

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

(22) Data de pedido: 2003.12.19	(73) Titular(es): THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE 10550 NORTH TORREY PINES ROAD LA JOLLA, CA 92037 US
(30) Prioridade(s): 2002.12.19 US 435079 P 2003.04.24 US 465435 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2008.11.05	(72) Inventor(es): JEFFERY W. KELLY US YOSHIKI SEKIJIMA JP
(45) Data e BPI da concessão: 2011.09.14 230/2011	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES E UTILIZAÇÕES PARA ESTABILIZAÇÃO DA TRANSTIRRETINA E INIBIÇÃO DO ENROLAMENTO**

(57) Resumo:

A ESTABILIZAÇÃO CINÉTICA DO ESTADO NATIVO DA TRANSTIRRETINA É UM MECANISMO EFICAZ DE PREVENÇÃO DO ENROLAMENTO PROTEÍNICO INCORRECTO. EM VIRTUDE DE O ENROLAMENTO INCORRECTO DA TRANSTIRRETINA DESEMPENHAR UM PAPEL IMPORTANTE NAS DOENÇAS AMILÓIDES DE TRANSTIRRETINA, A INIBIÇÃO DESSE ENROLAMENTO INCORRECTO PODE SER UTILIZADA COMO UM TRATAMENTO EFICAZ OU PROFILAXIA DESSAS DOENÇAS. SÃO DIVULGADOS MÉTODOS DE TRATAMENTO, MÉTODOS DE TRIAGEM, ASSIM COMO COMPOSTOS DE ESTABILIZAÇÃO ESPECÍFICOS DA TRANSTIRRETINA.

RESUMO

"Composições e utilizações para estabilização da transtirretina e inibição do enrolamento incorrecto da transtirretina"

A estabilização cinética do estado nativo da transtirretina é um mecanismo eficaz de prevenção do enrolamento proteínico incorrecto. Em virtude de o enrolamento incorrecto da transtirretina desempenhar um papel importante nas doenças amilóides de transtirretina, a inibição desse enrolamento incorrecto pode ser utilizada como um tratamento eficaz ou profilaxia dessas doenças. São divulgados métodos de tratamento, métodos de triagem, assim como compostos de estabilização específicos da transtirretina.

DESCRIÇÃO

"Composições e utilizações para estabilização da transtirretina e inibição do enrolamento incorrecto da transtirretina"

A invenção refere-se, em geral, ao enrolamento proteínico incorrecto. De um modo mais particular, esta invenção proporciona composições e utilizações para a estabilização da transtirretina, inibição do enrolamento incorrecto da transtirretina e o tratamento das doenças amilóides a ela associadas.

A transtirretina (TTR) é uma proteína homotetramérica de 55 kDa presente no soro e líquido cefalorraquidiano. A função da TTR é transportar a L-tiroxina (T₄) e a proteína de ligação do holo-retinol (RBP). A TTR é uma das mais de 20 proteínas amiloidogénicas não homólogas que pode ser transformada em fibrilas e outros agregados conduzindo à patologia da doença em seres humanos. Estas doenças não parecem ser causadas por perda de função em virtude de agregação proteínica. Em vez disso, a agregação parece causar disfunção neuronal/celular através de um mecanismo que ainda não é claro.

Sob condições desnaturantes, a dissociação do tetrâmero de TTR de tipo selvagem limitante da taxa e o rápido enrolamento incorrecto dos monómeros, permitem a incorrecta montagem em amilóide, causando putativamente a amiloidose sistémica senil (ASS). A dissociação e enrolamento incorrecto de uma de mais de oitenta variantes de TTR dão origem a polineuropatia amilóide familiar (PAF) e cardiomiopatia amilóide familiar (CAF).

O tetrâmero de TTR possui dois locais simétricos C₂ de ligação a T₄. Sabe-se que a ligação negativamente cooperativa de T₄ estabiliza o tetrâmero de TTR e inibe a formação de fibrila amilóide. Infelizmente, menos de 1% da TTR possui T₄ a ela ligada no soro humano, porque a globulina de ligação à tiroide (GLT) possui afinidade para T₄ uma ordem de grandeza superior em comparação com a TTR. Além disso, a concentração sérica de T₄ é relativamente baixa (0,1 µM) comparada com a de TTR (3,6-7,2 µM).

A invenção baseia-se, pelo menos em parte, na verificação de que a estabilização cinética do estado nativo da transtirretina inibe o enrolamento proteínico incorrecto. Esta verificação é importante devido ao papel que o enrolamento proteínico incorrecto desempenha numa variedade de processos de doença, incluindo as doenças amilóides de transtirretina. Através da inibição do enrolamento incorrecto da transtirretina, pode intervir-se numa doença deste tipo, melhorar os sintomas e/ou, em alguns casos, prevenir ou curar a doença.

A verificação de que a estabilização cinética do estado nativo da transtirretina inibe eficazmente o enrolamento incorrecto, permite o desenvolvimento de composições terapêuticas com especificidade potencialmente elevada e baixa toxicidade. Deste modo, embora sejam aqui divulgados reagentes biarílicos exemplificativos que possuem a capacidade de estabilizar a transtirretina, podem conceber-se outros reagentes que estabilizam selectivamente a proteína. Por exemplo, como aqui se descreve, é possível conceber e preparar bifenilos policlorados, análogos de diflunisal ou benzoxazoles que são altamente selectivos para ligação a transtirretina e que estabilizam o estado nativo da transtirretina.

O fascículo divulga um método de triagem para um composto que previne ou reduz a dissociação de um tetrâmero de transtirretina. O método pode incluir as etapas seguintes: colocar um tetrâmero de transtirretina em contacto com um composto candidato; e determinar se o composto candidato aumenta a energia de activação associada à dissociação do tetrâmero de transtirretina, prevenindo ou reduzindo, desse modo, a dissociação do tetrâmero de transtirretina. O método pode incluir, opcionalmente, uma etapa adicional de medição da capacidade do composto candidato para inibir a formação de fibrila.

O fascículo divulga um método incluindo uma etapa para determinar se o composto previne a dissociação do tetrâmero de transtirretina por desestabilização do estado de transição da dissociação do tetrâmero de transtirretina. O fascículo divulga, igualmente, um método incluindo uma etapa para determinar se o composto previne a dissociação do tetrâmero de

transtirretina por estabilização do tetrâmero de transtirretina mais do que o estado de transição dissociativo.

O composto candidato utilizado num tal método pode ser, opcionalmente, uma molécula pequena. Essa molécula pequena pode estabilizar o estado nativo da transtirretina através de ligação do tetrâmero, abrandando, desse modo, a dissociação e a amiloidose sob condições desnaturantes e fisiológicas através de um mecanismo de estabilização cinética. O composto exhibe, opcionalmente, estequiometria de ligação excedendo 0,1 para TTR em sangue humano quando administrado a uma concentração de 10,6 μM .

Uma molécula pequena pode possuir, opcionalmente, um peso molecular de menos de 1500 e ligar-se à transtirretina não cooperativamente ou positivamente cooperativamente e conferir uma energia de ligação de $> 2,3$ kcal/mol. A molécula pequena pode exibir K_{d1} e $K_{d2} < 100$ nM (e.g., < 10 nM) e/ou uma elevada concentração plasmática, que contribuem, ambos, para a estabilização proteínica excedendo 2,0 kcal/mol. A molécula pequena pode, igualmente, diminuir o rendimento da amiloidose e diminuir a taxa de amiloidogénese mediada por ácido ou mediada por MeOH e/ou diminuir a taxa de dissociação de TTR mediada por ureia.

A molécula pequena inclui bifenilaminas, bifenilos, éteres de oxima, benzazoles ou outras estruturas compostas por dois anéis aromáticos, onde um possui grupos hidrófilos, tais como um ácido ou um fenol, e o outro possui grupos hidrófobos, tais como halogéneos ou alquilos.

O composto candidato pode ser um biarilo onde um anel possui um (uns) substituinte(s) hidrófilo(s) e o outro possui substituintes hidrófobos, ou um biarilo onde ambos os anéis possuem, pelo menos, um substituinte hidrófilo. O grupo hidrófilo pode ser um fenol, um COOH, um álcool benzílico, um ácido ou éster borónico, um tetrazole, um aldeído ou um aldeído hidratado ou um grupo funcional que serve como dador ou aceitador de ligação H directamente para a proteína ou através de uma ligação H mediada por água. O biarilo pode ser um biarilo simétrico tendo ambos os anéis substituídos com funcionalidade hidrófila incluindo fenóis, carboxilatos e álcoois e, em alguns casos, halogéneos para complementar as bolsas de ligação de halogéneo em TTR, e.g., um biarilo com a

seguinte funcionalidade 3-Cl, 4-OH, 5-Cl e 3'-Cl, 4'-OH, 5'-Cl. Numa concretização, pelo menos um anel do biarilo é substituído com substituintes 2,4-difluoro ou 3,5-difluoro ou 2,6-difluoro ou 3,5-dicloro ou 3-Cl, 4-OH, 5-Cl ou 3-F, 4-OH, 5-F, 3-COOH, 4-OH ou 3-OH ou 3-COOH ou 4-COOH ou 3-CH₂OH ou 4-CH₂OH. Um biarilo exemplificativo é um bifenilo policlorado, e.g., um bifenilo policlorado hidroxilado, em que, pelo menos um anel possui substituintes OH e/ou Cl incluindo 3-Cl, 4-OH, 5-Cl ou 2-Cl, 3-Cl, 4-OH, 5-Cl ou 3,4-DiCl, ou 2,3,4-tricloro ou 2,3,4,5-tetracloro. Podem ser utilizados no composto candidato outros halogéneos para além do cloreto. O composto candidato pode ser um benzoxazole.

O composto candidato pode ser um análogo de diflunisal. São aqui descritas a estrutura do diflunisal assim como uma variedade de análogos de diflunisal. O análogo de diflunisal pode ter, opcionalmente, actividade de AINE reduzida ou ausente, em comparação com o diflunisal. Por exemplo, o análogo de diflunisal pode possuir actividade inibidora da ciclo-oxigenase reduzida ou ausente, em comparação com o diflunisal.

O método pode incluir uma etapa adicional para determinar se o análogo de diflunisal exhibe actividade de AINE. Por exemplo, o método pode incluir uma etapa para determinar se o análogo de diflunisal exhibe actividade inibidora da ciclo-oxigenase.

A transtirretina utilizada nos métodos de triagem pode ser transtirretina de tipo selvagem ou uma transtirretina mutante, tal como uma transtirretina mutante de ocorrência natural casualmente associada à incidência de uma doença amilóide de transtirretina, tal como polineuropatia amilóide familiar ou cardiomiopatia amilóide familiar. As transtirretinas mutantes de ocorrência natural exemplificativas incluem, mas não estão limitadas a V122I, V30M, L55P (a nomenclatura mutante descreve a substituição numa posição de aminoácido recitada, relativamente ao tipo selvagem; ver, e.g., Saraiva *et al.*, (2001) *Hum. Mut.* 17: 493-503).

O fascículo também descreve métodos para a estabilização da transtirretina num tecido ou num fluido biológico e, desse modo, a inibição do enrolamento incorrecto. Geralmente, o

método compreende a administração ao tecido ou fluido biológico de uma composição compreendendo uma quantidade estabilizante de um composto aqui descrito que se liga à transtirretina e previne a dissociação do tetrâmero de transtirretina por estabilização cinética do estado nativo do tetrâmero de transtirretina.

Deste modo, métodos que estabilizem a transtirretina num tecido doente melhoram o enrolamento incorrecto e atenuam sintomas de uma doença associada e, dependendo da doença, podem contribuir para a cura da doença. O fascículo contempla a inibição do enrolamento incorrecto da transtirretina num tecido e/ou dentro de uma célula. A extensão do enrolamento incorrecto e, por conseguinte, a extensão da inibição alcançada pelos métodos descritos, pode ser avaliada por intermédio de uma variedade de métodos, tal como são descritos nos Exemplos.

A invenção inclui uma utilização para tratamento de uma doença amilóide de transtirretina. A utilização pode compreender a administração a um indivíduo, diagnosticado com uma doença amilóide de transtirretina, de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto que previne a dissociação de um tetrâmero de transtirretina por estabilização cinética do estado nativo do tetrâmero de transtirretina. De acordo com a invenção, utilizam-se 250 mg *b.i.d.* de diflunisal.

O fascículo também divulga um método de tratamento de uma doença amilóide de transtirretina, em que o método compreende a administração a um indivíduo, diagnosticado com uma doença amilóide de transtirretina, de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um análogo de diflunisal (e.g., um análogo de diflunisal que previne a dissociação de um tetrâmero de transtirretina) que previne a dissociação de um tetrâmero de transtirretina. O análogo de diflunisal pode possuir, opcionalmente, actividade de AINE reduzida ou ausente (e. g., actividade inibidora da ciclo-oxigenase), em comparação com o diflunisal.

O fascículo também divulga um método de tratamento de uma doença amilóide de transtirretina, em que o método compreende a administração a um indivíduo, diagnosticado com uma doença amilóide de transtirretina, de uma quantidade terapêuticamente

eficaz de um bifenilo policlorado (e.g., um bifenilo policlorado que previne a dissociação de um tetrâmero de transtirretina) que previne a dissociação de um tetrâmero de transtirretina. O bifenilo policlorado pode ser um bifenilo policlorado hidroxilado.

O fascículo divulga também um método de tratamento de uma doença amilóide de transtirretina, em que o método compreende a administração a um indivíduo, diagnosticado com uma doença amilóide de transtirretina, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um benzoxazole (e.g., um benzoxazole que previne a dissociação de um tetrâmero de transtirretina) que previne a dissociação de um tetrâmero de transtirretina.

A doença amilóide de transtirretina pode ser, por exemplo, polineuropatia amilóide familiar, cardiomiopatia amilóide familiar ou amiloidose sistémica senil.

O indivíduo tratado na presente utilização e nos métodos aqui descritos pode ser um indivíduo humano, embora deva ser entendido que os princípios da invenção indicam que a invenção é eficaz em relação a todos os mamíferos. Neste contexto, um "mamífero" é entendido como incluindo qualquer espécie de mamífero em que seja desejável o tratamento de doenças associadas ao enrolamento incorrecto da transtirretina, particularmente espécies de mamíferos agrícolas e domésticas.

Os compostos aqui descritos (e.g., compostos biarílicos, tais como análogos de diflunisal, bifenilos policlorados ou benzoxazoles) podem ser formulados com um farmacêuticamente aceitável para preparar uma composição farmacêutica compreendendo o composto. Como aqui utilizadas, as expressões "farmacêuticamente aceitável", "fisiologicamente tolerável" e suas variações gramaticais, quando se referem a composições, transportadores, diluentes e reagentes, são utilizadas indiferentemente e significam que os materiais são susceptíveis de administração a, ou sobre, um mamífero, sem a produção de efeitos fisiológicos indesejáveis.

O fascículo também divulga a utilização de qualquer dos compostos ou composições farmacêuticas aqui descritos para o tratamento de uma doença amilóide de transtirretina (e.g., polineuropatia amilóide familiar, cardiomiopatia amilóide familiar ou amiloidose sistémica senil).

O fascículo também divulga a utilização de qualquer dos compostos ou composições farmacêuticas aqui descritos no fabrico de um medicamento para o tratamento de uma doença amilóide de transtirretina (e.g., polineuropatia amilóide familiar, cardiomiopatia amilóide familiar ou amiloidose sistémica senil).

Os compostos e os métodos de tratamento aqui descritos proporcionam vantagens significativas em relação às opções de tratamentos actualmente disponíveis para a amiloidose de TTR. A amiloidose de TTR, tipicamente, conduz à morte em dez anos e, até há pouco tempo, era considerada incurável. O transplante hepático é um meio eficaz de substituir o alelo associado à doença por um alelo WT nos casos familiares, porque o fígado é, tipicamente, a fonte da TTR amiloidogénica. Embora o transplante hepático seja eficaz como forma de terapia génica, não é isento de problemas. O transplante é complicado pela necessidade de cirurgia invasiva tanto para o beneficiário como para o dador, terapia imunossupressora pós-transplante prolongada, uma escassez de dadores, o seu custo elevado e o grande número de doentes de amiloidose de TTR que não são bons candidatos, em virtude da progressão da sua doença. Infelizmente, a amiloidose cardíaca progride em alguns doentes de família mesmo após o transplante hepático porque a TTR WT continua, frequentemente, a depositar-se. Nem tão pouco a deposição de TTR no sistema nervoso central (SNC) é aliviada por transplante, em consequência da sua síntese pelo plexo coróide. O transplante não é uma opção viável para a doença de TTR mais predominante, a amiloidose sistémica senil (ASS), afectando, aproximadamente, 25% daqueles acima dos 80 em virtude da deposição de TTR WT.

Salvo definição em contrário, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados possuem o mesmo significado como geralmente é compreendido por uma pessoa competente na matéria a que pertence a presente invenção. Embora possam ser utilizados na prática ou verificação da presente invenção métodos e materiais semelhantes ou equivalentes àqueles aqui descritos, são a seguir descritos os métodos e materiais preferidos. Todas as publicações, pedidos de patente, patentes e outras referências aqui mencionadas, são incorporadas por referência na sua totalidade. Em caso de conflito, o presente pedido, incluindo definições, será o controlo. Adicionalmente,

os materiais, métodos e exemplos, são ilustrativos apenas e não se pretendem limitantes.

Outras características e vantagens da invenção serão evidentes da descrição detalhada que se segue e das reivindicações.

A FIG. 1 é um diagrama esquemático representando o local de ligação a T4 da transtirretina.

As FIG. 2A e 2B são gráficos representando a evolução no tempo do desenrolamento da transtirretina na presença de diferentes inibidores.

As FIGS. 3A e 3B são gráficos representando a evolução no tempo da formação de fibrila na presença de diferentes inibidores.

As FIGS. 4A e 4B são gráficos representando a evolução no tempo da formação de fibrila na presença de diferentes inibidores.

A FIG. 5 representa as estruturas de bifenilos policlorados rastreados quanto a ligação à transtirretina no plasma sanguíneo.

A FIG. 6 representa as estruturas de bifenilos policlorados hidroxilados, cuja ligação à transtirretina no plasma foi avaliada juntamente com as suas propriedades de inibição de fibrila amilóide *in vitro*.

A FIG. 7 é um gráfico representando a supressão da formação de fibrila de transtirretina por compostos de benzoxazole. A posição do carboxilo no benzoxazole é apresentada do lado esquerdo, ao passo que o anel fenilo em C(2) é apresentado na parte de baixo. As barras indicam a percentagem de formação de fibrila (*ff*), isto é, a quantidade de fibrilas formada da transtirretina (3,6 μ M) na presença do composto de benzoxazole (7,2 μ M) relativamente à quantidade formada pela transtirretina na ausência de inibidor (que é definida como 100%).

A FIG. 8 é um gráfico representando a estequiometria (*S*) de benzoxazoles ligados à transtirretina após incubação em plasma sanguíneo humano. A imunoprecipitação com um anticorpo

ligado a uma resina foi utilizada para capturar a transtirretina. A seguir à libertação da transtirretina da resina, as quantidades de transtirretina e inibidor foram quantificadas a partir das áreas sob os seus picos num cromatograma de HPLC. O valor máximo possível de s é 2. Os números dos compostos são apresentados ao longo do eixo inferior. As linhas finas verticais indicam o erro da medição.

A FIG. 9 é um gráfico representando a dissociação em função do tempo (t) para transtirretina wt (1,8 μ M) em ureia 6 M sem inibidor, ou na presença de 3,6 μ M dos compostos **20**, **21** ou **27**, ou 1,8 μ M de composto **20**.

A FIG. 10 representa a estrutura de raios X do co-cristal do composto **20** ligado à transtirretina. Resíduos equivalentes em diferentes subunidades são distinguidos com números de resíduos, com plica e sem plica, tal como são os pares de bolsas de ligação de halogéneo.

Pelo menos algumas doenças amilóides parecem ser causadas pela deposição de qualquer uma de mais de 20 proteínas ou fragmentos de proteínas não homólogos que proporcionam, em última análise, uma estrutura fibrilar quaternária em folha β cruzada. A formação de fibrilas amilóides a partir de uma proteína normalmente enrolada, como a transtirretina, requer o enrolamento proteínico incorrecto para produzir um intermediário competente para montagem. O processo de amiloidogénese da transtirretina (TTR) parece causar três doenças amilóides diferentes - amiloidose sistémica senil (ASS), polineuropatia amilóide familiar (PAF) e cardiomiopatia amilóide familiar (CAF). A ASS está associada à deposição de TTR de tipo selvagem, ao passo que a PAF e a CAF são causadas pela amiloidogénese de uma de mais de 80 variantes de TTR. Ver, por exemplo, Colon, W.; Kelly, J.W. *Biochemistry* **1992**, *31*, 8654-60; Kelly, J.W. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 11-7; Liu, K.; et al. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 754-7; Westermark, P.; et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 2843-5; Saraiva, M.J.; et al., *J. Clin. Invest.* **1985**, *76*, 2171-7; Jacobson, D. R.; et al., *N. Engl. J Med.* **1997**, *336*, 466-73; Buxbaum, J.N.; Tagoe, C. E. *Ann. Rev. Med.* **2000**, *51*, 543-569; e Saraiva, M. J. *Hum. Mutat.* **1995**, *5*, 191-6, cada um incorporado por referência na sua totalidade.

A TTR é um homotetrâmero de 55 kDa caracterizado por simetria 2,2,2, possuindo dois locais de ligação em forma de funil idênticos na interface dímero-dímero, onde a hormona da tiróide (T4) se pode ligar no plasma sanguíneo e no LCR. A TTR está, tipicamente, ligada a menos de 1 equiv. de proteína de ligação do holo-retinol. O enrolamento incorrecto da TTR, incluindo a dissociação do tetrâmero em monómeros seguido de alterações estruturais terciárias dentro do monómero, torna a proteína capaz de montagem incorrecta proporcionando, em última análise, o amilóide. O tratamento disponível para a PAF emprega a terapia génica mediada por transplante hepático para substituir a TTR variante no sangue pela proteína de tipo selvagem (WT). Esta abordagem não será provavelmente eficaz para CAF, em virtude da deposição continuada de TTR WT, nem seria útil para o tratamento da ASS, onde o processo de deposição de TTR WT parece ser causativo. A terapia de transplante hepático falharia igualmente para, aproximadamente, 10 das variantes de TTR que depositam fibrilas amilóides nas leptomeninges, conduzindo a doença do SNC, visto que esta TTR é sintetizada pelo plexo coróide. Deste modo, é desejável desenvolver uma estratégia terapêutica não invasiva geral à base de fármacos. Pode ser desejável que o fármaco não seja à base de proteína, péptido ou ácido nucleico. Ver, por exemplo, Blake, C.C.; et al. *J. Mol. Biol.* **1978**, 121, 339-56; Wojtczak, A.; et al. *Acta Crystallogr., Sect. D* **1996**, 758-810; Monaco, H.L.; Rizzi, M.; Coda, A. *Science* **1995**, 268, 1039-41; Lai, Z.; Colon, W.; Kelly, J.W. *Biochemistry* **1996**, 35, 6470-82; Holmgren, G.; et al. *Lancet* **1993**, 341, 1113-6; Suhr, O.B.; Ericzon, B.G.; Friman, S. *Liver Transpl.* **2002**, 8, 787-94; Dubrey, S.W.; et al. *Transplantation* **1997**, 64, 74-80; Yazaki, M.; et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 274, 702-6; e Cornwell, C.G. III; et al. *Am. J. of Med.* **1983**, 75, 618-623, cada um incorporado por referência na sua totalidade.

Síntese de Análogos de Diflunisal que Inibem a Formação de Fibrila Amilóide de Transtirretina

O enrolamento incorrecto de TTR que conduz à formação de fibrila amilóide pode ser prevenido por estabilização do tetrâmero mediada por T4. Várias famílias estruturalmente diversas de estabilizantes do tetrâmero ligam-se a um ou a ambos os locais de T4 dentro da TTR e previnem a amiloidose,

sem os prováveis efeitos secundários da hormona T4. Estes compostos estabilizantes do tetrâmero incluem diversos fármacos anti-inflamatórios não esteróides (AINE), tais como ácido flufenâmico, diclofenac, flurbiprofeno e diflunisal, que parecem funcionar por aumento da barreira cinética associada à dissociação do tetrâmero através de ligação e estabilização do estado fundamental. Porque a TTR é o transportador secundário de T4 no plasma sanguíneo, mais de 95% da capacidade de ligação da T4 da TTR permanece inutilizada, permitindo a administração de composto estabilizante de tetrâmero que tem estes locais como alvo. Porque o diflunisal é um inibidor da ciclo-oxigenase-2, a administração prolongada poderia conduzir a efeitos secundários gastrointestinais. São, por conseguinte, desejáveis os análogos de diflunisal que têm actividade de AINE reduzida ou ausente, mas possuem elevada afinidade para com a TTR no plasma sanguíneo. A primeira etapa com vista a este objectivo é a concepção e síntese de análogos de diflunisal como inibidores de formação de fibrila amilóide. Ver, por exemplo, Miroy, G.J.; et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 15051-6; Klabunde, T.; et al. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 312-21; Baures, P.W.; Peterson, S.A.; Kelly, J.W. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1389-401; Petrassi, H.M.; et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2178-2192; Baures, P.W.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1339-47; Sacchettini, J.C.; Kelly, J.W. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2002**, *1*, 267-275; Oza, V.B.; et al. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 321-32; Bartalena, L.; Robbins, J. *Clin. Lab. Med.* **1993**, *13*, 583-98; Aldred, A.R.; Brack, C.M.; Schreiber, G. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **1995**, *111*, 1-15; e Mao, H.Y.; et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10429-10435, cada um incorporado como referência na sua totalidade.

As subunidades do tetrâmero de TTR relacionam-se por três eixos C_2 perpendiculares. A FIG. 1 é uma representação esquemática do local de ligação a T4 de TTR, demonstrando o modo de ligação directo onde o carboxilato inibidor participa em interacções electrostáticas com o amónio ϵ de Lys 15 e 15'. Os dois locais de ligação a T4 equivalentes criados pela interface estrutural quaternária são alternados pelos dois eixos C_2 que são perpendiculares ao eixo de simetria cristalográfico C_2 . Cada local de ligação de T4 pode ser dividido numa cavidade de ligação interna e externa. Ver, por exemplo, Blake, C.C.; Oatley, S.J. *Nature* 1977, *268*, 115-20,

que é incorporado por referência na sua totalidade. A cavidade de ligação interna compreende um par de bolsas de ligação de halogéneo (HBP), designadas HBP 3 e 3', compostas pelas cadeias laterais de Leu 17, Ala 108, Val 121 e Thr 119. A convergência de quatro cadeias laterais de Ser 117 de cada subunidade define a região mais interna e a interface entre os dois locais de ligação idênticos. Os grupos hidroxilo de Ser 117 podem servir como dadores ou aceitadores de ligações de hidrogénio para complementar a funcionalidade no composto (e.g., um inibidor da formação de amilóide) ou mediar interacções electrostáticas com o composto através de moléculas de água. O local de ligação externo é composto por HBP 1 e 1', ao passo que as HBP 2 e 2' estão posicionadas na interface das cavidades de ligação interna e externa. Os grupos amónio ϵ de Lys 15 e 15' definem os alcances mais externos da cavidade de ligação externa, permitindo interacções electrostáticas com substituintes aniónicos num composto. Muitos dos compostos de estabilização do tetrâmero de TTR ligam-se no modo de ligação directo, onde um substituinte aniónico no anel fenílico hidrófilo, posicionado na bolsa de ligação externa, se engrena numa interacção electrostática com os grupos amónio ϵ de Lys 15. No modo de ligação directo, um anel fenílico hidrófobo (frequentemente substituído com halogéneos) pode ocupar a bolsa de ligação interna. Exemplos de ligação na orientação oposta (o modo de ligação inverso), contudo, foram igualmente observados. No modo de ligação inverso, um anel aromático hidrófilo pode ser posicionado na cavidade interna, permitindo uma ligação carboxilato a hidrogénio com Ser 117 e Ser 117'. No modo de ligação inverso, um anel hidrófobo substituído com halogéneo pode ser posicionado na cavidade externa.

O diflunisal pode reduzir a amiloidogénese de TTR mediada por ácido. A estrutura do diflunisal (ver Exemplo 2) pode ser utilizada como base para a concepção de novos compostos que consigam inibir a amiloidogénese de TTR. Ver, por exemplo, Verbeeck, R.K.; *et al.*, *Biochem. Pharm.* **1980**, 29, 571-576; e Nuernberg, B.; Kohler, G.; Brune, K. *Clin. Pharmacokin.* **1991**, 20, 81-89.

O composto pode ter a fórmula:



Ar²

onde Ar¹ é um grupo arílico ou heteroarílico, estando Ar¹ opcionalmente substituído com um ou mais de: halo, , -R¹, -OR¹, -OC(=O)R¹, -OC(=O)OR¹, -OC(=O)NHR¹, -SR¹, -S(=O)R¹, -S(=O)₂R¹, -C(=O)R¹, -CO₂R¹, -C(=O)NHR¹, -NR¹R², -NHC(=O)R¹, -NHC(=O)NHR¹, -NHC(=O)OR¹ ou -NHS(=O)₂R¹.

Ar² é um grupo arílico ou heteroarílico, estando Ar² opcionalmente substituído com um ou mais de: halo, -R¹, -OR¹, -OC(=O)R¹, -OC(=O)OR¹, -OC(=O)NHR¹, -SR¹, -S(=O)R¹, -S(=O)₂R¹, -C(=O)R¹, -CO₂R¹, -C(=O)NHR¹, -NR¹R², -NHC(=O)R¹, -NHC(=O)NHR¹, -NHC(=O)OR¹ ou -NHS(=O)₂R¹.

Cada R¹ é, independentemente, hidrogénio ou um grupo substituído ou não substituído alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alcenilo, cicloalcenilo, heterocicloalcenilo, alcinilo, arilo ou heteroarilo.

Cada R² é, independentemente, hidrogénio ou um grupo substituído ou não substituído alquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, alcenilo, cicloalcenilo, heterocicloalcenilo, alcinilo, arilo ou heteroarilo.

Em determinadas circunstâncias, Ar¹ pode ser fenilo substituído ou não substituído. Ar² pode ser, independentemente, fenilo substituído ou não substituído. Ar¹ e Ar² podem ser, simultaneamente, fenilo substituído ou não substituído. Os substituintes podem ser fluoro, cloro, hidroxí, -CO₂H, -CO₂Me, -OMe, -CH₂OH ou formilo. R¹ pode ser alquilo inferior.

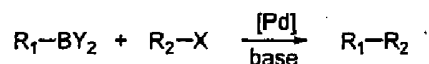
Os compostos podem ser utilizados na forma de sais farmacêuticamente aceitáveis derivados de ácidos e bases orgânicos ou inorgânicos. Estão incluídos entre esses sais de ácidos os seguintes: acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, benzenossulfonato, bissulfato, butirato, citrato, canforato, canforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanossulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemissulfato, heptanoato, hexanoato, cloridrato, bromidrato, iodidrato, 2-hidroxietanossulfonato, lactato, maleato, metanossulfonato, 2-naftalenossulfonato, nicotinato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato,

propionato, succinato, tartarato, tiocianato, tosilato e undecanoato. Os sais de bases incluem sais de amónio, sais de metais alcalinos, tais como sais de sódio e de potássio, sais de metais alcalino-terrosos, tais como sais de cálcio e de magnésio, sais de bases orgânicas, tais como sais de diciclohexilamina, N-metil-D-glucamina e sais de aminoácidos, tais como arginina, lisina e assim por diante. Igualmente, os grupos contendo azoto básico podem ser quaternizados com agentes tais como halogenetos de alquilo inferior, tais como cloretos, brometos e iodetos de metilo, etilo, propilo e butilo; sulfatos de dialquilo, tais como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo e diamilo, halogenetos de cadeia longa, tais como cloretos, brometos e iodetos de decilo, laurilo, miristilo e estearilo, halogenetos de aralquilo, tais como brometos de benzilo e de fenetilo e outros. São obtidos desse modo produtos solúveis ou dispersáveis em água ou óleo.

Os compostos podem estabilizar tetrâmeros de TTR e inibir a formação de amilóide de TTR. Os compostos podem ser análogos de diflunisal caracterizados por alterações estruturais subtis. Os compostos podem ser utilizados para avaliar relações de estrutura-actividade visto que pertencem à inibição de amilóide de TTR. Podem ser variados padrões de substituição e número de substituintes incluindo halogéneos, carboxilatos, acilo, alcoxi e hidroxilo. Dados de estrutura-actividade de outras classes de compostos revelam que um substituinte carboxilato ou um grupo análogo aniónico ou de ligações de H parece ser importante, possivelmente participando em interacções electrostáticas com os grupos amónio ϵ de Lys 15 e 15' ou interacções de ligações de hidrogénio com Ser 117 e 117', enquanto o anel hidrófobo substituído com halogéneo complementa as bolsas de ligação a halogéneo de TTR. Podem ser avaliados os arilos substituídos tanto com flúor como com cloro, incluindo 2-fluoro, 4-fluoro, 3,5-difluoro, 2,4-difluoro e 2,6-difluoro. Os grupos arilo substituídos com iodo podem ser menos desejáveis, em virtude da sua labilidade e potencial para actuarem como agonistas da tiroxina. O substituinte carboxilato (aniónico) pode estar ausente em alguns análogos, para avaliar a sua influência na inibição de fibrila e selectividade de ligação plasmática. Podem ser sintetizados compostos contendo uma funcionalidade aldeído ou álcool, para avaliar a influência de um aceitador ou dador de ligação de hidrogénio não carregado na

selectividade de ligação e inibição de fibrila amilóide. A forma gem-diol do aldeído pode ser a principal espécie de ligação.

Em geral, os compostos podem ser sintetizados através de métodos conhecidos na especialidade. Um método de preparação dos compostos é um acoplamento de Suzuki:



$BY_2 = B(OH)_2, B(OR)_2, 9\text{-BBN}, B(CHCH_3CH(CH_3)_2)_2$

$X = I, Br, Cl, OSO_2(C_nF_{2n+1}), n = 0, 1, 4$

$R_1 = \text{arilo, alcenilo, alquilo}$

$R_2 = \text{arilo, alcenilo, benzilo, alilo, alquilo}$

Por exemplo, um composto bifenílico pode ser formado através de um acoplamento de Suzuki de um ácido fenilborónico com um bromobenzeno ou um iodobenzeno. Podem ser necessários grupos protectores apropriados para evitar a formação de produtos secundários durante a preparação de um composto. Por exemplo, um substituinte amino pode ser protegido por um grupo protector amino adequado, tal como o trifluoroacetilo ou terc-butoxicarbonilo. Outros grupos protectores e condições reaccionais podem ser encontrados em T.W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, (3rd, 1999, John Wiley & Sons, New York, N.Y.).

Composições Farmacêuticas

Os compostos aqui descritos (e.g., análogos de diflunisal, bifenilos policlorados ou benzoxazoles) podem ser formulados em composições farmacêuticas que podem ser administradas oralmente, parentericamente, por pulverizador para inalação, topicamente, rectalmente, nasalmente, bucalmente, vaginalmente ou por meio de um reservatório implantado. O termo "parentérico", como aqui utilizado, inclui técnicas de injeção ou infusão subcutânea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intra-sinovial, intraesternal intratecal, intra-hepática, intralesional e intracraniana.

As composições farmacêuticas podem incluir qualquer dos compostos ou seus derivados farmacêuticamente aceitáveis,

juntamente com qualquer transportador farmacêuticamente aceitável. O termo "transportador" como aqui utilizado inclui adjuvantes e veículos aceitáveis. Os transportadores farmacêuticamente aceitáveis que podem ser utilizados nas composições farmacêuticas desta invenção incluem, mas não estão limitados a, permutadores iónicos, alumina, estearato de alumínio, lecitina, proteínas séricas, tal como albumina sérica humana, substâncias tampão, tal como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potássio, misturas de glicéridos parciais de ácidos gordos vegetais saturados, água, sais ou electrólitos, tais como sulfato de protamina, hidrogenofosfato dissódico, hidrogenofosfato de potássio, cloreto de sódio, sais de zinco, sílica coloidal, trissilicato de magnésio, polivinilpirrolidona, substâncias à base de celulose, polietilenoglicol, carboximetilcelulose sódica, poliacrilatos, ceras, polímeros de blocos de polietileno-polioxipropileno, polietilenoglicol e lanolina.

As composições farmacêuticas podem adoptar a forma de uma preparação injectável estéril, por exemplo, uma suspensão estéril injectável aquosa ou oleaginosa. Esta suspensão pode ser formulada de acordo com técnicas conhecidas na especialidade utilizando agentes dispersantes ou molhantes adequados e agentes de suspensão. A preparação injectável estéril pode ser, igualmente, uma solução ou suspensão injectável estéril num diluente ou solvente não tóxico parentericamente aceitável, por exemplo, sob a forma de uma solução em 1,3-butanodiol. Entre os veículos e solventes aceitáveis que podem ser empregados estão a água, solução de Ringer e solução isotónica de cloreto de sódio. Adicionalmente, óleos fixos estéreis são convencionalmente empregados como um meio solvente ou de suspensão. Para o efeito, qualquer óleo fixo brando pode ser empregado incluindo mono- ou diglicéridos sintéticos. Ácidos gordos, tais como ácido oleico e seus derivados glicéridos são úteis na preparação de injectáveis, tal como óleos naturais farmacêuticamente aceitáveis, tais como azeite ou óleo de rícino, especialmente nas suas versões polioxietiladas. Estas soluções ou suspensões oleosas podem conter, igualmente, um diluente ou dispersante alcoólico de cadeia longa.

As composições farmacêuticas podem ser administradas oralmente em qualquer forma de dosagem oralmente aceitável

incluindo, mas não limitada a cápsulas, comprimidos, suspensões ou soluções aquosas. No caso de comprimidos para utilização oral, os transportadores que são normalmente utilizados incluem lactose e amido de milho. Agentes lubrificantes, tais como estearato de magnésio, são também tipicamente adicionados. Para administração oral na forma de uma cápsula, os diluentes úteis incluem lactose e amido de milho seco. Quando são requeridas suspensões aquosas para utilização oral, o ingrediente activo é combinado com agentes emulsionantes e de suspensão. Se desejado, podem ser igualmente adicionados determinados agentes adoçantes, aromatizantes ou corantes.

Alternativamente, as composições farmacêuticas podem ser administradas na forma de supositórios para administração rectal. Estas podem ser preparadas misturando o agente com um excipiente não irritante adequado que é sólido à temperatura ambiente, mas líquido à temperatura rectal e, por conseguinte, derreterá no recto para libertar o fármaco. Tais materiais incluem manteiga de cacau, cera de abelhas e polietilenoglicóis.

As composições farmacêuticas podem ser, igualmente, administradas topicamente, especialmente quando o alvo do tratamento inclui áreas ou órgãos acessíveis sem dificuldade por aplicação tópica, incluindo doenças do olho, da pele ou do aparelho intestinal inferior. Formulações tópicas adequadas são preparadas sem dificuldade para cada uma destas áreas ou órgãos.

A aplicação tópica para o aparelho intestinal inferior pode ser efectuada numa formulação de supositório rectal (ver acima) ou numa formulação de enema adequada. Podem ser igualmente utilizados adesivos topicamente transdérmicos.

Para aplicações tópicas, as composições farmacêuticas podem ser formuladas numa pomada adequada, contendo o componente activo suspenso ou dissolvido num ou mais transportadores. Os transportadores para administração tópica dos compostos incluem, mas não estão limitados a, óleo mineral, parafina líquida, vaselina, propilenoglicol, polioxietileno, composto de polioxipropileno, cera emulsionante e água. Alternativamente, as composições farmacêuticas podem ser formuladas numa loção ou creme

adequados, contendo os componentes activos suspensos ou dissolvidos num ou mais transportadores farmacêuticamente aceitáveis. Os transportadores adequados incluem, mas não estão limitados a, óleo mineral, monoestearato de sorbitano, polissorbato 60, cera de ésteres cetílicos, álcool cetearílico, 2-octildodecanol, álcool benzílico e água.

Para utilização oftálmica, as composições farmacêuticas podem ser formuladas como suspensões micronizadas em solução salina estéril isotónica com pH ajustado ou, de um modo preferido, como soluções em solução salina estéril isotónica com pH ajustado, com ou sem um conservante, tal como cloreto de benzilalcónio. Alternativamente, para utilizações oftálmicas, as composições farmacêuticas podem ser formuladas numa pomada, tal como vaselina.

As composições farmacêuticas podem também ser administradas por aerossol ou inalação nasais através da utilização de um nebulizador, um inalador de pó seco ou um inalador de dose calibrada. Tais composições são preparadas de acordo com técnicas bem conhecidas na especialidade da formulação farmacêutica e podem ser preparadas como soluções em solução salina, empregando álcool benzílico ou outros conservantes adequados, promotores de absorção para melhorar a biodisponibilidade, fluorocarbonetos e/ou outros agentes solubilizantes ou dispersantes convencionais.

A quantidade de ingrediente activo que pode ser combinada com os materiais transportadores para produzir uma forma de dosagem individual irá variar, dependendo do hospedeiro tratado e do modo específico de administração. Contudo, deve ser entendido que uma dosagem e regime de tratamento específicos para qualquer doente particular dependerão de uma variedade de factores, incluindo a actividade do composto específico empregue, a idade, peso corporal, saúde geral, sexo, dieta, tempo de administração, taxa de excreção, combinação de fármacos e do parecer do médico assistente e da gravidade da doença particular que está a ser tratada. A quantidade de ingrediente activo pode igualmente depender do agente terapêutico ou profiláctico, se existir, com o qual o ingrediente é co-administrado.

Uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica é a quantidade que é requerida para conferir um efeito terapêutico

no paciente tratado e irá depender de uma variedade de factores, tais como a natureza do inibidor, o tamanho do paciente, o objectivo do tratamento, a natureza da patologia a tratar, a composição farmacêutica específica utilizada e o parecer do médico assistente. Para referência, ver Freireich *et al.*, *Cancer Chemother. Rep.* 1966, 50, 219 e Scientific Tables, Geigy Pharmaceuticals, Ardley, New York, 1970, 537. Podem ser úteis níveis de dosagem de entre cerca de 0,001 e cerca de 100 mg/kg de peso corporal por dia, entre cerca de 0,1 e cerca de 10 mg/kg de peso corporal por dia do composto ingrediente activo.

Os seguintes são exemplos da prática da invenção. Não se destinam a limitar de nenhum modo o âmbito da invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Prevenção da Doença Amilóide de Transtirretina através da Alteração da Energia do Enrolamento Proteínico Incorrecto

Centenas de doenças humanas, incluindo as amiloidoses, estão associadas ao enrolamento proteínico incorrecto. As 80 mutações familiares que exacerbam [por exemplo, Val30 → Met30 (V30M) e Leu55 → Pro55 (L55P)] ou melhoram [Thr119 → Met119 (T119M)] a patologia amilóide de transtirretina (TTR) proporcionam valiosos conhecimentos mecanicísticos. Todas as mutações associadas à doença caracterizadas até agora desestabilizam o tetrâmero de TTR e muitas influenciam a velocidade da dissociação do tetrâmero, limitante da taxa, em que taxas rápidas aceleram a amiloidose e taxas lentas retardam-na. Aproveitou-se o mecanismo pelo qual a T119M previne a doença em heterozigotos do composto V30M para desenvolver inibidores de amilóide de TTR de molécula pequena que retardavam drasticamente o evento inicial de enrolamento incorrecto (dissociação do tetrâmero) requerido para a desnaturação parcial do monómero, permitindo a montagem incorrecta em amilóide e outros agregados.

Os tetrâmeros híbridos foram isolados para mais bem compreender o mecanismo de trans-supressão. O aumento da estequiometria da subunidade T119M relativamente a V30M [ou L55P] deslocou o máximo da formação de fibrila mediada por ácido para um pH inferior, diminuiu o rendimento global de

amilóide a valores de pH fisiologicamente acessíveis ($> 4,0$) e abrandou a taxa de amiloidogénese induzida por ácido (pH 4,4) e mediada por metanol. Foram identificados diversos inibidores de fibrila amilóide de TTR de molécula pequena, um subconjunto dos quais foi aqui estudado, incluindo dois fármacos aprovados pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) (inibidores 8 e 10) (Sacchettini *et al.*, *Nature Rev. Drug Discovery* 1, 267 (2002)). A influência da ligação do inibidor de molécula pequena no rendimento e na taxa de formação de fibrila de TTR de tipo selvagem (WT) foi semelhante à da incorporação da subunidade T119M. Contudo, o deslocamento para um óptimo de pH inferior para a formação de fibrila não foi observado com todos os inibidores. Estes inibidores funcionam através de ligação aos dois locais de tiroxina (T4) equivalentes dentro do tetrâmero de TTR, não ao monómero.

As taxas de dissociação do tetrâmero foram medidas através da ligação de alterações estruturais quaternárias lentas à transição de desenrolamento, com uma taxa de 5×10^5 vezes a da dissociação (Hammarström *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16427 (2002)). A dissociação detectada por desnaturação é irreversível porque a concentração de ureia utilizada ($> 6,0$ M) não suporta o reenrolamento. O aumento da estequiometria da subunidade T119M relativamente às subunidades V30M [ou L55P] revelou uma drástica diminuição da taxa de dissociação do tetrâmero de TTR ($1,8 \mu\text{M}$) (limitante para a amiloidogénese) em três diferentes ambientes de desnaturação (pH ácido, metanol aquoso ou ureia), explicando a origem da prevenção da doença.

Medições da taxa de dissociação do tetrâmero de TTR WT ($1,8 \mu\text{M}$) na presença dos inibidores 6 a 10 ($1,8$ e $3,6 \mu\text{M}$) mostraram um abrandamento dependente da dose para todos os complexos TTR-inibidor. A taxa inicial de dissociação do tetrâmero foi, aproximadamente, inversamente proporcional à fracção molar do tetrâmero ligado a dois inibidores ($T \cdot I_2$). No caso dos inibidores 6, 7 e 9 ($1,8 \mu\text{M}$), a amplitude da exponencial simples correlacionou-se principalmente com a dissociação do tetrâmero sem ligando (e, em menor escala, $T \cdot I$), implicando que $T \cdot I_2$ preveniu a dissociação do tetrâmero em ureia 6 M. Em contrapartida, a formação de $T \cdot I$ e $T \cdot I_2$ para os inibidores 8 e 10 não protegeu substancialmente o tetrâmero da dissociação em ureia, revelando que apenas a ligação era

insuficiente. A inibição eficiente observada no caso de 6, 7 e 9 ($3,6 \mu\text{M}$) resultou da energia de ligação que estabilizou o complexo $\text{T} \cdot \text{I}_2$ com energias livres excedendo $2,3 \text{ kcal/mol}$ ($\Delta G_1 = RT \ln([T \cdot I]/[T]) = RT \ln([I]/K_{d1})$ e $\Delta G_2 = RT \ln([T \cdot I_2]/[T]) = RT \ln\{[I]^2/(K_{d1} \cdot K_{d2})\}$). A estabilização de $\text{T} \cdot \text{I}_2$ relativamente a T por $2,7 \text{ kcal/mol}$ teria como resultado, uma diminuição de duas ordens de grandeza na taxa de dissociação do tetrâmero de TTR. A forte ligação negativamente cooperativa dos inibidores 8 e 10 ($3,6 \mu\text{M}$) estipula que a ligação ao segundo local ($\text{T} \cdot \text{I}_2$, constantes de dissociação EM μM) não estabilizaria adicionalmente a TTR relativamente à ligação ao primeiro local ($\text{T} \cdot \text{I}$). As constantes de dissociação em nM (K_{d1} e K_{d2}) dos inibidores 6, 7 e 9 garantiriam que a estabilização do estado fundamental ($>2,3 \text{ kcal/mol}$) seria suficiente para aumentar substancialmente a barreira de activação para a dissociação do tetrâmero de TTR, desde que os inibidores não se ligassem e similarmemente estabilisassem o estado de transição dissociativo. As taxas de dissociação do inibidor do complexo $\text{T} \cdot \text{I}_2$ e $\text{T} \cdot \text{I}$ podem igualmente desempenhar um papel na eficácia dos inibidores 6, 7 e 9. A TTR saturada com inibidor foi imobilizada por uma resina com anticorpos, sobre a qual foi passado tampão aquoso a $5,0 \text{ mL/min}$ para avaliar as taxas efectivas de dissociação de 6 a 10. Os melhores inibidores foram aqueles com as taxas de dissociação aparentes mais baixas.

Embora haja, geralmente, uma correlação muito boa entre as taxas de amiloidogénese (condições ácidas) e as taxas de dissociação do tetrâmero (em ureia) na presença de inibidores, não tem de ser assim. A amiloidogénese requer uma montagem incorrecta, dependente da concentração, após a dissociação. Deste modo, moléculas pequenas serão geralmente mais eficazes na prevenção da formação de fibrila do que a dissociação do tetrâmero, especialmente quando o inibidor consegue manter a concentração do intermediário amiloidogénico monomérico baixa ($<3,6 \mu\text{M}$), onde a formação de fibrila é muito ineficiente. Ocasionalmente, as taxas de dissociação do tetrâmero em ureia não irão prever com precisão a ordem de classificação da eficácia do inibidor sob condições ácidas. Por exemplo, o fármaco aprovado pela FDA diflunisal (8) foi um inibidor de amilóide muito melhor do que um inibidor da dissociação do tetrâmero. Uma explicação provável para esta observação é que K_{d1} e/ou K_{d2} são mais baixas em ácido do que em ureia (18).

Adicionalmente, alguns inibidores têm um desempenho muito melhor sob condições desnaturantes do que permitiriam supor as suas constantes de ligação determinadas sob condições fisiológicas. Por exemplo, o composto 9 foi mais ou igualmente eficiente a prevenir a dissociação do tetrâmero (ureia) e a formação de fibrila (ácido) do que o inibidor 7, apesar de o inibidor 9 ter valores de K_{d1} e K_{d2} que eram 10 e 83 vezes os de 7, respectivamente, (medidos sob condições fisiológicas). Deste modo, é importante avaliar a eficácia dos inibidores do enrolamento incorrecto sob uma variedade de condições desnaturantes e não apenas sob condições fisiológicas.

A inclusão de subunidades trans-supressoras de T119M em tetrâmeros, de outro modo compostos por subunidades associadas a doença, poderia diminuir a taxa de dissociação do tetrâmero por estabilização do estado fundamental tetramérico numa maior extensão do que o estado de transição (como é o caso dos inibidores de molécula pequena) e/ou por desestabilização do estado de transição da dissociação. Para distinguir entre estas possibilidades, compararam-se as cinéticas de reconstituição dos homotetrâmeros WT e T119M. O reenrolamento de monómeros de T119M foi rápido e dentro do erro da taxa de enrolamento de monómeros de TTR WT. Contudo, a re-montagem de monómeros enrolados de T119M foi duas ordens de grandeza mais lenta do que a tetramerização de monómeros de TTR WT iniciada por diluição em ureia. O processo de re-montagem é bifásico, o que pode ser explicado pela presença de um intermediário observável na via de montagem (provavelmente um dímero). Na direcção oposta, o tetrâmero de T119M dissocia-se a 1/37 da taxa exibida pelo tetrâmero de TTR WT. Estes efeitos cinéticos não podem ser atribuídos a diferenças na estabilidade da estrutura terciária e/ou estabilidade do tetrâmero. Uma comparação directa da estabilidade termodinâmica dos monómeros de WT e T119M (empregando uma construção de TTR monomérica manipulada (M-TTR)) revelou uma diferença no Delta de energia livre, ΔG , para o desenrolamento de apenas 0,4 kcal/mol, muito inferior às 2,1 e 2,7 kcal/mol requeridas para explicar as diferenças de taxas de dissociação e montagem, respectivamente. Uma análise do ciclo termodinâmico da TTR T119M e WT revelou que a T119M previne a dissociação do tetrâmero por desestabilização do estado de transição da dissociação em aprox. 3,1 kcal/mol, não por estabilização do tetrâmero. De acordo com esta análise, o tetrâmero de T119M é,

na verdade, desestabilizado em 0,9 kcal/mol relativamente a WT, corroborando adicionalmente um mecanismo de estabilização cinética. A diferença de energia livre entre a dissociação do tetrâmero de WT e de T119M não pode ser medida através do desenrolamento mediado por ureia porque a desnaturação de T119M em ureia requer períodos de incubação extremamente longos (várias semanas), durante os quais a TTR se modifica. Comparações de curvas de desnaturação em cloreto de guanidínio (GdmCl) e tiocianato de guanidínio (GdmSCN) revelaram que a TTR WT era mais resistente a desnaturação em GdmCl do que a T119M, ao passo que o oposto era verdade em GdmSCN. Estas diferenças nos pontos médios de desnaturação podem ser atribuídas a estabilização aniônica diferencial, sugerindo que as verdadeiras estabilidades termodinâmicas destas proteínas são muito semelhantes, embora uma análise quantitativa não seja possível nestes caotropsos.

A trans-supressão de T119M é mediada, principalmente, por desestabilização do estado de transição dissociativo, consistente com o posicionamento de T119M na interface dímero-dímero. O aumento da energia do estado de transição dissociativo em 3,1 kcal/mol previne eficazmente a dissociação do tetrâmero porque a barreira de activação se torna intransponível (a semivida de dissociação $t_{1/2}$ aumenta de aprox. 42 horas para >1500 horas). A ligação de moléculas pequenas aumenta do mesmo modo a barreira de activação associada à dissociação do tetrâmero de um modo dependente da dose, embora esta seja mediada através de estabilização do tetrâmero (relativamente à estabilização do estado de transição). A extensão da estabilização é máxima quando as constantes de dissociação de moléculas pequenas $Kd1$ e $Kd2$ são tão baixas quanto possível e a concentração de inibidor é tão alta quanto possível. As concentrações utilizadas nas nossas experiências de estabilização do estado fundamental são comparáveis às observadas no plasma para numerosos fármacos disponíveis por via oral.

A ligação e trans-supressão de moléculas pequenas aumentam a energia de activação associada à dissociação do tetrâmero, a etapa limitante da taxa da formação de fibrila de TTR. Estabelecer esta analogia é importante porque se sabe que a trans-supressão previne a doença em heterozigotos de composto V30M. A estabilização cinética do estado nativo é uma

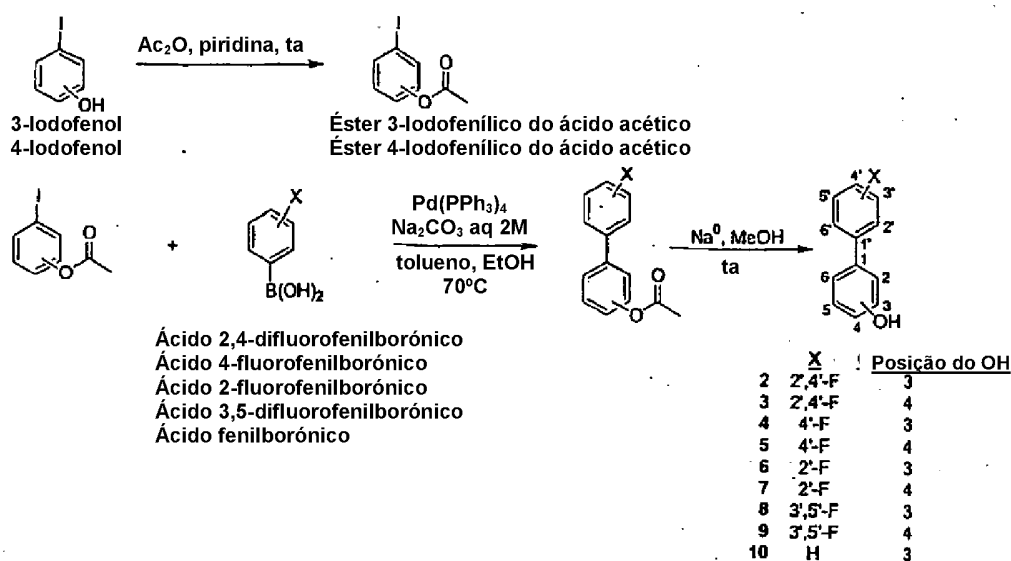
estratégia particularmente atractiva, considerando as provas emergentes de que pequenos oligómeros enrolados incorrectamente são neurotóxicos. Deverá ser agora considerada a identificação de ligantes de molécula pequena ou o desenvolvimento de uma abordagem de trans-supressão para afinar o panorama energético de outras proteínas patologicamente relevantes com uma predilecção para o enrolamento incorrecto.

Exemplo 2: Análogos de Diflunisal Estabilizam o Estado Nativo da Transtirretina e são Inibidores da Formação de Fibrila Amilóide de Transtirretina

O diflunisal (1) pode reduzir a amiloidogénese de Transtirretina (TTR). Por exemplo, sob determinadas condições (e.g., TTR 3,6 μ M, diflunisal a 3,6 μ M, pH 4,4, 72 h, 37°C), o diflunisal reduz a amiloidogénese de TTR em 63%. Nestas condições, a duplicação da concentração de diflunisal (para 7,2 μ M) reduz a amiloidogénese em 97%. O diflunisal é um dos melhores inibidores da fibrila amilóide relatados até à data e o diflunisal administrado oralmente é altamente biodisponível, proporcionando uma concentração plasmática sustentada superior a 100 μ M com uma dose de 250 mg duas vezes por dia. Porque o diflunisal é um inibidor da ciclo-oxigenase-2, a administração prolongada poderia conduzir a efeitos secundários gastrointestinais. São, por conseguinte, opcionalmente desejáveis análogos de diflunisal que tenham actividade de AINE reduzida ou ausente, mas possuam elevada afinidade para TTR no plasma sanguíneo. A estrutura do diflunisal pode, por conseguinte, ser utilizada como base para a concepção de novos compostos que consigam inibir a amiloidogénese de TTR. Ver, por exemplo, Verbeeck, R.K.; et al., *Biochem. Pharm.* **1980**, 29, 571-576; e Nuernberg, B.; Koehler, G.; Brune, K. *Clin. Pharmacokin.* **1991**, 20, 81-89.

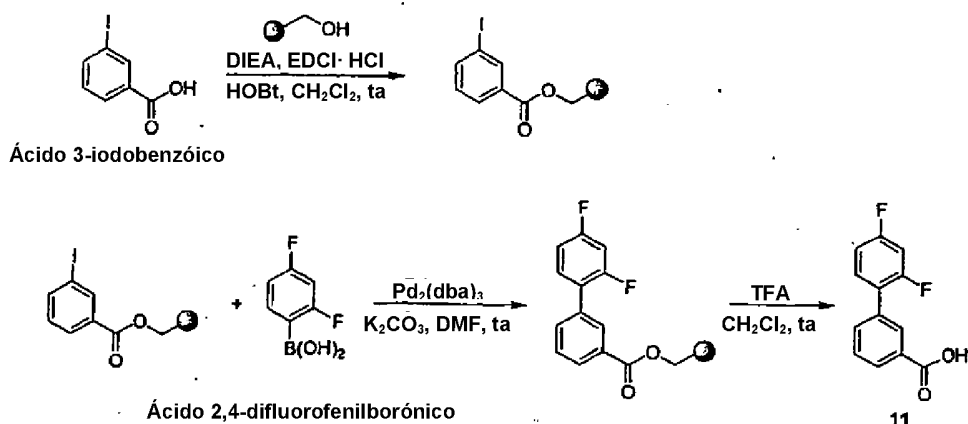
Foram sintetizados análogos de diflunisal utilizando um acoplamento de Suzuki mediado por Pd entre um halogeneto de arilo e um ácido arilborónico. A síntese dos análogos **2-10** foi realizada por acetilação de 3- ou 4-iodofenol com anidrido acético e piridina, seguida de acoplamento de Suzuki com o ácido fluorofenilborónico apropriado sob as condições padrão da reacção de acoplamento de Suzuki, tal como apresentado no Esquema 1. A remoção do éster com Na⁰ e MeOH (condições de

Zemplén) proporcionou os fenóis 2-10. Ver, por exemplo, Miyaoura, N.; Yanagi, T.; Suzuki, A. *Synth. Commun.* **1981**, 11, 513-519; Sharp, M.J.; Snieckus, V. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 5997-6000; Sharp, M.J.; Cheng, W.; Snieckus, V. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 5093-5096; Pozsgay, V.; Nanasi, P.; Neszmelyi, A. *Carbohydr. Res.* **1981**, 90, 215-231; Jendralla, H.; Chen, L.-J. *Synthesis* **1990**; 827-833; e Kelm, J.; Strauss, K. *Spectrochim. Acta, Part A* **1981**, 37, 689-692, cada um incorporado por referência na sua totalidade. *Acta, Part A* **1981**, 37, 689-692, cada um incorporado por referência na sua totalidade.



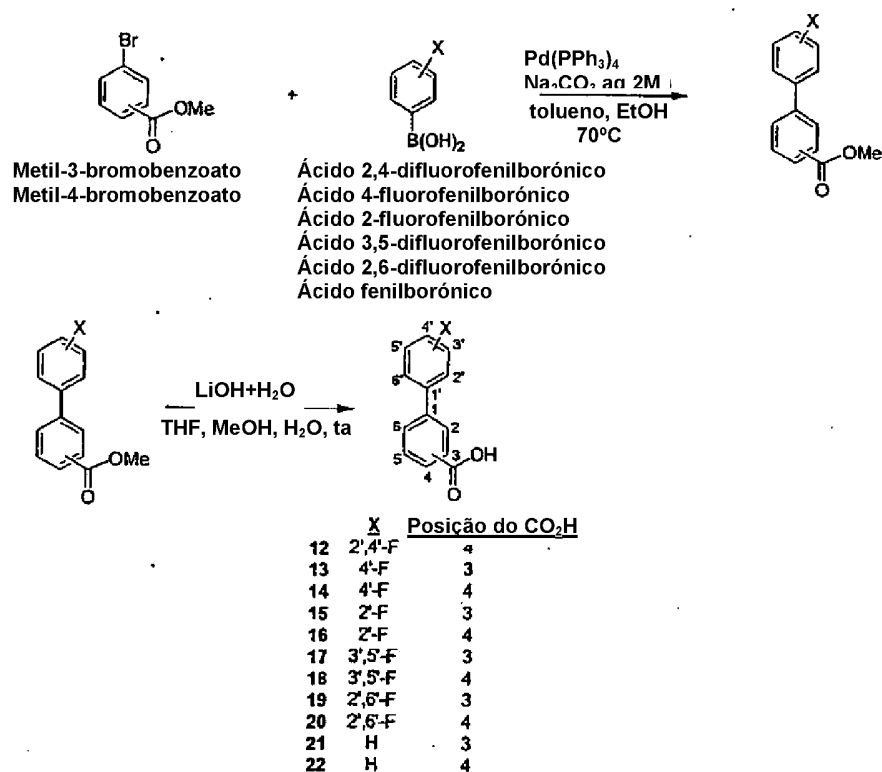
Esquema 1

O análogo de diflunisal **11** foi sintetizado utilizando métodos em fase sólida, tal como apresentado no Esquema 2. O ácido 3-iodobenzóico foi acoplado a resina de Wang por via de uma ligação éster, proporcionando o feniliodeto ligado à resina, que foi em seguida acoplado a ácido 2,4-difluorofenilborónico e clivado da resina com uma mistura 1:1 de TFA:CH₂Cl₂. Ver, por exemplo, Guiles, J.W.; Johnson, S.G.; Murray, W.V. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 5169-5171, que é incorporado por referência na sua totalidade.



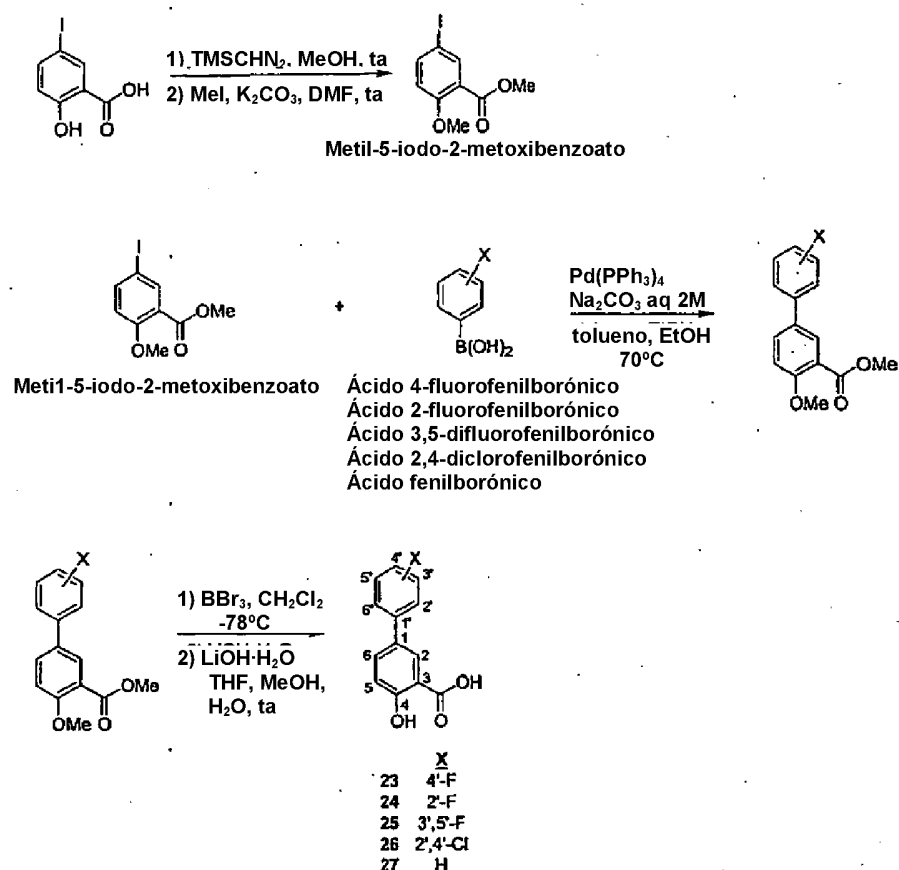
Esquema 2

Os substratos 12-22 contendo carboxilato foram montados por acoplamento de metil-3-bromobenzoato ou metil-4-bromobenzoato (ambos comercialmente disponíveis) com o ácido fluorofenilborónico apropriado utilizando condições padrão de acoplamento de Suzuki (ver anteriormente), tal como apresentado no Esquema 3. O éster foi em seguida saponificado com $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ para produzir o carboxilato correspondente. Ver, por exemplo, Bumagin, N.A.; Bykov, V.V. *Tetrahedron* **1997**, 53, 14437-14450; Ananthakrishnanadar, P.; Kannan, N. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1982**, 1305-1308; Homsí, F.; Nozaki, K.; Hiyama, T. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 5869-5872; e Hajduk, P.J.; et al. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 3144-3150, cada um incorporado como referência na sua totalidade.



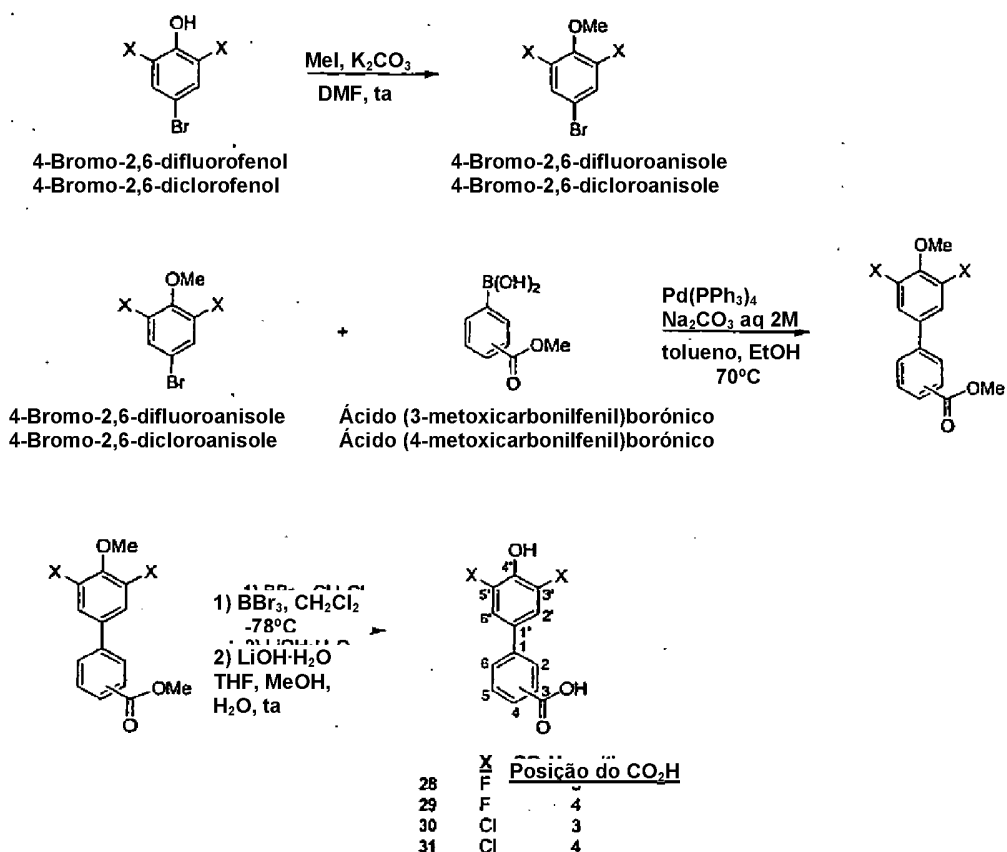
Esquema 3

Esterificou-se ácido 5-iodossalicílico utilizando TMS-CH₂N₂ e converteu-se o fenol num éter metílico empregando MeI. O ácido salicílico protegido foi acoplado aos vários ácidos fluorofenilborónicos e subsequentemente desprotegeu-se por saponificação com LiOH·H₂O e desmetilação com BBr₃ para produzir os derivados de ácido salicílico **23-27**, tal como apresentado no Esquema 4. Ver, por exemplo, Nicolaou, K.C.; et al. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2602-2621; e Chu-Moyer, M.Y.; et al. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 511-528.



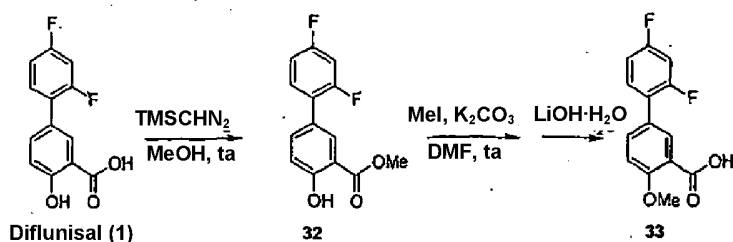
Esquema 4

Os análogos **28-31** contendo 3',5'-di-halo-4'-hidroxilo foram sintetizados protegendo em primeiro lugar o bromofenol comercialmente disponível na forma do éter metílico (MeI e K₂CO₃). O acoplamento de Suzuki com um ácido (metoxycarbonilfenil)borónico deu origem na formação dos substratos bifenílicos totalmente protegidos. A clivagem do éter metílico mediada por BBr₃ e a saponificação com LiOH·H₂O produziram os análogos de diflunisal **28-31** totalmente funcionalizados, tal como apresentado no Esquema 5.



Esquema 5

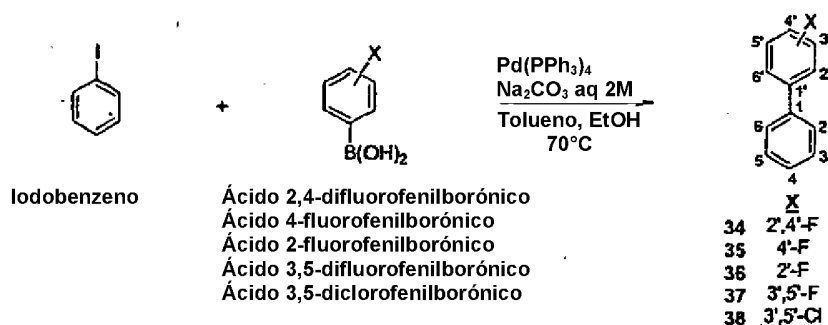
Os análogos éter metílico e éster metílico de diflunisal foram sintetizados por esterificação do ácido carboxílico com TMS-diazometano para produzir **32**, opcionalmente seguida de eterificação com MeI e K_2CO_3 e hidrólise do éster com $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ para produzir **33**. Ver Esquema 6.



Esquema 6

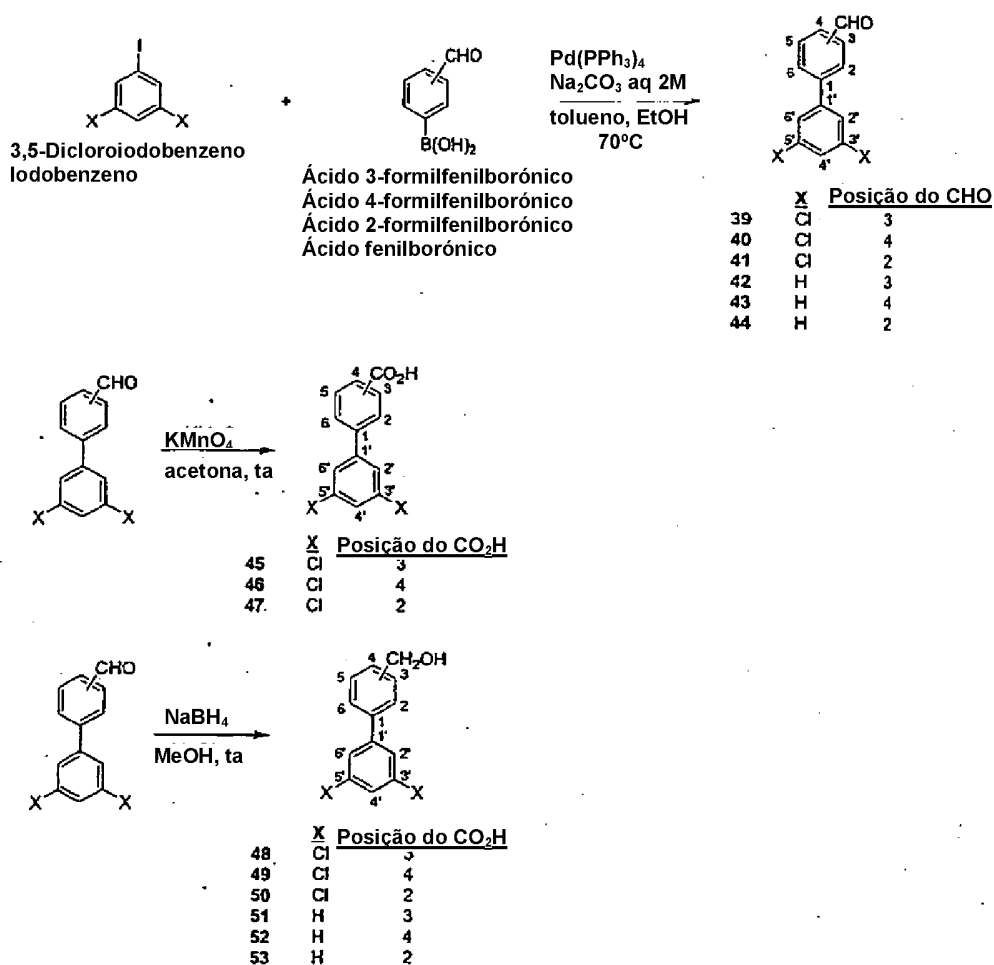
Uma série de bifenilos halogenados **34–38** foram montados por acoplamento de Suzuki de iodobenzeno com uma série de ácidos borónicos contendo halogéneo, tal como apresentado no Esquema 7. Ver, por exemplo, Patrick, T.B.; Willaredt, R.P. DeGonia, D.J. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2232–2235; Kuchar, M.;

et al. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1988**, 53, 1862-1872; Allen, K.J.; Bolton, R.; Williams, G.H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1983**, 691-695; Nakada, M.; *et al.* *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, 62, 3122-3126; e Weingarten, H. *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 730-733, cada um incorporado por referência na sua totalidade.



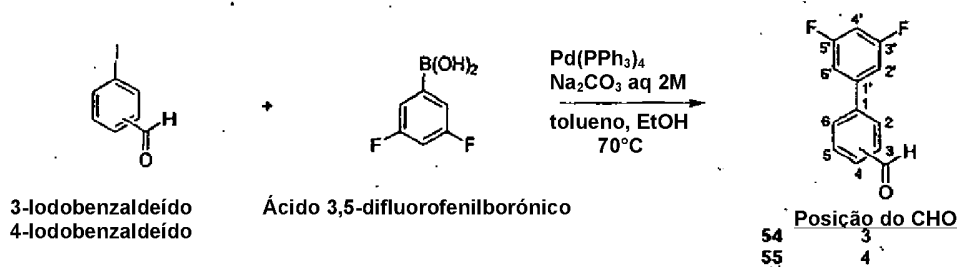
Esquema 7

Os aldeídos biarílicos clorados foram montados utilizando 3,5-dicloro-iodobenzeno e ácido 2-, 3- ou 4-formilfenilborónico, tal como apresentado no Esquema 8. Os aldeídos **42-44**, que não têm a substituição de halogéneo, foram preparados analogamente. Os aldeídos **39-41** foram oxidados com KMnO_4 em acetona/água para produzir os correspondentes ácidos carboxílicos **45-47** ou reduzidos com NaBH_4 em MeOH para produzir os correspondentes álcoois benzílicos **48-50**, Esquema 8. A redução dos aldeídos não clorados **42-44** com NaBH_4 e MeOH produziu os álcoois bifenilbenzílicos **51-53**. Ver, por exemplo, Song, X.P.; He, H.T.; Siahaan, T.J. *Org. Lett.* **2002**, 4, 549-552; e Nicolaou, K.C.; *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 9313-9323; Hashizume, H.; *et al.* *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, 42, 512-520; Indolese, A.F. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3513-3516; Pridgen, L.N.; Snyder, L.; Prol, J. *J Org Chem.* **1989**, 54, 1523-1526; Huang, C.G.; Beveridge, K.A.; Wan, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7676-7684; Wendeborn, S.; *et al.* *Synlett.* **1998**, 6, 671-675; Stevens, C.V.; Peristeropoulou, M.; De Kimpe, N. *Tetrahedron* **2001**, 57, 7865-7870; Tanaka, K.; Kishigami, S.; Toda, F. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 2981-2983; e Clive, D.L.J.; Kang, S.Z. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 6083-6091, cada um incorporado por referência na sua totalidade.



Esquema 8

Os bifenilos funcionalizados com 3',5'-difluoroformilo **54** e **55** foram sintetizados por meio de acoplamento de Suzuki de ácido 3,5-difluorofenilborónico com 2- ou 3-iodobenzaldeído, tal como apresentado no Esquema 9. Todos os outros inibidores foram sintetizados através de métodos semelhantes e referidos anteriormente. Os compostos **10**, **21**, **35**, **36** e **43** estão comercialmente disponíveis.



Esquema 9

Os reagentes e solventes foram adquiridos a Aldrich, Lancaster, Acros, Combi-Blocks, Matrix e Pfaltz-Bauer. O THF e o CH_2Cl_2 foram secos por passagem sobre Al_2O_3 . Outros solventes e reagentes foram obtidos de fornecedores comerciais e foram utilizados sem purificação adicional, salvo nota em contrário. As reacções foram monitorizadas por cromatografia em camada fina (TLC) analítica sobre placas pré-revestidas de sílica gel 60 F254 com indicador fluorescente adquirido a EM Science. A visualização das placas de TLC foi levada a cabo por iluminação UV, tratamento com ácido fosfomolibdico seguido de aquecimento ou tratamento com molibdato de amónio cérico seguido de aquecimento. A cromatografia *flash* foi realizada utilizando sílica gel 60 (malha de 230-400 *mesh*) da EM Science. A pureza de novos compostos que era essencial para as conclusões tiradas no texto foi determinada por HPLC. A HPLC de fase normal foi realizada com uma bomba/controlador Waters 600, um detector matricial de fotodiodo Waters 996 e uma coluna de sílica NovaPak da Waters. O sistema de solventes empregue foi hexanos e acetato de etilo e os gradientes foram corridos desde 50:50 de hexanos:acetato de etilo até 0:100 de hexanos:acetato de etilo ao longo de 30 min. A HPLC de fase inversa foi realizada com uma bomba/controlador Waters 600, um detector de duplo comprimento de onda Waters 2487 e uma coluna Vydac de proteína e C18 de péptido. O sistema de solventes A era 95:5 de água:acetonitrilo com 0,5% de ácido trifluoroacético e o de solventes B era 5:95 de água:acetonitrilo com 0,5% de ácido trifluoroacético. Os gradientes foram corridos desde 100:0 de A:B até 0:100 de A:B ao longo de 20 min com uma manutenção a 100% de B durante 10 min adicionais. A espectroscopia de dicroísmo circular foi realizada num espectrómetro da AVIV Instruments, modelo 202SF. Os espectros de RMN foram registados num espectrómetro de RMN Varian FT a uma frequência protónica de 400 MHz. Os desvios químicos do protão são apresentados em partes por milhão (ppm) com referência a CHCl_3 como padrão de desvio químico interno (7,26 ppm), salvo nota em contrário. As constantes de acoplamento são apresentadas em hertz (Hz). Os desvios químicos do carbono são apresentados em partes por milhão (ppm) com referência a CDCl_3 como padrão de desvio químico (77,23 ppm), salvo nota em contrário. Todos os espectros de massa foram obtidos no The Scripps Research Institute Center

for Mass Spectrometry ou na University of Illinois Mass Spectrometry Laboratory.

Os compostos **2-10** foram preparados de acordo com o Esquema 1. A uma solução do éster iodofenílico de ácido acético apropriado (1,0 equiv) dissolvido em tolueno suficiente para proporcionar uma concentração de 0,05 M, foi adicionada uma solução de ácido fenilborónico (1,1 equiv) dissolvido em EtOH para proporcionar uma solução 0,6 M em relação ao ácido borónico. Uma solução aquosa a 2 M de Na₂CO₃ foi adicionada para proporcionar uma concentração final de reacção de 0,03 M em relação ao éster iodofenílico de ácido acético, seguida de adição de Pd(PPh₃)₄ (4,0% mol). A mistura reaccional foi aquecida em refluxo sob Ar durante 20 h e, após conclusão da reacção, foi arrefecida até à temperatura ambiente (t.a.) e extractada com CH₂Cl₂ (2x), lavada com salmoura (1x), seca sobre MgSO₄ e concentrada *in vacuo*. O resíduo foi purificado por cromatografia *flash* (hexano:acetato de etilo 10:1) para produzir o bifenilo acetilado.

Adicionou-se uma quantidade catalítica de Na⁰ a uma solução do bifenilo acetilado em MeOH para proporcionar uma concentração final de reacção de 0,3 M. Deixou-se a mistura reaccional a agitar à t.a. sob Ar durante 12 h, após o que foi adicionada resina de permuta catiónica Dowex 50W-X8 para neutralizar a mistura reaccional. A resina foi filtrada e o filtrado foi concentrado *in vacuo* e submetido a cromatografia *flash* (hexano:acetato de etilo 3:1) para produzir os produtos hidroxibifenílicos sob a forma de sólidos brancos com rendimentos de 22 - 75%.

2',4'-Difluorobifenil-3-ol (2). ¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 9,63 (s lg, 1H), 7,54 (td, 1H, *J* = 8,9, 6,7 Hz), 7,34 (ddd, 1H, *J* = 11,1, 9,2, 2,6 Hz), 7,27 (m, 1H), 7,17 (tdd, 1H, *J* = 8,3, 2,6, 1,2 Hz), 6,92 (m, 2H), 6,81 (ddd, 1H, *J* = 8,1, 2,5, 1,0 Hz). ¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz) δ 162,8, 160,3, 157,4, 135,4, 131,8, 129,7, 119,4, 115,6, 114,9, 111,9, 104,4. HRESIMS calculado para C₁₂H₈F₂O (M-H) 205,0466, determinado 205,0465. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 10,5 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 1,3 min. >99% puro.

2',4'-Difluorobifenil-4-ol (3). ¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 7,49 (td, 1H, *J* = 9,4, 8,6 Hz), 7,34 (AA'XX',

2H, $J_{AA'} = J_{XX'} = 2,5$ Hz, $J_{XA} = 8,7$ Hz, $J_{X'A'} = 8,5$ Hz, $J_{X'A} = 0,3$ Hz, $J_{XA'} = 0,3$ Hz, $\nu_A = \nu_{A'} = 2934,1$ Hz, $\nu_X = \nu_{X'} = 2746,2$ Hz), 7,28 (ddd, 2H, $J = 11,3, 9,4, 2,6$ Hz), 7,13 (dddd, 1H, $J = 8,3, 7,5, 2,8, 1,0$ Hz), 6,87 (AA'XX', 2H, como acima). ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 162,3, 160,0, 157,2, 131,4, 129,9, 124,8, 115,4, 111,8, 104,3. HRESIMS calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}$ (M-H) 205,0464, determinado 205,0465. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 11,2 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 12,6 min. > 98% puro.

3',5'-Difluorobifenil-3-ol (8). ^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 9,65 (s lg, 1H), 7,34 (m, 2H), 7,28 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz), 7,19 (tt, 1H, $J = 9,1, 2,2$ Hz), 7,13 (ddd, 1H, $J = 7,8, 1,8, 1,0$ Hz), 7,08 (t, 1H, $J = 2,1$ Hz), 6,86 (ddd, 1H, $J = 8,0, 2,4, 1,0$ Hz). ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 162,9, 158,0, 144,1, 139,1, 130,1, 117,6, 115,7, 109,7, 102,6. HRESIMS calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}$ (M-H) 205,0465, determinado 205,0468. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 11,4 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 12,9 min. > 99% puro.

3',5'-Difluorobifenil-4-ol (9). ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7,44 (AA'XX', 2H, $J_{AA'} = J_{XX'} = 3,0$ Hz, $J_{XA} = 8,0$ Hz, $J_{X'A'} = 8,5$ Hz, $J_{X'A} = 0,7$ Hz, $J_{XA'} = 0,5$ Hz, $\nu_A = \nu_{A'} = 2973,8$ Hz, $\nu_X = \nu_{X'} = 2766,0$ Hz), 7,05 (dtd, 2H, $J = 6,6, 2,4, 0,7$ Hz), 6,92 (AA'XX', 2H, como acima), 6,74 (tt, 1H, $J = 8,9, 2,4$ Hz), 5,11 (s, 1H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ 164,7, 156,1, 144,2, 131,8, 128,6, 116,1, 109,6, 102,1. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_2$ (M-H) 205,0465, determinado 205,0465. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 10,8 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 12,9 min. > 99% puro.

Ácido 2',4'-Difluorobifenil-3-carboxílico (11). O composto 11 foi preparado de acordo com o Esquema 2. Ácido 3-iodobenzóico (200 mg, 0,81 mmol), DIEA (140 μL , 0,81 mmol), EDCI·HCl e HOBt, foram adicionados a uma solução de resina de Wang (265 mg, 0,67 mmol, 2,53 mmol/g) intumescida em CH_2Cl_2 (10 mL). Após agitação rigorosa num agitador de péptidos durante 22 h à t.a., o solvente foi removido e a resina foi lavada com DMF (3 x 10 mL) e CH_2Cl_2 (3 x 10 mL) e seca exhaustivamente *in vacuo*.

Ácido 2,4-difluorofenilborónico (112 mg, 0,71 mmol), K_2CO_3 (98 mg, 0,71 mmol) e $\text{Pd}(\text{dba})_3$ (4 mg, 0,01 mmol) foram adicionados a uma solução de resina de Wang funcionalizada

(140 mg, 0,35 mmol) intumescida em DMF (2 mL). Após agitação à t.a., a mistura reaccional foi filtrada e a resina foi lavada com DMF (3x), H₂O (3x), CH₂Cl₂ (3x) e MeOH (3x) e seca exhaustivamente *in vacuo*.

Uma solução de TFA:CH₂Cl₂ (3 mL, 1:1) foi adicionada a resina funcionalizada (140 mg, 0,35 mmol) e agitada vigorosamente num agitador de péptidos durante 13 h à t.a.. Após conclusão da reacção, a mistura reaccional foi filtrada, a resina foi lavada com CH₂Cl₂ (3x), o filtrado foi concentrado *in vacuo* e purificado por cromatografia *flash* (hexano:acetato de etilo 2:1, 0,5% de ácido acético) para produzir **11** (81 mg, 100%) sob a forma de um sólido branco. ¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 13,19 (s lg, 1H), 8,07 (q, 1H, *J* = 1,7 Hz), 7,99 (dt, 1H, *J* = 7,9, 1,6 Hz), 7,78 (dq, 1H, *J* = 7,8, 1,3 Hz), 7,64 (m, 2H), 7,40 (ddd, 1H, *J* = 11,1, 8,8, 2,5 Hz), 7,22 (tdd, 1H, *J* = 8,4, 2,8, 1,0 Hz). ¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz) δ 167,0, 160,7, 160,4, 134,5, 133,0, 132,0, 131,3, 129,4, 129,1, 128,7, 123,9, 112,2, 104,6. HRESIMS calculado para C₁₃H₈F₂O₂ (M-H) 233,0414, determinado 233,0426. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 13,7 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 12,5 min. >99% puro.

Os compostos **12-22** foram preparados de acordo com o Esquema 3. A uma solução do bromobenzoato de metilo apropriado (1,0 equiv) dissolvido em tolueno suficiente para proporcionar uma concentração de 0,1 M, foi adicionada uma solução de ácido fenilborónico (2,0 equiv) dissolvido em EtOH para proporcionar uma solução a 1,0 M de ácido borónico. Uma solução aquosa 2 M de Na₂CO₃ foi adicionada para proporcionar uma concentração final de reacção de 0,06 M em relação ao bromobenzoato, seguida de adição de Pd(PPh₃)₄ (10,0% mol). A mistura reaccional foi agitada a 70°C sob Ar durante 25 h e, após conclusão da reacção, foi arrefecida até à t.a. e extractada com CH₂Cl₂ (2x), lavada com salmoura (1x), seca sobre MgSO₄ e concentrada *in vacuo*. O resíduo foi purificado por cromatografia *flash* (hexano:acetato de etilo 10:1) para produzir o éster metílico.

A uma solução de éster metílico (1,0 equiv) em THF:MeOH:H₂O (1:1:1) numa concentração de 0,06 M, foi adicionado LiOH·H₂O (3,0 equiv). A mistura reaccional foi agitada à t.a. durante 4 h e, após conclusão da reacção, foi

acidificada com HCl a 30%, extractada com acetato de etilo (3 x 5 mL), seca sobre MgSO_4 e concentrada *in vacuo*. O resíduo foi purificado por cromatografia *flash* (CH_2Cl_2 , MeOH a 1%, ácido acético a 0,2%) para produzir os ácidos bifenilcarboxílicos sob a forma de sólidos brancos com rendimentos de 6-93%.

Ácido 2',4'-difluorobifenil-4-carboxílico (12). ^1H RMN (DMSO-d_6 , 400 MHz) δ 13,09 (s lg, 1H), 8,04 (AA'XX', 2H, $J_{\text{AA}'} = J_{\text{XX}'} = 2,0$ Hz, $J_{\text{XA}'} = J_{\text{X}'\text{A}'} = 8,0$ Hz, $J_{\text{X}'\text{A}} = J_{\text{XA}} = 0,7$ Hz, $\nu_{\text{A}} = \nu_{\text{A}'} = 3213,3$ Hz, $\nu_{\text{X}} = \nu_{\text{X}'} = 3056,2$ Hz), 7,65 (AA'XX', 2H, como acima), 7,63 (m, 1H), 7,38 (ddd, 1H, $J = 11,2, 9,0, 2,8$ Hz), 7,21 (td, 1H, $J = 8,4, 2,2$ Hz). ^{13}C RMN (DMSO-d_6 , 100 MHz) δ 167,1, 160,8, 158,0, 138,6, 132,1, 130,1, 129,6, 129,0, 123,9, 112,2, 104,7. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_2$ (M-H) 233,0414, determinado 233,0407. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 13,3 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 12,6 min. >99% puro.

Ácido 2'-fluorobifenil-3-carboxílico (15). ^1H RMN (CD_3OD , 400 MHz) δ 8,18 (q, 1H, $J = 1,4$ Hz), 8,03 (dt, 1H, $J = 7,8, 1,3$ Hz), 7,76 (dq, 1H, $J = 7,7, 1,5$ Hz), 7,55 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz), 7,48 (td, 1H, $J = 7,8, 1,7$ Hz), 7,38 (dddd, 1H, $J = 8,3, 7,5, 5,1, 1,8$ Hz), 7,26 (td, 1H, $J = 7,6, 1,3$ Hz), 7,20 (ddd, 1H, $J = 11,0, 8,2, 1,2$ Hz). ^{13}C RMN (CD_3OD , 100 MHz) δ 169,7, 161,2, 137,5, 134,6, 132,4, 132,0, 131,3, 130,1, 129,9, 129,5, 126,0, 117,2. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{FO}_2$ (M-H) 215,0508, determinado 215,0498. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 10,6 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 12,1 min. >99% puro.

Ácido 2'-fluorobifenil-4-carboxílico (16). ^1H RMN (DMSO-d_6 , 400 MHz) δ 13,10 (s lg, 1H), 8,05 (AA'XX', 2H, $J_{\text{AA}'} = J_{\text{XX}'} = 1,7$ Hz, $J_{\text{XA}'} = J_{\text{X}'\text{A}'} = 8,5$ Hz, $J_{\text{X}'\text{A}} = J_{\text{XA}} = 0,3$ Hz, $\nu_{\text{A}} = \nu_{\text{A}'} = 3217,9$ Hz, $\nu_{\text{X}} = \nu_{\text{X}'} = 3070,0$ Hz), 7,67 (AA'XX', 2H, como acima), 7,58 (td, 1H, $J = 8,0, 1,8$ Hz), 7,34 (m, 1H). ^{13}C RMN (DMSO-d_6 , 100 MHz) δ 167,1, 159,1, 139,4, 130,8, 130,3, 130,2, 129,6, 129,0, 127,3, 125,1, 116,2. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{FO}_2$ (M-H) 215,0508, determinado 215,0515. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 12,3 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 12,2 min. >99% puro.

Ácido 3',5'-difluorobifenil-3-carboxílico (17). ^1H RMN (acetona- d_6 , 400 MHz) δ 8,30 (td, 1H, $J = 2, 0,5$ Hz), 8,10

(dtd, 1H, $J = 7,6, 1,1, 0,5$ Hz), 7,97 (ddd, 1H, $J = 7,8, 2,0, 1,1$ Hz), 7,64 (td, 1H, $J = 7,8, 0,6$ Hz), 7,39 (m, 2H), 7,06 (tt, 1H, $J = 9,3, 2,4$ Hz). ^{13}C RMN (acetona- d_6 , 100 MHz) δ 167,4, 165,6, 163,2, 144,6, 139,8, 132,5, 132,4, 130,6, 130,3, 128,9, 111,0, 103,7. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_2$ (M-H) 233,0414, determinado 233,0425. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 13,5 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 12,7 min. >99% puro.

Ácido 3',5'-difluorobifenil-4-carboxílico (18). ^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 13,15 (s lg, 1H), 8,02 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz), 7,85 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz), 7,49 (m, 2H), 7,26 (tt, 1H, $J = 9,4, 2,4$ Hz). ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 166,4, 164,1, 161,7, 142,6, 141,6, 130,9, 130,0, 127,1, 110,2, 103,5. RESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_2$ (M-H) 233,0414, determinado 233,0423. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 13 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 12,8 min. >99% puro.

Ácido 2',6'-difluorobifenil-3-carboxílico (19). ^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 8,03 (dt, 1H, $J = 7,8, 1,6$ Hz), 8,00 (m, 1H), 7,72 (dt, 1H, $J = 7,8, 1,4$ Hz), 7,64 (t, 1H, $J = 7,7$ Hz), 7,53 (m, 1H), 7,26 (t, 2H, $J = 8,3$ Hz), ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 167,7, 158,7, 135,0, 132,2, 131,4, 131,1, 129,9, 129,5, 129,5, 112,8, 110,9. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_2$ (M-H) 233,0414, determinado 233,0410. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 12,1 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 12,1 min. >97% puro.

Ácido 2',6'-difluorobifenil-4-carboxílico (20). ^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 8,06 (AA'XX', 2H, $J_{\text{AA}'} = J_{\text{XX}'} = 2,0$ Hz, $J_{\text{XA}'} = J_{\text{X}'\text{A}'} = 8,0$ Hz, $J_{\text{X}'\text{A}} = J_{\text{XA}'} = 0,7$ Hz, $\nu_{\text{A}} = \nu_{\text{A}'} = 3243,6$ Hz, $\nu_{\text{X}} = \nu_{\text{X}'} = 3018,6$ Hz), 7,60 (AA'XX', 2H, como acima), 7,54 (m, 1H), 7,27 (t, 2H, $J = 8,3$ Hz). ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 171,0, 164,0, 134,1, 125,7, 122,0, 121,9, 121,1, 103,4. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_2$ (M-H) 233,0414, determinado 233,0425. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 14,5 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 12,1 min. >99% puro.

Ácido bifenil-4-carboxílico (22). ^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 13,07 (s lg, 1H), 8,03 (AA'XX', 2H, $J_{\text{AA}'} = J_{\text{XX}'} = 1,8$ Hz, $J_{\text{XA}'} = J_{\text{X}'\text{A}'} = 8,3$ Hz, $J_{\text{X}'\text{A}} = J_{\text{XA}'} = 0,3$ Hz, $\nu_{\text{A}} = \nu_{\text{A}'} = 3210,7$ Hz, $\nu_{\text{X}} = \nu_{\text{X}'} = 3122,0$ Hz), 7,81 (AA'XX', 2H, como

acima), 7,75 (m, 2H), 7,51 (tt, 2H, $J = 7,2,1,1$ Hz), 7,43 (tt, 1H, $J = 7,4, 1,2$ Hz). ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 167,2, 144,2, 139,0, 130,0, 129,8, 129,1, 128,3, 127,0, 126,8. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_2$ (M+) 198,0683, determinado 198,0683. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 13,8 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 12,2 min. >99% puro.

Metil-5-iodo-2-metoxibenzoato. TMS-diazometano (19,25 mL, 38,50 mmol, solução a 2 M em hexano) foi adicionado a uma solução de ácido 5-iodossalicílico (5,08 g, 19,24 mmol) em MeOH (20 mL) e agitada à t.a. durante 11 h. Após conclusão da reacção, a mistura reaccional foi concentrada *in vacuo* e o resíduo foi levado à etapa seguinte sem purificação adicional.

Iodeto de metilo (2,40 mL, 38,48 mmol) e K_2CO_3 (10,60 g, 76,96 mmol) foram adicionados a uma solução de 5-iodo-2-metoxibenzoato (5,37 g, 19,24 mmol) em DMF (20 mL) e agitados à t.a. sob Ar durante 24 h. Após conclusão da reacção, foi adicionado acetato de etilo e a mistura reaccional foi lavada com HCl a 1% (2 x 20 mL), salmoura (1 x), seca sobre MgSO_4 e concentrada *in vacuo*. O resíduo foi purificado por cromatografia *flash* (hexano:acetato de etilo 3:1) para produzir metil-5-iodo-2-metoxibenzoato (4,93 g, 88%) sob a forma de um sólido branco. Ver, por exemplo, Corey, E.J.; Myers, A.G. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 5574-5576, que é incorporado por referência na sua totalidade. ^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 7,90 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz), 7,80 (dd, 1H, $J = 8,8, 2,4$ Hz), 6,96 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz), 3,81 (s, 3H), 3,79 (s, 3H). ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 164,7, 158,0, 141,6, 138,5, 122,2, 115,2, 82,1, 55,9, 52,0. HRESIMS calculado para $\text{C}_9\text{H}_9\text{IO}_3$ (M+) 291,9608, determinado 291,9596.

Os compostos **23-27** foram preparados de acordo com o Esquema 4. A uma solução de metil-5-iodo-2-metoxibenzoato (1,0 equiv) dissolvido em tolueno suficiente para proporcionar uma concentração de 0,08 M, foi adicionada uma solução de ácido fenilborónico (2,0 equiv) dissolvido em EtOH para proporcionar uma solução 0,8 M de ácido borónico. Uma solução aquosa 2 M de Na_2CO_3 foi adicionada para proporcionar uma concentração final de reacção de 0,06 M em relação ao metoxibenzoato, seguida de adição de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (10,0% molar). A mistura reaccional foi agitada a 60°C sob Ar durante 15 h e,

após conclusão da reacção, foi arrefecida à t.a. e extractada com CH_2Cl_2 (2x), lavada com salmoura (1x), seca sobre MgSO_4 e concentrada *in vacuo*. O resíduo foi purificado por cromatografia *flash* (hexano:acetato de etilo 3:1) para produzir os salicilatos metilados.

A uma solução de salicilato metilado (1,0 equiv) em CH_2Cl_2 suficiente para proporcionar uma concentração de 0,06 M, foi adicionado BBr_3 (2,0 equiv, solução 1 M em CH_2Cl_2). A mistura reaccional foi agitada à t.a. sob Ar durante 4 h e, após conclusão da reacção, foi extinta com H_2O (10 mL), extractada com CH_2Cl_2 (2x), lavada com salmoura (1x), seca sobre MgSO_4 e concentrada *in vacuo*. O resíduo foi passado à etapa seguinte sem purificação adicional.

A uma solução de éster metílico (1,0 equiv) em $\text{THF}:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1:1) numa concentração de 0,06 M, foi adicionado $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (3,0 equiv). A mistura reaccional foi agitada à t.a. durante 4 h e, após conclusão da reacção, foi acidificada com HCl a 30%, extractada com acetato de etilo (3 x 5 mL), seca sobre MgSO_4 e concentrada *in vacuo*. O resíduo foi purificado por cromatografia *flash* (CH_2Cl_2 , MeOH a 1%, ácido acético a 0,2%) para produzir os salicilatos bifenílicos sob a forma de sólidos brancos com rendimentos de 12-42%.

Ácido 4'-fluoro-4-hidroxibifenil-3-carboxílico (23).

^1H RMN (CD_3OD , 400 MHz) δ 8,01 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz), 7,65 (dd, 1H, $J = 8,7, 2,5$ Hz), 7,51 (m, 2H), 7,11 (tt, 2H, $J = 10,0, 3,0$ Hz), 6,97 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz). ^{13}C RMN (CD_3OD , 100 MHz) δ 173,5, 165,0, 162,7, 137,7, 135,1, 132,6, 129,6, 129,3, 118,9, 116,7, 116,6, 114,2. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{FO}_3$ (M-H) 231,0459, determinado 231,0457. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 14,2 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 12,8 min. >99% puro.

Ácido 2'-fluoro-4-hidroxibifenil-3-carboxílico (24).

^1H RMN (CD_3OD , 400 MHz) δ 7,98 (dd, 1H, $J = 2,2, 1,4$ Hz), 7,59 (ddd, 1H, $J = 8,7, 2,4, 1,7$ Hz), 7,36 (td, 1H, $J = 7,8, 1,7$ Hz), 7,26 (dddd, 1H, $J = 9,9, 7,4, 4,9, 1,7$ Hz), 7,16 (td, 1H, $J = 7,5, 1,2$ Hz), 7,10 (ddd, 1H, $J = 11,1, 8,2, 1,3$ Hz), 6,95 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz). ^{13}C RMN (CD_3OD , 100 MHz) δ 173,5, 162,9, 162,4, 137,2, 131,8, 130,2, 130,1, 129,1, 128,1, 125,8, 118,5, 117,1, 114,0. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{FO}_3$ (M-H) 231,0457, determinado 231,0446. Tempo de retenção na HPLC de

fase normal: 13,8 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 12,7 min. >99% puro.

Ácido 3',5'-difluoro-4-hidroxibifenil-3-carboxílico (25).

^1H RMN (CD_3OD , 400 MHz) δ 8,07 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz), 7,73 (dd, 1H, $J = 8,5, 2,7$ Hz), 7,15 (m, 2H); 7,01 (d, 1H, $J = 8,9$ Hz), 6,86 (tt, 1H, $J = 9,0, 2,5$ Hz). ^{13}C RMN (CD_3OD , 100 MHz) δ 173,3, 166,3, 163,8, 145,1, 135,2, 131,0, 129,8, 119,2, 114,4, 110,4, 103,0. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_3$ (M-H) 249,0363, determinado 249,0356. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 14,5 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 13,3 min. >99% puro.

Ácido 2',4'-dicloro-4-hidroxibifenil-3-carboxílico (26).

^1H RMN (CD_3OD , 400 MHz) δ 7,83 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz), 7,70 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz), 7,58 (dd, 1H, $J = 8,6, 2,4$ Hz), 7,48 (ABX , 1H, $J_{\text{AB}} = 8,4$ Hz, $J_{\text{AX}} = 2,2$ Hz, $J_{\text{BX}} = 0,0$ Hz, $\nu_{\text{A}} = 2989,4$ Hz, $\nu_{\text{B}} = 2973,0$ Hz), 7,44 (ABX , 1H, como acima), 7,06 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz). ^{13}C RMN (CD_3OD , 100 MHz) δ 171,6, 160,8, 137,5, 136,4, 132,8, 132,6, 132,4, 130,8, 129,2, 128,5, 127,7, 117,2, 112,9. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_3$ (M-H) 280,9772, determinado 280,9782. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 13,1 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 14,4 min. >99% puro.

Ácido 4-hidroxibifenil-3-carboxílico (27).

^1H RMN (CD_3OD , 400 MHz) δ 8,08 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz), 7,73 (dd, 1H, $J = 8,7, 2,3$ Hz), 7,54 (m, 2H), 7,41 (tt, 2H, $J = 7,3, 1,8$ Hz), 7,29 (tt, 1H, $J = 7,8, 1,7$ Hz), 7,38 (dddd, 1H, $J = 8,8, 6,4$ Hz), 7,05 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz), 6,93 (m, 1H), 6,90 (ddd, 1H, $J = 7,3, 1,9$ Hz), 7,00 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz). ^{13}C RMN (CD_3OD , 100 MHz) δ 161,5, 140,1, 134,0, 132,4, 128,7, 128,3, 126,9, 126,3, 117,5, 112,9. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_3$ (M-H) 213,0552, determinado 213,0545. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 12,9 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 12,6 min. >99% puro.

4-Bromo-2,6-difluoroanisole. Iodeto de metilo (580 μL , 10,06 mmol) e K_2CO_3 (2,80 g, 20,12 mmol) foram adicionados a uma solução de 4-bromo-2,6-difluorofenol (1,05 g, 5,03 mmol) em DMF (10 mL) e agitados à t.a. sob Ar durante 24 h. Após conclusão da reacção, foi adicionado acetato de etilo e a mistura reaccional foi lavada com HCl a 1% (2 x 20 mL),

salmoura (1x), seca sobre MgSO_4 e concentrada *in vacuo*. O resíduo foi purificado por cromatografia *flash* (hexano) para produzir 4-bromo-2,6-difluoroanisole (747 mg, 67%) sob a forma de um sólido branco. Ver, por exemplo, Chambers, R.D.; *et al. J. Fluorine Chem.* **2000**, *102*, 169-174, que é incorporado por referência na sua totalidade. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7,06 (m, 2H), 3,97 (q, 3H, $J = 1,1$ Hz). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ 155,8, 136,3, 116,2, 113,8, 61,9. LREIMS determinado para $\text{C}_7\text{H}_5\text{F}_2\text{OBr}$ (M+) 223,0.

4-Bromo-2,6-dicloroanisole. Iodeto de metilo (467 μL , 8,12 mmol) e K_2CO_3 (2,24 g, 16,24 mmol) foram adicionados a uma solução de 4-bromo-2,6-diclorofenol (982 mg, 4,06 mmol) em DMF (10 mL) e agitados à t.a. sob Ar durante 40 min. Após conclusão da reacção, foi adicionado acetato de etilo e a mistura reaccional foi lavada com HCl a 1% (2 x 20 mL), salmoura (1x), seca sobre MgSO_4 e concentrada *in vacuo*. O resíduo foi purificado por cromatografia *flash* (hexano) para produzir 4-bromo-2,6-dicloroanisole (768 mg, 74%) sob a forma de um sólido branco. Ver, por exemplo, Li, J.; *et al. J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1846-1856, que é incorporado por referência na sua totalidade. ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ 7,75 (s, 2H), 3,81 (s, 3H). ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ 151,3, 131,5, 129,6, 116,5, 60,6. HRESIMS calculado para $\text{C}_7\text{H}_5\text{BrCl}_2\text{O}$ (M+) 253,8905, determinado 253,8901.

Os compostos **28-31** foram preparados de acordo com o Esquema 5. A uma solução do halo-anisole apropriado (1,0 equiv) dissolvido em tolueno suficiente para proporcionar uma concentração de 0,25 M, foi adicionada uma solução de ácido fenilborónico (2,0 equiv) dissolvido em EtOH para proporcionar uma solução 1,5 M de ácido borónico. Uma solução aquosa 2 M de Na_2CO_3 foi adicionada para proporcionar uma concentração final de reacção de 0,08 M em relação ao halo-anisole, seguida de adição de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (10,0% mol). A mistura reaccional foi agitada a 65°C durante 17 h e, após conclusão da reacção, foi arrefecida até à t.a. e extractada com CH_2Cl_2 (2x), lavada com salmoura (1x), seca sobre MgSO_4 e concentrada *in vacuo*. O resíduo foi purificado por cromatografia *flash* (hexano:acetato de etilo 20:1) para produzir o bifenilo metilado sob a forma de um sólido branco.

A uma solução do bifenilo metilado (1,0 equiv) em CH_2Cl_2 suficiente para proporcionar uma concentração de 0,20 M, foi adicionado BBr_3 (2,0 equiv, solução 1 M em CH_2Cl_2). A mistura reaccional foi agitada à t.a. sob Ar durante 3 h e, após conclusão da reacção, foi extinta com H_2O (10 mL), extractada com CH_2Cl_2 (2x), lavada com salmoura (1x), seca sobre MgSO_4 e concentrada *in vacuo*. O resíduo foi passado à etapa seguinte sem purificação adicional.

A uma solução de éster metílico (1,0 equiv) em $\text{THF}:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1:1) numa concentração de 0,04 M, foi adicionado $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (3,0 equiv). A mistura reaccional foi agitada à t.a. durante 5 h e, após conclusão da reacção, foi acidificada com HCl a 30%, extractada com acetato de etilo (3 x 5 mL), seca sobre MgSO_4 e concentrada *in vacuo*. O resíduo foi purificado por cromatografia *flash* (CH_2Cl_2 , 1% de MeOH, 0,2% de ácido acético) para produzir os produtos bifenílicos sob a forma de sólidos brancos com rendimentos de 14-39%.

Ácido 3',5'-difluoro-4'-hidroxibifenil-3-carboxílico (28).

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ 10,60 (s lg, 1H), 8,14 (t, 1H, $J = 1,7$ Hz), 7,91 (dt, 1H, $J = 7,7,1,1$ Hz), 7,88 (ddd, 1H, $J = 8,0, 2,0, 1,1$ Hz), 7,55 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz), 7,41 (m, 2H). ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ 167,3, 154,0, 151,5, 138,4, 133,6, 131,6, 130,8, 129,9, 129,4, 128,4, 127,1, 110,3. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_3$ (M-H) 249,0363, determinado 249,0358. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 18,3 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 10,5 min. >98% puro.

Ácido 3',5'-difluoro-4'-hidroxibifenil-4-carboxílico (29).

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ 7,98 ($\underline{\text{AA}}'\text{XX}'$, 2H, $J_{\text{AA}'} = J_{\text{XX}'} = 1,7$ Hz, $J_{\text{XA}'} = J_{\text{X}'\text{A}'} = 8,2$ Hz, $J_{\text{X}'\text{A}'} = J_{\text{XA}'} = 0,5$ Hz, $\nu_{\text{A}'} = \nu_{\text{A}'} = 3189,9$ Hz, $\nu_{\text{X}'} = \nu_{\text{X}'} = 3122,0$ Hz), 7,81 ($\underline{\text{AA}}'\text{XX}'$, 2H, como acima), 7,51 (m, 2H). ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ 167,7, 154,5, 142,5, 136,0, 130,5, 130,5, 130,4, 126,9, 111,0. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}_3$ (M-H) 249,0363, determinado 249,0375. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 18,9 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 10,2 min. >99% puro.

Ácido 3',5'-dicloro-4'-hidroxibifenil-3-carboxílico (30).

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ 8,13 (t, 1H, $J = 1,6$ Hz), 7,91 (m, 2H), 7,70 (s, 2H), 7,56 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz). ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ 167,2, 149,0, 137,9, 132,2, 131,6, 130,8, 129,3, 128,4, 127,1, 126,8, 122,9, 123,0. HRESIMS calculado para

$C_{13}H_8Cl_2O_3$ (M-H) 280,9772, determinado 280,9767. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 16,2 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 11,6 min. >99% puro.

Ácido 3',5'-dicloro-4'-hidroxibifenil-4-carboxílico (31).

1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 7,98 (AA'XX', 2H, $J_{AA'} = J_{XX'} = 1,7$ Hz, $J_{XA} = J_{X'A'} = 8,1$ Hz, $J_{X'A} = J_{XA'} = 0,5$ Hz, $\nu_A = \nu_{A'} = 3189,9$ Hz, $\nu_X = \nu_{X'} = 3110,0$ Hz), 7,81 (AA'XX', 2H, como acima), 7,78 (s, 2H). ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 167,2, 141,8, 141,7, 134,7, 129,9, 129,7, 126,9, 126,4, 123,0. HRESIMS calculado para $C_{13}H_8Cl_2O_3$ (M-H) 280,9772, determinado 280,9785. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 15,9 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 11,4 min. >97% puro.

Metil-2',4'-difluoro-4'-hidroxibifenil-3-carboxilato (32).

Os compostos **32** e **33** foram preparados de acordo com o Esquema 6. TMS-diazometano (5,87 mL, 11,75 mmol, solução 2 M em hexano) foi adicionado a uma solução de diflunisal (1,03 g, 4,11 mmol) em MeOH (10 mL) e agitada à t.a. durante 5 h. Após conclusão da reacção, a mistura reaccional foi concentrada *in vacuo* e o resíduo foi purificado por cromatografia *flash* (hexano:acetato de etilo 10:1) para produzir **32** (774 mg, 71%) sob a forma de um sólido branco. 1H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 7,97 (dd, 1H, $J = 2,2, 1,3$ Hz), 7,59 (dt, 1H, $J = 8,8, 2,1$ Hz), 7,36 (dq, 1H, $J = 7,7, 1,5$ Hz), 7,48 (td, 1H, $J = 7,8, 1,7$ Hz), 7,38 (dddd, 1H, $J = 8,8, 6,4$ Hz), 7,05 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz), 6,93 (m, 1H), 6,90 (ddd, 1H, $J = 10,6, 8,9, 2,5$ Hz), 3,96 (s, 3H). ^{13}C RMN ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 170,6, 163,6, 161,3, 158,5, 136,4, 131,2, 130,3, 126,2, 124,2, 118,0, 112,6, 111,8, 104,6, 52,6, 124,2. HRFABMS calculado para $C_{14}H_{10}F_2O_3$ (M+) 264,0596, determinado 264,0598. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 6,9 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 14,7 min. >99% puro.

Ácido 2',4'-difluoro-4'-metoxibifenil-3-carboxílico (33).

Iodeto de metilo (350 μ L, 1,16 mmol) e K_2CO_3 (320 mg, 2,32 mmol) foram adicionados a uma solução de **32** (152 mg, 0,58 mmol) em DMF (4 mL) e agitados à t.a. sob Ar durante 14 h. Após conclusão da reacção, foi adicionado acetato de etilo e a mistura reaccional foi lavada com HCl a 1% (2 x 20 mL), salmoura (1x), seca sobre $MgSO_4$ e concentrada *in vacuo* e passada à etapa seguinte sem purificação adicional.

LiOH·H₂O (60 mg, 1,43 mmol) foi adicionado a uma solução de diflunisal totalmente metilado (140 mg, 0,50 mmol) em MeOH:THF:H₂O (4,5 mL, 1:1:1), e agitou-se à t.a. durante 4 h. Após conclusão da reacção, a mistura reaccional foi acidificada com HCl a 30%, extractada com acetato de etilo (3 x 5 mL), seca sobre MgSO₄ e concentrada *in vacuo*. O resíduo foi purificado por cromatografia *flash* (acetato de etilo:hexano 2:1, 1% de ácido acético) para produzir **33** (122 mg, 93%) sob a forma de um sólido branco. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 10,77 (s lg, 1H), 8,31 (dd, 1H, *J* = 2,5, 0,9 Hz), 7,75 (dt, 1H, *J* = 8,6, 2,1 Hz), 7,41 (dt, 1H, *J* = 8,9, 6,6 Hz), 7,15 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz), 6,94 (m, 1H), 4,13 (s, 3H). ¹³CNMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 177,7, 161,4, 158,2, 135,7, 133,9, 131,4, 129,0, 123,5, 118,1, 112,2, 112,0, 104,6, 56,9. HRESIMS calculado para C₁₄H₁₀F₂O₃ (M-H) 263,0520, determinado 263,0514. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 21,6 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 11,9 min. >99% puro.

Os compostos **34–38** foram preparados de acordo com o Esquema 7. Os compostos **39–44** foram preparados de acordo com o Esquema 8. A uma solução de iodeto de arilo (1,0 equiv) em tolueno suficiente para proporcionar uma concentração de 0,07 M, foi adicionado um ácido formilfenilborónico apropriado dissolvido em EtOH suficiente para proporcionar uma concentração de 0,4 M de ácido borónico. Uma solução aquosa 2 M de Na₂CO₃ foi adicionada para proporcionar uma concentração final de reacção de 0,04 M em relação ao iodeto de arilo, seguida de adição de Pd(PPh₃)₄ (3,0% mol). A mistura reaccional foi aquecida em refluxo sob Ar durante 18 h e, após conclusão da reacção, foi arrefecida até à t. a. e extractada com CH₂Cl₂ (2x), lavada com salmoura (1x), seca sobre MgSO₄ e concentrada *in vacuo*. O resíduo foi purificado por cromatografia *flash* (hexano:acetato de etilo 40:1) para produzir os aldeídos bifenílicos sob a forma de sólidos brancos com rendimentos de 40–91%.

3',5'-Dicloro-3-formilbifenilo (39). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 10,09 (s, 1H), 8,04 (t, 1H, *J* = 1,8 Hz), 7,91 (dt, 1H, *J* = 7,6, 1,3 Hz), 7,80 (ddd, 1H, *J* = 7,8, 2,0, 1,3 Hz), 7,64 (t, 1H, *J* = 7,8 Hz), 7,49 (d, 2H, *J* = 1,8 Hz), 7,38 (t, 1H, *J* = 1,9 Hz). ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ 192,0, 142,8, 139,7, 137,2, 135,8, 133,0, 130,1, 130,0, 128,1, 128,0, 125,9.

HRFABMS calculado para $C_{13}H_8Cl_2O$ (M+H) 251,0027, determinado 251,0027. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 8,0 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 15,2 min. >99% puro.

3',5'-Dicloro-4-formilbifenilo (40). 1H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 7,99 (AA'XX', 2H, $J_{AA'} = J_{XX'} = 2,1$ Hz, $J_{XA} = J_{X'A'} = 8,5$ Hz, $J_{X'A} = J_{XA'} = 0,7$ Hz, $\nu_A = \nu_{A'} = 3193,7$ Hz, $\nu_X = \nu_{X'} = 3077,8$ Hz), 7,70 (AA'XX', 2H, como acima), 7,47 (t, 1H, $J = 1,9$ Hz), 7,39 (d, 2H, $J = 1,9$ Hz). ^{13}C RMN ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 191,8, 144,4, 142,9, 136,2, 135,8, 130,6, 128,5, 127,9, 126,1. HREIMS calculado para $C_{13}H_8Cl_2O$ (M-H) 248,9873, determinado 248,9874. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 7,9 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 15,2 min. >99% puro.

3',5'-Dicloro-2-formilbifenilo (41). 1H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 9,98 (s, 1H), 8,03 (dd, 1H, $J = 7,8, 1,3$ Hz), 7,66 (td, 1H, $J = 7,6, 1,5$ Hz), 7,55 (tt, 1H, $J = 7,6, 1,0$ Hz), 7,44 (t, 1H, $J = 1,9$ Hz), 7,39 (dd, 1H, $J = 7,7, 1,0$ Hz), 7,27 (d, 2H, $J = 1,9$ Hz). ^{13}C RMN ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 191,4, 142,9, 141,0, 135,3, 134,0, 133,7, 130,7, 129,0, 128,5, 128,4, 128,4. HRFABMS calculado para $C_{13}H_8Cl_2O$ (M+H) 251,0030, determinado 251,0029. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 7,0 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 14,9 min. >99% puro.

Os compostos **45-47** foram preparados de acordo com o Esquema 8. A uma solução de aldeído bifenílico (1,0 equiv) em acetona suficiente para proporcionar uma concentração de 0,07 M, foi adicionado $KMnO_4$ (2,0 equiv) em H_2O suficiente para proporcionar uma concentração de permanganato de 0,2 M. A mistura reaccional foi agitada durante 16 h à t.a. e, após conclusão da reacção, foi concentrada *in vacuo* e o resíduo resultante foi redissolvido em $CH_2Cl_2:MeOH$ 10:1 e filtrado através de um rolhão de lã de vidro. O produto em bruto foi purificado por cromatografia *flash* ($CH_2Cl_2:MeOH$ 10:1) para produzir os ácidos carboxílicos (58 mg, 100%) sob a forma de sólidos brancos com rendimentos de 82 -100%.

Ácido 2',4'-diclorobifenil-3-carboxílico (45). 1H RMN ($DMSO-d_6$, 400 MHz) δ 8,22 (s lg, 1H), 8,00 (s lg, 1H), 7,94 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz), 7,76 (s, 2H), 7,63 (s, 1H), 7,60 (s lg, 1H). ^{13}C RMN ($DMSO-d_6$, 100 MHz) δ 168,0, 143,7, 138,1, 135,4,

131,6, 129,9, 127,9, 126,2. HRESIMS calculado para $C_{13}H_8Cl_2O_2$ (M-H) 264,9823, determinado 264,9810. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 12,3 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 14,2 min. >99% puro.

Ácido 2',4'-diclorobifenil-4-carboxílico (46). 1H RMN (CD_3OD , 400 MHz) δ 8,11 (s lg, 2H) 7,72 (m, 2H), 7,64 (d, 2H, $J = 1,9$ Hz), 7,46 (t, 1H, $J = 1,7$ Hz). ^{13}C RMN ($DMSO-d_6$, 100 MHz) δ 170,3, 140,6, 135,2, 127,2, 126,4, 119,3, 118,6, 117,4. HRESIMS calculado para $C_{13}H_8Cl_2O_2$ (M-H) 264,9830, determinado 264,9823. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 12,5 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 14,4 min. >99% puro.

Ácido 2',4'-diclorobifenil-2-carboxílico (47). 1H RMN ($DMSO-d_6$, 400 MHz) δ 7,75 (s lg, 1H), 7,56 (s, 2H), 7,48 (m, 2H), 7,36 (m, 2H). ^{13}C RMN ($DMSO-d_6$, 100 MHz) δ 170,1, 152,5, 145,2, 133,3, 130,0, 129,6, 128,0, 127,2, 126,3. HRESIMS calculado para $C_{13}H_8Cl_2O_2$ (M-H) 264,9823, determinado 264,9834. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 11,4 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 13,6 min. >99% puro.

Os compostos **48-53** foram preparados de acordo com o Esquema 8. A uma solução de aldeído bifenílico (1,0 equiv) em MeOH suficiente para proporcionar uma concentração de 0,1 M, foi adicionado $NaBH_4$ (2,0 equiv) em MeOH suficiente para proporcionar uma concentração de 0,3 M de boro-hidreto. A mistura reaccional foi agitada a 0°C e, lentamente, aquecida até à t.a. e, após agitação durante 16 h, foi concentrada *in vacuo* e purificada por cromatografia *flash* (hexano:acetato de etilo 3:1) para produzir os álcoois bifenílicos sob a forma de sólidos brancos com rendimentos de 94-100%.

3',5'-Diclorobifenil-3-ilmetanol (48). 1H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 7,54 (m, 1H), 7,46 (d, 2H, $J = 1,8$ Hz), 7,45 (m, 2H), 7,39 (m, 1H), 7,34 (t, 1H, $J = 1,9$ Hz), 4,77 (s, 2H), 1,90 (s lg, 1H). ^{13}C RMN ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 144,1, 141,9, 139,0, 135,5, 129,5, 127,4, 127,1, 126,5, 125,8, 125,7, 65,3. HRESIMS calculado para $C_{13}H_{10}Cl_2O$ (M+) 252,0103, determinado 252,0109. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 13,9 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 14,0 min. >99% puro.

3',5'-Diclorobifenil-4-ilmetanol (49). ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7,53 ($\text{AA}'\text{XX}'$, 2H, $J_{\text{AA}'} = 1,9$ Hz, $J_{\text{XX}'} = 3,1$ Hz, $J_{\text{XA}'} = 8,7$ Hz, $J_{\text{X}'\text{A}'} = 6,4$ Hz, $J_{\text{X}'\text{A}} = J_{\text{XA}'} = 0,5$ Hz, $\nu_{\text{A}} = \nu_{\text{A}'} = 3009,8$ Hz, $\nu_{\text{X}} = \nu_{\text{X}'} = 2977,8$ Hz), 7,45 ($\text{AA}'\text{XX}'$, 2H, como acima), 7,45 (d, 2H, $J = 19$ Hz), 7,33 (t, 1H, $J = 1,9$ Hz), 4,75 (d lg, 2H, $J = 4,8$ Hz), 1,81 (t lg, 1H, $J = 5,2$ Hz). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ 144,0, 141,4, 138,0, 135,5, 127,8, 127,4, 127,4, 125,8, 65,1. HRESIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{O}$ (M+) 251,0110, determinado 252,0109. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 15,4 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 14,0 min. >97% puro.

3',5'-Diclorobifenil-2-ilmetanol (50). ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7,55 (dd, 1H, $J = 7,5, 1,3$ Hz), 7,43 (td, 2H, $J = 7,5, 1,4$ Hz), 7,38 (m, 2H), 7,29 (d, 2H, $J = 1,9$ Hz), 7,24 (dd, 1H, $J = 7,4, 1,4$ Hz), 4,58 (s, 2H), 1,79 (s, 1H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ 143,7, 138,9, 137,9, 134,9, 130,0, 129,0, 128,9, 128,2, 127,9, 127,6, 63,0. HREIMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{O}$ (M+) 252,0110, determinado 252,0109. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 11,5 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 14,0 min. >99% puro.

Os compostos **54** e **55** foram preparados de acordo com o Esquema 9. A uma solução do iodobenzaldeído apropriado (1,0 equiv) em tolueno suficiente para proporcionar uma concentração de 0,07 M, foi adicionado ácido 3,5-difluorofenilborónico (2,0 equiv) dissolvido em EtOH suficiente para proporcionar uma concentração de 1,0 M de ácido borónico. Uma solução aquosa 2 M de Na_2CO_3 foi adicionada para proporcionar uma concentração final de reacção de 0,04 M em relação ao iodobenzaldeído, seguida de adição de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (4,0% mol). A mistura reaccional foi agitada a 60°C durante 17 h e, após conclusão da reacção, foi arrefecida até à t.a. e extractada com CH_2Cl_2 (2x), lavada com salmoura (1x), seca sobre MgSO_4 e concentrada *in vacuo*. O resíduo foi purificado por cromatografia *flash* (hexano:acetato de etilo 10:1) para produzir os aldeídos bifenílicos sob a forma de sólidos brancos com rendimentos de 78-80%.

3',5'-Difluoro-3-formilbifenilo (54). ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 10,06 (s, 1H), 8,02 (t, 1H, $J = 1,4$ Hz), 7,88 (dt, 1H, $J = 7,8, 1,4$ Hz), 7,78 (ddd, 2H, $J = 7,8, 2,0, 1,2$ Hz), 7,61 (t, 2H, $J = 7,7$), 7,10 (m, 2H), 6,80 (tt, 1H, $J = 8,8$,

2,3 Hz. ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ 0192,0, 164,8, 162,3, 143,0, 139,8, 137,1, 132,9, 129,9, 127,9, 110,4, 103,5. HRFABMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}$ (M+H) 219,0620, determinado 219,0621. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 8,9 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 13,7 min. >99% puro.

3',5'-Difluoro-4-formilbifenilo (55). ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 9,98 (s, 1H), 8,02 (dd, 1H, $J = 7,8, 1,5$ Hz), 7,65 (td, 1H, $J = 7,3, 1,4$ Hz), 7,54 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz), 7,40 (dd, 1H, $J = 7,6, 1,2$ Hz), 6,90 (m, 3H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) 8191,5, 164,1, 161,6, 143,4, 141,3, 134,0, 133,7, 130,6, 129,0, 128,3, 113,3, 103,8. HRFABMS calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}$ (M+H) 219,0620, determinado 219,0621. Tempo de retenção na HPLC de fase normal: 7,0 min. Tempo de retenção na HPLC de fase inversa: 13,4 min. >99% puro.

Podem utilizar-se vários testes *in vitro* para avaliar os compostos quanto à sua capacidade para estabilizar os tetrâmeros de transtirretina ou prevenir a formação de fibrilas. Os testes podem incluir um ensaio de formação de fibrila, um ensaio de selectividade plasmática, determinação da estrutura tridimensional de um complexo transtirretina-composto (e.g., por cristalografia de raios X), cinéticas de dissociação do tetrâmero de transtirretina ou formações de fibrilas, e determinação da estequiometria e energética de interacções transtirretina-composto através de, por exemplo, centrifugação ou calorimetria. São apresentados a seguir detalhes de ensaios exemplificativos *in vitro*.

Cada composto foi submetido a um ensaio de formação de fibrila estagnada. Os compostos foram secos sobre P_2O_5 , de um dia para o outro, e dissolvidos em DMSO até uma concentração final de 7,2 mM para proporcionar uma solução-mãe primária (reserva de 10x). Uma solução-mãe secundária foi preparada através de diluição de cinco vezes da solução-mãe primária com DMSO para uma concentração final de 1,44 mM (reserva de 2x). A amiloidogenicidade mediada por ácido da TTR (3,6 μM) na presença de inibidores (1,44 mM) foi medida como se segue: A uma cuvete de UV descartável foram adicionados 495 μL de uma solução proteínica de TTR WT a 0,4 mg/mL em fosfato de sódio 10 mM, KCl 100 mM e EDTA 1 mM (pH 7,6) e 5 μL da solução-mãe secundária de inibidor de 1,44 mM em DMSO (reserva de 2x). A mistura foi submetida a um vórtice e incubada durante 30 min

(25°C), altura em que o pH foi diminuído para 4,4 com 500 µL de acetato 200 mM, KCl 100 mM e EDTA 1 mM (pH 4,2). A solução final de 1 mL foi submetida a um vórtice e incubada durante 72 h a 37°C sem agitação. Após 72 h, as cuvetes foram submetidas a um vórtice para suspender quaisquer fibrilas presentes, e a turbidez da suspensão foi medida a 350 e 400 nm utilizando um espectrómetro de UV-vis. A percentagem de formação de fibrila foi obtida através da razão das turbidezes observadas para cada TTR mais amostra de inibidor relativamente à de uma amostra preparada da mesma forma, mas não tendo o inibidor, multiplicada por 100. O ensaio de formação de fibrila empregando concentrações equimolares de inibidor e de TTR (3,6 µM) foi realizado como anteriormente utilizando uma solução-mãe secundária de 1x. A solução-mãe de 1x foi preparada por diluição de dez vezes da solução-mãe primária de 10X a 7,2 mM com DMSO, para uma concentração final de 0,72 mM e utilizada no ensaio de formação de fibrila, conforme descrito anteriormente. Todos os ensaios foram realizados em triplicado e todos os compostos foram ensaiados utilizando TTR de tipo selvagem. Verificou-se que todos os compostos eram solúveis durante todo o curso da experiência através de testes à turbidez das soluções na ausência de TTR WT, garantindo que a turbidez era o resultado da formação de amiloide de TTR.

As estequiometrias de ligação de potenciais inibidores da TTR no plasma sanguíneo foram avaliadas através de um método de captura por anticorpo/HPLC. Um tubo eppendorf de 1,5 mL foi cheio com 1,0 mL de plasma sanguíneo humano e com 7,5 µL de uma solução de DMSO 1,44 mM do inibidor em avaliação. A solução foi incubada e suavemente agitada, a 37°C, durante 24 h. Uma pasta fluida (125 µL) de gel:TSA 1:1 (solução salina Tris) de Sepharose extinta foi adicionada à solução e suavemente agitada a 4°C durante 1 h. A solução foi centrifugada (16 000 x g) e o sobrenadante foi dividido em duas alíquotas de 400 µL, que foram depois adicionadas a diferentes amostras de 200 µL de pasta fluida de gel:TSA 1:1 da Sepharose conjugada com o anticorpo anti-TTR. As soluções foram suavemente agitadas a 4°C durante 20 min, centrifugadas (16 000 x g), e o sobrenadante foi removido. O gel foi lavado com 1 mL de TSA/saponina a 0,05% (3x, 10 min cada) a 4°C, seguida de 1 mL de TSA (2x, 10 min cada) a 4°C. As amostras foram centrifugadas (16 000 x g), a lavagem final foi

removida, e foram adicionados 155 μL de trietilamina 100 mM, pH 11,5, para eluir a TTR e inibidores ligados dos anticorpos. Após agitação suave a 4°C durante 30 min, a amostra de eluição foi centrifugada (16 000 $\times$ g) e foram removidos 145 μL do sobrenadante, contendo TTR e inibidor. O sobrenadante foi em seguida analisado através de HPLC de fase inversa conforme descrito anteriormente. Ver, por exemplo, Purkey, H.E.; Dorrell, M.I. ; Kelly, J.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 5566-71, que é incorporado por referência na sua totalidade.

Os cristais de TTR WT foram obtidos a partir de soluções proteínicas a 7 mg/mL (em KCl 100 mM, EDTA 1 mM, fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0, sulfato de amónio 0,35-0,50 M) equilibradas contra sulfato de amónio 2 M em gotas pendentes. Os complexos TTR-ligando foram preparados a partir de cristais embebidos durante mais de três semanas com um excesso molar de 10 vezes do ligando. Um detector CCD-PXL-L600 (instrumentos Bruker) acoplado a um gerador de raios X de ânodo rotativo RU200 foi utilizado para recolha de dados dos cristais embebidos em **20** ou **26**. O detector Quantum-4 na fonte monocromática de alta energia de 14-BM-C, BIOCARs, Advance Photon Source foi utilizado para a recolha de dados de cristais embebidos em **1** ou **18**. Os cristais foram colocados em óleo paratone como crioprotector e arrefecidos para experiências de difracção (120 K para **20** e **26**, e 100 K para **1** e **18**). Os cristais das estruturas do complexo TTR·ligando são isomorfos da forma cristalina apo com dimensões celulares unitárias próximo de $a = 43 \text{ \AA}$, $b = 85 \text{ \AA}$ e $c = 66 \text{ \AA}$; grupo espacial $P2_12_12$ com dois monómeros na unidade assimétrica. Os conjuntos de dados de **1** e **18** foram reduzidos com DENZO e SCALEPACK. Ver Otwinowski, Z.; Minor, W. *Macromolecular Crystallography, Part A*, em *Methods in Enzymology*; Carter, C.W., Sweet, R.M., Eds.; Academic Press: 1997; Vol. 276, P 307-326, que é incorporado por referência na sua totalidade. Os conjuntos de dados de **20** e **26** foram reduzidos com SAINT e PROSCALE (Bruker AXS, Inc.).

As coordenadas atómicas proteínicas para TTR do Protein Data Bank (número de acesso 1BMZ) foram utilizadas como modelo de partida durante a busca de substituição molecular com o EPMR. As melhores soluções do EPMR foram refinadas por dinâmica molecular e protocolos de minimização energética de

CNS. Os mapas de diferenças de Fourier resultantes revelaram ligação dos ligandos (em duas conformações para **18**, **20** e **26**, e quatro conformações para **1**) em cada bolsa de ligação do tetrâmero de TTR. Utilizando estes mapas, o ligando poderia ser inequivocamente colocado dentro da densidade e foi incluído no refinamento cristalográfico. Após vários ciclos de emparelhamento simulado e subsequente refinamento por factor posicional e de temperatura, as moléculas de água foram colocadas em mapas de diferenças de Fourier. O ciclo final de ajustamento de mapa foi realizado utilizando o mapa de densidade electrónica ponderada não enviesado calculado pelo protocolo de remoção de enviesamento *shake/warp*. Todas as conformações de ligação do ligando estavam em concordância com os mapas omit não enviesados de emparelhamento, assim como os mapas ponderados não enviesados *shake/warp* colocados em fase na ausência do inibidor. Os ciclos finais do refinamento foram efectuados através do protocolo de refinamento restringido de Refmac. Em virtude da ausência de densidades electrónicas interpretáveis no mapa final, os nove resíduos N-terminais e os três C-terminais não foram incluídos no modelo final. Um sumário da análise cristalográfica é apresentado na Tabela 2. Ver, por exemplo, Kissinger, C.R.; Gehlhaar, D.K.; Fogel, D.B. *Acta Crystallogr., Sect. D* **1999**, 55, 484-491; Brunger, A.T.; et al. *Acta Crystallogr., Sect. D* **1998**, 54, 905-921; Kantardjieff; K.; et al. *Acta Crystallogr., Sect. D* **2002**, 58, 735-743; Bailey, S. *Acta Crystallogr., Sect. D* **1994**, 50, 760-763; e Murshudov, G.N.; Vagin, A.A.; Dodson, E.J. *Acta Crystallogr., Sect. D* **1997**, 53, 240-255, cada um incorporado como referência na sua totalidade.

A cinética da dissociação do tetrâmero de TTR foi avaliada pelo desenrolamento de monómeros ligados em ureia. A dissociação lenta do tetrâmero não é detectável por espectroscopia de CD no UV longínquo, mas está ligada à etapa rápida (500 000 vezes mais rápida) de desenrolamento, facilmente detectável por CD no UV longínquo, como descrito anteriormente. A cinética de dissociação do tetrâmero de TTR (3,6 μ M) em função do inibidor (3,6 μ M) foi avaliada por adição de 3,6 μ L de uma solução (em etanol) 1 mM do inibidor de interesse a 69 μ L de TTR WT (2,90 mg/mL, fosfato de sódio 10 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0) à qual foram adicionados 127,4 μ L de tampão de fosfato. Para uma concentração de inibidor (7,2 μ M) de duas vezes a concentração de TTR

(3,6 μM), 7,2 μL de uma solução (em etanol) 1 mM do inibidor de interesse foram adicionados a 69 μL de TTR WT (2,90 mg/mL, fosfato de sódio 10 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0) à qual foram adicionados 123,8 μL de tampão de fosfato. Foram adicionados 100 μL da solução de proteína-inibidor de interesse a uma solução de 600 μL de ureia 10,3 M e 300 μL de tampão de fosfato, para proporcionar uma concentração final de ureia de 6,5 M. As soluções foram submetidas a um vórtice e os espectros de dicroísmo circular (CD) foram obtidos com os seguintes intervalos: 0, 5, 8, 23, 46, 71, 95, 118, 144 e 168 h. Foi preparada uma amostra de controlo contendo 7,2 μL de etanol, em vez de inibidor, para comparação, e os espectros obtidos nos pontos temporais identificados anteriormente. Os espectros de CD foram obtidos entre 220 e 213 nm, com varrimento a cada 0,5 nm e um tempo médio de 10 s. Cada comprimento de onda foi varrido uma vez. Os valores para a amplitude tinham uma média entre 220 e 213 nm para determinar a extensão de perda de folha β ao longo de toda a experiência.

A taxa de formação de fibrila mediada por ácido foi seguida a pH 4,4 por turbidimetria. Os compostos foram secos sobre P_2O_5 , de um dia para o outro, e dissolvidos em DMSO até uma concentração final de 7,2 mM para produzir uma solução-mãe primária (reserva de 10x). Uma solução-mãe secundária foi preparada através de diluição de cinco vezes com DMSO da solução-mãe primária para proporcionar uma concentração final de 1,44 mM (reserva de 2x). O ensaio de formação de fibrila empregando uma concentração de inibidor de 7,2 μM relativamente a 3,6 μM de TTR (tetrâmero) foi realizado como se segue: A uma cuvete de UV descartável foram adicionados 495 μL de uma solução proteínica de TTR WT a 0,4 mg/mL em fosfato de sódio 10 mM, KCl 100 mM e EDTA 1 mM (pH 7,6) e 5 μL da solução-mãe secundária de inibidor 1,44 mM (reserva de 2x). A mistura foi submetida a um vórtice e incubada durante 30 min (25°C). Após 30 min, o pH foi diminuído para 4,4 com 500 μL de acetato 200 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM (pH 4,2). A solução final de 1 mL foi submetida a um vórtice e incubada a 37°C sem agitação. As soluções foram submetidas a um vórtice e foi medida a turbidez a 350 e 400 nm. Os espectros de UV foram obtidos com os seguintes intervalos: 0, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 h após acidificação. Foi preparada uma amostra de controlo contendo 5 μL de DMSO, para comparação, e os espectros foram obtidos nos pontos temporais anteriores.

Cada solução de inibidor foi preparada em grupos de 10 para prevenir a perturbação das cuvets antes de ser realizada uma leitura. Após se obter uma absorvância de UV, as cuvets correspondentes a esse ponto de tempo eram descartadas. O ensaio de formação de fibrila empregando uma concentração equimolar (3,6 μ M) de TTR e de inibidor foi realizado como anteriormente, utilizando uma solução-mãe secundária de inibidor a 1x, preparada como se segue: Foi preparada uma solução-mãe por diluição de dez vezes da solução-mãe primária 7,2 mM de 10x, com DMSO, para uma concentração final de 0,72 mM, e foi utilizada no ensaio de formação de fibrila, conforme descrito anteriormente. Verificou-se que todos os compostos eram solúveis durante todo o curso da experiência, garantindo que a turbidez era o resultado da formação de amilóide de TTR.

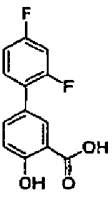
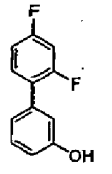
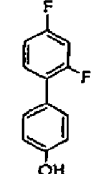
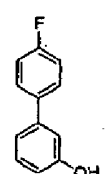
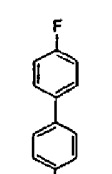
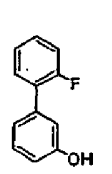
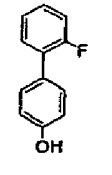
Foi analisada a estrutura quaternária de TTR na presença de inibidores a pH 4,4. O mecanismo pelo qual **18** e **20** estabilizam a TTR foi avaliado através da incubação da proteína (3,6 μ M) durante 72 h nas condições do ensaio de formação de fibrila estagnada na presença de 3,6 μ M ou 7,2 μ M de inibidor. Após 72 h, as amostras foram centrifugadas (14 000 x g) e o sobrenadante foi removido de qualquer sólido que foi formado no ensaio. A análise de ultracentrifugação de equilíbrio e velocidade foi realizada com uma ultracentrífuga analítica Beckman XL-I. A aquisição e análise de dados foram realizadas conforme descrito anteriormente. Ver, por exemplo, Lashuel, H.A.; Lai, Z.; Kelly, J.W. *Biochemistry* **1998**, *37*, 17851-64; e Lashuel, H.A.; et al. *Biochemistry* **1999**, *38*, 13560-73, cada um incorporado por referência na sua totalidade.

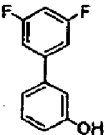
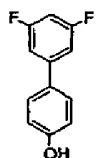
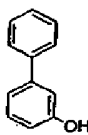
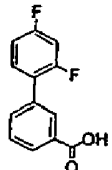
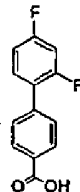
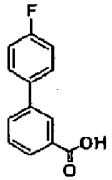
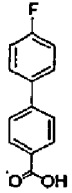
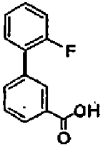
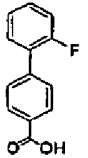
As constantes de dissociação que caracterizam a ligação de **18** e **20** a TTR WT foram determinadas por calorimetria de titulação isotérmica utilizando um instrumento da Microcal (Microcal Inc., Northhampton, MD). Uma solução de inibidor (300 μ M ou 500 μ M em tampão tris 25 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, EtOH a 12%, pH 8,0) foi preparada e titulada para uma célula de ITC contendo TTR WT (15 μ M ou 25 μ M em tampão tris 25 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, EtOH a 12%, pH 8,0). A injeção inicial de 2,5 μ L foi seguida de 50 injeções de 5,0 μ L cada (25°C). A integração do termograma após subtração de brancos produziu uma isotérmica de ligação que se ajustou melhor a um modelo de

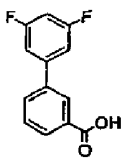
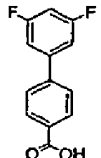
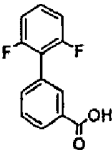
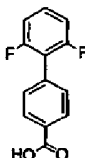
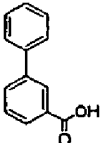
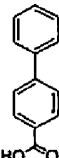
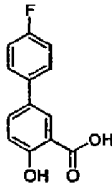
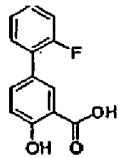
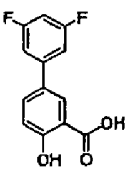
dois locais de ligação sequenciais com cooperatividade negativa. Os dados foram ajustados através de uma abordagem não linear de mínimos quadrados com quatro parâmetros ajustáveis, nomeadamente, K_1 , ΔH_1 , K_2 , ΔH_2 utilizando o módulo de análise de dados ITC na versão 2.9 do ORIGIN, proporcionado pela Microcal.

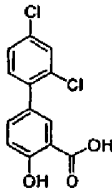
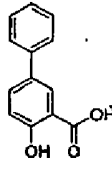
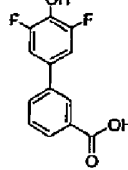
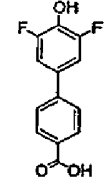
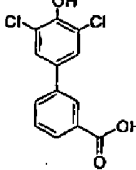
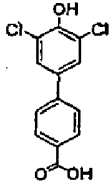
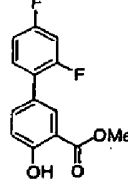
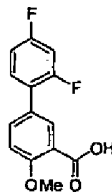
Os compostos descritos foram avaliados como inibidores de fibrila amilóide de TTR utilizando um ensaio de turbidimetria. A amiloidose de TTR WT foi iniciada por acidificação de TTR pré-incubada com inibidor (25°C, 30 min), empregando adição de tampão para subir o pH para um valor final de 4,4. Após incubação de cada mistura durante 72 h (37°C), a turbidez foi medida a 350 e 400 nm utilizando um espectrómetro de UV-vis. Todos os dados de formação de fibrila amilóide foram normalizados para amiloidogénese de TTR WT na ausência de inibidor, a que foi atribuído 100% de formação de fibrila. Por conseguinte, 5% de formação de fibrila corresponde a um composto que inibe 95% de formação de fibrila de TTR WT após 72 h. Cada potencial inibidor foi em primeiro lugar avaliado numa concentração de 7,2 μM relativamente a uma concentração de tetramero de TTR de 3,6 μM . Os compostos que permitiam menos de 15% de formação de fibrila foram reavaliados numa concentração igual à concentração de TTR (3,6 μM) para seleccionar os inibidores com a eficácia mais elevada. Nestas condições, a formação de fibrila inferior a 40% é característica de um inibidor muito bom, ao passo que 40-70% de inibição é indicativa de um composto modesto. Os dados de formação de fibrila são apresentados na Tabela 1.

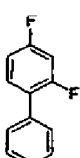
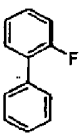
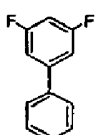
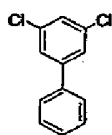
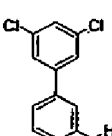
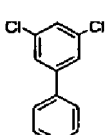
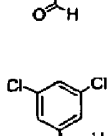
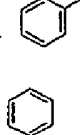
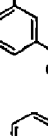
Tabela 1: Efeitos de Compostos sobre a Formação de Fibrila

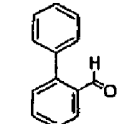
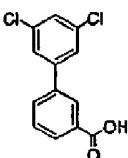
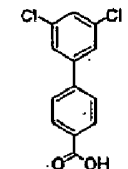
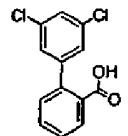
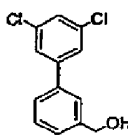
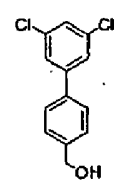
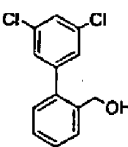
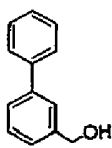
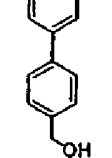
Número do composto	Estrutura	% de formação de fibrila (inibidor a 3,6 μ M)	% de formação de fibrila (inibidor a 7,2 μ M)	Selectividade plasmática (equiv ligados)
diplunisal (1)		37,0	3,4	0,13 $\pm$ 0,02
2			31,5	
3			32,4	
4			46,3	
5			53,1	
6			19,5	
7			19,6	
8		40,9	10,2	0,18 $\pm$ 0,05

9			16,4	
10			61,2	
11		39,4	9,1	não observada
12		32,6	2,6	0,20 ± 0,05
13			15,7	
14			13,3	
15		39,4	9,8	não observada
16		32,4	4,8	0,08 ± 0,00
17		35,7	5,6	0,23 ± 0,00

18		35,7	3,7	1,27 ± 0,12
19		35,1	6,7	0,29 ± 0,12
20		28,5	4,5	0,50 ± 0,05
21			30,8	
22		51,5	14,3	0,08 ± 0,01
23		38,7	2,6	0,09 ± 0,00
24		38,7	2,5	0,07 ± 0,02
25		35,5	1,0	não observada
26		29,9	3,6	0,27 ± 0,02

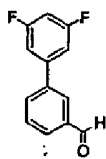
27		47,4	15,4	não observada
28		38,5	3,5	não observada
29		31,7	3,4	0,07 ± 0,02
30		25,5	4,4	0,12 ± 0,02
31		25,8	3,8	0,26 ± 0,04
32			69,9	
33			38,5	
34			100,0	

35		100,0		
36		99,4		
37		100,0		
38		52,2		
39		30,6	4,4	$1,30 \pm 0,15$
40		25,4		
41		34,5	7,1	$1,96 \pm 0,11$
42		35,4		
43		93,5		
44		72,5		

45		32,7	3,0	$0,80 \pm 0,08$
46		41,2	4,9	$1,56 \pm 0,01$
47			45,4	
48		30,0	3,3	$0,89 \pm 0,09$
49		38,9	5,9	$0,54 \pm 0,10$
50		33,6	7,7	não observada
51			85,5	
52			100,0	
53			81,0	

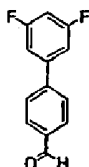
54

64,3



55

69,6



Com base nos dados de eficácia como inibidor para os compostos **2-55**, parece que um anel hidrófilo substituído com carboxilato ligado directamente a um anel hidrófobo funcionalizado com di-halogéneo é suficiente para uma excelente actividade (Tabela 1). Um substituinte fenólico no lugar de um carboxilato (**2-10**) produz inibidores consideravelmente menos activos, muito inferiores ao composto parental **1**. Inibidores possuindo um halogéneo na posição *orto* ou *meta* do anel hidrófobo são superiores aos compostos que não têm halogéneos ou aos que têm um único halogéneo em *para*. Isto sugere que os halogéneos em *para* não complementam as HBP da mesma forma que os biarilos halogenados em *meta* e *orto*. A remoção completa de todos os halogéneos pode dar origem a um inibidor fraco, presumivelmente em virtude da ausência de complementaridade estereoquímica para preencher as bolsas de ligação de halogéneo (por exemplo, os compostos **10**, **21-22**, **27**, **42-44** e **51-53**). Nas condições testadas, o melhor composto fenólico (**8**) é inferior a **1**, que possui tanto uma funcionalidade fenólica como de carboxilato no anel hidrófilo. Os compostos biarílicos estabilizados com um único carboxilato (tais como **11-22**) podem ser excelentes inibidores de fibrila amilóide, por exemplo, os compostos **11**, **12**, **15-20**. Estes rivalizam com o diflunisal quanto a inibição, sendo a excepção aqueles contendo apenas um halogéneo em *para* (e.g., os compostos **13** e **14**). Um carboxilato arílico substituído em *meta* ou *para* pode ser suficiente para dotar excelentes propriedades de inibição, sugerindo que o substituinte hidroxilo em **1** não é necessário para uma boa actividade inibidora. Adicionalmente, o posicionamento do carboxilato em *para* parece produzir inibidores superiores, sugerindo que um carboxilato em *para* está melhor preparado para tirar partido das interacções

electrostáticas com os grupos ϵ -amónio de Lys 15 e 15' (modo de ligação directo), como no caso de **20**, ou interacções de ligações de hidrogénio com os grupos hidroxilo de Ser 117 e 117' (modo de ligação inverso) como no caso de **18**. Os biarilos em que o anel hidrófobo é está substituído com halogéneos em posições excluindo a posição *para* e o anel hidrófilo com carboxilatos em *meta* e, particularmente, em *para*, produzem inibidores de formação de fibrila amilóide de TTR altamente eficazes.

A adição de um substituinte hidroxilo ao anel contendo um substituinte carboxilato (a substituição de ácido salicílico, por exemplo, **23-27**) pode dar, igualmente, origem a inibidores com elevada actividade similar ao diflunisal. Em biarilos com o núcleo de ácido salicílico, o posicionamento exacto dos halogéneos não parece ser tão vital como nos casos anteriores, sugerindo que este anel contribui desproporcionadamente para a energia de ligação. O hidroxilo em *para* pode participar em ligações de hidrogénio com os grupos ϵ -amónio de Lys 15 e 15' (modo de ligação directo) ou com os hidroxilos de Ser 117 e 117' (modo de ligação inverso). A substituição de flúor em **1** com cloro (**26**) pode dar origem a um inibidor com actividade igual ou superior, ao passo que a remoção completa dos halogéneos (**27**) pode dar origem a um inibidor modesto. Deve notar-se que **27** é apenas ligeiramente superior a um carboxilato em *para* **22** *in vitro*, e ambos são superiores aos inibidores sem halogéneo com o carboxilato na posição *meta*, **21**, e o análogo contendo hidroxilo **10**.

A inclusão de um substituinte 3',5'-di-halo-4'-hidroxilo no anel contendo halogéneo, com carboxilatos nas posições *para* ou *meta* (**28-31**) pode dar origem a actividade altamente inibitória, similar ao diflunisal. A substituição 4-hidroxilo foi incluída para mimetizar mais fielmente a tiroxina, o ligando natural de TTR. Estes inibidores podem igualmente mimetizar mais fielmente a actividade hormonal da tiroxina e, por conseguinte, podem actuar como agonistas ou antagonista da tiróide, um efeito que pode ser indesejável.

A protecção do carboxilato sob a forma de um éster metílico ou do hidroxilo sob a forma de um éter metílico (**32** e **33**) pode dar origem a inibidores inferiores em comparação a **1**. Uma combinação da perda de carga com o aumento no volume

estereoquímico explica, provavelmente, estas observações. A remoção de todos os substituintes hidrófilos (e.g., **34-38**) pode dar origem a inibidores fracos. Um composto biarílico contendo apenas a substituição de cloro em *meta* (e.g., **38**) pode ser um inibidor modesto, sugerindo que os cloros fazem contactos melhorados nas bolsas de ligação de halogéneo, em comparação com biarilos contendo flúor (**37**).

Foram sintetizados diversos inibidores contendo cloro e a sua actividade de inibição de fibrila de TTR foi avaliada. Quando os membros desta classe de inibidores contêm carboxilatos nas posições *meta* ou *para* (e.g., **45** e **46**), podem possuir elevada actividade, ao passo que aqueles possuindo um carboxilato em *orto* (tal como **47**) podem ser um inibidor inferior. Esta observação sugere que o carboxilato em *orto* pode estar demasiado distante dos grupos ϵ -amónio de Lys 15 e 15' para efectuar interacções electrostáticas favoráveis (modo de ligação directo) ou dos grupos hidroxilo de Ser 117 e 117' para sofrer interacções de ligações de hidrogénio (modo de ligação inverso). Surpreendentemente, os álcoois benzílicos **48-50** provaram ser excelentes inibidores de formação de fibrila. A substituição dicloro em *meta* em um anel parece ser complementada pela funcionalidade de álcool benzílico na posição *orto*, *meta* ou *para*, potencialmente em virtude de ligações de hidrogénio ou ligações de hidrogénio mediadas por água. Uma série de análogos aldeído (**39-41**) onde os grupos $-\text{CH}_2\text{OH}$ foram substituídos por uma funcionalidade aldeído, demonstraram boa inibição, excepto no caso do aldeído em *para* **41**, possivelmente em consequência de hidratação do aldeído num diol geminal. É possível que os aldeídos, os álcoois benzílicos e os carboxilatos se liguem na bolsa por meio de um mecanismo diferente. Contudo, na ausência de informação estrutural, não pode ser excluído um modo de ligação similar. É igualmente possível que os aldeídos se liguem covalentemente a Ser 117 (117') por meio de um hemiacetal ou a Lys 15 (15') por meio de uma ligação imina. A substituição dos cloros por flúores (**54** e **55**) no caso dos aldeídos pode dar origem a inibidores bastante fracos (**39** e **41**). Como anteriormente, a remoção completa dos halogéneos pode dar origem a inibidores com fraca actividade (**42** e **44**), excepto no caso do aldeído em *meta* **43** onde a actividade é modesta. Esta actividade modesta pode ser o resultado de um elevado grau de hidratação. É surpreendente que o aldeído em

meta 3',5'-difluoro (**54**) seja inferior ao aldeído que não tem halogéneos (**42**).

Inibidores que mantêm a formação de fibrila de TTR abaixo de 50% numa concentração igual à da TTR (3,6 μM) foram adicionalmente avaliados quanto à sua capacidade para ligarem a TTR selectivamente, com primazia sobre todas as outras proteínas no plasma sanguíneo. A concentração de diflunisal no sangue pode exceder 30 μM , 20 h após uma única dose de 500 mg, ou 300 μM , 4 h após a mesma dose. Embora este nível elevado de concentração plasmática sustentada sugira uma excelente biodisponibilidade, inibidores mais selectivos permitirão uma dosagem inferior e potencialmente menos efeitos secundários; por conseguinte, o plasma humano foi incubado com este subconjunto de inibidores numa concentração final de 10,8 μM (a concentração média de TTR no plasma humano é, aproximadamente, 5 μM). A TTR foi em seguida capturada utilizando um anticorpo ligado a resina e a TTR imobilizada foi lavada três vezes com uma solução de TSA (solução salina tris)/saponina a 0,05%, seguida de duas lavagens com TSA. O complexo TTR-inibidor foi libertado da resina com trietilamina 100 mM (pH 11,5), e a estequiometria de inibidor presente relativamente à TTR foi determinada por análise de HPLC de fase inversa. Pode estar ligado, por tetrâmero de TTR, um máximo de 2 equiv. de inibidor. As estequiometrias de ligação plasmática pós-lavagem, que representam limites inferiores em consequência de perdas associadas à lavagem, estão sumariadas na Tabela 1.

Os bifenilos contendo cloro podem ser selectivos para a ligação de TTR em plasma sanguíneo humano (estequiometria média de 0,8, com uma estequiometria teórica máxima de 2,0, ver Tabela 1). A estequiometria média observada foi 0,4 para todos os inibidores testados. Dos inibidores contendo flúor, **18** e **20** exibiram selectividade de ligação muito boa e aceitável para TTR, respectivamente, superior à estequiometria de 0,13 exibida por **1** com condições semelhantes. Os valores de estequiometria apresentados na Tabela 1 podem representar um limite inferior, em virtude de perdas associadas à lavagem do inibidor da TTR sequestrada numa resina de anticorpo policlonal. Os resultados de selectividade de ligação de TTR para **39** e **41** devem ser considerados com prudência, porque

estes compostos podem estar covalentemente ligados a TTR, conforme discutido acima.

Aqueles inibidores que exibem excelentes dados de inibição de fibrila amilóide de TTR *in vitro*, exibem no entanto fraca selectividade plasmática, podem ligar-se, de um modo preferido, aos locais de ligação de fármacos em albumina e/ou locais semelhantes em outras proteínas encontradas no plasma. Pode ser improvável que esses inibidores previnam o enrolamento incorrecto de TTR e a amiloidose num ambiente complexo como o do plasma sanguíneo ou do LCR.

As estruturas de co-cristal de raios X de alta resolução de **1** e de três dos seus análogos **26**, **18** e **20** ligados a TTR, foram obtidas através do embebimento de cristais de TTR com um excesso molar de 10 vezes de inibidor durante mais de três semanas. As estatísticas cristalográficas estão sumariadas na Tabela 2.

Tabela 2: Estatísticas Cristalográficas

Recolha de dados	TTR•1	TTR•18	TTR•20	TTR•26
Resolução (Å)	35,58- 1,85	42,18- 1,54	64,5-1,7	51,30- 1,7
N.º de reflexões únicas	20,478	33,741	25,634	25,486
Plenitude (%) (Global/invólucro externo)	98,4/99, 0	95,0/98, 0	98,0/99, 0	99,0/98, 0
R _{sim} (Global/invólucr o externo)	0,09/0,3 1	0,03/0,3 2	0,08/0,3 9	0,07/0,4 0
Refinamento				
Resolução (Å)	35,58- 1,85	42,18- 1,50	64,5-1,7	51,30- 1,7
Factor R /R livre (%)	21,2/23, 6	22,2/24, 5	22,5/24, 0	21,5/24, 2
Comprimento de ligação Rmsd (Å)	0,03	0,06	0,02	0,02
Ângulos de ligação Rmsd (°)	2,3	2,7	1,9	1,9

O diflunisal (**1**) liga-se a TTR em ambos os modos directo e inverso. Em cada local de ligação de hormona de TTR, verificaram-se quatro diferentes conformações de ligação de diflunisal com, aproximadamente, ocupação igual - um modo de ligação directo e inverso, cada com dois modos de ligação

simetricamente equivalentes. O sistema biarílico de diflunisal foi deslocado para longe do centro da bolsa de ligação de hormona e ocupa duas posições distintas para formar um cone de densidade electrónica em forma de 'V' na bolsa de ligação de hormona de TTR. Este modo de ligação melhora as interacções tanto hidrófobas como de van der Waals entre o inibidor e a bolsa hidrófoba de TTR formada por Leu 17, Ala 108, Leu 110, Thr 119 e Val 121. O modo de ligação inverso de diflunisal foi aumentado pela interacção da ligação de hidrogénio entre o grupo carboxílico e o oxigénio da cadeia lateral de Thr 119 e o oxigénio da cadeia principal de Ala 108 na bolsa de ligação interna. Surpreendentemente, a Ser 117, nem adopta múltiplas conformações nem forma qualquer interacção electrostática com o inibidor. No modo inverso de ligação, um dos substituintes flúor do diflunisal estava dentro da distância da ligação de hidrogénio do oxigénio da cadeia lateral de Thr 119 (3,3 Å). Na bolsa de ligação externa, a densidade electrónica para os átomos da cadeia lateral de Lys 15' era visível apenas a um nível de sigma baixo, indicando que pode estar em mais do que uma conformação. A melhor conformação possível para o resíduo Lys 15 foi modelada a uma distância de ligações de hidrogénio do grupo carboxilo do diflunisal no modo de ligação directo.

O composto **20** liga-se a TTR no modo de ligação directo, com o anel hidrófilo substituído com carboxilato orientado na bolsa de ligação externa para interagir electrostaticamente com Lys 15 e 15'. O anel arílico fluorado está posicionado na bolsa de ligação interna em que os halogéneos são colocados em HBP 2 e 2'. Interessantemente, uma inspecção aprofundada a ambos os locais de ligação, revela uma diferença significativa na orientação dos anéis bifenílicos. Os ângulos entre os planos dos anéis fenílicos variam desde 32,6 graus num local de ligação até 63,8 graus no outro. Esta observação pode ser o resultado da ligação negativamente cooperativa de **20** com TTR.

O composto **18** liga-se a TTR no modo inverso com o anel arílico hidrófilo substituído com carboxilato orientado para a bolsa interna, dentro da distância de ligações de hidrogénio de Ser 117 e Ser 117'. Os anéis arílicos estão rodados 34 graus um em relação ao outro, para tirar partido das interacções hidrófobas com Leu 17, Ala 108, Val 121 e Thr 119. Os flúores estão posicionados nas bolsas de ligação de halogéneo 1 e 1'. O modo de ligação inverso não era esperado,

em vez disso, previa-se que o carboxilato estivesse posicionado na bolsa externa para tirar proveito de interações electrostáticas com Lys 15 e 15', com os flúores sequestrados nas bolsas de ligação de halogéneo 2 e 2'. Contudo, o modo de ligação inverso não constituiu uma surpresa total, visto que foi anteriormente observado para o diclofenac (uma amina biarílica) e vários análogos do diclofenac.

A substituição com cloros em vez de flúores no diflunisal induz diferenças significativas na ligação de **26** a TTR. O composto **26** liga-se a TTR no modo de ligação inverso com o anel arílico substituído por carboxilo orientado na bolsa de ligação interna e os cloros sequestrados nas bolsas de ligação de halogéneo 2 e 2'. Tal como **18** e **20**, o composto **26** ocupa igualmente o centro da bolsa de ligação de hormona. Os resíduos Ala 108, Lys 15, Leu 17, Leu 110, Lys 17 e Thr 119 de protómeros de TTR formam interações de van der Waals e hidrófobas com o inibidor. Na bolsa de ligação interna, a cadeia lateral de Ser 117 existe em duas conformações para interagir com a substituição carboxílica de **26** e Ser 117 dos outros monómeros. O mesmo oxigénio carboxílico de **26** forma igualmente uma interacção de ligação de hidrogénio com o oxigénio da cadeia principal de Ser 117. O outro oxigénio carboxílico de **26** forma uma ligação de hidrogénio com o oxigénio da cadeia principal de Ala 108. Contrariamente ao diflunisal, o resíduo Thr 119 orienta-se para longe do inibidor, contribuindo para a hidrofobicidade da bolsa de ligação, em vez de para as ligações de hidrogénio com o inibidor.

Para sondar adicionalmente o mecanismo de acção destes inibidores, foi avaliada a sua capacidade para estabilizar a TTR contra a dissociação induzida por ureia em função do tempo. A taxa de dissociação do tetrâmero estava irreversivelmente ligada ao rápido desenrolamento de monómeros, facilmente monitorizado, empregando concentrações de ureia excedendo aquelas que permitem o reenrolamento de monómeros. A dissociação monitorizada pelo desenrolamento foi sondada por CD no UV longínquo em ureia 6,5 M, revelando que todos os bons inibidores da amiloidogénese mediada por ácido abrandaram a taxa de dissociação do tetrâmero de uma forma dependente da dose (FIG. 2A e 2B). Vários inibidores, incluindo **20**, **46** e **48**, apresentam um efeito drástico na

dissociação do tetrâmero de TTR, a etapa limitante da amiloidogénese. Ver, por exemplo, Hammarstrom, P.; et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *25*, 16427-32, que é incorporado por referência na sua totalidade.

Visto que se suspeita que o modo de inibição da formação de fibrila de TTR por estes compostos seja a afinação dependente da dose da barreira de dissociação do tetrâmero através da estabilização do estado fundamental, os melhores inibidores deverão abrandar mais ao máximo a dissociação do tetrâmero. A taxa de formação de fibrila foi monitorizada por turbidimetria a um pH final de 4,4 ao longo de 192 h. Ver as FIG. 3A, 3B, 4A e 4B. Os inibidores possuindo a capacidade para estabilizar a TTR tetramérica a pH baixo irão prevenir a dissociação, o enrolamento incorrecto e a montagem incorrecta do tetrâmero em amilóide. Os melhores inibidores de formação de fibrila amilóide são aqueles que mais abrandam a dissociação do tetrâmero (FIG. 2A e 2B). Contudo, a correlação não é perfeita, visto que alguns inibidores se ligam melhor em ureia do que em condições ácidas e *vice-versa*.

Para garantir que os inibidores estão a estabilizar a forma tetramérica de TTR (3,6 μM), a estrutura quaternária de TTR foi sondada com estudos de ultracentrifugação analítica de equilíbrio e velocidade. Foi determinada a estrutura quaternária da proteína após incubação de 72 h com **18** e **20** (3,6 μM ou 7,2 μM) a pH 4,4. O tetrâmero era a espécie dominante, à concentração de inibidor tanto de 3,6 μM como de 7,2 μM , em estudos tanto de AUC de equilíbrio, como de velocidade.

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foi empregue para determinar as constantes de ligação de **18** e **20** para TTR a pH 8,0 (25°C). O diflunisal e os dois análogos ligam-se a TTR com cooperatividade negativa, uma característica exibida por muitos outros ligandos. No caso do diflunisal e de **20**, a ligação no primeiro local é 15 vezes mais forte do que a ligação no segundo local. O biarilo **18** possui um K_{d1} aproximadamente 120 vezes mais baixo do que o K_{d2} (Tabela 3). A Tabela 3 sumaria a primeira e a segunda constantes de dissociação para a ligação de **1**, **18** e **20** a TTR de tipo selvagem determinada por ITC. As constantes de ligação para **1**

foram relatadas anteriormente e são aqui proporcionadas para fins de comparação. Ver Exemplo 1.

Tabela 3: Constantes de Dissociação para Compostos que se Ligam a TTR de Tipo Selvagem

Inibidor	K _{d1}	K _{d2}
1	75 nM	1100 nM
18	9 nM	1100 nM
20	80 nM	1300 nM

A TTR WT tetramérica dissocia-se com um $t_{1/2}$ de 42 h e desenrola-se 500 000 vezes mais rápido. Deste modo, a sua taxa de dissociação pode ser sondada ligando-a ao desenrolamento, que é irreversível em ureia 6,5 M. Visto que a dissociação do tetrâmero é limitante para a amiloidogénese, todos os inibidores exibindo excelente actividade *in vitro* e estequiometria de ligação excedendo 0,50 no plasma, deverão abrandar a dissociação do tetrâmero se o mecanismo de acção presumido, a estabilização cinética através de ligação selectiva ao estado nativo, estiver correcto (ver FIG. 2A e 2B).

As taxas de dissociação do tetrâmero de TTR foram medidas em função da concentração de inibidor ao longo de um período de tempo de 168 h em ureia 6,5 M. Os inibidores seleccionados, especificamente **18, 20, 39, 41, 45, 46, 48 e 49**, demonstraram uma redução global na extensão da dissociação do tetrâmero ao longo de 160 h, como reflectido nas alterações de amplitude relativamente a TTR sem inibidor. A taxa de dissociação do tetrâmero é também drasticamente abrandada na presença de inibidor, como reflectido na diminuição do declive do decorrer do tempo. Os inibidores **20, 45, 46 e 48** são superiores, presumivelmente porque o inibidor se dissocia muito lentamente da TTR·I e TTR·I₂, em virtude da sua elevada afinidade de ligação em ureia. A formação de TTR·I e TTR·I₂, pode estabilizar significativamente o estado nativo, em virtude da baixa K_d desses complexos e aumentar a barreira cinética para a dissociação do tetrâmero, substancialmente no caso de **20, 45, 46 e 48**. Apesar de **16 e 18** se ligarem a TTR, parece que a sua afinidade é insuficiente para afectar a estabilização cinética. É provavelmente significativo que a ordem de

classificação da eficácia do inibidor em ureia para uma concentração de inibidor de 3,6 μM (proteína 3,6 μM) seja **20 $\approx$ 45 > 46 $\approx$ 48**, que é diferente de uma concentração de inibidor de 7,2 μM (**20 $\approx$ 46 > 45 $\approx$ 48**). Isto reflecte provavelmente uma diferença nos valores de K_{d2} em ureia.

A estabilização cinética do estado nativo é uma estratégia terapêutica atractiva, em virtude das provas emergentes de que oligómeros enrolados incorrectamente, quer na via amilóide quer fora dela, são neurotóxicos. Conseguir a estabilização cinética com inibidores pode proporcionar um tratamento não invasivo para ASS, PAF e CAF.

As taxas de dissociação do tetrâmero em ureia na presença de um dado inibidor nem sempre prevêm a capacidade do inibidor para prevenir a amiloidose a pH baixo. Uma vez que ainda não está claro como e onde se forma o amilóide num ser humano, são desejáveis estabilizantes do tetrâmero de TTR que funcionem bem numa variedade de ambientes desnaturantes. Foi explorada a taxa de formação de fibrila de TTR em função da concentração de inibidor, em condições ácidas (FIG. 3A, 3B, 4A e 4B). Os inibidores **20**, **45** e **48** têm um desempenho excepcionalmente bom, também neste ambiente. O inibidor **46** é um melhor estabilizante do tetrâmero em ureia do que em ácido, ao passo que **1** é muito melhor em ácido do que em ureia. A energia livre de estabilização associada à formação dos complexos $\text{TTR}\cdot\text{I}$ e $\text{TTR}\cdot\text{I}_2$ num dado ambiente, determina a extensão da estabilização do estado fundamental e o aumento associado na energia livre de activação para a dissociação do tetrâmero. Estes dados sugerem que os inibidores abrandam a amiloidose de TTR a pH baixo muito mais eficientemente do que abrandam a dissociação do tetrâmero de TTR em ureia 6,5 M. Isto pode acontecer porque a amiloidogénese requer a remontagem dependente da concentração após a dissociação. Os inibidores mais eficazes são aqueles que conseguem manter a concentração do intermediário amiloidogénico monomérico de TTR em níveis suficientemente baixos para tornar a formação de fibrila muito ineficiente. Tal como observado na desnaturação por ureia da TTR na presença de inibidores, a ordem de classificação da eficácia dos inibidores a pH baixo difere significativamente da concentração de inibidor 3,6 μM (FIG. 3A e 3B) para inibidor 7,2 μM (FIG. 4A e 4B). Esta observação reflecte provavelmente as diferenças nos valores de K_{d2} de

cada um dos inibidores a pH baixo. O exemplo mais drástico é o do diflunisal - um dos mais eficazes inibidores da formação de fibrila a 3,6 μM , porém um dos menos eficazes a 7,2 μM , em consequência da sua relativamente elevada K_{d2} .

Os análogos de diflunisal representam uma classe promissora de compostos para o tratamento da amiloidose de TTR. Embora diversos análogos de diclofenac sejam inibidores muito bons da formação de fibrila, os análogos de diflunisal oferecem uma classe adicional de estabilizantes do tetramero de TTR altamente eficazes. Diversos análogos de diclofenac oferecem a capacidade para inibir a formação de fibrila resultante da dissociação e enrolamento incorrecto de dois mutantes de TTR - Val30Met e Leu55Pro. As estruturas de co-cristal de raios x demonstram que os análogos de diclofenac se ligam principalmente no modo de ligação inverso, contudo, perturbações menores nas estruturas dos análogos de diflunisal permitem a sua ligação directa ou inversa. Adicionalmente, o diflunisal é capaz de se ligar no modo de ligação directo ou inverso, com ocupação quase igual em ambos os modos. As constantes de dissociação obtidas para o diclofenac (60 nM para K_{d1} e 1200 nM para K_{d2}) foram comparáveis às obtidas para o diflunisal e **20**, sendo que **18** demonstra ligação quase 10 vezes mais forte para o primeiro evento de ligação, conforme ilustrado pelo seu valor de K_{d1} . Adicionalmente, ambas as classes de inibidores exibiram ligação negativamente cooperativa. Muito notavelmente, diversos análogos de diflunisal foram muito selectivos para TTR no plasma sanguíneo humano, oferecendo o potencial para toxicidade e efeitos secundários diminuídos. Ver Oza, V.B.; et al. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 321-32.

Vinte e oito dos compostos sintetizados conseguem inibir, substancialmente, a amiloidogénese de TTR. Desses, vários apresentaram estequiometria de ligação superior a 0,05 equiv no plasma sanguíneo humano. Tanto as estruturas arílicas cloradas como fluoradas dos melhores inibidores se encontram em fármacos conhecidos, por conseguinte, há boas razões para se pensar que estes compostos ou os seus análogos poderiam ser transformados em fármacos que não exibem a actividade de AINE de **1**. Os compostos fluorados **18** e **20** podem ligar-se e estabilizar a TTR tetramérica em ureia 6,5 M, abrandando drasticamente a primeira etapa de enrolamento incorrecto e

amiloidogénese, dissociação do tetrâmero de TTR. Estes compostos e outros, também abrandam drasticamente a amiloidogénese de TTR mediada por ácido. Dos compostos testados, 18, 20, 39, 41, 45, 46, 48 e 49 tiveram o melhor desempenho na estabilização do tetrâmero de TTR em ureia e sob condições ácidas. Estes compostos biarílicos parecem aumentar a barreira de activação associada à dissociação do tetrâmero, a etapa limitante para a formação de amilóide, através da estabilização do estado fundamental.

Exemplo 3: Diflunisal Administrado Oralmente Estabiliza a Transtirretina Contra a Desnaturação

A transtirretina (TTR) é uma proteína homotetramérica que transporta a tiroxina e a proteína de ligação ao holo-retinol. Sob condições desnaturantes, a dissociação do tetrâmero limitante da taxa e o rápido enrolamento incorrecto dos monómeros permitem a montagem incorrecta em amilóide causando amiloidose sistémica senil, polineuropatia amilóide familiar e cardiomiopatia amilóide familiar. Sabe-se que a ligação de diflunisal a, pelo menos, um dos dois locais de ligação de tiroxina não ocupados em TTR estabiliza o tetrâmero de TTR, aumentando igualmente a barreira de activação da dissociação *in vitro*. Foi investigada a exequibilidade da utilização do diflunisal para o tratamento da amiloidose de TTR.

Métodos

Foram recrutados trinta voluntários saudáveis (25 do sexo masculino, 5 do sexo feminino) após ser dado consentimento informado. Os indivíduos variavam desde os 23 até aos 53 anos de idade (idade média, $37,6 \pm 8,8$) com um peso corporal médio de $78,0 \pm 12,1$ kg. Cada indivíduo foi tratado com diflunisal (Dolobid®) numa dose de 125, 250 ou 500 mg, duas vezes por dia (a cada 12 h) durante 7 dias (13 doses no total). Foi colhido sangue no dia 1 antes do tratamento e no dia 8, 4 e 12 h após a ingestão de diflunisal. Este desenho de estudo foi aprovado pelo Human Subjects Committee of Scripps Clinic, Scripps Green Hospital, The Scripps Research Institute, e The Scripps General Clinical Research Center.

Foram medidos os níveis séricos de diflunisal. Foram adicionados cem μ L de soro a 900 μ L de acetonitrilo para precipitar as proteínas. Após a centrifugação, foram

adicionados 100 µL de sobrenadante a 900 µL de trietilamina aquosa 100 mM, pH 11,5. Após filtração, foram injectados 100 µL de cada amostra numa coluna de fase inversa C18 de 3 cm Keystone utilizando um gradiente de 40-100% de solução B ao longo de 10 min (solução A: 94,8% de água/5% de acetonitrilo/0,2% de ácido trifluoroacético; solução B: 94,8% de acetonitrilo/5% de água/0,2% de ácido trifluoroacético), controlado por um sistema de distribuição de multi-solvente Waters 600E. A detecção foi levada a cabo a 280 nm com um detector de absorvância ajustável Waters 486 e os picos foram integrados para proporcionar a concentração de diflunisal a partir de curvas padrão.

Foi analisada a estequiometria de ligação de diflunisal a TTR em soro humano. Uma pasta de Sepharose de 1:1 de gel/Tris·HCl 10 mM, pH 8,0/NaCl 140 mM/NaN₃ (TSA) a 0,025% (62,5 µL) foi adicionada a 500 µL de soro e incubada a 4°C durante 1 h. A seguir a centrifugação, foram adicionados 400 µL de sobrenadante a 200 µL de uma pasta de gel/TSA 1:1 da Sepharose conjugada com anticorpo anti-TTR e foi lentamente agitada a 4°C durante 20 min. Após centrifugação, o gel foi lavado com 1 mL de TSA/saponina a 0,05% (Fisher Scientific) (duas vezes, 10 min cada), e adicionalmente com 1 mL de TSA (uma vez, 10 min) a 4°C. Em seguida, adicionaram-se 155 µL de trietilamina aquosa 100 mM, pH 11,5, para eluir a TTR e o diflunisal ligado dos anticorpos. Após agitação suave a 4°C durante 30 min, a amostra foi centrifugada e removeram-se 145 µL do sobrenadante. Uma injeção de 135 µL de amostra foi separada e analisada conforme descrito anteriormente (Purkey *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**; 98: 5566-71).

Foi avaliada a estabilidade do tetrâmero de TTR no soro em relativamente à desnaturação por ureia. Amostras de dez µL de soro foram incubadas (25°C) em 90 µL de várias concentrações de ureia em tampão de fosfato 50 mM (pH 7,0; KCl 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM). As soluções de ureia foram examinadas através do índice de refração para verificar as concentrações preparadas em peso. A ligação cruzada de glutaraldeído da proteína foi realizada pela adição de 10 µL de glutaraldeído (25%). A reacção de ligação cruzada foi deixada prosseguir durante 4 min antes de ser extinta pela adição de 10 µL de NaBH₄ (7% em NaOH a 0,1 M). As amostras foram misturadas com 120 µL de cocktail de carregamento do gel

reductor de SDS (concentração final de SDS = 2,5%) e fervidas durante 5 min. As amostras foram separadas utilizando SDS-PAGE a 12% e os géis foram analisados por imunotransferência utilizando anti-soro anti-TTR (Purkey *et al.*, *supra*).

Foi avaliada a estabilidade do tetrâmero de TTR no soro contra a desnaturação ácida. Amostras de dez µL de soro foram incubadas (37°C) em 90 µL de tampão de acidificação 100 mM. Foi utilizado tampão de citrato quando se desejava um pH final ≤3,8; foi empregue tampão de acetato quando a gama de pH em avaliação era de 4,2 - 5,4. Após ligação cruzada, as amostras foram analisadas por SDS-PAGE e imunotransferência, conforme descrito acima.

A TTR WT recombinante e variantes foram expressas em *Escherichia coli* Epicurian gold BL21/DE3 (Stratagene) transformada com o plasmídeo pmmHα contendo os genes da TTR e de resistência à ampicilina. A expressão e purificação foram realizadas conforme descrito anteriormente (Lashuel *et al.*, *Biochemistry* **1999**; 38: 13560-73).

A taxa de dissociação do tetrâmero de TTR foi medida por espectroscopia de dicroísmo circular. A avaliação das taxas de dissociação do tetrâmero foi efectuada utilizando amostras de TTR (3,6 µM) recombinante em ureia 6,5 M, uma concentração na região pós-transição para alteração estrutural terciária (Hammarström *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* **2002**; 99: 16427-32). Os espectros de CD no UV longínquo de TTR (210 -220 nm) em função do tempo foram medidos para avaliar a taxa de dissociação lenta do tetrâmero ligando-a a rápidas alterações estruturais terciárias.

O ensaio à formação de fibrila foi efectuado como se segue. Uma solução-mãe de TTR recombinante (7,2 µM) foi diluída 1:1 com tampão de acidificação 100 mM. Foi utilizado tampão de citrato quando se desejava um pH final ≤3,8; foi empregue tampão de acetato quando a gama de pH em avaliação era de 4,2 - 6,0 e foi utilizado tampão de fosfato para avaliar a amiloidogénese a pH 6,5. As amostras foram incubadas a 37°C durante 72 h sem agitação após acidificação. A extensão da formação de fibrila foi sondada através de medições de turbidez a 400 nm.

A cinética da formação de fibrila foi medida como se segue. Soluções de TTR recombinante (7,2 μM) foram misturadas com um volume igual de tampão de acetato 100 mM para produzir um pH final de 4,4. As amostras foram incubadas a 37°C e a turbidez a 400 nm foi monitorizada ao longo de 168 h. Foi preparada uma amostra em separado para cada ponto de tempo.

O efeito do diflunisal sobre a dissociação do tetrâmero mediada por ureia e a formação de fibrila mediada pelo pH, foi avaliado através da adição de diflunisal a uma solução de TTR que foi incubada durante 3 h (37°C) antes de se submeter a proteína a desnaturação pela ureia ou amiloidose mediada pelo pH.

Resultados

As concentrações médias de diflunisal sérico, medidas por HPLC, 4 e 12 h após a ingestão da 13ª dose eram $20,1 \pm 7,1$ e $6,9 \pm 3,0$ μM no grupo de 125 mg *b.i.d.*, $233,5 \pm 76,0$ e $145,8 \pm 38,9$ μM no grupo de 250 mg *b.i.d.*, e $517,0 \pm 79,5$ e $421,9 \pm 78,1$ μM no grupo de 500 mg *b.i.d.* Mais de 99% de diflunisal está ligado à proteína. Estas concentrações, observadas no grupo de 250 mg *b.i.d.* e de 500 mg *b.i.d.*, são muito elevadas relativamente à concentração de TTR no soro (3,6 - 7,2 μM) e deverão produzir uma estequiometria de ligação de diflunisal próxima do máximo de 2 se a ligação a proteínas competidoras tais como GLT (0,3 - 0,5 μM) e/ou albumina (580 - 725 μM), que possuem múltiplos locais de ligação para moléculas pequenas, não for de elevada afinidade.

O diflunisal liga-se, de um modo preferido, a TTR tetramérica no sangue com estequiometria de, pelo menos, 1 e idealmente 2, para observar a máxima estabilização cinética. Para colocar um limite inferior na estequiometria do diflunisal em cada indivíduo, a transtirretina foi imunoprecipitada do soro com anticorpos policlonais ligados a uma resina de fase sólida, conforme descrito anteriormente (Purkey *et al.*, *supra*). Após lavar a TTR imobilizada 3X para eliminar a ligação não específica, o complexo TTR-diflunisal foi dissociado da resina e a estequiometria do diflunisal foi determinada por HPLC empregando curvas padrão. A estequiometria do diflunisal ligado a TTR no soro, 4 e 12 h após ingestão, foi $0,45 \pm 0,11$ e $0,31 \pm 0,12$ no grupo de 125 mg *b.i.d.*, $1,12 \pm 0,08$ e $0,95 \pm 0,13$ no grupo de 250 mg

b.i.d. e $1,51 \pm 0,09$ e $1,48 \pm 0,08$ no grupo de 500 mg *b.i.d.* A estequiometria do diflunisal aumentou com a sua concentração sérica, até $\approx 300 \mu\text{M}$. A estequiometria máxima de 1,5, inferior ao esperado, a uma concentração sérica de $300 \mu\text{M}$, resulta de uma limitação do método (perdas associadas à lavagem) e/ou da ligação do diflunisal a outras proteínas plasmáticas, por conseguinte, efectuou-se um estudo da estequiometria da ligação do diflunisal com TTR recombinante. As perdas associadas à lavagem explicam a máxima estequiometria de ligação de 1,5 em consequência, principalmente, da dissociação do local de baixa afinidade. O diflunisal liga-se a TTR com cooperatividade negativa, e por este motivo a dissociação do local de baixa afinidade é drasticamente mais rápida. A estequiometria da ligação esperada em tampão foi calculada com base nas constantes de dissociação determinadas através de calorimetria de titulação isotérmica (K_{d1} , 75 nM; K_{d2} , 1,1 μM). A co-representação gráfica da estequiometria calculada e determinada experimentalmente, esta última derivada de imunoprecipitação (3 lavagens) e análise por HPLC, permite estimar a estequiometria verdadeira em 1,75 - 1,91 para 250 mg *b.i.d.*, sugerindo que esta dose poderia ser utilizada.

Uma comparação da estequiometria de ligação do diflunisal (100 μM) em indivíduos (0,8 - 1) a TTR recombinante (1,5) revela ligação significativa a proteínas séricas além da TTR, proporcionando o incentivo para desenvolver análogos de diflunisal que se liguem mais selectivamente a TTR. O nível sérico de TTR aumentaram e os níveis séricos de T_4 e RBP totais diminuíram após a administração de diflunisal em todos os grupos. Estas verificações sugerem que o diflunisal influencia o metabolismo da TTR. Não foram observados efeitos secundários óbvios durante ou após o estudo. Contudo, no grupo de 500 mg *b.i.d.*, o nível sérico de albumina diminuiu significativamente e os níveis de BUN e creatinina aumentaram ligeiramente. No grupo de 250 mg *b.i.d.*, o nível sérico de albumina diminuiu moderadamente e o nível de BUN aumentou ligeiramente.

Foi desenvolvido um novo método para demonstrar que o diflunisal administrado oralmente estabiliza a TTR sérica contra *stresses* de desnaturação incluindo a amiloidose. Este método serve como um marcador substituto para identificar compostos que deverão prevenir as doenças de enrolamento

incorrecto de TTR. O soro completo dos indivíduos foi submetido a desnaturação através da adição de ureia (0 - 9 M) ou através da adição de ácido (pH 3,8 - 5,4). Visto que a TTR se tem que dissociar a fim de se desnaturar, podem utilizar-se as alterações estruturais quaternárias para monitorizar a extensão do desenrolamento (Hammarström *et al.*, *supra*). Foi adicionado glutaraldeído para reticular todas as proteínas no soro após serem submetidas a um *stress* de desnaturação e para estabelecer que fracção de TTR está enrolada normalmente (tetrâmero ou dímero) *versus* desnaturada (monómero). O SDS-PAGE do soro completo separa o tetrâmero e o dímero de TTR reticulada (representando estes a TTR enrolada) do monómero. A imunotransferência permite comparações quantitativas da quantidade de TTR enrolada. Os anticorpos policlonais não se ligam ao monómero de TTR desenrolado quase tão bem como à TTR enrolada, e por conseguinte é muito útil comparar a intensidade das bandas de tetrâmero e dímero na ausência e na presença de diflunisal. A dependência temporal da inibição pelo diflunisal da desnaturação de TTR pode ser igualmente avaliada através deste método. A dependência temporal escassamente perceptível deste processo na presença de diflunisal apoia fortemente o mecanismo de estabilização cinética (ver Exemplo 1), em que a estabilização do estado fundamental pelo diflunisal torna a barreira de dissociação do tetrâmero intransponível. A eficácia do diflunisal (250 mg *b.i.d.*) nestes períodos temporais de desnaturação é melhor do que a estequiometria medida (0,8 - 1,2) poderia prever, proporcionando evidências adicionais de que o método da imunoprecipitação subestima a verdadeira estequiometria de ligação, especialmente quando esta excede 1.

O conhecimento da gama de estequiometrias de ligação do diflunisal em seres humanos e da concentração de diflunisal requerida para mimetizar essas estequiometrias num tubo de ensaio, permite efectuar estudos biofísicos relevantes *in vitro* para sondar o mecanismo pelo qual os complexos TTR•diflunisal e TTR•diflunisal₂ previnem a dissociação e a amiloidose. A taxa de dissociação mediada por ureia (6,5 M) e a taxa de formação de fibrila amilóide mediada por ácido (pH 4,4) foram estudadas em função da concentração de diflunisal (5, 10, 20 e 60 μ M), revelando um abrandamento dependente da dose. Visto que a dissociação do tetrâmero é limitante para a formação de fibrila amilóide, daí resulta que

as taxas de dissociação do tetrâmero em ureia deverão ser indiciantes da extensão da formação de fibrila amilóide mediada por acidificação. O diflunisal é melhor a inibir a amiloidose do que a inibir a dissociação mediada por ureia porque, para a amiloidose, é igualmente necessária a remontagem dependente da concentração. É igualmente possível que K_{d1} e K_{d2} associadas à ligação de diflunisal a TTR sejam mais baixas em ácido do que em ureia.

Mais de 80 mutações de TTR predispõem os indivíduos a amiloidose hereditária por alterações dependentes da sequência do panorama energético da desnaturação. Destes, a deposição de amilóide de vV122I dá origem à cardiomiopatia amilóide familiar (CAF) em 3 - 4% dos afro-americanos, ao passo que V30M é a mutação proeminente da polineuropatia amilóide familiar (PAF). O diflunisal inibe ambas as amiloidogêneses, de V122I e V30M, de uma forma dependente da dose, demonstrando a generalidade desta abordagem.

É altamente desejável desenvolver uma estratégia terapêutica geral, não invasiva, para melhorar a amiloidose de TTR. Os resultados aqui delineados indicam que a administração oral de diflunisal pode retardar a dissociação do tetrâmero através de ligação a, e estabilização do estado nativo não amiloidogénico. A estabilização do estado nativo é uma estratégia particularmente atractiva, dados os recentes relatórios de que são os oligómeros enrolados incorrectamente e não as fibrilas amilóides que causam a neurodegeneração. A utilização clínica de diflunisal (250 - 500 mg *b.i.d.*) para a artrite reumatóide e a osteoartrite demonstra a sua baixa toxicidade em utilizações prolongadas. A semivida sérica de TTR é de 12 - 15 h, e por conseguinte, a dosagem de duas vezes por dia parece óptima, dada a semivida de 8-10 h do diflunisal. O diflunisal deverá ser eficaz contra ASS, CAF e PAF, porque se liga tanto a TTR WT como a variantes, impondo a estabilização cinética, analogamente ao mecanismo utilizado pela inclusão de subunidades trans-supressoras dentro dos tetrâmeros de TTR, caso contrário, compostos por subunidades associadas a doença, que se sabe que melhoram a doença humana. O diflunisal pode ser menos eficaz contra a amiloidose do SNC porque não consegue atravessar a barreira hemato-encefálica, embora os análogos de diflunisal (e.g., um análogo aqui descrito) possam ter essa capacidade.

Exemplo 4: Bifenilos Policlorados Hidroxilados Ligam-se Selectivamente a Transtirretina no Sangue e Inibem a Amiloidogénese

Os bifenilos policlorados (PCB) são conhecidos poluentes ambientais persistentes que são referidos como sendo tóxicos para roedores e, possivelmente, seres humanos. A longevidade destes compostos no ambiente deve-se à sua lenta degradação e elevada lipofilicidade, que lhes permite bioacumularem-se e concentrarem-se à medida que se deslocam na cadeia alimentar. Os PCB hidroxilados (OH-CB) são metabolitos formados por oxidação de PCB pelas mono-oxigenases P450. Dados definitivos sobre a toxicidade de compostos individuais de PCB em seres humanos são difíceis de encontrar, em virtude do facto de que os PCB comercialmente disponíveis são geralmente misturas que contêm muitos isómeros diferentes, assim como quantidades vestigiais de toxinas conhecidas, e.g., dibenzofuranos clorados. Contudo, a toxicidade de diversos PCB purificados foi demonstrada em animais de laboratório. Perda óssea, toxicidade imunológica, neurotoxicidade e níveis diminuídos de hormona tiróide, além da estrogenicidade dos OH-PCB, estão associados à administração destes compostos.

Numerosos estudos demonstram que os PCB e os OH-PCB se ligam à transtirretina (TTR) *in vitro*. Foi sugerido que a TTR é o alvo proteínico no sangue humano que contribui para a persistência dos OH-PCB em indivíduos expostos. Embora numerosos relatos sugiram a TTR como uma proteína de ligação a PCB *in vivo*, não há qualquer prova definitiva de que os PCB se liguem à transtirretina no plasma. Desenvolvemos um método de imunoprecipitação que pode ser utilizado para colocar um limite inferior à estequiometria de ligação de moléculas pequenas a TTR em fluidos biológicos. A estequiometria de ligação a TTR de PCB e OH-PCB à TTR plasmática humana foi aqui avaliada.

A amiloidogénese pós-secreção de TTR plasmática que requer a dissociação do tetrâmero, limitante, o enrolamento incorrecto de monómeros e a montagem incorrecta causa putativamente amiloidose sistémica senil, cardiomiopatia amilóide familiar e as polineuropatias amilóides familiares. Demonstra-se aqui que diversos OH-PCB se ligam selectivamente a TTR no plasma humano e inibem a formação de fibrila

amilóide, através da estabilização do tetrâmero, conduzindo à estabilização cinética, parcial ou completa, do estado nativo. Caracterizámos quatro complexos representativos $TTR \cdot (OH-PCB)_2$ por cristalografia de raios X para mais bem compreender a base molecular da ligação e para proporcionar a base para a concepção de inibidores otimizados da amiloidogénese de TTR.

Selectividade de Ligação de PCB e OH-PCB para Transtirretina em Plasma Sanguíneo Humano

Foi avaliada a selectividade de ligação de oito PCB (compostos **1-8**, FIG. 5), sobre os quais foi relatado que deslocam da TTR a hormona da tiróide com uma IC_{50} inferior a 50 nM e catorze OH-PCB (compostos **9-22**, FIG. 6), conhecidos metabolitos de PCB que se refere que se ligam a TTR ou baixam os níveis tiroxina em ratinhos ou ratos. Foram estabelecidos limites inferiores à estequiometria de ligação de PCB a TTR no plasma utilizando anticorpos policlonais para TTR ligados covalentemente a uma resina de Sepharose que foi misturada com plasma sanguíneo humano pré-tratado com PCB ou OH-PCB (10,8 μM). Após lavagem, foi avaliada a estequiometria da ligação de PCB ou de OH-PCB a TTR ($\approx 5 \mu M$) através de HPLC de fase inversa.

Num tetrâmero de TTR, podem ligar-se até dois PCB aos dois locais de ligação idênticos da hormona tiróide. Excepto os PCB **1 & 3**, os restantes PCB não hidroxilados exibiram selectividade de ligação relativamente baixa para a TTR plasmática (Tabela 4). Em contrapartida, os OH-PCB apresentaram boa a excelente selectividade de ligação para com a TTR plasmática (Tabela 5). Vários dos PCB hidroxilados (e.g., **16** e **22**) aproximam-se de uma estequiometria de ligação de 2. A selectividade de ligação de OH-PCB em sangue completo é muito similar à observada no plasma, e por esse motivo as membranas de eritrócitos não sequestram significativamente os OH-PCB estudados.

Tabela 4: Estequiometria de Ligação de PCB a TTR em Plasma Sanguíneo Humano

Composto	Equivalentes Ligados
3	$1,50 \pm 0,42$
1	$0,62 \pm 0,12$
6	$0,19 \pm 0,11$
2	$0,18 \pm 0,03$
5	$0,06 \pm 0,04$
4	$0,05 \pm 0,04$
7	Ausência de ligação
8	Ausência de ligação

Tabela 5: Estequiometria de Ligação de PCB Hidroxilados a TTR em Plasma Sanguíneo Humano

Composto	Equivalentes Ligados (Plasma)	Equivalentes Ligados (Sangue)
16	$1,86 \pm 0,14$	ND
22	$1,67 \pm 0,40$	1,69
17	$1,63 \pm 0,05$	ND
19	$1,48 \pm 0,16$	1,55
21	$1,40 \pm 0,22$	1,33
18	$1,36 \pm 0,21$	ND
12	$1,23 \pm 0,24$	1,47
11	$1,12 \pm 0,22$	1,20
20	$1,02 \pm 0,09$	0,86
10	$0,96 \pm 0,09$	0,93
13	$0,84 \pm 0,24$	0,86
9	$0,83 \pm 0,19$	0,57
14	$0,81 \pm 0,29$	0,73
15	$0,70 \pm 0,17$	0,56

A captura de anticorpos do complexo TTR•PCB possui o potencial para subestimar a estequiometria de ligação de PCB em consequência da dissociação de PCB da TTR durante as 5 etapas de lavagem. Os PCB e OH-PCB (10,8 μ M) foram incubados com TTR recombinante (3,6 μ M) para avaliar a estequiometria da molécula pequena ligada a TTR imobilizada após cada etapa de lavagem. A estequiometria diminuiu em 10-17% para o PCB **2** e o OH-PCB **18** após 5 lavagens, ao passo que a do PCB **4** diminuiu em 45%. A quantificação de perdas associadas à lavagem permite estimar a verdadeira estequiometria de ligação de PCB e OH-PCB no plasma. Além disso, uma boa correlação entre a

estequiometria final de OH-PCB ligado a TTR recombinante e a quantidade ligada a TTR no plasma, indicam que o composto é um ligante de TTR altamente selectivo no plasma, e.g., OH-PCB **18**. Em contrapartida, os PCB **2** e **4** exibem uma estequiometria de ligação mais elevada para TTR em tampão do que no plasma, sugerindo fortemente que estes se ligam a proteína(s) competidora(s), assim como a TTR no plasma.

Inibição de Fibrila Amilóide de TTR por PCB Hidroxilados

Foi avaliada a capacidade de OH-PCB e do PCB **3** para inibirem a formação de fibrila de TTR *in vitro*, porque estes compostos exibem boa selectividade de ligação para com a TTR no sangue. A TTR segregada para o sangue a partir do fígado parece ser a fonte de amilóide de TTR sistémico. Embora não seja claro onde ou como se forma o amilóide em seres humanos, o desnaturante típico nas células é ácido, que é eficaz na conversão de quase todos os péptidos e proteínas amiloidogénicos em amilóide e/ou agregados relacionados. Deste modo, a formação de fibrila mediada por ácido (pH 4,4), monitorizada por turbidimetria, foi empregada para monitorizar a eficácia dos PCB como inibidores. Os PCB hidroxilados e o PCB **3** foram altamente eficazes como inibidores de fibrila de TTR. A uma concentração de inibidor igual à concentração de TTR WT (3,6 μ M), apenas foi observada 12 - 50% da quantidade normal de formação de fibrila após um período de incubação de 72 h. Esta actividade é equivalente à exibida pelos melhores inibidores de fibrila identificados até à data, tais como o ácido flufenâmico (Flu), que foi incluído como controlo positivo.

Ligação do OH-PCB **18** a TTR

Experiências anteriores de espectrometria de massa sugerem que o OH-PCB **18** exhibe cooperatividade de ligação positiva para dois locais de ligação da hormona tiróide C2 relacionados da TTR. Quando são adicionadas a TTR quantidades subestequiométricas (<1:1) de **18**, as espécies predominantes observadas no espectrómetro de massa são apo-TTR e o complexo TTR•**18**₂, consistentemente com a ligação positivamente cooperativa. As características de ligação a TTR do **18** contrastam com as exibidas por numerosos outros inibidores de fibrila amilóide de TTR que se ligam com cooperatividade negativa. Os estudos de calorimetria de titulação isotérmica

efectuados sob condições fisiológicas revelam que a ligação do OH-PCB **18** a TTR WT se ajusta melhor a um modelo onde as constantes de dissociação são K_d idênticas ($3,2 \pm 1,8$ nM). Este resultado não refuta a ligação positivamente cooperativa, visto que não se consegue alcançar uma concentração suficientemente baixa de TTR para sondar a cooperatividade positiva, em virtude do insuficiente calor libertado. Tentativas para ajustar os dados recolhidos a modelos de ligação positivamente ou negativamente cooperativa produziram fracos ajustes.

Estruturas de Co-Cristal dos OH-PCB 12, 16, 17 e 18

Os cristais de OH-PCB **12**, **16**, **17** e **18** ligados a TTR WT foram obtidos através de embebimento dos cristais de TTR com um excesso molar de 10 vezes de inibidor, durante quatro semanas. As estruturas de raios X foram depois resolvidas para cada um dos complexos. O dímero de TTR dentro da unidade cristalográfica assimétrica forma metade das duas bolsas de ligação ao ligando. Em virtude de ambos os locais de ligação serem bissectados pelos mesmos eixos duplos de simetria, observam-se, tipicamente, dois modos de ligação de simetria equivalentes dos inibidores. Cada local de ligação de TTR pode ser subdividido em cavidades internas e externas. Estas cavidades compreendem três denominadas bolsas de ligação de halogéneo (HBP) porque são ocupadas pelos iodos nos dois anéis aromáticos da tiroxina. As HBP **3** e **3'** localizam-se profundamente dentro da cavidade de ligação interna, as HBP **2** e **2'** definem a fronteira entre a cavidade de ligação interna e externa, ao passo que as HBP **1** e **1'** se localizam próximo da periferia da cavidade de ligação externa. As estruturas de co-cristal revelam que a ligação C-C que liga os dois anéis aromáticos do OH-PCB está quase centrada sobre o eixo duplo de simetria, dando a aparência de uma única conformação de ligação. O ângulo do diedro entre dois anéis fenílicos é de 59° para **12**, 37° tanto para **16** como **17** e 44° para **18**. Iodos os OH-PCB ocupam posições semelhantes nas bolsas de ligação interna e externa. A complementaridade de van der Waals do sistema de anéis biarílico facilita diversas interacções inter-subunidades que envolvem os resíduos X, Y e Z numa subunidade, e os resíduos n', m' e o' na outra subunidade que compõem cada local de ligação. Vários dos substituintes nos

anéis fenílicos estão fora do eixo e podem ser modelados em múltiplas posições dentro da densidade electrónica observada.

OH-PCB 18 Ligado a TTR

A estrutura de raios X de 1,8 Å do complexo TTR•**18**₂ demonstra que o inibidor possui excelente complementaridade estereoquímica com o local de ligação de TTR. A mecânica molecular (Insight II, Accelrys) indica que a conformação não ligada de **18** está próxima da sua estrutura ligada. A estrutura refinada define interacções electrostáticas, directas e mediadas por água, que contribuem para a elevada afinidade de ligação de **18**. Um dos anéis aromáticos identicamente substituídos 3-Cl, 4-OH, 5-Cl ocupa a bolsa de ligação interna, projectando-se os seus substituintes de cloro para HBP **3** e **3'**. As cadeias laterais de Ser117 e Thr119 adoptam uma conformação alternativa por rotação em torno das suas ligações Cα-Cβ, tal como discernido pelos mapas de densidade electrónica não enviesados. A cadeia lateral de Ser117 adopta todas as três conformações de rotómero, tal como discernido pela distribuição de densidade electrónica. Interessantemente, duas moléculas de água estão localizadas entre os resíduos Ser117 adjacentes no eixo duplo com ocupação de 50%, facilitando uma rede de ligações de hidrogénio ligando os resíduos Ser117, as moléculas de água vizinhas e a funcionalidade fenólica de **18**. A partir de uma inspecção da estrutura, não é claro por que motivo **18** se liga com comportamento não cooperativo ou positivamente cooperativo. O outro anel identicamente substituído ocupa a bolsa de ligação externa de TTR com os seus halogéneos projectando-se para as HBP **1** e **1'**.

Composto 16 Ligado a TTR

O anel fenólico trissubstituído 3-Cl, 4-OH, 5-Cl de **16** está orientado para o local de ligação interior de TTR efectuando as mesmas interacções electrostáticas e hidrófobas com TTR que este anel faz na estrutura TTR•**18**₂ descrita anteriormente. O anel aromático 3,4-diclorado ocupa a bolsa de ligação externa, com o halogéneo dirigido para dentro de HBP **1** ou **1'**, dependendo de que modo de ligação de simetria equivalente está a ser considerado. A densidade electrónica de **16**, tal como a do OH-PCB **18**, é simétrica e, deste modo, com base no mapa de densidade electrónica, não é possível

posicionar inequivocamente o OH em *para* e o Cl em *para*. O mapa de densidade electrónica não enviesado é consistente com três conformações de rotómero de Ser117 e contém duas moléculas de água entre os resíduos Ser117, analogamente à estrutura do TTR•18₂.

OH-PCB 17 Ligado a TTR

O inibidor **17** liga-se com o seu anel arílico substituído 3-Cl, 4-OH, 5-Cl orientado para a bolsa de ligação interna, utilizando as mesmas interacções que este anel utiliza nas estruturas TTR•16₂ e TTR•18₂ descritas acima. O anel 2,3,4-triclorado ocupa a bolsa de ligação externa utilizando interacções com HBP-1, HBP-1', HBP-2, HBP-2' nos dois modos de ligação de simetria equivalentes. As múltiplas conformações de Ser117 e as duas moléculas de água conservadas são igualmente características da estrutura de TTR•17₂. Uma alteração conformacional da cadeia lateral de Thr119 era evidente a partir dos mapas de densidade electrónica não enviesados.

Composto 12 Ligado a TTR

O biarilo **12** coloca o seu anel arílico substituído 3-Cl, 4-OH na bolsa de ligação externa, com os seus dois cloros interagindo com HBP-1 e 1'. Contrariamente às estruturas de TTR•16₂ e TTR•17₂, onde o fenol se localiza na bolsa de ligação interna. O grupo hidroxilo (provavelmente na forma ionizada) está dentro da distância de ligações de hidrogénio das cadeias laterais de Lys15. O anel tetraclorado está colocado na bolsa de ligação interna onde os halogéneos estão orientados em HBP 2 e 2', assim como 3 e 3'. As cadeias laterais de Ser117 e Thr119 adoptam conformações que são idênticas às encontradas na estrutura apo-TTR, contrariamente à situação de **16**, **17** e **18**.

Aqui, de 8 PCB referidos anteriormente como deslocando a T4 com uma IC₅₀ inferior a 50 nM, demonstrou-se que apenas **1** e **3** se ligam a TTR no plasma humano com estequiometria apreciável. Em contrapartida, todos os catorze OH-PCB referidos anteriormente como se ligando a TTR, exibiram selectividade de ligação significativa para com TTR no plasma. Isto é consistente com a observação de que os OH-PCB são observados principalmente no plasma e parecem ser aí selectivamente retidos, em oposição à retenção em lípidos e

outros tecidos onde os PCB, tipicamente, se acumulam. Os OH-PCB também se ligam selectivamente a TTR no sangue completo, consistentemente com a ideia de que não sofrem partição em membranas lipídicas.

A quantidade de PCB (ou OH-PCB) que é perdida do complexo anticorpo•TTR•PCB durante as etapas de lavagem foi avaliada utilizando TTR WT recombinante. A extensão da dissociação de PCB associada à lavagem é específica da molécula. Alguns compostos exibem elevada estequiometria de ligação após as lavagens, consistentemente com significativa ligação inicial e baixas perdas associadas à lavagem, implicando uma taxa de dissociação lenta. Compostos exibindo baixa estequiometria de ligação caem em, pelo menos, duas categorias: elevada estequiometria de ligação inicial com perdas significativas associadas à lavagem ou baixa estequiometria de ligação inicial sem perdas significativas associadas à lavagem, o último cenário aplicável a compostos que se ligam com elevada afinidade a TTR, mas com afinidade ainda mais elevada a outra(s) proteína(s) plasmáticas(s). Os PCB **2** e **4** exibem ambos baixa estequiometria de ligação pós-lavagem à TTR recombinante. Perdeu-se quarenta e cinco % de PCB **4** em virtude das lavagens, ao passo que o PCB **2** exhibe simplesmente fraca estequiometria de ligação inicial com perdas mínimas associadas à lavagem (10%). Os valores de selectividade pós-lavagem reflectem um limite inferior da quantidade de PCB que está inicialmente ligado no plasma. Os compostos como o PCB **18**, que são caracterizados por elevada estequiometria de ligação pós-lavagem, têm que possuir elevada afinidade e selectividade de ligação, consistentemente com a lenta taxa de dissociação observada.

Além da sua elevada selectividade de ligação para com a TTR plasmática, os OH-PCB e o PCB **3** exibem, igualmente, excelente inibição da formação de fibrila de TTR *in vitro*. A eficácia dos inibidores **14**, **15** e **18** estão entre as mais elevadas observadas até à data a uma concentração equimolar (3,6 μ M) de inibidor e TTR. Isto é provavelmente atribuível à sua elevada afinidade de ligação (igualmente consistente com a sua lenta taxa de dissociação) e às suas propriedades de ligação de TTR não cooperativa, ou positivamente cooperativa, que são invulgares. As K_d em nM exibidas pelo melhor inibidor, o OH-PCB **18**, estipulam que o estado nativo de TTR será

estabilizado por >3 kcal/mol. A estabilização do estado fundamental aumenta substancialmente a barreira de dissociação do tetrâmero (etapa limitante na amiloidogénese de TTR), pelo que o tetrâmero não se consegue dissociar num período de tempo biologicamente relevante. A estabilização cinética do estado nativo não amiloidogénico mediada pela ligação de **18** ao estado fundamental foi confirmada pela dissociação do tetrâmero drasticamente abrandada em ureia a 6 M e amiloidogenicidade lenta a pH 4,4. Pensa-se que o OH-PCB **18** (3,6 μ M) seja um impressionante inibidor de amilóide porque é um excelente estabilizante cinético de TTR tetramérica, i.e., impede 2/3 de uma amostra de TTR 3,6 μ M de ficar amiloidogénica a pH 4,4, porque TTR•**18** e TTR•**18**₂ são incompetentes para formar amilóide, e o restante da TTR (1,18 μ M) forma amilóide muito ineficientemente em virtude da sua baixa concentração. As taxas de dissociação dos melhores inibidores de OH-PCB podem ser igualmente mais lentas do que o esperado em virtude do emparelhamento estrutural de TTR em torno do OH-PCB, porém, isto ainda não foi avaliado tão cuidadosamente como é necessário. No mínimo, estes compostos proporcionam uma orientação para a síntese de inibidores excepcionais, ou podem, eles mesmos, provar-se úteis como inibidores dependendo do seu perfil de toxicidade.

A informação estrutural sobre TTR ligada aos OH-PCB **12**, **16**, **17** e **18** revela que estes biarilos se ligam geralmente ao longo do eixo duplo de simetria cristalográfico. O ângulo do diedro entre os dois anéis varia de ~ 40 – 60° , permitindo que as bolsas de ligação de halogéneo (HBP) em duas subunidades vizinhas se engrenem simultaneamente, conduzindo à estabilização da interface estrutural quaternária tetramérica. O PCB hidroxilado **18** possui óptima complementaridade estrutural com TTR, já que os seus cloros são capazes de se ligar simultaneamente a HBP 1 e 1', assim como a 3 e 3'. Este não é o caso com **16** e **17**, que requerem consideração de ambos os modos de ligação de simetria equivalentes, de modo a prolongar os cloros para dentro das HBP 1, 1', 3 e 3'.

A orientação do anel fenólico para a bolsa de ligação interna parece desempenhar um importante papel, na medida em que permite que se forme uma rede de ligações de hidrogénio mediada por água entre o anel e as subunidades de TTR vizinhas que, presumivelmente, estabilizam adicionalmente a estrutura

quaternária nativa de TTR. Uma rede de ligações de H envolvendo as três conformações alternadas de Ser-117, o grupo fenólico do inibidor e as duas moléculas de água conservadas, cria uma rede electrostática que interliga as duas subunidades que formam o local de ligação de PCB. Em todas as três estruturas, a Thr119 ocupa, igualmente, múltiplas conformações de rotómero. Em contrapartida, esta rede de interacções electrostáticas está ausente no complexo **12₂•TTR**, em que o anel fenólico substituído com hidroxilo está orientado na bolsa de ligação externa e em que Ser117 e Thr 119 adoptam conformações apo de cadeia lateral.

A toxicidade dos OH-PCB não está bem estabelecida na literatura. Numa variedade de estudos *in vitro* e em animais, os OH-PCB parecem ser ligeiramente estrogénicos ou anti-estrogénicos. Foram sugeridos outros mecanismos de toxicidade e há igualmente relatos de níveis diminuídos de hormona tiróide em animais expostos a estes compostos. A sugestão de que a ligação de OH-PCB a TTR diminui os níveis de T4 e de que níveis diminuídos de T4 reflectem ligação de moléculas pequenas a TTR é difícil de apoiar directamente. Visto que, aproximadamente, metade da T4 é transportada por albumina, o deslocamento de T4 dos locais de ligação de albumina parece ser mais provavelmente a causa dos níveis diminuídos de T4 em indivíduos expostos a PCB. A globulina de ligação à tiróide possui a afinidade mais elevada para a tiroxina e é um transportador fundamental em seres humanos, porém não está presente em muitos mamíferos inferiores, incluindo ratos e ratinhos onde foram estudados muitos dos perfis toxicológicos destes compostos. Deste modo, é mais provável que compostos que se ligam a TTR venham a ter nestas espécies um efeito sobre a ligação global e o transporte de T4. Dados que demonstram a ligação dos PCB a TBG sugerem pouca interacção, com a excepção de um ou dois compostos que se ligam fracamente. Por conseguinte, o efeito dos OH-PCB nos níveis da tiróide humana deverá ser mínimo, a não ser que se liguem a albumina. Há, igualmente, relatos de que estes compostos possam estar a interferir na activação da hormona tiróide ou a aumentar a taxa de sulfatação e, por conseguinte, a inactivação de T4. Os OH-PCB podem igualmente ligar-se a outros alvos da hormona tiróide incluindo receptores da hormona tiróide, o que parece razoável dada a analogia estrutural com T4.

Fica claro que pouco está estabelecido no que se refere à toxicidade dos PCB hidroxilados, especialmente em seres humanos. Espera-se que a toxicologia em roedores seja mais grave, em consequência do papel da TTR como principal transportador da hormona tiróide. O que fica claro é que os PCB hidroxilados exibem excelente actividade como inibidores da formação de fibrila de transtirretina, sugerindo que esta classe de compostos tem potencial para ser útil para a inibição da formação de fibrila amilóide.

Materiais e Métodos

Purificação de Anticorpo para Transtirretina e Conjugação com Sepharose

Foram produzidos anticorpos, purificados e acoplados a Sepharose. A resina foi armazenada como uma pasta fluida 1:1 em TSA (Tris 10 mM, pH 8,0/NaCl 140 mM/NaN₃ a 0,025%). Adicionalmente, foi preparada Sepharose extinta através do acoplamento de Tris 200 mM, pH 8,0, à resina, em vez do anticorpo.

Preparação de Plasma Humano

Foi colhido sangue completo de voluntários saudáveis no Scripps General Clinical Research Center's Normal Blood-Drawing Program e transferido para tubos cónicos de 50 mL. Os tubos foram centrifugados a 3000 RPM (1730 x g) numa centrífuga de bancada Sorvall RT7 equipada com rotor de balde oscilante durante 10 min a 25°C. O sobrenadante plasmático foi removido e centrifugado de novo a 3000 RPM durante 10 min para remover as células restantes. Foi adicionada azida de sódio para produzir uma solução a 0,05%. O plasma foi armazenado a 4°C até utilização.

Imunoprecipitação de Transtirretina e PCB Ligados

Um tubo eppendorf de 2 mL foi cheio com 1,5 mL de plasma sanguíneo humano e com 7,5 µL de uma solução de DMSO a 2,16 mM do PCB em avaliação. Esta solução foi incubada a 37°C durante 24 h. Uma pasta fluida 1:1 de resina/TSA (187 µL) de Sepharose extinta foi adicionada à solução e suavemente agitada a 4°C durante 1 h. A solução foi centrifugada (16 000 x g) e o sobrenadante foi dividido em 3 alíquotas de 400 µL cada. Estas

foram adicionadas cada uma a 200 μ L de uma pasta fluida 1:1 de resina/TSA da Sepharose conjugada com anticorpo anti-transtirretina e agitadas lentamente a 4°C durante 20 min. As amostras foram centrifugadas (16 000 x g) e o sobrenadante foi removido. A resina foi lavada com 1 mL de TSA/Saponina (Acros) a 0,05% (3X 10 min) a 4°C e adicionalmente com 1 mL de TSA (2X 10 min) a 4°C. As amostras foram centrifugadas (16 000 x g), a lavagem final foi removida, e 155 μ L de trietilamina 100 mM, pH 11,5, foram adicionados para eluir a TTR e moléculas pequenas ligadas dos anticorpos. A seguir a agitação suave a 4°C durante 30 min, as amostras foram centrifugadas (16 000 x g) e foram removidos 145 μ L do sobrenadante, contendo TTR e inibidor.

Análise por HPLC e Quantificação de Transtirretina e PCB Ligados

As amostras de eluição do sobrenadante das esférulas de anticorpo de TTR (145 μ L) foram carregadas num auto-amostrador Waters 71P. Uma injeção de 135 μ L de cada amostra foi separada numa coluna de fase inversa C18 de 3 cm Keystone utilizando um gradiente 40-100% de B ao longo de 8 min (A: 94,8% de H₂O/5% de acetonitrilo/0,2% de TFA; B: 94,8% de acetonitrilo/5% de H₂O/0,2% de TFA), controlado por um sistema de distribuição de multi-solvente Waters 600E. A detecção foi levada a cabo a 280 nm com um detector de absorvância ajustável Waters 486 e os picos foram integrados para proporcionar a área, tanto da TTR como da molécula pequena. A fim de determinar a quantidade de cada espécie, quantidades conhecidas de TTR tetramérica ou de PCB foram injectadas na HPLC. Os picos foram integrados para criar curvas de calibração a partir de regressões lineares dos dados utilizando o Kaleidagraph (Synergy Software). As curvas de calibração foram utilizadas para determinar o número de moles de cada espécie presente nas amostras de plasma. A razão de molécula pequena para proteína foi calculada para obter a estequiometria de molécula pequena ligada a TTR no plasma.

Ensaio de Formação de Fibrila Amilóide de Transtirretina

Os compostos foram dissolvidos em DMSO numa concentração de 720 μ M. Cinco μ L de uma solução do composto a avaliar foram adicionados a 0,5 mL de uma solução de TTR 7,2 μ M em fosfato 10 mM, pH 7,6, KCl 100 mM, tampão de EDTA 1 mM, deixando o

composto incubar com TTR durante 30 min. Foram adicionados 495 μ L de acetato 0,2 mM, pH 4,2, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, para produzir concentrações finais de proteína e inibidor de 3,6 μ M cada e um pH de 4,4. A mistura foi depois incubada a 37°C durante 72 h, após o que os tubos foram submetidos a um vórtice durante 3 s e a densidade óptica foi medida a 400 nm. A extensão da formação de fibrila foi determinada através da normalização de cada densidade óptica pela da TTR sem inibidor, definida como sendo 100% de formação de fibrila. Foram igualmente testadas soluções de controlo de cada composto na ausência de TTR e nenhuma absorvia apreciavelmente a 400 nm.

Calorimetria de Titulação Isotérmica de PCB 18 e TTR

Uma solução 25 μ M do composto **18** (em fosfato 10 mM, pH 7,6, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, DMSO a 8%) foi titulada com uma solução 1,2 μ M de TTR num tampão idêntico utilizando um calorímetro de titulação isotérmica MCS da Microcal (Microcal, Northampton, MA). Uma injeção inicial de 2 μ L foi seguida de 25 injeções de 10 μ L a 25°C. O termograma foi integrado e foi subtraído um branco para obter uma isotérmica de ligação que mais bem se ajusta a um modelo de dois locais de ligação idênticos, utilizando o pacote de análise de dados ITC no ORIGIN 5.0 (Microcal).

Cristalização e recolha de dados de raios x

Os cristais de TTR recombinante foram obtidos de soluções proteínicas a 5 mg/ml (em KCl 100 mM, fosfato 100 mM, pH 7,4, sulfato de amónio 1 M) equilibradas contra sulfato de amónio 2 M em experiências de gotas pendentes. Os complexos TTR•ligando foram preparados a partir de cristais embebidos durante 2 semanas com um excesso molar de 10 vezes do ligando para garantir a saturação completa de ambos os locais de ligação. Foi utilizada solução acetona:água 1:1 como agente de embebedimento. Um sistema de placa de imagiologia DIP2030b (MAC Science, Yokohama, Japão) acoplado a um gerador de raios x de ânodo rotativo RU200 foi utilizado para recolha de dados. Os cristais foram colocados em óleo paratone como crioprotector e arrefecidos a 120 K para as experiências de difracção. Os cristais de todos os complexos TTR•ligando são isomórficos, com a forma cristalina apo contendo dimensões de célula unitária $a=43$ Å, $b=86$ Å e $c=65$ Å. Pertencem ao grupo espacial

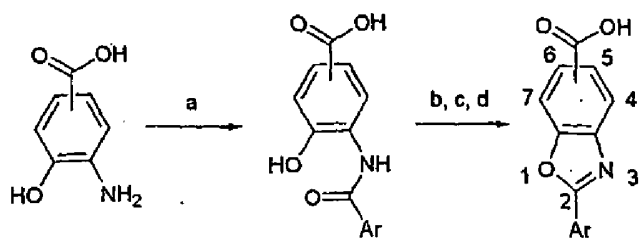
P2₁2₁2 e contêm metade do homotetrâmero na unidade assimétrica. Os dados foram reduzidos com DENZO e SCALEPACK.

Determinação e Refinamento da Estrutura

As coordenadas atômicas da proteína para TTR do Protein Data Bank (número de acesso 1BMZ) foram utilizadas como modelo de partida para o refinamento de TTR nativa e dos complexos TTR-ligando por dinâmica molecular e minimização energética utilizando o programa CNS. Os mapas foram calculados a partir de dados de difracção recolhidos com cristais de TTR embebidos com PCB ou co-cristalizados simultaneamente. Para os complexos de TTR com os PCB, os mapas resultantes revelaram posições aproximadas do ligando em ambas as bolsas de ligação do tetrâmero de TTR, com alturas de picos acima de 5-9 r.m.s. De modo a melhorar adicionalmente a densidade electrónica das moléculas pequenas e remover o enviesamento do modelo, o modelo foi submetido a vários ciclos do protocolo *warp/shake*, o que deu origem a um melhoramento notável no mapa, especialmente em torno do inibidor. O ajustamento subsequente do modelo foi realizado utilizando estes mapas e a molécula de ligando foi colocada dentro da densidade. Em todos os três casos, a conformação de energia mínima do inibidor calculada pelo programa InsightII (Accelrys) estava em concordância com o mapa. Em virtude do eixo duplo de simetria cristalográfico ao longo do canal de ligação, tem que ser aplicado um modelo de desordem estatística, dando origem a dois modos de ligação do ligando em cada um dos dois locais de ligação da TTR tetramérica. As moléculas de água foram adicionadas com base no mapa de densidade electrónica não enviesado. Em virtude da ausência de densidades electrónicas interpretáveis no mapa final, os nove resíduos N-terminais e os três C-terminais não foram incluídos no modelo final.

Exemplo 5: Benzoxazoles como Inibidores de Fibrila Amilóide de Transtirretina

Os dois locais de ligação de tiroxina da transtirretina são criados pela sua interface estrutural quaternária. O tetrâmero pode ser estabilizado por ligação de moléculas pequenas a estes locais, proporcionando, potencialmente, um meio para tratar a doença amilóide de TTR com fármacos de molécula pequena. Foram determinadas muitas famílias de compostos cuja ligação estabiliza o estado fundamental tetramérico num grau proporcional às constantes de dissociação da molécula pequena K_{d1} e K_{d2} . Isto também aumenta eficazmente a barreira de activação dissociativa e inibe a amiloidose por estabilização cinética. Tais inibidores são, tipicamente, compostos por dois anéis aromáticos, com um anel portador de substituintes de halogéneo e o outro portador de substituintes hidrófilos. Os benzoxazoles substituídos com um ácido carboxílico em C(4)-C(7) e um anel fenílico halogenado em C(2) parecem igualmente complementar o local de ligação da tiroxina de TTR. Uma pequena biblioteca destes compostos foi, por conseguinte, preparada por desidrociclicização de ácidos *N*-acilamino-hidroxibenzóicos, como ilustrado no Esquema 1.



Esquema 1: Síntese Geral de Benzoxazoles

Reagentes: (a) ArCOCl , THF, piridina (Ar = Fenilo, 3,5-Difluorofenilo, 2,6-Difluorofenilo, 3,5-Diclorofenilo, 2,6-Diclorofenilo, 2-(Trifluorometil)fenilo e 3-(Trifluorometil)fenilo); (b) $\text{TsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$, xilenos de refluxo; (c) TMSCHN_2 , benzeno, MeOH; (d) LiOH, THF, MeOH, H_2O (8-27% de rendimento ao longo de 4 etapas).

Os benzoxazoles foram avaliados utilizando uma série de análises de estringência crescente. A TTR WT (3,6 μM) foi

incubada durante 30 min (pH 7, 37°C) com um composto (7,2 µM) de teste. Visto que, pelo menos, uma molécula do composto de teste se tem que ligar a cada molécula de tetrâmero de TTR para poder estabilizar, uma concentração de composto de teste de 7,2 µM é apenas o dobro da concentração mínima eficaz. O pH foi depois ajustado para 4,4, o pH óptimo para fibrilação. A quantidade de amiloide formada após 72 h (37°C) na presença do composto de teste foi determinada por turbidimetria a 400 nm e é expressa como % de formação (*ff*) de fibrila, sendo 100% a quantidade formada por apenas TTR. Dos 28 compostos testados, 11 reduziram a formação de fibrila para níveis desprezáveis (*ff* <10%; FIG. 7).

Os 11 compostos mais activos foram, em seguida, avaliados quanto à sua capacidade para se ligarem selectivamente a TTR com primazia sobre todas as outras proteínas no sangue. O plasma sanguíneo humano (conc. de TTR de 3,6-5,4 µM) foi incubado durante 24 h com o composto de teste (10,8 µM) a 37°C. A TTR e qualquer inibidor ligado foram imunoprecipitados utilizando um anticorpo policlonal para TTR ligado a Sepharose. A TTR, com ou sem inibidor ligado, foi libertada da resina a pH elevado e a estequiometria inibidor:TTR foi determinada por análise de HPLC (FIG. 8). Os benzoxazoles com ácidos carboxílicos na posição 5 ou 6, e os substituintes 2,6-diclorofenilo (**13**, **20**) ou 2-trifluorometilfenilo (**11**, **18**) na posição 2 exibiram as estequiometrias de ligação mais elevadas. Em particular, **20** exibiu excelentes actividade inibitória e selectividade de ligação. Deste modo, o seu mecanismo de acção foi caracterizado adicionalmente.

Para confirmar que **20** inibe a formação de fibrila de TTR através de forte ligação ao tetrâmero, foram conduzidas experiências de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e velocidade de sedimentação com TTR wt. A ITC demonstrou que dois equivalentes de **20** se ligam, sob condições fisiológicas, com constantes de dissociação médias de $K_{d1} = K_{d2} = 55 (\pm 10)$ nM. Estas são comparáveis às constantes de dissociação de muitos outros inibidores eficazes de amiloidogénese de TTR. Para as experiências de velocidade de sedimentação, a TTR (3,6 µM) foi incubada com **20** (3,6 µM, 7,2 µM, 36 µM) sob condições óptimas para a fibrilação (72 h, pH 4,4, 37°C). O tetrâmero (55 kDa) foi a única espécie detectável em solução com **20** a 7,2 ou 36 µM. Formaram-se alguns agregados de grandes dimensões com

20 a 3,6 μM , porém a TTR que permaneceu em solução era tetramérica.

A inclusão da subunidade T119M e a ligação de moléculas pequenas preveniram ambas a formação de amilóide de TTR através do aumento da barreira de activação para a dissociação do tetrâmero. Uma capacidade do inibidor para o efeito é testada mais rigorosamente através da medição da sua eficácia a retardar a dissociação do tetrâmero em ureia 6 M, um severo *stress* de desnaturação. Deste modo, foram comparadas as taxas de dissociação do tetrâmero de TTR em ureia a 6 M na presença e na ausência de **20**, **21** ou **27** (FIG. 9). A TTR (1,8 μM) foi completamente desnaturada após 168 h em ureia 6 M. Em contrapartida, **20** a 3,6 μM preveniu a dissociação do tetrâmero durante, pelo menos, 168 h ($>3\times$ a semivida de TTR em plasma humano). Com uma quantidade equimolar de **20**, apenas 27% da TTR desnaturou em 168 h. O composto **27** (3,6 μM) foi muito menos capaz de prevenir a dissociação do tetrâmero (90% de desenrolamento após 168 h), apesar de ter sido activo no ensaio de formação de fibrila. O composto **21** não impediu a dissociação de TTR em absoluto. Estes resultados demonstram que a ligação do inibidor a TTR é necessária mas não suficiente para estabilizar cineticamente o tetrâmero de TTR sob condições fortemente desnaturantes; é igualmente importante que as constantes de dissociação sejam muito baixas (ou que as taxas de dissociação sejam muito lentas). Igualmente, a exibição de grupos funcionais em **20** é aparentemente óptima para a estabilização do tetrâmero de TTR; mover o ácido carboxílico de C(6) para C(7), como em **27**, ou remover os cloros, como em **21**, diminui severamente a sua actividade.

O papel dos substituintes em **20** é evidente da sua estrutura de co-cristal com TTR (FIG. 10). O composto **20** orienta os seus dois átomos de cloro próximo das bolsas de ligação de halogéneo 2 e 2' (assim denominadas porque estão ocupadas por iodos quando a tiroxina se liga a TTR). O padrão de substituição 2,6 no anel fenílico força os anéis de benzoxazole e fenilo para fora da planaridade, posicionando optimamente o ácido carboxílico no benzoxazole para se ligar por ligação de hidrogénio aos grupos $\epsilon\text{-NH}_3^+$ de Lys 15/15'. As interacções hidrófobas entre os anéis aromáticos de **20** e as

cadeias laterais de Leu 17, Leu 110, Ser 117 e Val 121 contribuem com energia de ligação adicional.

Métodos

O procedimento geral para a síntese de benzoxazole e caracterização dos produtos (RMN de ^1H e ^{13}C e espectros de massa de alta resolução) são detalhados a seguir.

Ultracentrifugação Analítica

A estrutura quaternária de TTR na presença de **20** foi observada utilizando ultracentrifugação analítica de velocidade de sedimentação. As amostras foram incubadas com **20** a 3,6, 7,2 ou 36 μM durante 72 h. Os dados foram recolhidos numa ultracentrífuga analítica com controlo de temperatura Beckman XL-1 (equipada com um rotor An60Ti e varrimento fotoeléctrico). Uma célula de sector duplo, equipada com uma peça central Epon de 12 mm e janela de safira, foi carregada com 400-420 μL de amostra utilizando uma seringa. Os dados foram recolhidos a velocidades do rotor de 3000 e 50 000 rpm em modo contínuo a 25°C, com uma dimensão de passo de 0,005 cm empregando uma média de 1 varrimento por ponto. A detecção foi efectuada a 280 nm. Os dados foram submetidos a análise de derivada em ordem ao tempo utilizando o programa DCDT+ desenvolvido pela Philo (Philo, 2000; Stafford, 1992). A análise demonstrou que a distribuição de espécies em solução era representada por uma gama de valores de *s*. Esta distribuição foi, depois, ajustada a diversos modelos, a fim de determinar os coeficientes de sedimentação e de difusão para as espécies no sistema. O peso molecular de cada espécie foi determinado por métodos referidos anteriormente (Petrassi, et al., 2000). Os valores de *s* verificados para a TTR demonstraram que esta permaneceu tetramérica na presença de 7,2 e 36 μM de **20**, ao passo que a 3,6 μM a TTR que permanece em solução era tetramérica apesar da formação de algum agregado.

Cristalização e Recolha de Dados de raios x

Os cristais de TTR WT foram obtidos a partir de soluções proteínicas a 12 mg/mL (em KCl 100 mM, EDTA 1 mM, Fosfato de Sódio 10 mM, e pH 7,0, sulfato de amónio 0,35 M) equilibradas contra sulfato de amónio 2 M em experiências de gotas

pendentes. O complexo TTR-20 foi preparado a partir de cristais embebidos durante 3 semanas com um excesso molar de 10 vezes do ligando para garantir a saturação completa de ambos os locais de ligação. O cristal embebido em ligando difractou até 1,55 Å num detector Quantum-4 na fonte monocromática de alta energia de 14-BM-C, BIOCARs, Advanced Photon Source (Argonne National Laboratory). Os cristais foram embebidos em óleo paratone e arrefecidos instantaneamente para 100 K para as experiências de difracção. Os cristais do complexo TTR-20 são isomórficos com a forma cristalina apo com dimensões de célula unitária de $a = 43,1$ Å, $b = 84,7$ Å, e $c = 64,7$ Å, grupo espacial $P2_12_12$ com duas subunidades de TTR na unidade assimétrica. Os dados foram reduzidos com DENZO e SCALEPACK do pacote HKL2000. (Otwinowski, 1997)

Determinação e Refinamento da Estrutura

As coordenadas atómicas da proteína para a TTR do Protein Data Bank (número de acesso 1BMZ) foram utilizadas como modelo de partida para as buscas de substituição molecular. O refinamento da estrutura do complexo TTR-20 foi efectuado utilizando a dinâmica molecular e os protocolos de minimização energética de CNS. Os mapas de diferenças de Fourier resultantes revelaram ligação do ligando em ambas as bolsas de ligação do tetrâmero de TTR. Utilizando estes mapas, o ligando poderia ser inequivocamente colocado dentro da densidade e foi incluído no refinamento cristalográfico. A conformação de energia mínima do inibidor calculada pelo programa Insight II (Accelrys Inc.) foi utilizada como modelo inicial para o refinamento cristalográfico. Em virtude do eixo duplo de simetria cristalográfico estar ao longo do canal de ligação, teve de ser aplicado um modelo de desordem estatística, dando origem a dois modos de ligação do ligando por bolsa de ligação de TTR. Após vários ciclos de emparelhamento simulado e subsequente refinamento de factor posicional e de temperatura, as moléculas de água foram colocadas nos mapas de diferenças de Fourier. O ciclo final de ajustamento do mapa foi realizado utilizando o mapa de densidade electrónica ponderado não enviesado calculado pelo protocolo de remoção de enviesamento *shake/warp*. As conformações de ligação relacionadas com a simetria, do ligando, estavam em concordância com os mapas omit de emparelhamento não enviesado, assim como os mapas ponderados não enviesados *shake/warp* na ausência do inibidor

colocados em fase. Em virtude da ausência de densidades electrónicas interpretáveis no mapa final, os nove resíduos N-terminais e os três C-terminais não foram incluídos no modelo final. Um sumário da análise cristalográfica é apresentado na Tabela 6.

Tabela 6: Estatísticas para a Estrutura de Cristal de Raios X

Plenitude (%) (global/invólucro externo)	86/90
R _{sim} (Global/invólucro externo)	0,05/0,33
Estatísticas do refinamento	
Resolução (Å)	33,02-1,55
Factor R/R livre (%)	21,1 / 24,3
Comprimento de ligação Rmsd (Å)---	0,03
Ângulos de ligação Rmsd (°)	2,5
Outras estatísticas	
Dimensões do cristal (mm)	0,3×0,2×0,15
Sistema cristalino	Ortorrômbico
Dimensões da célula unitária (a,b,c em Å)	43,1, 84,7, 64,7
Volume da célula unitária (Å ³)	236123
Resolução máxima (Å)	1,54
Modo de varrimento	Phi
Temperatura de medição	100 K
Número de reflexões independentes	30705
Método de solução da estrutura	Substituição molecular por EPMR (Kissinger, 1999)
Refinamento contra	F _{obs}
Alvo de refinamento	Máxima probabilidade
Program utilizado para refinamento	CNS-Solve (Brunger 1998)
Base de dados	Protein Data Bank

Síntese de Benzoxazole - Métodos Gerais

Salvo indicação em contrário, todas as reacções foram efectuadas em equipamento de vidro seco em estufa sob uma atmosfera de árgon seco utilizando um FirstMate Organic Synthesizer (Argonaut Technologies). Todos os solventes (anidros) e reagentes foram adquiridos a Aldrich e utilizados sem purificação adicional. Os espectros de RMN de ¹H foram medidos a 500 MHz num espectrómetro Bruker DRX-500 ou a 600 MHz num espectrómetro Bruker DRX-600 e foram referenciados ao padrão interno CHD₂-S(O)-CD₃ (2,49 ppm). Os espectros de ¹³C foram realizados a 125 MHz num instrumento Bruker DRX-500 ou a 150 MHz num Bruker DRX-600 e foram referenciados a (CD₃)₂SO (39,5 ppm). As análises de cromatografia em camada fina foram realizadas em placas analíticas de camada fina com suporte de

vidro Glass-backed (Kieselgel 60 F₂₅₄, 0,25 mm, EM Science n.º 5715-7). A visualização foi levada a cabo utilizando absorvância de UV ou ácido fosfomolibdico a 10% em etanol. A cromatografia foi realizada num Chromatoton (Harrison Research, Modelo 7924T, placa de 2 mm) ou numa placa preparativa de sílica gel (Kieselgel 60 F₂₅₄, 1 mm, EM Science n.º 13895-7).

Procedimento Geral para a Síntese de Benzoxazole

Uma mistura de ácido amino-hidroxibenzóico (0,2 mmol) em THF (3 mL) foi sequencialmente tratada com piridina (500 µL, 0,6 mmol) e com o cloreto de ácido desejado (0,2 mmol). A mistura reaccional foi agitada à temperatura ambiente durante 10 h, submetida a refluxo durante 1 h, concentrada *in vacuo* e utilizada na etapa seguinte sem purificação.

Ácido *p*-toluenossulfónico mono-hidratado (380,4 mg, 2,0 mmol) foi adicionado à mistura reaccional em bruto em xilenos (5 mL) e a mistura resultante foi agitada em refluxo, de um dia para o outro. Após 12 h, a mistura reaccional foi arrefecida para a temperatura ambiente, extinta com NaOH (2 mL, 1 N) e as fases foram separadas. A camada aquosa foi acidificada com HCl (1 N) para pH 2 e extractada com EtOAc (4 x 3 mL). As camadas orgânicas combinadas foram secas sobre MgSO₄, filtradas e concentradas *in vacuo*. O resíduo resultante foi dissolvido numa mistura de MeOH:Benzeno (2 mL; 1:4), tratado com TMS-CHN₂ (200 µL de solução em hexanos a 2,0 M, 0,4 mmol) a 25°C e a progressão da reacção foi monitorizada por TLC (usualmente completa após 0,5 h). A mistura reaccional foi concentrada *in vacuo* e o resíduo foi submetido a cromatografia (gradiente de 10 a 25% de EtOAc/hexanos) para produzir o éster metílico de benzoxazole desejado.

O éster metílico de benzoxazole foi dissolvido numa mistura de THF:MeOH:H₂O (3:1:1, 0,07 M) e tratado com LiOH·H₂O (4 equiv). A mistura reaccional foi agitada à temperatura ambiente e monitorizada por TLC. Após conclusão da reacção, a mistura foi acidificada para pH 2 com HCl 1 N e extractada com EtOAc (4 x). As camadas orgânicas combinadas foram secas sobre MgSO₄, filtradas e concentradas. O resíduo foi purificado por cromatografia preparativa de camada fina (4,9% de MeOH, 95% de CH₂Cl₂, 0,1% de HOAc) para produzir o produto sob a forma de um sólido branco.

4-Carboxi-2-(3,5-difluorofenil)benzoxazole (1). Preparado a partir de ácido 3-hidroxiantranílico de acordo com o procedimento geral, para produzir **1** sob a forma de um sólido branco (7,0 mg, 13%). Dados para **1**: ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,70-12,50 (s lg, 1H, CO_2H), 8,04 (AMX , 1H, $J=8,1\text{ Hz}$, Ar), 7,94 (AMX , 1H, $J=7,3\text{ Hz}$, Ar), 7,84 (d lg, 2H, $J=5,6\text{ Hz}$, Ar), 7,62-7,58 (m, 1H, Ar), 7,56 (AMX , 1H, $J=7,3, 8,1\text{ Hz}$, Ar); ^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6) δ 165,8, 162,7 (d, $J=248\text{ Hz}$), 162,6 (d, $J=248\text{ Hz}$), 161,1, 151,0, 140,3, 129,3, 127,0, 125,8, 123,6, 115,2, 110,8 (d, $J=28\text{ Hz}$), 107,8 (t, $J=26\text{ Hz}$); HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{F}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 276,0467, determinado 276.0463.

4-Carboxi-2-(2,6-difluorofenil)benzoxazole (2). Preparado a partir de ácido 3-hidroxiantranílico de acordo com o procedimento geral, para produzir **2** sob a forma de um sólido branco (8,2 mg, 15%). Dados para **2**: ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,00 (s lg, 1H, CO_2H), 8,06 (AMX , 1H, $J=8,1\text{ Hz}$, Ar), 7,94 (AMX , 1H, $J=7,6\text{ Hz}$, Ar), 7,80-7,74 (m, 1H, Ar), 7,57 (AMX , 1H, $J=7,6, 8,1\text{ Hz}$, Ar), 7,40-7,38 (m, 2H, Ar); ^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6) δ 166,1, 160,4 (d, $J=256\text{ Hz}$), 160,3 (d, $J=256\text{ Hz}$), 154,9, 150,6, 139,6, 134,7 (t, $J=10\text{ Hz}$), 126,8, 125,8, 114,8, 112,8 (d, $J=22\text{ Hz}$), 105,2 (t, $J=16\text{ Hz}$); HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{F}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 276,0467, determinado 276,0461.

4-Carboxi-2-[(3-trifluorometil)fenil]benzoxazole (3). Preparado a partir de ácido 3-hidroxiantranílico de acordo com o procedimento geral, para produzir **3** sob a forma de um sólido branco (9,5 mg, 15%). Dados para **3**: ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,70-12,80 (s lg, 1H, CO_2H), 8,50 (ABX , 1H, $J=7,8\text{ Hz}$, Ar), 8,43 (s, 1H, Ar), 8,06 (AMX , 1H, $J=8,1\text{ Hz}$, Ar), 8,03 (ABX , 1H, $J=8,1\text{ Hz}$, Ar), 7,94 (AMX , 1H, $J=7,8\text{ Hz}$, Ar), 7,88 (ABX , 1H, $J=7,8\text{ Hz}$, Ar), 7,54 (AMX , 1H, $J=8,1\text{ Hz}$, Ar); ^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6) δ 165,8, 161,9, 151,0, 140,6, 131,4, 130,8, 130,0 (q, $J=33\text{ Hz}$), 128,7 (d, $J=4\text{ Hz}$), 127,2, 127,0, 125,5, 123,8, 123,7 (q, $J=273\text{ Hz}$), 123,2, 115,2; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_3$ (MH^+) 308,0529, determinado 308,0535.

4-Carboxi-2-[(2-trifluorometil)fenil]benzoxazole (4). Preparado a partir de ácido 3-hidroxiantranílico de acordo com o procedimento geral, para produzir **4** sob a forma de um sólido branco (15,2 mg, 25%). Dados para **4**: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6)

δ 13,15 (s lg, 1H, CO₂H), 8,18 (d, 1H, J = 7,6 Hz, Ar), 8,06 (AMX 1H, J = 0,9, 8,2 Hz, Ar), 8,02 (d, 1H, J = 7,9 Hz, Ar), 7,96 (AMX, 1H, J = 0,9, 7,9 Hz, Ar), 7,94-7,87 (m, 2H, Ar), 7,58 (AMX, 1H, J = 8,2 Hz, Ar); ¹³C RMN (150 MHz, DMSO-d₆) δ 165,8, 161,6, 151,2, 140,0, 133,0, 132,6, 132,3, 127,6 (q, J = 32 Hz), 127,2 (q, J = 6 Hz), 127,0, 125,6, 124,9, 123,5, 123,4 (q, J = 273 Hz), 115,2; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para C₁₅H₈F₃NO₃ (MH⁺) 308,0529, determinado 308,0531.

4-Carboxi-2-(3,5-diclorofenil)benzoxazole (5). Preparado a partir de ácido 3-hidroxiantranílico de acordo com o procedimento geral, para produzir **5** sob a forma de um sólido branco (8,0 mg, 13%). Dados para **5**: ¹H RMN (600 MHz, DMSO-d₆) δ 13,60-12,60 (s lg, 1H, CO₂H), 8,16 (A₂M, 2H, J = 2,0 Hz, Ar), 8,05 (AMX, 1H, J = 0,9, 8,2 Hz, Ar), 7,96 (A₂M, 1H, J = 2,0 Hz, Ar), 7,94 (AMX, 1H, J = 0,9, 7,6 Hz, Ar), 7,56 (AMX, 1H, J = 7,9 Hz, Ar); ¹³C RMN (150 MHz, DMSO-d₆) δ 165,8, 160,8, 151,0, 140,4, 135,2, 131,5, 129,4, 127,0, 126,3, 125,9, 125,8, 123,6, 115,2; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para C₁₄H₇Cl₂NO₃ (MH⁺) 307,9876, determinado 307,9876.

4-Carboxi-2-(2,6-diclorofenil)benzoxazole (6). Preparado a partir de ácido 3-hidroxiantranílico de acordo com o procedimento geral, para produzir **6** sob a forma de um sólido branco (5,2 mg, 8%). Dados para **6**: ¹H RMN (600 MHz, DMSO-d₆) δ 13,80-12,50 (s lg, 1H, CO₂H), 8,07 (AMX 1H, J = 8,2 Hz, Ar), 7,95 (AMX, 1H, J = 7,9 Hz, Ar), 7,77-7,71 (m, 3H, Ar), 7,59 (AMX, 1H, J = 7,9, 8,2 Hz, Ar); ¹³C RMN (150 MHz, DMSO-d₆) δ 165,8, 158,2, 150,8, 139,3, 134,8, 134,0, 128,7, 126,8, 126,7, 125,9, 122,4; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para C₁₄H₇Cl₂NO₃ (MH⁺) 307,9876, determinado 307,9880.

4-Carboxi-2-fenilbenzoxazole (7). Preparado a partir de ácido 3-hidroxiantranílico de acordo com o procedimento geral, para produzir **7** sob a forma de um sólido branco (10,2 mg, 21%). Dados para **7**: ¹H RMN (600 MHz, DMSO-d₆) δ 13,50-12,60 (s lg, 1H, CO₂H), 8,24-8,22 (m, 2H, Ar), 8,03 (AMX, 1H, J = 0,9, 8,2 Hz, Ar), 7,91 (AMX, 1H, J = 0,9, 7,9 Hz, Ar), 7,68-7,61 (m, 3H, Ar), 7,51 (AMX, 1H, J = 7,9, 8,2 Hz, Ar); ¹³C RMN (150 MHz, DMSO-d₆) δ 166,0, 163,4, 151,0, 140,8, 132,4, 129,4, 127,6, 126,7, 126,1, 125,0, 123,0, 115,0; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para C₁₄H₉NO₃ (MH⁺) 240,0655, determinado 240,0656.

5-Carboxi-2-(3,5-difluorofenil)benzoxazole (8). Preparado a partir de ácido 3-amino-4-hidroxibenzóico de acordo com o procedimento geral, para produzir **8** sob a forma de um sólido branco (10,2 mg, 19%). Dados para **8**: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,60-12,80 (s lg, 1H, CO_2H), 8,32 (ABM , 1H, $J = 1,5$ Hz, Ar), 8,07 (ABM , 1H, $J = 1,5, 8,5$ Hz, Ar), 7,90 (ABM , 1H, $J = 8,5$ Hz, Ar), 7,86-7,85 (m, 2H, Ar), 7,60 (tt, 1H, $J = 2,4, 9,2$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,8, 162,8 (d, $J = 248$ Hz), 162,7 (d, $J = 248$ Hz), 161,5, 153,0, 141,2, 129,1 (t, $J = 11$ Hz), 128,2, 127,7, 121,4, 111,2, 110,8 (d, $J = 23$ Hz), 110,7 (d, $J = 22$ Hz), 107,8 (t, $J = 26$ Hz); HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{F}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 276,0467, determinado 276,0469.

5-Carboxi-2-(2,6-difluorofenil)benzoxazole (9). Preparado a partir de ácido 3-amino-4-hidroxibenzóico de acordo com o procedimento geral, para produzir **9** sob a forma de um sólido branco (6,8 mg, 12%). Dados para **9**: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,50-12,80 (s lg, 1H, CO_2H); 8,39 (ABM , 1H, $J = 0,7, 1,6$ Hz, Ar), 8,10 (ABM , 1H, $J = 1,6, 8,7$ Hz, Ar), 7,95 (ABM , 1H, $J = 0,7, 8,7$ Hz, Ar), 7,77 (m, 1H, Ar), 7,40 (t, 2H, $J = 8,8$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,8, 160,4 (d, $J = 257$ Hz), 160,3 (d, $J = 257$ Hz), 155,4, 152,6, 140,8, 134,8 (t, $J = 11$ Hz), 128,2, 127,7, 121,6, 113,0 (d, $J = 22$ Hz), 112,9 (d, $J = 22$ Hz), 111,2, 104,9; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{F}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 276,0467, determinado 276,0467.

5-Carboxi-2-[(3-trifluorometil)fenil]benzoxazole (10). Preparado a partir de ácido 3-amino-4-hidroxibenzóico de acordo com o procedimento geral, para produzir **10** sob a forma de um sólido branco (6,7 mg, 11%). Dados para **10**: ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,30-12,80 (s lg, 1H, CO_2H), 8,51 (ABX , 1H, $J = 7,8$ Hz; Ar), 8,45 (s, 1H, Ar), 8,35 (ABM , 1H, $J = 1,7$ Hz, Ar), 8,08 (ABM , 1H, $J = 1,7, 8,6$ Hz, Ar), 8,04 (ABX , 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar), 7,93 (ABM , 1H, $J = 8,6$ Hz, Ar), 7,89 (ABX , 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6) δ 166,8, 162,2, 153,1, 141,4, 131,4, 130,9, 130,1 (q, $J = 33$ Hz), 128,8, 128,2, 127,5, 127,1, 123,8 (q, $J = 4$ Hz), 123,7 (q, $J = 273$ Hz), 121,3, 111,2; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_3$ (MH^+) 308,0529, determinado 308,0530.

5-Carboxi-2-[(2-trifluorometil)fenil]benzoxazole (11). Preparado a partir de ácido 3-amino-4-hidroxibenzóico de acordo com o procedimento geral, para produzir **11** sob a forma

de um sólido branco (10,3 mg, 17%). Dados para **11**: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,19 (s lg, 1H, CO_2H), 8,38 (m, 1H, Ar), 8,19 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, Ar), 8,09 (dd, 1H, $J=1,8, 8,5$ Hz, Ar), 8,03 (d, 1H, $J=7,9$ Hz, Ar), 7,94-7,88 (m, 3H, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,8, 161,6, 153,2, 141,1, 133,1, 132,5, 132,4, 128,2, 127,6, 127,5 (q, $J=32$ Hz), 127,2 (q, $J=6$ Hz), 124,7, 123,4 (q, $J=274$ Hz), 121,6, 111,2; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{F}_3\text{NO}_3$ (MH^+) 308,0529, determinado 308,0531.

5-Carboxi-2-(3,5-diclorofenil)benzoxazole (12). Preparado a partir de ácido 3-amino-4-hidroxibenzóico de acordo com o procedimento geral, para produzir **12** sob a forma de um sólido branco (7,3 mg, 12%). Dados para **12**: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,14 (s lg, 1H, CO_2H), 8,33 (AMX , 1H, $J=0,6, 1,8$ Hz, Ar), 8,16 (AM , 2H, $J=1,8$ Hz, Ar), 8,08 (AMX , 1H, $J=1,8, 8,5$ Hz, Ar), 7,95 (AM , 1H; $J=1,8$ Hz, Ar), 7,91 (AMX , 1H, $J=0,6, 8,5$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,7, 161,1, 153,0, 141,3, 135,2, 131,6, 129,2, 128,2, 127,7, 125,9, 121,4, 111,3; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 307,9876, determinado 307,9879.

5-Carboxi-2-(2,6-diclorofenil)benzoxazole (13). Preparado a partir de ácido 3-amino-4-hidroxibenzóico de acordo com o procedimento geral, para produzir **13** sob a forma de um sólido branco (10,8 mg, 18%). Dados para **13**: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,08 (s lg, 1H, CO_2H), 8,43 (AMX , 1H, $J=0,6, 1,8$ Hz, Ar), 8,13 (AMX , 1H, $J=1,8, 8,5$ Hz, Ar), 7,98 (AMX , 1H, $J=0,6, 8,5$ Hz, Ar), 7,77-7,72 (m, 3H, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,7, 158,6, 152,8, 140,4, 134,8, 134,2, 128,8, 128,4, 127,8, 126,2, 121,8, 111,5; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_3$ (MH^+) 307,9876, determinado 307,9879.

5-Carboxi-2-fenilbenzoxazole (14). Preparado a partir de ácido 3-amino-4-hidroxibenzóico de acordo com o procedimento geral, para produzir **14** sob a forma de um sólido branco (11,5 mg, 24%). Dados para **14**: ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,12 (s lg, 1H, CO_2H), 8,30 (ABX , 1H, $J=1,8$ Hz, Ar), 8,20 (dt, 2H, $J=1,5, 6,7$ Hz, Ar), 8,03 (ABX , 1H, $J=1,8, 8,5$ Hz, Ar), 7,87 (ABX , 1H, $J=8,5$ Hz, Ar), 7,67-7,60 (m, 3H, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,9, 163,6, 153,0, 141,6, 132,4, 129,4, 127,9, 127,5, 127,0, 126,0, 121,0, 111,0; HRMS

(MALDI-FTMS) calc. para $C_{14}H_9NO_3$ (MH^+) 240,0655, determinado 240,0656.

6-Carboxi-2-(3,5-difluorofenil)benzoxazole (15).

Preparado a partir de ácido 4-amino-3-hidroxibenzóico de acordo com o procedimento geral, para produzir **15** sob a forma de um sólido branco (10,3 mg, 19%). Dados para **15**: 1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,22 (s lg, 1H, CO_2H), 8,20 (ABM 1H, $J=1,5$ Hz, Ar), 7,98 (ABM, 1H, $J=1,5, 8,2$ Hz, Ar), 7,86 (ABM, 1H, $J=8,2$ Hz, Ar), 7,79-7,78 (m, 2H, Ar), 7,57 (tt, 1H, $J=2,4, 9,4$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,7, 162,7 (d, $J=248$ Hz), 162,6 (d, $J=248$ Hz), 162,4, 150,0, 144,7, 129,0 (t, $J=11$ Hz), 128,7, 126,5, 120,0, 112,1, 110,9 (d, $J=23$ Hz), 110,8 (d, $J=22$ Hz), 108,0 (t, $J=26$ Hz); HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $C_{14}H_7F_2NO_3$ (MH^+) 276,0467, determinado 276,0468.

6-Carboxi-2-(2,6-difluorofenil)benzoxazole (16).

Preparado a partir de ácido 4-amino-3-hidroxibenzóico de acordo com o procedimento geral, para produzir **16** sob a forma de um sólido branco (8,5 mg, 15%). Dados para **16**: 1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,25 (s lg, 1H, CO_2H), 8,30 (ABM, 1H, $J=0,6, 1,5$ Hz, Ar), 8,04 (ABM, 1H, $J=1,5, 8,2$ Hz, Ar), 7,96 (ABM, 1H, $J=0,6, 8,2$ Hz, Ar), 7,76 (m, 1H, Ar), 7,39 (t, 2H, $J=8,8$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,7, 160,4 (d, $J=257$ Hz), 160,3 (d, $J=257$ Hz), 156,6, 149,7, 144,2, 134,9 (t, $J=11$ Hz), 128,8, 126,4, 120,1, 113,1, 112,9, 112,2 (d, $J=5$ Hz), 105,0 (t, $J=16$ Hz); HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $C_{14}H_7F_2NO_3$ (MH^+) 276,0467, determinado 276,0466.

6-Carboxi-2-[(3-trifluorometil)fenil]benzoxazole (17).

Preparado a partir de ácido 4-amino-3-hidroxibenzóico de acordo com o procedimento geral, para produzir **17** sob a forma de um sólido branco (7,4 mg, 12%). Dados para **17**: 1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,20 (s lg, 1H, CO_2H), 8,48 (ABX, 1H, $J=7,9$ Hz, Ar), 8,41 (s, 1H, Ar), 8,28 (ABM, 1H, $J=1,5$ Hz, Ar), 8,03 (ABX, 1H, $J=7,9$ Hz, Ar), 8,02 (ABM, 1H, $J=1,5, 8,2$ Hz, Ar), 7,90 (ABM, 1H, $J=8,2$ Hz, Ar), 7,86 (ABX, 1H, $J=7,9$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 168,0, 164,6, 151,4, 146,2, 132,8, 132,2, 131,4 (q, $J=32$ Hz), 130,2, 129,8, 128,4, 127,8, 125,2, 125,0 (q, $J=272$ Hz), 121,2, 113,6; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $C_{15}H_8F_3NO_3$ (MH^+) 308,0529, determinado

308,0530. HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $C_{15}H_8F_3NO_3$ (MH^+) 308,0529, determinado 308,0531.

6-Carboxi-2-[(2-trifluorometil)fenil]benzoxazole (18).

Preparado a partir de ácido 4-amino-3-hidroxibenzóico de acordo com o procedimento geral, para produzir **18** sob a forma de um sólido branco (6,6 mg, 11%). Dados para **18**: 1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,22 (s lg, 1H, CO_2H), 8,30 (ABX, 1H, $J=0,6,1,5$ Hz, Ar), 8,20 (d, 1H, $J=7,3$ Hz, Ar), 8,06 (ABX, 1H, $J=1,5,8,2$ Hz, Ar), 8,04 (d, 1H, $J=7,9$ Hz, Ar), 7,98 (ABX, 1H, $J=0,6,8,2$ Hz, Ar), 7,94 (t, 1H, $J=7,3$ Hz, Ar), 7,90 (t, 1H, $J=7,9$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 168,0, 164,0, 151,6, 145,9, 133,8, 130,0, 129,0 (q, $J=32$ Hz), 128,6 (q, $J=6$), 127,7; 126,0, 124,7 (q, $J=273$ Hz), 121,6, 113,6; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $C_{15}H_8F_3NO_3$ (MH^+) 308,0529, determinado 308,0530.

6-Carboxi-2-(3,5-diclorofenil)benzoxazole (19).

Preparado a partir de ácido 4-amino-3-hidroxibenzóico de acordo com o procedimento geral, para produzir **19** sob a forma de um sólido branco (6,0 mg, 10%). Dados para **19**: 1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,20 (s lg, 1H, CO_2H), 8,17 (ABX, 1H, $J=0,6,1,5$ Hz, Ar), 8,00 (AB, 1H, $J=2,0$ Hz, Ar), 7,96 (ABX, 1H, $J=1,5,8,5$ Hz, Ar), 7,83 (AB, 1H, $J=2,0$ Hz, Ar), 7,82 (ABX, 1H, $J=0,6,8,5$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166,6, 161,9, 150,0, 144,6, 135,1, 131,6, 129,0, 128,7, 126,4, 125,8, 119,9, 112,1; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $C_{14}H_7Cl_2NO_3$ (MH^+) 307,9876, determinado 307,9879.

6-Carboxi-2-(2,6-diclorofenil)benzoxazole (20).

Preparado a partir de ácido 4-amino-3-hidroxibenzóico de acordo com o procedimento geral, para produzir **20** sob a forma de um sólido branco (12,7 mg, 21%). Dados para **20**: 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,27 (s lg, 1H, CO_2H), 8,38 (ABX, 1H, $J=0,5,1,5$ Hz, Ar), 8,09 (ABX, 1H, $J=1,5,8,3$ Hz, Ar), 8,02 (ABX, 1H, $J=8,3,0,5$ Hz, Ar), 7,78-7,71 (m, 3H, Ar); ^{13}C RMN (125 MHz, DMSO- d_6) δ 166,6, 159,8, 150,0, 143,8, 134,8, 134,2, 129,1, 128,8, 126,4, 126,3, 120,4, 112,6; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $C_{14}H_7Cl_2NO_3$ (MH^+) 307,9876, determinado 307,9877.

6-Carboxi-2-fenilbenzoxazole (21).

Preparado a partir de ácido 4-amino-3-hidroxibenzóico de acordo com o procedimento geral, para produzir **21** sob a forma de um sólido branco (7,0 mg, 15%). Dados para **21**: 1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ

13,16 (s lg, 1H, CO₂H), 8,27 (d, 1H, J = 0,9 Hz, Ar), 8,25-8,22 (m, 2H, Ar), 8,01 (dd, 1H, J = 1,5, 8,5 Hz, Ar), 7,89 (d, 1H, J = 8,5 Hz, Ar), 7,69-7,62 (m, 3H, Ar); ¹³C RMN (150 MHz, DMSO-d₆) δ 166,8, 164,7, 150,0, 145,2, 132,6, 129,4, 128,0, 127,6, 126,3, 126,0, 119,6, 112,0; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para C₁₄H₉NO₃ (MH⁺) 240,0655, determinado 240,0655.

7-Carboxi-2-(3,5-difluorofenil)benzoxazole (22).

Preparado a partir de ácido 3-aminossalicílico de acordo com o procedimento geral, para produzir **22** sob a forma de um sólido branco (8,8 mg, 16%). Dados para **22**: ¹H RMN (600 MHz, DMSO-d₆) δ 13,55 (s lg, CO₂H), 8,10 (AMX, 1H, J = 1,2, 7,9 Hz, Ar), 7,97 (AMX, 1H, J = 1,2, 7,9 Hz, Ar), 7,80-7,79 (m, 2H, Ar), 7,63 (tt, 1H, J = 2,4, 9,2 Hz, Ar), 7,55 (AMX, 1H, J = 7,9 Hz, Ar); ¹³C RMN (150 MHz, DMSO-d₆) δ 164,5, 162,8 (d, J = 248 Hz), 162,6 (d, J = 248 Hz), 160,9, 149,2, 142,6, 129,2, 128,0, 125,2, 124,9, 116,1, 110,6 (d, J = 28 Hz), 107,7 (q, J = 25 Hz); HRMS (MALDI-FTMS) calc. para C₁₄H₇F₂NO₃ (MH⁺) 276,0467, determinado 276,0469.

7-Carboxi-2-(2,6-difluorofenil)benzoxazole (23).

Preparado a partir de ácido 3-aminossalicílico de acordo com o procedimento geral, para produzir **23** sob a forma de um sólido branco (7,3 mg, 13%). Dados para **23**: ¹H RMN (600 MHz, DMSO-d₆) δ 13,48 (s lg, 1H, CO₂H), 8,16 (ABX, 1H, J = 1,2, 8,2 Hz, Ar), 8,00 (ABX, 1H, J = 1,2, 7,6 Hz, Ar), 7,78 (m, 1H, Ar), 7,57 (ABX, 1H, J = 7,6, 8,2 Hz, Ar), 7,40 (t, 2H, J = 8,5 Hz, Ar); ¹³C RMN (150 MHz, DMSO-d₆) δ 164,5, 160,4 (d, J = 256 Hz), 160,3 (d, J = 257 Hz), 154,9, 148,9, 142,1, 134,8 (t, J = 10 Hz), 128,0, 125,1, 125,0, 116,0, 113,0 (d, J = 22 Hz), 112,9 (q, J = 21 Hz), 105,1 (t, J = 17 Hz); HRMS (MALDI-FTMS) calc. para C₁₄H₇F₂NO₃ (MH⁺) 276,0467, determinado 276,0467.

7-Carboxi-2-[(3-trifluorometil)fenil]benzoxazole (24).

Preparado a partir de ácido 3-aminossalicílico de acordo com o procedimento geral, para produzir **24** sob a forma de um sólido branco (7,9 mg, 13%). Dados para **24**: ¹H RMN (600 MHz, DMSO-d₆) δ 13,51 (s lg, CO₂H), 8,48 (ABX, 1H, J = 8,2 Hz, Ar), 8,40 (s, 1H, Ar), 8,10 (AMX, 1H, J = 1,2, 7,9 Hz, Ar), 8,05 (ABX, 1H, J = 7,9 Hz, Ar), 7,96 (AMX, 1H, J = 1,2, 7,6 Hz, Ar), 7,94 (ABX, 1H, J = 7,9 Hz, Ar), 7,54 (AMX, 1H, J = 7,9, 7,6 Hz, Ar); ¹³C RMN (150 MHz, DMSO-d₆) δ 164,6, 161,7, 149,3, 142,7, 131,3, 131,0, 130,0 (q, J = 32 Hz), 128,6 (d, J = 3 Hz), 127,7, 127,2,

125,0, 124,8, ,123,7 (q, $J= 272$ Hz), 123,5, 116,0; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $C_{15}H_8F_3NO_3$ (MH^+) 308,0529, determinado 308,0532.

7-Carboxi-2-[(2-trifluorometil)fenil]benzoxazole (25).

Preparado a partir de ácido 3-aminossalicílico de acordo com o procedimento geral, para produzir **25** sob a forma de um sólido branco (13,8 mg, 22%). Dados para **25**: 1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,46 (s lg, 1H, CO_2H), 8,18 (d, 1H, $J= 7,6$ Hz, Ar), 8,14 (AMX, 1H, $J= 1,2, 7,9$ Hz, Ar), 8,03 (d, 1H, $J= 7,9$ Hz, Ar), 7,98 (AMX, 1H, $J= 1,2, 7,6$ Hz, Ar), 7,94 (t, 1H, $J= 7,3$ Hz, Ar), 7,89 (t, 1H, $J= 7,6$ Hz, Ar), 7,56 (AMX, 1H, $J= 7,9$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 164,6, 161,1, 149,3, 142,4, 133,0, 132,4, 132,2, 127,8, 127,6, 127,2 (q, $J= 6$ Hz), 125,0, 124,9, 123,4 (q, $J= 273$ Hz), 116,2; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $C_{15}H_8F_3NO_3$ (MH^+) 308,0529, determinado 308,0534.

7-Carboxi-2-(3,5-diclorofenil)benzoxazole (26).

Preparado a partir de ácido 3-aminossalicílico de acordo com o procedimento geral, para produzir **26** sob a forma de um sólido branco (7,0 mg, 11%). Dados para **26**: 1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14,00-12,80 (s lg, CO_2H), 8,10-8,08 (m, 3H, Ar), 7,98-7,96 (m, 2H, Ar), 7,55 (t, 1H, $J= 7,8$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 164,5, 160,5, 149,2, 142,6, 135,2, 131,5, 129,4, 128,0, 125,6, 125,2, 124,8, 116,2; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $C_{14}H_7Cl_2NO_3$ (MH^+) 307,9876, determinado 307,9874.

7-Carboxi-2-(2,6-diclorofenil)benzoxazole (27).

Preparado a partir de ácido 3-aminossalicílico de acordo com o procedimento geral, para produzir **27** sob a forma de um sólido branco (10,3 mg, 17%). Dados para **27**: 1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,90-13,10 (s lg, CO_2H), 8,16 (AMX, 1H, $J= 7,9$ Hz, Ar), 8,02 (AMX, 1H, $J= 7,9$ Hz, Ar), 7,78-7,72 (m, 3H, Ar), 7,60 (AMX, 1H, $J= 7,9$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 164,4, 158,3, 149,1, 141,7, 134,9, 134,2, 128,8, 128,2, 126,5, 125,3, 125,2, 116,2; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $C_{14}H_7Cl_2NO_3$ (MH^+) 307,9876, determinado 307,9875.

7-Carboxi-2-fenilbenzoxazole (28).

Preparado a partir de ácido 3-aminossalicílico de acordo com o procedimento geral, para produzir **28** sob a forma de um sólido branco (13,1 mg, 27%). Dados para **28**: 1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13,48 (s lg, 1H, CO_2H), 8,20-8,19 (m, 2H, Ar), 8,05 (AMX, 1H, $J=1,2, 7,9$ Hz, Ar), 7,92 (AMX, 1H, $J= 1,2, 7,6$ Hz, Ar), 7,66-7,62 (m,

3H, Ar), 7,50 (AMX, 1H, $J = 7,9$ Hz, Ar); ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6) δ 164,8, 163,1, 149,2, 142,9, 132,2, 129,4, 127,4, 127,2, 126,0, 124,7, 124,4, 115,8; HRMS (MALDI-FTMS) calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}_3$ (MH^+) 240,0655, determinado 240,0656.

O fascículo descreve igualmente os métodos que se seguem:

1. Um método para rastreio quanto a um composto que previne ou reduz a dissociação de um tetrâmero de transtirretina, o método compreendendo:

o contacto de um tetrâmero de transtirretina com um composto candidato; e

a determinação de se o composto candidato aumenta a energia de activação associada à dissociação do tetrâmero de transtirretina, desse modo prevenindo ou reduzindo a dissociação do tetrâmero de transtirretina.

2. O método de 1, compreendendo a determinação de se o composto previne a dissociação do tetrâmero de transtirretina por destabilização do estado de transição da dissociação do tetrâmero de transtirretina.

3. O método de 1, compreendendo a determinação de se o composto previne a dissociação do tetrâmero de transtirretina, por estabilização do tetrâmero de transtirretina.

4. O método de 1, compreendendo adicionalmente a medição da capacidade do composto candidato para inibir a formação de fibrila.

5. O método de 1, em que o tetrâmero de transtirretina compreende transtirretina de tipo selvagem.

6. O método de 1, em que o tetrâmero de transtirretina compreende uma transtirretina mutante de ocorrência natural.

7. O método de 1, em que o tetrâmero de transtirretina compreende uma transtirretina mutante de ocorrência natural causalmente associado à incidência de polineuropatia amilóide familiar.

8. O método de 1, em que o tetrâmero de transtirretina compreende uma transtirretina mutante de ocorrência natural

causalmente associada à incidência de cardiomiopatia amilóide familiar.

9. O método de 1, em que o tetrâmero de transtirretina compreende a transtirretina mutante V122I.

10. O método de 1, em que o tetrâmero de transtirretina compreende a transtirretina mutante V30M.

11. O método de 1, em que o tetrâmero de transtirretina compreende a transtirretina mutante L55P.

12. O método de 1, em que o composto candidato é uma molécula pequena.

13. O método de 1, em que o composto candidato é um análogo de diflunisal.

14. O método de 13, em que o análogo de diflunisal tem actividade de AINE reduzida ou ausente comparativamente com o diflunisal.

15. O método de 13, em que o análogo de diflunisal tem actividade inibidora da ciclo-oxigenase reduzida ou ausente comparativamente com o diflunisal.

16. O método de 1, compreendendo adicionalmente a determinação de se o análogo de diflunisal exhibe actividade de AINE.

17. O método de 1, compreendendo adicionalmente a determinação de se o análogo de diflunisal exhibe actividade inibidora da ciclo-oxigenase.

18. O método de 1, em que o composto candidato é um bifenilo policlorado.

19. O método de 18, em que o bifenilo policlorado é um bifenilo policlorado hidroxilado.

20. Um método de tratamento de uma doença amilóide de transtirretina, o método compreendendo a administração, a um indivíduo diagnosticado com uma doença amilóide de transtirretina, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de

um análogo de diflunisal que previne a dissociação de um tetrâmero de transtirretina.

21. O método de 20, em que o análogo de diflunisal previne a dissociação do tetrâmero de transtirretina por estabilização cinética do estado nativo do tetrâmero de transtirretina.

22. O método de 20, em que a doença amilóide de transtirretina é polineuropatia amilóide familiar.

23. O método de 20, em que a doença amilóide de transtirretina é cardiomiopatia amilóide familiar.

24. O método de 20, em que a doença amilóide de transtirretina é amiloidose sistémica senil.

25. O método de 20, em que o análogo de diflunisal tem actividade de AINE reduzida ou ausente comparativamente com o diflunisal.

26. O método de 20, em que o análogo de diflunisal tem actividade inibidora da ciclo-oxigenase reduzida ou ausente comparativamente com o diflunisal.

27. Um método de tratamento de uma doença amilóide da transtirretina, o método compreendendo a administração, a um indivíduo diagnosticado com uma doença amilóide de transtirretina, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um bifenilo policlorado que previne a dissociação de um tetrâmero de transtirretina.

28. O método de 27, em que o bifenilo policlorado previne a dissociação do tetrâmero de transtirretina por estabilização cinética do estado nativo do tetrâmero de transtirretina.

29. O método de 27, em que o bifenilo policlorado é um bifenilo policlorado hidroxilado.

30. O método de 27, em que a doença amilóide de transtirretina é polineuropatia familiar.

31. O método de 27, em que a doença amilóide de transtirretina é cardiomiopatia amilóide familiar.

32. O método de 27, em que a doença amilóide de transtirretina é amiloidose sistémica senil.

Lisboa, 2011-11-15

REIVINDICAÇÕES

1. Diflunisal para utilização no tratamento de uma doença amiloide de transtirretina, em que o diflunisal é preparado para ser administrado numa quantidade de 250 mg *b.i.d.*.

2. Diflunisal para a utilização da reivindicação 1, em que a doença amiloide de transtirretina é polineuropatia amiloide familiar.

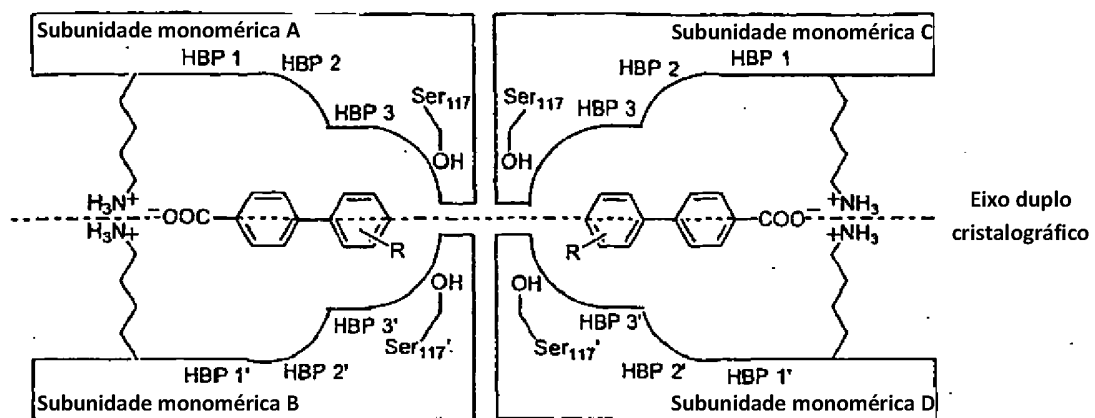
3. Diflunisal para a utilização da reivindicação 1, em que a doença amiloide de transtirretina é cardiomiopatia amiloide familiar.

4. Diflunisal para a utilização da reivindicação 1, em que a doença amiloide de transtirretina é amiloidose sistémica senil.

5. Diflunisal para a utilização da reivindicação 1, em que a doença amiloide da transtirretina é amiloidose cardíaca após transplante hepático.

6. Utilização de diflunisal no fabrico de um medicamento para o tratamento de uma doença amiloide de transtirretina, em que o medicamento é preparado para administração de diflunisal numa quantidade de 250 mg *b.i.d.*.

Lisboa, 2011-11-15

**FIG. 1**

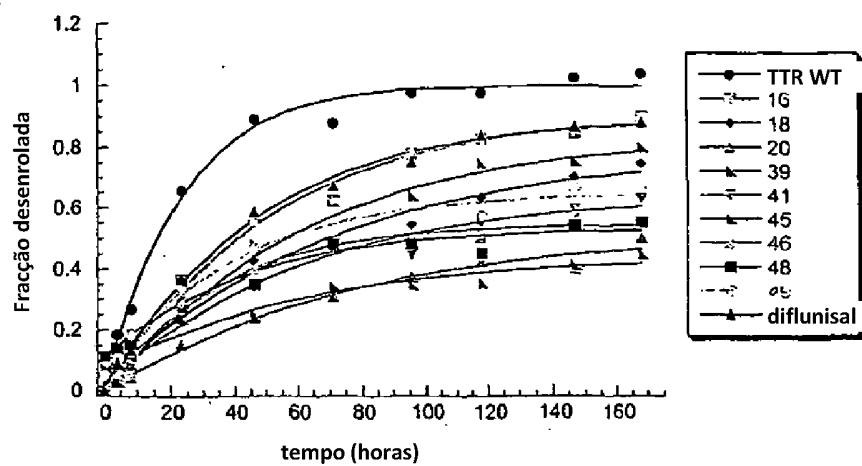


FIG. 2A

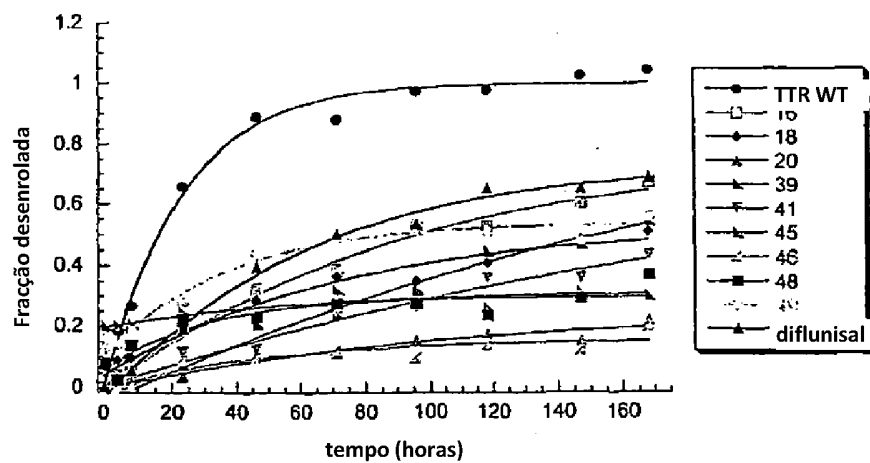


FIG. 2B

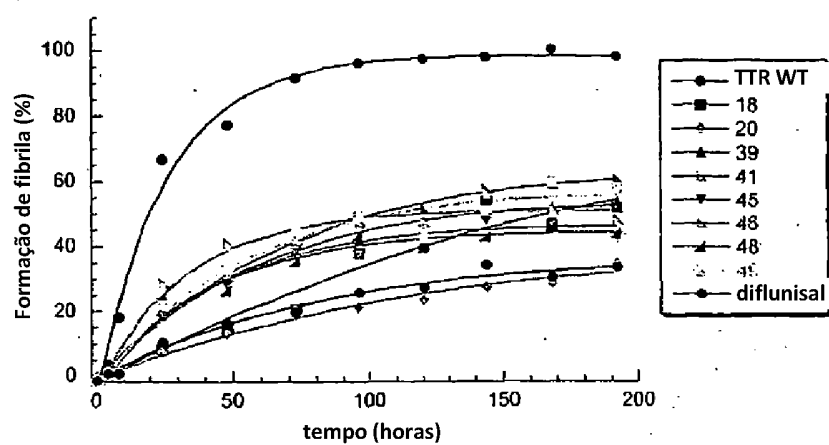


FIG. 3A

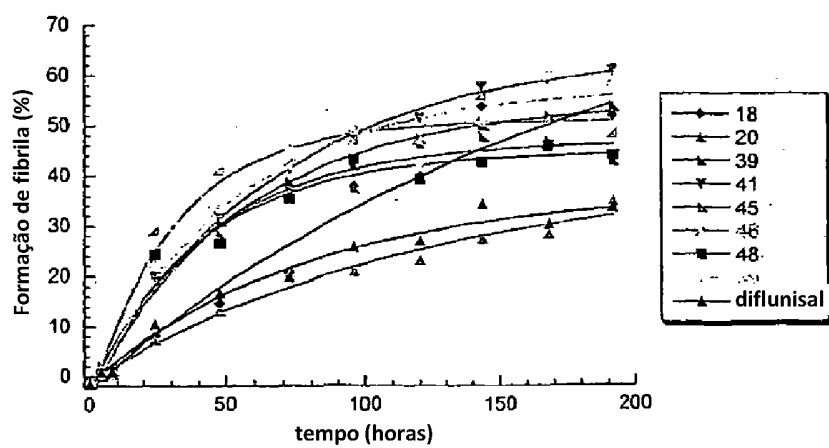


FIG. 3B

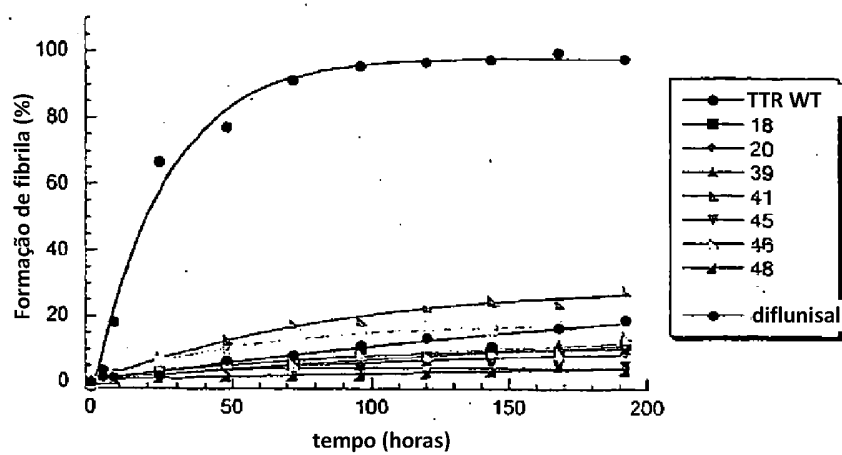


FIG. 4A

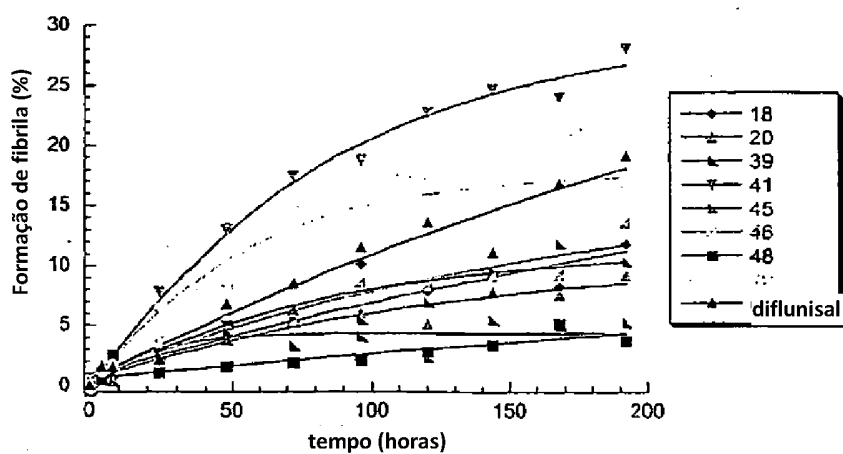
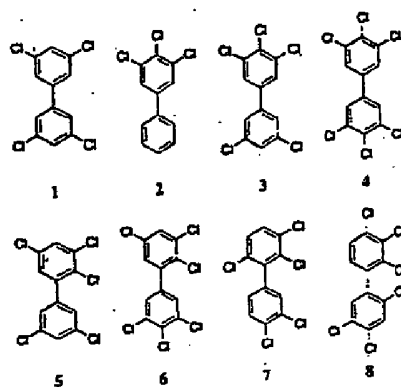
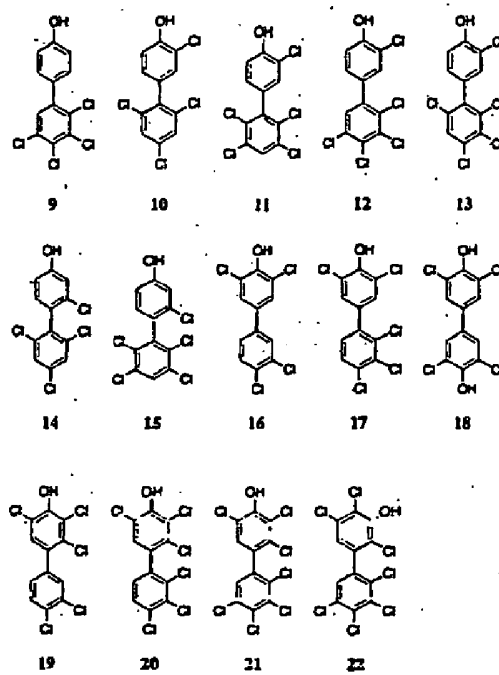


FIG. 4B

**FIG. 5**

**FIG. 6**

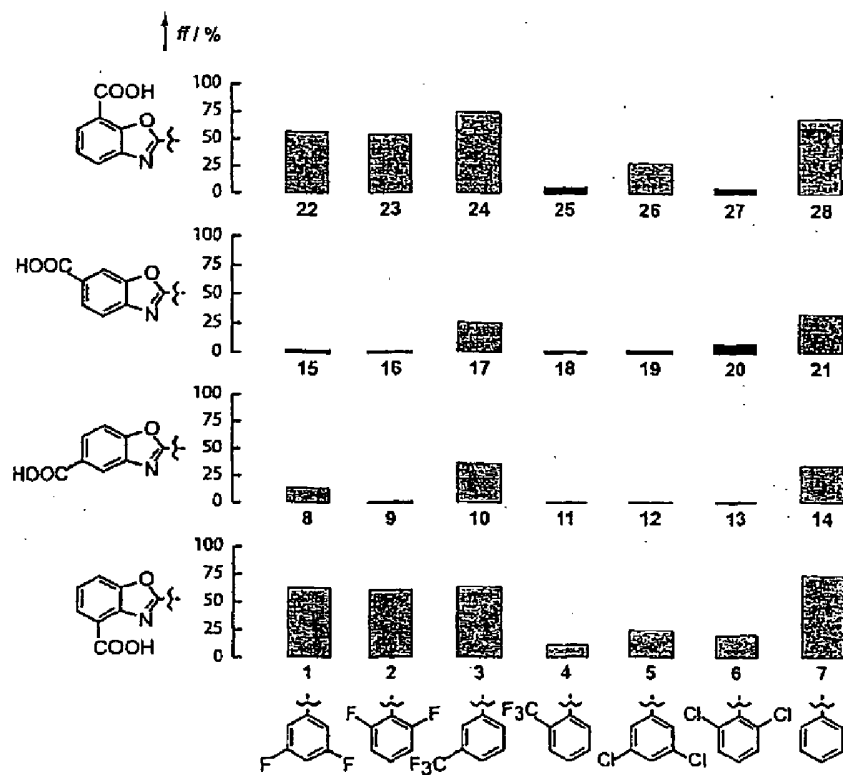


FIG. 7

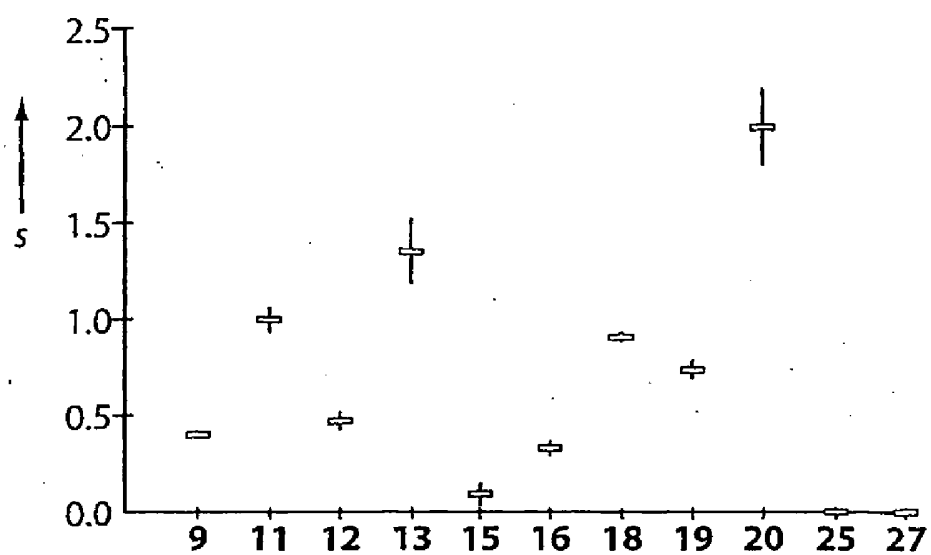


FIG. 8

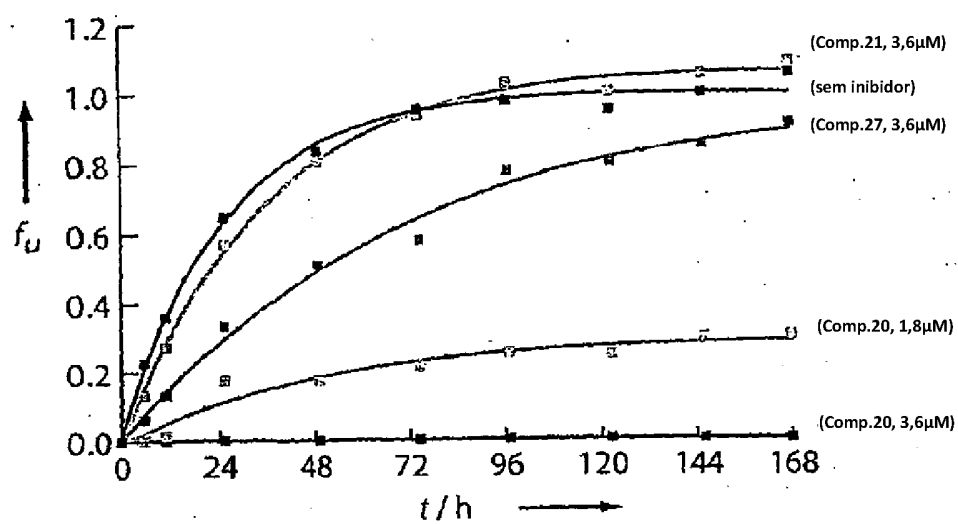


FIG. 9

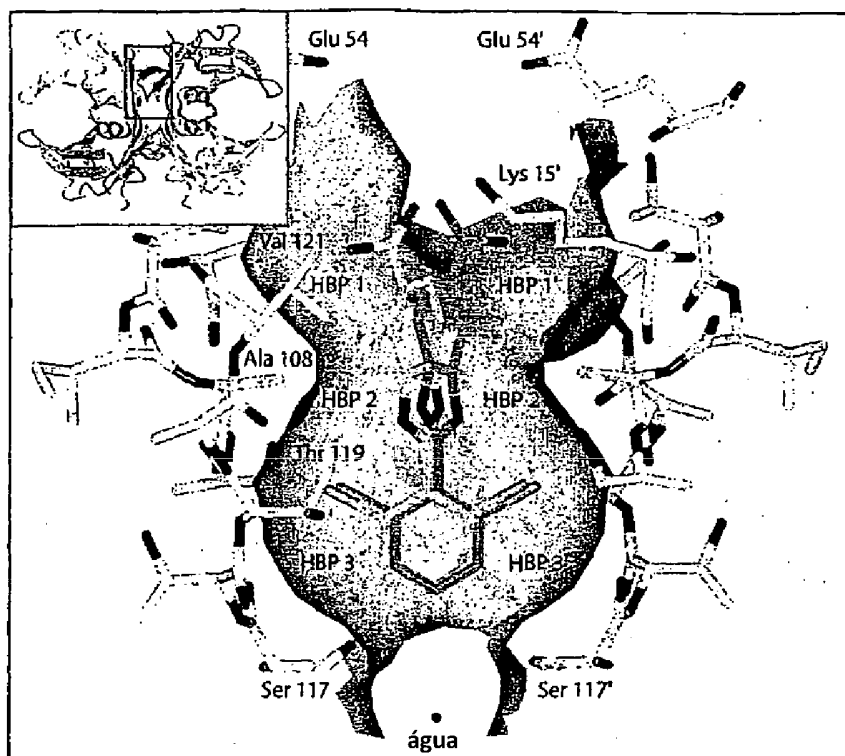


FIG. 10