofenilo)-benzotiazol-6-carboxílico e subsequente redução do grupo nitro com cloreto de estanho em etanol. Os derivados substituídos da base de primulina são sintetizados com os cloretos de p-nitrobenzoílo substituídos e 2-aminotiofenol substituídos com R⁷-R¹⁰ apropriados.

Seguindo a mesma estratégia como acima, os outros derivados de primulina reivindicados podem ser sintetizados substituindo o derivado do ácido 3-mercaptop-4-aminobenzoico substituído apropriado (e.g. ácido 2-, 5-, ou 6-metilo-3-

mercapto-4-aminobenzoico), o derivado do cloreto de 4-nitro-benzoílo apropriado (e.g. cloreto de 2- ou 3-metilo-4-nitro-benzoílo) ou o derivado de 2-amino-5-metilotiofenol apropriado (e.g. 3,5-, 4,5-, ou 5,6-dimetilo-2-aminotiofenol).

Exemplo 2: Síntese de derivados de 2-[2-(4'-aminofenilo)-etilenilo]-benzotiazol

Rota 3: O exemplo da síntese de BTEA-0, 1, 2 e BTAA-0, 1, 2, os quais são representativos do grupo de compostos de BTEA e BTAA foi de acordo com o esquema de reação ilustrado abaixo:



(a) *Trans*-2-(4-Nitrofeniloetilenilo)benzotiazol (11)

O cloreto de *trans*-4-Nitrocinnamilo **10** (1,77 g, 9,5 mmol, 1,2 eq.) em DMF (20 mL) foi adicionado a uma solução de 2-aminotiofenol **9** (1,0 g, 8,0 mmol) em DMF (15 mL) à temperatura ambiente. A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. A mistura reacional

foi vertida numa solução de 10% de carbonato de sódio (100 mL). O participado foi recolhido por filtração sob pressão reduzida. A recristalização a partir do metanol deu 1,95 g (85,1%) do produto **11**.

(b) 2-(4-Aminofeniloetilenilo)benzotiazol (12)

Uma mistura de 2-(4-nitrofeniloetilenilo) **11** (500 mg, 1,7 mmol) e cloreto de estanho (II) di-hidratado (1,18 g, 5,2 mmol) em etanol anidro (20 mL) foi submetida a refluxo sob atmosfera de N₂ durante 4 hrs. O etanol foi removido por evaporação no vácuo. O resíduo foi dissolvido em acetato de etilo (20 mL), lavado com solução de NaOH (1 N, 3x20 mL) e água (3x20 mL), e seco sobre MgSO₄. A evaporação até à secura deu 40 mg (8,0%) de produto **12**.

(c) 2-(4-Metilominofeniloetilenilo)benzotiazol (13)

Uma mistura de 2-(4-aminofeniloetilenilo) **12** (7 mg), Mel (3,9 mg) e K₂CO₃ anidro (100 mg) em DMSO (anidro, 0,5 mL) foi aquecida a 100°C durante 16 hrs. A mistura reacional foi purificada com CCF de fase reversa (MeOH:H₂O=7:1) para dar 2,5 mg (32,7%) do produto **13**.

(d) 2-(4-aminofeniloetileno)benzotiazol (14)

O 2-(4-Nitrofeniloetilenilo)benzotiazol (30 mg, 0,10 mL) foi dissolvido em MeOH (10 mL). Foi adicionado Pd/C (10%, 40 mg) e a mistura reacional foi agitada sob uma atmosfera de H₂ à temperatura ambiente durante 60 hrs. O catalisador foi filtrado e lavado com metanol (ca. 2 mL). A evaporação do filtrado deu o produto bruto o qual foi purificado com CCF (hexanos:acetato de etilo = 70:40) para dar 15 mg (50%) do produto. ¹HRMN (300MHz, MeOH-d₄) δ: 7,88 (d, J=8,3Hz, 1H, H-7), 7,86 (d, J = 8,1 Hz, 1H, H-4), 7,48 (dd, J₁ = J₂ = 6,2Hz, 1H, H-5 ou H-6), 7,38 (dd, J₁ = J₂ = 8,2Hz, 1H, H-5 ou H-6), 6,96 (d, J = 6,8Hz, 2H, H-2',6'), 6,62 (d, J =

6,8Hz, 2H, H-3', 5'), 3,36 (t, J = 7,4Hz, 2H, CH₂), 3,03 (t, J=7,4Hz, 2H, CH₂).

(e) 2-(4-Dimetiloaminofeniloetileno)benzotiazol (16)

Uma mistura de 2-aminotiofenol **9** (0,51 g, 4,1 mmol), ácido trans-4-dimetiloaminocinâmico **14** (0,79 g, 4,1 mmol) e AP (10 g) foi aquecida a 220°C durante 4 hrs. A mistura reacional foi arrefecida até à temperatura ambiente e vertida em 10% de solução de carbonato de potássio (~400 mL). O resíduo foi recolhido por filtração sob pressão reduzida. A purificação com coluna flush (hexanos: acetato de etilo =2:1) deu 560 mg (48,7%) do produto **15** como um sólido amarelo.

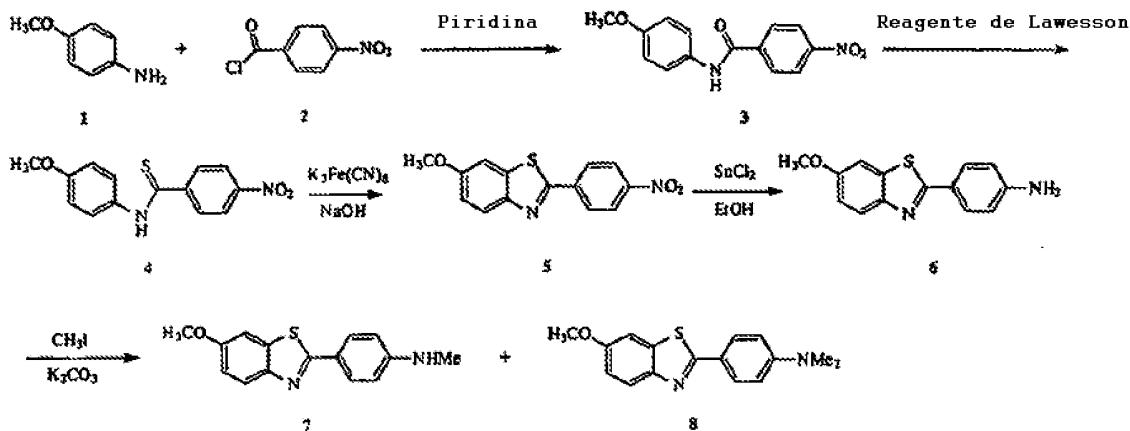
(f) 2-(4-Dimetiloaminofeniloetileno)benzotiazol (17)

O 2-(4-Dimetiloaminofeniloetilenilo)benzatiazol (12 mg, 0,038 mL) foi dissolvido em MeOH (5 mL). Foi adicionado Pd/C (10%, 20 mg) e a mistura reacional foi agitada sob uma atmosfera de H₂ à temperatura ambiente durante 16 hrs. O catalisador foi filtrado e lavado com metanol (ca. 1 mL). A evaporação do filtrado deu 7 mg (58%) do produto.
¹HRMN (300MHz, Acetona-d₆) δ: 7,97 (d, J=8,3Hz, 1H, H-7), 7,93 (d, J = 8,1 Hz, 1H, H-4), 7,48 (dt, J = 6,2Hz, J = 1,1Hz 1H, H-5 ou H-6), 7,38 (dt, J = 8,2Hz, J = 1,1Hz, 1H, H-5 ou H-6), 7,13 (d, J = 6,8Hz, 2H, H-2',6'), 6,68 (d, J = 6,8Hz, 2H, H-3', 5'), 3,37 (t, J = 7,4Hz, 2H, CH₂), 3,09 (t, J=7,4Hz, 2H, CH₂), 2,88 (s, 6H, NMe₂).

Exemplo 3: Síntese de derivados de 2-(4'-aminofenilo)-benzotiazol

Rota 1: Exemplo da síntese de 6-MeO-BTA-O, -1, -2, o qual é representativo do grupo de compostos de BTA com os substituintes R₇-R₁₀ bem como R₃-R₆ (Shi et al., "Antitumor Benzothiazoles. 3. Synthesis of 2-(4-Aminophenyl)benzothiazoles and Evaluation of Their

"Activities against Breast Cancer Cell Lines in Vitro and in Vivo" *J. Med. Chem.* 39:3375-3384, 1996):



(a) 4-Metoxi-4'-nitrobenzanilida (3)

A p-Anisidina **1** (1,0 g, 8,1 mmol) foi dissolvida em piridina anidra (15 mL), foi adicionado cloreto de 4-nitrobenzoílo **2** (1,5 g, 8,1 mmol). Permitiu-se que a mistura reacional ficasse à temperatura ambiente durante 16 hrs. A mistura reacional foi vertida em água e o precipitado foi recolhido com o filtrado sob pressão de vácuo e lavado com 5% de bicarbonato de sódio (2x10 mL). O produto **3** foi usado no passo seguinte sem purificação adicional. $^1\text{HRMN}$ (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).

(b) 4-Metoxi-4'-nitrotiobenzanilida (4)

Uma mistura de 4-metoxi-4'-nitrotiobenzanilida **3** (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 a refluxo durante 4 hrs. O solvente foi evaporado e o resíduo foi purificado com coluna flush (hexano: acetato de etilo =4:1) para dar 820 mg (77,4%) do produto **4** como um sólido de cor laranja. $^1\text{HRMN}$ (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), 3,808,37 (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).(s, 3H, MeO).

(c) 6-Metoxi-2-(4-nitrofenilo)benzotiazol (5)

As 4-Metoxi-4'-nitrotiobenzanilidas **4** (0,5 g, 1,74 mmol) foram molhadas com um pouco de etanol (~0,5 mL), e foi adicionada 30% de solução aquosa de hidróxido de sódio (556 mg, 13,9 mmol, 8 equiv.). A mistura foi diluída com água para proporcionar uma solução/suspensão final de 10% de hidróxido de sódio aquoso. Aliquotas desta mistura foram adicionadas a intervalos de 1 min a uma solução agitada 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 durante 0,5 h adicionais e então deixada a arrefecer. O participado foi recolhido por filtração sob pressão de vácuo e lavado com água, purificado com coluna flush (hexano: acetato de etilo =4:1) para dar 130 mg (26%) do produto **5**. $^1\text{HRMN}$ (300MHz, Acetona-d₆) 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).

(d) 6-Metoxi-2-(4-aminofenilo)benzotiazol (6)

Uma mistura de 6-metoxi-2-(4-nitrofenilo)benzotiazóis **5** (22 g, 0,077 mmol) e cloreto de estanho (II) di-hidratado (132 mg, 0,45 mmol) em etanol em ebulação foi agitada sob atmosfera de azoto durante 4 hrs. O etanol foi evaporado e o resíduo foi dissolvido em acetato de etilo (10 mL), lavado com 1 N de hidróxido de sódio (2 mL) e água (5 mL), e seco sobre MgSO₄. A evaporação do solvente deu 19 mg (97%) do produto **6** como sólido amarelo.

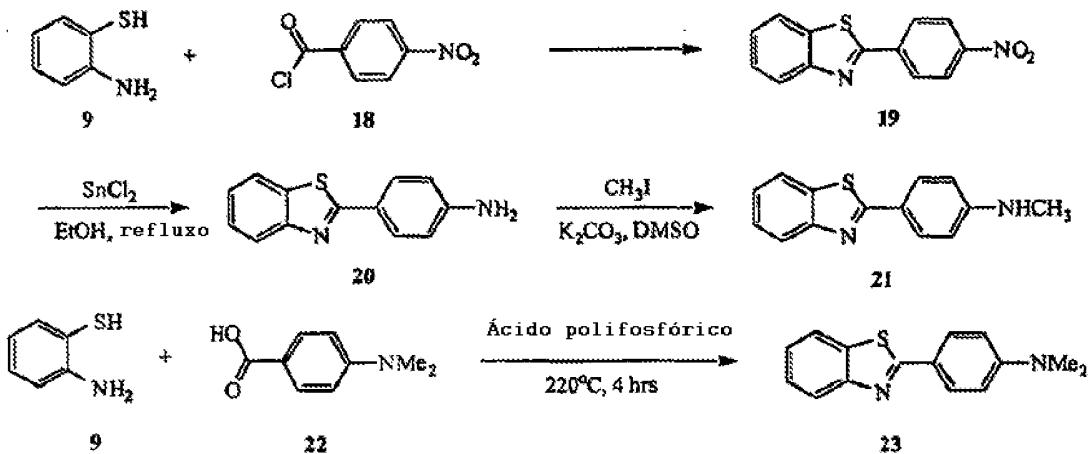
(e) 6-Metoxi-2-(4-metiloaminofenilo)benzotiazol (7) e 6-Metoxi-2-(4-dimetiloaminofenilo)benzotiazol (8)

Uma mistura de 6-metoxi-2-(4-aminofenilo)benzotiazol **6** (15 mg, 0,059 mmol), Mel (8,3 mg, 0,060 mmol) e K₂CO₃ (100 mg, 0,72 mmol) em DMSO (anidro, 0,5 mL) foi aquecida a 100°C durante 16 hrs. A mistura reacional foi purificada por CCF de fase reversa (MeOH:H₂O = 7:1) para dar 2,0 mg (13,3%) de 6-metoxi-2-(4-metiloaminofenilo)benzotiazol **7** e 6 mg (40%) de 6-metoxi-2-(4-dimetiloaminofenilo)benzotiazol **8**. ¹HRMN de **7** (300MHz, Acetona-d₆) δ: 7,85 (d, J=8,7Hz, 2H, H-2' 6'), 7,75 (dd, J = 8,8Hz, J = 1,3Hz, 1H, H-4), 7,49 (d, J = 2,4Hz, 1H, H-7), 7,01 (dd, J = 8,8Hz, J = 2,4Hz, H-5), 6,78 (d, J = 7,6Hz, 2H, H-3' 5'), 3,84 (s, 3H, MeO), 2,91 (s, 3H, NMe), ¹HRMN de **8** (300MHz, Acetona-d₆) δ: 7,85 (d, J = 8,7Hz, 2H, H-2' 6'), 7,75 (dd, J = 8,8Hz, J=1,3Hz, 1 H, H-4), 7,49 (d, J = 2,4Hz, 1H, H-7), 7,01 (dd, J = 8,8Hz, J = 2,4Hz, H-5), 6,78 (d, J = 7,6Hz, 2H, H-3' 5'), 3,84 (s, 3H, MeO), 3,01 (s, 6H, NMe₂).

Seguindo a mesma estratégia como acima, os outros derivados de 2-(4'-aminofenilo)-benzotiazol reivindicados podem ser sintetizados substituindo o derivado de anilina substituído apropriado (e.g. 2-, 3-, ou 4-metiloanilina) e o derivado de cloreto de 4-nitro-benzoílo apropriado (e.g. cloreto de 2- ou 3-metilo-4-nitro-benzoílo).

Exemplo 4: Síntese de derivados de BTA sem substituição de R⁷-R¹⁰

Rota 2: Exemplo da síntese de compostos de BTA-0, -1, -2, os quais são representativos do grupo de compostos de BTA sem R⁷-R¹⁰. (Garmaise et al., "Anthelmintic Quaternary Salts. III. Benzothiazolium Salts" *J. Med. Chem.* 12:30-36 1969):



(a) 2-(4-Nitrofenilo)benzotiazol (19)

Uma solução de cloreto de 4-nitrobenzoílo (1,49 g, 8,0 mmol) em benzeno (anidro, 10 mL) foi adicionada gota a gota ao 2-aminotiofenol (1,0 g, 8,0 mmol em 10 mL de benzeno) à temperatura ambiente. A mistura reacional foi deixada a agitar durante 16 hrs. A reação foi extinguida com água (20 mL). A camada aquosa foi separada e extraída com acetato de etilo (3x10 mL). As camadas orgânicas combinadas foram secas e evaporadas. O produto bruto foi purificado com coluna flush (hexano: acetato de etilo =85:15) para dar 1,5 g (73,2%) do produto como um sólido amarelo claro.

(b) 2-(4-Aminofenilo)benzotiazol (20)

Uma mistura de 2-(4-nitrofenilo)benzotiazol (105 mg, 0,10 mL) e cloreto de estanho (II) di-hidratado (205 mg, 0,91 mmol) em etanol (20 mL) foi submetida a refluxo sob atmosfera de N₂ durante 4 hrs. Depois da remoção do etanol por evaporação no vácuo, o resíduo foi dissolvido em acetato de etilo (20 mL), e lavado com solução de NaOH (1 N, 3x20 mL) e água (3x20mL), seco e evaporado até à secura para dar 102 mg (97%) do produto.

(c) 2-(4-Metiloaminofenilo)benzotiazol (21) e 2-(4-dimetiloaminofenilo)benzotiazol (23)

Uma mistura de 2-(4-aminofenilo)benzotiazol **20** (15 mg, 0,066 mmol), Mel (9,4 mg, 0,066 mmol) e K₂CO₃ (135 mg, 0,81 mmol) em DMSO (anidro, 0,5 mL) foi aquecida a 100°C durante 16 hrs. A mistura reacional foi purificada por CCF de fase reversa (MeOH:H₂O = 6:1) para dar 1,5 mg (10%) de 2-(4-metiloaminofenilo)benzotiazol **21** e 2,5 mg (16,7%) de 2-(4-dimetiloamino-fenilo)benzotiazol **23**.

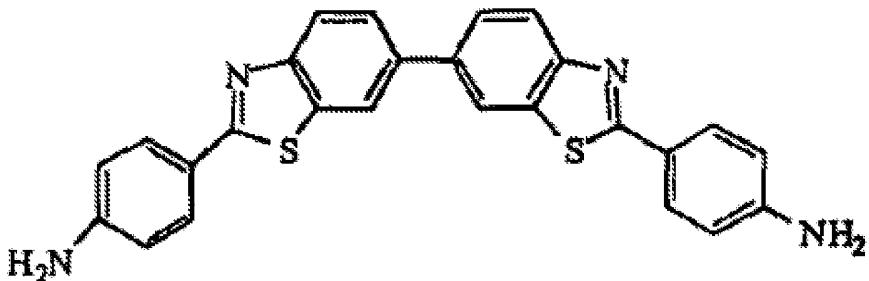
(d) 6-Metoxi-2-(4-aminofenilo)benzotiazol (6)

Uma mistura de 2-aminotiofenol **9** (0,5 g, 4,0 mmol), ácido 4-dimetiloaminobenzoico **22** (0,66 g, 4,0 mmol) e AP (10 g) foi aquecida a 220°C durante 4 hrs. A mistura reacional foi arrefecida até à temperatura ambiente e vertida em 10% de solução de carbonato de potássio (~400 mL). O resíduo foi recolhido por filtração sob pressão a vácuo para dar 964 mg do produto **23**, o qual era ca. 90% puro baseado na análise de ¹HRMN. A recristalização de 100 mg de **23** em MeOH deu 80 mg do produto puro. ¹HRMN (300MHz, Acetona-d₆) δ: 7,12 (d, J=7,7Hz, 1H, H-7), 7,01 (d, J=9,0Hz, 1H, H-4), 6,98 (d, J = 9,1Hz, 2H, H-2',6'), 6,56 (t, J = 7,8Hz, J=7,3Hz, 1H, H-5 ou H-6), 5,92 (d, J=8,9Hz, 1H, H-3',5'), 2,50 (s, 6H, NMe₂).

Seguindo a mesma estratégia como acima, os outros derivados de 2-(4'-aminofenilo)-benzotiazol reivindicados podem ser sintetizados substituindo o derivado do cloreto de 4-nitro-benzoílo apropriado (e.g. cloreto de 2- ou 3-metilo-4-nitro-benzoílo) ou o derivado do ácido 4-dimetilamino-benzoico apropriado (e.g. ácido 2- ou 3-metilo-4-dimetiloamino-benzoico).

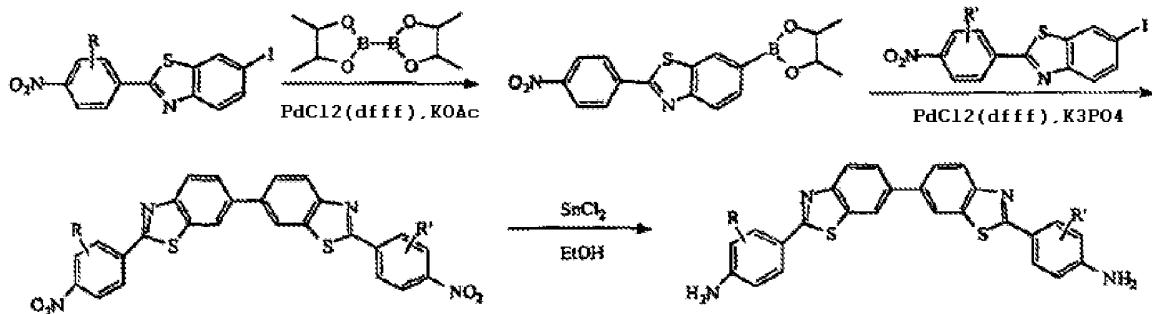
Exemplo 5: Síntese de derivados de bis-2,2'-(4'-aminofenilo)-dibenzotiazol

Rota 1: O seguimento do procedimento geral para os compostos de 6-MeO-BTA descritos acima mas substituindo a benzidina por p-anisidina e usando 16 equivalentes do cloreto de 4-nitrobenzoílo resulta no seguinte composto:



Seguindo a mesma estratégia como acima, os outros derivados de bis-2,2'-(4'-aminofenilo)-dibenzotiazol podem ser sintetizados através do derivado de benzidina substituído apropriado (e.g. 2,2'-, 3,3'-dimetilobenzidina) e do derivado do cloreto de 4-nitro-benzoílo apropriado (e.g. cloreto de 2- ou 3-metilo-4-nitro-benzoílo).

Rota 2: Os derivados não simétricos bis-2,2'-(4'-aminofenilo)-dibenzotiazol são sintetizados através da ligação de Suzuki catalisada por paládio dos 6-iodo-(2-p-nitrofenilo)benzotiazóis substituídos apropriados, os quais podem ser preparados seguindo a mesma estratégia dos compostos de 6-MeO-BTA e subsequente redução dos grupos nitro. (Ishiyama et al., "Palladium (0)-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Alkoxydiboron with Haloarenes: A Direct Procedure for Arylboronic Esters" *Tetrahedron Lett.*, 38, 3447, 1997).



Exemplos Biológicos

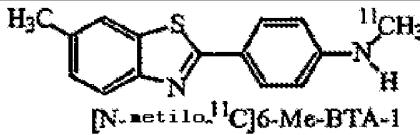
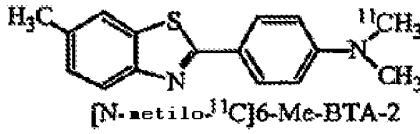
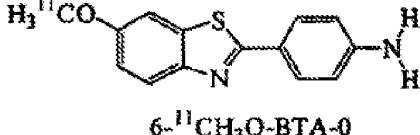
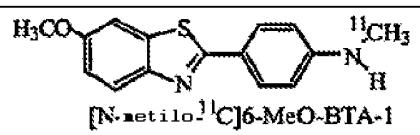
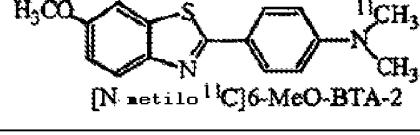
Exemplo 6: Determinação da Afinidade para a A_β e da Captação pelo Cérebro dos Derivados de Tioflavina

Estudos iniciais de ligação competitiva usando [³H]CG e A_β (1-40) sintética foram conduzidos para determinar se a CG, a TS e a TT se ligam ao(s) mesmo(s) local(ais). Tem sido determinado que a TS competia com a [³H]CG para os locais de ligação na A_β (1-40), mas a TT não (ver, e.g., Fig. 5). A [N-metilo-¹¹C]BTA-1 com alta atividade específica (ver Tabela 1) foi então sintetizada pela metilação de BTA-0. Foram realizados estudos de ligação com [N-metilo-¹¹C]BTA-1 e 200 nM de fibrilas de A_β (1-40). A ligação específica de [N-metilo-¹¹C]BTA-1 foi de ~70%. A Fig. 5 (ver painel do lado direito) ilustra as curvas de competição para os locais da A_β pela TT, BTA-0, BTA-1, e BTA-2 usando o ensaio de ligação da [N-metilo-¹¹C]BTA-1. As Ci foram: 3,0±0,8 nM para a BTA-2, 9,6±1,8 nM para a BTA-1; 100±16 nM para a BTA-0; e 1900±510 nM para a TT. Não só a amina quaternária da TT não é necessária para a ligação às fibrilas de A_β, ela parece diminuir a afinidade da ligação também.

Na Tabela 1 abaixo estão cinco diferentes derivados de BTA marcados com ¹¹C onde as suas propriedades de ligação *in vitro*, valores de logP, e as propriedades de captação e

retenção do cérebro *in vivo* em camundongos foram determinadas.

Tabela 1. Propriedades *in vitro* e *in vivo* de vários derivados de Tioflavina T marcados com ^{11}C promissores.

Estrutura do Composto de BTA marcado com ^{11}C	C_i (nM) às fibrilas de A β	logP	Captação pelo Cérebro de Camundongos @ 2 min (% DI/g*kg)	Captação pelo Cérebro de Camundongos @ 30 min (% DI/g*kg)	Razão dos Valores de Captação aos 2 min/30 min
	21	3,3 (est.)	0,32±0,07	0,17±0,05	1,9
	Não testado	3,9 (est.)	0,15±0,06	0,16±0,02	0,9
	30	1,9 (est.)	0,60±0,04	0,39±0,005	1,5
	5,7	2,7	0,43±0,11	0,094±0,038	4,6
	2,3	3,3 (est.)	0,32±0,09	0,42±0,10	0,8
	9,6	2,7	0,44±0,14	0,057±0,010	7,7

Os dados mostrados na Tabela 1 são notáveis, particularmente para os derivados de 6-MeO-BTA-1 e BTA-1 marcados com ^{11}C . Estes compostos apresentaram uma afinidade relativamente alta para a A β , com valores de $C_i < 10$ nM, e prontamente entraram no cérebro do camundongo com valores de captação $> 0,4\%$ DI/g*kg (ou $> 13\%$ DI/g para 30 g

de animais). Além disso, os valores de concentração da radioatividade no cérebro aos 30 min foram menores do que 0,1% DI/g*kg, resultando em razões de concentração dos 2 min aos 30 min >4. Ambos os compostos de N,N-dimetilo se depuraram menos rapidamente do tecido do cérebro do camundongo do que os derivados de N-metilo. Do mesmo modo, a única amina primária correntemente testável, 6-MeO-BTA-0, mostrou uma depuração do cérebro fraca. Este resultado surpreendente e inesperado suporta o uso específico da amina secundária (e.g. -NHCH₃) como um agente de imagiologia *in vivo*.

Exemplo 7: Experiências de Imagiologia de TEP *in vivo* em Babuínos

Grandes quantidades de BTA-1, 6-Me-BTA-1, e 6-MeO-BTA-1 marcadas com ¹¹³C com alta atividade específica (> 2000 Ci/mmol) foram preparadas para estudos de imagiologia do cérebro em 20-30 kg de babuínos anestesiados usando o tomógrafo Siemens/CTI HR+ no modo de recolha de dados em 3D (resolução LMA nominal de 4,5 mm). Os estudos de imagiologia do cérebro foram conduzidos após a injeção intravenosa de 3-5 mCi de radiotraçador. As curvas típicas tempo-atividade corrigidas para a atenuação e para o decaimento para uma região de interesse do córtex frontal para cada um dos três compostos são mostradas na Fig. 6. É de notar que a captação total pelo cérebro destes 3 compostos em babuínos é muito similar àquela em camundongos (i.e., cerca de 0,47 a 0,39% DI/g*kg). No entanto, a taxa de depuração normal do cérebro de todos os três radiotraçadores é consideravelmente mais lenta em babuínos comparada com a de camundongos, com razões pico-a-60 min na gama de 2,4 a 1,6 em comparação com as razões tão elevadas quanto 7,7 aos 30 min em camundongos. A ordem de classificação da captação e depuração máxima pelo cérebro dos três compostos foi também a mesma em camundongos e

babuínos. A captação pelo cérebro dos radiotraçadores não pareceu ser limitada pelo fluxo de sangue (Fig. 6, inserção). Foram obtidas amostras de sangue arterial nos babuínos depois da injeção de todos os três compostos, e mostraram que os seus perfis metabólicos eram muito similares. Somente metabólitos altamente polares que eluiram perto do volume de espaços vazios (4 mL) da coluna de CCF analítica de fase reversa foram observados no plasma em todos os pontos temporais depois da injeção, enquanto o traçador não metabolizado eluiu a cerca de 20 mL. Quantidades típicas do injetado não metabolizado no plasma para todos os três compostos foram cerca de: 90% aos 2 min; 35% aos 30 min; e 20% aos 60 min.

Imagens de TEP transversais em dois níveis do cérebro de babuíno depois da injeção i.v. de 3 mCi de N-metilo-¹¹C]BTA-1 são mostradas na Fig. 7. Os ficheiros de emissão recolhidos 5-15 min após a injeção foram resumidos para proporcionar as imagens. As regiões do cérebro incluem: Ctx (côrortex); Tl (tálamo); Occ (côrortex occipital); e Cer (cerebelo). Note-se a distribuição uniforme da radioatividade em todo o cérebro, indicando a ausência de especificidade de ligação regional no cérebro normal.

Exemplo 8: Coloração dos depósitos amiloides no cérebro de camundongo com DA e Tg post mortem

Secções de tecido do cérebro *post mortem* de cérebro com DA e um camundongo transgénico PSI/APP com 8 meses de idade [explicar o que este método está acostumado a mostrar] foram corados com BTA-1 não marcada. O modelo de camundongo PSI/APP combina duas mutações no gene humano conhecidas por causar a doença de Alzheimer num camundongo duplamente transgénico o qual deposita as fibrilas de A β nas placas de amiloide no cérebro começando tão cedo quanto aos 3 meses de idade. Micrografias de fluorescência típicas são

mostradas na Figura 8, e a coloração das placas de amiloide pela BTA-1 em tecidos do cérebro quer com DA *post mortem*, quer de camundongo PS1/APP é claramente visível. A amiloide cerebrovascular também foi brilhantemente corada (Fig. 8, direita). As outras marcas neuropatológicas características do cérebro com DA, emaranhados neurofibrilares (ENF), são mais fracamente corados pela BTA-1 no cérebro com DA (Fig. 8, esquerda). Os ENF não têm sido observados em modelos de camundongo transgénico da deposição amiloide.

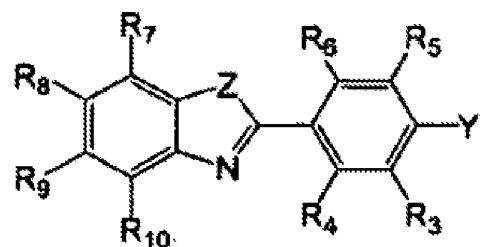
Exemplo 9: Marcação e deteção *in vivo* dos depósitos amiloides em camundongos transgénicos

Três camundongos transgénicos PS1/APP com 17 meses de idade foram injetados intraperitonealmente (ip) com uma dosagem única de 10 mg/kg de BTA-1 numa solução de DMSO, propilenoglicol, e pH 7,5 TFS (v/v/v 10/45/45). Vinte e quatro horas depois, foi empregue microscopia de fluorescência multifotónica para obter imagens de alta resolução nos cérebros de camundongos vivos usando uma técnica de janela craniana. Imagens *in vivo* típicas de BTA-1 num camundongo PS1/APP vivo são mostradas na Figura 9, e as placas e a amiloide cerebrovascular são claramente distinguíveis. Os estudos de microscopia multifotónica demonstram a especificidade *in vivo* da BTA-1 para a A β em camundongos AS1/APP transgénicos vivos.

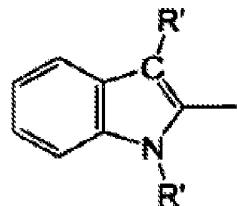
Como usados aqui e nas seguintes reivindicações, os artigos singulares tais como "um" e "uma" destinam-se a referir o singular ou o plural.

REIVINDICAÇÕES

1. Um composto de ligação à amiloide com a seguinte fórmula ou um seu sal solúvel em água, não tóxico:

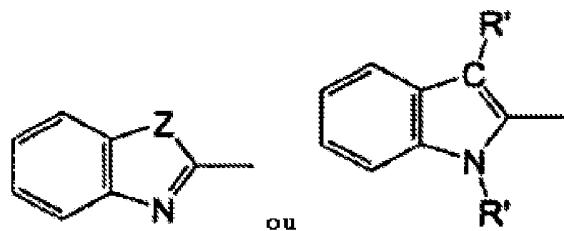


em que Z é S, NR', O ou CR', caso em que a forma tautomérica correta do anel heterocíclico se torna um indole no qual R' é H ou um grupo alquilo C₁-C₈:



Y é NR¹R², OR², ou SR²;

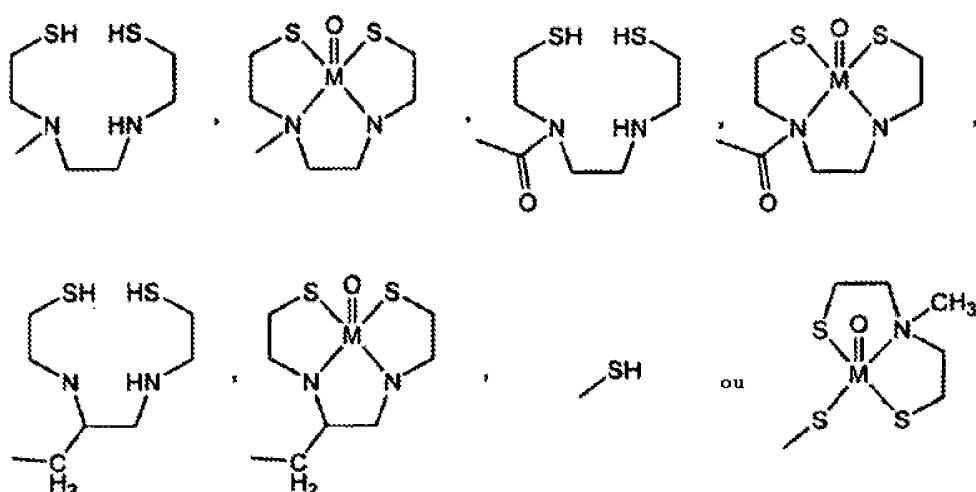
em que o nitrogénio de



não é uma amina quaternária;

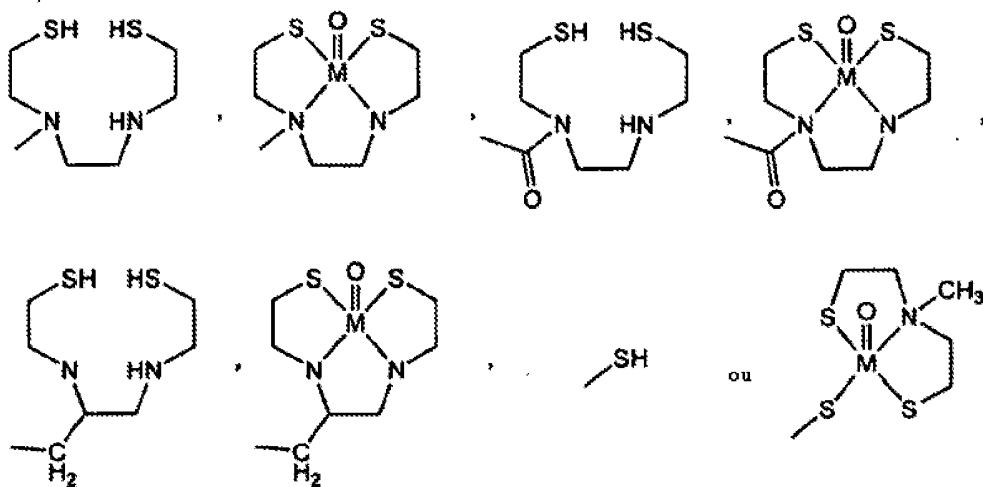
cada R¹ e R² independentemente é selecionado do grupo consistindo em H, um grupo alquilo C₁-C₈, (CH₂)_nOR' (em que n=1, 2, ou 3), CF₃, CH₂-CH₂X, CH₂-CH₂-CH₂X (em que

$X=F, Cl, Br$ ou I), $(C=O)-R'$, R_{fe} , $(CH_2)_nR_{fe}$ (em que $n=1, 2, 3$, ou 4 e R_{fe} representa um grupo fenilo não substituído ou substituído, em que os substituintes de R_{fe} são selecionados do grupo consistindo em F, Cl, Br, I , um grupo alquilo C_1-C_8 , $(CH_2)_nOR'$ (em que $n=1, 2$, ou 3), CF_3 , CH_2-CH_2X , OCH_2-CH_2X , $CH_2-CH_2-CH_2X$, $O-CH_2-CH_2-CH_2X$ (em que $X=F, Cl, Br$ ou I), CN , $(C=O)-R'$, $N(R')_2$, NO_2 , $(C=O)N(R')_2$, $O(CO)R'$, OR' , SR' , $COOR'$ (em que R' é H ou um grupo alquilo C_1-C_8), um estanho tri-alquilo e um grupo quelante (com ou sem um grupo metálico quelado) da forma $W-L$ ou $V-W-L$, em que V é selecionado do grupo consistindo em $-COO-$, $-CO-$, $-CH_2O-$ e $-CH_2NH-$; W é $-(CH_2)_n$ em que $n=0, 1, 2, 3, 4$, ou 5 ; e L é:

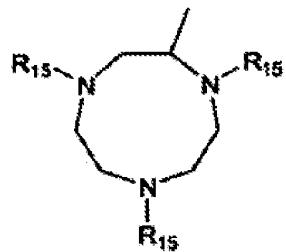
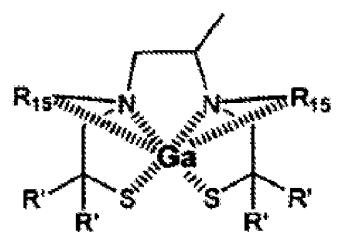
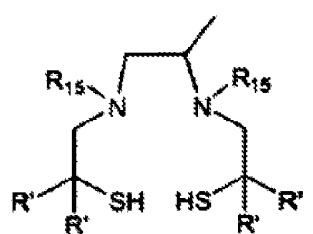
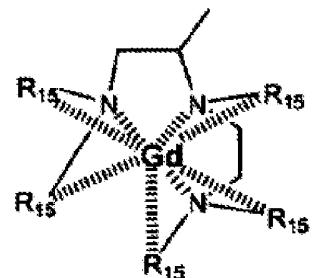
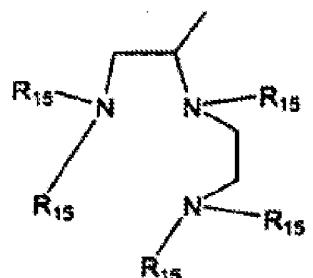
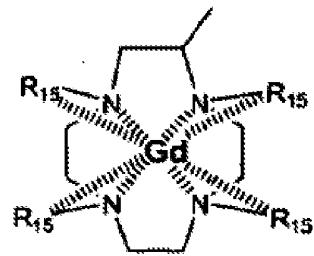
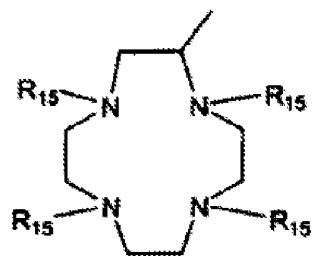


em que M é selecionado do grupo consistindo em Ce e Re ; e R' é H ou um grupo alquilo C_1-C_8); cada R^3-R^{10} independentemente é selecionado do grupo consistindo em H, F, Cl, Br, I , um grupo alquilo C_1-C_8 , $(CH_2)_nOR'$ (em que $n=1, 2$, ou 3), CF_3 , CH_2-CH_2X , $O-CH_2-CH_2X$, $CH_2-CH_2-CH_2X$, $O-CH_2-CH_2-CH_2X$ (em que $X=F, Cl, Br$ ou I), CN , $(C=O)-R'$, $N(R')_2$, NO_2 , $(C=O)N(R')_2$, $O(CO)R'$, OR' , SR' , $COOR'$, R_{fe} , $CR'=CR'-R_{fe}$, $CR'_2-CR'2-R_{fe}$, um estanho tri-alquilo e um grupo quelante (com ou sem um

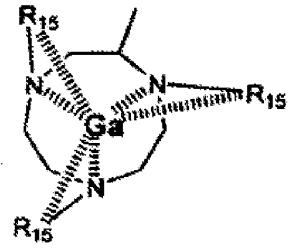
grupo metálico quelado) da forma W-L ou V-W-L, em que V é selecionado do grupo consistindo em $-COO^-$, $-CO^-$, $-CH_2O^-$ e $-CH_2NH^-$; W é $-(CH_2)_n$ em que $n=0, 1, 2, 3, 4$, ou 5; e L é:



em que M é selecionado do grupo consistindo em Ce e Re; ou em que cada R¹-R¹⁰ independentemente é selecionado do grupo consistindo num grupo quelante (com ou sem um ião metálico quelado) da forma W-L e V-W-L, em que V é selecionado do grupo consistindo em $-COO^-$, e $-CO^-$; W é $-(CH_2)_n$ em que $n=0, 1, 2, 3, 4$, ou 5; L é:

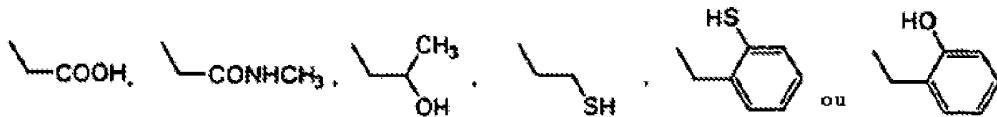


ou

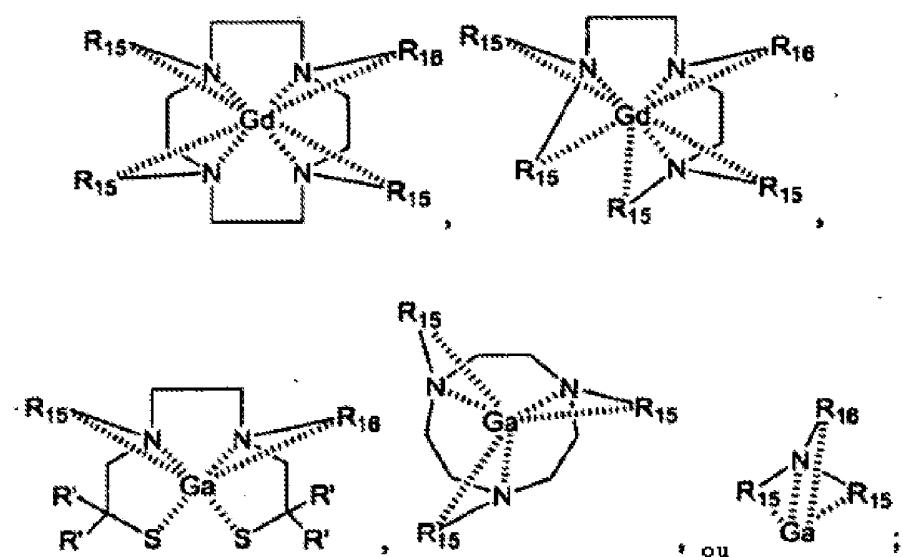


e em que R¹⁵ independentemente é selecionado dos seguintes:

H,

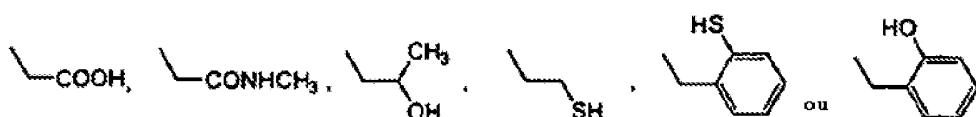


ou uma ligação à amiloide, composto quelante (com um grupo metálico quelado) ou um seu sal solúvel em água, não tóxico da forma:

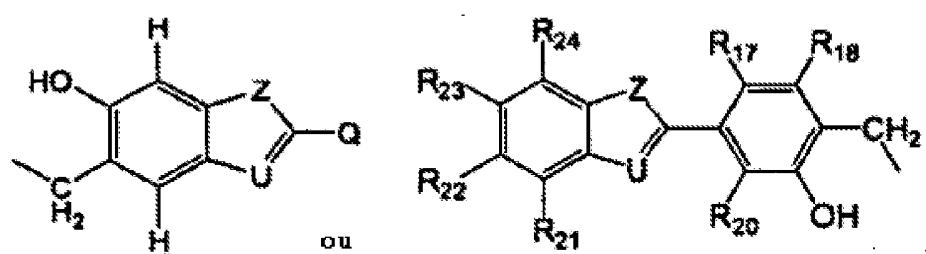


em que R^{15} independentemente é selecionado dos seguintes:

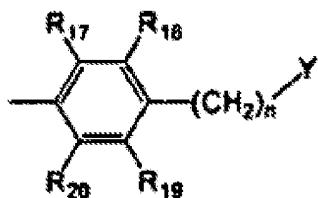
$H,$



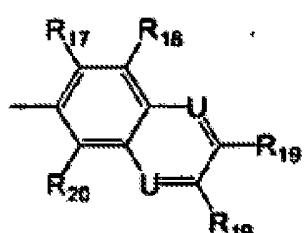
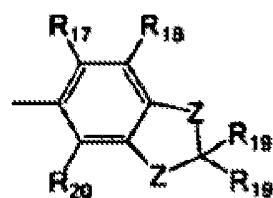
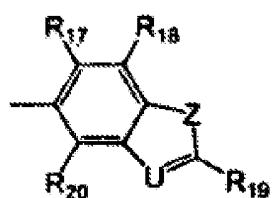
e R^{16} é



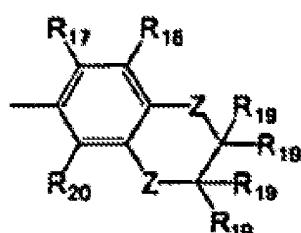
em que Q é independentemente selecionado de uma das seguintes estruturas:



em que $n=0, 1, 2, 3$, ou 4 ,



ou



Z é S, NR', O, ou C(R')₂, no qual R' é H ou um grupo alquilo C₁-C₈;

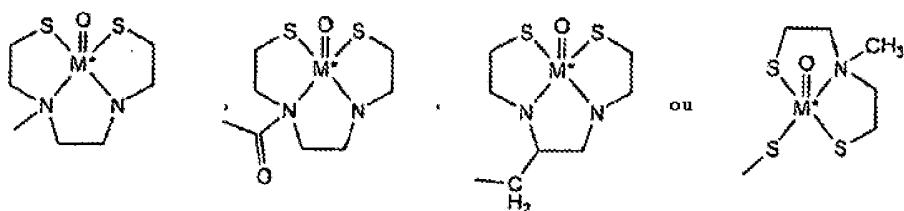
U é N ou CR';

Y é NR¹R², OR², ou SR²;

cada R¹⁷-R²⁴ independentemente é selecionado do grupo consistindo em H, F, Cl, Br, I, um grupo alquilo C₁-C₈, (CH₂)_nOR' (em que n=1, 2, ou 3), CF₃, CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂X, CH₂-CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂-CH₂X (em que X=F, Cl, Br ou I), CN, (C=O)-R', N(R')₂, NO₂, (C=O)N(R')₂, O(CO)R', OR', SR', COOR', R_{fe}, CR'=CR'-R_{fe} e CR₂'=CR₂'-R_{fe};

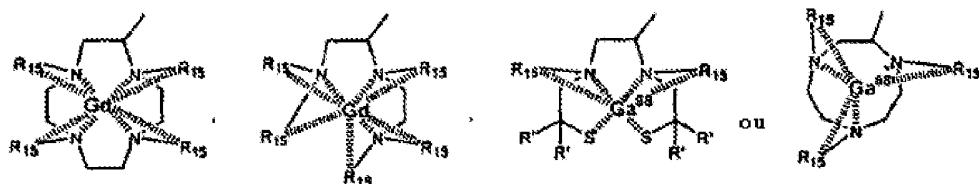
em que pelo menos um dos substituintes R¹-R¹⁰ é selecionado do grupo consistindo em ³H, ¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I,

^{76}Br , ^{75}Br , $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-X}^*$, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-X}^*$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-X}^*$, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-X}^*$ (em que $\text{X}^* = ^{131}\text{I}$, ^{123}I , ^{76}Br ou ^{75}Br), ^{19}F , um substituinte contendo um carbono selecionado de um grupo consistindo em alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$, $(\text{CH}_2)_n\text{OR}'$, CF_3 , $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{X}$, $\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{X}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{X}$, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{X}$ (em que $\text{X}=\text{F}$, Cl , Br ou I), CN , $(\text{C=O})\text{-R}'$, $(\text{C=O})\text{N}(\text{R}')_2$, $\text{O}(\text{CO})\text{R}'$, COOR' , $\text{CR}'=\text{CR}'\text{-R}_{\text{fe}}$ e $\text{CR}_2'=\text{CR}_2'\text{-R}_{\text{fe}}$ em que pelo menos um carbono é ^{11}C , ^{13}C ou ^{14}C e um grupo quelante (com grupo metálico quelado) da forma W-L^* ou V-W-L^* , em que V é selecionado do grupo consistindo em $-\text{COO-}$, $-\text{CO-}$, $-\text{CH}_2\text{O-}$ e $-\text{CH}_2\text{NH-}$; W é $-(\text{CH}_2)_n$ onde $n=0, 1, 2, 3, 4$, ou 5; e L^* é:



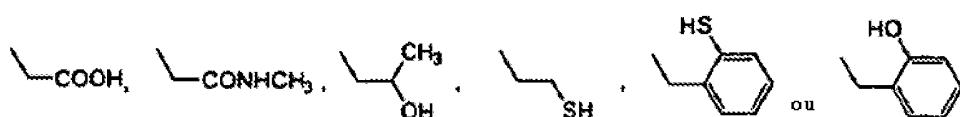
em que M^* é $^{99\text{m}}\text{Tc}$;

ou L^* é:



e em que R^{15} independentemente é selecionado dos seguintes:

H ,



2. O composto da reivindicação 1, em que a radiomarcação de um dos substituintes R^3-R^{10} é selecionada do grupo consistindo em ^{131}I , ^{123}I , ^{11}C , ^{75}Br e ^{76}Br .
3. O composto da reivindicação 2, em que a radiomarcação de um dos substituintes R^3-R^{10} é ^{11}C .
4. O composto da reivindicação 1, em que $Z=S$, $Y=NR^1R^2$, $R^1=H$; e R^2 é selecionado do grupo consistindo em $(CH_2)_nOR'$ (em que $n=1$, 2, ou 3), CF_3 , CH_2-CH_2X , $CH_2-CH_2-CH_2X$ (em que $X=F$, Cl, Br ou I), $(C=O)-R'$, R_{fe} e $(CH_2)_nR_{fe}$ (em que $n=1$, 2, 3, ou 4) em que quando R^2 é CH_2R_{fe} R^8 não é CH_3 .
5. O composto da reivindicação 1, em que $Z=S$, $Y=NR^1R^2$, $R'=H$, $R^1=H$, $R^2=CH_3$ e R^3-R^{10} são H.
6. O composto da reivindicação 1, em que $Z=S$, $Y=O$, $R'=H$, $R^2=CH_3$ e R^3-R^{10} são H.
7. O composto da reivindicação 1, em que $Z=S$, $Y=NR^1R^2$, $R'=H$, $R^{1-4}=H$, $R^5=I$, e R^6-R^{10} são H.
8. O composto da reivindicação 1, em que $Z=S$, $Y=NR^2$, $R'=H$, $R^{1-4}=H$, $R^5=I$, $R^8=OH$ e R^6-R^7 e R^9-R^{10} são H.
9. O composto da reivindicação 1, em que $Z=S$, $Y=NR^1R^2$, $R'=H$, $R^2=CH_2-CH_2-CH_2-F$ e R^3-R^{10} são H.
10. O composto da reivindicação 1, em que $Z=S$, $Y=O$, $R'=H$, $R^2=CH_2-CH_2-F$ e R^3-R^{10} são H.
11. O composto da reivindicação 1, em que $Z=S$, $Y=NR^1R^2$, $R'=H$, $R^{1-7}=H$, $R^8=O-CH_2-CH_2-F$ e R^9-R^{10} são H.

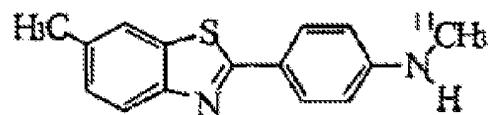
12. O composto da reivindicação 1, em que Z=S, Y=NR¹R², R'=H, R¹=CH₃, R²⁻⁷=H, R⁸=O-CH₂-CH₂-F e R⁹-R¹⁰ são H.

13. O composto da reivindicação 4, em que pelo menos um dos substituintes R³-R¹⁰ é selecionado do grupo consistindo em CN, OCH₃, OH e NH₂.

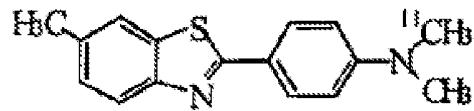
14. O composto da reivindicação 1, em que R¹=H, R²=CH₃ e R⁸ é selecionado do grupo consistindo em CN, CH₃, OH, OCH₃ e NH₂.

15. O composto da reivindicação 14, em que R³-R⁷ e R⁹-R¹⁰ são H.

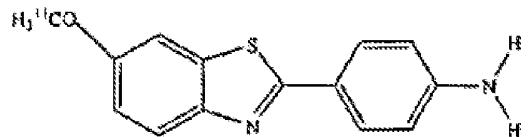
16. O composto da reivindicação 1, tendo a estrutura:



17. O composto da reivindicação 1, tendo a estrutura:



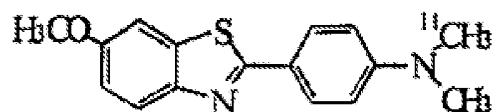
18. O composto da reivindicação 1, tendo a estrutura:



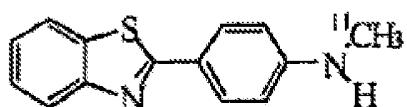
19. O composto da reivindicação 1, tendo a estrutura:



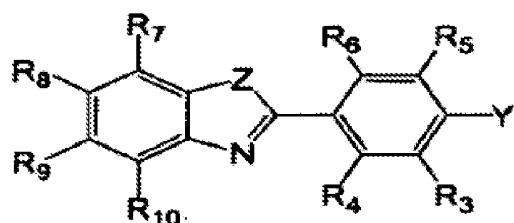
20. O composto da reivindicação 1, tendo a estrutura:



21. O composto da reivindicação 1, tendo a estrutura:

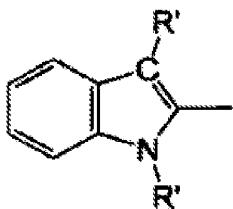


22. Um método para sintetizar um composto da fórmula seguinte ou um seu sal solúvel em água, não tóxico:

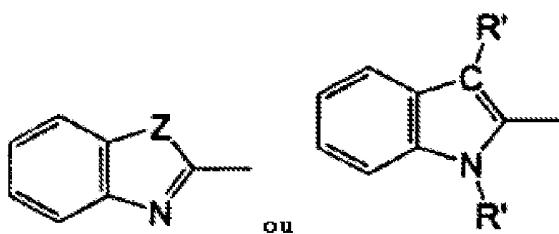


(1)

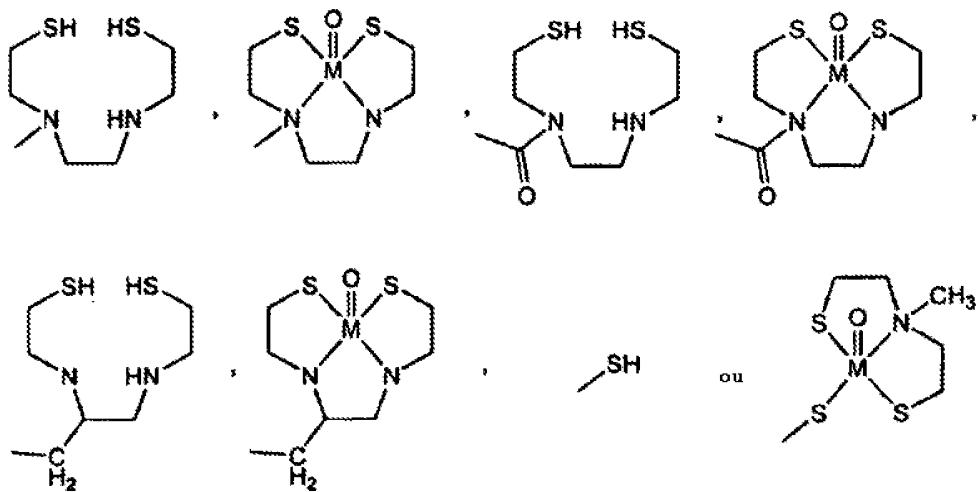
em que Z é S, NR', O ou CR', caso em que a forma tautomérica correta do anel heterocíclico se torna um indole no qual R' é H ou um grupo alquilo C₁-C₈:



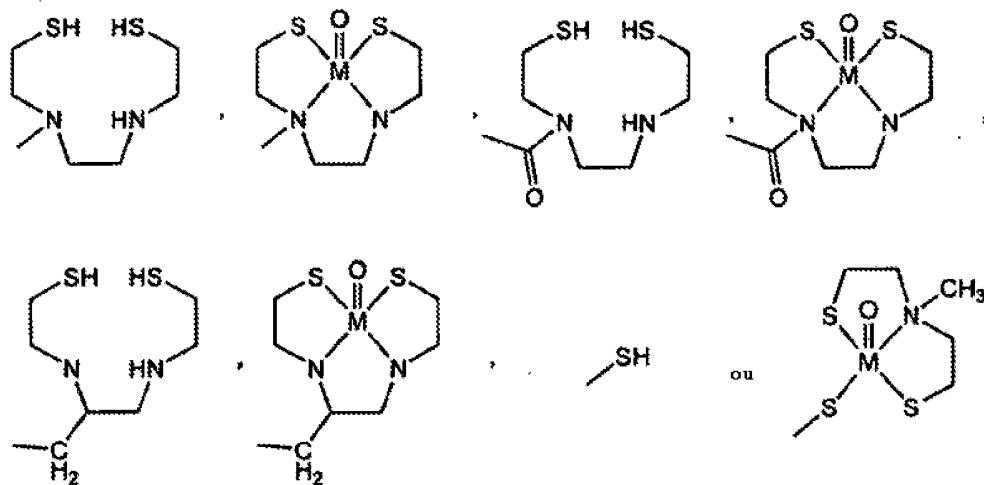
Y é NR^1R^2 , OR^2 , ou SR^2 ;
em que o nitrogénio de



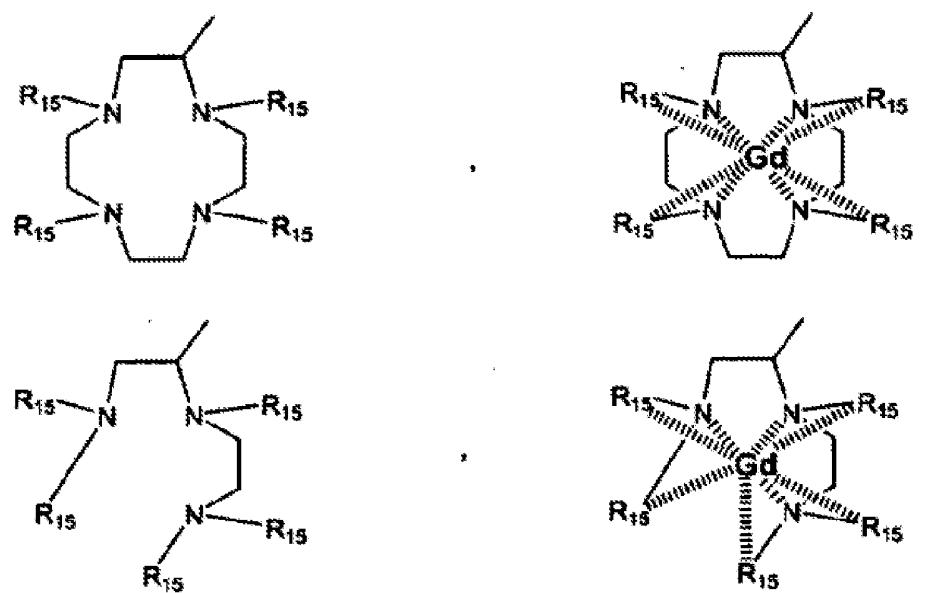
não é uma amina quaternária;
cada R^1 e R^2 independentemente é selecionado do grupo consistindo em H, um grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$, $(\text{CH}_2)_n\text{OR}'$ (em que $n=1, 2$, ou 3), CF_3 , $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{X}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{X}$ (em que $\text{X}=\text{F}, \text{Cl}, \text{Br}$ ou I), $(\text{C=O})\text{-R}'$, R_{fe} , $(\text{CH}_2)_n\text{R}_{\text{fe}}$ (em que $n=1, 2, 3$, ou 4) e R_{fe} representa um grupo fenilo não substituído ou substituído, em que os substituintes de R_{fe} são selecionados do grupo consistindo em F, Cl, Br, I, um grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$, $(\text{CH}_2)_n\text{OR}'$ (em que $n=1, 2$, ou 3), CF_3 , $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{X}$, $\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{X}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{X}$, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{X}$ (em que $\text{X}=\text{F}, \text{Cl}, \text{Br}$ ou I), CN , $(\text{C=O})\text{-R}'$, $\text{N}(\text{R}')_2$, NO_2 , $(\text{C=O})\text{N}(\text{R}')_2$, $\text{O}(\text{CO})\text{R}'$, OR' , SR' , COOR' (em que R' é H ou um grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$), um estanho tri-alquilo e um grupo quelante (com ou sem um grupo metálico quelado) da forma W-L ou V-W-L , em que V é selecionado do grupo consistindo em $-\text{COO}-$, $-\text{CO}-$, $-\text{CH}_2\text{O}-$ e $-\text{CH}_2\text{NH}-$; W é $-(\text{CH}_2)_n$ em que $n=0, 1, 2, 3, 4$, ou 5 ; e L é:

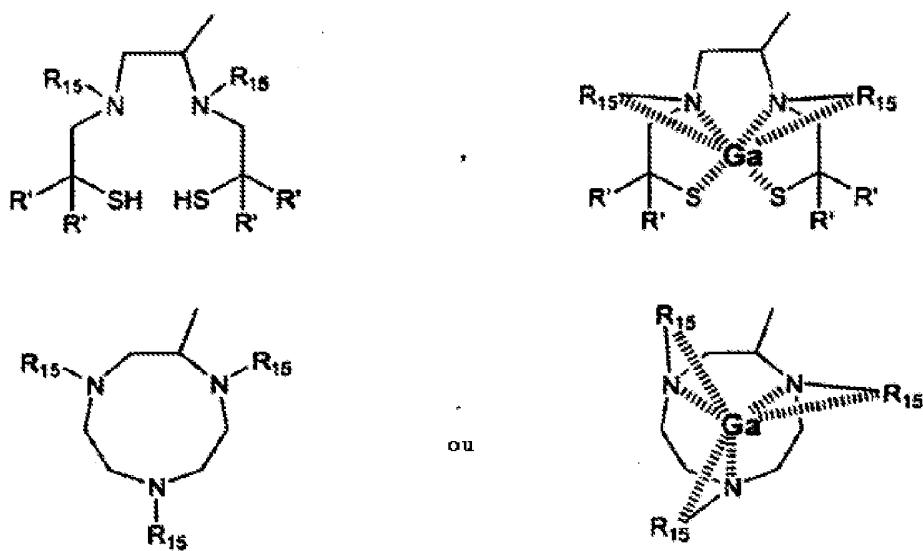


em que M é selecionado do grupo consistindo em Ce e Re; e R' é H ou um grupo alquilo C₁-C₈); cada R³-R¹⁰ independentemente é selecionado do grupo consistindo em H, F, Cl, Br, I, um grupo alquilo C₁-C₈, (CH₂)_nOR' (em que n=1, 2, ou 3), CF₃, CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂X, CH₂-CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂-CH₂X (em que X=F, Cl, Br ou I), CN, (C=O)-R', N(R')₂, NO₂, (C=O)N(R')₂, O(CO)R', OR', SR', COOR', R_{fe}, CR'=CR'-R_{fe}, CR'₂-CR'2-R_{fe}, um estanho tri-alquilo e um grupo quelante (com ou sem um grupo metálico quelado) da forma W-L ou V-W-L, em que V é selecionado do grupo consistindo em -COO-, -CO-, -CH₂O- e -CH₂NH-; W é -(CH₂)_n em que n=0,1,2,3,4, ou 5; e L é:



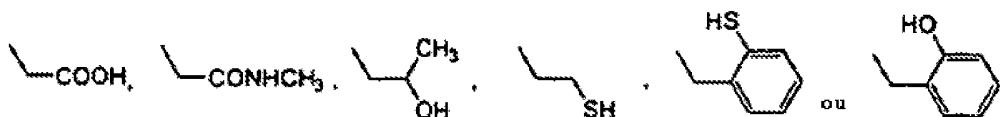
em que M é selecionado do grupo consistindo em Ce e Re; ou em que cada R¹-R¹⁰ independentemente é selecionado do grupo consistindo num grupo quelante (com ou sem um ião metálico quelado) da forma W-L e V-W-L, em que V é selecionado do grupo consistindo em -COO-, e -CO-; W é -(CH₂)_n em que n=0,1,2,3,4, ou 5; L é:



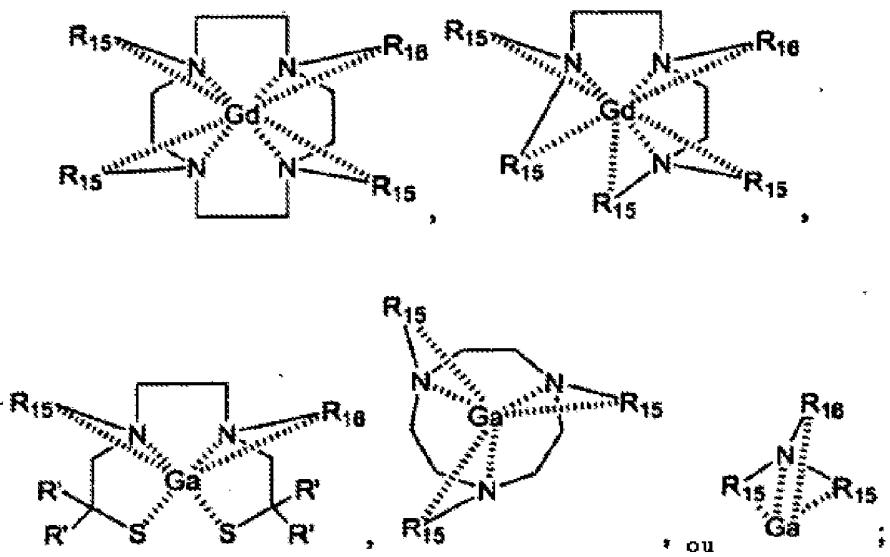


e em que R^{15} independentemente é selecionado dos seguintes:

H,

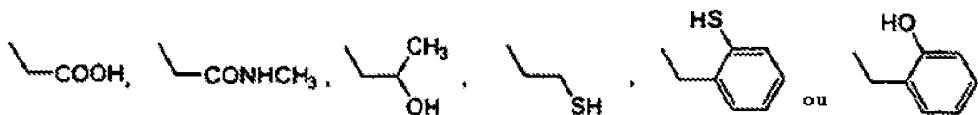


ou uma ligação à amiloide, composto quelante (com um grupo metálico quelado) ou um seu sal solúvel em água, não tóxico da forma:

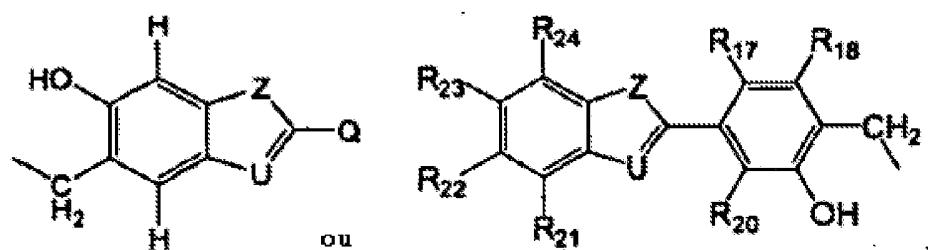


em que R^{15} independentemente é selecionado dos seguintes:

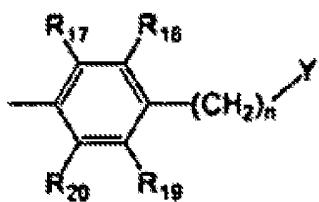
H,



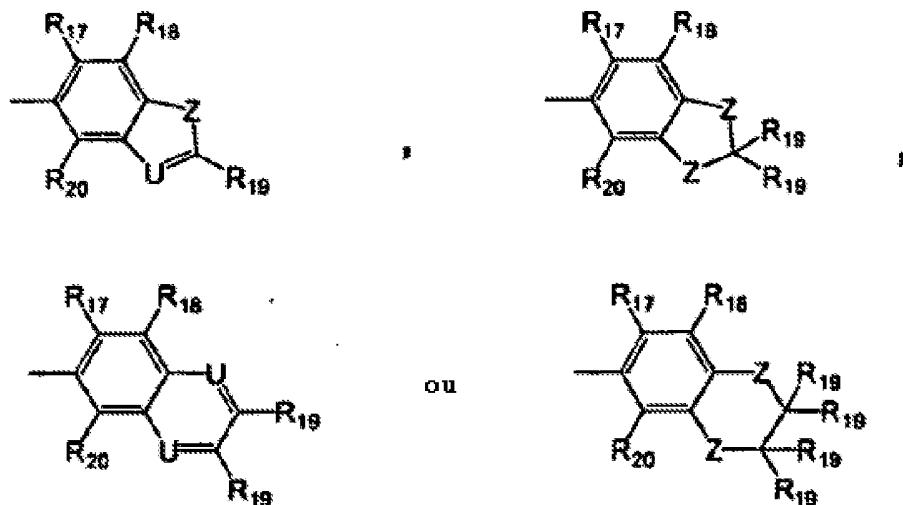
e R^{16} é



em que Q é independentemente selecionado de uma das seguintes estruturas:



em que n=0,1,2,3, ou 4,



Z é S, NR', O, ou C(R')₂, no qual R' é H ou um grupo alquilo C₁-C₈;

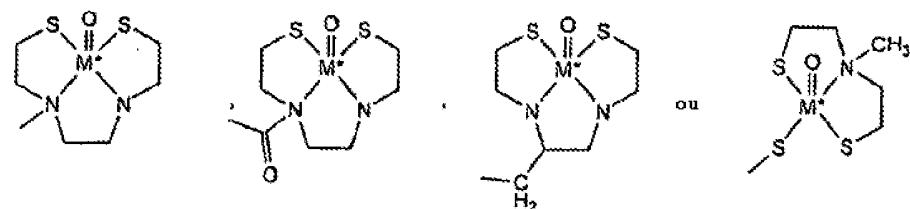
U é N ou CR';

Y é NR¹R², OR², ou SR²;

cada R¹⁷-R²⁴ independentemente é selecionado do grupo consistindo em H, F, Cl, Br, I, um grupo alquilo C₁-C₈, (CH₂)_nOR' (em que n=1, 2, ou 3), CF₃, CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂X, CH₂-CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂-CH₂X (em que X=F, Cl, Br ou I), CN, (C=O)-R', N(R')₂, NO₂, (C=O)N(R')₂, O(CO)R', OR', SR', COOR', R_{fe}, CR'=CR'-R_{fe} e CR₂'=CR₂'-R_{fe};

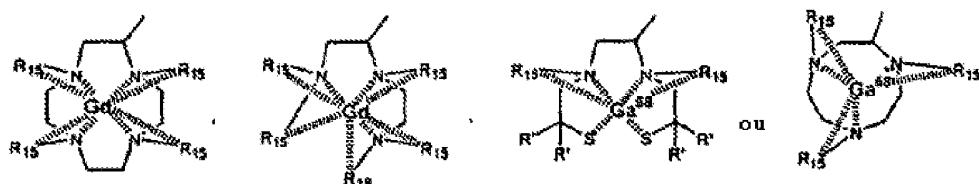
em que pelo menos um dos substituintes R¹-R¹⁰ é selecionado do grupo consistindo em ³H, ¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ⁷⁶Br, ⁷⁵Br, CH₂-CH₂-X*, O-CH₂-CH₂-X*, CH₂-CH₂-CH₂-X*, O-CH₂-CH₂-CH₂-X* (em que X* = ¹³¹I, ¹²³I, ⁷⁶Br, ⁷⁵Br ou ¹⁸F), ¹⁹F, um substituinte contendo um carbono selecionado de

um grupo consistindo em alquilo C₁-C₈, (CH₂)_nOR', CF₃, CH₂-CH₂X, OCH₂-CH₂X, CH₂-CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂-CH₂X (em que X=F, Cl, Br ou I), CN, (C=O)-R', (C=O)N(R')₂, O(CO)R', COOR', CR'=CR'-R_{fe} e CR'₂=CR'₂-R_{fe} em que pelo menos um carbono é ¹¹C, ¹³C ou ¹⁴C e um grupo quelante (com grupo metálico quelado) da forma W-L* ou V-W-L*, em que V é selecionado do grupo consistindo em -COO-, -CO-, -CH₂O- e -CH₂NH-; W é -(CH₂)_n onde n=0,1,2,3,4, ou 5; e L* é:



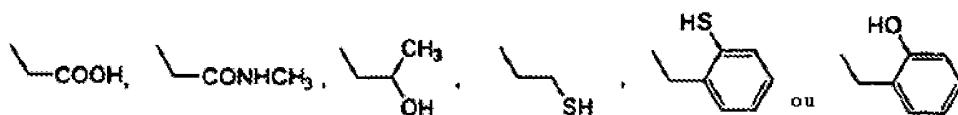
em que M* é ^{99m}Tc;

ou L* é:



e em que R¹⁵ independentemente é selecionado dos seguintes:

H,



tendo pelo menos um dos substituintes R³-R¹⁰ selecionado do grupo consistindo em ¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ⁷⁶Br, ⁷⁵Br, ¹⁸F, e ¹⁹F, compreendendo o passo de marcação de um composto

da reivindicação 1, em que pelo menos um dos substituintes R³-R¹⁰ é um estanho tri-alquilo, pela reação do composto com uma substância contendo ¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ⁷⁶Br, ⁷⁵Br, ¹⁸F, ou ¹⁹F.

23. Um método *in vivo* para detetar depósitos amiloides num sujeito, compreendendo os passos de:

- (a) administrar uma quantidade detetável de uma composição farmacêutica compreendendo (a) um composto de ligação à amiloide ou um seu sal solúvel em água, não tóxico como definido na reivindicação 22 e (b) um transportador farmaceuticamente aceitável, e
- (b) detetar a ligação do composto ao depósito amiloide no sujeito.

24. O método da reivindicação 23, em que o depósito amiloide está localizado no cérebro de um sujeito.

25. O composto da reivindicação 23, em que o sujeito é suspeito de ter uma doença ou síndrome selecionados do grupo consistindo em Doença de Alzheimer, Doença de Alzheimer familiar, Síndrome de Down e homozigotos para o alelo E4 da apolipoproteína.

26. O método da reivindicação 23, em que a deteção é selecionada do grupo consistindo em imagiologia de raios gama, imagiologia por ressonância magnética e espetroscopia por ressonância magnética.

27. O método da reivindicação 26, em que a deteção é feita por imagiologia de raios gama, e a imagiologia de raios gama é PET ou TCEFU.

- 28.** O método da reivindicação 23, em que a composição farmacêutica é administrada por injeção intravenosa.
- 29.** O método da reivindicação 23, em que a razão da (i) ligação do composto a uma área do cérebro excetuando o cerebelo em relação à (ii) ligação do composto ao cerebelo, no sujeito, é comparada à razão em sujeitos normais.
- 30.** Um método de deteção de depósitos amiloïdes na biopsia ou em tecido humano ou animal *post mortem* compreendendo os passos de:
- (a) incubar tecido fixo em formalina ou congelado fresco com uma solução de um composto de ligação à amiloïde ou um seu sal solúvel em água, não tóxico como definido na reivindicação 22 como para formar um depósito marcado e depois,
- (b) detetar os depósitos marcados.
- 31.** O método da reivindicação 30 em que a solução é composta por 25-100% de etanol, com o restante da solução sendo água, em que a solução está saturada com um composto de ligação à amiloïde de acordo com a reivindicação 1 ou um seu sal solúvel em água, não tóxico.
- 32.** O método da reivindicação 30 em que a solução é composta por um tampão aquoso contendo 0-50% de etanol, em que a solução contém 0,0001 a 100 µM do composto de ligação à amiloïde.
- 33.** O método da reivindicação 30 em que a deteção é efetuada por técnicas microscópicas selecionadas do grupo consistindo em microscopia sobre fundo claro, de

fluorescência, laser confocal, e por polarização cruzada.

34. Um método de quantificar a quantidade de amiloide na biopsia ou em tecido *post mortem* compreendendo os passos de:

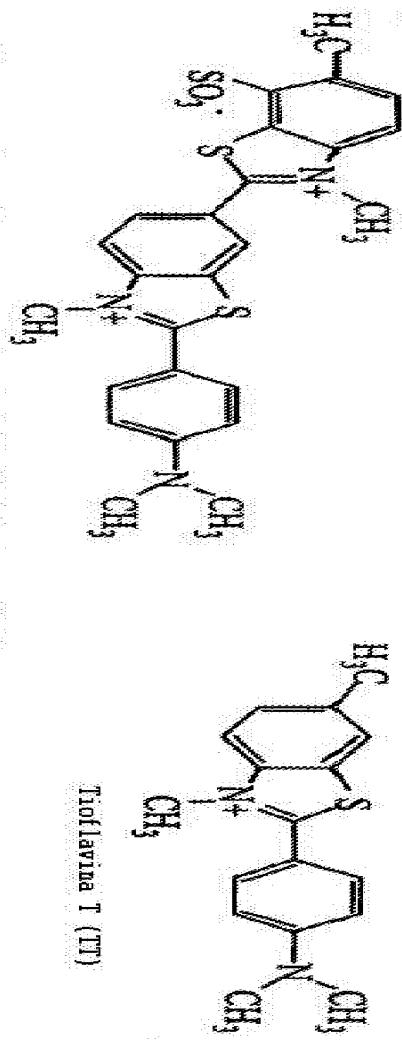
- (a) incubar um derivado radiomarcado de um composto de ligação à amiloide ou um seu sal solúvel em água, não tóxico definido na reivindicação 22, com um homogeneizado na biopsia ou em tecido *post mortem*,
- (b) separar o derivado radiomarcado de um composto ligado ao tecido do não ligado ao tecido,
- (c) quantificar o derivado radiomarcado de um composto ligado ao tecido, e
- (d) converter as unidades do derivado radiomarcado de um composto ligado ao tecido da reivindicação 1 em unidades de microgramas de amiloide por 100 mg de tecido por comparação com um padrão.

35. Um método para distinguir um cérebro com doença de Alzheimer de um cérebro normal compreendendo os passos de:

- a) incubar os tecidos (i) do cerebelo e (ii) de outra área do mesmo cérebro excetuando o cerebelo, de sujeitos normais e de sujeitos suspeitos de ter doença de Alzheimer, com um composto de ligação à amiloide ou um seu sal solúvel em água, não tóxico como definido na reivindicação 22 tal que a amiloide no tecido se ligue ao composto;

- b) quantificar a quantidade de amiloide ligada ao composto e detetar a ligação do composto ao depósito de amiloide no sujeito;
- d) calcular a razão da quantidade de amiloide na área do cérebro excetuando o cerebelo em relação à quantidade de amiloide em tecido de sujeitos suspeitos de ter doença de Alzheimer; e
- e) determinar a presença da doença de Alzheimer se a razão do cérebro de um sujeito suspeito de ter doença de Alzheimer for maior do que 90% das razões obtidas dos cérebros de sujeitos normais.

FIG. 1



Estrutura Proposta de um Componente Principal de Tioflavina S (T5)

FIG. 2

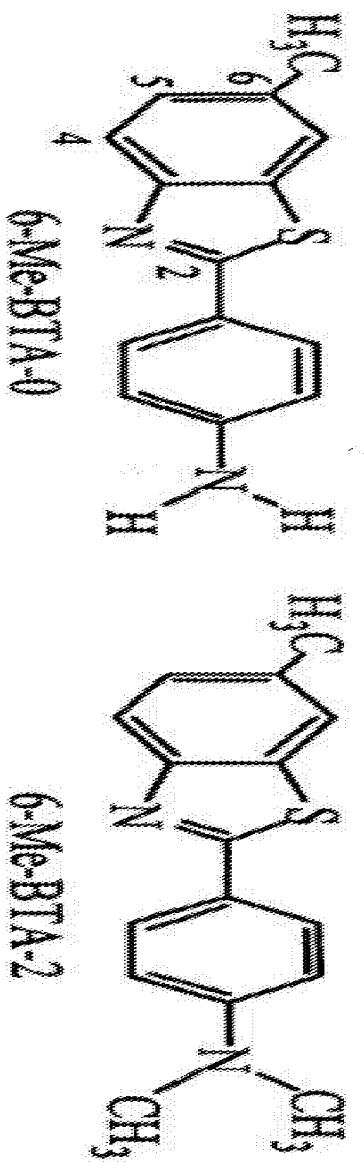


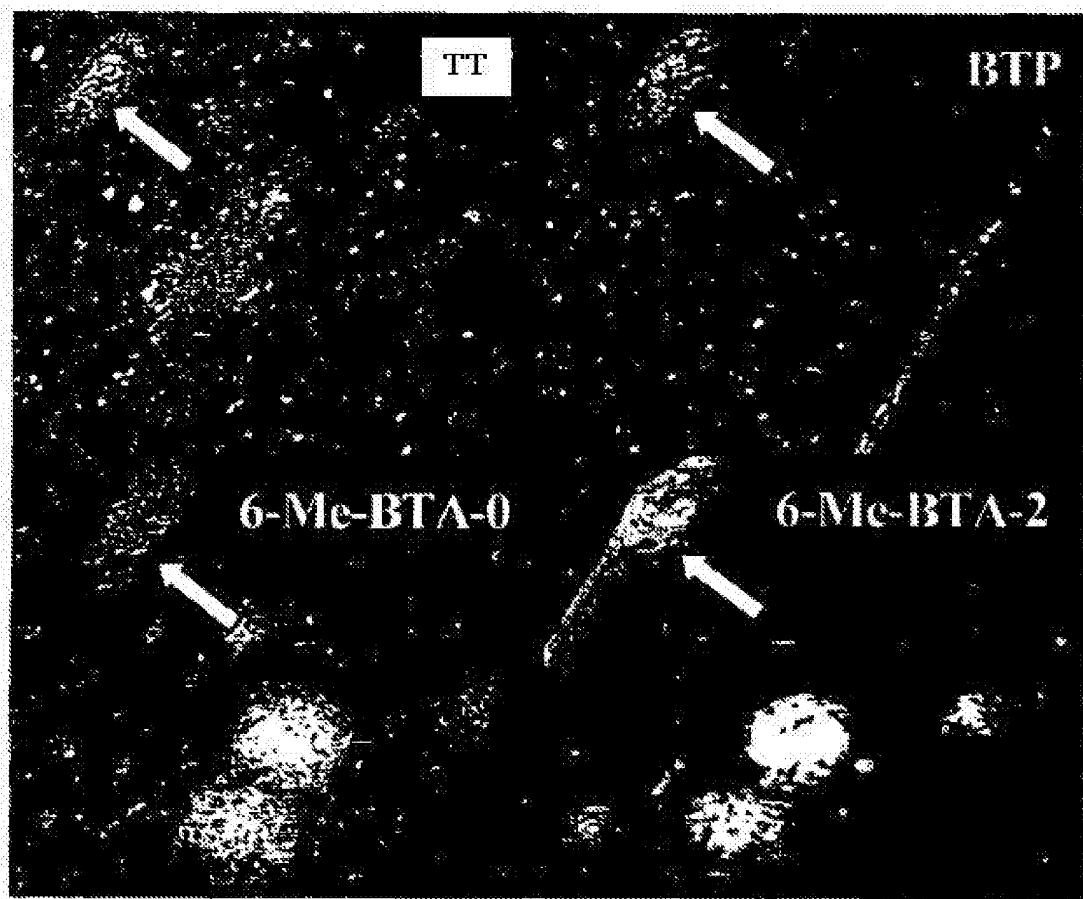
FIG. 3

FIG. 4

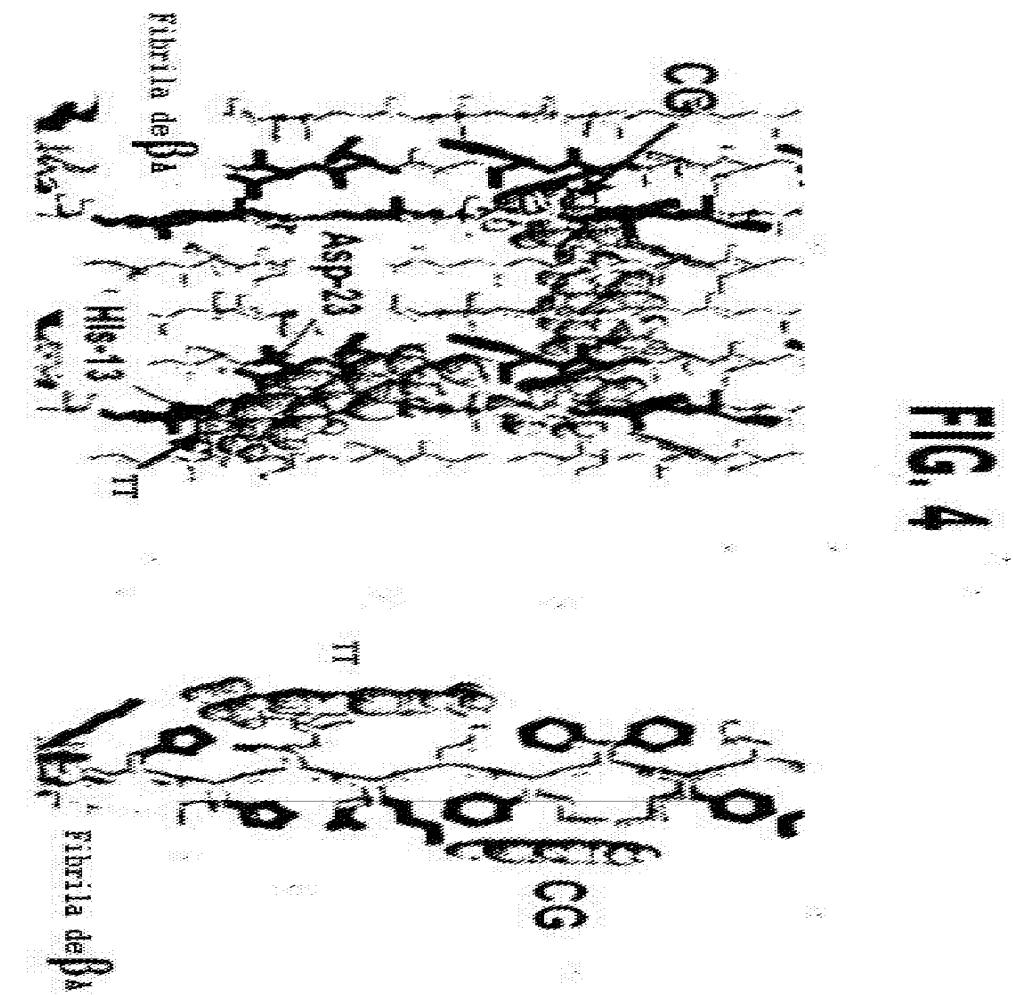


FIG. 5

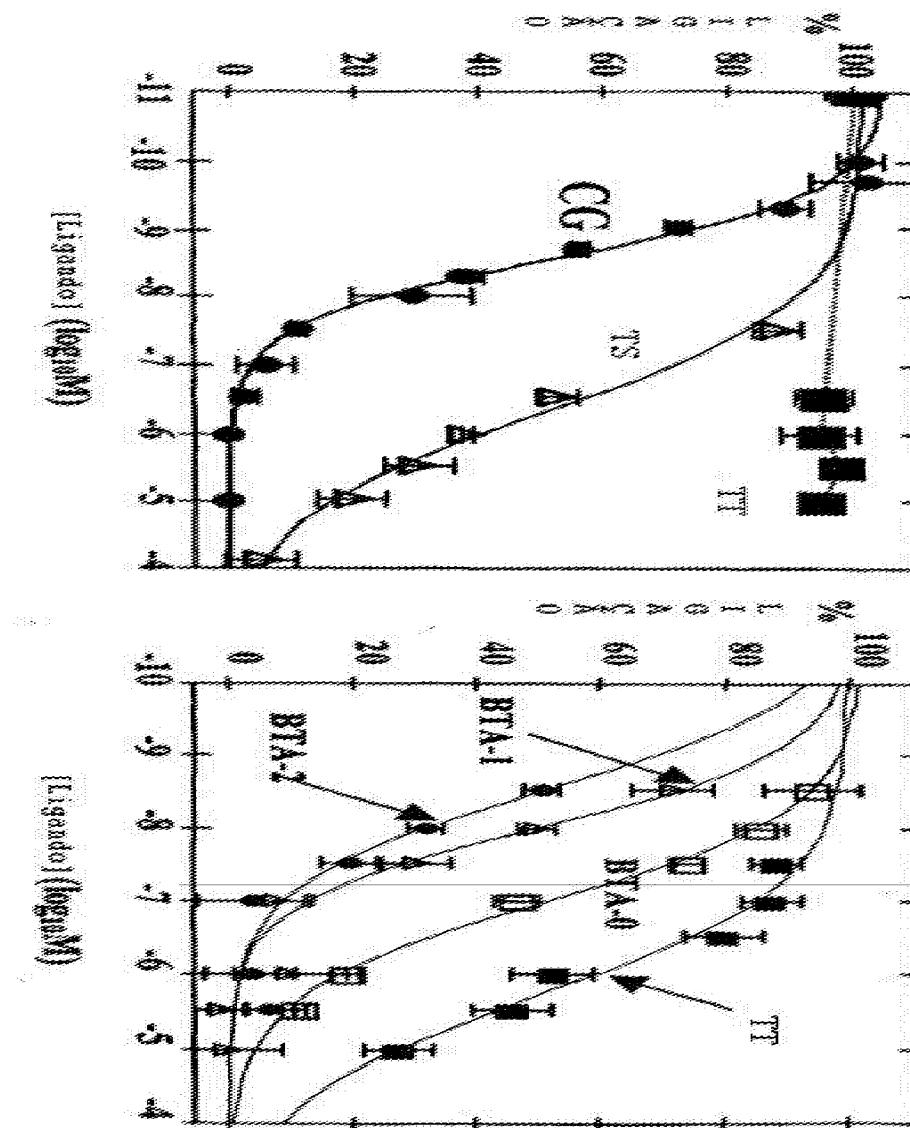


FIG. 6

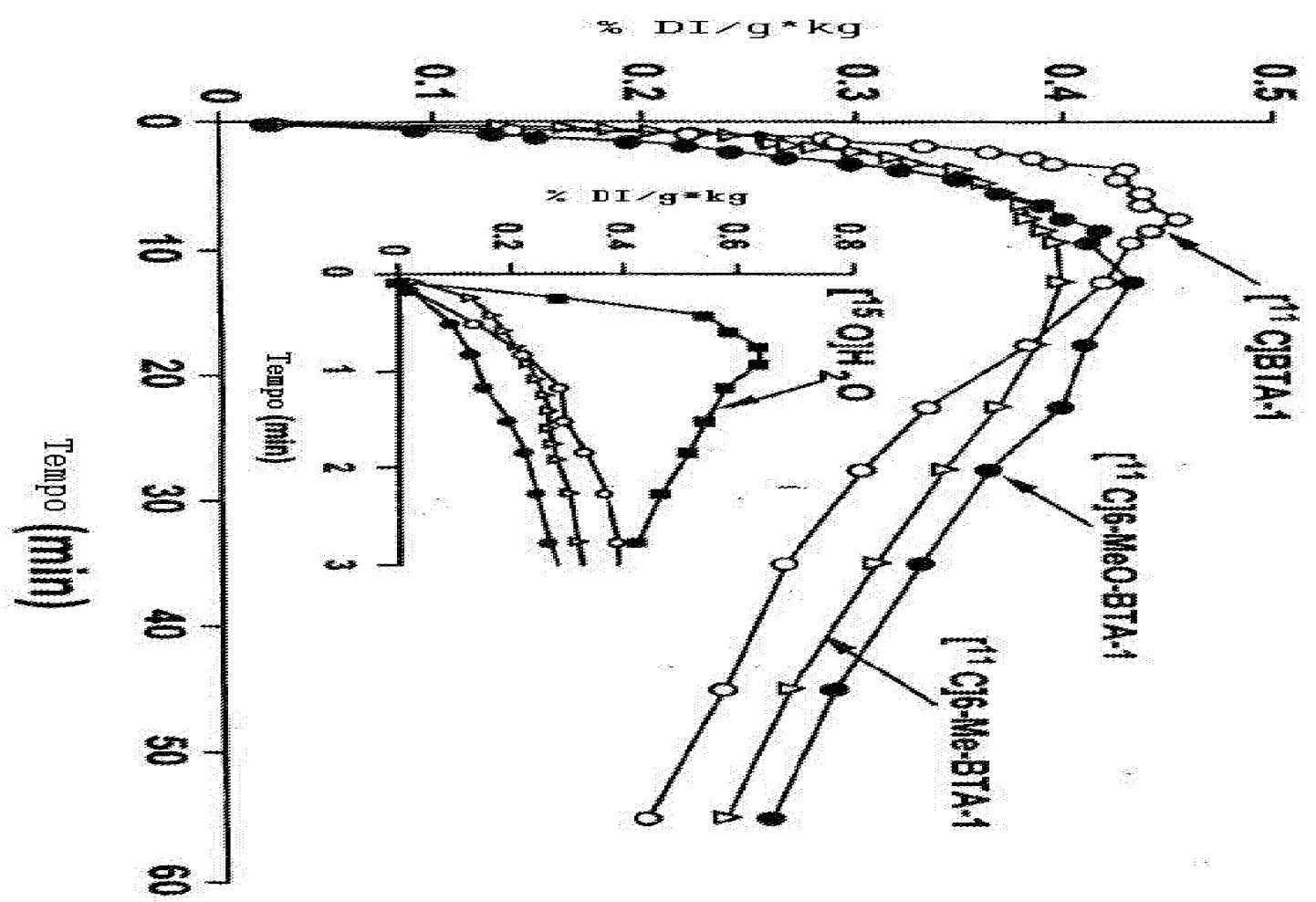


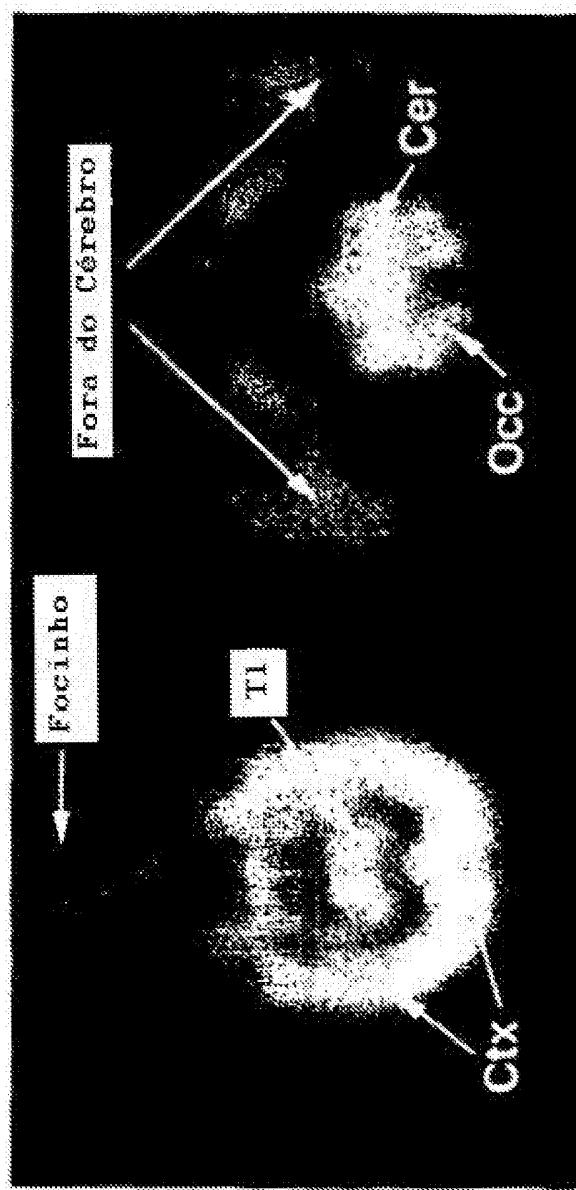
FIG. 7

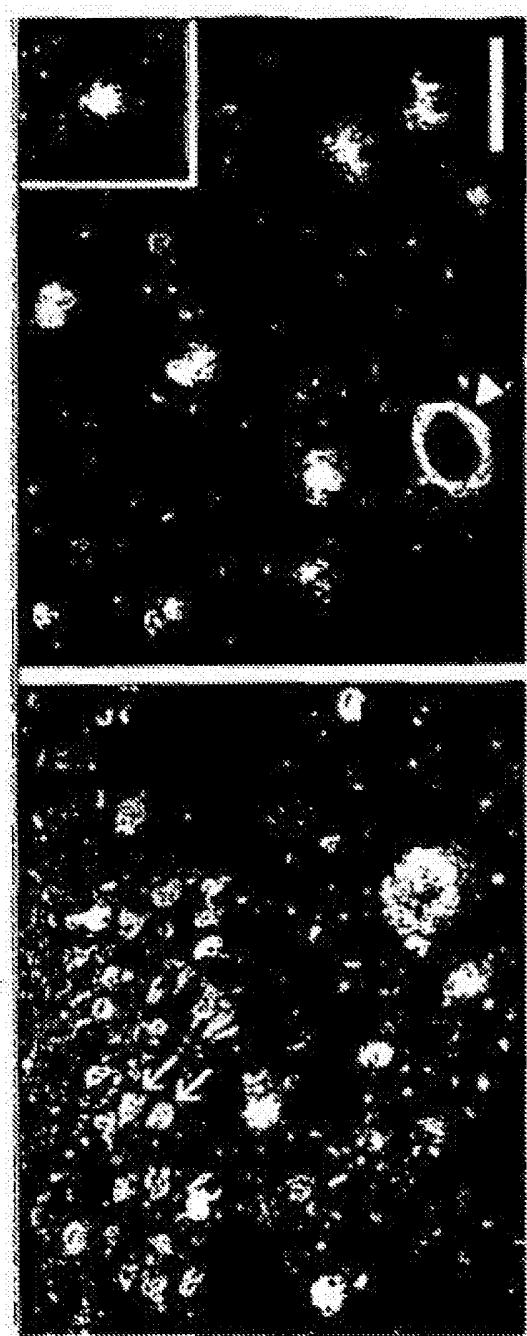
FIG. 8

FIG. 9

