

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

(22) Data de pedido: 2004.03.15	(73) Titular(es): UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION 200 GARDNER STEEL CONFERENCE CENTER THACKERAY & O'HARA STREETS PITTSBURGH, PA 15620-4002 US
(30) Prioridade(s): 2003.03.14 US 388173 2003.08.22 US 645847	(72) Inventor(es): WILLIAM E. KLUNK US CHESTER A MATHIS US YANMING WANG US
(43) Data de publicação do pedido: 2006.01.04	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, Nº. 69 - 3º D 1250-148 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2012.08.22 236/2012	

(54) Epígrafe: **COMPOSTOS DERIVADOS DE BENZOTIAZOLE, COMPOSIÇÕES E UTILIZAÇÕES**

(57) Resumo:

ESTA INVENÇÃO PROVIDENCIA COMPOSTOS DERIVADOS DO BENZOTIAZOLE, COMPOSIÇÕES QUE COMPREENDEM TAIS COMPOSTOS, MÉTODOS DE PREPARAR TAIS COMPOSTOS, E MÉTODOS DE UTILIZAR TAIS COMPOSTOS PARA DETETAR DEPÓSITO(S) DE AMILOIDE E PARA DIAGNOSTICAR UMA DOENÇA, PATOLOGIA OU ESTADO CARACTERIZADO POR DEPÓSITO(S) DE AMILOIDE. OS COMPOSTOS ENCONTRAM UTILIZAÇÃO PARTICULAR NO DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE PACIENTES COM DOENÇAS EM QUE A ACUMULAÇÃO DE PLACAS NEURÍTICAS É PREVALENTE. OS ESTADOS DA DOENÇA OU ENFERMIDADES INCLUEM, MAS NÃO SÃO LIMITADOS A, DOENÇA DE ALZHEIMER, DOENÇA FAMILIAR DE ALZHEIMER, SÍNDROME DE DOWN E HOMOZIGOTOS PARA O ALELO E4 DA APOLIPOPROTEÍNA.

RESUMO**"COMPOSTOS DERIVADOS DE BENZOTIAZOLE, COMPOSIÇÕES E UTILIZAÇÕES"**

Esta invenção providencia compostos derivados do benzotiazole, composições que compreendem tais compostos, métodos de preparar tais compostos, e métodos de utilizar tais compostos para detetar depósito(s) de amiloide e para diagnosticar uma doença, patologia ou estado caracterizado por depósito(s) de amiloide. Os compostos encontram utilização particular no diagnóstico e tratamento de pacientes com doenças em que a acumulação de placas neuríticas é prevalente. Os estados da doença ou enfermidades incluem, mas não são limitados a, doença de Alzheimer, doença familiar de Alzheimer, síndrome de Down e homocigotos para o alelo E4 da apolipoproteína.

DESCRIÇÃO

"COMPOSTOS DERIVADOS DE BENZOTIAZOLE, COMPOSIÇÕES E UTILIZAÇÕES"

CAMPO DA INVENÇÃO

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

FUNDAMENTO DA INVENÇÃO

A doença de Alzheimer ("AD") é uma doença neurodegenerativa caracterizada por perda de memória e outras deficiências cognitivas. McKhann *et al.*, *Neurology* 34:939 (1984). É a causa mais comum de demência nos Estados Unidos. A AD pode atingir pessoas tão jovens quanto 40-50 anos de idade, ainda, porque a presença da doença é difícil de se determinar sem uma biopsia cerebral perigosa, o momento do início é desconhecido. A predominância da AD aumenta com a idade, com uma estimativa da população afetada atingindo até 40-50% nas idades de 85-90 anos. Evans *et al.*, *JAMA* 262:2551 (1989); Katzman, *Neurology* 43:13 (1993).

Os estudos sugerem que a deposição de amiloide no cérebro é um evento causador precoce na patogênese da doença de Alzheimer (AD). A progressão da deposição de amiloide

resulta na formação de placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares em regiões do cérebro que estão envolvidas na aprendizagem e memória. Uma placa neurítica de Alzheimer típica compreende neuritos distróficos circundando um núcleo de material amiloide. O componente principal do núcleo amiloide é uma proteína chamada de beta-amiloide ($A\beta$).

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

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

A deposição inicial de $A\beta$ ocorre provavelmente muito antes que os sintomas clínicos sejam observáveis. Os "critérios microscópicos mínimos" atualmente recomendados para o

diagnóstico de AD são baseados no número de placas neuríticas encontradas no cérebro. Khachaturian, *Arch. Neurol., supra* (1985). No entanto, o acesso à contagem de placas neuríticas tem que ser retardado até após a morte.

As placas neuríticas contendo amiloide são uma característica proeminente de áreas seletivas do cérebro na AD, bem como na Síndrome de Down e em indivíduos homozigotos para o alelo da apolipoproteína E4, os quais são muito prováveis de desenvolver a AD. Corder *et al.*, *Science* 261:921 (1993); Divry, P., *J. Neurol. Psych.* 27:643-657 (1927); Wisniewski *et al.*, in Zimmerman, H. M. (ed.): *PROGRESS IN NEUROPATHOLOGY* (Grune and Stratton, N. Y. 1973) pp. 1-26.

A amiloide cerebral é prontamente demonstrada através da marcação de secções cerebrais com tioflavina S ou vermelho do Congo. Puchtler *et al.*, *J. Histochem. Cytochem.* 10:35 (1962). A amiloide marcada com vermelho do Congo é caracterizada por um aparecimento dicroico, exibindo uma polarização colorida amarelo-verde. A ligação dicroica é o resultado da estrutura em folha beta plissada das proteínas amiloides. Glenner, G.N. *Eng. J. Med.* 302:1283 (1980). Uma discussão detalhada da bioquímica e histoquímica de amiloide pode ser encontrada em Glenner, N. *Eng. J. Med.*, 302:1333 (1980).

Até agora, o diagnóstico de AD foi conseguido principalmente através da avaliação de critérios clínicos, biopsias cerebrais e estudos de tecidos *post-mortem*. Os esforços da investigação para desenvolver métodos para diagnosticar a doença de Alzheimer *in vivo* incluem (1) testes genéticos, (2) métodos de ensaio imunológico e (3) técnicas de imagiologia.

A evidência de que as anomalias no metabolismo de A β são necessárias e suficientes para o desenvolvimento de AD é baseada na descoberta de mutações pontuais na proteína precursora de A β em várias famílias raras com uma forma dominante autossômica de AD. Hardy, *Nature Genetics* 1:233 (1992); Hardy *et al.*, *Science* 256:184 (1992). Estas mutações ocorrem próximo dos pontos de clivagem N- e C-terminais necessários para a geração de A β a partir de sua proteína precursora. St. George-Hyslop *et al.*, *Science* 235:885 (1987); Kang *et al.*, *Nature* 325:733(1987); Potter WO 92/17152. A análise genética de um grande número de famílias AD demonstrou, no entanto, que a AD é geneticamente heterogênea. St. George-Hyslop *et al.*, *Nature* 347:194 (1990). A ligação a marcadores do cromossoma 21 é demonstrada em apenas algumas famílias com AD instalada precocemente e em nenhuma família com AD instalada tardiamente. Mais recentemente foi identificado por Sherrington *et al.*, *Nature* 375:754-760 (1995), um gene no cromossoma 14 cujo produto se prevê que contenha domínios transmembranares múltiplos e que se assemelhe a uma proteína de membrana integral. Este gene pode ser responsável por até 70% da AD dominante autossômica instalada precocemente. Dados preliminares sugerem que esta mutação do cromossoma 14 provoca um aumento na produção de A β . Scheuner *et al.*, *Soc. Neurosci. Abstr.* 21:1500 (1995). Uma mutação num gene muito semelhante foi identificada no cromossoma 1 de famílias Volga Alemãs com AD instalada precocemente. Levy-Lahad *et al.*, *Science* 269:973-977 (1995).

O varrimento para o genótipo da apolipoproteína E foi sugerido como uma ajuda no diagnóstico de AD. Scott, *Nature* 366:502 (1993); Roses, *Ann. Neurol.* 38:6-14 (1995). No

entanto, ocorrem dificuldades com esta tecnologia, porque o alelo da apolipoproteína E4 é apenas um fator de risco para a AD, não um marcador da doença. Está ausente em muitos pacientes de AD e presente em muitos indivíduos idosos não dementes. Bird, *Ann. Neurol.* 38:2-4 (1995).

Foram desenvolvidos métodos de ensaio imunológico para detetar a presença de marcadores neuroquímicos em pacientes de AD e para detetar uma proteína amiloide relacionada com AD no fluido espinal. Warner, *Anal. Chem.* 59:1203A (1987); Patente Mundial N° 92/17152 por Potter; Glenner *et al.*, Patente U. S. 4,666,829. Estes métodos para diagnosticar a AD não provaram detetar a AD em todos os pacientes, particularmente nos estágios iniciais da doença e são relativamente invasivos, requerendo uma punção lombar. Da mesma forma, foram realizadas tentativas para desenvolver anticorpos monoclonais como sondas para a imagiologia de A β . Majocha *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 33:2184 (1992); Majocha *et al.*, WO 89/06242 e Majocha *et al.*, Patente U. S. 5,231,000. A principal desvantagem de sondas de anticorpos é a dificuldade em conseguir que estas moléculas grandes atravessem a barreira hematoencefálica. A utilização de anticorpos para o diagnóstico *in vivo* de AD irá requer anomalias marcadas na barreira hematoencefálica de maneira a se aceder ao cérebro. Não existe qualquer evidência funcional convincente de que as anomalias na barreira hematoencefálica existam com segurança na AD. Kalaria, *Cerebrovascular & Brain Metabolism Reviews* 4:226 (1992).

O peptídeo A β radiomarcado foi utilizado para marcar placas difusas, compactas e do tipo neurítico em secções de cérebro com AD. Ver Maggio *et al.*, WO 93/04194. No entanto, estes peptídeos partilham todas as desvantagens dos anticorpos. Especificamente, os peptídeos normalmente não

atravessam a barreira hematoencefálica em quantidades necessárias para imagiologia e, uma vez que estas sondas reagem com placas difusas, poderão não ser específicas para a AD.

As placas neuríticas e os emaranhados neurofibrilares são as duas indicações patológicas mais características da AD. Klunk e Abraham, *Psychiatric Development*, 6:121-152 (1988). As placas ocorrem inicialmente no neocórtex onde estão distribuídas de modo relativamente homogêneo. Thal *et al.*, *Neurology* 58:1791-1800 (2002). Os emaranhados aparecem primeiro em áreas límbicas tais como o córtex transentorinal e progridem num padrão topográfico previsível para o neocórtex. Braak e Braak, *Acta Neuropathologica* 82:239-259 (1991). Arnold *et al.* mapearam a distribuição de ENF e placas neuríticas nos cérebros de pacientes com AD. Arnold *et al.*, *Cereb. Cortex* 1: 103-116 (1991). Em comparação com ENF, as placas neuríticas eram, em geral, distribuídas mais uniformemente através do córtex, com as exceções de notavelmente menos placas neuríticas no perialocórtex e alocórtex límbicos (as áreas com a maior densidade de ENF). Através da marcação com tioflavina-S, os lóbulos temporal e occipital apresentaram as densidades de placa neurítica mais elevadas, os lóbulos límbico e frontal apresentaram as mais baixas, e o lóbulo parietal foi intermédio. Arriagada *et al.*, *Neurology* 42:1681-1688 (1992). Arriagada *et al.* estudaram a distribuição topográfica das alterações patológicas do tipo AD nos cérebros de indivíduos idosos presumidamente não dementes. As suas observações sugerem que a maioria dos indivíduos com idade acima de 55 anos apresenta pelo menos um pouco de ENF e placas. Os subtipos de SP definidos imunohistoquimicamente apresentaram padrões distintos de distribuição com placas A β imunoreativas presentes em áreas

neocorticais muito maiores que nas áreas límbicas e placas Alz-50 imunoreativas sendo não frequentes e limitadas àquelas áreas que contêm neurónios Alz-50-positivos e ENF. Estes padrões sugeriram uma existência de atributos comuns nos processos patológicos que conduzem a ENF e SP tanto no envelhecimento quanto na AD.

Permanece o debate relativamente a se as placas e emaranhados são subprodutos do processo neurodegenerativo encontrado na AD ou se são a causa de morte celular neuronal. Ross, *Current Opinion in Neurobiol.* 96:644-650(1996); Terry, *J. of Neuropath. & Exp. Neurol.* 55:1023-1025(1996); Terry, *J. Neural Transmission-Suppl.* 53:141-145 (1998). É clara a evidência de que a perda sináptica neocortical e hipocampal se correlaciona bem com o estado cognitivo pré-mórbido. Alguns investigadores sugerem que a rutura da estrutura e função microtubular, causada pela hiperfosforilação da proteína associada ao microtúbulo, tau, representa o papel etiológico chave na perda sináptica em particular e na AD em geral. Terry, *J. of Neuropath. & Exp. Neurol.* 55:1023-1025 (1996); Terry, *J. of Neural Transmission-Suppl.* 53:141-145 (1998). A lesão oxidativa e a rutura de membrana foram propostos como desempenhando papéis importantes na AD. Perry, *Free Radical Biology & Medicine* 28:831-834(2000); Pettegrew *et al.*, *Annals of the New York Academy of Sciences* 826: 282-306 (1997). Os fatores vasculares incluindo hipoperfusão cerebral crónica subtil foram também implicados na patogénese da AD. De la Torre, *Annals of the New York Academy of Sciences* 903:424-436 (2000); Di Iorio *et al.*, *Aging (Milano)* 11:345-352 (1999). Enquanto que todos estes fatores são prováveis de desempenhar algum papel na patogénese da AD, aumentam as evidências que apontam para anomalias no processamento do peptídeo beta-amiloide (A β), um peptídeo de 4 kD que se

agrega numa estrutura em folha β -pregueada fibrilar. Glenner e Wong, *Biochemical & Biophysical Research Communications* 120:885-890 (1984). Foi proposto que a A β desempenhe um papel importante na patogénese da AD por várias razões: 1) os depósitos de A β são os marcadores neuropatológicos mais precoces da AD na síndrome de Down, e podem preceder a formação de ENF em várias décadas; Mann *et al.*, *Neurodegeneration* 1:201-215 (1992); Naslund, *et al.*, *JAMA* 283:1571-1577 (2000). 2) a β -amiloidose é relativamente específica para AD e patologias intimamente relacionadas; Selkoe, *Trends in Neurosciences* 16:403-409 (1993). 3) a A β é tóxica para neurónios cultivados, Yankner, *Neurobiol. Aging* 13:615-616 (1992); Mattson *et al.*, *J. Neuroscience* 12:376-389 (1992); Shearman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1470-1474 (1994), uma toxicidade que parece ser dependente da estrutura secundária em placa β e agregação em pelo menos oligómeros. Lambert *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6448-6453 (1989); Pike *et al.*, *J. Neuroscience* 13:1676-1687 (1993); Simmons *et al.*, *Molecular Pharmacology* 45:373-379 (1994). Embora seja certo que a A β existe num equilíbrio distribuído por frações monoméricas, oligoméricas e fibrilar/placa, a forma oligomérica de A β foi fortemente implicada como sendo o componente neurotóxico chave. Selkoe, *Alzheimer disease*, editado por R.D. Terry, *et al.*, pp. 293-310 Lippincott Williams e Wilkins, Philadelphia (1999); Selkoe, *Science* 298,789-91 (2002). O reconhecimento dos efeitos tóxicos de A β oligomérica formou uma base de compromisso para alguns oponentes da "hipótese de cascata amiloide" da AD. Terry, *Ann. Neurol.* 49:684 (2001). Talvez a evidência mais forte do papel de A β na patogénese da AD provenha da descoberta de mutações no gene da proteína precursora amiloide (APP) que conduz a algumas formas de AD

familiar instalada precocemente. Goate *et al.*, *Nature* 349:704-706 (1991). Adicionalmente, todas as formas familiares de AD dominante autossômica têm em comum um nível elevado da forma de A β que agrega mais rapidamente 42 aminoácidos. Younkin *Rinsho Shinkeigaku - Clinical Neurology* 37:1099 (1997). Em contraste, nenhuma mutação na proteína tau se mostrou como sendo causadora de AD. Em vez disso as mutações em tau (cromossoma 17) estão ligadas à demência fronto-temporal com Parkinsonismo. Goedert *et al.*, *Neuron* 21:955-958 (1998). Evidência recente mostrou uma boa correlação entre os níveis de A β no cérebro e o declínio cognitivo na AD, e a deposição de amiloide aparenta ser um evento muito precoce, talvez mesmo o primeiro, na patogênese da AD, precedendo qualquer diminuição da capacidade cognitiva. Naslund, *et al.*, *JAMA* 283:1571-1577 (2000). A sua presença poderá modular um número de vias bioquímicas que resultam na deposição de ainda outras proteínas, na ativação da astrogliã e microglia, e eventualmente morte celular neuronal e consequente disfunção cognitiva.

Os dados sugerem que os compostos que se ligam a amiloide possuirão um potencial terapêutico na AD e diabetes *mellitus* tipo 2. As reações morfológicas incluindo astrocitose reativa, neurites distróficas, células de microglia ativadas, perda sináptica, e ativação complementar completa encontrada em torno de placas neuríticas, todas significam que os processos neurotóxicos e degenerativos celulares estão a ocorrer nas áreas adjacentes a estes depósitos de A β . Joachim *et al.*, *Am. J. Pathol.* 135:309 (1989); Masliah *et al.*, *loc. cit.* 137:1293 (1990); Lue e Rogers, *Dementia* 3:308 (1992). A neurotoxicidade induzida por A β e a degeneração celular foram relatadas num número de tipos celulares *in vitro*. Yankner

et al., Science 250:279 (1990); Roher *et al.*, BBRC 174:572 (1991); Frautschy *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 88:83362 (1991); Shearman *et al.*, *loc. cit.* 91:1470 (1994). Foi demonstrado que a agregação do peptídeo A β é necessária para a neurotoxicidade *in vitro*. Yankner, Neurobiol. Aging 13:615 (1992). Recentemente, três laboratórios relataram resultados que sugerem que o vermelho do Congo inibe a neurotoxicidade induzida por A β e a degeneração celular *in vitro*. Burgevin *et al.*, Neuro Report 5:2429 (1994); Lorenzo e Yankner, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:12243 (1994); Pollack *et al.*, Neuroscience Letters 184:113 (1995); Pollack *et al.*, Neuroscience Letters 197:211 (1995). O mecanismo parece envolver tanto a inibição da formação de fibrilo quanto a prevenção das propriedades neurotóxicas dos fibrilos formados. Lorenzo e Yankner, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:12243 (1994). Demonstrou-se também que o vermelho do Congo protege as células da ilhota pancreática contra a toxicidade causada pela amilina. Lorenzo e Yankner, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:12243 (1994). A amilina é um peptídeo fibrilar semelhante a A β que se acumula no pâncreas na diabetes *mellitus* tipo 2.

É conhecido na técnica que certos corantes azo, tais como o vermelho do Congo, podem ser carcinogênicos. Morgan *et al.*, Environmental Health Perspectives, 102 (supl.) 2:63-78, (1994). Este potencial carcinogênico parece ser grandemente baseado no fato de corantes azo serem extensivamente metabolizados à amina precursora livre por bactérias intestinais. Cerniglia *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Com., 107:1224-1229, (1982). No caso de corantes de benzidina (e muitas outras benzidinas substituídas), é a amina livre que é o carcinogêneo. Estes fatos têm poucas implicações para os estudos de imagiologia de amiloide nos quais uma quantidade extremamente pequena do corante radiomarcado com

elevada atividade específica é diretamente injetada na corrente sanguínea. Neste caso, a quantidade administrada seria desprezável e o corante não seria atacado pelas bactérias intestinais.

No caso de uso terapêutico, estes fatos possuem uma importância crítica. A libertação de um carcinógeno conhecido a partir de um composto terapêutico é inaceitável. Um segundo problema do metabolismo de corante diazo é que a maior parte do fármaco administrado é metabolizada por bactérias intestinais antes de sua absorção. Esta biodisponibilidade diminuída permanece como uma desvantagem mesmo que os metabolitos libertados sejam inócuos.

A tioflavina T é um corante básico primeiro descrito como um corante seletivo de amiloide em 1959 por Vassar e Culling, *Arch. Pathol.* 68:487 (1959). Schwartz *et al.*, *Zbl. Path.* 106:320 (1964), demonstraram primeiro a utilização da tioflavina S, um corante ácido, como um corante de amiloide em 1964. Desde então, as propriedades tanto da tioflavina T quanto da tioflavina S, foram estudadas em detalhe. Kelenyi, *J. Histochem. Cytochem.* 15:172 (1967); Burns *et al.*, *J. Path. Bact.* 94:337(1967); Guntern *et al.*, *Experientia* 48:8 (1992); Levine, *Meth. Enzymol.* 309:274 (1999). A tioflavina S é comumente utilizada no estudo *post-mortem* da deposição de amiloide em cérebro com AD, em que se revelou ser uma das técnicas mais sensíveis para se demonstrar placas senis. Vallet *et al.*, *Acta Neuropathol.* 83:170 (1992). A tioflavina T foi frequentemente utilizada como um reagente para estudar a agregação de proteínas amiloides solúveis em fibrilos em placa beta. Levine, *Proc. Sci.* 2:404 (1993). Os derivados de amina quaternária relacionados com a tioflavina T foram propostos com agentes

de imagiologia de amiloide, embora não tenha sido apresentada qualquer evidência da absorção cerebral destes agentes. Caprathe *et al.*, Patente U. S. 6,001,331.

Uma vez que a deposição de amiloide inicial poderá ocorrer muito antes dos sintomas clínicos da AD serem observáveis, a detecção e a quantificação de depósitos de amiloide poderia facilitar o diagnóstico da AD em seus estágios iniciais pré-sintomáticos. Ver a Patente U. S. 6,417,178. As técnicas de imagiologia, tais como a tomografia de emissão de positrão (PET) e tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT), são efetivas na monitorização da acumulação de depósitos de amiloide no cérebro e na sua correlação com a progressão da AD. A aplicação destas técnicas requer o desenvolvimento de radioligandos que entrem prontamente no cérebro e se liguem seletivamente aos depósitos de amiloide *in vivo*.

Wang *et al.*, J. of Mol. Neurosci. 19, 11 (2002), revela a utilização de 2-(3'-Iodo-4'-aminofenil)-6-hidroxibenzotiazole radiomarcado com ¹²⁵I para quantificação *in vivo* de depósitos de amiloide.

A incapacidade de se aceder à deposição de amiloide na AD até após a morte impede o estudo desta doença devastadora. Um método para quantificar a deposição de amiloide antes da morte é necessário tanto como uma ferramenta de diagnóstico em casos moderados ou clinicamente confusos quanto na monitorização da eficácia de terapias destinadas a prevenir a deposição de A β . Consequentemente permanece da maior importância desenvolver um método seguro e específico para o diagnóstico de AD antes da morte, por imagiologia de amiloide no cérebro de parênquima *in vivo*. Apesar de terem sido realizadas várias tentativas para se diagnosticar a AD

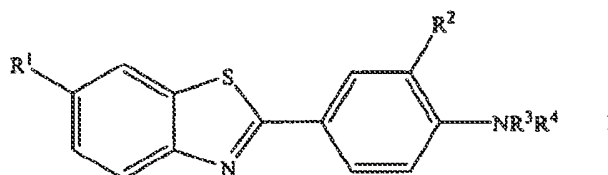
in vivo, atualmente, não existe qualquer sonda *ante-mortem* para a amiloide cerebral. Nenhum método utilizou uma sonda de elevada afinidade para amiloide que possuísse baixa toxicidade, pudesse atravessar a barreira hematoencefálica, e se ligasse mais efetivamente ao cérebro com AD que ao cérebro normal de maneira a identificar depósitos de amiloide em AD antes da morte dos pacientes. Assim, nenhum método *in vivo* para o diagnóstico de AD mostrou cumprir estes critérios.

Existe uma necessidade de compostos que se liguem a amiloide que não sejam tóxicos e possam atravessar a barreira hematoencefálica, e, conseqüentemente, possam ser utilizados em diagnósticos. Com esta finalidade, os presentes inventores determinaram que variando substituições em diferentes posições pode aumentar a afinidade ligante dependendo da posição do substituinte.

Adicionalmente, os presentes inventores desenvolveram uma série de derivados de tioflavina T não carregados como agentes de imagiologia de amiloide que exibem elevada afinidade para depósitos de amiloide e elevada permeabilidade através da barreira hematoencefálica. Os estudos intensivos *in vitro* e *in vivo* destes agentes de imagiologia de amiloide sugerem que se ligam especificamente a depósitos de amiloide a concentrações típicas daquelas obtidas durante os estudos de tomografia por emissão de positrão. No ambiente complexo do cérebro humano, a ligação não específica dos compostos de imagiologia de amiloide é baixa, mesmo em cérebros de controlo destituídos de depósitos de amiloide. À concentração nanomolar, estes compostos parecem não se ligar a emaranhados neurofibrilares.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

É consequentemente uma concretização da presente invenção providenciar compostos que permitem um método seguro e específico de diagnosticar AD antes da morte, por imagiologia *in vivo* de amiloide no parênquima cerebral. Os compostos úteis para este propósito estão de acordo com a fórmula I seguinte:



ou um sal, hidrato, solvato ou pró-fármaco farmacologicamente aceitável do composto, em que:

R^1 é hidrogénio, $-OH$, $-NO_2$, $-CN$, $-COOR$, $-OCH_2OR$, C_1-C_6 alquilo, C_2-C_6 alcenilo, C_2-C_6 alcinilo, C_1-C_6 alcoxi ou halogeno, em que um ou mais dos átomos de R^1 poderão ser um átomo radiomarcado;

R é C_1-C_6 alquilo, em que um ou mais dos átomos de carbono poderão ser um átomo radiomarcado;

R^2 é um radiofluoro;

R^3 é hidrogénio, C_1-C_6 alquilo, C_2-C_6 alcenilo ou C_2-C_6 alcinilo; e

R^4 é hidrogénio, C_1-C_6 alquilo, C_2-C_6 alcenilo ou C_2-C_6 alcinilo.

Noutra concretização, os compostos que se ligam a amiloide da invenção ligam-se a $A\beta$ com uma constante de dissociação (K_D) entre 0,0001 e 10,0 μM quando medida pela ligação ao peptídeo $A\beta$ sintético ou ao tecido cerebral com Doença de Alzheimer.

Um método para sintetizar os compostos que se ligam a amiloide da presente invenção apresentando pelo menos um dos substituintes selecionados a partir do grupo consistindo em ^{18}F e ^{19}F , compreendendo o passo de marcação do composto que se liga a amiloide em que pelo menos um dos substituintes é um tri-alkil estanho, através da reação do composto com uma substância contendo ^{18}F ou ^{19}F .

Uma concretização adicional da presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica para imagiologia *in vivo* de depósitos de amiloide, compreendendo (a) um composto que se liga a amiloide da presente invenção e (b) um veículo farmacêuticamente aceitável.

A invenção permite um método *in vivo* para detetar depósitos de amiloide, que compreende as etapas de: (a) administrar uma quantidade detetável de uma composição farmacêutica compreendendo o composto que se liga a amiloide marcado, e detetar a ligação do composto ao depósito de amiloide no indivíduo. Num aspeto preferido desta concretização, o depósito de amiloide está localizado no cérebro de um indivíduo. Num aspeto particularmente preferido desta concretização, o indivíduo é suspeito de possuir uma doença ou síndrome selecionada a partir do grupo consistindo em Doença de Alzheimer, Doença familiar de Alzheimer, Síndrome de Down e homozigotos para o alelo E4 da apolipoproteína. Noutro aspeto particularmente preferido desta concretização, a deteção é selecionada a partir do grupo que consiste em imagiologia gama, imagiologia por ressonância magnética e espectroscopia por ressonância magnética. Numa concretização preferida do método, a imagiologia gama é quer PET ou SPECT. Noutra concretização preferida do método, a composição farmacêutica é administrada por injeção intravenosa. Noutra concretização preferida do método, a razão entre (i) a ligação do

composto a uma área cerebral diferente do rebelo e (ii) a ligação do composto ao cerebelo, num indivíduo é comparada com a razão num indivíduo normal.

Noutra concretização do método, a deteção dos depósitos de amiloide *in vivo* é utilizada no diagnóstico da doença de Alzheimer.

A invenção também permite um método para detetar depósitos de amiloide em tecido humano ou animal de biópsia ou *post-mortem* compreendendo as etapas de: (a) incubar tecido fixado a formalina ou congelado recente com uma solução de um composto que se liga a amiloide da presente invenção para formar um depósito marcado e em seguida, (b) detetar os depósitos marcados. Numa aspeto preferido desta concretização, a solução é composta de 25-100% de etanol, sendo o restante da solução água, em que a solução é saturada com um composto que se liga a amiloide de acordo com a presente invenção. Numa concretização particularmente preferida deste método, a solução é composta por um tampão aquoso (tal como tris ou fosfato) contendo 0-50% de etanol, em que a solução contém 0,0001 a 100 μM de um composto que se liga a amiloide de acordo com a presente invenção. Numa concretização particularmente preferida do método, a deteção é realizada por técnicas de microscopia seleccionadas a partir do grupo que consiste em microscopia de campo claro, de fluorescência, a laser confocal, e por polarização cruzada.

A invenção permite adicionalmente um método para quantificar a quantidade de amiloide em tecido de biópsia ou *post-mortem*, que compreende as etapas de: a) incubar um derivado radiomarcado de um composto que se liga a amiloide da presente invenção com um homogenado de tecido de biópsia

ou *post-mortem*, b) separar o tecido ligado do tecido não ligado ao derivado radiomarcado de um composto que se liga a amiloide da presente invenção, c) quantificar o tecido ligado ao derivado radiomarcado de um composto que se liga a amiloide da presente invenção, e d) converter as unidades de tecido ligado ao derivado radiomarcado de um composto que se liga a amiloide da presente invenção em unidades de microgramas de amiloide por 100 mg de tecido por comparação com um padrão.

A invenção também permite um método para distinguir um cérebro com doença de Alzheimer de um cérebro normal compreendendo as etapas de: a) obtenção de tecido de (i) o cerebelo e (ii) noutra área do mesmo cérebro que não o cerebelo, de indivíduos normais e de indivíduos sob suspeita de apresentarem a doença de Alzheimer; b) incubação dos tecidos com um derivado radiomarcado de um composto de tioflavina que se liga a amiloide de acordo com a presente invenção de tal forma que o amiloide no tecido se liga ao derivado de um composto que se liga a amiloide da presente invenção; c) quantificação da quantidade de amiloide ligado ao derivado radiomarcado de um composto que se liga a amiloide da presente invenção de acordo com o método descrito acima; d) cálculo da razão entre a quantidade de amiloide na área do cérebro diferente do cerebelo e a quantidade de amiloide no cerebelo; e) comparação da razão para a quantidade de amiloide no tecido de indivíduos normais com a razão para a quantidade de amiloide em tecido de indivíduos sob suspeita de apresentarem doença de Alzheimer; e f) determinação da presença da doença de Alzheimer se a razão a partir do cérebro de um indivíduo sob suspeita de possuir a doença de Alzheimer for acima de 90% das razões obtidas a partir de cérebros de indivíduos normais.

Outra concretização da presente invenção refere-se a compostos da presente invenção que são úteis na ligação específica a depósitos de amiloide em relação aos emaranhados neurofibrilares.

A invenção também permite um método de ligação seletiva a placas de amiloide mas não a emaranhados neurofibrilares *in vivo* de tecido cerebral que contenha ambos através da administração de uma quantidade efetiva de um composto da presente invenção de tal forma que a concentração sanguínea do composto administrado permaneça abaixo de 10 nM *in vivo*.

Outra concretização refere-se à utilização de um composto de Fórmula I para a preparação de um medicamento para o diagnóstico da doença de Alzheimer num paciente em sua necessidade.

Outras concretizações da invenção serão óbvias para aqueles peritos na técnica a partir da consideração da especificação e prática da invenção descritas aqui. Pretende-se que a especificação seja considerada apenas como exemplo, com o âmbito e o espírito da invenção sendo indicados nas reivindicações que se seguem. Adicionalmente, todos os documentos a que se faz referência aqui são expressamente incorporados por citação.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra as estruturas de uma Tioflavina S e de uma Tioflavina T;

A Figura 2 mostra as estruturas de dois derivados de Tioflavina de acordo com a invenção;

A Figura 3 mostra quatro secções em série de córtex frontal cerebral corado por fluorescência de um paciente de AD;

A Figura 4 mostra locais propostos de ligação de Crisamina G e Tioflavina T em fibrilos em placa β ;

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

A Figura 6 mostra a radioatividade ao longo do tempo no córtex frontal de babuínos injetados com BTA-1, 6-MeO-BTA-1 e 6-MeBTA-1 marcados; e

A Figura 7 mostra uma imagem de tomografia por emissão de positrão transversa de dois níveis de cérebro de babuíno após a injeção de [N-metil- ^{11}C]BTA-1.

A Figura 8 mostra secções *post-mortem* de cérebro humano e de murganho transgénico marcadas com um derivado da presente invenção (BTA-1).

A Figura 9 mostra a marcação *in vivo* de placas amiloides e amiloide vascular com um derivado da presente invenção (BTA-1) em murganhos transgénicos vivos observados por microscopia multifotónica.

A Figura 10A mostra uma comparação de dados de ligação de [^3H] a homogenados de um cérebro de controlo, cérebro com doença de Alzheimer e cérebro com demência diferente da doença de Alzheimer.

A Figura 10B mostra a razão de dados a partir de uma comparação do córtex frontal e cerebelo para cada cérebro

individual num cérebro de controlo, cérebro com doença de Alzheimer e cérebro com demência diferente da doença de Alzheimer.

As Figuras 11A-F mostram a especificidade dos compostos da invenção para placas de amiloide em relação a emaranhados neurofibrilares, em que A e B mostram o córtex entorinal, C e D mostram o córtex frontal e E e F mostram o cerebelo de um cérebro de controlo em estágio II de Braak.

A Figura 12 é uma tabela que exhibe a ligação de [³H]BTA-1 a áreas específicas de um Cérebro de Controlo Braak II e um Cérebro AD Braak VI (AD02).

A Figura 13 mostra uma representação de Scatchard da ligação de [³H]BTA-1 a homogenados de substância cinzenta frontal de AD e destacando a substância branca do mesmo cérebro com AD.

A Figura 14 mostra um auto-radiograma e uma micrografia fluorescente que exhibe a sobreposição da ligação de [I-125]6-OH-BTA-0-3'-I a placas e amiloide cerebrovascular e depósitos de amiloide marcados pelo corante de amiloide, X-34. Esquerda: auto-radiograma da ligação de [I-125]6-OH-BTA-0-3'-I a tecido recentemente congelado a partir de cérebro com AD *post-mortem*. As áreas escuras mostram a localização do [I-125]6-OH-BTA-0-3'-I e estão destacadas a vermelho. A estrutura do [I-125]6-OH-BTA-0-3'-I é mostrada na parte de baixo à esquerda. Direita: O mesmo fragmento de tecido de cérebro com AD *post-mortem* marcado com o corante de amiloide, X-34. As áreas claras indicam placas de amiloide e amiloide cerebrovascular. Centro: Sobreposição do destaque em vermelho do auto-radiograma da esquerda com a marcação de X-34 mostrando uma correspondência de aproximadamente 1:1 de ligação de [I-125]6-OH-BTA-0-3'-I às

placas e ao amiloide cérebro-vascular. A barra representa 1000 μm .

A Figura 15 mostra as curvas de atividade - tempo da penetração e libertação de radioatividade de três regiões de cérebro de babuíno após a injeção do Composto B(2-(3-[^{18}F]-fluoro-4-metilamino-fenil)-benzotiazol-6-ol).

A Figura 16 mostra as curvas de atividade - tempo da penetração e libertação de radioatividade a partir do cerebelo de babuíno (região de referência destituída de ligação específica) após a injeção dos radioligandos [carbonil- ^{11}C]WAY100635, [^{11}C](+)-McN5652 e [^{18}F]altanserina em comparação com o comportamento do composto B.

A Figura 17 mostra as curvas de atividade - tempo da penetração e libertação de radioatividade a partir de três regiões de cérebro de babuíno após a injeção do composto C (2-[4-(3- ^{18}F -fluoro-propilamino)-fenil]benzotiazol-6-ol).

A Figura 18 mostra as curvas de atividade - tempo da penetração e libertação de radioatividade a partir do cerebelo de babuíno (região de referência destituída de ligação específica) após a injeção dos radioligandos [carbonil- ^{11}C]WAY100635, [^{11}C](+)-McN5652 e [^{18}F]altanserina em comparação com o comportamento do composto C.

DESCRIÇÃO DETALHADA

A presente invenção explora a capacidade dos compostos de Tioflavina e seus derivados radiomarcados para atravessar a barreira hematoencefálica *in vivo* e de se ligarem a $\text{A}\beta$ depositada em placas neuríticas (mas não difusas), a $\text{A}\beta$ depositada em amiloide cérebro-vascular, e ao amiloide

consistindo na proteína depositada em ENF. Os presentes compostos são derivados de amina não quaternária de Tioflavina S e T que são conhecidas como marcadoras de amiloide em secções de tecido e que se ligam a A β sintética *in vitro*. Kelenyi, J. Histochem. Cytochem. 15:172 (1967); Burns *et al.*, J. Path. Bact. 94:337 (1967); Guntern *et al.*, Experientia 48:8 (1992); LeVine, Meth. Enzymol. 309:274 (1999).

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

Modelação Molecular

A modelação molecular foi realizada, utilizando o programa de computador para modelação Alchemy2000, um produto da Tripost, Inc. (St. Louis, MO), para gerar as cadeias peptídicas de A β na conformação em placa beta anti-paralela. Kirschner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:503 (1986). Os peptídeos de amiloide foram colocados em ansas em gancho, ver Hilbich *et al.*, J. Mol. Biol. 218:149 (1991), e foram utilizados sem refinação estrutural adicional. Os peptídeos A β foram alinhados de tal forma que as cadeias alternadas foram espaçadas de 4,76 Å entre si, característica dos fibrilos em placa beta. Kirschner, *supra*. Os derivados de tioflavina T foram minimizados em energia e alinhados com o modelo de fibrilo para maximizar o contacto com Asp-23/Gln-15/His-13 de A β (1-42).

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

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

A sequência de aminoácidos para A β (1-40) é como se segue:

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

"Alquilo" refere-se a um radical hidrocarboneto saturado de cadeia linear ou ramificada. Os exemplos incluem, sem limitação, metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, *tert*-butilo, *n*-pentilo e *n*-hexilo.

"Alcenilo" refere-se a um radical hidrocarboneto insaturado de cadeia linear ou ramificada compreendendo pelo menos uma ligação dupla carbono-carbono. Os exemplos incluem, sem

limitação, etenilo, propenilo, *iso*-propenilo, butenilo, *iso*-butenilo, tert-butenilo, *n*-pentenilo e *n*-hexenilo.

"Alcinilo" refere-se a um radical hidrocarboneto insaturado de cadeia linear ou ramificada compreendendo pelo menos uma ligação tripla carbono-carbono. Os exemplos incluem, sem limitação, etinilo, propinilo, *iso*-propinilo, butinilo, *iso*-butinilo, *tert*-butinilo, pentinilo e *n*-hexinilo.

"Alcoxi" refere-se a um grupo alquilo ligado através de uma ligação oxigénio. "Halogeno" refere-se a um radical fluoro, cloro, bromo ou iodo.

"Quantidade efetiva" refere-se à quantidade requerida para produzir um efeito desejado. Os exemplos de uma "quantidade efetiva" incluem quantidades que possibilitam a imagiologia de depósito(s) de amiloide *in vivo*, que produzem níveis de toxicidade e de biodisponibilidade aceitáveis para uso farmacêutico, e/ou previnem a degeneração celular e a toxicidade associadas à formação de fibrilo.

"Veículo farmacêuticamente aceitável" refere-se a um material, composição ou veículo farmacêuticamente aceitável, tal como um enchimento, diluente, excipiente ou solvente líquido ou sólido que encapsula o material, envolvido no transporte do composto em questão a partir de um órgão, ou parte do corpo, para outro órgão ou parte do corpo. Cada veículo é "aceitável" no sentido de ser compatível com os outros componentes da formulação e adequado para utilizar com o paciente. Os exemplos de materiais que podem servir como veículo farmacêuticamente aceitável incluem sem limitação: (1) açúcares, tais como lactose, glicose e sacarose; (2) amidos, tais como amido de milho e amido de batata; (3) celulose e seus derivados,

tais como carboximetilcelulose sódica, etilcelulose e acetato de celulose; (4) tragacanta em pó; (5) malte; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes tais como manteiga de cacau e ceras de supositório; (9) óleos, tais como óleo de amendoim, óleo de algodão, óleo de girassol, óleo de sésamo, azeite, óleo de milho e óleo de soja; (10) glicóis, tais como propilenoglicol; (11) polióis, tais como glicerina, sorbitol, manitol e polietilenoglicol; (12) ésteres, tais como oleato de etilo e laureato de etilo; (13) ágar; (14) agentes tampão, tais como hidróxido de magnésio e hidróxido de alumínio; (15) ácido algínico; (16) água isenta de pirogênio; (17) solução salina isotónica; (18) solução de Ringer; (19) álcool etílico; (20) soluções com pH tamponado; (21) poliésteres, policarbonatos e/ou polianidridos; e (22) outras substâncias não tóxicas compatíveis empregues em formulações farmacêuticas conforme identificadas, por exemplo, em REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 15th ed. (Mack Publishing Co., 1975), nas páginas 1405-1412 e 1461-1487, e THE NATIONAL FORMULARY XIV, 14th ed. (American Pharmaceutical Association, 1975).

"Sal farmacêuticamente aceitável" refere-se a um sal de ácido ou de base do composto da invenção, que possui a atividade farmacológica desejada e não é biologicamente indesejável nem de qualquer outra forma. O sal pode ser formado com ácidos que incluem sem limitação, acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, benzenossulfonato, butirato bissulfato, citrato, canforato, canforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanossulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemissulfato, heptanoato, hexanoato, hidrocloreto, hidrobrometo, hidriodeto, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanossulfonato, 2-naftalenossulfonato, nicotinato, oxalato, tiocianato, tosilato e undecanoato. Os exemplos de um sal de base incluem sem limitação, sais de

amónio, sais de metais alcalinos tais como sais de sódio e potássio, sais de metais alcalino-terrosos tais como sais de cálcio e magnésio, sais com bases orgânicas tais como sais de diciclohexilamina, *N*-metil-*D*-glucamina, e sais com aminoácidos tais como arginina e lisina. Em algumas concretizações, os grupos básicos que contêm nitrogénio podem ser quaternizados com agentes incluindo halogenetos de alquilo inferiores 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; e halogenetos de aralquilo tais como brometos de fenetilo.

"Pró-fármaco" refere-se a um derivado do composto da invenção que sofre biotransformação, tal como metabolismo, antes de exibir o(s) seu(s) efeito(s) farmacológico(s). O pró-fármaco é formulado com o(s) objetivo(s) de melhorar a estabilidade química, melhorar a aceitação e a condescendência do paciente, melhorar a biodisponibilidade, prolongar a duração da ação, aumentar a seletividade para o órgão, melhorar a formulação (e.g., melhorar a hidrossolubilidade) e/ou reduzir os efeitos laterais (e.g., toxicidade). Um pró-fármaco pode ser facilmente preparado a partir do composto da invenção utilizando métodos convencionais, tais como aqueles descritos em BURGER'S MEDICINAL CHEMISTRY AND DRUG CHEMISTRY, 5th ed., vol. 1 (1995), páginas 172-178 e 949-982.

"Animal" refere-se a um organismo vivo possuindo sensação e o poder de movimento voluntário, e que requer para a sua existência oxigénio e alimento orgânico. Os exemplos incluem, sem limitação, membros das espécies humana, equina, suína, bovina, murina, canina e felina. No caso de

um ser humano, um "animal" pode também ser referido como um "paciente".

"Mamífero" refere-se a um animal vertebrado de sangue quente.

"Tratamento" refere-se a:

(i) prevenção da ocorrência de uma doença, patologia ou estado num animal que poderá estar predisposto à doença, patologia ou estado, mas que não foi ainda diagnosticado como a apresentando;

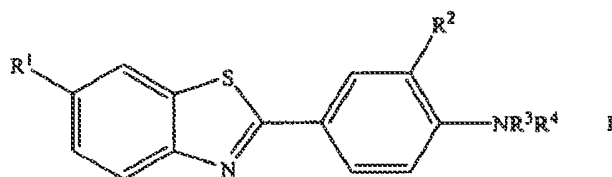
(ii) inibição da doença, patologia ou estado, i.e., interrupção de seu desenvolvimento; e/ou

(iii) alívio da doença, patologia ou estado, i.e., provocar a regressão da doença, patologia ou e/ou estado.

A não ser que o contexto claramente refira o contrário, as definições de termos no singular podem ser extrapoladas para se aplicarem às suas contrapartes no plural conforme aparecem no pedido; da mesma forma, as definições dos termos no plural podem ser extrapoladas para serem aplicadas às suas contrapartes no singular conforme aparecem no pedido.

COMPOSTOS

Esta invenção providencia um composto radiomarcado de fórmula I



ou um sal, hidrato, solvato ou pró-fármaco farmacologicamente aceitável do composto, em que:

R^1 é hidrogénio, $-OH$, $-NO_2$, $-CN$, $-COOR$, $-OCH_2OR$, C_1-C_6 alquilo, C_2-C_6 alcenilo, C_2-C_6 alcinilo, C_1-C_6 alcoxi ou halogeno, em que um ou mais dos átomos de R^1 poderá ser um átomo radiomarcado;

R é C_1-C_6 alquilo, em que um ou mais dos átomos de carbono poderão ser um átomo radiomarcado;

R^2 é um radiofluoro;

R^3 é hidrogénio, C_1-C_6 alquilo, C_2-C_6 alcenilo ou C_2-C_6 alcinilo; e

R^4 é hidrogénio, C_1-C_6 alquilo, C_2-C_6 alcenilo ou C_2-C_6 alcinilo.

Exemplos de um carbono radioativo incluem, sem limitação, ^{11}C , ^{13}C e ^{14}C . Numa concretização, R^1 é $-OH$.

Como indicado R^2 é um radiofluoro. Como um exemplo dos compostos, R^1 é $-OH$ ou C_1-C_6 alcoxi; R^2 é ^{18}F ; e R^3 e R^4 são independentemente hidrogénio ou C_1-C_6 alquilo. Como outro exemplo, R^1 é $-OH$; R^3 é hidrogénio; e R^4 é $-CH_3$.

Ainda noutra concretização, os compostos da invenção ligam-se seletivamente a amiloide, particularmente a $A\beta$ sintética *in vitro* ou a $A\beta$ depositada em placas neuríticas; atravessam uma barreira hematoencefálica não comprometida *in vivo*; são biodisponíveis; e/ou não são tóxicos.

MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO

Os compostos da invenção podem ser utilizados para determinar a presença, localização e/ou quantidade de um ou mais depósitos de amiloide num órgão ou área corporal, incluindo o cérebro, de um animal. O(s) depósito(s) de amiloide incluem, sem limitação, depósitos de A β . Ao se permitir que a sequência da deposição de amiloide no tempo seja seguida, o composto da invenção poderá adicionalmente ser utilizado para correlacionar a deposição de amiloide com o início de sintomas clínicos associados à doença, patologia ou estado. Os compostos da invenção poderão em última análise serem utilizados para, e para diagnosticar, uma doença, patologia ou estado caracterizado por deposição de amiloide, tal como AD, AD familiar, síndrome de Down, amiloidose, diabetes *mellitus* Tipo II, e homocigotos para o alelo E4 da apolipoproteína.

O método desta invenção determina a presença e localização de depósitos de amiloide num órgão ou área corporal, de preferência o cérebro, de um paciente. O presente método compreende a administração de uma quantidade detetável de uma composição farmacêutica contendo um composto que se liga a amiloide da presente invenção designado por "composto detetável" ou um seu sal solúvel em água farmacêuticamente aceitável. Uma "quantidade detetável" significa que a quantidade do composto detetável que é administrada é suficiente para possibilitar a detecção de ligação do composto a amiloide. Uma "quantidade efetiva para imagiologia" significa que a quantidade do composto detetável que é administrada é suficiente para possibilitar a imagiologia da ligação do composto a amiloide.

A invenção emprega sondas de amiloide que, em conjunção com técnicas de neuroimagem não invasivas, tais como espectroscopia (MRS) ou imagiologia (MRI) de ressonância magnética, ou imagiologia gama tal como tomografia por emissão de positrão (PET) ou tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT), são utilizadas para quantificar a deposição de amiloide *in vivo*. O termo "imagiologia *in vivo*" refere-se a qualquer método que permita a deteção de um derivado de tioflavina marcado conforme descrito aqui. Para imagiologia gama, a radiação emitida a partir do órgão ou área sendo examinada é medida e expressa quer como ligação total ou como uma razão na qual a ligação total num tecido é normalizada (por exemplo, dividida por) em relação à ligação total noutro tecido do mesmo indivíduo durante o mesmo procedimento de imagiologia *in vivo*. A ligação total *in vivo* é definida como o sinal completo detetado num tecido por uma técnica de imagiologia *in vivo* sem a necessidade de correção por uma segunda injeção de uma quantidade idêntica de composto marcado juntamente com um grande excesso de composto não marcado, mas de outra forma quimicamente idêntico. Um "indivíduo" é um mamífero, preferencialmente um ser humano e, com mais preferencialmente, um ser humano sob suspeita de apresentar demência.

Para os propósitos de imagiologia *in vivo*, o tipo de instrumento de deteção disponível é um fator preponderante na seleção de um dado marcador. Por exemplo, os isótopos radioativos e ^{19}F são particularmente adequados para a imagiologia *in vivo* nos métodos da presente invenção. O tipo de instrumento utilizado irá orientar a seleção do radionuclídeo ou isótopo estável. Por exemplo, o radionuclídeo escolhido tem que apresentar um tipo de decaimento detetável por um dado tipo de instrumento. Outra

consideração refere-se à meia-vida do radionuclídeo. A meia-vida deve ser suficientemente longa de tal forma que ainda seja detetável no tempo da absorção máxima pelo alvo, mas curta o suficiente de modo que o hospedeiro não seja submetido a radiação deletéria. Os compostos radiomarcados da invenção podem ser detetados utilizando imagiologia gama, em que a irradiação gama emitida com comprimento de onda apropriado é detetada. Os métodos de imagiologia gama incluem, mas não estão limitados a, SPECT e PET. Preferencialmente, para deteção por SPECT, o radiomarcador escolhido não apresenta uma emissão particulada, mas irá produzir um grande número de fótons na gama de 140-200 keV. Para a deteção por PET, o radiomarcador será um radionuclídeo emissor de positrão tal como ^{18}F que se irá anular para formar dois raios gama de 511 keV que serão detetados pela câmara PET.

Na presente invenção, os compostos que se ligam a amiloide/sondas são obtidos para serem úteis para a imagiologia *in vivo* e quantificação da deposição de amiloide. Estes compostos são para serem utilizados em conjunção com técnicas de neuroimagiologia não invasivas tais como espectroscopia (MRS) ou imagiologia de ressonância magnética (MRI), tomografia por emissão de positrão (PET) e tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT). De acordo com esta invenção, os derivados de tioflavina podem ser marcados com ^{19}F ou ^{13}C para MRS/MRI por técnicas gerais de química orgânica conhecidas na técnica. Por exemplo, ver ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY; REACTION, MECHANISMS, AND STRUCTURE, 3rd ed. (1985), cujo conteúdo é aqui incorporado por citação. Os derivados de tioflavina podem também ser radiomarcados com ^{18}F , ^{11}C , ^{75}Br , ou ^{76}Br para PET por técnicas bem conhecidas na técnica e são descritas por Fowler, J. e Wolf, A. em POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY AND AUTORADIOGRAPHY 391-450

(Raven Press, 1986), cujo conteúdo é aqui incorporado por citação. Os derivados de tioflavina podem ser também radiomarcados com ^{123}I para SPECT por qualquer uma das várias técnicas conhecidas na técnica. Ver, e.g., Kulkarni, *Int. J. Rad. Appl. & Inst. (Parte B)* 18:647 (1991), cujo conteúdo é incorporado aqui por citação. Adicionalmente, os derivados de tioflavina poderão também ser marcados com qualquer isótopo de iodo radioativo adequado, tal como, mas não limitado a, ^{131}I , ^{125}I ou ^{123}I , por iodação de um derivado amino diazotado diretamente através de um iodeto de diazônio, ver Greenbaum, *F. Am. J. Pharm.* 108:17 (1936), ou por conversão de uma amina diazotada instável no triazeno estável, ou por conversão de um precursor halogenado não radioativo num derivado de tri-álquilestanho estável que pode então ser convertido no composto de iodo por vários métodos bem conhecidos na técnica. Ver, Satyamurthy e Barrio, *J. Org. Chem.* 48:4394 (1983), Goodman *et al.*, *J. Org. Chem.* 49:2322 (1984), e Mathis *et al.*, *J. Labell. Comp. and Radiopharm.* 1994:905; Chumpradit *et al.*, *J. Med. Chem.* 34:877(1991); Zhuang *et al.*, *J. Med. Chem.* 37:1406 (1994); Chumpradit *et al.*, *J. Med. Chem.* 37: 4245 (1994). Por exemplo, um derivado estável de triazeno ou de tri-álquil estanho de tioflavina ou seus análogos é sujeito a reação com um agente de homogeneização contendo ^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{76}Br , ^{75}Br , ^{18}F ou ^{19}F . Desta forma, os derivados de tri-álquil estanho de tioflavina e seus análogos são novos precursores úteis para a síntese de muitos dos compostos radiomarcados da presente invenção. Como tal, estes derivados tri-álquil estanho são uma concretização desta invenção.

Os derivados de tioflavina poderão também ser radiomarcados com radiomarcadores metálicos conhecidos, tais como Tecnécio 99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$). A modificação dos substituintes para

introduzir ligandos que se liguem a tais iões metálicos pode ser realizada sem experimentação excessiva por um perito comum na técnica de radiomarcção. O derivado de tioflavina radiomarcado com metal pode então ser utilizado para detetar os depósitos de amiloide. A preparação de derivados radiomarcados de ^{99m}Tc é bem conhecida na técnica. Ver, por exemplo, Zhuang *et al.*, "Neutral and stereospecific Tc-99m complexes: [99mTc] N-benzyl-3,4-di-(N-2-mercaptoetil)-amino-pyrrolidines (P-BAT)" *Nuclear Medicine & Biology* 26(2):217-24, (1999); Oya *et al.*, "Small and neutral Tc(v)O₂ BAT, bisaminoethanethiol (N₂S₂) complexes for developing new brain imaging agents" *Nuclear Medicine & Biology* 25(2): 135-40, (1998); e Hom *et al.*, "Technetium-99m-labeled receptor-specific small-molecule radiopharmaceuticals: recent developments and encouraging results" *Nuclear Medicine & Biology* 24(6):485-98, (1997).

Os métodos da presente invenção poderão utilizar isótopos detetáveis por espectroscopia por ressonância magnética nuclear com o propósito de imagiologia e espectroscopia *in vivo*. Os elementos particularmente úteis em espectroscopia por ressonância magnética incluem ^{19}F e ^{13}C .

Os radioisótopos adequados para os propósitos desta invenção incluem emissores beta, emissores gama, emissores de positrões, e emissores de raios-X. Estes radioisótopos incluem ^{131}I , ^{123}I , ^{18}F , ^{11}C , ^{75}Br , e ^{76}Br . Os isótopos estáveis adequados para utilizar em Imagiologia por Ressonância Magnética (MRI) ou Espectroscopia por Ressonância Magnética (MRS), de acordo com esta invenção, incluem ^{19}F e ^{13}C . Os radioisótopos adequados para quantificação *in vitro* de amiloide em homogenados de biópsia ou tecido *post-mortem* incluem ^{125}I , ^{14}C , e ^3H . Os radiomarcadores preferidos são ^{11}C ou ^{18}F para utilizar em imagiologia PET *in vivo*, ^{123}I

para uso em imagiologia SPCT, ^{19}F para MRS/MRI, e ^3H ou ^{14}C para estudos *in vitro*. No entanto, pode ser utilizado qualquer método convencional para a visualizar sondas de diagnóstico de acordo com esta invenção.

De acordo com o aspeto da invenção que se relaciona com um método de detetar depósitos de amiloide em tecido de biópsia ou *post-mortem*, o método envolve incubar de tecido fixado em formalina com uma solução de um composto de tioflavina que se liga a amiloide da presente invenção. Preferencialmente, a solução é etanol 25-100%, (sendo o restante água), saturada com um composto de tioflavina ligante de amiloide de acordo com a presente invenção. Através de incubação, o composto marca ou rotula o depósito de amiloide no tecido e o depósito marcado ou rotulado pode ser detetado ou visualizado por qualquer método padrão. Tal deteção inclui técnicas de microscopia tais como microscopia de campo claro, de fluorescência, a laser confocal e de polarização cruzada.

O método de quantificação da quantidade de amiloide e tecido de biópsia ou *post-mortem* envolve a incubação de um derivado marcado de tioflavina de acordo com a presente invenção, ou um seu sal solúvel em água não tóxico. O tecido é obtido e homogeneizado por métodos bem conhecidos na técnica. O marcador preferido é um radiomarcado, embora outros marcadores tais como enzimas, compostos quimioluminescentes e imunofluorescentes sejam bem conhecidos de um perito na técnica. O radiomarcador preferido é ^{121}I , ^{14}C ou ^3H que está contido num substituinte de um dos compostos substituídos das presentes fórmulas descritas aqui. O tecido contendo os depósitos de amiloide irá ligar-se aos derivados marcados dos compostos de tioflavina que se ligam a amiloide da presente invenção. O tecido ligado é então separado do tecido não ligado por

qualquer mecanismo conhecido de um perito na técnica, tal como filtração. O tecido ligado pode então ser quantificado através de quaisquer meios conhecidos de um perito na técnica. As unidades de derivado de tioflavina radiomarcado ligado ao tecido são então convertidas em unidades de microgramas de amiloide por 100 mg de tecido por comparação com uma curva padrão gerada por incubação de quantidades conhecidas de amiloide com o derivado de tioflavina radiomarcado.

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

A capacidade dos presentes compostos para se ligarem especificamente a emaranhados neurofibrilares em relação a placas de amiloide é particularmente verdadeira a concentrações inferiores a 10 nM, o que inclui a gama de concentração *in vivo* de vestígios radiológicos de PET. A estas concentrações baixas, que contêm apenas emaranhados e não contêm placas, não ocorre ligação significativa quando comparada com tecido cerebral de controlo não contendo placas ou emaranhados. No entanto, a incubação dos homogenados de tecido cerebral que contêm principalmente placas e alguns emaranhados com compostos radiomarcados da fórmula descrita aqui, resulta num aumento significativo na ligação quando comparada com tecido cerebral de controlo sem placas ou emaranhados. Este dado sugere a vantagem de que estes compostos são específicos para depósitos de A β a concentrações inferiores a 10 nM. Estas baixas concentrações são detetáveis em estudos PET, tornando possível a deteção por PET utilizando compostos radiomarcados das fórmulas descritas aqui que são específicos para depósitos de A β . A utilização de tais compostos permite a deteção por PET em depósitos de A β tais como aqueles encontrados em placas e amiloide cerebrovascular. Uma vez que foi reportado que os níveis de A β no córtex frontal são aumentados antes da formação de emaranhados, isto sugere que os compostos radiomarcados da presente invenção, utilizados como pesquisadores por PET, serão específicos para as alterações iniciais em córtex de AD. Naslund *et al.*, JAMA 283:1571 (2000).

Método de Detetar Depósitos de Amiloide *In Vivo*

Esta invenção providencia adicionalmente um método para detetar depósito(s) de amiloide *in vivo*, compreendendo:

- (i) administração a um animal de uma quantidade efetiva de um composto da invenção, em que o composto se irá ligar a qualquer (quaisquer) depósito(s) de amiloide no animal; e
- (ii) deteção da ligação do composto ao(s) depósito(s) de amiloide no animal.

Após ter passado um tempo suficiente para o composto se ligar ao(s) depósito(s) de amiloide, por exemplo, 30 minutos a 48 horas após a administração, a ligação poderá ser detetada por quaisquer meios conhecidos na técnica. Os exemplos de meios de deteção incluem, sem limitação, ensaios (tais como ensaios imunométricos, calorimétricos, densiométricos, espetrográficos e cromatográficos), técnicas de neuroimagiologia não invasiva (tais como espectroscopia por ressonância magnética (MRS), imagiologia por ressonância magnética (MRI), e técnicas de imagiologia gama tais como tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) e tomografia por emissão de positrão (PET)). Para a imagiologia gama, a radiação emitida a partir do órgão ou área sendo examinada é medida e expressa quer como ligação total ou como uma razão na qual a ligação total num tecido é normalizada (por exemplo, dividida) relativamente à ligação total noutro tecido do mesmo indivíduo durante o mesmo procedimento de imagiologia *in vivo*. A ligação total *in vivo* é definida como sendo o sinal detetado completo num tecido por uma técnica de imagiologia *in vivo* sem a necessidade de correção por uma segunda injeção de uma quantidade idêntica do composto marcado juntamente com um grande excesso de composto não marcado, mas de outra forma quimicamente idêntico.

O tipo de instrumento de deteção disponível pode ser um fator na seleção do isótopo radioativo de halogéneo ou de carbono. Por exemplo, o radioisótopo selecionado deve

apresentar um tipo de decaimento que seja detetável por um dado instrumento. Outra consideração relaciona-se com a meia-vida do radioisótopo. A meia-vida deve ser suficientemente longa para que o radioisótopo ainda seja detetável ao tempo da absorção máxima pelo alvo, mas curta o suficiente de tal forma que o hospedeiro não seja submetido a radiação deletéria. Para a deteção por SPECT, o radioisótopo selecionado pode não apresentar emissão particulada, mas pode produzir um grande número de fótons na gama de 140-200 keV. Para a deteção por PET, o radioisótopo selecionado pode ser um radioisótopo emissor de positrão, que se anula para formar dois raios gama de 511 keV, detetáveis por uma câmara PET.

Os radioisótopos úteis incluem, sem limitação: ^{125}I , ^{14}C , e ^3H para quantificação de amiloide *in vitro* em homogenados de tecido de biópsia ou *post-mortem*; ^{11}C e ^{18}F para imagiologia PET *in vivo*; ^{123}I para imagiologia SPECT; ^{18}F para MRS/MRI; ^3H ou ^{14}C para estudos *in vitro*; e ^{18}F e ^{13}C para espectroscopia por ressonância magnética. Numa concretização, a deteção é realizada por imagiologia gama, imagiologia por ressonância magnética ou espectroscopia por ressonância magnética. Noutra concretização, a imagiologia gama é PET ou SPECT.

O composto da invenção pode ser administrado por quaisquer meios conhecidos d um perito comum na técnica. Por exemplo, a administração ao animal pode ser local ou sistémica e obtida oralmente, parentericamente, por inalação de aerossol, topicamente, rectalmente, nasalmente, bucalmente, vaginalmente, ou através de um reservatório implantado. O termo "parenteral" conforme utilizado aqui inclui técnicas de injeção e infusão subcutânea, intravenosa, intra-arterial, intramuscular, intraperitoneal, intratecal,

intraventricular, intracisternal, intracraniana, e intraóssea. O protocolo de administração exato irá variar dependendo de vários fatores incluindo a idade, peso corporal, saúde geral, sexo e dieta do paciente; a determinação dos procedimentos de administração específicos será de rotina para um perito comum na técnica.

Os níveis de dosagem da ordem de cerca de 0,001 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ até cerca de 10000 $\text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$ de um composto da invenção são úteis para os métodos da invenção. Numa concretização, o nível de dosagem é de cerca de 0,001 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ até cerca de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$. Noutra concretização, o nível de dosagem é de cerca de 0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ a cerca de 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$. Ainda noutra concretização, o nível de dosagem é de cerca de 0,1 $\text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$ a cerca de 100 $\text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$.

O nível de dosagem específico para qualquer paciente em particular irá variar dependendo de vários fatores, incluindo a atividade e a possível toxicidade do composto específico empregue; da idade, peso corporal, saúde geral, sexo e dieta do paciente; do tempo de administração; da taxa de excreção; da combinação de fármacos; e da forma de administração. Tipicamente, resultados de dosagem - efeito *in vitro* providenciam orientação útil para as doses adequadas para a administração ao paciente. Os estudos em modelos animais são também úteis. As considerações para se determinar os níveis de dosagem apropriados são bem conhecidas na técnica e da competência de clínico comum.

Qualquer regime de administração conhecido para regular o tempo e a sequência da libertação do fármaco pode ser utilizado e repetido conforme necessário para se efetuar o tratamento com os métodos da invenção. O regime poderá

incluir o pré-tratamento e/ou coadministração com agente(s) terapêutico(s) adicional(is).

Numa concretização, os compostos da invenção são administrados a um animal que está sob suspeita de apresentar ou sob o risco de desenvolver uma doença, patologia ou estado caracterizado pela deposição de amiloide. Por exemplo, o animal pode ser um ser humano idoso.

Noutra concretização, os compostos da invenção ligam-se a A β com uma constante de dissociação (K_D) de cerca de 0,0001 μ M a cerca de 10,0 μ M quando medida pela ligação a peptídeo A β sintético ou tecido cerebral com AD.

Método para Detetar Depósito(s) de Amiloide *In Vitro*

Esta invenção providencia adicionalmente um método para detetar depósito(s) de amiloide *in vitro* compreendendo:

- (i) o contacto de um tecido corporal com uma quantidade efetiva de um composto da invenção, em que o composto se liga a quaisquer depósito(s) de amiloide no tecido; e
- (ii) deteção da ligação do composto ao(s) depósito(s) de amiloide no tecido.

A ligação pode ser detetada por quaisquer meios conhecidos na técnica. Os exemplos de meios de deteção incluem, sem limitação, técnicas de microscopia, tais como microscopia de campo claro, de fluorescência, a laser confocal e de polarização cruzada.

Numa concretização, o tecido é tecido de biópsia ou tecido *post-mortem* que é fixado em formalina ou recentemente congelado. Noutra concretização, o tecido é homogeneizado. Ainda noutra concretização, o composto da invenção está numa solução que compreende adicionalmente 25-99% de etanol, sendo o restante da solução água. Ainda noutra concretização, a solução compreende adicionalmente 0-50% de etanol e de 0,0001 a 100 μM do composto. Ainda noutra concretização, o método compreende adicionalmente (iii) a separação do(s) depósito(s) de amiloide ligado(s) ao composto do tecido; e (iv) a quantificação do(s) depósito(s) de amiloide ligado(s) ao composto da invenção. O(s) depósito(s) de amiloide ligado(s) pode(m) ser separado(s) do tecido por qualquer meio conhecido na técnica, tal como a filtração. A quantidade de depósito(s) de amiloide ligado(s) pode ser convertida em unidades de μg de depósito(s) de amiloide por 100 mg de tecido por comparação com uma curva padrão gerada por incubação de quantidades conhecidas de amiloide com o composto da invenção ou seu sal, hidrato, solvato ou pro-fármaco farmacologicamente aceitável.

Método para Distinguir o Cérebro com Doença de Alzheimer do Cérebro Normal

Esta invenção providencia adicionalmente um método para distinguir um cérebro doente de Alzheimer de um cérebro normal compreendendo:

- (i) obtenção de tecidos a partir de (a) cerebelo e (b) de outra área do mesmo cérebro, de um animal normal e de um animal sob suspeita de apresentar doença de Alzheimer;
- (ii) contacto dos tecidos com um composto da invenção;

- (iii) quantificação da amiloide ligada ao composto;
- (iv) cálculo da razão da quantidade de amiloide na área do cérebro diferente do cerebelo para a quantidade de amiloide no cerebelo;
- (v) comparação da razão para um animal normal com a razão para um animal sob suspeita de apresentar a doença de Alzheimer.

Pode ser realizado um diagnóstico da doença de Alzheimer se a razão para um animal sob suspeita de apresentar a doença de Alzheimer for, por exemplo, acima de 90% da razão para um animal normal. Para este método, um animal "normal" é um que não sofre da doença de Alzheimer.

COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

Esta invenção providencia adicionalmente uma composição farmacêutica compreendendo:

- (i) uma quantidade efetiva de pelo menos um composto da invenção; e
- (ii) um veículo farmacêuticamente aceitável.

A composição poderá compreender um ou mais componentes farmacêuticamente aceitáveis, incluindo, sem limitação, um ou mais agentes de humidificação, agentes tampão, agentes de suspensão, agente(s) de lubrificação, agente(s) emulsionante(s), absorvente(s), conservante(s), tensioativo(s), corante(s), aromatizante(s), adoçante(s) e terapêutico(s).

A composição poderá ser formulada na forma sólida, líquida, de gel ou suspensão para: (1) administração oral como, por exemplo, um produto para embeber (solução ou suspensão aquosa ou não aquosa), comprimido (por exemplo, direcionado

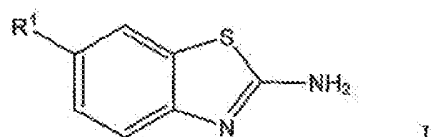
para absorção bucal, sublingual ou sistêmica), bolo, pó, grânulo, pasta para aplicação na língua, cápsula de gelatina dura, cápsula de gelatina mole, pulverizador bucal, emulsão e micro-emulsão; (2) administração parentérica por injeção subcutânea, intramuscular, intravenosa ou epidural como, por exemplo, uma solução estéril, suspensão ou formulação de libertação retardada; (3) aplicação tópica como, por exemplo, um creme, unguento, emplastro de libertação controlada ou aerossol aplicado à pele; (4) administração intra-vaginal ou intra-rectal como, por exemplo, um óvulo, creme ou espuma; (5) administração sublingual; (6) administração ocular; (7) administração transdérmica; ou (8) administração nasal.

Numa concretização, a composição é formulada para administração intravenosa e o veículo inclui um fluido e/ou um repositores nutricional. Noutra concretização, a composição é capaz de se ligar especificamente a amiloide *in vivo*, é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, não é tóxica nos níveis de dosagem apropriados e/ou tem uma duração de efeito satisfatória. Ainda noutra concretização, a composição compreende cerca de 10 mg de albumina de soro humano e de cerca de 0,5 a 500 mg do composto da invenção por mililitro de tampão fosfato contendo NaCl.

Os exemplos seguintes são providenciados para ilustrar a presente invenção. Deve ser entendido, contudo, que a invenção não está limitada às condições ou detalhes específicos descritos nos exemplos. Em toda a especificação, quaisquer e todas as referências a um documento disponível publicamente, incluindo as patentes U. S., são incorporadas especificamente neste pedido de patente por citação.

EXEMPLOS

Todos os reagentes utilizados na síntese foram adquiridos a partir da Aldrich Chemical Company e utilizados sem purificação adicional, salvo indicação em contrário. Os pontos de fusão foram determinados num Mel-TEMP II e não foram corrigidos. Os espectros de ^1H RMN de todos os compostos foram medidos num Bruker 300 utilizando TMS como referência interna e estavam de acordo com as estruturas atribuídas. A TLC foi realizada utilizando sílica gel 60 F₂₅₄ da EM Sciences e detetada sob uma lâmpada de UV. A cromatografia *flash* foi realizada em sílica gel 60 (230-400 mesh. Adquirida à Mallinckrodt Company). A TLC em fase reversa foi adquirida à Whiteman Company.

Metodologia geral para a síntese do composto de Fórmula I:

R^1 é hidrogénio, $-\text{OH}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{COOR}$, $-\text{OCH}_2\text{OR}$, $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquilo, $\text{C}_2\text{-C}_6$ alcenilo, $\text{C}_2\text{-C}_6$ alcinilo, $\text{C}_1\text{-C}_6$ alcoxi ou halogeno, em que um ou mais dos átomos de R^1 poderão ser um átomo radiomarcado;

R é $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquilo, em que um ou mais dos átomos de carbono poderão ser um átomo radiomarcado;

é hidrolisado por um dos dois procedimentos seguintes:

Preparação de 2-aminotiofenol por hidrólise:

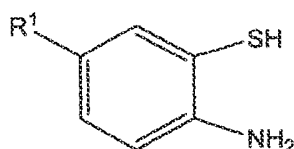
O 2-aminobenzotiazole 6-substituído (172 mmol) é suspenso em KOH 50% (180 g de KOH dissolvidos em 180 mL de água) e etilenoglicol (40 mL). A suspensão é aquecida ao refluxo durante 48 horas. No arrefecimento até à temperatura

ambiente, é adicionado tolueno (300 mL) e a mistura reacional é neutralizada com ácido acético (180 mL). A fase orgânica é separada e a fase aquosa é extraída com mais 200 mL de tolueno. As fases de tolueno são combinadas e lavadas com água e secas sobre MgSO_4 . A evaporação do solvente origina o produto desejado.

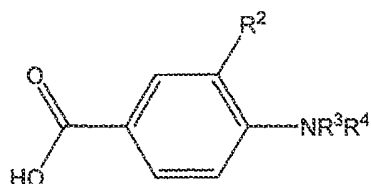
Preparação de 2-aminotiofenol por hidrazinólise

O benzotiazole 6-substituído (6,7 mmol) é suspenso em etanol (11 mL, anidro) e é adicionada hidrazina (2,4 mL) sob atmosfera de nitrogénio à temperatura ambiente. A mistura reacional é aquecida ao refluxo durante 1 hora. O solvente é evaporado e o resíduo é dissolvido em água (10 mL) e ajustado a um pH de 5 com ácido acético. O precipitado é recolhido por filtração e lavado com água para originar o produto desejado.

O 2-amino-1-tiofenol substituído na posição 5 resultante da forma



é acoplado a um ácido benzoico da forma



em que R^2 é hidrogénio, e R^3 e R^4 são independentemente hidrogénio C_1 - C_6 alquilo, C_2 - C_6 alcenilo, ou C_2 - C_6 alcinilo, através da reação seguinte:

Uma mistura do 2-aminotiofenol 5-substituído (4,0 mmol), do ácido benzoico (4,0 mmol), e ácido polifosfórico (PPA) (10 g) é aquecida até 220 °C durante 4 horas. A mistura reacional é arrefecida até à temperatura ambiente e colocada numa solução de carbonato de potássio a 10% (~ 400 mL). O precipitado é recolhido por filtração sob pressão reduzida para originar o produto desejado, o qual pode ser purificado por cromatografia *flash* ou recristalização.

O hidrogénio de R² pode ser substituído com um grupo halogeno não radioativo ou um halogeno radioativo através da reação seguinte:

A uma solução do 2-(4'-aminofenil)-benzotiazole substituído na posição 6 (1 mg) em 250 µL de ácido acético num frasco selado são adicionados 40 µL de uma solução de cloramina-T (28 mg dissolvidos em 500 µL de ácido acético) seguido por 27 µL (ca. 5 mCi) de [¹²⁵I]iodeto de sódio (atividade específica 2,175 Ci/mmol). A mistura reacional é agitada à temperatura ambiente durante 2,5 horas e extinta com uma solução saturada de hidrogenossulfito de sódio. Após diluição com 20 mL de água, a mistura reacional é carregada em C8 Plus SepPak e eluída com 2 mL de metanol. Dependendo da natureza do substituinte na posição 6, poderá ser necessário empregar grupos protetores. Por exemplo, o grupo 6-hidroxi é protegido como o derivado metanossulfonilo (mesiloxi). Para desproteção do grupo metanossulfonilo, são adicionados 0,5 mL de NaOH 1 M à solução eluída do intermediário radioiodado. A mistura é aquecida a 50 °C durante 2 horas. Após ser extinta por 500 µL de ácido acético 1 M, a mistura reacional é diluída com 40 mL de água e carregada numa SepPak Plus C8. O produto radioiodado, apresentando uma

radioatividade de aproximadamente 3 mCi, é eluído da SepPak com 2 mL de metanol. A solução é condensada por uma corrente de nitrogénio até 300 μ L e o produto bruto é purificado por HPLC numa coluna ODS Phenomenex (tampão MeCN/TEA, 35:65, pH 7,5, caudal 0,5 mL/minuto até 4 minutos, 1,0 mL/minuto aos 4-5 minutos, e 2,0 mL/minuto após 6 minutos, tempo de retenção 23,6). As frações recolhidas são carregadas numa SepPak Plus C8. A eluição com 1 mL de etanol originou aproximadamente 1 mCi do produto radioiodado final.

Quando um ou ambos R^3 e R^4 são hidrogénio, seguidamente R^3 e R^4 podem ser convertidos a C_1 - C_6 alquilo, C_2 - C_6 alcenilo ou C_2 - C_6 alcinilo por reação com um halogeneto de alquilo, alcenilo ou alcinilo sob as condições seguintes:

Para dialquilação: A uma solução do 2-(4'-aminofenil)-benzotiazole 6-substituído (0,59 mmol) em DMSO (anidro, 2 mL) é adicionado halogeneto de alquilo, alcenilo ou alcinilo (2,09 mmol), e K_2CO_3 (500 mg, 3,75 mmol). A mistura reacional é aquecida a 140 °C durante 16 horas. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, a mistura reacional é deitada em água e extraída com acetato de etilo (3 x 10 mL). As fases orgânicas são combinadas e o solvente é evaporado. O resíduo é purificado por coluna *flash* para originar o (dimetilminofenil)-benzotiazole 6-substituído desejado.

Por monoalquilação: A uma solução de 2-(4'-aminofenil)-benzotiazole 6-substituído (0,013 mmol) em DMSO (anidro, 0,5 mL) é adicionado halogeneto de alquilo, alcenilo ou alcinilo (0,027 mmol), e K_2CO_3 anidro (100 mg, 0,75 mmol). A mistura reacional é aquecida a 100 °C durante 16 horas. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, a mistura

reacional é purificada diretamente por TLC preparativa em fase normal para originar os derivados de 2-(4'-metilminofenil)-benzotiazole 6-substituídos desejados.

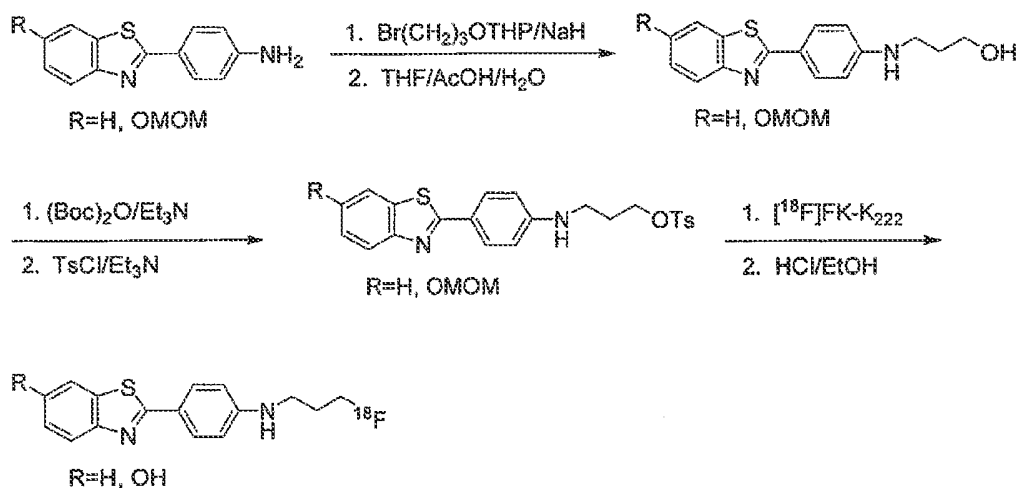
Quando R^2 é hidrogénio ou um halogeno não radioativo, R^4 é C_1-C_6 alquilo, C_2-C_6 alcenilo ou C_2-C_6 alcinilo, em que o alquilo, alcenilo ou alcinilo compreende um átomo de carbono radioativo ou é substituído com um halogeno radioativo, o composto pode ser sintetizado por uma das sequências seguintes:

Por incorporação de carbono radioativo:

Aproximadamente 1 Ci de dióxido de [^{11}C]carbono é produzido utilizando-se um ciclotrão de ião negativo CTI/Siemens RDS 112 por irradiação de alvo um gás de nitrogénio ($^{14}\text{N}_2$) contendo 1% de oxigénio gasoso com uma corrente de feixe de 40 μA de prótons de 11 MeV por 60 minutos. O dióxido de [^{11}C]carbono é convertido em iodeto de [^{11}C]metilo por reação deste com uma solução saturada de hidreto de alumínio lítio em THF seguido pela adição de ácido iodídrico à temperatura de refluxo para gerar o iodeto de [^{11}C]metilo. O iodeto de [^{11}C]metilo é carregado numa corrente de nitrogénio gasoso para um vaso reacional contendo o precursor para radiomarcção. O precursor, 2-(4'-aminofenil)-benzotiazole 6-substituído ($\sim 3,7 \mu\text{moles}$), é dissolvido em 400 μL de DMSO. É adicionado KOH anidro (10 mg), e o frasco V de 3 mL é sujeito a vórtice durante 5 minutos. O iodeto de [^{11}C]metilo sem veículo adicionado é borbulhado através da solução a 30 mL/minuto à temperatura ambiente. A reação é aquecida durante 5 minutos a 95 °C usando um banho de óleo. O produto reacional é purificado por HPLC semi-preparativa usando uma coluna ODS-Prep Prodigy eluída com acetonitrilo a 60%/tampão fosfato de

triethylamônio a 40% pH 7,2 (fluxo a 5 mL/minuto durante 0-7 minutos aumentado seguidamente para 15 mL/minuto durante 7-30 minutos). A fração contendo 2-(4'-aminofenil)-benzotiazole [N-metil- ^{11}C] 6-substituído (cerca de 15 minutos) é recolhida e diluída com 50 mL de água e eluída através de um cartucho de SepPak Plus C18 da Waters. O C18 SepPak é lavado com 10 mL de água, e o produto é eluído com 1 mL de etanol (absoluto) num frasco estéril seguido por 14 mL de solução salina. As purezas radioquímica e química são > 95% como determinado por HPLC analítica ($k'=4,4$ utilizando a coluna analítica Prodigy ODS(3) eluída com 65/35 de acetonitrilo/tampão fosfato de trietilamônio pH 7,2). Média de 17% de rendimento radioquímico a EOS com base em iodeto de [^{11}C]metilo, e média cerca de 160 GBq/ μmol (4,3 Ci/ μmol) de atividade específica ao final da síntese.

Para incorporação de halogéneo radioativo:



Uma mistura de 2-(4'-aminofenil)-benzotiazole 6-substituído (poderão ser necessários grupos protetores dependendo da natureza do 6-substituinte como indicado acima) (0,22 mmol), NaH (4,2 mmol) e 2-(3-bromopropoxi)tetrahydro-2-H-pirano (0,22 mmol) em THF (8 mL) é aquecida ao refluxo durante 23 horas. O solvente é removido por destilação e o

resíduo é dissolvido em acetato de etilo e água, a fase orgânica é separada e a fase aquosa é extraída com acetato de etilo (10 mL x 6). A fase orgânica é combinada e seca sobre MgSO_4 e evaporada até à secura. Ao resíduo é adicionado uma solução de $\text{AcOH}/\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ (5 mL, 4/2/1) e aquecido até 100 °C durante 4 horas. O solvente é removido por evaporação e o resíduo é dissolvido em acetato de etilo (~10 mL) lavado com uma solução de NaHCO_3 , seco sobre MgSO_4 e evaporado até à secura para originar um resíduo que é purificado por TLC preparativa (hexano:acetato de etilo = 60:40) para originar o 2-(4'-(3"-hidroxipropil-amino)-fenil)-benzotiazole 6-substituído (45%).

A uma solução de 2-(4'-(3"-hidroxipropilamino)-fenil)benzotiazole 6-substituído (0,052 mmol) e Et_3N (0,5 mL) dissolvido em acetona (5 mL) é adicionado $(\text{Boc})_2\text{O}$ (50 mg, 0,22 mmol). A mistura reacional é agitada à temperatura ambiente durante 6 horas seguida pela adição de cloreto de tosilo (20 mg, 0,11 mmol). A mistura reacional é agitada à temperatura ambiente durante outras 24 horas. O solvente é removido e o resíduo é dissolvido em acetato de etilo (10 mL), lavado com uma solução de NaCO_3 , seco sobre MgSO_4 , evaporado, e purificado em coluna *flash* (hexano/acetato de etilo=4/1) para originar o 2-(4'-(3"-toluenossulfonoxipropilamino)-fenil)-benzotiazole 6-substituído desejado (13%). Este 2-(4'-(3"-toluenossulfonoxipropil-amino)-fenil)benzotiazole 6-substituído é seguidamente radioflurinado por métodos comuns como se segue:

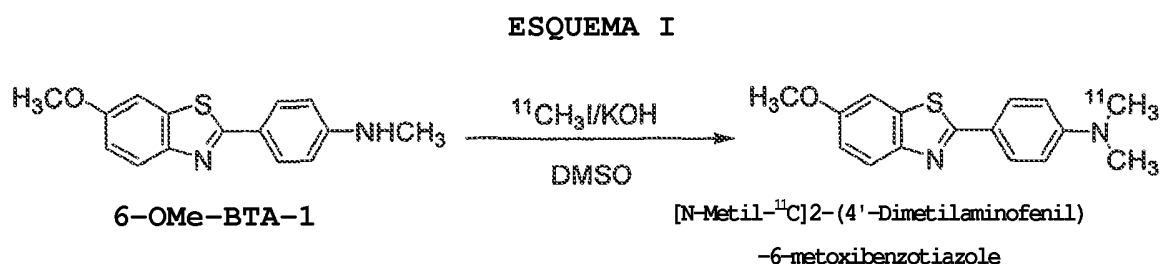
Um alvo ciclotrão contendo 0,35 mL de água enriquecida com [O-18] é irradiado com prótons de 11 MeV a uma corrente de feixe de 20 μA durante 60 minutos, e os conteúdos são transferidos para um frasco reacional de

5 mL contendo Kryptofix 222 (22,3 mg) e K_2CO_3 (7,9 mg) em acetonitrilo (57 μ L). A solução é evaporada até à secura três vezes a 110 °C sob uma corrente de árgon seguida da adição de alíquotas de 1 mL de acetonitrilo. Ao [F-18]fluoreto seco são adicionados 3 mg de 2-(4'-(3"-toluenosulfonoxipropilamino)-fenil)-benzotiazole 6-substituído em 1 mL de DMSO, e o frasco reacional é selado e aquecido até 85 °C durante 30 minutos. Ao frasco reacional, são adicionados 0,5 mL de MeOH/HCl (concentrado) (2/1 v/v), e o frasco é aquecido à 120 °C durante 10 minutos. Após aquecimento, são adicionados 0,3 mL de tampão acetato de sódio 2 M à solução reacional seguida da purificação por HPLC semi-preparativa utilizando uma coluna Prodigy ODS-prep C18 Phenomenex (10 μ m 250 x 10 mm) eluída com acetonitrilo a 40%/tampão fosfato de trietilamina 60 mM a 60% (v/v) pH 7,2 a um caudal de 5 mL/minuto durante 15 minutos, seguidamente o fluxo é aumentado até 8 mL/minuto para o restante da separação. O produto, 2-(4'-(3"-fluoropropilamino)-fenil)-benzotiazole [F-18]6-substituído, é eluído a ~20 minutos num volume de cerca de 16 mL. A fração contendo 2-(4'-(3"-fluoropropilamino)-fenil)-benzotiazole [F-18]6-substituído é diluída com 50 mL de água e eluída através de um cartucho SepPak Plus C18 da Waters. O cartucho SepPak é seguidamente lavado com 10 mL de água, e o produto é eluído utilizando 1 mL de etanol (absoluto) num frasco estéril. A solução é diluída com 10 mL de solução salina normal estéril para injeção intravenosa em animais. O produto 2-(4'-(3"-fluoropropilamino)-fenil)-benzotiazole [F-18]6-substituído é obtido com um rendimento radioquímico de 2-12% no final da radiosíntese de 120 minutos (sem

correção de decaimento) com uma atividade específica média de 1500 Ci/mmol.

Exemplos de Síntese

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

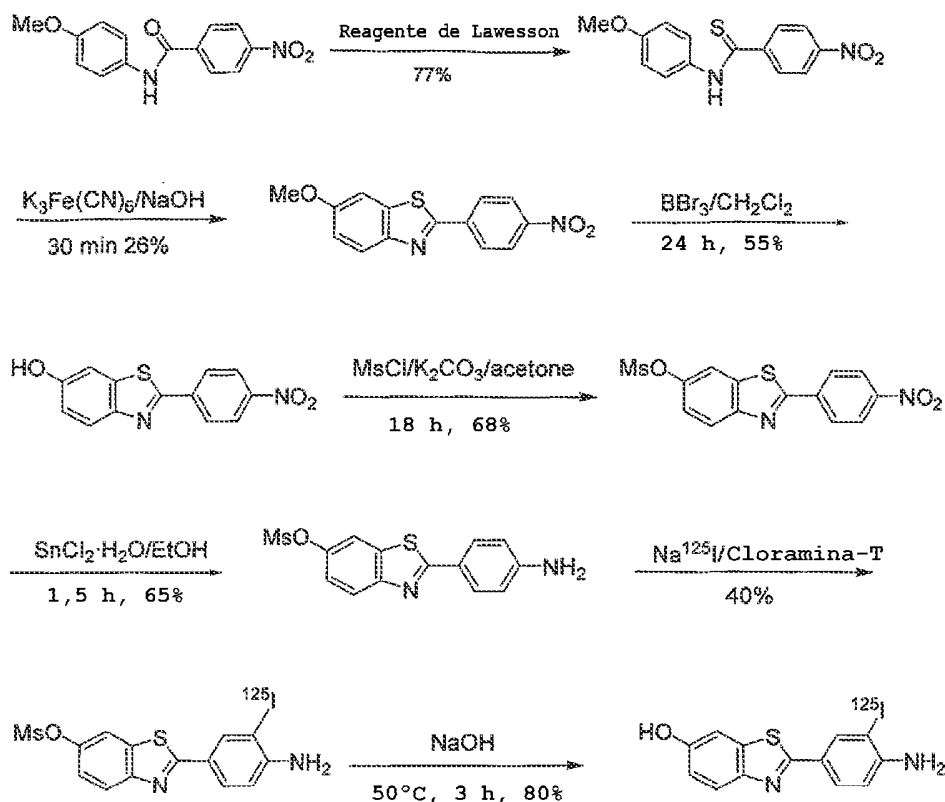


Foi produzido aproximadamente 1 Ci de dióxido de [^{11}C]carbono utilizando um ciclotrão de ião negativo CTI/Siemens RDS 112 por irradiação de um alvo de nitrogénio gasoso ($^{14}\text{N}_2$) contendo oxigénio gasoso a 1% com uma corrente de feixe de 40 μA de protões de 11 MeV durante 60 minutos. O dióxido de [^{11}C]carbono é convertido no iodeto de [^{11}C]metilo primeiro pela reação deste com uma solução saturada de hidreto de alumínio e lítio em THF seguido pela adição de ácido iodrídico à temperatura de refluxo para gerar o iodeto de [^{11}C]metilo. O iodeto de [^{11}C]metilo é transportado na corrente de nitrogénio gasoso para um frasco reacional contendo o precursor para radiomarcção. O precursor, 6- CH_3O -BTA-1 (1,0 mg, 3,7 μmoles), foi dissolvido em 400 μL de DMSO. É adicionado KOH anidro (10 mg), e o frasco V de 3 mL foi sujeito a vórtice durante 5 minutos. O iodeto de [^{11}C]metilo sem adição de veículo foi borbulhado através da solução a 30 mL/ minuto à temperatura ambiente. A reação foi aquecida durante 5 minutos a 95 $^\circ\text{C}$ utilizando um banho de óleo. O produto reacional foi purificado por HPLC semi-preparativa utilizando uma coluna ODS-Prep Prodigy eluída com acetonitrilo a 60%/tampão

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

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

ESQUEMA II



A uma solução de 2-(4'-aminofenil)-6-metanossulfonoxibenzotiazole (1 mg) em 250 μL de ácido acético num frasco selado foram adicionados 40 μL de uma solução de cloramina T (28 mg dissolvidos em 500 μL de ácido acético) seguido por 27 μL (ca. 5 mCi) de [¹²⁵I]iodeto de sódio (atividade específica 2,175 Ci/mmol). A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente durante 2,5 horas e extinta com uma solução saturada de hidrogenossulfito de sódio. Após diluição com 20 mL de água, a mistura reacional foi carregada num SepPak Plus C8 e eluída com 2 mL de metanol. Para desproteção do grupo metanossulfonilo, foram adicionados 0,5 mL de NaOH 1 M à

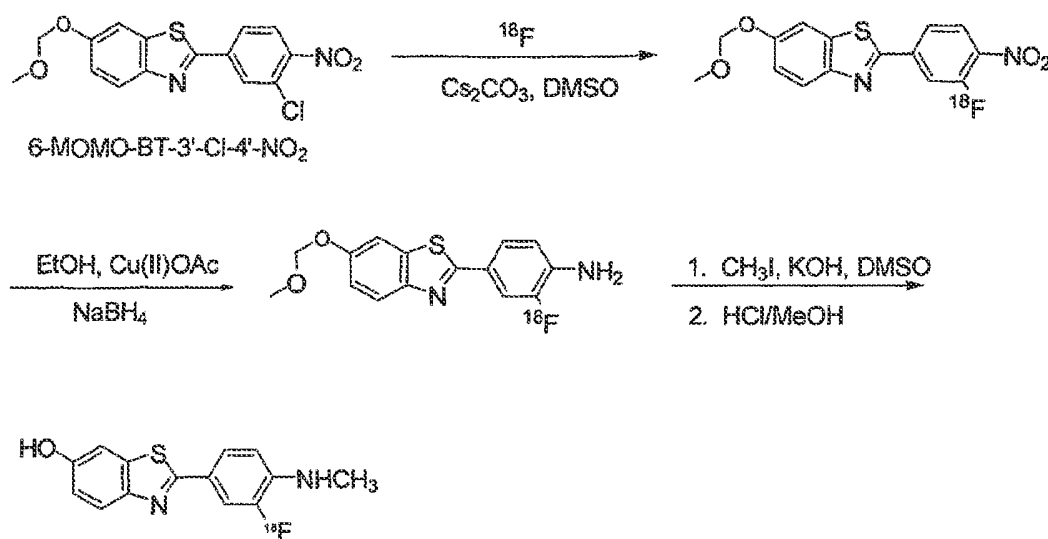
solução eluída do intermediário radioiodado. A mistura é aquecida a 50 °C durante 2 horas. Após ser extinta por 500 µL de ácido acético 1M, a mistura reacional é diluída com 40 mL de água e carregada a um SepPak Plus C8. O produto radioiodado, tendo uma radioatividade de ca. 3 mCi, foi removido por eluição da SepPak com 2 mL de metanol. A solução foi condensada por uma corrente de nitrogénio até 300 µL e o produto bruto foi purificado por HPLC numa coluna ODS Phenomenex (MeCN/tampão TEA, 35:65, pH 7,5, caudal 0,5 mL/minuto até 4 minutos, 1,0 mL/minuto aos 4-5 minutos, e 2,0 mL/minuto após 6 minutos, tempo de retenção 23,6). As frações recolhidas foram carregadas num SepPak Plus C8. A eluição com 1 mL de etanol produziu aproximadamente 1 mCi do produto radioiodado final.

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

Radiotracer to Image the Serotonin Transporter." Journal of Nuclear Medicine 1996; 37:1207-1214.

Exemplo 3: O 2-(3-¹⁸F-Fluoro-4-metilamino-fenil)-benzotiazol-6-ol foi sintetizado de acordo com o Esquema III.

ESQUEMA III



2-(3-¹⁸F-Fluoro-4-metilamino-fenil)
-benzotiazol-6-ol

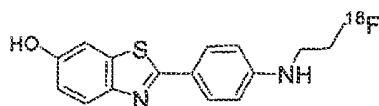
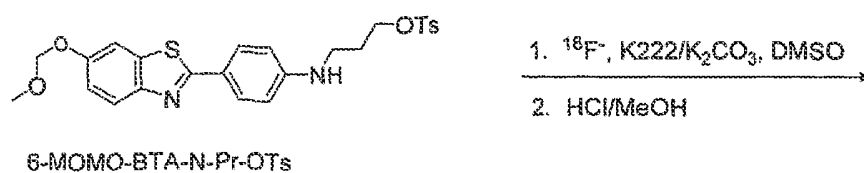
Um alvo de ciclotrão contendo 0,35 mL de água enriquecida com [O-18] foi irradiado com prótons de 11 MeV a uma corrente de feixe de 20 μA durante 60 minutos, e os conteúdos foram transferidos para um frasco reacional de 5 ml contendo 2 mg de Cs₂CO₃ em acetonitrilo (57 μL). A solução foi evaporada até à secura a 110 °C sob uma corrente de argon três vezes utilizando alíquotas de 1 mL de acetonitrilo. Ao [F-18]fluoreto seco foram adicionados 6 mg de 6-MOMO-BT-3'-Cl-4'-NO₂ em 1 mL de DMSO, e o frasco reacional foi selado e aquecido até 120 °C durante 20 minutos (a incorporação radioquímica para esta primeira etapa da radiosíntese foi de cerca de 20% do [F-18]fluoreto solubilizado). À mistura reacional bruta foram

adicionados 8 mL de água e 6 mL de éter dietílico, a mistura foi agitada e deixada separar. A fase etérea foi removida e evaporada até à secura sob uma corrente de árgon a 120 °C. À amostra seca, foram adicionados 0,5 mL de EtOH absoluto juntamente com 3 mg de acetato de cobre(II) e 8 mg de NaBH₄. A reação de redução foi deixada prosseguir durante 10 minutos à temperatura ambiente (o rendimento bruto para a etapa de redução foi de cerca de 40%). Foram adicionados à mistura reacional 8 mL de água e 6 mL de éter dietílico, a mistura foi agitada e a fase etérea foi separada. A fase de éter dietílico foi seca sob uma corrente de árgon a 120 °C. Ao frasco reacional foram adicionados 700 µL de DMSO contendo 30 micromoles de CH₃I e 20 mg de KOH seco. O frasco reacional foi aquecido a 120 °C durante 10 minutos. Foi adicionada uma solução de 700 µL de MeOH/HCl (concentrado) 2:1 e aquecida durante 15 minutos a 120 °C. Após aquecimento, foi adicionado 1 mL de tampão de acetato de sódio 2 M à solução reacional seguida de purificação por HPLC semi-preparativa utilizando uma coluna Prodigy ODS-prep C18 Phenomenex (10 µm 250 x 10 mm) eluída com acetonitrilo a 35%/tampão fosfato de trietilamina 60 mM 65% (v/v) pH 7,2 a um caudal de 5 mL/minuto durante 2 minutos, seguidamente o fluxo foi aumentado até 15 mL/minuto para o restante da separação. O produto, 2-(3-¹⁸F-fluoro-4-metilamino-fenil)-benzotiazol-6-ol, foi eluído em ~15 minutos num volume de cerca de 16 mL. A fração contendo 2-(3-¹⁸F-fluoro-4-metilamino-fenil)-benzotiazol-6-ol foi diluída com 50 mL de água e eluída através de um cartucho SepPak Plus C18 Waters. O cartucho SepPak foi seguidamente lavado com 10 mL de água, e o produto foi eluído utilizando 1 mL de etanol (absoluto) para um frasco estéril. A solução foi diluída com 10 mL de solução salina normal estéril para injeção intravenosa em animais. O produto 2-(3-¹⁸F-fluoro-4-metilaminofenil)-benzo-tiazol-6-

ol foi obtido com um rendimento radioquímico de 0,5% (n = 4) no final de 120 minutos e radiossíntese (sem correção de decaimento) com uma atividade específica média de 1000 Ci/mmol. As purezas radioquímica e química do 2-(3-¹⁸F-fluoro-4-metilamino-fenil)benzo-tiazol-6-ol foram obtidas por rádio-HPLC com detecção por UV a 350 nm utilizando uma coluna Prodigy ODS(3) C18 Phenomenex (5 μm, 250 x 4,6 mm) eluída com acetonitrilo 40%/tampão fosfato de trietilamina 60 mM 60% (v/v) pH 7,2. O 2-(3-¹⁸F-fluoro-4-metilamino-fenil)-benzotiazol-6-ol apresentou um tempo de retenção de ~11 minutos a um caudal de 2 mL/minuto (k' = 5,5). A pureza radioquímica foi >99%, e a pureza química foi >90%. A identidade radioquímica do 2-(3-¹⁸F-fluoro-4-metilamino-fenil)-benzotiazol-6-ol foi confirmada por radio-HPLC em fase reversa utilizando uma amostra de controlo de qualidade do produto radioquímico final co-injetado com um padrão autêntico (frio).

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

ESQUEMA IV

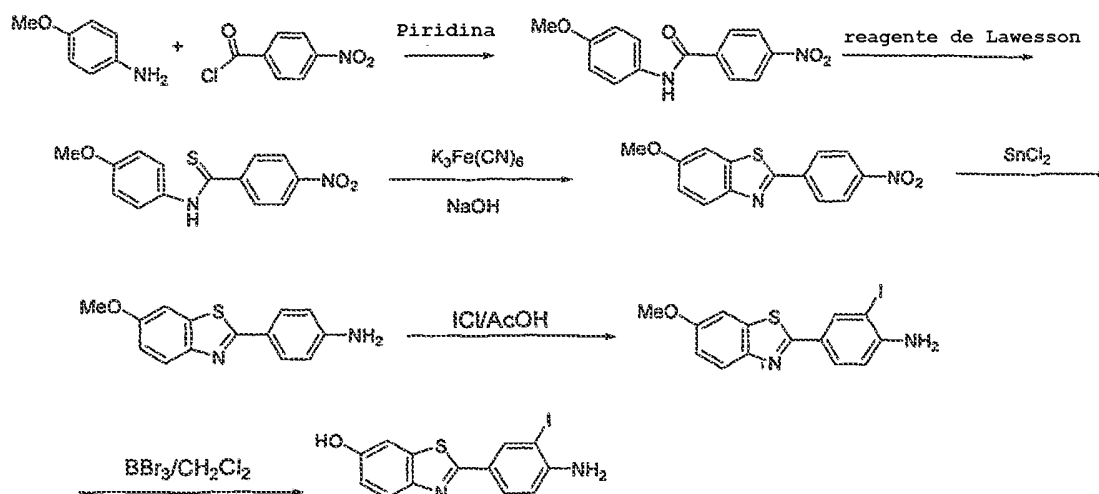


**2-[4-(3-¹⁸F-Fluoro-propilamino)-
-fenil]-benzotiazol-6-ol**

Um alvo de ciclotrão contendo 0,35 mL de água enriquecida com [O-18] a 95% foi irradiado com prótons de 11 MeV a uma corrente de feixe de 20 μ A durante 60 minutos, e os conteúdos foram transferidos para um frasco reacional de 5 mL contendo Kryptofix 222 (22,3 mg) e K_2CO_3 (7,9 mg) em acetonitrilo (57 μ L). A solução foi evaporada até à secura três vezes a 110 °C sob uma corrente de argon seguida da adição de alíquotas de 1 mL de acetonitrilo. Ao [F-18]fluoreto seco foram adicionados 3 mg de 6-MOMO-BTA-N-Pr-Ots em 1 mL de DMSO, e o frasco reacional foi selado e aquecido até 85° C durante 30 minutos. Ao frasco reacional, foram adicionados 0,5 mL de MeOH/HCl (concentrado) (2/1 v/v), e o frasco foi aquecido a 120 °C durante 10 minutos. Após o aquecimento, foram adicionados 0,3 mL de tampão de acetato de sódio 2 M à solução reacional seguido de purificação por HPLC semi-preparativa utilizando uma coluna Prodigy ODS-prep C18 Phenomenex (10 μ m 250 x 10 mm) eluída com acetonitrilo 40%/tampão fosfato de trietilamina 60 mM 60% (v/v) pH 7,2 a um caudal de 5 mL/minuto durante 15 minutos, seguidamente o fluxo foi aumentado até 8 mL/minuto para o restante da separação. O produto, [F-18]6-HO-BTA-N-PrF, eluído em ~20 minutos num volume de cerca de 16 mL. A fração contendo [F-18]6-HO-BTA-N-PrF foi diluída com 50 mL de água e eluída através de um cartucho SepPak Plus C18 da Waters. O cartucho SepPak foi seguidamente lavado com 10 mL de água, e o produto foi eluído utilizando 1 mL de etanol (absoluto) num frasco estéril. A solução foi diluída com 10 mL de solução salina normal estéril para injeção intravenosa em animais. O produto [F-18]6-HO-BTA-N-PrF foi obtido com um rendimento radioquímico de $8 \pm 4\%$ (n = 8) ao fim de 120 minutos de radiosíntese (sem correção de decaimento) com uma atividade específica média de 1500 Ci/mmol. As purezas radioquímica e química do [F-18]6-HO-BTA-N-PrF foram obtidas por radio-HPLC com deteção por UV a

350 nm utilizando uma coluna Prodigy ODS(3) C18 Phenomenex (5 μ m, 250 x 4,6 mm) eluída com acetonitrilo 40%/tampão fosfato de trietilamina 60 mM 60% (v/v) pH 7,2. O [F-18]6-HO-BTA-NPrF apresentou um tempo de retenção de ~ 12 minutos a um caudal de 2 mL/minuto (k' = 6,1). A pureza radioquímica foi >99%, e a pureza química foi >90%. A identidade radioquímica do [F-18]6-HO-BTA-N-PrF foi confirmada por radio-HPLC em fase reversa utilizando uma amostra de controlo de qualidade do produto radioquímico final co-injetado com um padrão autêntico (frio).

Exemplo de referência 5: Síntese do 2-(3'-iodo-4'-aminofenil)-6-hidroxibenzotiazole



Preparação de 4-metoxi-4'-nitrobenzanilida

p-Anisidina (1,0 g, 8,1 mmol) foi dissolvida em piridina anidra (15 mL), foi adicionado cloreto de 4-nitrobenzoilo (1,5 g, 8,1 mmol). A mistura reacional foi deixada em repouso à temperatura ambiente durante 16 horas. A mistura reacional foi deitada em água e o precipitado foi recolhido com filtrado sob pressão de vácuo e lavado com bicarbonato de sódio a 5% (2 x 10 mL). O produto foi utilizado no passo seguinte sem purificação adicional.

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 10,46 (s, 1H, NH); 8,37 (d, J = 5,5 Hz, 2H, H-3',5'); 8,17 (d, J = 6,3 Hz, 2H, H-2',6'); 7,48 (d, J = 6,6 Hz, 2H); 6,97 (d, J = 6,5 Hz, 2H); 3,75 (s, 3H, MeO).

Preparação de 4-metoxi-4'-nitrotiobenzanilida

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

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 8,29 (d, 2H, H-3',5'); 8,00 (d, J = 8,5 Hz, 2H, H-2',6'); 7,76 (d, 2H); 7,03 (d, J = 8,4 Hz, 2H); 8,37 (d, J = 5,5 Hz, 2H, H-3',5'); 8,17 (d, J = 6,3 Hz, 2H, H-2',6'); 7,48 (d, J = 6,6 Hz, 2H); 6,97 (d, J = 6,5 Hz, 2H); 3,75 (s, 3H, MeO); 3,80 (s, 3H, MeO).

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

4-Metoxi-4'-nitrotiobenzanilidas (0,5 g, 1,74 mmol) foram humidificadas com um pouco de etanol (~0,5 mL), e foi adicionada uma solução aquosa de hidróxido de sódio a 30% (556 mg, 13,9 mmol, 8 equiv.). A mistura foi diluída com água para originar uma solução/suspensão final aquosa de hidróxido de sódio a 10%. Alíquotas desta mistura foram adicionadas a intervalos de 1 minuto a uma solução sob agitação de ferricianeto de potássio (2,29 g, 6,9 mmol, 4 equiv.) em água (5 mL) a 80-90 °C. A mistura reacional foi aquecida por 0,5 h adicionais e seguidamente deixada arrefecer. O precipitado foi recolhido por filtração sob pressão de vácuo e lavado com água, purificado com coluna

flash (hexano : acetato de etilo = 4:1) para originar 130 mg (26%) do produto.

^1H RMN (300 MHz, Acetona- d_6) δ : 8,45 (m, 4H); 8,07 (d, J = 8,5 Hz, 1H, H-4); 7,69 (s, 1H, H-7); 7,22 (d, J = 9,0 Hz, 1H, H-5); 3,90 (s, 3H, MeO).

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

Uma mistura de 6-metoxi-2-(4-nitrofenil)benzotiazóis (22 mg, 0,077 mmol) e cloreto de estanho(II) homógrafo (132 mg, 0,45 mmol) em etanol em ebulição foi agitada sob atmosfera de nitrogénio durante 4 horas. O etanol foi evaporado e o resíduo foi dissolvido em acetato de etilo (10 mL), lavado com hidróxido de sódio 1 N (2 mL) e água (5 mL), e seco sobre MgSO_4 . A evaporação do solvente produziu 19 mg (97%) do produto como um sólido amarelo.

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

A uma solução de 2-(4'-aminofenil)-6-metoxibenzotiazole (22 mg, 0,09 mmol) em ácido acético glacial (2,0 mL) foi injetada uma solução de cloreto de iodo 1 M em CH_2Cl_2 (0,10 ml, 0,10 mmol, 1,2 equiv.) sob atmosfera de N_2 . A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente durante 16 horas. O ácido acético glacial foi removido sob pressão reduzida e o resíduo foi dissolvido em CH_2Cl_2 . Após neutralização da solução com NaHCO_3 , a fase aquosa foi separada e extraída com CH_2Cl_2 . As fases orgânicas foram combinadas e secas sobre MgSO_4 . A seguir à evaporação do solvente, o resíduo foi purificado por TLC preparativa (hexanos : acetato de etilo = 6:1) para originar 2-(4'-amino-3'-iodofenil)-6-metoxibenzotiazole (25 mg, 76%) como um sólido castanho.

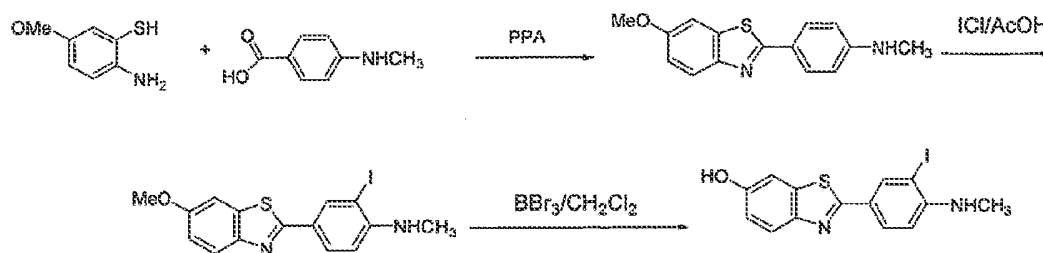
^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,35 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H); 7,87 (dd, $J_1 = 2,0$ Hz, $J_2 = 9,0$ Hz, 1H); 7,31 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H); 7,04 (dd, $J_1 = 2,2$ Hz, $J_2 = 9,0$ Hz, 1H); 6,76 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H); 3,87 (s, 3H).

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

A uma solução de 2-(4'-amino-3'-iodofenil)-6-metoxibenzotiazole (5) (8,0 mg, 0,02 mmol) em CH_2Cl_2 (2,0 mL) foi injetada uma solução de BBr_3 1 M em CH_2Cl_2 (0,20 mL, 0,20 mmol) sob atmosfera de N_2 . A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente durante 18 horas. Após a reação ter sido extinta com água, a mistura foi neutralizada com NaHCO_3 . A fase aquosa foi extraída com acetato de etilo (3 x 3 mL). As fases orgânicas foram combinadas e secas sobre MgSO_4 . O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por TLC (hexanos : acetato de etilo = 7:3) para originar 2-(3'-iodo-4'-aminofenil)-6-hidroxi-benzotiazole (4,5 mg, 58%) na forma de um sólido castanho.

^1H RMN (300 MHz, acetona- d_6) δ (ppm): 8,69 (s, 1H); 8,34 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H); 7,77 (dd, $J_1 = 2,0$ Hz, $J_2 = 8,4$ Hz, 1H); 7,76 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H); 7,40 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 7,02 (dd, $J_1 = 2,5$ Hz, $J_2 = 8,8$ Hz, 1H); 6,94 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H); 5,47 (largo, 2H). HRMS m/z 367,9483 (M^+ calc. para $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_2\text{OSI}$ 367,9480).

Exemplo de referência 6: Síntese de 2-(3'-iodo-4'-metilaminofenil)-6-hidroxi-benzotiazole



Preparação de 6-metoxi-2-(4-metilaminofenil)benzotiazole

Uma mistura de ácido 4-metilaminobenzoico (11,5 g, 76,2 mmol) e 5-metoxi-2-aminotiofenol (12,5 g, 80 mmol) foi aquecida em PPA (~30 g) até 170 °C sob atmosfera de N₂ durante 1,5 hora. A mistura reacional foi seguidamente arrefecida até à temperatura ambiente e deitada numa solução de K₂CO₃ a 10%. O precipitado foi filtrado sob pressão reduzida. O produto bruto foi recristalizado duas vezes a partir de acetona/água e THF/água seguido por tratamento com carvão ativado para originar 4,6 g (21%) de 6-metoxi-2-(4-metilaminofenil)benzotiazole como um sólido amarelo.

¹H RMN (300 MHz, acetona-d₆) δ: 7,84 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-2',6'); 7,78 (dd, J₁ = 8,8 Hz, J₂ = 1,3 Hz, 1H, H-4); 7,52 (d, J = 2,4 Hz, 1H, H-7); 7,05 (dd, J₁ = 8,8 Hz, J₂ = 2,4 Hz, H-5); 6,70 (d, J = 7,6 Hz, 2H, H-3'5'); 5,62 (s, 1H, NH); 3,88 (s, 3H, OCH₃); 2,85 (d, J = 6,2 Hz, 3H, NCH₃).

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

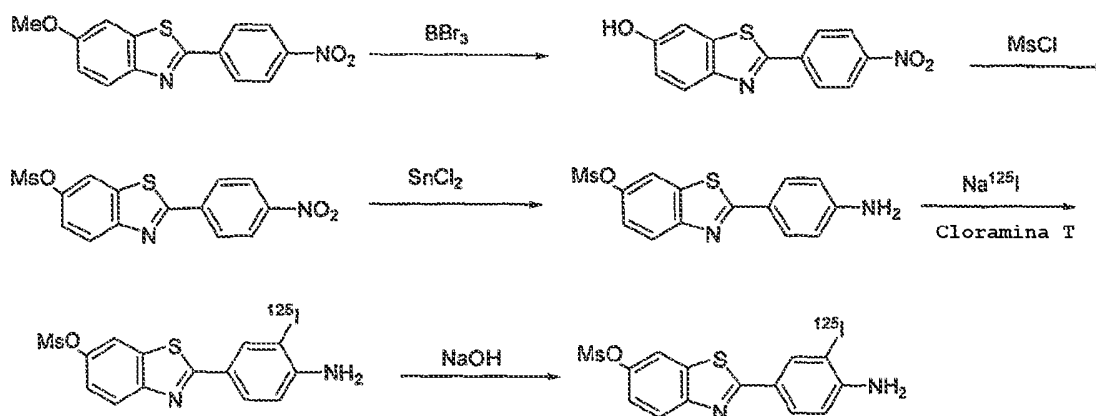
A uma solução de 2-(4'-metilaminofenil)-6-metoxi benzotiazole (20 mg, 0,074 mmol) dissolvido em ácido acético glacial (2 mL) foi adicionado ICl (90 µL, 0,15 mmol, 1,2 equiv., 1 M em CH₂Cl₂) sob atmosfera de N₂. A reação foi deixada a agitar à temperatura ambiente durante 18 horas. O ácido acético glacial foi removido sob pressão

reduzida. O resíduo foi dissolvido em CH_2Cl_2 e neutralizado com NaHCO_3 . A fase aquosa foi extraída com CH_2Cl_2 e as fases orgânicas foram combinadas, secas sobre MgSO_4 e evaporadas. O resíduo foi purificado com TLC preparativa (hexano:EA = 2:1) para originar 2-(4'-metilamino-3'-iodofenil)-6-metoxibenzotiazole (8 mg, 27%) como um sólido castanho. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,39 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H); 7,88 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H); 7,33 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H); 7,06 (dd, $J_1 = 2,2$ Hz, $J_2 = 9,0$ Hz, 1H); 6,58 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H); 3,89 (s, 3H, OCH_3).

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

A uma solução de 2-(4'-metilamino-3'-iodofenil)-6-metoxibenzotiazole (12 mg, 0,03 mmol) dissolvido em CH_2Cl_2 (4 mL) foi adicionado BBr_3 (400 μL , 0,4 mmol), 1 M em CH_2Cl_2) sob atmosfera de N_2 . A reação foi deixada a agitar à temperatura ambiente durante 18 horas. Foi seguidamente adicionada água para extinguir a reação e a solução foi neutralizada com NaHCO_3 , extraída com acetato de etilo (3 x 5 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas sobre MgSO_4 e evaporadas. O resíduo foi purificado por TLC preparativa (hexano : EA = 7:3) para originar 2-(4'-metilamino-3'-idofenil)-6-hidroxibenzotiazole (5 mg, 43%) como um sólido castanho. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,37 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H); 7,88 (dd, $J_1 = 2,0$ Hz, $J_2 = 8,4$ Hz, 1H); 7,83 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H); 7,28 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 6,96 (dd, $J_1 = 2,5$ Hz, $J_2 = 8,8$ Hz, 1H); 6,58 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H); 2,96 (s, 3H, CH_3).

Exemplo de Referência 7: Radiossíntese de [^{125}I]6-OH-BTA-0-3'-1



Preparação de 2-(4'-Nitrofenil)-6-hidroxibenzotiazole

A uma suspensão de 2-(4'-nitrofenil)-6-metoxi benzotiazole (400 mg, 1,5 mmol) em CH_2Cl_2 (10 mL) foi adicionado BBr_3 (1 M em CH_2Cl_2 , 10 mL, 10 mmol). A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente durante 24 horas. A reação foi seguidamente extinta com água, e extraída com acetato de etilo (3 x 20 mL). As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com água, secas sobre MgSO_4 e evaporadas. O resíduo foi purificado por cromatografia *flash* (sílica gel, hexanos : acetato de etilo = 1:1) para originar o produto como um sólido amarelo (210 mg, 55%). ^1H RMN (300 MHz, acetona- d_6) δ (ppm): 9,02 (s, OH); 8,41 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H); 8,33 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H); 7,96 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H); 7,53 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 7,15 (dd, $J_1 = 8,6$ Hz, $J_2 = 2,4$ Hz, 1H).

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

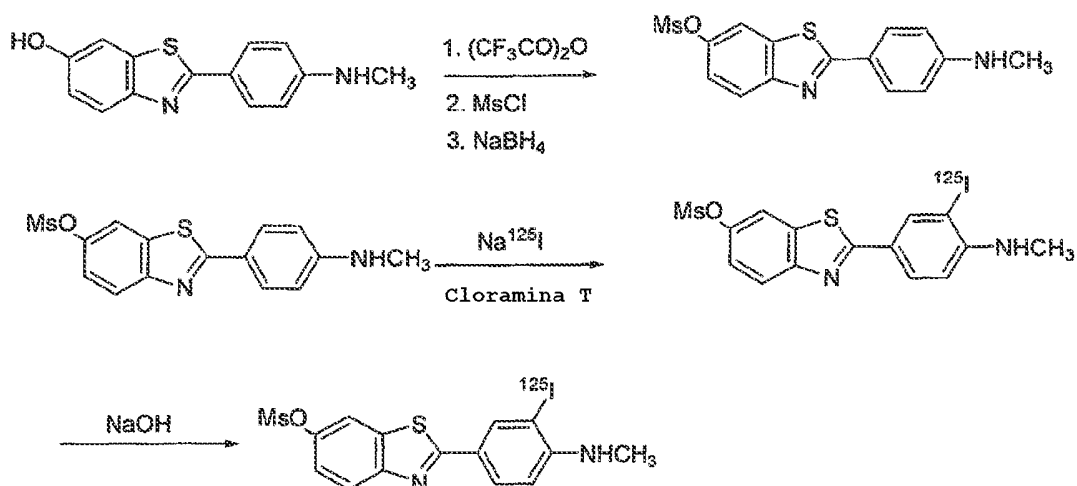
A uma solução de 2-(4'-nitrofenil)-6-hidroxi benzotiazole (50 mg, 0,18 mmol) dissolvido em acetona (7 ml, anidra) foi adicionado K_2CO_3 (100 mg, 0,72 mmol, em pó) e MsCl (200 μL). Após agitação durante 2 horas, a mistura reacional foi filtrada. O filtrado foi concentrado e o resíduo foi purificado por coluna *flash* (sílica gel, hexano : acetato

de etilo = 4:1) para originar 2-(4'-nitrofenil)-6-metilsulfoxibenzotiazole (44 mg, 68%) como um sólido amarelo claro. ^1H RMN (300 MHz, acetona- d_6) δ (ppm): 8,50-8,40 (m, 4H); 8,29 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H); 8,23 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H); 7,61 (dd, $J_1 = 2,3$ Hz, $J_2 = 8,9$ Hz, 1H).

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

A uma solução de 2-(4'-nitrofenil)-6-metilsulfoxi benzotiazole (35 mg, 0,10 mmol) dissolvido em etanol (10 mL) foi adicionado $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (50 mg). A mistura reacional foi aquecida ao refluxo durante 1,5 horas. O solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em acetato de etilo (10 mL), lavado com NaOH 1 N, água, seco sobre MgSO_4 . A evaporação do solvente produziu 2-(4'-aminofenil)-6-metilsulfoxibenzotiazole (21 mg, 65%) como um sólido castanho claro. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,02 (d, $J = 6,2$ Hz, 1H); 7,92 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H); 7,84 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 7,38 (dd, $J_1 = 2,4$ Hz, $J_2 = 6,2$ Hz, 1H); 6,78 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H); 2,21 (s, 3H, CH_3).

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



A uma solução de 2-(4'-metilaminofenil)-6-hidroxi-benzotiazole (300 mg, 1,17 mmol) dissolvido em CH_2Cl_2 (20 mL) foi adicionada Et_3N (2 mL) e ácido trifluoracético (1,5 mL). A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente durante 3 horas. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo foi dissolvido em acetato de etilo (30 mL), lavado com uma solução de NaHCO_3 , solução aquosa saturada de cloreto de sódio, água, e seco sobre MgSO_4 . Após a evaporação do solvente, o resíduo foi dissolvido em acetona (20 mL, pré-seca sobre K_2CO_3), foi adicionado K_2CO_3 (1,0 g, pó) seguido de MsCl (400 mg, 3,49 mmol). A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente e monitorizada por TLC até o desaparecimento do material de partida. O resíduo foi seguidamente filtrado. O filtrado foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em acetato de etilo (30 mL), lavado com solução de NaHCO_3 . Solução aquosa saturada de cloreto de sódio, água, e seco sobre MgSO_4 . Após a evaporação do solvente, o resíduo foi dissolvido em EtOH e foi adicionado NaBH_4 . A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente durante 2 h. O solvente foi evaporado e o resíduo foi dissolvido em água, extraído com acetato de etilo (3 x 20 mL), os extratos foram combinados e secos sobre MgSO_4 . Após evaporação do solvente, o resíduo foi purificado com coluna *flash* (hexanos/acetato de etilo = 8:1) para originar o produto (184 mg, 47,0%) como um sólido castanho. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,94 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H); 7,87 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H); 7,77 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H); 7,30 (dd, $J_1 = 8,8$ Hz, $J_2 = 2,3$ Hz, 1H); 6,63 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H); 3,16 (s, CH_3); 2,89 (s, NCH_3).

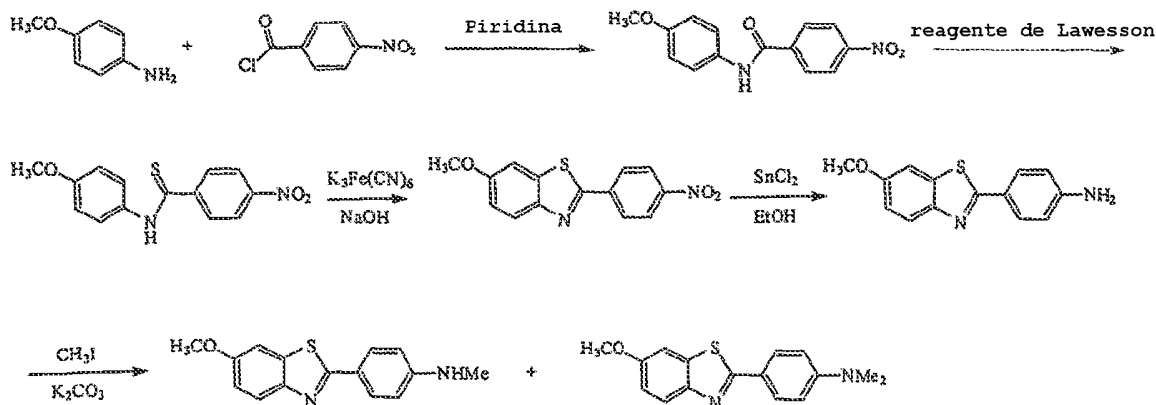
Procedimento geral para a radiomarcção:

A uma solução de 2-(4'-aminofenil)-6-metanossulfonoxi-benzotiazole ou 2-(4'-metilaminofenil)-6-metilsulfoxibenzotiazole (1 mg) em 250 μL de ácido acético num frasco selado foram adicionados 40 μL de uma solução de cloraminas T (28 mg dissolvidos em 500 μL de ácido acético) seguida de 27 μL (ca. 5 mCi) de [^{125}I]iodeto de sódio (atividade específica de 2,175 Ci/mmol). A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente durante 2,5 horas e extinta com uma solução saturada de hidrogenossulfito de sódio. Após a diluição com 20 mL de água, a mistura reacional foi carregada num SepPak Plus C8 e eluída com 2 mL de metanol. Para a desproteção do grupo metanossulfonilo, foram adicionados 0,5 mL de NaOH 1 M à solução eluída do intermediário radioiodado. A mistura foi aquecida a 50 °C durante 2 horas. Após ser extinta com 500 μL de ácido acético, a mistura reacional foi diluída com 40 mL de água e carregada num SepPak Plus C8. O produto radioiodado, tendo uma radioatividade de aproximadamente 3 mCi, foi eluído do SepPak com 2 mL de metanol. A solução foi condensada por uma corrente de nitrogénio para 300 μL e o produto bruto foi purificado por HPLC em uma coluna ODS Phenomenex (MeCN/tampão TEA, 35:65, pH 7,5, caudal 0,5 mL/minuto até 4 minutos, 1,0 mL/minuto aos 4-6 minutos, e 2,0 mL/minuto após 6 minutos, tempo de retenção 23,6). As frações recolhidas foram carregadas num SepPak Plus C8. A eluição com 1 mL de etanol produziu aproximadamente 1 mCi do produto radioiodado.

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

Via 1: Exemplo da síntese de 6-MeO-BTA-0, -1, -2, que são representativos do grupo de compostos de tioflavina (Shi et

al., "Antitumor Benzothiazoles. 3. Synthesis of 2-(4-Aminophenyl)benzothiazoles e Evaluation of Their Activities against Breast Cancer Cell Lines in Vitro and in Vivo" J. Med. Chem. 39:33753384, 1996).



Preparação de 4-metoxi-4'-nitrobenzanilida

p-Anisidina (1,0 g, 8,1 mmol) foi dissolvida em piridina anidra (15 mL), foi adicionado cloreto de nitrobenzoilo (1,5 g, 8,1 mmol). A mistura reacional foi deixada repousar à temperatura ambiente durante 16 horas. A mistura reacional foi deitada em água e o precipitado com filtrado foi recolhido sob pressão de vácuo e lavado com bicarbonato de sódio a 5% (2 x 10 mL). O produto foi utilizado no passo seguinte sem purificação adicional. 1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 10,46 (s, 1H, NH); 8,37 (d, $J = 5,5$ Hz, 2H, H-3',5'); 8,17 (d, $J = 6,3$ Hz, 2H, H-2',6'); 7,48 (d, $J = 6,6$ Hz, 2H); 6,97 (d, $J = 6,5$ Hz, 2H); 3,75 (s, 3H, MeO).

Preparação de 4-metoxi-4'-nitrotiobenzanilida

Uma mistura de 4-metoxi-4'-nitrotiobenzanilina (1,0 g, 3,7 mmol) e reagente de Lawesson (0,89 g, 2,2 mmol, 0,6 equiv.) em clorobenzeno (15 mL) foi aquecida ao refluxo durante 4

horas. O solvente foi evaporado e o resíduo foi purificado com coluna *flash* (hexano : acetato de etilo = 4:1) para originar 820 mg (77,4%) do produto como um sólido alaranjado. ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 8,29 (d, 2H, H-3',5'); 8,00 (d, J = 8,5 Hz, 2H, H-2',6'); 7,76 (d, 2H); 7,03 (d, J = 8,4 Hz, 2H); 8,37 (d, J = 5,5 Hz, 2H, H-3',5'); 8,17 (d, J = 6,3 Hz, 2H, H-2', 6'); 7,48 (d, J = 6,6 Hz, 2H); 6,97 (d, J=6,5 Hz, 2H); 3,75 (s, 3H, MeO); 3,80 (s, 3H, MeO).

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

4-Metoxi-4'-nitrotiobenzanilidas (0,5 g, 1,74 mmol) foram humidificadas com um pouco de etanol (~0,5 mL), e foi adicionada uma solução aquosa a 30% de hidróxido de sódio (556 mg, 13,9 mmol, 8 equiv.). A mistura foi diluída com água para providenciar uma solução/suspensão aquosa a 10% final de hidróxido de sódio. Alíquotas desta mistura foram adicionadas a intervalos de 1 minuto a uma solução agitada de ferricianeto de potássio (2,29 g, 6,9 mmol, 4 equiv.) em água (5 mL) a 80-90 °C. A mistura reacional foi aquecida 0,5 h adicionais e seguidamente deixada arrefecer. O precipitado foi recolhido por filtração sob pressão de vácuo e lavado com água, purificado com coluna *flash* (hexano : acetato de etilo = 4:1) para originar 130 mg (26%) do produto. ^1H RMN (300 MHz, acetona- d_6) δ : 8,45 (m, 4H); 8,07 (d, J = 8,5 Hz, 1H, H-4); 7,69 (s, 1H, H-7); 7,22 (d, J = 9,0 Hz, 1H, H-5); 3,90 (s, 3H, MeO).

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

Uma mistura de 6-metoxi-2-(4-nitrofenil)benzotiazóis (22 mg, 0,077 mmol) e cloreto de estanho(II) homógrafo (132 mg, 0,45 mmol) em etanol em ebulição foi agitada sob atmosfera

de nitrogénio durante 4 horas. O etanol foi evaporado e o resíduo foi dissolvido em acetato de etilo (10 mL), lavado com hidróxido de sódio 1 N (2 mL) e água (5 ml), e seco sobre MgSO₄. A evaporação do solvente produziu 19 mg (97%) do produto como um sólido amarelo.

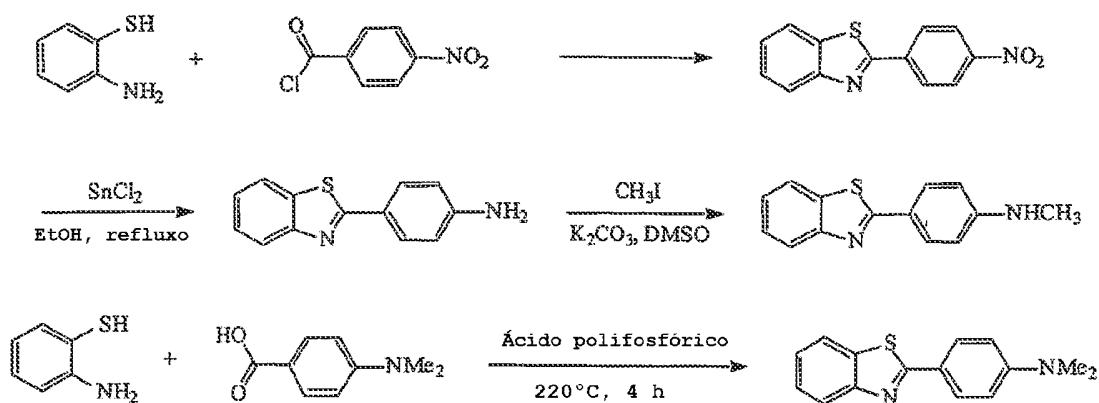
Preparação de 6-metoxi-2-(4-metilaminofenil)benzotiazole e 6-metoxi-2-(4-dimetilaminofenil)benzotiazole

Uma mistura de 6-metoxi-2-(4-aminofenil)benzotiazole (15 mg, 0,059 mmol), MeI (8,3 mg, 0,060 mmol) e K₂CO₃ (100 mg, 0,72 mmol) em DMSO (anidro, 0,5 mL) foi aquecida a 100 °C durante 16 horas. A mistura reacional foi purificada por TLC em fase reversa (MeOH : H₂O = 7:1) para originar 2,0 mg (13,3%) de 6-metoxi-2-(4-metilaminofenil)benzotiazole e 6 mg (40%) de 6-metoxi-2-(4-dimetilaminofenil)benzotiazole. ¹H RMN do 6-metoxi-2-(4-metilaminofenil)benzotiazole (300 MHz, acetona-d₆) δ: 7,85 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-2',6'), 7,75 (dd, J = 8,8 Hz, J = 1,3 Hz, 1H, H4), 7,49 (d, J = 2,4 Hz, 1H, H-7), 7,01 (dd, J = 8,8 Hz, J = 2,4 Hz, H-5), 6,78 (d, J = 7,6 Hz, 2H, H-3',5'), 3,84 (s, 3H, MeO), 2,91 (s, 3H, Nme), ¹H RMN do 6-metoxi-2-(4-dimetilaminofenil)benzotiazole (300 MHz, acetona-d₆) δ: 7,85 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-2',6'); 7,75 (dd, J = 8,8 Hz, J = 1,3 Hz, 1H, H-4); 7,49 (d, J = 2,4 Hz, 1H, H-7); 7,01 (dd, J = 8,8 Hz, J = 2,4 Hz, H-5); 6,78 (d, J = 7,6 Hz, 2H, H-3'5'); 3,84 (s, 3H, MeO); 3,01 (s, 6H, Nme₂).

Seguindo a mesma estratégia como acima, os outros derivados de 2-(4'-aminofenil)benzotiazole poderão ser sintetizados por substituição do derivado de anilina substituída apropriado (por exemplo, 2-, 3- ou 4-metil-anilina) e o derivado de cloreto de 4-nitrobenzoilo apropriado (por exemplo, cloreto de 2- ou 3-metil-4-nitro-benzoilo).

Exemplo 10: Síntese de derivados de BTA sem substituição

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



Preparação de 2-(4-Nitrofenil)benzotiazole

Uma solução de cloreto de 4-nitrobenzoilo (1,49 g, 8,0 mmol) em benzeno (anidro, 10 mL) foi adicionado gota a gota a 2-aminotiofenol (1,0 g, 8,0 mmol em 10 mL de benzeno) à temperatura ambiente. A mistura reacional foi deixada a agitar durante 16 horas. A reação foi extinta com água (20 mL). A fase aquosa foi separada e extraída com acetato de etilo (3 x 10 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas e evaporadas. O produto bruto foi purificado com coluna *flash* (hexano : acetato de etilo = 85:15) para originar 1,5 g (73,2%) do produto como um sólido amarelo claro.

Preparação de 2-(4-Aminofenil)benzotiazole

Uma mistura de 2-(4-nitrofenil)benzotiazole (105 mg, 0,40 mmol) em cloreto de estanho(II) homógrafo (205 mg, 0,91 mmol) em etanol (20 mL) foi sujeita ao refluxo sob N₂ durante 4 horas. Após a remoção do etanol por evaporação sob vácuo, o resíduo foi dissolvido em acetato de etilo (20 mL), e lavado com uma solução de NaOH (1 N, 3 x 20 mL) e água (3 x 20 mL), seco e evaporado até à secura para originar 102 mg (97%) do produto.

Preparação de 2-(4-Metilaminofenil)benzotiazole e 2-(4-dimetilaminofenil)benzotiazole

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

Preparação de 2-(4-Dimetilaminofenil)benzotiazole

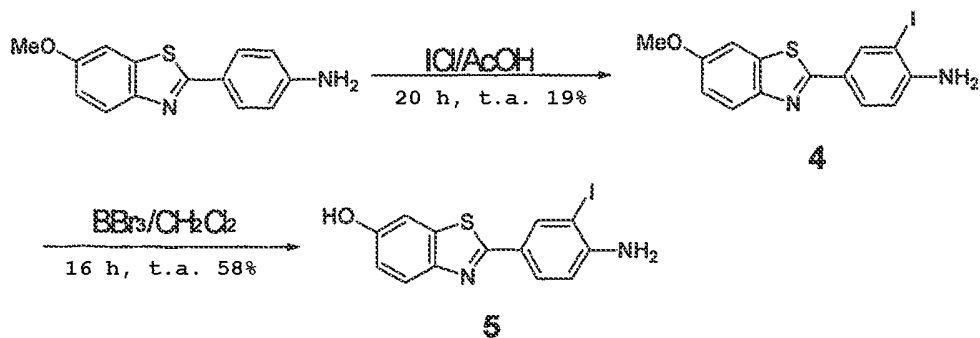
A mistura de 2-aminotiofenol (0,5 g, 4,0 mmol), ácido 4-dimetilaminobenzoico (0,66 g, 4,0 mmol) e PPA (10 g) foi aquecida até 220 °C durante 4 horas. A mistura reacional foi arrefecida até à temperatura ambiente e deitada numa solução de carbonato de potássio a 10% (~400 mL). O resíduo foi recolhido por filtração sob pressão de vácuo para originar 964 mg do produto, que tinha cerca de 90% de pureza com base na análise por ¹H RMN. A recristalização de 100 mg em MeOH originou 80 mg do produto puro. ¹H RMN (300 MHz, acetona-d₆) δ: 7,12 (d, J = 7,7 Hz, 1H, H-7); 7,01 (d, J = 9,0 Hz, 1H, H-4); 6,98 (d, J = 9,1 Hz, 2H, H-2',6');

6,56 (t, $J = 7,8$ Hz, $J = 7,3$ Hz, 1H, H-5 ou H-6); 5,92 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H, H-3',5'); 2,50 (s, 6H, Nme₂).

Seguindo a mesma estratégia como acima, os outros derivados de 2-(4'-aminofenil)benzotiazole poderão ser sintetizados por substituição do derivado de cloreto de 4-nitro-benzoilo apropriado (por exemplo, cloreto de 2- ou 3-metil-4-nitro-benzoilo) ou o derivado de ácido 4-dimetilamino-benzoico apropriado (por exemplo, ácido 2- ou 3-metil-4-dimetilamino-benzoico).

Exemplo 11: Síntese de compostos iodados

Via 3: Exemplo da síntese de 2-(3'-iodo-4'-aminofenil)-6-hidroxibenzotiazole, que é representativa para a síntese de outros compostos iodados (as referências numéricas dos nomes dos compostos abaixo referem-se ao esquema de síntese mostrado).



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

A uma solução de 2-(4'-aminofenil)-6-metoxibenzotiazole (22 mg, 0,09 mmol) em ácido acético glacial (2,0 mL) foi injetada uma solução de cloreto de iodo 1 M em CH₂Cl₂ (0,10 ml, 0,10 mmol, 1,2 equiv.) sob atmosfera de N₂. A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente durante 16

horas. O ácido acético glacial foi removido sob pressão reduzida e o resíduo foi dissolvido em CH_2Cl_2 . Após a neutralização da solução com NaHCO_3 , a fase aquosa foi separada e extraída com CH_2Cl_2 . As fases orgânicas foram combinadas e secas sobre MgSO_4 . A seguir a evaporação do solvente, o resíduo foi purificado por TLC preparativa (hexanos : acetato de etilo = 6:1) para originar 2-(4'-amino-3'-iodofenil)-6-metoxibenzotiazole (25 mg, 76%) como um sólido castanho. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,35 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H); 7,87 (dd, $J_1 = 2,0$ Hz, $J_2 = 9,0$ Hz, 1H); 7,31 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H); 7,04 (dd, $J = 2,2$ Hz, $J_2 = 9,0$ Hz, 1H); 6,76 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H); 3,87 (s, 3H).

Preparação de 2-(3'-Iodo-4'-aminofenil)-6-hidroxi-benzotiazole

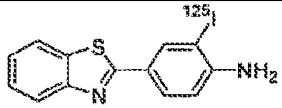
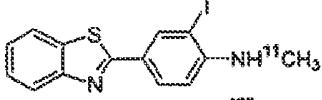
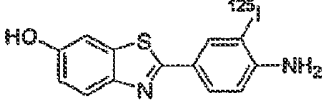

A uma solução de 2-(4'-amino-3'-iodofenil)-6-metoxibenzotiazole (8,0 mg, 0,02 mmol) em CH_2Cl_2 (2,0 mL) foi injetada uma solução de BBr_3 1 M em CH_2Cl_2 (0,20 mL, 0,20 mmol) sob atmosfera de N_2 . A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente durante 18 horas. Após a reação ter sido extinta com água, a mistura foi neutralizada com NaHCO_3 . A fase aquosa foi extraída com acetato de etilo (3 x 3 mL). As fases orgânicas foram combinadas e secas sobre MgSO_4 . O solvente foi seguidamente evaporado sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por TLC (hexanos : acetato de etilo = 7:3) para originar 2-(3'-iodo-4'-aminofenil)-6-hidroxibenzotiazole (4,5 mg, 58%) como um sólido castanho. ^1H RMN (300 MHz, acetona- d_6) δ (ppm): 8,69 (s, 1H); 8,34 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H); 7,77 (dd, $J_1 = 2,0$ Hz, $J_2 = 8,4$ Hz, 1H); 7,76 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H); 7,40 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 7,02 (dd, $J_1 = 2,5$ Hz, $J_2 = 8,8$ Hz, 1H); 6,94 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H); 5,47 (largo, 2H). HRMS m/z 367,9483 (M^+ calc. para $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_2\text{OSI}$ 367,9480).

Exemplos Biológicos

Exemplo 1:

Determinação da Afinidade para A β e Absorção cerebral de Derivados de Tioflavina

Foram efetuados estudos de ligação inicial utilizando A β (1-40) sintético para determinar se os quatro compostos mostrados abaixo se ligam significativamente a locais de depósitos de amiloide no cérebro.

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

Os dados mostrados na Tabela 1 indicam que estes compostos exibiram uma afinidade relativamente elevada para A β , com valores de K_i < 10 nM, e facilmente entraram no cérebro do murgancho com valores de absorção > 0,4% ID/g*kg (ou > 13% ID/g para animais de 30 g). Além disso, os valores da concentração de radioatividade cerebral aos 30 min foram menores que 0,1% ID/g*kg, resultando em razões de concentração > 4 de 2 min a 30 min.

Exemplo 2: Marcação de depósitos de amiloide em cérebro de murgancho *post-mortem* AD e Tg

Secções de tecido cerebral *post-mortem* de cérebro com AD e um murganho PS1/APP transgénico de 8 meses de idade foram marcadas com BTA-1 não marcado. O modelo de murganho PS1/APP combina duas mutações de gene humano conhecidas como causadoras da doença de Alzheimer num murganho duplamente transgénico que deposita fibrilos A β em placas amiloides no cérebro iniciando tão cedo quanto 3 meses de idade. As micrografias de fluorescência típicas são mostradas na Figura 8, e a marcação das placas amiloides por BTA-1 tanto em tecido cerebral *post-mortem* com AD como em tecido cerebral de PS1/APP é claramente visível. A amiloide cerebrovascular foi também claramente marcada (Fig. 8, à direita). A outra marca neuropatológica característica de cérebro com AD, emaranhados neurofibrilares (ENF), são marcados mais fracamente por BTA-1 em cérebro com AD (Fig. 8, à esquerda). Não foram observados ENF em modelos de murganho transgénico de deposição amiloide.

Exemplo 3: Marcação *in vivo* e deteção de depósitos de amiloide em murganhos transgénicos

Três murganhos transgénicos PS1/APP com 17 meses de idade foram injetados intraperitonealmente (ip) com uma dose única de 10 mg/kg de BTA-1 numa solução de DMSO, propilenoglicol, e PBS com pH 7,5 (v/v/v 10/45/45). Vinte e quatro horas mais tarde, foi empregue a microscopia de fluorescência multifotónica para se obter imagens de alta resolução nos cérebros de murganhos vivos utilizando uma técnica de janela craniana. As imagens *in vivo* típicas de BTA-1 num murganho PS1/APP vivo são mostradas na Figura 9, e as placas e a amiloide cerebrovascular são claramente discerníveis. Os estudos de microscopia multifotónica

demonstram a especificidade *in vivo* de BTA-1 para A β em murganhos transgênicos PS1/APP vivos.

Exemplo 4: Especificidade dos Compostos da Invenção para placas Alzheimer em relação a emaranhados de Alzheimer

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

matéria cinzenta frontal de AD. O cérebro com AD mostrou depósitos de placas amiloide difusos no EC (Fig. 11B) que parecem não produzir ligação de [³H]BTA-1 significativa. O córtex frontal tinha placas amiloides extensivas que eram ambas compactas e difusas e estavam associadas a níveis elevados de ligação de [³H]BTA-1 (Fig. 11D e Tabela).

Exemplo 5: Estudos de entrada no cérebro de murganho *in vivo*

As experiências para aceder à penetração cerebral de 2-(3'-¹²⁵I-iodo-4'-aminofenil)-benzotiazol-6-ol (composto A), 2-(3-[¹⁸F]-fluoro-4-metilamino-fenil)-benzotiazol-6-ol (composto B), e 2-[4-(3-¹⁸F-fluoro-propilamino)-fenil]-benzotiazol-6-ol (composto C), foram conduzidas em murganhos jovens do tipo selvagem que não apresentavam depósitos amiloides nos seus cérebros. Este estudo reflete a entrada cerebral e a libertação do tecido cerebral normal. Um critério necessário para um bom agente de imagem de PET é a rápida libertação das áreas cerebrais que não contêm o sítio de ligação alvo. Uma medida da taxa de libertação da ligação não específica é providenciada pela razão dos valores dos 2 minutos até os 30 minutos (%ID-kg)/g.

Os estudos foram conduzidos em murganhos fêmeas Swiss-Webster (23-35 g) de acordo com o Guide for the Care e Use of Laboratory Animal adotado pelo NIH e com a aprovação do Institutional Animal Care and Use Committee local. Os murganhos foram injetados numa veia lateral da cauda com 0,37-3,7 MBq (10-100 μ Ci) de uma atividade específica elevada do Composto A, Composto B ou Composto C (~2,0/ μ mol) contido em \leq 0,10 mL de uma solução salina isotónica a 95% e 5% de etanol. Os murganhos foram anestesiados e mortos por excisão cardíaca após punção cardíaca para obtenção de

amostras de sangue arterial aos 2 minutos ou 30 minutos após a injeção. Os cérebros de murganho foram rapidamente excisados e divididos nas frações do cerebelo e a restante totalidade do cérebro (incluindo o tronco encefálico). As amostras de cérebro foram contadas num contador de poço gama, e as contagens foram corrigidas quanto ao decaimento para o tempo da injeção relativamente aos padrões ^{125}I ou ^{18}F preparados a partir da solução de injeção para determinar a percentagem de dose injetada (%ID) nas amostras. As amostras de cérebro foram pesadas para determinar a percentagem da dose injetada por grama de tecido (%ID/g), e esta quantidade foi multiplicada pela totalidade do peso corporal (em kg) para determinar a concentração de radioatividade normalizada para o peso corporal [(%ID-kg/g)] de cada amostra de tecido. O Composto A, Composto B e Composto C revelaram uma entrada cerebral relativamente elevada em pontos de tempo iniciais e rápida libertação a pontos de tempo mais tardios. As concentrações de radioatividade (%ID-kg/g) aos 2 minutos e 30 minutos e nas razões 2 minutos a 30 minutos são apresentadas na Tabela 2 abaixo.

TABELA 2

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

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

Os estudos de imagiologia PET em babuínos adultos (*Papio anubis*) (pesando 15-35 kg, idades 6-12 anos) foram conduzidos com o Composto B e o Composto C de acordo com o Guide for the Care e Use of Laboratory Animals adotado pelo

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

Os dados de PET foram obtidos utilizando-se um scanner ECAT HR+PET (CTI PET Systems, Knoxville, TN) e modo de imagem em 3D (63 lâminas paralelas; campo de visão axial de 15,2 cm; resolução no plano metade da máxima para a largura total). Foi utilizado um Neuro-Insert (CTI PET Systems) para reduzir a contribuição de eventos de espalhamento de fóton. Após os babuínos terem sido posicionados no scanner PET, foi obtido um varrimento por transmissão em janela (10-15 minutos) para correção de atenuação dos dados de emissão

PET utilizando bastões giratórios $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$. O composto B e o composto C foram administrados de forma intravenosa durante 20 segundos, e uma série dinâmica de varrimentos PET foi obtida durante 90 minutos utilizando-se 26 quadros de comprimento crescente (6 x 20 segundos; 4 x 30 segundos; 6 x 60 segundos; 4 x 5 minutos; 6 x 10 minutos). Aproximadamente 185 MBq (-5 mCi) de um Composto B ou Composto C com elevada atividade específica (> 14,8 GBq/pmol) foram injetados num babuíno. Noutros estudos, foram injetados 148-296 MBq (4-8 mCi) de um radio-pesquisador PET referência com elevada atividade específica (> 18,5 GBq/ μmol), incluindo quer [^{11}C](+) McN5652, [carbonil- ^{11}C]WAY100635 ou [^{18}F]altanserina. Os dados de PET foram reconstruídos utilizando-se um filtro Hanning (corte Nyquist) e corrigidos para o decaimento, atenuação fotónica e espalhamento.

Um varrimento de MRI foi obtido para cada babuíno utilizando-se um scanner 1,5T GE Sigma (GE Medical Systems, Milwaukee, WI) equipado com uma bobina padrão. Uma sequência RM volumétrica do tipo "*spoiled gradient recalled*" (SPGR) com parâmetros para alto contraste entre a matéria cinzenta, matéria branca e fluido espino-cerebral (CSF) foi obtida no plano coronal (TE = 5, TR = 24, ângulo de arremesso = 40° , espessura de lâmina = 1,5 mm, NEX = 2, campo de visão 12 cm, tamanho de voxel = 0,94 x 1,25 x 1,5 mm). A imagem de RM para cada babuíno individual foi co-registrada para os dados PET utilizando-se um algoritmo de registo de imagem automático (AIR) para realinhamento e refatiamento de imagem no modo cruzado. Os 16 quadros iniciais (0-9 minutos após injeção) das imagens PET dinâmicas foram somados em conjunto em imagens consistindo de um único quadro. Antes do co-registo, ambas as imagens de MR e as de PET somadas foram editadas utilizando-se o

pacote de programas ANALYZE (Mayo Clinic, Rochester, MN) para remover os tecidos extra-cerebrais que poderiam possivelmente confundir o processo de co-registo. As imagens de MR editadas foram então co-registadas para a imagem somada de PET e re-fatiadas para produzir imagens de MR com a mesma orientação espacial e resolução das imagens PET somadas. O co-registo de conjuntos de dados de RM e PET no babuíno demonstrou ser uma aplicação confiável e robusta do método AIR.

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

A Figura 15 mostra uma curva de atividade no tempo de PET representativa (TAC) de radioatividade em três regiões cerebrais de um babuíno após a injeção intravenosa do composto B. As TACs indicam uma excelente penetração no cérebro da radioatividade a pontos no tempo iniciais (cerca de 0,40% ID-kg/g, em acordo razoável com a penetração cerebral do composto B em murganhos a 2 minutos após a injeção) em todas as três regiões e libertação relativamente rápida da radioatividade regional de 0-90 minutos após a injeção no cérebro deste babuíno de controlo. As regiões do cérebro contendo níveis mais altos de matéria branca demonstraram concentrações algo mais

elevadas (-30%) de radioatividade aos 90 minutos que as regiões que eram dominadas pela matéria cinzenta tal como o córtex temporal. A concentração de radioatividade no córtex de babuíno foi aproximadamente idêntica à do córtex cerebelar em todos os pontos no tempo. A taxa de liberação da radioatividade foi consideravelmente mais lenta no cérebro de babuíno que no cérebro de murganho, com o Composto B exibindo um meio-tempo de liberação de cerca de 17 minutos da matéria cinzenta de babuíno. O Composto B radio-pesquisador exibiu uma concentração de radioatividade no cérebro de precoce a tardia no cérebro de babuíno de cerca de 4, indicando que apenas cerca de 25% da radioatividade máxima permanecia no cérebro a pontos no tempo tardios. Estes resultados foram consistentes com a ausência esperada de placas de amiloide nos cérebros destes animais de controlo e indicaram que muito pouca radioatividade foi retida no cérebro de babuíno normal. A comparação do comportamento *in vivo* do composto B em cérebro de babuíno com aquele da entrada e libertação de outros radioligandos PET de sucesso numa região cerebral de referência destituída de sítios de ligação específica (isto é, cerebello) foi útil.

A Figura 16 compara as TACs cerebelares em babuínos de [carbonil-¹¹C]WAY100635, [¹¹C](+)-McN5652, [¹⁸F]altanserina e Composto B. As taxas de libertação de ligação não específica relativamente rápidas de [carbonil-¹¹C]WAY100635 e [¹⁸F]altanserina são importantes para o sucesso destes radioligandos de PET para a imagiologia de sistemas de recetor de serotonina 5-HT_{1A} e serotonina 5-HT_{2A}. Em contraste, a libertação relativamente lenta *in vivo* de [¹¹C](+)-McN5652 limitou a utilidade deste radioligando para a imagiologia do sistema transportador de serotonina. As propriedades de libertação cerebral do Composto B indicaram que a taxa relativamente rápida de libertação não

específica deste radio-pesquisador ($t_{1/2} = 17$ minutos) foi semelhante à de outros agentes de imagiologia neuroreceptores PET úteis.

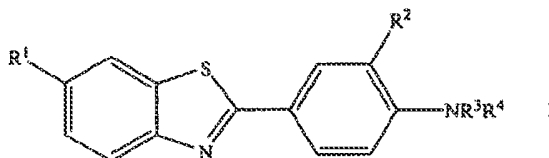
A Figura 17 mostra uma TAC PET representativa de radioatividade em três regiões do cérebro de um babuíno após a injeção intravenosa do Composto C. As TACs indicam excelente penetração cerebral da radioatividade a pontos no tempo iniciais (cerca de 0,22% ID-kg/g, bem de acordo com a penetração cerebral do composto C em murganhos a 2 minutos após a injeção) em todas as três regiões e liberação relativamente alta de radioatividade regional de 0-90 minutos pós injeção no cérebro deste babuíno de controlo. As regiões do cérebro contendo níveis mais elevados de matéria branca demonstraram concentrações ligeiramente mais altas (< 10%) de radioatividade aos 90 minutos que as regiões que eram dominadas pela matéria cinzenta tal como o córtex temporal. A concentração da radioatividade no córtex de babuíno foi aproximadamente idêntica à do córtex cerebelar em todos os pontos no tempo. A taxa de liberação de radioatividade foi consideravelmente mais lenta do cérebro de babuíno que a de cérebro de murganho, com o Composto C exibindo um meio-tempo de libertação de cerca de 10 minutos da matéria cinzenta de babuíno. O Composto C radio-pesquisador exibiu uma concentração de radioatividade no cérebro de precoce a tardia no cérebro de babuíno de cerca de 6, indicando que apenas cerca de 15% da radioatividade máxima permanecia no cérebro a pontos no tempo tardios. Estes resultados foram consistentes com a ausência esperada de placas de amiloide nos cérebros destes animais de controlo e indicaram que muito pouca radioatividade foi retida no cérebro de babuíno normal. A comparação do comportamento *in vivo* do Composto C em cérebro de babuíno com o de entrada e libertação de outros radioligandos PET de sucesso numa região cerebral de

referência destituída de sítios de ligação específica (isto é, cerebelo) foi útil.

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

REIVINDICAÇÕES

1. Um composto de fórmula I



ou um seu sal hidrato ou solvato farmacêuticamente aceitável, em que:

R¹ é hidrogénio, -OH, -NO₂, -CN, -COOR, -OCH₂OR, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alcenilo, C₂-C₆ alcinilo, C₁-C₆ alcoxi ou halogeno, em que um ou mais dos átomos de R¹ é opcionalmente um átomo radiomarcado;

R é C₁-C₆ alquilo, em que um ou mais dos átomos de carbono é opcionalmente um átomo radiomarcado;

R² é um radiofluoro;

R³ é hidrogénio, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alcenilo ou C₂-C₆ alcinilo; e

R⁴ é hidrogénio, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alcenilo ou C₂-C₆ alcinilo.

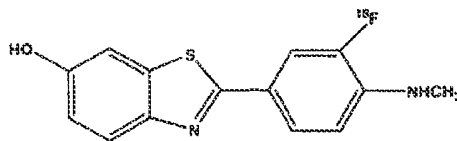
2. O composto da reivindicação 1, em que:

R¹ é -OH ou C₁-C₆ alcoxi;

R² é ¹⁸F; e

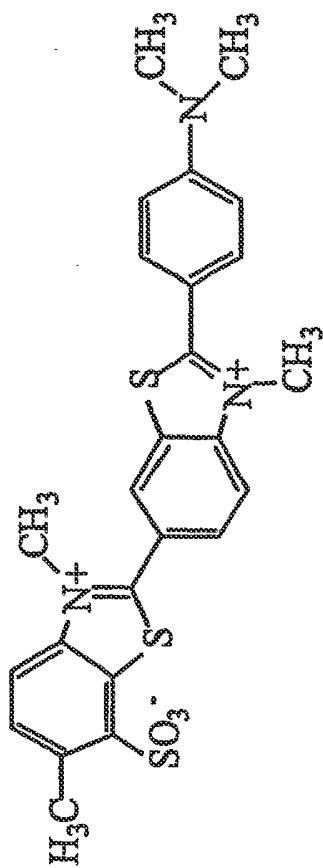
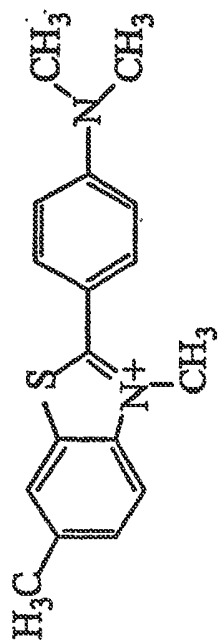
R³ e R⁴ são independentemente hidrogénio ou C₁-C₆ alquilo.

3. Um composto da reivindicação 2, possuindo a seguinte estrutura:



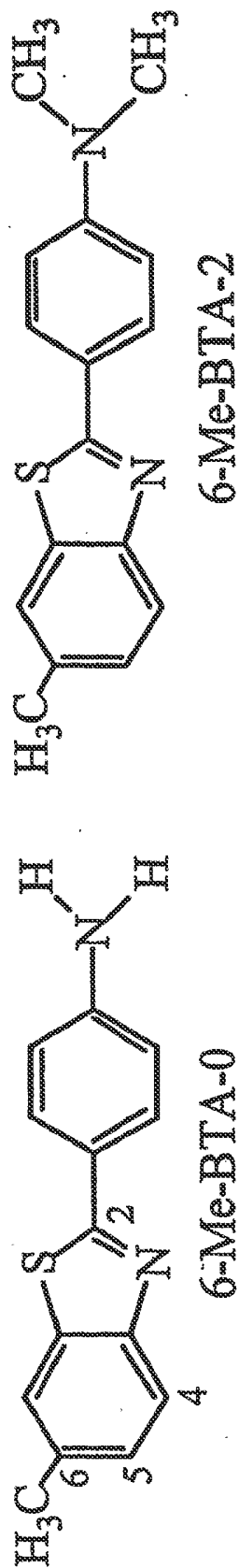
4. Uma composição farmacêutica compreendendo
- (i) uma quantidade efetiva de um composto de qualquer uma das reivindicações 1-3 e
 - (ii) um veículo farmacêuticamente aceitável
5. Utilização de um composto de acordo com qualquer das reivindicações 1-3 para a preparação de uma composição para uso na detecção de depósitos de amiloide *in vivo* num mamífero.

FIG. 1

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

Tioflavina T (ThT)

FIG. 2



6-Me-BTA-2

6-Me-BTA-0

FIG. 3

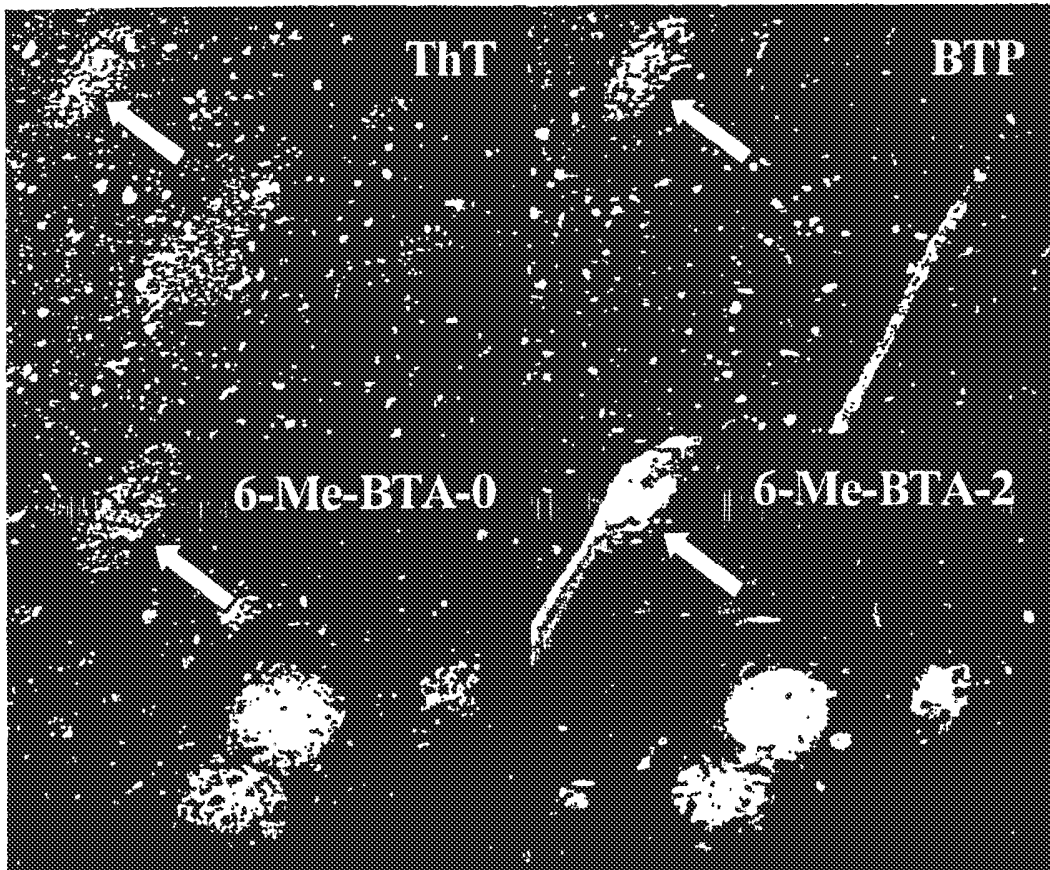


FIG. 4

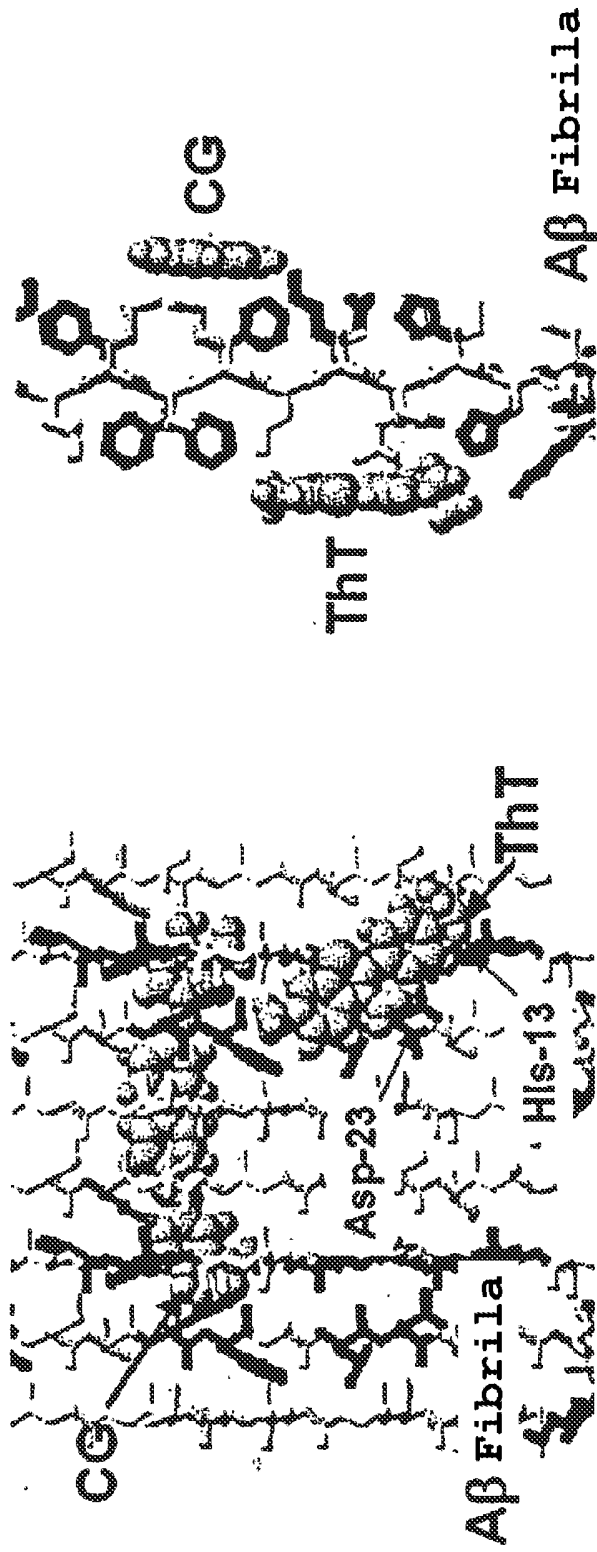
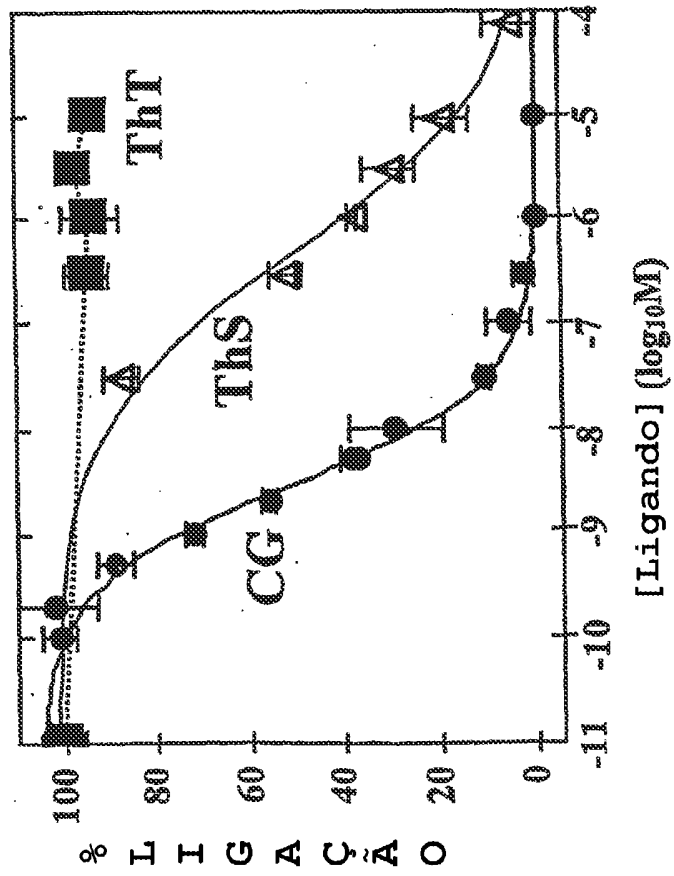
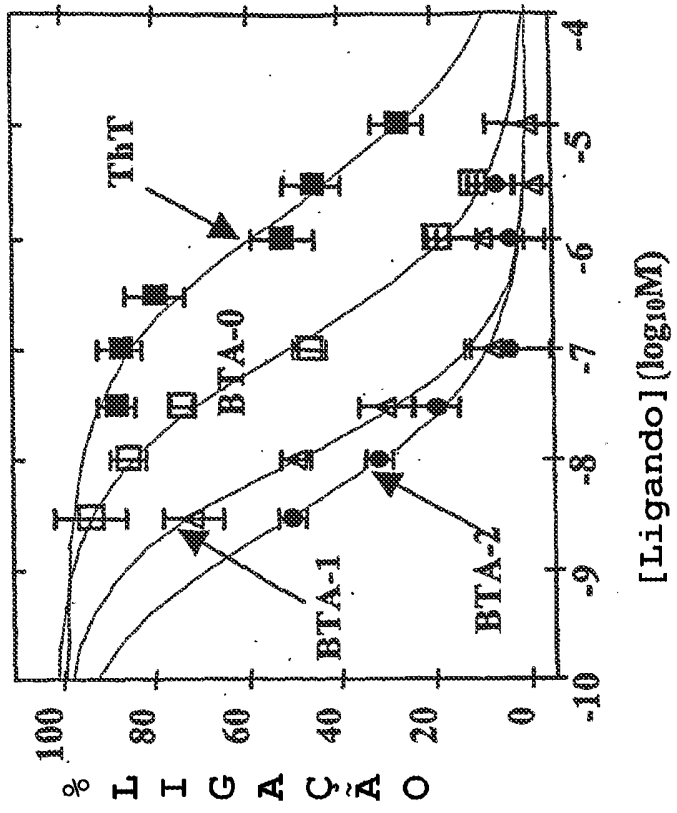


FIG. 5



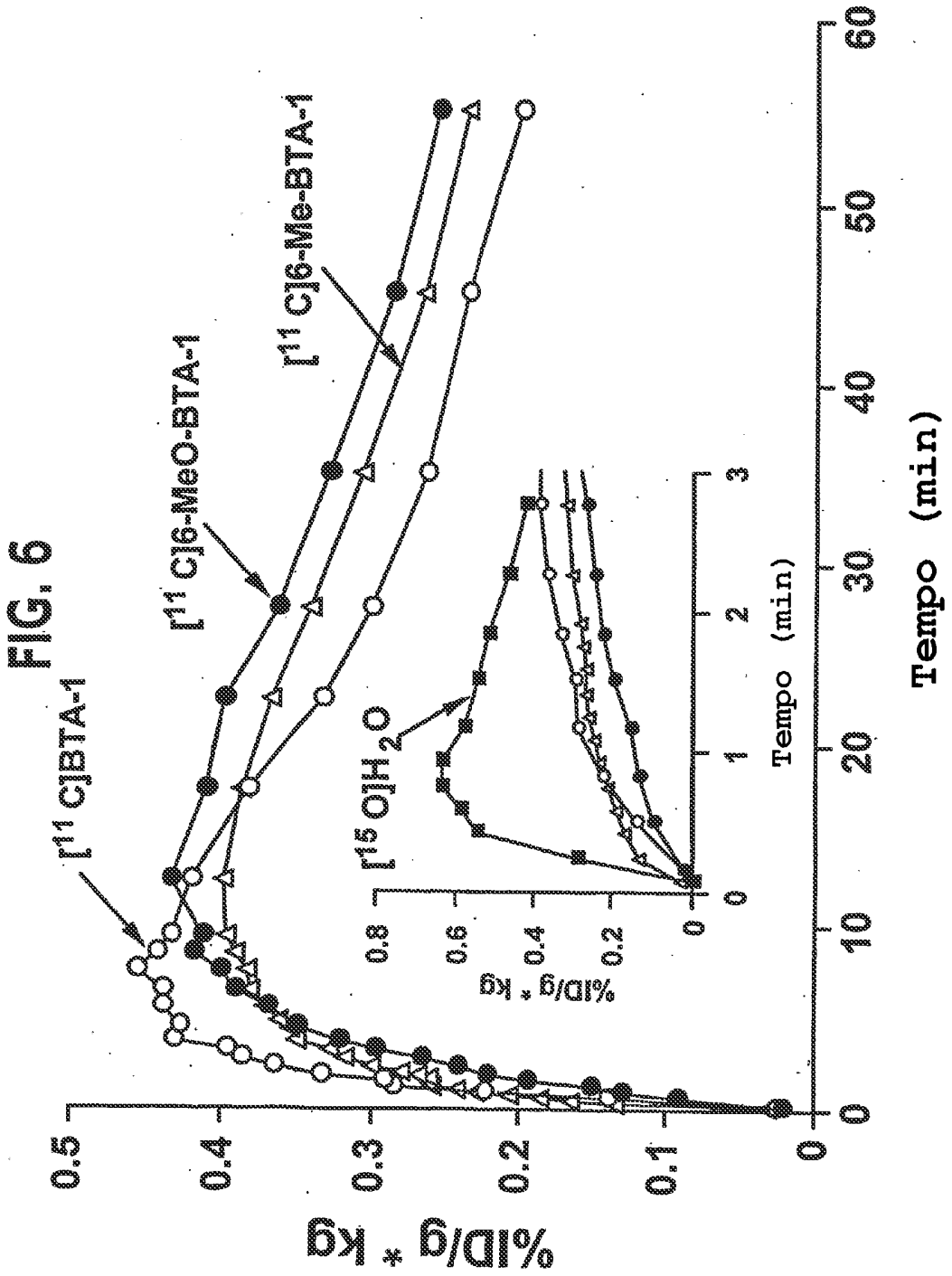


FIG. 7

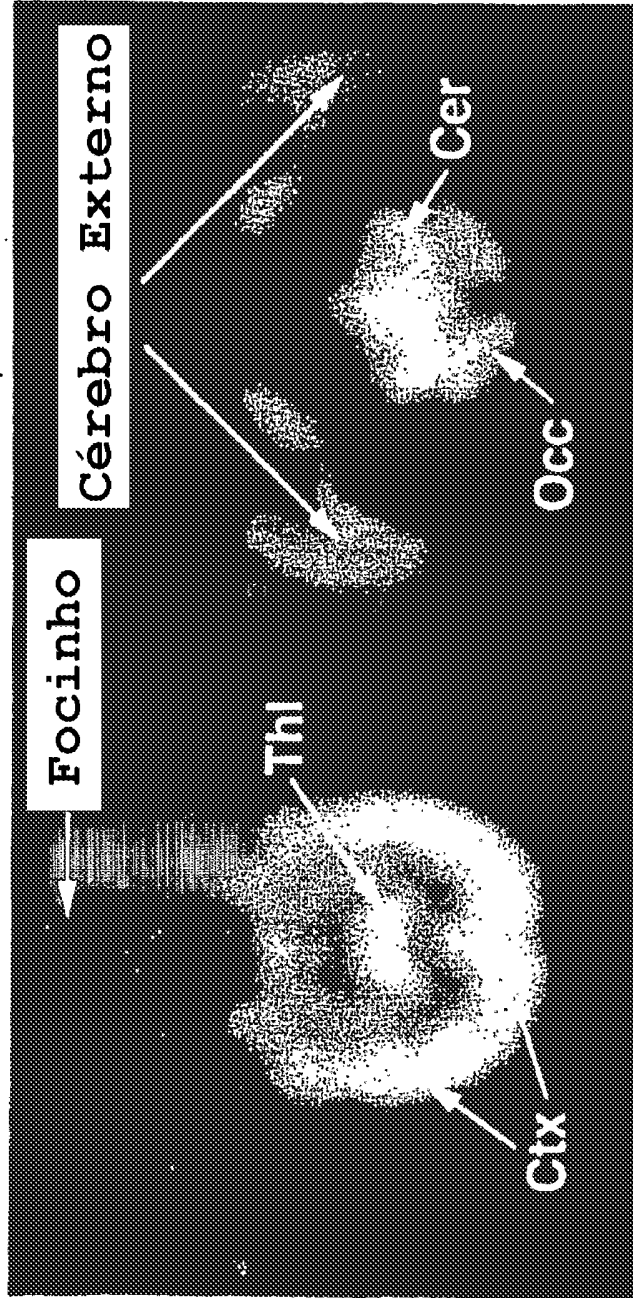


FIG. 8

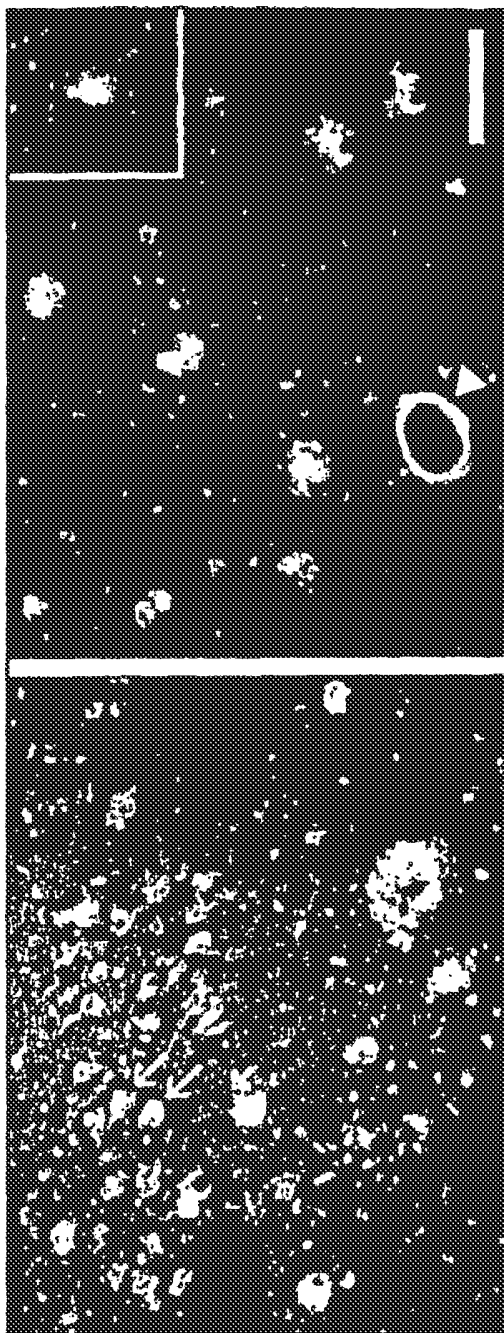


FIG. 9

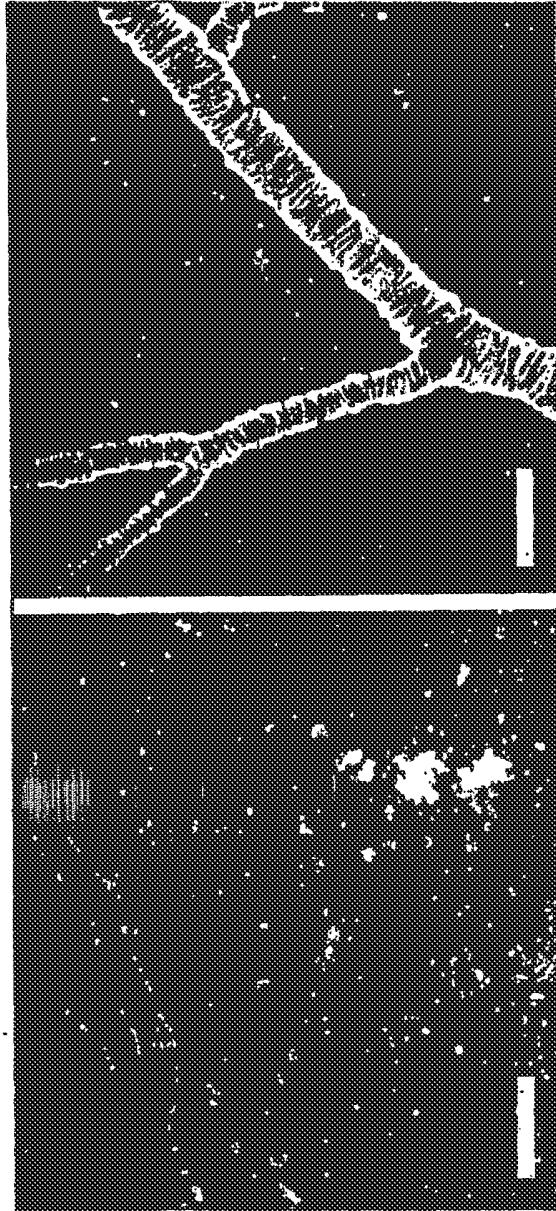


Figura 10

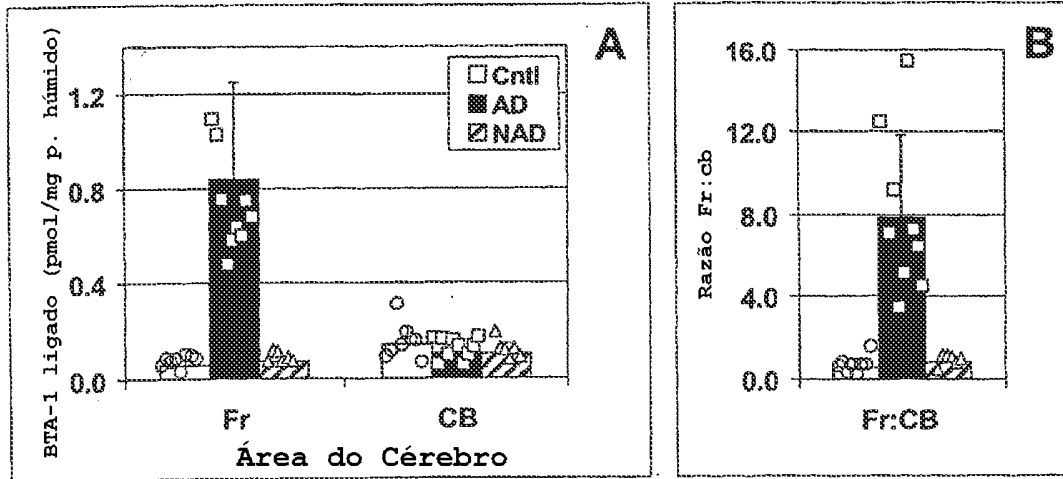


Figura 11

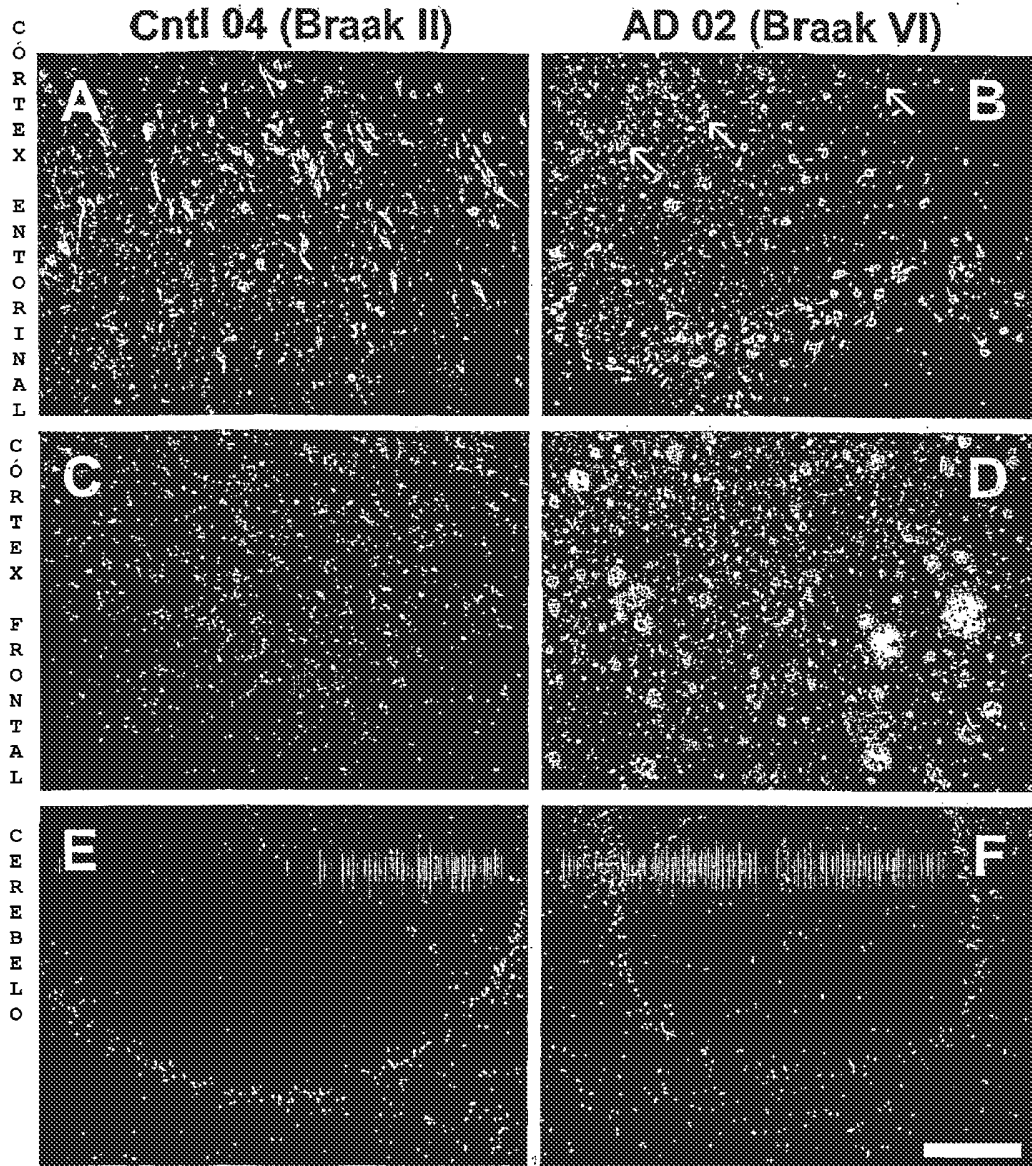


FIGURA 12

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

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

*EC: córtex endotorinal; Fr: Frontal; Cb: cerebelo

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

Figura 13

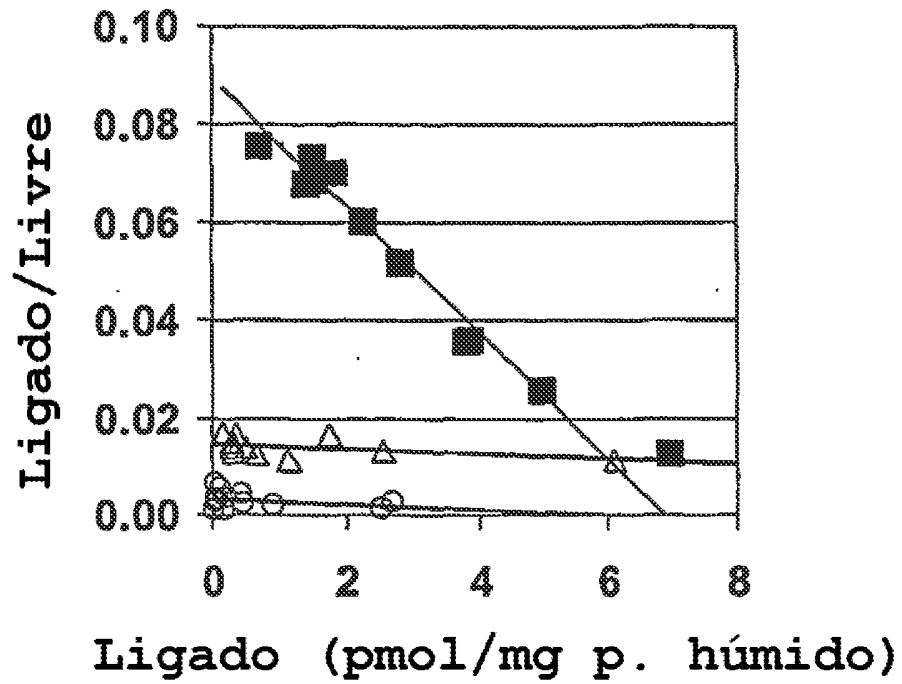
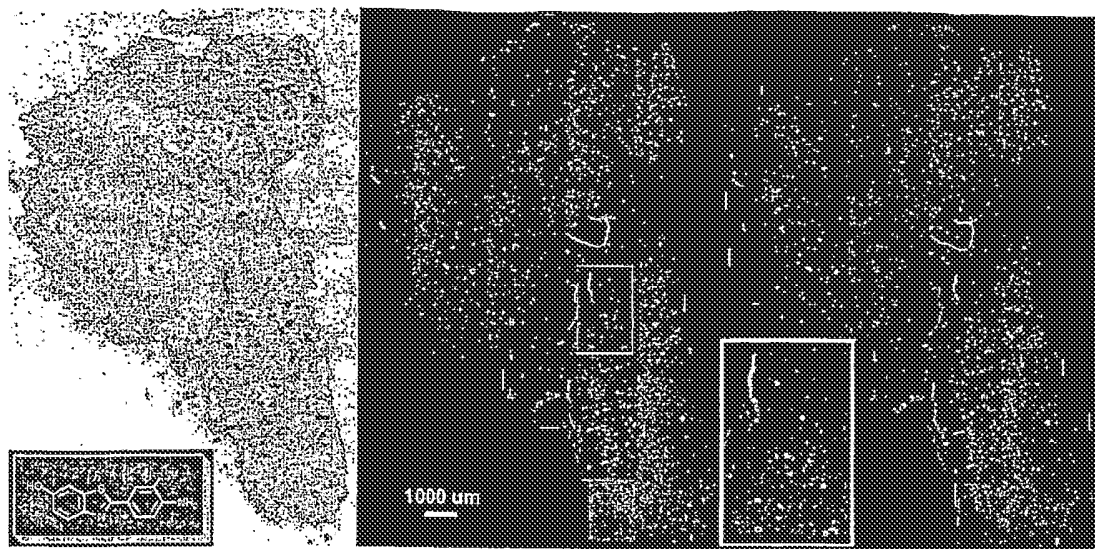


FIGURA 14



Composto B

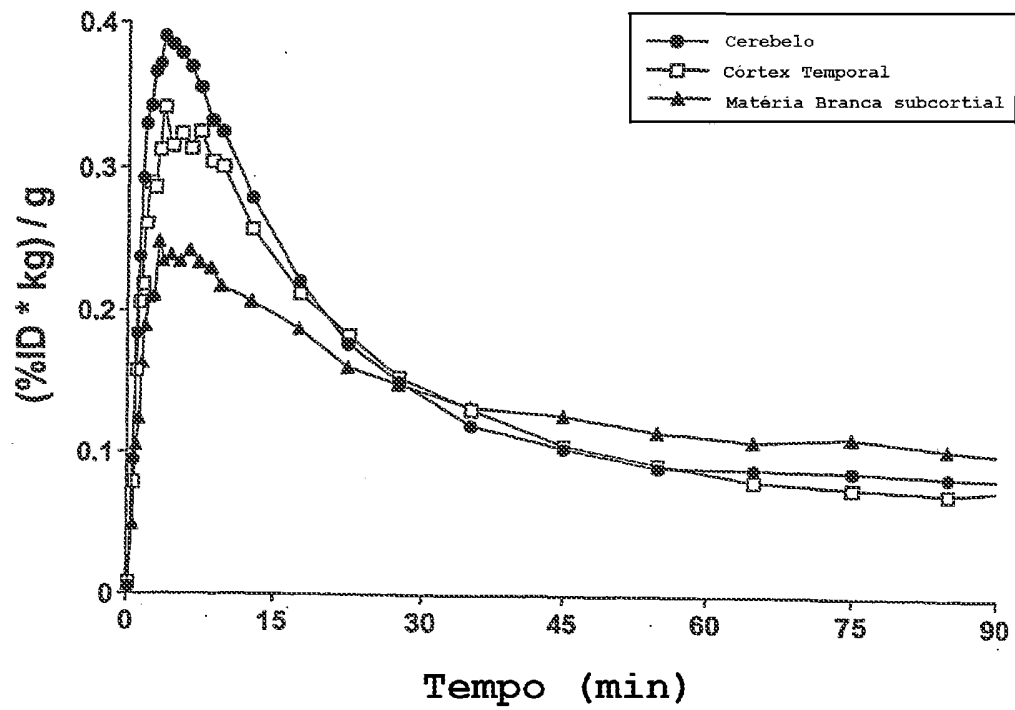


FIGURA 15

Cerebello

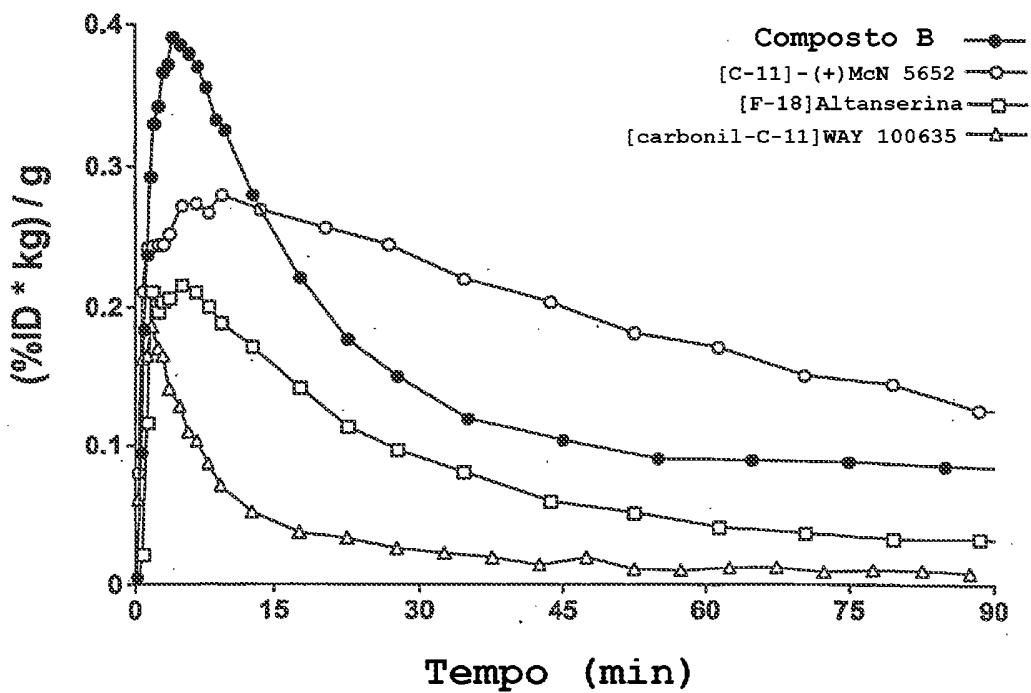


FIGURA 16

Composto C

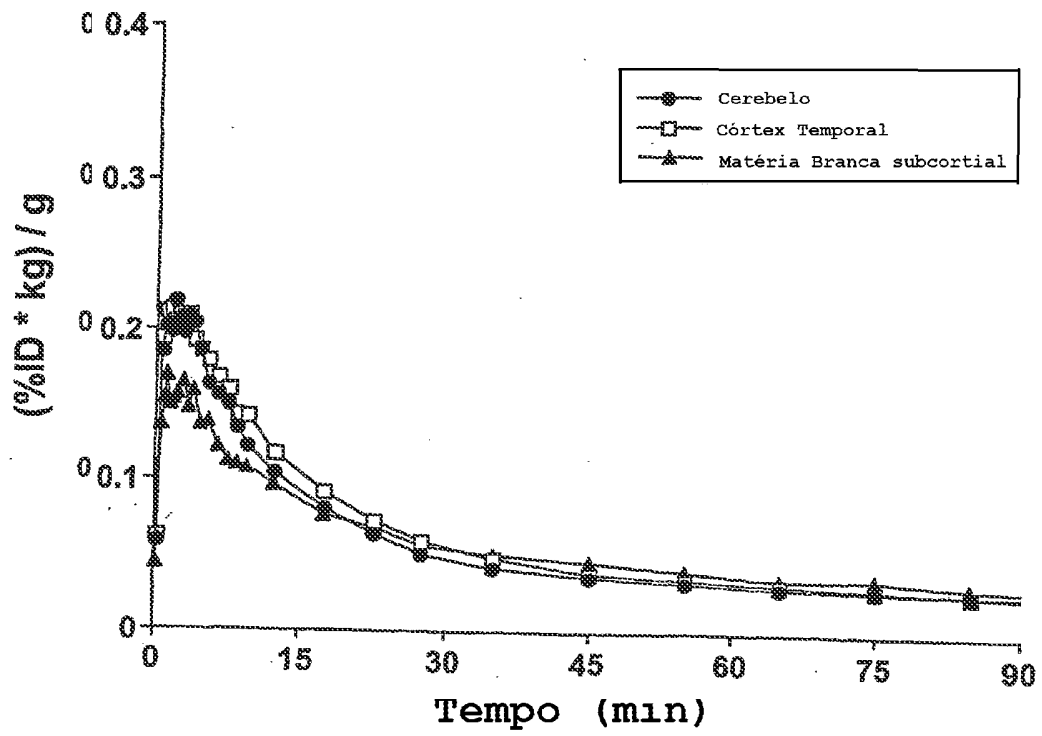


FIGURA 17

Cerebello

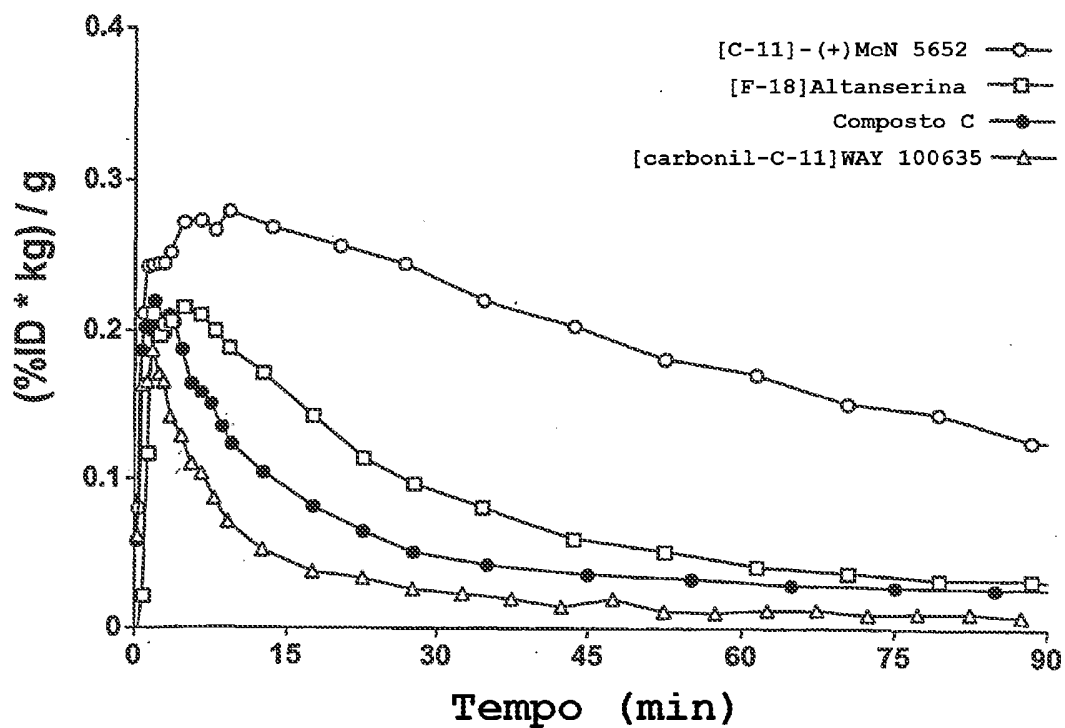


FIGURA 18