

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 987**

51 Int. Cl.:  
**C07D 307/79** (2006.01)  
**A61K 51/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06825654 .4**  
96 Fecha de presentación: **10.10.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1945622**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.07.2008**

54 Título: **Compuestos de benzofurano marcados isotópicamente como radiotrazadores para proteínas amiloidógenas**

30 Prioridad:  
**11.10.2005 US 724782 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.05.2012**

73 Titular/es:  
**UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE  
COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER  
EDUCATION  
200 GARDNER STEEL CONFERENCE CENTER  
THACKERAY & O'HARA STREETS  
PITTSBURGH, PA 15260, US**

72 Inventor/es:  
**KLUNK, William, E. y  
MATHIS, JR., Chester, A.**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 379 987 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Compuestos de benzofurano marcados isotópicamente como radiotrazadores para proteínas amiloidógenas.

## CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere de forma general al campo de los compuestos de benzofurano marcados isotópicamente que son sustrato de proteínas amiloidógenas, por ejemplo, A $\beta$ 1-42, una proteína amiloide, cuyos depósitos en el cerebro se relacionan con la enfermedad de Alzheimer.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

## I. AMILOIDOSIS EN EL CEREBRO

10 La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida de memoria y otros trastornos cognitivos. McKhann et al., *Neurology* 34: 939 (1984). Es la causa más frecuente de demencia en los Estados Unidos. La EA puede afectar a personas de tan solo 40-50 años de edad; sin embargo, dado que es difícil de determinar la presencia de la enfermedad sin una biopsia del cerebro, que siempre es peligrosa, se desconoce el momento de su aparición. La prevalencia de la EA se incrementa con la edad, y se estima que puede llegar a verse afectada hasta el 40-50% de la población hacia los 85-90 años de edad. Evans et al., *JAMA* 262: 2551 (1989); Katzman, *Neurology* 43:13 (1993).

15 Los estudios sugieren que el depósito de amiloide en el cerebro es un acontecimiento causal temprano durante la patogenia de la enfermedad de Alzheimer (EA). La progresión del depósito de amiloide da lugar a la formación de placas neuríticas y ovillos neurofibrilares en regiones del cerebro que están relacionadas con el aprendizaje y la memoria. Una placa neurítica de Alzheimer típica comprende axones distróficos alrededor de un núcleo de material de amiloide. El componente principal del núcleo de amiloide es una proteína denominada amiloide- $\beta$  (A $\beta$ ).

20 En la práctica, la EA se diagnostica definitivamente mediante la evaluación del tejido cerebral, normalmente en la autopsia. Khachaturian, *Arch. Neurol.* 42: 1097 (1985); McKhann et al., *Neurology* 34: 939 (1984). Desde el punto de vista neuropatológico, esta enfermedad se caracteriza por la presencia de placas neuríticas (PN), ovillos neurofibrilares (ONF) y neuropenia, junto con otros muchos hallazgos. Mann, *Mech. Ageing Dev.* 31: 213 (1985). Los cortes de tejido encefálico tras la muerte de los enfermos de Alzheimer muestran la presencia de la amiloide en forma de núcleos extracelulares proteínicos de las placas neuríticas que caracterizan la EA.

25 Los núcleos de amiloide de estas placas neuríticas están formados por una proteína llamada amiloide  $\beta$  (A $\beta$ ) cuya disposición predominante es en una configuración de lámina de hojas  $\beta$ . Mori et al., *Journal of Biological Chemistry* 267: 17082 (1992); Kirschner et al., *PNAS* 83: 503 (1986). Las placas neuríticas son un aspecto temprano e invariable de la enfermedad. 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).

30 El depósito inicial de la A $\beta$  probablemente se produce mucho antes de que los síntomas clínicos sean apreciables. Los «criterios microscópicos mínimos» recomendados en la actualidad para el diagnóstico de la EA se basan en el número de placas neuríticas encontradas en el cerebro. Khachaturian, *Arch. Neurol.* (1985), véase más arriba. Sin embargo, la valoración del número de placas neuríticas hay que retrasarlo hasta después de la muerte.

35 Las placas neuríticas que contienen la amiloide son una característica prominente de determinadas áreas del cerebro de la EA, así como del síndrome de Down y de las personas homocigotas para el alelo apolipoproteína E4, que son muy propensas a desarrollar la EA. Corder et al., *Science* 261: 921 (1993); Divry, P., *J. Neurol. Psych.* 27: 643-657 (1927); Wisniewski et al., en Zimmerman, H. M. (ed.): *Progress in Neuropathology* (Grune y Stratton, N.Y. 1973) págs. 1-26.

40 La amiloide en el cerebro se pone de manifiesto con facilidad mediante la tinción de cortes del cerebro con tioflavina S o rojo Congo. Puchtler et al., *J. Histochem. Cytochem.* 10: 35 (1962). La amiloide teñida con rojo Congo se caracteriza por una apariencia dicroica, que muestra un color de polarización amarillo-verdoso. La fijación dicroica es el resultado de una estructura de lámina de hojas  $\beta$  de las proteínas amiloides. Glenner, G. N. *Eng. J. Med.* 302: 1283 (1980). Se puede encontrar una explicación detallada de la bioquímica y de la histoquímica de la amiloide en Glenner. *N. Eng. J. Med.*, 302: 1333 (1980).

45 Hasta ahora, el diagnóstico de la EA se ha conseguido principalmente mediante la evaluación de criterios clínicos, biopsias del cerebro y estudios hitológicos tras la muerte. Los esfuerzos en la investigación para el desarrollo de métodos para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer *in vivo* incluyen pruebas genéticas, métodos de inmunoensayo y técnicas de diagnóstico por imagen.

50 Las pruebas de que las anomalías del metabolismo de la A $\beta$  son necesarias y suficientes para el desarrollo de la EA se basan en el descubrimiento de mutaciones puntuales en la proteína precursora A $\beta$  en varias familias infrecuentes con una forma dominante autosómica de EA. Hardy, *Nature Genetics*, 1: 233 (1992); Hardy et al., *Science* 256: 184 (1992). Estas mutaciones aparecen cerca de los puntos de escisión del extremo amino y del extremo carboxilo

necesarios para la generación de la A $\beta$  a partir de su proteína precursora. St. George-Hyslop et al., *Science* 235: 885 (1987); Kang et al., *Nature* 325: 733 (1987); Potter, patente internacional WO 92/17152. Sin embargo, el análisis genético de un gran número de familias de EA ha demostrado que la EA es heterogénea desde el punto de vista genético. St. George-Hyslop et al., *Nature* 347: 194 (1990). El ligamiento a los marcadores del cromosoma 21 se ha demostrado sólo en algunas familias de EA de aparición precoz, y en ninguna familia de EA de aparición tardía. Más recientemente, Sherrington et al., *Nature*, 375: 754-760 (1995) han identificado un gen en el cromosoma 14 cuyo producto se predice que contiene varios dominios transmembranarios y que se parece a una proteína integral de la membrana. Este gen puede dar cuenta de hasta el 70% de las EA dominantes autosómicas de aparición temprana. Los datos preliminares sugieren que la mutación de este cromosoma 14 ocasiona un incremento de la síntesis de la A $\beta$ . Scheuner et al., *Soc. Neurosci. Abstr.* 21: 1500 (1995). Se ha identificado una mutación en un gen muy similar en el cromosoma 1 de los alemanes emparentados de la región del Volga con una EA de aparición temprana. Levy-Lahad et al., *Science* 269: 973-977 (1995).

Se ha sugerido que la detección selectiva de genotipos con apolipoproteína E proporciona una ayuda para el diagnóstico de la EA. Scott. *Nature*, 366: 502 (1993); Roses, *Ann. Neurol.* 38: 6-14 (1995). Sin embargo, surgen dificultades con esta tecnología, porque el alelo apolipoproteína E4 es sólo un factor de riesgo para la EA, no un marcador de la enfermedad. Está ausente en muchos pacientes con EA y presente en muchas personas ancianas sin demencia. Bird, *Ann. Neurol.* 38: 2-4 (1995).

Se han desarrollado métodos de inmunoensayo para detectar la presencia de marcadores neuroquímicos en los pacientes con la EA y para detectar una proteína amiloide relacionada con la EA en el líquido cefalorraquídeo. Warner, *Anal. Chem.* 59: 1203A (1987); patente internacional n.º 92/17152 de Potter; Glenner et al., patente de los EE.UU. n.º 4 666 829. Estos métodos para el diagnóstico de la EA no se ha demostrado que detecten la EA en todos los pacientes, en particular en las etapas iniciales de la enfermedad, y son relativamente invasivos al requerir una punción lumbar. También se ha intentado desarrollar anticuerpos monoclonales como sondas para los diagnósticos por imagen de la A $\beta$ . Majocha et al., *J. Nucl. Med.*, 33: 2184 (1992); Majocha et al., patente internacional WO 89/06242 y Majocha et al., patente de los EE.UU. n.º 5 231 000. La desventaja principal de las sondas inmunoglobulínicas es la dificultad para conseguir que estas grandes moléculas atraviesen la barrera hematoencefálica. La utilización de anticuerpos para el diagnóstico *in vivo* de la EA requeriría que la barrera hematoencefálica presentara anomalías notables para que pudieran llegar al cerebro. No hay ninguna prueba funcional convincente de que en la EA existan de verdad anomalías de la barrera hematoencefálica. Kalara, *Cerebrovascular & Brain Metabolism Reviews*, 4: 226 (1992).

El péptido A $\beta$  radiomarcado se ha utilizado para marcar placas difusas, compactas y de tipo neurítico en los cortes de cerebro con EA. Véase Maggio et al., patente internacional WO 93/04194. Sin embargo, estos péptidos comparten todas las desventajas de los anticuerpos. Específicamente, los péptidos no suelen atravesar la barrera hematoencefálica en la cantidad necesaria para las técnicas de imagen y, dado que estas sondas reaccionan con las placas difusas, no pueden ser específicas para la EA.

Las placas neuríticas y los ovillos neurofibrilares son los dos distintivos patológicos más característicos de la EA. Klunk y Abraham, *Psychiatric Development*, 6: 121-152 (1988). Las placas son lo primero que aparece en la neocorteza, donde se encuentran distribuidas de forma relativamente homogénea. Thal et al., *Neurology* 58: 1791-1800 (2002). Los ovillos aparecen primero en las áreas límbicas tales como la corteza transentorrinal y progresa en un patrón topográfico predecible hacia la neocorteza. Braak y Braak, *Acta Neuropathologica* 82: 239-259 (1991). Arnold et al. cartografiaron la distribución de los ONF y de las placas neuríticas en el cerebro de los pacientes con EA. Arnold et al., *Cereb. Cortex* 1: 103-116 (1991). En comparación con los ONF, las placas neuríticas se distribuían, en general, más homogéneamente por toda la corteza, con las excepciones de que en la perialocorteza y en la allocorteza límbicas (las áreas con la mayor densidad de ONF) aparecen notablemente menos placas neuríticas. Con la tinción de tioflavina S, los lóbulos temporal y occipital tenían la densidad de placas neuríticas más elevada, los lóbulos límbico y frontal tenían las más bajas, y el lóbulo parietal era intermedio. Arriagada et al., *Neurology*, 42: 1681-1688 (1992). Arriagada et al estudiaron la distribución topográfica de los cambios patológicos de tipo EA en el cerebro de los ancianos supuestamente sin demencia. Sus observaciones sugieren que la mayoría de los individuos mayores de 55 años tienen al menos unos pocos ONF y placas. Los subtipos de SP definidos desde el punto de vista inmunohistoquímico tenían patrones diferentes de distribución, presentando placas inmunorreactivas mucho mayores a la A $\beta$  en las áreas neocorticales que en las áreas límbicas, y las placas inmunorreactivas Alz-50 eran infrecuentes y se limitaban a esas áreas que contenían las neuronas positivas para Alz-50 y los ONF. Estos patrones sugerían que los procesos patológicos que conducen a ONF y SP en el envejecimiento y en la EA tenían puntos en común.

Se sigue debatiendo sobre si las placas y los ovillos son subproductos del proceso neurodegenerativo encontrado en la EA, o si son la causa de la muerte 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). Las pruebas de que la pérdida de la sinapsis neocortical e hipocámpica se correlaciona bien con el estado cognitivo premórbido son claras. Algunos investigadores sugieren que la alteración de la estructura y del funcionamiento de los microtúbulos, provocado por la hiperfosforilación de la proteína asociada a los microtúbulos,  $\tau$ , desempeña una función clave y causal en la pérdida de la sinapsis en particular y en la EA en general. Terry, *J. of Neuropath & Exp.*

Neurol. 55: 1023-1025 (1996); Terry, *J. of Neural Transmission – Suppl.* 53: 141-145 (1998). Se ha propuesto que el daño oxidativo y la rotura de la membrana desempeñan funciones importantes en la EA. Perry, *Free Radical Biology & Medicine* 28: 831-834 (2000); Pettegrew et al., *Annals of the New York Academy of Sciences* 826: 282-306 (1997). Los factores vasculares que incluyen la hipoperfusión cerebral crónica sutil también se piensa que intervienen en la patogenia de la EA. 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). Mientras que todos estos factores es probable que desempeñen una cierta función en la patogenia de la EA, cada vez hay más indicios que apuntan a anomalías en el procesamiento del péptido amiloide- $\beta$  (A $\beta$ ), un péptido de 4 kDa que se agrega en una estructura fibrilar de lámina de hojas  $\beta$ . Glenner y Wong, *Biochemical & Biophysical Research Communications* 120: 885-890 (1984). Se ha propuesto que la A $\beta$  desempeña una función importante en la patogenia de la EA por varias razones: 1) los depósitos de A $\beta$  son los primeros marcadores neuropatológicos de la EA en el síndrome de Down, y pueden preceder a la formación de ONF durante varias décadas. Mann et al., *Neurodegeneration* 1: 201-215 (1992); Naslund et al., *JAMA* 283: 1571-1577 (2000). 2) La amiloidosis  $\beta$  es relativamente específica de la EA y de los trastornos estrechamente relacionados; Selkoe, *Trends in Neurosciences* 16: 403-409 (1993); 3) la A $\beta$  es tóxica para las neuronas en cultivo, 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), una toxicidad que aparece como dependiente de la estructura secundaria de lámina  $\beta$  y de la agregación en al menos oligómeros. Lambert et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6448-6453 (1998); Pike et al., *J. Neuroscience* 13: 1676-1687 (1993); Simmons et al., *Molecular Pharmacology* 45: 373-379 (1994). Aunque la A $\beta$  seguramente existe en equilibrio distribuida a través de fracciones monoméricas, oligoméricas y fibrilares/de placas, la forma oligomérica de la A $\beta$  es la que se piensa que es el componente neurotóxico clave. Selkoe, *Alzheimer disease*, editado por R. D. Terry et al., págs. 293-310 Lippincott Williams and Wilkins, Filadelfia (1999); Selkoe, *Science* 298, 789-91 (2002). El reconocimiento de los efectos tóxicos de la A $\beta$  oligomérica ha supuesto una base con la que se han comprometido algunos de los que se oponen a la «hipótesis de la cascada amiloide» de la EA. Terry, *Ann. Neural.* 49: 684 (2001). Quizás la prueba más sólida de que la A $\beta$  interviene en la patogenia de la EA viene del hallazgo de mutaciones en el gen de la proteína precursora de amiloide (APP, por su nombre en inglés) que conducen a algunas formas de EA familiar de aparición temprana. Goate et al., *Nature*, 349: 704-706 (1991). Además, todas las formas familiares de la EA dominante autosómica tienen en común una gran cantidad de la forma de 42 aminoácidos de la A $\beta$ , que se agrega con más rapidez. Younkin Rinsho Shinkeigaku – *Clinical Neurology* 37: 1099 (1997). Por el contrario, no se ha demostrado que ninguna mutación en la proteína  $\tau$  ocasione la EA. En cambio, las mutaciones en  $\tau$  (cromosoma 17) están relacionadas con la demencia frontotemporal del párkinson. Goedert et al., *Neuron*. 21: 955-958 (1998). Los recientes resultados han demostrado que existe una buena correlación entre la concentración de la A $\beta$  en el cerebro y el declive cognitivo en la EA, y que el depósito de amiloide aparece como un acontecimiento muy temprano, quizás el primero, en la patogenia de la EA, precediendo a cualquier trastorno cognitivo. Naslund et al., *JAMA* 283: 1571-1577 (2000). La presencia de depósitos de amiloide puede modular una serie de vías bioquímicas que dan lugar al depósito de otras proteínas, a la activación de los astrogliocitos y de los microgliocitos y, finalmente, a la muerte celular neuronal y a la consiguiente disfunción cognitiva.

## II. AMILOIDOSIS LOCALIZADA Y SISTÉMICA

La amiloidosis es una afección de progresión lenta que puede conllevar una morbilidad significativa y muerte. Se clasifican como «amiloidosis» un grupo heterogéneo de procesos patológicos, la cual se caracteriza por depósitos extracelulares en tejidos, en uno o varios órganos, de diferentes proteínas fibrilares insolubles, que se denominan en general «amiloides», en una cantidad suficiente para alterar el funcionamiento normal.

Los depósitos de amiloide son extracelulares que no se metabolizan ni se eliminan del cuerpo. La amiloide se puede diferenciar macroscópicamente porque se tiñen con yodo de manera similar al almidón; de ahí el nombre de amiloide. Desde el punto de vista microscópico, la amiloide se diferencia por su distribución extracelular, por sus propiedades de tinción y ópticas cuando se tiñen con rojo Congo, y por su estructura proteica fibrilar. Así pues, al microscopio óptico, la amiloide es una sustancia homogénea muy refractante con afinidad por el colorante con rojo Congo, tanto en los tejidos fijados como *in vivo*. Al microscopio electrónico, la amiloide consiste en fibrillas no ramificadas lineales de 100 Å (10 nm); con la difracción de rayos X tiene un patrón de cruces  $\beta$ .

Las enfermedades relacionadas con la amiloidosis están todas tipificadas por una acumulación de depósitos de amiloide. Los depósitos de amiloide se caracterizan por la presencia de una o más proteínas amiloidógenas, que proceden de proteínas precursoras que, o bien tienen una estructura anormal, o bien están anormalmente altas en el suero.

Se desconoce la causa de la producción de amiloide y su depósito en los tejidos. Los mecanismos etiológicos pueden variar en los diferentes tipos bioquímicos de amiloidosis. En la amiloidosis secundaria, por ejemplo, puede existir un metabolismo defectuoso de la proteína precursora (el reactivo de fase aguda: amiloide A del suero), mientras que en la amiloidosis hereditaria está presente una variante genética de la proteína. En la amiloidosis primaria, una población monoclonal de células de la médula sintetiza cadenas ligeras completas o fragmentos de ellas que pueden procesarse anormalmente para formar la amiloide.

Desde el punto de vista bioquímico, se han definido tres tipos principales de amiloide y varias formas menos frecuentes: el primer tipo, que tiene una secuencia en el extremo amino que es homóloga a una porción de la región

variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, se denomina AL y aparece en la amiloidosis primaria y en la amiloidosis relacionada con el mieloma múltiple. El segundo tipo tiene una secuencia única en el extremo amino de una proteína no inmunoglobulínica denominada proteína AA y aparece en los pacientes con amiloidosis secundaria. El tercer tipo, que está relacionado con una polineuropatía amiloide familiar, es normalmente una molécula de transtirretina (prealbúmina) que tiene una única sustitución de aminoácido. Se han encontrado otras amiloides hereditarias que consisten en gelsolina mutante en algunas familias, la apolipoproteína A-I mutante en otras, y otras proteínas mutantes en la amiloide hereditaria en la arteria cerebral. En la amiloide relacionada con la hemodiálisis crónica, la microglobulina 2 es la que forma la proteína amiloide. La amiloide relacionada con el envejecimiento de la piel y con los órganos endocrinos puede representar otras formas bioquímicas de amiloidosis. La amiloide encontrada en las lesiones histopatológicas de la enfermedad de Alzheimer consiste en proteínas. Los análisis químicos en relación con distintas formas de amiloidosis han conducido a una clasificación más refinada. Una proteína única, una pentraxina denominada AP (o AP del suero) está relacionada universalmente con todas las formas de amiloide y constituye la base de un ensayo diagnóstico.

En la actualidad se reconocen tres formas clínicas sistémicas principales. La amiloidosis se clasifica como primaria o idiopática (forma AL) cuando no hay una enfermedad asociada, y secundaria, adquirida o reactiva (forma AA) cuando se relaciona con enfermedades crónicas, bien infecciosas (tuberculosis, bronquiectasia, osteomielitis, lepra) o inflamatorias (artritis reumatoide, íleo granulomatoso). La amiloide también se relaciona con mieloma múltiple (AL), enfermedad de Hodgkin (AA), otros tumores, y la fiebre mediterránea familiar (AA). La amiloidosis puede acompañar al envejecimiento. El tercer tipo principal aparece en las formas familiares que no están relacionadas con otra enfermedad, a menudo con tipos distintivos de neuropatía, nefropatía y cardiopatía.

En la amiloidosis primaria (AL) se pueden ver afectados corazón, pulmón, piel, lengua, glándula tiroidea e intestinos. Se pueden encontrar «tumores» de amiloide localizados en las vías respiratorias u otros sitios. Suelen verse afectados con frecuencia los órganos parenquimatosos (hígado, bazo, riñón) y el sistema vascular, especialmente el corazón.

La amiloidosis secundaria (AA) muestra una preferencia por bazo, hígado, riñón, glándulas suprarrenales y ganglios linfáticos. Sin embargo, no se escapa ningún sistema orgánico, y la afectación vascular puede ser generalizada, aunque es infrecuente la afectación clínicamente significativa del corazón. El hígado y el bazo suelen aumentar de tamaño y son firmes y correosos. Los riñones normalmente aumentan de tamaño. Los cortes del bazo tienen grandes áreas cerosas translúcidas donde los cuerpos de Malpigio normales están reemplazados por una amiloide pálida, que produce el bazo sagú.

La amiloidosis hereditaria se caracteriza por una neuropatía motora y sensorial periférica, a menudo neuropatía autónoma, y amiloide cardiovascular y renal. Podrían aparecer el síndrome del túnel carpiano y anomalías vítreas.

La amiloide relacionada con determinadas neoplasias malignas (p. ej., mieloma múltiple) tiene la misma distribución que la amiloide idiopática (AL); con otras neoplasias malignas (p. ej., carcinoma medular de la glándula tiroidea) puede producirse sólo de forma local asociada al tumor o en las metástasis. La amiloide se encuentra con frecuencia en el páncreas de individuos con diabetes mellitus de aparición en la fase adulta.

Mientras que se puede sospechar una amiloidosis basándose en síntomas y signos clínicos específicos, solo se diagnosticará definitivamente con una biopsia. En la actualidad, la aspiración de la capa de grasa abdominal subcutánea y la biopsia de la mucosa rectal son los mejores ensayos de detección sistemática. Otros sitios útiles para la biopsia son encías, piel, nervios, riñón e hígado. Los cortes de tejido se deben teñir con colorante rojo Congo y se observarán al microscopio de luz polarizada en busca de la birrefringencia verde característica de la amiloide. La AP de suero marcada isotópicamente se ha utilizado en un ensayo gammagráfico para confirmar el diagnóstico de la amiloidosis. Se necesitan desarrollar mejores metodologías diagnósticas para proporcionar el diagnóstico precoz, para de ese modo permitir un tratamiento eficaz.

Se sigue especulando sobre la conexión entre la inhibición de los depósitos de amiloide y el tratamiento de la diabetes, véase, p. ej., la patente internacional WO 02/16333. Las técnicas de imagen del páncreas para el diagnóstico de la diabetes constituyen una metodología adecuada para medir definitivamente la cantidad de amiloide en el páncreas, una correlación que se ha revelado indicativa de un diagnóstico de diabetes.

### III. MARCADORES INDIRECTOS

Se cree que la EA afecta a unos 4 millones de estadounidenses y quizás a 20-30 millones de personas en todo el mundo. Se reconoce que la EA es un problema importante de salud pública en los países desarrollados. Han surgido varias dianas terapéuticas mediante los trabajos en curso que intentan esclarecer la base molecular de la EA. Por ejemplo, se han autorizado cuatro inhibidores de la colinesterasa para el tratamiento sintomático de los pacientes con EA: tacrina (Cognez, Warner-Lambert, Morris Plains, New Jersey); donepezilo (Aricept, Eisai, Inc.; Teaneck, New Jersey y Pfizer, Inc., Nueva York, Nueva York); rivastigmina (Exelon, Novartis, Basilea, Suiza); y galantamina (Reminyl, Janssen, Titusville, New Jersey). Los posibles tratamientos nuevos de la EA que se están desarrollando en la actualidad están relacionados con inmunoterapia, inhibidores de la secretasa o antiinflamatorios. Sin embargo, hasta la fecha, no se dispone de fármacos para los que se haya demostrado que modifican el transcurso del declive

cognitivo.

Un obstáculo importante para desarrollar tratamientos antiamiloides se ejemplifica con la cita siguiente de (Hock , C. et al., 2003, *Neuron*, 38: 547-554) dirigido al uso de la inmunoterapia como tratamiento antiamiloides: «no sabemos si la carga de amiloide  $\beta$  del cerebro disminuyó en los pacientes de nuestro estudio; se necesitarán técnicas de imagen *in vivo* para responder esta cuestión». La capacidad para cuantificar la carga amiloide antes del tratamiento y, entonces, seguir los efectos del tratamiento, es decisiva para el desarrollo eficaz de esta clase de fármacos.

#### IV. CÓMO DIAGNOSTICAR LAS FORMAS PRODRÓMICAS DE AMILOIDOSIS

Una afección estrechamente relacionada con la enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza o bien por un trastorno de memoria aislado, o bien por un trastorno en varios dominios cognitivos, pero sin una gravedad suficiente para satisfacer los criterios diagnósticos para la enfermedad de Alzheimer. Esta afección se ha denominado trastorno cognitivo leve (TCL) y puede representar una fase prodrómica de la EA. El trastorno cognitivo leve se define como un estado intermedio o transitorio entre un estado cognitivo normal y la demencia. Los pacientes con un trastorno cognitivo leve típicamente tienen un trastorno de la memoria mayor de lo esperado para la edad y la educación, aunque no padecen demencia.

Hay ciertas indicaciones de que los pacientes diagnosticados con un trastorno cognitivo leve progresarán a la EA. También hay indicaciones de que el trastorno cognitivo leve puede representar una afección heterogénea compleja y que algunos pacientes con un trastorno cognitivo leve no desarrollarán la EA ni otros trastornos de demencia.

Ha habido un gran interés por discernir la frontera entre la demencia y la EA. La mayor parte del interés se centra en una frontera o estado transitorio entre el envejecimiento normal y la demencia, o más específicamente, la enfermedad de Alzheimer (EA). Las revisiones de varios estudios han indicado que estos individuos tienen más riesgo de desarrollar la EA, que oscila del 1 al 25% al año. La variabilidad de esta tasa probablemente se deberá a los diferentes criterios de diagnóstico, a los instrumentos de medición y a que las muestras eran pequeñas. Véase Dawe et al., *Int'l J. Geriatr. Psychiatry*, 7: 473 (1992).

Los pacientes con diagnóstico de TCL también se han vuelto interesantes para los ensayos de tratamiento. El Estudio Cooperativo de la Enfermedad de Alzheimer, que es un consorcio de grupos de investigación sobre la enfermedad de Alzheimer del Instituto Estadounidense de Envejecimiento, se ha embarcado en un ensayo multicéntrico de fármacos que pretenden alterar la progresión a la EA de los pacientes con un TCL. Véase Grundman et al., *Neurology*, 1996, A403.

Han surgido dudas respecto a los criterios de diagnóstico para el TCL. Algunos investigadores creen que prácticamente todos estos pacientes con una enfermedad leve tienen la EA desde el punto de vista neuropatológico y, por lo tanto, esto no puede ser una distinción útil. Véase Morris et al., *Neurology* 41: 469 (1991). Otros advierten que, mientras que muchos de estos pacientes progresan a la EA, no todos lo hacen y, por consiguiente, que la distinción es importante. Véase Grundman, véase más arriba; Petersen et al., *JAMA* 273: 1274 (1995); Petersen et al., *Ann N Y Acad. Sci.* 802: 58 (1996).

#### V. SUSTRATOS PARA LAS PROTEÍNAS AMILOIDÓGENAS: LOS BENZOFURANOS RADIOMARCADOS

Se han propuesto posibles sustratos para las proteínas amiloidógenas que van desde sustancias colorantes, tales como el rojo Congo y los derivados de la crisamina G (véase, p. ej., patente de los EE.UU. n.º 6 168 776), a péptidos con determinadas secuencias que se han marcado con el propósito de tomar imágenes de la A $\beta$  insoluble. Estos péptidos incluyen el propio péptido A $\beta$  marcado, el péptido putrescina-gadolinio-A $\beta$ , A $\beta$  radiomarcada, [<sup>111</sup>In]A $\beta$ , [<sup>125</sup>I]A $\beta$ , A $\beta$  marcada con radioisótopos de emisión  $\gamma$ , derivados de A $\beta$ -DTPA, putrescina radiomarcada, ligandos basados en KVLFF y derivados de los mismos (véanse, p. ej., publicación de patente internacional n.º WO93/04194 y la patente de los EE.UU. n.º 6 331 440).

En la patente de los EE.UU. n.º 6 696 039 se describieron unos pocos benzofuranos sin radiomarcación propuestos para uso en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, no se radiomarcaron ninguno de los compuestos de benzofurano descritos y no se describió que ninguno fuera eficaz para las técnicas de imagen en un paciente vivo con la enfermedad de Alzheimer.

Aunque se conocen algunos benzofuranos marcados, ninguno se ha utilizado para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer. Véase, Aitken et al., *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry* (1998), (23), 3937-3942, donde se describe un derivado de benzofurano deuterado; Givens et al. describen el 2-fenil-benzofurano-d en *Journal of the American Chemical Society* (1993), 115 (14); 6001-12 y Davies et al. describen el 2-fenil-benzofurano marcado con <sup>14</sup>C en *Journal of the Chemical Society* (1959) 3544-7.

M. Ono et al., *Nuclear Medicine and Biotechnology* 29 (2002) 633-642 describen determinados compuestos de benzofurano radiomarcados como radiotrazadores que se dirigen selectivamente a las placas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer.

La patente internacional WO 03/051859 describe determinados compuestos de benzofurano, y versiones

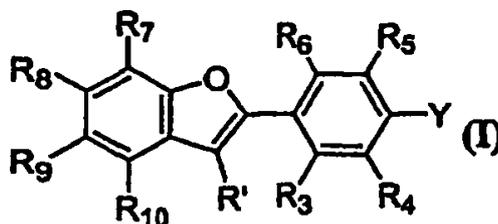
radiomarcadas de los mismos, para el diagnóstico o las técnicas de imagen *in vivo* de las enfermedades relacionadas con la amiloide, tales como la enfermedad de Alzheimer.

5 La patente internacional WO 2004/100998 describe algunos compuestos de bencimidazol, de benzotiazol y de benzofurano, y versiones marcadas de los mismos, para evaluar la concentración de la A $\beta$  soluble para diagnosticar las enfermedades relacionadas con la amiloide, tales como la enfermedad de Alzheimer.

Por lo tanto, existe la necesidad de benzofuranos marcados isotópicamente que sean capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y unirse a los depósitos de amiloide insolubles para las técnicas de imagen en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

### COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

10 La presente invención satisface esta necesidad y otras al dar a conocer, en una realización, un compuesto de fijación a amiloide de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



en la que

Y es F, Cl, Br, I, O-(CR''<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-X, o -(CR''<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-X;

15 en la que

X es F, Cl, Br o I; y

n es 1 a 5;

R' es H o un grupo alquilo(C<sub>1-8</sub>);

R'' es H o un grupo alquilo(C<sub>1-8</sub>);

20 R<sub>3</sub> a R<sub>10</sub> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, alquilo(C<sub>1-5</sub>), (CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-OR<sub>11</sub>, CF<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-X, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-X, CN, -CO-R<sub>11</sub>, -N(R<sub>11</sub>)<sub>2</sub>, -NR''<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NO<sub>2</sub>, -CO-N(R<sub>11</sub>)<sub>2</sub>, -O-(CO)-R<sub>11</sub>, OR<sub>11</sub>, SR<sub>11</sub>, COOR<sub>11</sub>, R<sub>ph</sub>, -CR<sub>11</sub>=CR<sub>11</sub>-R<sub>ph</sub> y -C(R<sub>11</sub>)<sub>2</sub>-C(R<sub>11</sub>)<sub>2</sub>R<sub>ph</sub>, en la que

X es F, Cl, Br o I; y

25 R<sub>ph</sub> es fenilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo que consiste en F, Cl, Br, I, alquilo(C<sub>1-5</sub>), (CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-O-R<sub>11</sub>, CF<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-X, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-X, CN, -CO-R<sub>11</sub>, -N(R<sub>11</sub>)<sub>2</sub>, -CO-N(R<sub>11</sub>)<sub>2</sub>, -O-(CO)-R<sub>11</sub>, OR<sub>11</sub>, SR<sub>11</sub> y COOR<sub>11</sub>, en la que cada R<sub>11</sub> es independientemente H o alquilo(C<sub>1-5</sub>); y

Y o R<sup>3</sup>-R<sup>10</sup> comprende al menos una marcación detectable seleccionada entre el grupo que consiste en <sup>131</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>124</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>76</sup>Br, <sup>79</sup>Br, <sup>18</sup>F, <sup>19</sup>F, <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>C, <sup>14</sup>C y <sup>3</sup>H.

30 En otra realización se da a conocer una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de fijación a amiloide de acuerdo con la fórmula (i) que se describe más arriba y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Aún otra realización se refiere a los compuestos de fórmula (I) para uso en un método para detectar lo(s) depósito(s) de amiloide *in vivo*. El método comprende (i) administrar a un mamífero una cantidad eficaz de un compuesto de fijación a amiloide de acuerdo con la fórmula (I), en donde el compuesto se fijaría a cualquier depósito o depósitos de amiloide en el mamífero; y (ii) detectar la fijación del compuesto al depósito o depósitos de amiloide en el mamífero.

Adicionalmente, sola o en combinación con cualquier otra realización descrita en la presente memoria, la invención abarca el uso de un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), como se define en la presente memoria, para detectar depósitos de amiloide *in vivo* en un mamífero. En una realización relacionada, la invención además da a conocer el uso de un compuesto de fórmula (I) para la preparación de un medicamento para uso en la detección de los depósitos de amiloide *in vivo* en tal sujeto.

Aún otra realización es un método para detectar depósito(s) de amiloide *in vitro*. El método comprende (i) poner en

contacto un tejido corporal con una cantidad eficaz de un compuesto de fijación a amiloide de acuerdo con la fórmula (I), en donde el compuesto se fijaría a cualquier depósito o depósitos de amiloide en el tejido; y (ii) detectar la fijación del compuesto al depósito o depósitos de amiloide en el tejido.

5 Sola o en combinación con cualquier otra realización descrita en la presente memoria, otra realización es el uso de un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), como se define en la presente memoria, para detectar depósitos de amiloide *in vitro*. En otra realización, la invención da a conocer el uso de un compuesto de fórmula (I) en la preparación de un medicamento para uso en la detección de depósitos de amiloide *in vitro*.

10 Una realización adicional se refiere a los compuestos de fórmula (I) para uso en un método para diferenciar entre un cerebro enfermo de Alzheimer y un cerebro normal. El método comprende (i) obtener tejidos de (i) el cerebelo y (ii) otra área del mismo cerebro, de un mamífero normal y de un mamífero que se sospecha que tiene la enfermedad de Alzheimer;

(ii) poner en contacto los tejidos con un compuesto de fijación a amiloide de acuerdo con la reivindicación 1;

(iii) cuantificar la amiloide fijada al compuesto;

15 (iv) calcular la proporción entre (a) la cantidad de amiloide en el área del cerebro que no sea el cerebelo y (b) la cantidad de amiloide en el cerebelo; y

(v) comparar la proporción para un mamífero normal con la proporción para un mamífero del que se sospecha que tiene la enfermedad de Alzheimer.

20 En otra realización, sola o en combinación con cualquier otra realización descrita en la presente memoria, la invención da a conocer el uso de un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), como se define en la presente memoria, para diferenciar entre un cerebro enfermo de Alzheimer y un cerebro normal. Otra realización es el uso de un compuesto de fórmula (I) en la preparación de un medicamento para uso en la diferenciación entre un cerebro enfermo de Alzheimer y un cerebro normal.

25 Aún otra realización es un método para detectar depósitos de amiloide en tejido de humano o de animal obtenido por biopsia o por autopsia. El método comprende las etapas de (a) incubar tejido fijado en formol o tejido recién congelado con una solución de un compuesto de fijación a amiloide de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para formar un depósito marcado y (b) detectar el depósito marcado.

30 En otra realización, sola o en combinación con cualquier otra realización descrita en la presente memoria, la invención da a conocer el uso de un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), como se define en la presente memoria, para detectar depósitos de amiloide en tejido de humano o de animal obtenido por biopsia o por autopsia. Otra realización es el uso de un compuesto de fórmula (I) en la preparación de un medicamento para uso en la detección de depósitos de amiloide en tejido de humano o de animal obtenido por biopsia o por autopsia.

En aún otra realización, se da a conocer un método para cuantificar la cantidad de amiloide en tejido obtenido por biopsia o por autopsia. El método comprende las etapas de:

35 a) incubar un derivado radiomarcado de un compuesto de fijación a amiloide de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo con un homogeneizado de tejido obtenido por biopsia o por autopsia, en el que al menos uno de los sustituyentes del compuesto está marcado con una radiomarcación seleccionada entre el grupo que consiste en  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ , y un sustituyente que contiene carbono, en el que al menos un carbono es  $^{14}\text{C}$ ;

b) separar el derivado radiomarcado de fórmula (I) fijado a tejido del no fijado,

40 c) cuantificar el derivado radiomarcado de un compuesto de fórmula (I) fijado a tejido, y

d) convertir las unidades de derivado radiomarcado de un compuesto de fórmula (I) fijado a tejido a unidades de microgramos de amiloide por 100 mg de tejido mediante la comparación con un estándar.

45 En otra realización, sola o en combinación con cualquier otra realización descrita en la presente memoria, la invención da a conocer el uso de un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), como se define en la presente memoria, para cuantificar la cantidad de amiloide en tejido obtenido por biopsia o por autopsia. Otra realización es el uso de un compuesto de fórmula (I) para la preparación de un medicamento para uso en la cuantificación de la cantidad de amiloide en tejido obtenido por biopsia o por autopsia.

50 En otra realización se da a conocer un método para fijar selectivamente un compuesto de fijación a amiloide de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a las placas de amiloide, pero no a los ovillos neurofibrilares, en el tejido encefálico que contiene a ambos. El método comprende poner en contacto las placas de amiloide mediante ensayos de fijación *in vitro* o de tinción con un compuesto de fórmula (I) a una concentración por debajo de unos 10 nM.

5 Aún en otra realización, sola o en combinación con cualquier otra realización descrita en la presente memoria, la invención da a conocer el uso de un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), como se define en la presente memoria, para uso en un método de fijación selectiva de un compuesto de fijación a amiloide de fórmula (I) o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a placas de amiloide, pero no a ovillos neurofibrilares, en el tejido encefálico que contiene a ambos. Otra realización es el uso de un compuesto de fórmula (I) para la preparación de un medicamento para uso en la fijación selectiva de un compuesto de fijación a amiloide de fórmula (I) o sw una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a placas de amiloide, pero no a ovillos neurofibrilares, en el tejido encefálico que contiene a ambos.

10 Aún en otra realización, se da a conocer un compuesto de fórmula (I) para uso en un método de fijación selectiva *in vivo* de un compuesto de fijación a amiloide de fórmula (I) o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a placas de amiloide, pero no a ovillos neurofibrilares, en el tejido encefálico que contiene a ambos. El método comprende la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I) o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de tal forma que la concentración sanguínea del compuesto administrado permanezca por debajo de unos 10 nM *in vivo*.

15 Aún otra realización es un compuesto de fórmula (I) para uso en un método *in vivo* o *in vitro* para detectar en un sujeto al menos un depósito de amiloide que comprende al menos una proteína amiloidógena. El método comprende las etapas de:

- 20 (a) administrar a un sujeto que padece una enfermedad relacionada con la amiloidosis una cantidad detectable de una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fijación a amiloide de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y
- (b) detectar la fijación del compuesto a un depósito de amiloide que comprende al menos una proteína amiloidógena.

En otra realización más, se da a conocer un compuesto de fórmula (I) para uso en un método de identificación de un paciente como prodrómico de una enfermedad relacionada con el depósito de amiloide que comprende:

- 25 A) administrar al paciente, que presenta signos de demencia clínica o signos clínicos de un trastorno cognitivo leve, un compuesto de fijación a amiloide de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; luego
- B) tomar imágenes de dicho paciente para obtener datos; y
- 30 C) analizar dichos datos para evaluar la concentración de amiloide en dicho paciente por referencia a una concentración estándar, por lo que se identifica dicho paciente como prodrómico de una enfermedad relacionada con el depósito de amiloide.

En otra realización, se da a conocer el compuesto de fórmula (I) para uso en un método de determinación de la eficacia terapéutica del tratamiento de la amiloidosis. El método comprende

- 35 A) administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de fijación a amiloide de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- B) tomar imágenes de dicho paciente; entonces
- C) administrar a dicho paciente que lo necesita al menos un agente antiamiloido;
- D) posteriormente, administrar a dicho paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I);
- 40 E) tomar imágenes de dicho paciente; y
- F) comparar la cantidad de depósito de amiloide en dicho paciente antes del tratamiento con dicho al menos un agente antiamiloido con la cantidad de depósito de amiloide en dicho paciente después del tratamiento con dicho al menos un agente antiamiloido.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

45 La presente invención explota la capacidad que tienen los derivados de benzofurano marcados isotópicamente para atravesar la barrera hematoencefálica y fijarse a las proteínas amiloidógenas.

Un ejemplo de tal fijación es la capacidad que tienen los compuestos de benzofurano para fijarse a la A $\beta$  depositada en las placas neuríticas (pero no difusas), a la A $\beta$  depositada en la amiloide cerebrovascular, y a la amiloide que consiste en la proteína depositada en los ONF.

50

**Caracterización de la fijación específica al péptido sintético de A $\beta$ : afinidad, cinética, fijación máxima**

Se analizaron las características de la fijación del derivado de benzofurano utilizando A $\beta$ (1-40) sintético y 2-(4'-[<sup>3</sup>H]metilamino-fenil)-benzotiazol ([<sup>3</sup>H]BTA-1) en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) como se describió previamente. Klunk et al., *Life Sci* 69: 1471 (2001); Mathis et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12: 295 (2002).

**5 La secuencia de aminoácidos para A $\beta$ (1-40) es la siguiente:**

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

**Definiciones**

«Alquilo» se refiere a un radical de hidrocarburo saturado de cadena ramificada o lineal. Los ejemplos incluyen, sin limitarse a ellos, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *tert*-butilo, n-pentilo y n-hexilo.

10 «Cantidad eficaz» se refiere a la cantidad requerida para producir un efecto deseado. Los ejemplos de una «cantidad eficaz» incluyen las cantidades que permiten detectar y tomar imágenes del depósito o depósitos de amiloide *in vivo* o *in vitro*, que producen unos niveles de toxicidad y de biodisponibilidad aceptables para uso farmacéutico, y/o previenen la degeneración celular y la toxicidad relacionadas con la formación de fibrillas.

15 «Vehículo farmacéuticamente aceptable» se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un material de relleno líquido o sólido, diluyente, material de encapsulación de excipiente o disolvente, implicado en llevar o transportar el compuesto de interés de un órgano, o porción del cuerpo, a otro órgano o porción del cuerpo. Cada vehículo es «aceptable» en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y adecuado para uso con el paciente. Ejemplos de materiales que pueden servir como un vehículo farmacéuticamente aceptable incluyen, pero sin limitarse a ellos: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tal como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua sin pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones a pH tamponado; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; y (22) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en las formulaciones farmacéuticas como se identifican, por ejemplo, en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 15.<sup>a</sup> ed. (Mack Publishing Co., 1975) en las páginas 1405-1412 y 1461-1487, y THE NATIONAL FORMULARY XIV, 14.<sup>a</sup> ed. (American Pharmaceutical Association, 1975).

25

30

«Sal farmacéuticamente aceptable» se refiere a una sal ácida o básica del compuesto de la invención, poseyendo dicha sal la actividad farmacológica deseada y no es indeseable ni biológicamente ni de otra manera. La sal se puede formar con ácidos que incluyen, sin limitarse a ellos, acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, canforato, canforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidrocloreto, hidrobromuro, hidroyoduro, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, tiocianato, tosilato y undecanoato. Los ejemplos de una sal básica incluyen, sin limitarse a ellas, sales de amonio, sales de metales alcalinos tales como sales de sodio y de potasio, sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y de magnesio, sales con bases orgánicas tales como sales de dicitclohexilamina, N-metil-D-glucamina, y sales con aminoácidos tales como arginina y lisina. En algunas realizaciones, los grupos que contienen nitrógeno básico se pueden cuaternizar como agentes que incluyen haluros de alquilo inferiores tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo tales como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo; haluros de cadena larga tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, lauroilo, miristoilo y estearoilo; y haluros de aralquilo tales como bromuros de fenetilo.

La terminología «parenteral», tal como se usa en la presente memoria, incluye la inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intraesternal, intracraneal e intraósea, y técnicas de infusión.

«Animal» se refiere a un organismo vivo que tiene sensibilidad y el poder de moverse voluntariamente, y que requiere para su existencia oxígeno y comida orgánica. Los ejemplos incluyen, sin limitación, miembros de las especies humana, equina, porcina, bovina, murina, canina y felina. En el caso de un humano, un «animal» también se puede citar como un «paciente».

«Mamífero» se refiere a un animal vertebrado de sangre caliente.

Un «sujeto» es un mamífero, tal como, por ejemplo, un humano. Un ejemplo específico es un humano que se sospecha que tiene demencia.

«Tratar» se refiere a:

- (i) impedir que una enfermedad, trastorno o afección se produzca en un animal que puede estar predispuesto a la enfermedad, trastorno y/o afección, pero que no se le ha diagnosticado todavía;
- (ii) inhibir la enfermedad, trastorno o afección, a saber, detener su desarrollo; y/o
- (iii) aliviar la enfermedad, trastorno o afección, a saber, provocar la regresión de la enfermedad, trastorno y/o afección.

La terminología «tratamiento» incluye tratar y/o prevenir la enfermedad.

La terminología «tratar» o «terapéutico» no necesariamente significa la curación total. Cualquier tipo de alivio de un síntoma indeseado o de un efecto patológico de la enfermedad, o el enlentecimiento del progreso de la enfermedad, se pueden considerar tratamiento. Además, el tratamiento puede incluir actos que pueden empeorar la sensación global de bienestar o de apariencia del paciente. Por ejemplo, la administración de quimioterapia a los pacientes con cáncer que puede hacer que los pacientes se sientan «enfermos» se sigue considerando tratamiento.

La terminología «prevención» se refiere a disminuir la probabilidad de que un organismo contraiga o desarrolle una enfermedad relacionada con el depósito de amiloide. Por ejemplo, la terminología «prevención» se refiere a la reducción del porcentaje de individuos que desarrollan la enfermedad respecto a un grupo de control que no se somete a la administración de un agente anti-amiloide.

Una «cantidad detectable» quiere decir que la cantidad de compuesto detectable que se administra es suficiente para permitir la detección de la fijación del compuesto a la amiloide.

Una «toma de imágenes con la cantidad eficaz» quiere decir que la cantidad del compuesto detectable que se administra es suficiente para permitir la toma de imágenes de la fijación del compuesto a la amiloide.

La terminología «toma de imágenes *in vivo*» se refiere a cualquier método que permite la detección de un compuesto de benzofurano marcado como se describe en la presente memoria.

La terminología «método *in vivo* o *in vitro* para detección» se refiere a cualquier método que permite la detección de un derivado de tioflavina marcado de fórmula (I).

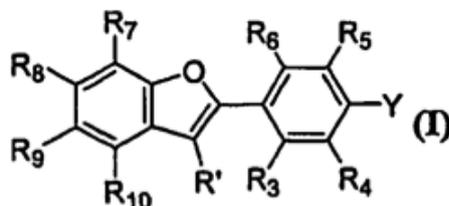
La terminología «basal» se refiere a la cantidad y distribución del depósito de amiloide de un paciente antes de iniciar el tratamiento anti-amiloide.

A menos que el contexto lo dicte con claridad de otra manera, las definiciones de los términos en singular se pueden extrapolar para aplicarse a los homólogos en plural que aparecen en la solicitud; asimismo, las definiciones de los

términos en plural se pueden extrapolar para aplicarse a los homólogos en singular que aparecen en la solicitud.

**Radiotrazadores de amiloide**

El radiotrazador de amiloide de la presente invención es cualquier compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



5

en la que R', R<sub>3</sub> a R<sub>10</sub> e Y son como se define más arriba.

Los compuestos de fórmula (I), también citados en la presente memoria como «compuestos de benzofurano», «derivados de benzofurano» o «radiotrazadores de amiloide», tienen cada uno las características siguientes: (1) fijación específica a la Aβ sintética *in vitro*, (2) capacidad para atravesar una barrera hematoencefálica no comprometida *in vivo*, (3) fijación específica a un depósito de amiloide que comprende al menos una proteína amiloidógena, en el que la proteína amiloidógena se selecciona entre el grupo que consiste en AL, AH, ATTR, Aβ2M, AA, AApoAI, AApoAII, AGel, ALys, AFib, ACys, ABri, ADan, APrP, ACal, AIAPP, AANF, APro, AIns, AMed, AKer, A(tbn) y ALac, (4) fijación a la Aβ depositada en las placas neuríticas (pero no difusas), a la Aβ depositada en la amiloide cerebrovascular, y a la amiloide que consiste en la proteína depositada en los ONF y (5) también son no tóxicos a los niveles de dosis adecuados y el efecto dura un tiempo satisfactorio.

15

En una realización, opcionalmente en combinación con cualquier otra realización descrita en la presente memoria, Y puede ser H, NO<sub>2</sub>, -NR''<sub>3</sub><sup>+</sup>, F, Cl, Br, I o -(CR''<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-X.

En una realización, R<sub>3</sub> a R<sub>10</sub> se pueden seleccionar cada uno independientemente entre el grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, -N(R<sub>11</sub>)<sub>2</sub> y OR<sub>11</sub>. En combinación con esto o cualquier otra realización descrita en la presente invención, R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> pueden ser independientemente OR<sub>11</sub>.

20

En otra realización opcionalmente en combinación con otras realizaciones descritas en la presente memoria, cada R<sub>7</sub> y R<sub>10</sub> pueden ser H. Aún en otra realización, cada uno de R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> pueden ser H.

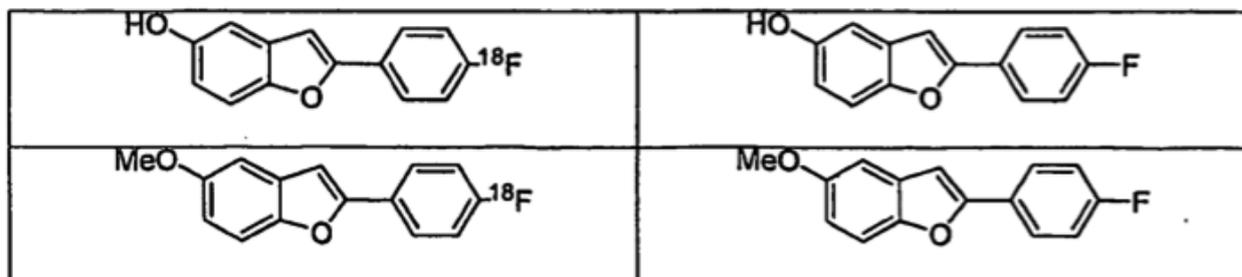
Aún en otras realizaciones de la invención, Y puede ser F, Cl, Br, I o -NO<sub>2</sub>. Un ejemplo específico de Y es F.

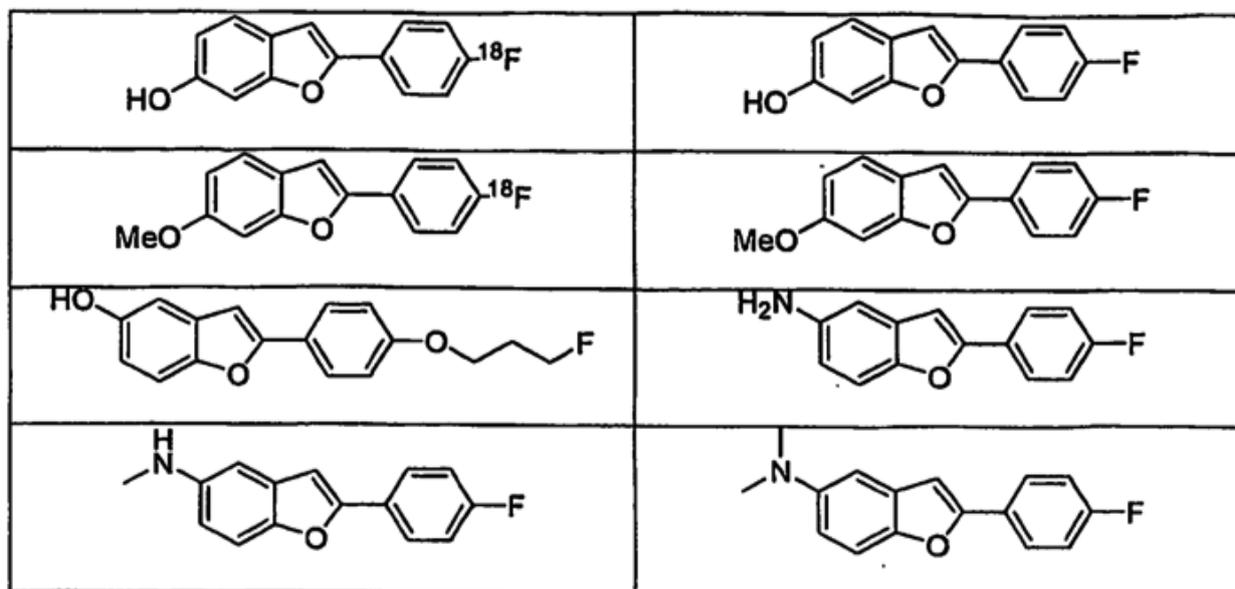
En otra realización, el compuesto de fijación a amiloide de fórmula (I) establece que cada uno de R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, y R<sub>10</sub> es H, y R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> son independientemente OR<sub>11</sub>.

25

Otra realización establece que Y comprende al menos una marcación detectable.

Los compuestos ilustrativos de fórmula (I) incluyen, pero sin limitarse a ellos:





### Métodos de uso

Los compuestos de la invención se pueden utilizar para determinar la presencia, localización y/o cantidad de uno o varios depósitos de amiloide en un órgano o área corporal, incluido el cerebro, de un animal. El depósito o depósitos de amiloide incluyen, sin limitación, el depósito o depósitos de A $\beta$ . Al permitir la vigilancia de la secuencia temporal del depósito de amiloide, el compuesto de la invención se puede utilizar además para correlacionar el depósito de amiloide con la aparición de síntomas clínicos relacionados con una enfermedad, trastorno o afección. Los compuestos de la invención pueden finalmente utilizarse para diagnosticar una enfermedad, trastorno o afección caracterizado por el depósito de amiloide, tal como EA, EA familiar, síndrome de Down, amiloidosis, diabetes mellitus de tipo 2, trastorno cognitivo leve y homocigotos para el alelo apolipoproteína E4. Los compuestos de la invención también se pueden utilizar como marcadores indirectos para evaluar los tratamientos anti-amiloide.

### Técnicas de imagen

Un método de esta invención determina la presencia y la localización de los depósitos de amiloide en un órgano o área del cuerpo, tal como el cerebro, de un paciente. El método comprende la administración de una cantidad detectable de una composición farmacéutica que contiene un compuesto de fijación a amiloide de la presente invención denominado un «compuesto detectable», o una sal hidrosoluble farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente. Una «cantidad detectable» significa que la cantidad del compuesto detectable que se administra es suficiente para permitir la detección de la fijación del compuesto a la amiloide. Una «toma de imágenes con la cantidad eficaz» quiere decir que la cantidad de compuesto detectable que se administra es suficiente para permitir tomar imágenes de la fijación del compuesto a la amiloide.

La invención emplea radiotrazadores de amiloide que, junto con técnicas de neuroimagen no invasivas tales como la espectroscopia de resonancia magnética (ERM) o las imágenes de resonancia magnética (IRM) o la gammagrafía tal como tomografía por emisión de positrones (TEP) o tomografía computerizada de emisión de fotones simples (SPECT, por su nombre en inglés), se utilizan para cuantificar el depósito de amiloide *in vivo*. El método implica tomar imágenes de un paciente para establecer un valor basal del depósito de amiloide. Para la gammagrafía, se mide la radiación emitida desde el órgano o área a examinar y se expresa bien como la fijación total o bien como una proporción en la que la fijación total en un tejido se normaliza a (por ejemplo, se divide por) la fijación total en otro tejido del mismo sujeto durante el mismo procedimiento de toma de imágenes *in vivo*. La fijación total *in vivo* se define como la señal total detectada en un tejido mediante una técnica de toma de imágenes *in vivo* sin la necesidad de la corrección mediante una segunda inyección de una cantidad idéntica del compuesto marcado junto con un gran exceso del compuesto sin marcar, pero por lo demás químicamente idéntico. El método puede comprender adicionalmente al menos una sesión de toma de imágenes de un paciente después de la administración de un tratamiento anti-amiloide. El método también puede comprender la toma de imágenes de un paciente antes y después del tratamiento con al menos un agente anti-amiloide. La toma de imágenes se puede realizar en cualquier momento durante el tratamiento.

Para los propósitos de la toma de imágenes *in vivo*, el tipo de instrumento de detección disponible es un factor importante a la hora de seleccionar una marcación determinada. Por ejemplo, se pueden utilizar isótopos radioactivos y  $^{18}\text{F}$  para la toma de imágenes *in vivo* en los métodos de la presente invención. El tipo de instrumento utilizado guiará la selección del radionúclido o del isótopo estable. Por ejemplo, el radionúclido elegido debe tener un tipo de descomposición detectable por un tipo de instrumento determinado. Otra consideración se refiere a la

semivida del radionúclido. La semivida debe ser suficientemente larga de forma que todavía sea detectable en el momento de la captación máxima por la diana, pero suficientemente corta de tal forma que el hospedador no reciba una radiación perjudicial. Los compuestos radiomarcados de la invención se pueden detectar utilizando gammagrafías en las que se detecta la radiación y emitida de una longitud de onda apropiada. Los métodos de gammagrafía incluyen, pero sin limitarse a ellos, SPECT y TEP. En una realización, tal como para la detección por SPECT, la radiomarcación elegida carecerá de emisión de partículas, pero producirá un gran número de fotones en un intervalo de 140-200 keV. Para la detección por TEP, la radiomarcación será un radionúclido emisor de positrones, tal como  $^{19}\text{F}$ , que desaparecerá para formar dos rayos  $\gamma$  de 511 keV que se pueden detectar mediante la cámara de TEP.

En la presente invención se elaboran compuestos de fijación a amiloide/radiotrazadores que son útiles para la toma de imágenes y la cuantificación *in vivo* del depósito de amiloide. Estos compuestos han de utilizarse a la vez que las técnicas de neuroimagen no invasivas tales como la espectroscopia de resonancia magnética (ERM) o las imágenes de resonancia magnética (IRM), tomografía por emisión de positrones (TEP) y tomografía computerizada de emisión de fotones simples (SPECT). De acuerdo con esta invención, los compuestos de benzofurano se pueden marcar con  $^{19}\text{F}$  o  $^{13}\text{C}$  para ERM/IRM mediante técnicas de química orgánica generales conocidas en la técnica. Por ejemplo, véase *ADVANCES ORGANIC CHEMISTRY: REACTION, MECHANISMS AND STRUCTURE*, 3.<sup>a</sup> ed. (1985). Los compuestos de benzofurano también pueden estar radiomarcados con  $^{18}\text{F}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{75}\text{Br}$  o  $^{76}\text{Br}$  para TEP mediante técnicas bien conocidas en la técnica y las describen Fowler, J y Wolf, A en *POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY AND AUTORADIOGRAPHY* 391-450 (Raven Press, 1986). Los compuestos de benzofurano también se pueden radiomarcarse con  $^{123}\text{I}$  para SPECT mediante cualquiera de las muchas técnicas conocidas en la técnica. Véase, p. ej., Kulkarni, *Int. J. Rad. Appl. & Inst.* (parte B) 18: 647 (1991). Además, los compuestos de benzofurano se pueden marcar con cualquier isótopo de yodo radioactivo adecuado, tal como, pero sin limitarse a ellos,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$  o  $^{123}\text{I}$ , mediante yodación de un aminoderivado diazotizado directamente a través de un yoduro de diazonio, véase, Greenbaum, *F. Am. J. Pharm.* 108: 17 (1936) o mediante la conversión de la amina diazotizada inestable en el triazeno estable, o mediante la conversión de un precursor halogenado no radiactivo en un derivado de estaño trialquilado estable que, luego, se puede convertir en el compuesto yodado mediante muchos métodos bien conocidos en la técnica. Véase, Satymurthy y Barrio, *J. Org. Chem.* 48: 4394 (1983), Goodman et al., *J. Org. Chem.* 49: 2322 (1984), and 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 ejemplo, un triazeno estable o un derivado de estaño trialquilado del benzofurano se hace reaccionar con un agente halogenado que contiene  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{18}\text{F}$  o  $^{19}\text{F}$ . Así pues, los derivados de estaño trialquilado estables del benzofurano son nuevos precursores útiles para la síntesis de muchos de los compuestos radiomarcados dentro de la presente invención. Como tal, estos derivados de estaño trialquilado se contemplan como una realización de esta invención.

Los métodos de la presente invención pueden utilizar isótopos que son detectables mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear para los propósitos de toma de imágenes y espectroscopia *in vivo*. Los elementos útiles en la espectroscopia de resonancia magnética incluyen, pero sin limitarse a ellos,  $^{19}\text{F}$  y  $^{13}\text{C}$ .

Los radioisótopos adecuados para los propósitos de esta invención pueden ser emisores  $\beta^-$ , emisores  $\gamma$ , emisores de positrones y emisores de rayos X. Estos radioisótopos incluyen  $^{131}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{75}\text{Br}$  y  $^{76}\text{Br}$ . Los isótopos estables adecuados para uso en las imágenes de resonancia magnética (IRM) o la espectroscopia de resonancia magnética (ERM), de acuerdo con esta invención, incluyen  $^{19}\text{F}$  y  $^{13}\text{C}$ . Los radioisótopos adecuados para la cuantificación *in vitro* de la amiloide en homogeneizados del tejido obtenido por biopsia o por autopsia incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$  y  $^3\text{H}$ . Los radiomarcadores de ejemplo son  $^{11}\text{C}$  o  $^{18}\text{F}$  para uso en la toma de imágenes *in vivo* por TEP,  $^{123}\text{I}$  para uso en la toma de imágenes por SPECT,  $^{19}\text{F}$  para ERM/IRM y  $^3\text{H}$  o  $^{14}\text{C}$  para estudios *in vitro*. No obstante, se puede utilizar cualquier método convencional para visualizar los radiotrazadores diagnósticos de acuerdo con esta invención.

De acuerdo con una realización de la invención que se refiere a un método para detectar depósitos de amiloide en tejido obtenido por biopsia o por autopsia, el método implica la incubación del tejido fijado en formol con una solución de un compuesto de benzofurano de fijación a amiloide de la presente invención. En una realización, la solución es etanol al 25-100%, (siendo el resto agua) saturado con un compuesto de benzofurano de fijación a amiloide de acuerdo con la presente invención. Durante la incubación, el compuesto tiñe o marca el depósito de amiloide en el tejido, y el depósito teñido o marcado se puede detectar o visualizar mediante cualquier método estándar. Tales medios de detección incluyen técnicas de microscopia tales como microscopia de campo claro, de fluorescencia, de láser confocal y de polarización cruzada.

El método de cuantificación de la cantidad de amiloide en tejido obtenido por biopsia o por autopsia implica incubar un derivado de benzofurano marcado de acuerdo con la presente invención, o una sal no tóxica hidrosoluble del mismo, con el homogeneizado del tejido obtenido por biopsia o por autopsia. El tejido se obtiene y se homogeneiza mediante los métodos bien conocidos en la técnica. En una realización, la marcación es un radiomarcador, aunque otros marcadores tales como enzimas, compuestos quimioluminiscentes e inmunofluorescentes los conocen bien los expertos en la técnica. Los radiomarcadores de ejemplo incluyen, pero sin limitarse a ellos,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$  y  $^3\text{H}$ , que están contenidos en un sustituyente sustituido en uno de los compuestos de las presentes fórmulas descritas en esta memoria. El tejido que contiene depósitos de amiloide se fijará a los derivados marcados de los compuestos de

benzofurano de fijación a amiloide de la presente invención. A continuación, el tejido fijado se puede separar de cualquier tejido sin fijación mediante algún mecanismo conocido por los expertos en la técnica, tal como filtración. El tejido con fijación se puede entonces cuantificar mediante algún medio conocido por el experto en la técnica. A continuación, las unidades del derivado de benzofurano radiomarcado fijado al tejido se pueden convertir a unidades de microgramos de amiloide por 100 mg de tejido por comparación con una curva estándar generada incubando cantidades conocidas de amiloide con el derivado de benzofurano radiomarcado.

El método para diferenciar entre un cerebro enfermo de Alzheimer y un cerebro normal comprende la obtención de tejido de (a) el cerebelo y de (b) otra área del mismo cerebro, diferente al cerebelo, de pacientes normales y de pacientes que se sospecha que tienen la enfermedad de Alzheimer. Tales tejidos se convierten en homogeneizados independientes mediante los métodos bien conocidos por el experto en la técnica y luego se incuban con un compuesto de benzofurano radiomarcado de fórmula (I) de fijación a amiloide. A continuación, para cada tipo de tejido (p. ej., cerebelo, no cerebelo, normal, anormal), se calcula la cantidad de tejido que se fija al compuesto de benzofurano radiomarcado de fijación a amiloide, y la proporción para la fijación en tejido que no es cerebelo por tejido de cerebelo se calcula para los tejidos de pacientes normales y para los tejidos de pacientes que se sospecha que tienen la enfermedad de Alzheimer. Después se comparan estas proporciones. Si la proporción del cerebro que se sospecha que tiene la enfermedad de Alzheimer está por encima del 90% de las proporciones obtenidas para los cerebros normales, se realiza el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Las proporciones normales se pueden obtener de los datos obtenidos anteriormente, o alternativamente, se pueden recalcular al mismo tiempo que se estudia el tejido de cerebro sospechoso.

La capacidad de los presentes compuestos para unirse específicamente a ovillos neurofibrilares frente a las placas de amiloide es particularmente evidente a concentraciones de menos de 10 nM, que incluye el intervalo de concentración *in vivo* de radiotrazadores para TEP. A esta baja concentración, que contiene sólo ovillos y no placas, no se produce una fijación significativa cuando se compara con el tejido de cerebro de control que no contiene ni placas ni ovillos. Sin embargo, la incubación de homogeneizados del tejido encefálico que contiene principalmente placas y algunos ovillos con compuestos radiomarcados de las fórmulas descritas en la presente memoria da lugar a un incremento significativo de la fijación cuando se compara con el tejido de control sin placas ni ovillos. Estos datos sugieren que una ventaja de estos compuestos es su especificidad para los depósitos de A $\beta$  a concentraciones de menos de 10 nM. Esta baja concentración es detectable en estudios de TEP, lo que hace posible la detección por TEP mediante compuestos radiomarcados de las fórmulas descritas en la presente memoria que son específicos de los depósitos de A $\beta$ . La utilización de tales compuestos permite la detección por TEP de depósitos de A $\beta$  tales como los encontrados en la amiloide de placas y cerebrovascular. Dado que se ha descrito que la cantidad de A $\beta$  en la corteza frontal se incrementa antes de la formación de los ovillos, esto sugeriría que los compuestos radiomarcados de la presente invención, utilizados como trazadores para TEP, serían específicos para los primeros cambios de la corteza en la EA. Naslund et al., *JAMA* 283: 1571 (2000).

#### **Método y uso para detectar depósito(s) de amiloide *in vivo***

Tal y como se mencionó más arriba, la invención da a conocer además, en una realización, un compuesto de fórmula (I) para uso en un método para detectar depósito(s) de amiloide *in vivo*, que comprende:

- (i) administrar a un animal una cantidad eficaz del compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en donde el compuesto se fijaría a cualquier depósito o depósitos de amiloide en el animal; y
- (ii) detectar la fijación del compuesto al depósito o depósitos de amiloide en el animal.

Después de que haya transcurrido un tiempo suficiente para que el compuesto se fije al depósito o depósitos de amiloide, por ejemplo de 30 minutos a 48 horas después de la administración, se puede detectar la fijación mediante cualquier medio conocido en la técnica. Ejemplos de medios de detección incluyen, sin limitación, ensayos (tales como ensayos inmunométricos, calorimétricos, densitométricos, espectrográficos y cromatográficos), técnicas de neuroimagen no invasivas (tales como espectroscopia de resonancia magnética [ERM], imagen de resonancia magnética [IRM] y técnicas de gammagrafía tales como tomografía computerizada de emisión de fotones simples [SPECT] y tomografía por emisión de positrones [TEP]). Para la gammagrafía, se mide la radiación emitida desde el órgano o el área a examinar y se expresa o bien como fijación total o como una proporción en la que la fijación total en un tejido se normaliza (por ejemplo, se divide) por la fijación total en otro tejido del mismo sujeto durante el mismo procedimiento de toma de imágenes *in vivo*. La fijación total *in vivo* se define como la señal completa detectada en un tejido mediante una técnica de imagen *in vivo* sin necesidad de corregir con una segunda inyección de una cantidad idéntica del compuesto marcado junto con un gran exceso del compuesto sin marcar, pero por lo demás idéntico desde el punto de vista químico.

El tipo de instrumento de detección disponible puede ser un factor a la hora de seleccionar el isótopo radiactivo de halógeno o de carbono. Por ejemplo, el radioisótopo seleccionado debe tener un tipo de descomposición que es detectable mediante un instrumento dado. Otra consideración se refiere a la semivida del radioisótopo. La semivida debe ser suficientemente larga de tal forma que el radioisótopo sea todavía detectable en el momento de máxima captación por la diana, pero suficientemente corta para que el hospedador no reciba una radiación perjudicial. Para la detección mediante SPECT, el radioisótopo seleccionado puede carecer de una emisión de partículas, pero puede

producir un gran número de fotones en el intervalo de 140-200 keV. Para la detección por TEP, el radioisótopo seleccionado puede ser un radioisótopo emisor de positrones, que desaparece para forma dos rayos  $\gamma$  de 511 keV detectables mediante una cámara de TEP.

5 Los radioisótopos útiles incluyen, sin limitación:  $^{125}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$ , y  $^3\text{H}$  para la cuantificación *in vitro* de amiloide en homogeneizados de tejido obtenido por biopsia o por autopsia;  $^{11}\text{C}$  y  $^{18}\text{F}$  para la toma de imágenes por TEP *in vivo*;  $^{123}\text{I}$  para la toma de imágenes por SPECT;  $^{18}\text{F}$  para ERM/IRM;  $^3\text{H}$  o  $^{14}\text{C}$  para los estudios *in vitro*; y  $^{18}\text{F}$  y  $^{13}\text{C}$  para la espectroscopia de resonancia magnética (ERM). En una realización, la detección se efectúa mediante gammagrafía, imágenes de resonancia magnética o espectroscopia de resonancia magnética. En otra realización, la gammagrafía es TEP o SPECT.

#### 10 **Método y uso para detectar depósito(s) de amiloide *in vitro***

Esta invención da a conocer adicionalmente un método para detectar depósito(s) de amiloide *in vitro* que comprende:

- (i) poner en contacto un tejido corporal con una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la fórmula (I), en el que el compuesto se fijaría a cualquier depósito o depósitos de amiloide en el tejido; y
- 15 (ii) detectar la fijación del compuesto al depósito o depósitos de amiloide en el tejido.

La fijación se puede detectar mediante cualquier medio conocido en la técnica. Ejemplos de medios de detección incluyen, sin limitación, técnicas de microscopia, tales como microscopia de campo claro, de fluorescencia, de láser confocal y de polarización cruzada.

20 En una realización, el tejido es tejido de biopsia o de autopsia que se fija en formol o se congela en fresco. En otra realización, el tejido está homogeneizado. Aún en otra realización, el compuesto de la invención está en una solución que además comprende etanol al 25-99%, siendo el resto de la solución agua. Aún en otra realización, la solución comprende etanol al 0-50% y de 0,0001 a 100  $\mu\text{M}$  del compuesto. Aún en otra realización, el método comprende adicionalmente (iii) separar del tejido el depósito o depósitos de amiloide fijados al compuesto; y (iv) cuantificar el depósito o depósitos de amiloide fijados al compuesto de la invención. El depósito o depósitos de amiloide fijados se pueden separar del tejido mediante cualquier medio conocido en la técnica, tal como filtración. La cantidad de depósito o depósitos de amiloide fijados se pueden convertir a unidades de microgramos de depósito o depósitos de amiloide por 100 mg de tejido mediante comparación con una curva estándar generada por incubación de cantidades conocidas de amiloide con el compuesto de la invención o una sal, hidrato, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable.

#### 30 **Método y uso para diferenciar entre el cerebro enfermo de Alzheimer y el cerebro normal**

Esta invención da a conocer adicionalmente un compuesto de fórmula (I) para uso en un método para diferenciar entre un cerebro enfermo de Alzheimer y un cerebro normal que comprende:

- (i) obtener tejidos de (a) el cerebelo y de (b) otra área del mismo cerebro, de un animal normal o de un animal que se sospecha que tiene la enfermedad de Alzheimer;
- 35 (ii) poner en contacto los tejidos con un compuesto de acuerdo con la fórmula (I);
- (iii) cuantificar la amiloide fijada al compuesto;
- (iv) calcular la proporción de la cantidad de amiloide en el área del cerebro que no es el cerebelo por cantidad de amiloide en el cerebelo;
- 40 (v) comparar la proporción para un animal normal con la proporción para un animal que se sospecha que tiene la enfermedad de Alzheimer.

Se puede realizar un diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer si la proporción para un animal que se sospecha que tiene la enfermedad de Alzheimer está, por ejemplo, por encima del 90% de la proporción para un animal normal. Para este método, un animal «normal» es uno que no padece la enfermedad de Alzheimer.

#### **Administración y composiciones farmacéuticas**

45 De acuerdo con la presente invención, una composición farmacéutica que comprende un radiotrazador de amiloide de fórmula (I) se puede administrar a sujetos en quienes se ha anticipado la formación de amiloide o de fibrillas de amiloide, p, ej., pacientes con diagnóstico clínico de enfermedad de Alzheimer o de otra enfermedad relacionada con el depósito de amiloide.

50 La administración al sujeto puede ser local o sistémica y llevarse a cabo, por ejemplo, por vía intravenosa, intraarterial, intratecal (por el líquido cefalorraquídeo) o similares. La administración también puede ser intradérmica o intracavitaria, según el sitio del cuerpo a examinar. Después de que haya transcurrido un tiempo suficiente para

que el compuesto se fije a la amiloide, por ejemplo de 30 minutos a 48 horas, el área del sujeto a investigar se examina mediante técnicas de imagen de rutina, tales como ERM/IRM, SPECT, imágenes de centelleo planas, TEP y también cualquier técnica de imagen emergente. El protocolo exacto que se necesita variará según factores específicos del paciente, como se señaló más arriba, y según el sitio corporal a examinar, el método de administración y el tipo de marcación utilizado; la determinación de los procedimientos específicos serían rutinarios para el experto en la técnica. Para la toma de imágenes del cerebro, a modo de ejemplo, la cantidad (fijación específica o total) del compuesto o análogo de benzofurano marcado radiactivamente de la presente invención se mide y se compara (como proporción) con la cantidad de compuesto de benzofurano marcado fijado al cerebelo del paciente. Después se compara esta proporción con la misma proporción en un cerebro normal emparejado por edad. Para la toma de imágenes de órganos, como otro ejemplo, la cantidad (fijación total o específica) del derivado o análogo de tioflavina marcado radiactivamente de la presente invención se mide y se compara (como proporción) con la cantidad de derivado de tioflavina marcado que se fija al órgano del paciente. Entonces se compara esta proporción con la misma proporción en un órgano normal emparejado por edad.

Los radiotrazadores de amiloide de la presente invención se pueden administrar en forma de composiciones inyectables, como se señaló más arriba, pero también se pueden formular en sistemas de administración de fármacos bien conocidos (p. ej., oral, rectal, parenteral [intravenoso, intramuscular o subcutáneo], intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, local [polvos, ungüentos o gotas], o como un pulverizador bucal o nasal). Una composición típica para tal propósito comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la composición puede contener unos 10 mg de seroalbúmina humana y de unos 0,5 a 500 µg del compuesto de benzofurano marcado por mililitro de tampón de fosfato con NaCl. Otros vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas, excipientes inocuos, que incluyen sales, conservantes, tampones y similares, como se describe, por ejemplo, en *REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 15.<sup>a</sup> ed. Easton: Mack Publishing Co., pág. 1405-1412 y 1461-1487 (1975) y *THE NATIONAL FORMULARY XIV*, 14.<sup>a</sup> ed. Washington: American Pharmaceutical Association (1975).

Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal y ésteres orgánicos inyectables tal como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas o acuosas, soluciones salinas, vehículos parenterales tales como cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, etc. Los vehículos intravenosos incluyen regeneradores de líquidos y de nutrientes. Los conservantes incluyen antimicrobianos, antioxidantes, quelantes y gases inertes. El pH y la concentración exacta de los distintos componentes de la composición farmacéutica se ajustan de acuerdo con las capacidades cotidianas de la técnica. Véase *THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICS* (7<sup>a</sup> de) de Goodman y Gilman.

El protocolo de la tomografía por emisión de positrones (TEP) puede comprender una exploración de todo el cuerpo (que cubre desde la cabeza a la pelvis) que se completará 15-60 minutos después de la inyección del radiofármaco, o una exploración de una área corporal concreta (p. ej., corazón, pulmones, hígado, riñones). Este protocolo de exploración es análogo a una exploración oncológica con TEP de un área corporal concreta o de todo el cuerpo realizada con [<sup>18</sup>F]2-fluoro-2-desoxiglucosa (FDG). Es decir, el radiofármaco específico de amiloide se inyecta por vía intravenosa, se deja un tiempo para que el radiotrazador se distribuya por todo el cuerpo, se capture el radiotrazador en el órgano u órganos de interés, y se elimine de la sangre y de otros órganos en los que no se encuentre la amiloide, y se realiza una exploración de 20-40 minutos de todo el cuerpo o sobre un área concreta para tomar imágenes del radiotrazador fijado a la amiloide. Además, se pueden utilizar las imágenes de las exploraciones para posteriormente tomar muestras directas de biopsia del tejido o tejidos explorados.

Por lo general, la dosis del compuesto de benzofurano marcado detectablemente de acuerdo con la fórmula (I) variará dependiendo de consideraciones tales como la edad, estado, sexo y extensión de la enfermedad en el paciente, contraindicaciones, si las hay, tratamientos concomitantes y otras variables a ajustar por un médico experto en la técnica. Las dosis del orden de unos 0,001 (µg/kg)/día a unos 10 000 (mg/kg)/día de un compuesto de la invención son útiles para los métodos de la invención. En una realización, la concentración de la dosis es de unos 0,001(µg/kg)/día a unos 10,0 (µg/kg)/día. En otra realización, la concentración de la dosis es de unos 0,01(µg/kg)/día a aproximadamente 1,0 (µg/kg)/día. Aún en otra realización, la concentración de la dosis es unos 0,1 (mg/kg)/día a unos 100 (mg/kg)/día.

La concentración de la dosis específica para un paciente determinado variará según distintos factores, que incluyen la actividad y la posible toxicidad del compuesto específico empleado; la edad, masa corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el momento de administración; la velocidad de excreción; la politerapia; y la forma de administración. Típicamente, los resultados del efecto de la dosis *in vitro* proporcionan una guía útil sobre las dosis adecuadas para la administración al paciente. Los estudios en modelos animales también son útiles. Las consideraciones para determinar la concentración de la dosis adecuada se conocen bien en la técnica y están dentro de los conocimientos de un médico experto.

Cualquier régimen de administración conocido para regular la cronología y la secuencia de administración del fármaco se puede utilizar y repetir cuanto sea necesario para efectuar el tratamiento según los métodos de la invención. La posología puede incluir el tratamiento previo y/o la coadministración de uno o más fármacos terapéuticos adicionales.

En una realización, los compuestos de acuerdo con la fórmula (I) se administran a un animal que se sospecha que tiene, o que se encuentra en riesgo de desarrollar, una enfermedad, trastorno o afección caracterizado por un depósito de amiloide. Por ejemplo, el animal puede ser un humano anciano.

5 En otra realización, los compuestos de la invención se fijan a la A $\beta$  con una constante de disociación ( $K_D$ ) de unos 0,0001  $\mu$ M a unos 10,0  $\mu$ M cuando se mide mediante la fijación al péptido A $\beta$  sintético o a tejido de cerebro con EA.

La invención da a conocer adicionalmente una composición farmacéutica que comprende:

- (i) una cantidad eficaz de al menos un compuesto de la invención; y
- (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 La composición puede comprender uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables adicionales, que incluyen sin limitación uno o más humectantes, tamponantes, agentes de suspensión, lubricantes, emulsionantes, disgregantes, absorbentes, conservantes, surfactantes, colorantes, aromatizantes, edulcorantes y fármacos terapéuticos.

15 La composición se puede formular en forma sólida, líquida, en gel o en suspensión para: (1) administración oral como, por ejemplo, un empape (disolución o suspensión acuosa o no acuosa), comprimido (por ejemplo, dirigido a la absorción oral, sublingual o sistémica), bolo, polvo, gránulo, pasta para aplicación en la lengua, cápsula de gelatina dura, cápsula de gelatina blanda, pulverizador oral, emulsión y microemulsión; (2) administración parenteral mediante inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural como, por ejemplo, una solución estéril, suspensión o formulación de liberación prolongada; (3) aplicación tópica como, por ejemplo, una crema, ungüento, parche de liberación prolongada o pulverizador aplicado a la piel; (4) administración intravaginal o intrarrectal como, por ejemplo, un óvulo vaginal, crema o espuma; (5) administración sublingual; (6) administración ocular; (7) administración transdérmica; o (8) administración nasal.

20 En una realización, la composición se puede formular para la administración intravenosa y el vehículo incluye un regenerador de líquido y/o de nutrientes. En otra realización, la composición es capaz de fijarse específicamente a la amiloide *in vivo*, es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, no es tóxica a dosis en las concentraciones adecuadas y/o el efecto dura un tiempo satisfactorio. Aún en otra realización, la composición comprende unos 10 mg de seroalbúmina humana y de unos 0,5 a 500 mg del compuesto de la invención por mililitro del tampón fosfato con NaCl.

25 Además, los presentes compuestos de benzofurano se pueden utilizar en un método para determinar la eficacia terapéutica del tratamiento de la amiloidosis. El método implica la toma de imágenes de la amiloide a modo de marcador indirecto. Los marcadores indirectos son un tipo especial de biomarcador que se puede utilizar en lugar de las mediciones clínicas como un criterio de valoración clínico para los propósitos de autorización de fármacos. Por ejemplo, la medición de la colesterolemia es en la actualidad un marcador indirecto aceptado de la aterosclerosis. La presente invención implica la toma de imágenes de la amiloide como marcador indirecto para los tratamientos antiamiloides.

35 El presente método da a conocer unos medios para evaluar el éxito de los tratamientos antiamiloides. En algunas realizaciones, el presente método da a conocer unos medios para evaluar el éxito clínico de los tratamientos antiamiloides. En algunas realizaciones, el método se puede utilizar para evaluar el éxito clínico en los sujetos ligeramente afectados con unos pocos o ningún síntoma clínico que seguir. El método básico para determinar la eficacia terapéutica del tratamiento de la amiloidosis implica:

- 40 A) administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz del compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable como se describe más arriba;
- B) tomar imágenes de dicho paciente; luego
- C) administrar a dicho paciente que lo necesita al menos un agente antiamiloide;
- 45 D) posteriormente, administrar a dicho paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I);
- E) tomar imágenes de dicho paciente; y
- F) comparar los niveles del depósito de amiloide en dicho paciente antes del tratamiento con al menos un agente antiamiloide con los niveles del depósito de amiloide en dicho paciente después del tratamiento con al menos un agente antiamiloide.

## 50 **Tratamientos antiamiloides y usos**

Otra realización de la invención es un método para determinar la eficacia terapéutica del tratamiento de la amiloidosis en un paciente que lo necesita. El método comprende la administración de un compuesto de fórmula (I) y

luego tomar imágenes del paciente. Después de la toma de imágenes, al paciente se le administra al menos un fármaco antiamiloide/tratamiento antiamiloide. La cantidad administrada, la vía de administración y la duración del tratamiento los determina un experto en la técnica basándose en la edad, el peso y el estado del paciente. Tales determinaciones se encuentran dentro de las competencias del experto en la técnica. La cantidad adecuada incluye, pero sin limitarse a ellas, de 0,01 a 100 mg/kg. La vía de administración adecuada incluye, pero sin limitarse a ellas, oral, subcutánea e intravenosa. La duración adecuada del tratamiento incluye, pero sin limitarse a ellas, de una única dosis a cuatro dosis al día dadas indefinidamente. Los momentos adecuados para tomar imágenes incluyen, pero sin limitarse a ellos, inmediatamente después de la primera dosis a diez años después de la dosis más reciente. Los momentos de ejemplo para tomar imágenes incluyen, pero sin limitarse a ellos, entre 7 días y 6 meses después de la dosis más reciente.

Un «fármaco antiamiloide» o un «tratamiento antiamiloide» es cualquier fármaco o combinación de fármacos que tratan o impiden la amiloidosis. Ejemplos de enfermedades relacionadas con el depósito de amiloide, amiloidosis, incluyen enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, diabetes mellitus de tipo 2, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (holandesa), amiloide A (reactivo), amiloidosis secundaria, TCL, fiebre mediterránea familiar, nefropatía amiloide familiar con urticaria y sordera (síndrome de Muckle-Wells), amiloide de cadena ligera  $\lambda$  o de cadena ligera  $\kappa$  (idiopática, asociada a mieloma o macroglobulinemia), A $\beta$ 2M (hemodiálisis crónica), ATTR (polineuropatía amiloide familiar [portuguesa, japonesa, sueca]), miocardiopatía amiloide familiar (danesa), amiloide cardíaca aislada, amiloidosis senil sistémica, ALAPP o insulinoma amilínico, factor natriurético auricular (amiloide auricular aislado), procalcitonina (carcinoma medular de la tiroides), gelsolina (amiloidosis familiar [finlandesa]), cistatina C (hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis [islandesa]), AApo-A-I (polineuropatía familiar con amiloidosis-*lowa*), AApo-A-II (senescencia acelerada en los ratones), amiloide asociada a fibrinógeno; y Asor o PrP-27 (encefalopatía espongiiforme ovina, enfermedad de Creutzfeldt Jacob, síndrome de Gertsman-Straussler-Scheinker, encefalitis espongiiforme bovina) o en los casos de personas que son homocigotas para el alelo apolipoproteína E4, y la afección relacionada con la homocigosidad para el alelo apolipoproteína E4 o la enfermedad de Huntington. La invención contempla enfermedades relacionadas con el depósito de placas de amiloide. En una realización, la enfermedad relacionada con el depósito de amiloide es la EA.

Los presentes benzofuranos de acuerdo con la fórmula (I) se pueden utilizar para la toma de imágenes de la amiloide al servir de marcador indirecto de la eficacia del tratamiento antiamiloide. La administración de un trazador para tomar imágenes de la amiloide para establecer un valor de referencia basal del depósito de amiloide y la posterior toma de imágenes de un paciente tanto antes como después del tratamiento del paciente con un fármaco antiamiloide permite determinar la eficacia del tratamiento antiamiloide. El método se puede usar para determinar la eficacia de un tratamiento antiamiloide porque se puede administrar un trazador para tomar imágenes de la amiloide, y se pueden tomar imágenes del paciente antes y después de cualquier tratamiento antiamiloide. El método contempla la determinación de tratamientos antiamiloides que son ineficaces a la hora de tratar enfermedades relacionadas con el depósito de amiloide, así como los tratamientos antiamiloides que son eficaces para tratar enfermedades relacionadas con el depósito de amiloide. Una persona experta en la técnica es capaz de determinar las condiciones y la dosis del tratamiento antiamiloide de acuerdo con los protocolos apropiados. Por consiguiente, la presente invención contempla determinar la eficacia de los tratamientos antiamiloides que se conocen actualmente, así como los tratamientos que aún se tienen que descubrir. Los tratamientos antiamiloides no limitantes de ejemplo se describen más abajo.

En algunas realizaciones, la eficacia de los inhibidores de la acetilcolinesterasa para el tratamiento de la amiloidosis se puede determinar con el presente método. El tratamiento con acetilcolinesterasa se basa en estudios de patrones de degeneración en la EA que identificaron disminuciones sustanciosas entre grupos de neuronas en el prosencéfalo basal. Estas células utilizan el transmisor acetilcolina y su pérdida significa que se está liberando menos acetilcolina en las terminales anteriores de la corteza. Varios fármacos, tales como tacrina, donepezilo, rivastigmina y galantamina, se han desarrollado basándose en estos hallazgos, y se propone que funcionan inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa (Ingram, V., *American Scientist*, 2003, 91 (4): 312-321).

En otras realizaciones, la eficacia del tratamiento antiamiloide que actúa selectivamente sobre las enzimas responsables de la formación de fragmentos nocivos de la proteína precursora de amiloide (APP) en el tratamiento de la amiloidosis se determina mediante los compuestos de la invención de acuerdo con la metodología descrita. En algunas realizaciones, el fragmento nocivo de la proteína precursora de amiloide (APP) es el péptido de A $\beta$  mal plegado. Por ejemplo, la sobreproducción del fragmento A $\beta$ 1-42 se considera por algunos científicos que es la causa principal de la EA. El fragmento A $\beta$ 1-42 está formado por la escisión de la APP mediante la enzima  $\beta$ -secretasa (BACE1) (que produce el extremo amino) y la enzima  $\gamma$ -secretasa (que escinde el extremo carboxilo de la APP). Los inhibidores de estas enzimas secretasa se pueden utilizar como tratamientos antiamiloides (Ingram V., *American Scientist*, 2003, 91(4): 312-321).

En algunas realizaciones, la eficacia de las estrategias inmunoterápicas para el tratamiento de la amiloidosis se puede determinar mediante el presente método. La inmunoterapia funciona utilizando el sistema inmunitario del paciente para localizar y destruir las placas de amiloide, y los científicos están persiguiendo activamente muchas estrategias inmunoterápicas. Las estrategias inmunoterápicas pueden ser pasivas o activas. Por ejemplo, en la inmunoterapia activa, un paciente puede recibir una inyección o una aplicación del péptido A $\beta$  con pulverizador

nasal, lo que conduce a una respuesta inmunitaria antiamiloide. La inmunoterapia pasiva, por otra parte, podría implicar que se esquive la proteína amiloide  $\beta$ , utilizando en su lugar antisuero que ya se ha producido en respuesta al amiloide  $\beta$ . La inmunoterapia de anticuerpos contra el péptido de A $\beta$  se ha estudiado para el tratamiento de la EA. Por ejemplo, AN-1792 es una preparación de amiloide  $\beta$  sintética preagregada (A $\beta$ , 1-42 de longitud) junto con el adyuvante QS-21 (Hock, C et al., 2003, *Neuron.*, 38: 547-554). Unos 300 pacientes con EA se han tratado con esta preparación antes de la suspensión del ensayo clínico debido a los efectos secundarios (Birmingham, K. y Frantz, S., 2002, *Nature Medicine*, 8: 199-200).

En otras realizaciones, la eficacia de las estrategias neuroprotectoras en el tratamiento de la amiloidosis se determina mediante el método presente. Por ejemplo, muchos médicos recomiendan que los pacientes tomen dosis elevadas (1000-2000 UI/día) de vitamina E. Otros tipos de estrategias neuroprotectoras que se han sugerido para el tratamiento de la amiloidosis son dosis elevadas de vitamina C, de moduladores del canal de calcio, de depuradores de los radicales libres, y de quelantes de iones metálicos (Selkoe et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2003, 43: 545-84).

En algunas realizaciones, la eficacia de las estrategias con antiinflamatorios (AINE) en el tratamiento de la amiloidosis se determina mediante el método presente. Los tratamientos que implican los AINE se basan en los datos de que se desencadena una respuesta inflamatoria celular en la corteza por la acumulación progresiva del péptido de A $\beta$ . Los antiinflamatorios de ejemplo son prednisona, inhibidores inespecíficos de la ciclooxigenasa e inhibidores de la ciclooxigenasa 2 (Clark, M., et al., *Annals of Internal Medicine*, 2003, 138(5): 400-410; y Hardy, John, *Annu. Rev. Med.*, 2004, 55: 15-25).

En algunas realizaciones, el presente método es capaz de determinar la eficacia de los tratamientos con hipocolesterolemiantes que incluyen, pero sin limitarse a ellos, los inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (estatinas). Los tratamientos que implican hipocolesterolemiantes (tales como las estatinas) se basan en las pruebas epidemiológicas de que los pacientes tratados con estatinas tienen una incidencia más baja de EA y que las estatinas son capaces de alterar el metabolismo de la A $\beta$  para disminuir la cantidad de A $\beta$  (Wolozin, B (2002) «Cholesterol and Alzheimer's disease». *Biochemical Society Transactions*. 30: 525-529). Fármacos hipocolesterolemiantes estatínicos de ejemplo incluyen lovastatina, pravastatina, rosuvastatina, fluvastatina, atorvastatina y simvastatina. Otros hipocolesterolemiantes incluyen niacina, colestiramina, fenofibrato, colesvelam y ezetimiba.

En otras realizaciones, la eficacia que tienen algunas moléculas pequeñas a la hora de eliminar la neurotoxicidad de los agregados de A $\beta$ 1-42 en el tratamiento de la amiloidosis se determina mediante el presente método. Tal fármaco, cuando se administra, por ejemplo, al comienzo de la progresión de la enfermedad, «desintoxicaría» la acumulación gradual del péptido A $\beta$  antes de que inflija algún daño permanente a las neuronas. (Clark, M., et al., *Annals of Internal Medicine*, 2003, 138(5): 400-410).

En algunas realizaciones, la eficacia de los «péptidos señuelo» para el tratamiento de la amiloidosis se determina mediante el presente método. Los péptidos señuelo son moléculas pequeñas que se fijan al péptido A $\beta$ 1-42 en agregación y le obligan a adquirir una estructura inocua. Los péptidos señuelo de ejemplo son péptidos pequeños (5, 6 o 9 aminoácidos de longitud), seleccionados entre grandes colecciones de fragmentos de proteínas por su capacidad para formar una asociación fuerte con el A $\beta$ 1-42 etiquetado (Clark, M. et al., *Annals of Internal Medicine*, 2003, 138(5): 400-410).

En otras realizaciones, la eficacia de la modulación de la homeostasia del colesterol para el tratamiento de la amiloidosis se determina mediante el presente método. El uso continuo de los hipocolesterolemiantes se ha relacionado recientemente con una incidencia menor de la EA. A la vez, se ha demostrado que las dietas ricas en colesterol incrementan la enfermedad de la A $\beta$  en los animales, y se ha demostrado que los hipocolesterolemiantes reducen la enfermedad en los ratones transgénicos con la APP. Se están llevando a cabo ensayos clínicos para estudiar el efecto de la modulación de la homeostasia del colesterol para el tratamiento de la EA (Hardy, John, *Annu. Rev. Med.* 2004, 55: 15-25).

Determinados anticuerpos tales como el denominado m266 (DeMattos, RB, Bales, KR, Cummins, DJ, Dodart, JC, Paul, SM, Holtzman, DM (2001) «Peripheral anti-A  $\beta$  antibody alters CNS and plasma A $\beta$  clearance and decreases brain A $\beta$  burden in a mouse model of Alzheimer's disease» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 8850-8855) o moléculas que no sean anticuerpos (Matsuoka, Y, Saito, M, LaFrancois, J, Saito, M, Gaynor, K, Olm, V, Wang, L, Casey, E, Lu, Y, Shiratori, C, Lemere, C, Duff, K (2001) «Novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease by peripheral administration of agents with an affinity to  $\beta$ -amyloid» *Journal of Neuroscience*, 23: 29-33) se cree que disminuyen la amiloide del cerebro al unirse a los péptidos A $\beta$  en la sangre, lo que crea un «sumidero periférico» y cambia el equilibrio de A $\beta$  desde el cerebro a la sangre, donde se puede eliminar del cuerpo. Tales agentes se citan en la presente memoria como «agentes de sumidero periférico».

#### **Evaluación de la eficacia del tratamiento antiamiloide**

La metodología que emplea los benzofuranos de acuerdo con la fórmula (I) para determinar la eficacia terapéutica del tratamiento de la amiloidosis comprende la administración a un paciente que lo necesita de un compuesto de

fórmula (I) y tomar imágenes del paciente. Después de la toma de imágenes, se administra al menos un fármaco antiamilóide al paciente. A continuación, al paciente se le administra una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I) y se vuelven a tomar imágenes del paciente. Finalmente, la cantidad basal del depósito de amiloide del paciente antes del tratamiento con el fármaco antiamilóide se compara con la cantidad del depósito de amiloide en el paciente después del tratamiento con el fármaco antiamilóide. Tal comparación se encuentra dentro de las competencias de un experto en la técnica.

En algunas realizaciones, la cantidad de depósito de amiloide en el paciente antes del tratamiento con el fármaco antiamilóide será más alta que la cantidad de depósito de amiloide en el paciente después del tratamiento con el fármaco antiamilóide. Tal resultado indica que el fármaco antiamilóide o el tratamiento antiamilóide es eficaz para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el depósito de amiloide.

Por ejemplo, AN-1792 es una preparación de amiloide- $\beta$  sintético preagregado ( $A\beta$ ; 1-42 de longitud) junto con el adyuvante QS-21. Unos 300 pacientes con EA se trataron con esta preparación antes de la suspensión del ensayo clínico debido a los efectos secundarios (Birmingham, K y Frantz, S., 2002, *Nature Medicine*, 8: 199-200). A pesar de este retraso, el optimismo acerca de esta estrategia ha surgido por dos hallazgos. Primero, en el único informe de autopsia publicado hasta ahora referente a un paciente de EA tratado con AN-1792, había varios hallazgos inusuales, entre ellos: (i) áreas extensas de neocorteza con muy pocas placas de  $A\beta$ ; (ii) áreas de corteza que estaban desprovistas de placas de  $A\beta$  contenían densidad de ovillos, hebras de neuropilos y angiopatía amiloide cerebral (AAC) similar a una EA sin inmunizar, pero carecían de neuritas distróficas asociadas a placas y de agrupamientos de astrocitos; (iii) en algunas regiones desprovistas de placas, la inmunorreactividad de  $A\beta$  se asoció a los microglíocitos (Nicoll, J et al., 2003, *Nature Medicine*, 9: 448-452). Segundo, en un pequeño grupo de 30 pacientes tratados con AN-1792, los pacientes que generaron anticuerpos contra la  $A\beta$ , como se determinó mediante un ensayo de inmunorreactividad de placas de amiloide en tejidos (TAPIR, por su nombre en inglés), mostraron un ritmo significativamente más lento de pérdida de funciones cognitivas y de actividades en cadena Q *living*, como se indicó mediante el minexamen del estado mental, la Disability Assessment for Dementia y la prueba visual de asociación de parejas para el retraso del recuerdo de la escala de memoria de Wechsler, cuando se comparó con pacientes sin tales anticuerpos (Hock, C et al., 2003, *Neuron*, 38: 547-554).

En otra realización, la invención contempla administrar el compuesto de acuerdo con la fórmula (I) a un paciente en un método para tomar imágenes de los depósitos de amiloide en el cerebro de los pacientes que no satisfacen los criterios clínicos para el diagnóstico de la EA. Estos incluyen, pero sin limitarse a ellos, pacientes que presentan signos clínicos de demencia o pacientes con un trastorno cognitivo leve, tal como, por ejemplo, pacientes que presentan un trastorno de demencia de origen incierto, donde los datos de las imágenes de las amiloides de los pacientes revela que algunos depósitos de amiloide son un síntoma premonitorio de la EA o de otro trastorno con depósito de amiloide.

Otra realización de la presente invención es un método para identificar un paciente como prodrómico de un diagnóstico clínico estándar de una enfermedad con depósitos de amiloide. El método comprende el uso de radiotrazadores de amiloide para obtener datos cuantitativos y cualitativos de un paciente. La toma de imágenes de amiloide cuantitativas y cualitativas, de acuerdo con la presente invención, debe permitir el diagnóstico más precoz y más exacto de enfermedades con depósitos de amiloide, y debe ayudar al desarrollo de tratamientos antiamiloides. El paciente idóneo para esta metodología puede ser un paciente que presenta signos de demencia clínica o un paciente que muestra signos clínicos de trastorno cognitivo leve.

Para ajustarse a la práctica convencional, el médico puede aplicar diferentes criterios para determinar los signos de la demencia clínica. Tales criterios incluyen, pero sin limitarse a ellos, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, tercera edición, (DSM-III), *Alzheimer's Disease Diagnostic and Treatment Center (ADDTC)*, *International Statistical Classification of Diseases*, 10.<sup>a</sup> revisión (ICD-10), *National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences (NINDS-AIREN)* y *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, cuarta edición (DSM-IV). Véase Pohjasvaara et al., *Stroke* 31: 2952-57 (2000).

La caracterización clínica de que un paciente tiene un trastorno cognitivo se encuentra dentro de los conocimientos del experto en la técnica. La evaluación de un paciente para dilucidar tal afección implica realizar una serie de pruebas mentales. Los métodos para el diagnóstico clínico se han revisado ampliamente y se explican, por ejemplo, en Petersen et al., *Arch. Neurol.* 56: 303-08 (1999).

Basándose solo en las pruebas clínicas, los sujetos identificados con un TCL pueden convertirse en un diagnóstico de EA (a un ritmo de un 10-15% al año), permanecer con la TCL, o revertirse a un diagnóstico de «normal» (10-15% al año). Larrieu et al., *Neurology* 59: 1594-99 (1992). En consecuencia, existe una considerable inseguridad pronóstica relacionada con este diagnóstico clínico. La capacidad para identificar la presencia o ausencia del depósito de amiloide en el cerebro en un sujeto con diagnóstico clínico de TCL es posible que incremente enormemente la exactitud del pronóstico para la conversión en EA.

La categoría de enfermedades relacionadas con el depósito de amiloide incluye, pero sin limitarse a ellas, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, diabetes mellitus de tipo 2, hemorragia cerebral hereditaria con

amiloidosis (holandesa), amiloide A (reactiva), amiloidosis secundaria, fiebre mediterránea familiar, nefropatía amiloide familiar con urticaria y sordera (síndrome de Muckle-Wells), amiloide de cadena ligera  $\lambda$  o amiloide de cadena ligera  $\kappa$  (idiopática, asociada a mieloma o macroglobulinemia), A $\beta$ 2M (hemodiálisis crónica), ATTR (polineuropatía amiloide familiar [portuguesa, japonesa, sueca]), miocardiopatía amiloide familiar (danesa), amiloide cardíaca aislada, amiloidosis seniles sistémicas, AIAPP o insulinoma de amilina, factor natriurético auricular (amiloide auricular aislado), procalcitonina (carcinoma medular de la tiroides), gelsolina (amiloidosis familiar [finlandesa]), cistatina C (hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis [islandesa]), AApo-A-I (polineuropatía familiar con amiloidosis-lowia), AApo-A-II (senescencia acelerada en ratones), amiloide asociado a fibrinógeno; y Asor o PrP-27 (encefalopatía espongiiforme ovina, enfermedad de Creutzfeld Jacob, síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker, encefalitis espongiiforme bovina) o en los casos de personas que son homocigotas para el alelo apolipoproteína E4, y la afección relacionada con homocigosis para el alelo apolipoproteína E4 o la enfermedad de Huntington. En una realización, la enfermedad relacionada con el depósito de amiloide es una enfermedad con depósito de placas de amiloide. Una enfermedad específica relacionada con el depósito de amiloide es la EA.

- 15 De acuerdo con la invención, una metodología básica para identificar un paciente como prodrómico de una enfermedad con depósito de amiloide conlleva:
- A) administrar al paciente, que presenta signos de demencia clínica o que presenta signos clínicos de un trastorno cognitivo leve, y que lo necesita, una cantidad eficaz del compuesto de fórmula I descrito más arriba o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
  - 20 B) tomar imágenes de dicho paciente para obtener datos y
  - C) analizar dichos datos para evaluar la cantidad de amiloide en dicho paciente por referencia a un paciente normal.

Una realización se refiere a un método para diagnosticar un paciente que presenta una demencia de origen incierto. Este método comprende determinar si las demencias de origen incierto es probable que sean una EA u otro trastorno con depósito de amiloide basándose en el hallazgo de depósitos de amiloide. El método comprende administrar a un paciente un compuesto de fórmula (I), tomar imágenes del paciente para obtener datos y determinar si la demencia de origen incierto es una EA basándose en el hallazgo de depósitos de amiloide.

La terminología «trastorno de demencia de origen incierto» se refiere a una afección en la que una persona se presenta para una evaluación clínica (que puede consistir en evaluaciones neurológicas, psiquiátricas, médicas y neuropsicológicas que los expertos en la técnica emplean con frecuencia para diagnosticar a las personas con trastornos de demencia) y, después de esa evaluación clínica, el evaluador encuentra indicios de que puede existir algún trastorno de demencia (basándose en las pruebas de memoria subjetiva, descripción de pérdida de memoria por informadores familiares de las personas que se desvían del funcionamiento normal, o un mal resultado en las pruebas neuropsicológicas y clínicas utilizadas con frecuencia por los expertos en la técnica), pero que no proporciona suficientes pruebas para algún trastorno de demencia definido clínicamente (tal como EA, demencia frontotemporal, demencia con cuerpos de Lewy, demencia vascular, pseudodemencia debida a depresión mayor, enfermedad de Creutzfeld Jacob y otras conocidas por los expertos en la técnica) o encuentra que la persona muestra indicios de más de un único trastorno de demencia hasta el grado de que la distinción entre estos dos (o más) trastornos de demencia es incierto en esta persona.

Esta realización de la invención emplea radiotrazadores de amiloide que, junto con técnicas de neuroimagen no invasivas tales como la espectroscopia de resonancia magnética (ERM) o imágenes de resonancia magnética (IRM) o gammagrafías tal como tomografía por emisión de positrones (TEP) o tomografía computerizada por emisión de protones simples (SPECT), se utilizan para cuantificar el depósito de amiloide *in vivo*. Esta técnicas de toma de imágenes adquieren datos de muchas regiones de cerebro. La cuantificación sobre regiones específicas se consigue delineando «regiones de interés o RDI».

De acuerdo con esta realización, los datos obtenidos de pacientes que utilizan una de las técnicas de toma de imágenes mencionadas más arriba se pueden comparar con los datos de pacientes normales con una conclusión basada en criterios que distinguen al paciente como prodrómico de un diagnóstico clínico estándar de una enfermedad con depósito de amiloide.

- 50 Con el mismo protocolo se pueden comparar los datos obtenidos de las técnicas de imagen aplicadas a los pacientes para:
- definir que un trastorno de demencia de origen incierto está ocasionado por una enfermedad con depósito de amiloide;
  - diferenciar entre la enfermedad de Alzheimer y la demencia frontotemporal;
  - 55 vigilar a un paciente para determinar la aparición de la enfermedad de Alzheimer;

diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un paciente con diagnóstico clínico de trastorno cognitivo leve;

identificar que un paciente es prodrómico de la enfermedad de Alzheimer;

identificar que un paciente tiene una enfermedad relacionada con un trastorno con depósito de amiloide, en donde el paciente presenta un trastorno de demencia de origen incierto o

- 5 identificar que un paciente tiene la enfermedad de Alzheimer, en donde el paciente presenta un trastorno de demencia de origen incierto.

#### **Análisis de los datos de las imágenes de amiloides**

Los datos obtenidos se pueden expresar cuantitativamente en términos de valor de captación normalizado (VCN) o en términos de parámetros de modelización farmacocinética tales como la proporción del volumen de distribución (PVD) de Logan respecto a un tejido de referencia tal como el cerebelo. Los sujetos que están una desviación estándar por encima del valor de control típico de SLTV o de PVD se consideraría que dan una prueba «positiva» y que se considerarían prodrómicos de un diagnóstico clínico de una enfermedad con depósito de amiloide tal como la EA. Específicamente, los sujetos se pueden considerar «positivos» si su VCN medio a los 40-60 minutos es mayor de 1,0 en la corteza frontal, parietal o cingulada posterior. Este valor separó con claridad entre pacientes con EA y controles en el estudio inicial con humanos (Klunk et al., 2004, *Ann. Neurol.*, 55 (3): 306-19). Asimismo, los sujetos se pueden considerar «positivos» si su VCN de Logan supera 1,5 en la corteza frontal, parietal o cingulada posterior. Estas áreas del cerebro y los valores discriminatorios exactos se dan sólo como ejemplos, y los trabajos posteriores podrán describir otras áreas del cerebro que son útiles y se podrán refinar los valores discriminatorios y se podrán aplicar otras técnicas de modelización (tales como la modelización compartimental, el análisis gráfico, la modelización de tejido de referencia o el análisis espectral) para determinar los valores discriminatorios. Además, los datos de la exploración se pueden interpretar cualitativamente a partir de imágenes de la distribución regional del cerebro de tanto VCN, PVD de Logan u otros parámetros en los que la persona con experiencia en la técnica de interpretación de las exploraciones con TEP pueden determinar que la cantidad cualitativa y la distribución de la amiloide es coherente con una fase prodrómica de una enfermedad con depósito de amiloide diagnosticada desde el punto de vista clínico.

En otra realización de la invención, la detección *in vivo* o *in vitro* se efectúa, en relación con un sujeto que tiene o corre el riesgo de tener al menos un depósito de amiloide (a saber, un depósito que comprende al menos una proteína amiloidógena) mediante una metodología que conlleva:

- 30 (a) administrar, a un sujeto que padece una enfermedad relacionada con la amiloidosis, una cantidad detectable de una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) como se describe más arriba y sales farmacéuticamente aceptables del mismo; y
- (b) detectar la fijación del compuesto a un depósito de amiloide que comprende al menos una proteína amiloidógena, en donde la proteína amiloidógena se selecciona del grupo que consiste en AL, AH, ATTR, A $\beta$ 2M, AA, AApoAI, AApoAII, AGel, ALys, AFib, ACys, ABri, ADan, APrP, ACal, AIAPP, AANF, APro, AIns, AMed, ALer, A(tbn) y ALac.

En la amiloidosis sistémica primaria (AL), la proteína amiloidógena pueden ser cadenas ligeras ( $\kappa$  o  $\lambda$ ) de inmunoglobulina monoclonal en conformación anormal producidas por células plasmáticas clonales. Las fibrillas se depositan en los riñones, en el corazón, en el hígado y en otros órganos o tejidos.

En unos pocos casos, las fibrillas de la amiloidosis de cadenas de inmunoglobulinas contienen sólo secuencias de la cadena pesada en vez de secuencias de la cadena ligera. En esa circunstancia, la enfermedad se denomina «amiloidosis de cadena pesada» (AH).

En la amiloidosis de transtirretina, la proteína precursora es la TTR de secuencia normal o mutante, una proteína del transporte sintetizada en el hígado y en el plexo coroideo. La TTR es un tetrámero de 4 subunidades idénticas de 127 aminoácidos cada una. La TTR de secuencia normal forma depósitos de amiloide en los ventrículos cardíacos de los ancianos (mayores de 70 años); esta enfermedad se denomina también «amiloidosis cardíaca senil». La prevalencia de la amiloidosis cardíaca de la TTR se incrementa progresivamente con la edad, y afecta al 25% o más de la población mayor de 90 años. La ATTR de secuencia normal puede ser un hallazgo fortuito en la autopsia, o puede ocasionar síntomas clínicos (p. ej., insuficiencia cardíaca y arritmias).

Las mutaciones puntuales en la TTR incrementan la tendencia de la TTR a formar amiloides. Las mutaciones amiloidógenas de la TTR se heredan como una enfermedad dominante autosómica con una penetrancia variable. Se conocen más de 60 mutaciones amiloidógenas de la TTR. Las mutaciones de TTR más prevalentes son TTR Val30Met (frecuente en Portugal, Japón y Suecia) y TTR Val122Ile (llevada por el 3,9% de los afroamericanos). Las mutaciones amiloidógenas de la TTR provocan depósitos principalmente en los nervios periféricos, en el corazón, en el tubo digestivo y en el vítreo.

55 En la amiloidosis de microglobulina  $\beta$ 2, la proteína precursora es una microglobulina  $\beta$  normal ( $\beta$ 2M), que es el

componente de la cadena ligera del complejo mayor de histocompatibilidad. En el contexto clínico, la A $\beta$ 2M aparece en los pacientes en diálisis y, raramente, en los pacientes con insuficiencia renal que no están en diálisis.

5 La  $\beta$ 2M se cataboliza normalmente en el riñón. En los pacientes con insuficiencia renal, la proteína se acumula en el suero. Las membranas de diálisis convencionales no retiran la  $\beta$ 2M; por lo tanto, se puede alcanzar una concentración en el suero de hasta 30-60 veces el valor del intervalo de referencia para los pacientes en hemodiálisis. Los órganos típicos afectados incluyen el ligamento carpiano y, posiblemente, las membranas sinoviales (lo que conduce a artropatías y quistes óseos) y en el corazón, en el tubo digestivo, en el hígado, en los pulmones, en la próstata, en las glándulas suprarrenales y en la lengua.

10 La amiloidosis de amiloide A (AA) es la forma más frecuente de amiloidosis sistémica en todo el mundo. Se produce en el transcurso de una enfermedad inflamatoria crónica de origen infeccioso o no infeccioso. En la AA se encuentran afectados principalmente los riñones, el hígado y el bazo.

15 La amiloidosis de apolipoproteína AI (AApoAI) es una amiloidosis dominante autosómica ocasionada por mutaciones puntuales en el gen de la apoAI. Normalmente, esta amiloidosis es una amiloide renal prominente. Algunos familiares tienen una neuropatía periférica o una cardiopatía. La ApoAI (posiblemente de secuencia normal) también es el precursor de las fibrillas en las placas de amiloide localizadas en la aorta de los ancianos.

La amiloidosis de apolipoproteína AII (AApoAII) es una amiloidosis dominante autosómica ocasionada por mutaciones puntuales en el gen de la apoAII. Los 2 familiares descritos con este trastorno llevaban cada uno una mutación puntual en el codón de parada, lo que conducía a la producción de una proteína anormalmente larga.

20 La proteína precursora de la amiloidosis de gelsolina (AGel) es la gelsolina, una proteína moduladora de la actina. Las fibrillas de amiloide incluyen un fragmento de gelsolina que contiene una mutación puntual.

La amiloidosis de fibrinógeno (AFib) es una amiloidosis dominante autosómica ocasionada por mutaciones puntuales en el gen de la cadena  $\alpha$  del fibrinógeno.

La amiloidosis de lisozima (ALys) es una amiloidosis dominante autosómica ocasionada por mutaciones puntuales en el gen de la lisozima.

25 La proteína precursora en la amiloidosis de cistatina C (ACys) es la cistatina C, que es un inhibidor de las cisteín-proteasas que contiene una mutación puntual. Esta afección se denomina clínicamente HCHWA, de tipo islandés. La ACys es dominante autosómica. La presentación clínica incluye varios accidentes cerebrovasculares y cambios del estado mental que comienzan en la segunda o tercera década de vida. La patogenia se debe a que la cistatina mutante que se distribuye ampliamente en los tejidos, pero las fibrillas se forman sólo en los vasos cerebrales; por consiguiente, se cree que las afecciones locales intervienen en la formación de las fibrillas.

30

35 La proteína precursora en la amiloidosis de la proteína de los priones (APrP) es una proteína priónica, que es una glucoproteína de la membrana plasmática. El origen es tanto infeccioso (a saber, kuru) como genético (a saber, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob [ECJ], síndrome de Gerstmann-Straussier-Scheinker [GSS], insomnio familiar mortal [IFM]). La unidad infecciosa es la proteína priónica, que induce un cambio conformacional en una proteína homóloga codificada por un gen cromosómico del hospedador. Los pacientes con la ECJ, el GSS y el IFM llevan mutaciones amiloidógenas dominantes autosómicas en el gen de la proteína priónica; por consiguiente, la amiloidosis se forma incluso en la ausencia de un desencadenante infeccioso.

40 En la amiloide de calcitonina (ACal), la proteína precursora es la calcitonina, una hormona reguladora del calcio sintetizada por la tiroides. Los pacientes con el carcinoma medular de la tiroides pueden desarrollar un depósito de amiloide localizado en los tumores, que consiste en procalcitonina de la secuencia normal (ACal). La patogenia supuesta es el incremento local de calcitonina, lo que conduce a una concentración local suficientemente elevada del péptido que ocasiona la polimerización y la formación de fibrillas.

45 En la amiloidosis del polipéptido amiloide de los islotes (AIAPP), la proteína precursora es el polipéptido amiloide de los islotes (IAPP), también conocido como amilina. El IAPP es una proteína secretada por las células  $\beta$  de los islotes que se almacenan con insulina en los gránulos secretores y se libera junto con la insulina. Normalmente, el IAPP modula la actividad de la insulina en el músculo esquelético. El amiloide de IAPP se encuentra en los insulinomas y en el páncreas de muchos pacientes con diabetes mellitus de tipo 2.

50 La amiloidosis del factor natriurético auricular está relacionada con la proteína precursora, el factor natriurético auricular (ANF), una hormona que controla la homeostasia del agua y las sales, que se sintetiza en las aurículas cardíacas. Los depósitos de amiloide se localizan en las aurículas del corazón. Esta afección es muy prevalente en los ancianos. La amiloidosis del factor natriurético auricular (AANF) es más habitual en los pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva de larga duración, supuestamente debido a la producción persistente de ANF.

55 En la amiloide de prolactina (APro) se encuentran prolactina o fragmentos de prolactina en la amiloide hipofisaria. Esta afección se observa a menudo en los ancianos y también se ha descrito en un amiloidoma de un paciente con un tumor hipofisario productor de prolactina.

La amiloidosis de la piel reacciona con algunos anticuerpos contra la queratina para generar una forma localizada de amiloidosis. No obstante, la identidad exacta de las fibrillas no se ha confirmado químicamente en la amiloide de queratina, pero se denominan proteínas de la amiloide de queratina (AKer).

5 La amiloide intermedia aórtica se produce en la mayoría de personas mayores de 60 años. La amiloide de medina (AMed) procede de un fragmento proteolítico de lactadherina, una glucoproteína expresada por el epitelio mamario.

La demencia británica familiar (DBF) se caracteriza desde el punto de vista neuropatológico por el depósito de una única proteína formadora de amiloide, ABri. Se trata de un fragmento de una forma anormal de una proteína precursora, BRI.

10 En la demencia danesa familiar (DDF), una duplicación decamérica entre los codones 265 y 266 en la región 3' del gen de BRI origina un péptido amiloide denominado ADan con 11 residuos más que el péptido de tipo salvaje sintetizado por gen de BRI normal. Se han encontrado depósitos de ADan ampliamente distribuidos por el SNC en los casos de DDF. Los depósitos de ADan son predominantemente agregados no fibrilares.

Los péptidos ABri y ADan son fragmentos procedentes de una proteína precursora más larga anclada a la membrana denominada proteína precursora de BRI, y codificada por el gen *BRI* en el cromosoma 13.

15 El tumor de Pindborg se caracteriza por la producción de grandes cantidades de amiloide y la presencia de cuerpos laminares calcificados. La proteína amiloide relacionada a este síndrome todavía no a recibido ningún nombre, pero se suele citar como A(tbn).

20 Las fibrillas de amiloide se pueden formar en ausencia del componente amiloide P del suero (SAP) y de proteoglucanos de sulfato de heparina de varios polipéptidos naturales, tales como la insulina. Esto da lugar a la proteína amiloide, Alns, cuyo precursor es la insulina.

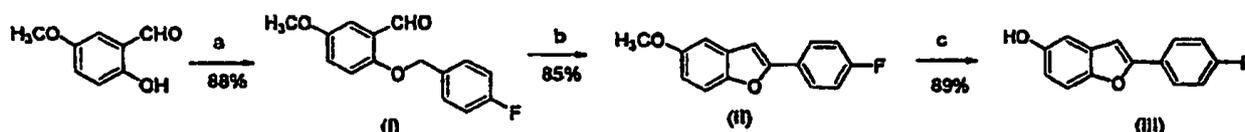
Otra proteína, la lactoferrina, se ha descrito que es la principal proteína de las fibrillas en la amiloidosis corneal subepitelial familiar. Se supone que o bien una anomalía estructural o bien una concentración anormalmente alta en el suero dará lugar a la proteína amiloide ALac.

25 Las proteínas amiloidógenas se detectan con los presentes compuestos de tioflavina. Los compuestos de tioflavina se dirigen selectivamente al menos a una proteína amiloidógena que procede de al menos una proteína precursora seleccionada entre el grupo que consiste en cadena ligera de inmunoglobulina, cadena pesada de inmunoglobulina, transtirretina, microglobulina  $\beta_2$ , (Apo)suero AA, apolipoproteína AI, apolipoproteína AII, gelsolina, lisozima, cadena  $\alpha$  del fibrinógeno, cistatina C, ABriPP, ABanPP, proteína priónica, (Pro)calcitonina, polipéptido amiloide de los islotes, factor natriurético auricular, prolactina, insulina, lactadherina, querato-epitelina, proteína precursora asociada al tumor de Pindborg (tbn) y lactoferrina. Son estas dianas proteicas las que dan lugar a diferentes síndromes o enfermedades de los tejidos afectados. Véase Buxbaum, *Curr. Opin. Rheumatol.* 16: 67-75 (2003). Véase también Merlino y Westermark, *J. Intern. Med.* 255: 159-178 (2004). Los ejemplos siguientes se ofrecen para ilustrar la presente invención. Los ejemplos ilustran cómo preparar los compuestos detectables de la invención, pero sin la presencia de marcaciones detectables, así como la manera en que tales compuestos se fijan al péptido sintético A $\beta$ .

## 35 Ejemplos

### Ejemplos de síntesis

#### Ejemplo 1. Preparación del 5-metoxi-2-(4'-fluorofenil)benzofurano



40 Esquema: a, 4-fluorobencilbromuro,  $K_2CO_3$ ,  $CH_3CN$ , a reflujo 4 h; b,  $P_4-t-Bu$ , tolueno, a reflujo 12 h; c,  $BBr_3$ ,  $CHCl_3$ , 3 horas a temperatura ambiente.

#### 2-Benciloxi-5-metoxibenzaldehído (I):

45 A una solución de 2-hidroxi-5-metoxibenzaldehído (0,152 g, 1,0 mmol) en MeCN seco (50 ml) se le añadió bromuro de 4-fluorobencilo (0,145 mg, 1,0 mmol) y  $K_2CO_3$  anhidro (0,27 g, 2,0 mmol). La mezcla se mantuvo a reflujo en agitación durante 4 horas, y luego se evaporó al vacío. Se le añadió agua (100 ml) y se extrajo la mezcla con EtOAc. La capa orgánica apartada se secó con  $MgSO_4$  y luego se evaporó al vacío. Finalmente, se eluyó el resto a través de una columna de gel de sílice con n-hexano/EtOAc (4:1) para dar el compuesto blanco I (0,21 g, 88%).

$^1H$  RMN (300 MHz, acetona- $d_6$ ):  $\delta$  10,56 (s, 1H, CHO), 7,35-7,48 (m, 2H), 7,12-7,19 (m, 5H), 5,20 (s, 2H,  $OCH_2$ ), 3,90 (s, 3H,  $OCH_3$ ).

**5-Metoxi-2-(4'-fluorofenil)benzofurano (II):**

A una solución del compuesto I (50 mg, 0,2 mmol) en tolueno seco (5 ml) se le añadió una solución de base de fosfaceno (P<sub>4</sub>-t-Bu) en hexano (0,2 ml, 1,0 M) y se mantuvo a reflujo durante una noche. Se le añadió CHCl<sub>2</sub> (50 ml) y se lavó la solución con agua. La capa orgánica apartada se secó con MgSO<sub>4</sub> y luego se evaporó al vacío.

- 5 Finalmente, se separó el resto en una cromatografía de capa fina de gel de sílice con hexano/EtOAc (4:1) para obtener el compuesto blanco II (39 g, 85%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, acetona-d<sub>6</sub>): δ 7,92-7,98 (m, 2H), 7,46 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,21-7,28 (m, 3H), 7,15 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 6,90 (dd, J = 3 Hz, 1H), 3,90 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

**5-Hidroxi-1-(4'-fluorofenil)benzofurano (III):**

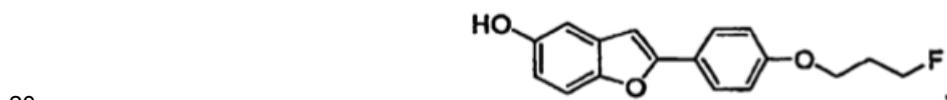
- 10 Una solución del compuesto II (24 mg, 0,1 mmol) en 5 ml de dicloruro de metileno se añadió a 2 ml de una solución de BBr<sub>3</sub> a 1,0 M en dicloruro de metileno, y se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Se retiró el solvente por evaporación y se purificó el producto bruto en cromatografía en capa fina de gel de sílice con hexano/EtOAc (3:1) para dar el compuesto blanco III (21 mg, 89%).

- 15 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, acetona-d<sub>6</sub>): δ 8,15 (s, 1H), 7,92-7,95 (m, 2H), 7,37 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,26 (t, J<sub>1</sub> = J<sub>2</sub> = 8,9 Hz, 2H), 7,14 (s, 1H), 7,02 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 6,85 (dd, J = 2,4 Hz, 1H).

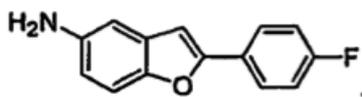
**Ejemplos 2-5**

Mediante los procedimientos análogos a los descritos en los ejemplos 1 y 2, se sintetizaron los compuestos siguientes:

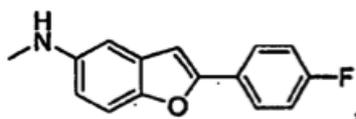
Ejemplo 2:



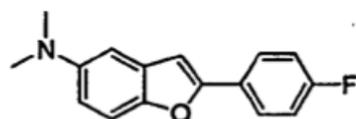
Ejemplo 3:



Ejemplo 4:



25 Ejemplo 5:

**Ejemplos biológicos****Estudios de la entrada en el cerebro de ratón**

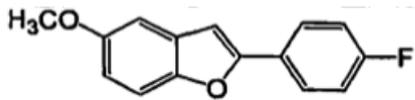
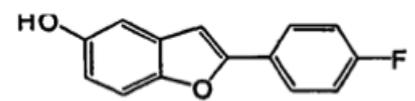
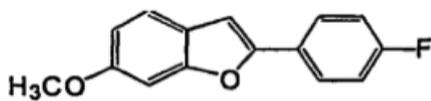
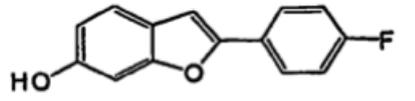
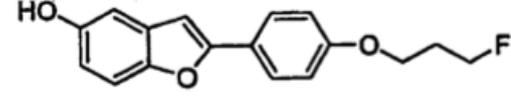
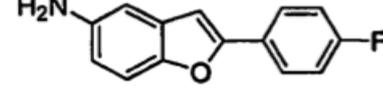
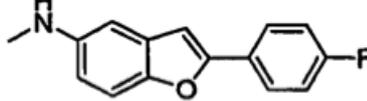
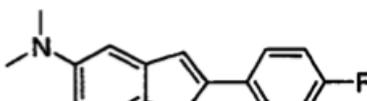
- 30 El 5-metoxi-2-(4'-fluorofenil)benzofurano en etanol se diluyó con solución salina normal para hacer una solución que contenía unos 500 μCi/ml. Se pesaron ratones Webster suizos de tipo salvaje, se les inyectaron unos 30 μCi a través de la vena lateral de la cola, y se mataron a diferentes tiempos después de la inyección. Se tomó una muestra de sangre completa mediante una punción cardíaca en el momento de la muerte, se retiró el cerebro rápidamente y se diseccionó en cerebelo y cerebro completo (sin el tronco encefálico). Se retiró un fémur de cada ratón también para determinar el índice metabólico del [<sup>18</sup>F]fluoruro. Estas fracciones se analizaron en un contador y de pocillos junto con una porción calibrada de lo inyectado, y las muestras se corrigieron por la desintegración en el momento de la inyección. Se pesaron las muestras, se determinó el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (%DI/g) y se normalizó por la masa corporal de ratón ((%DI\*kg)/g).
- 35

### Estudios de incorporación al cerebro de babuino

Un babuino de 40 kg se anestesió, se inmovilizó y se colocó en un respirador. Se colocó el babuino en un escáner de TEP para tomar imágenes del cerebro, y se realizó una exploración de transmisión para corregir la atenuación. Al babuino se le inyectó por vía intravenosa una solución con 8 mCi de 5-metoxi-2-(4'-fluorofenil)benzofurano, y durante 2 horas que siguieron a la inyección se tomaron imágenes del cerebro en una serie de intervalos de tiempo crecientes de recogida de datos. Después de la adquisición de datos, se reconstruyeron las imágenes y se dibujaron las regiones de interés. Para cada una de las regiones se generaron curvas de actividad frente a tiempo corregidas por la atención y la desintegración para determinar la cinética temporal cuantitativa de la radioactividad en cada región del cerebro. Estas curvas de actividad frente a tiempo indican una penetración excelente del radiotrazador en el cerebro y una eliminación rápida de la radioactividad del cerebro del babuino normal. Estas propiedades *in vivo* combinadas con la afinidad relativamente elevada del ligando *in vitro* para la amiloide agregada indican que el compuesto es un radiotrazador de amiloide potencialmente útil.

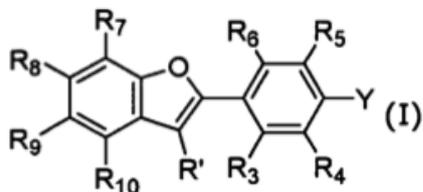
### Caracterización de la afinidad de fijación al péptido sintético A $\beta$

Las características de la fijación del derivado de benzofurano se analizaron con la A $\beta$  (1-40) sintética y el 2-(4'-[<sup>3</sup>H]metilamino-fenil)benzotiazol ([<sup>3</sup>H]BTA-1) en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4), como se describió previamente. Klunk et al., *Life Sci.* 69: 1471 (2001); Mathis et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12: 295 (2002). La tabla que viene a continuación recoge las constantes de inhibición (K<sub>i</sub>) de los cuatro compuestos mostrados para la competición de la fijación a [<sup>3</sup>H]BTA-1 de la A $\beta$  (1-40) sintética. Los compuestos con valores de K<sub>i</sub> por debajo de 20 nM sirven de ejemplo para uso como radiotrazadores de TEP *in vivo*.

Benzofuranos	K <sub>i</sub> (nM)
 (compuesto V)	3,7
 (Compuesto III)	27,7
	3,9
	96
	1,2
	28
	2,8
	2

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fijación a amiloide de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



en el que

5 Y es F, Cl, Br, I, O-(CR''<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-X, o -(CR''<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-X;

en el que

X es F, Cl, Br o I; y

n es 1 a 5;

R' es H o un grupo alquilo(C<sub>1-8</sub>);

10 R'' es H o un grupo alquilo(C<sub>1-8</sub>);

R<sub>3</sub> a R<sub>10</sub> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, alquilo(C<sub>1-5</sub>), (CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-OR<sub>11</sub>, CF<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-X, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-X, CN, -CO-R<sub>11</sub>, -N(R<sub>11</sub>)<sub>2</sub>, -NR''<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NO<sub>2</sub>, -CO-N(R<sub>11</sub>)<sub>2</sub>, -O-(CO)-R<sub>11</sub>, OR<sub>11</sub>, SR<sub>11</sub>, COOR<sub>11</sub>, R<sub>ph</sub>, -CR<sub>11</sub>=CR<sub>11</sub>-R<sub>ph</sub> y -C(R<sub>11</sub>)<sub>2</sub>-C(R<sub>11</sub>)<sub>2</sub>-R<sub>ph</sub>, en el que

X es F, Cl, Br o I; y

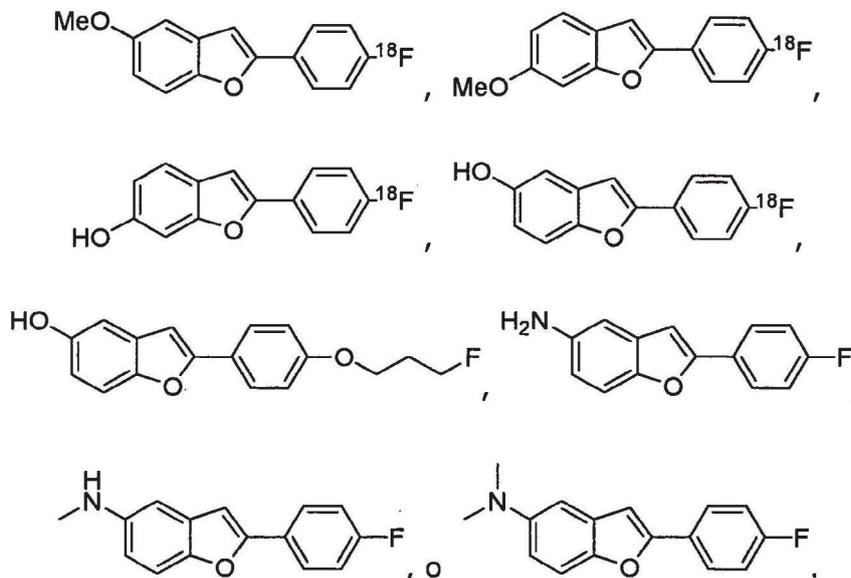
15 R<sub>ph</sub> es fenilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo que consiste en F, Cl, Br, I, alquilo(C<sub>1-5</sub>), (CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-O-R<sub>11</sub>, CF<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-X, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-X, CN, -CO-R<sub>11</sub>, -N(R<sub>11</sub>)<sub>2</sub>, -CO-N(R<sub>11</sub>)<sub>2</sub>, -O-(CO)-R<sub>11</sub>, OR<sub>11</sub>, SR<sub>11</sub> y COOR<sub>11</sub>, en el que cada R<sub>11</sub> es independientemente H o alquilo(C<sub>1-5</sub>); y

Y o R<sup>3</sup>-R<sup>10</sup> comprenden al menos una marcación detectable seleccionada entre el grupo que consiste en <sup>131</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>124</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>76</sup>Br, <sup>75</sup>Br, <sup>18</sup>F, <sup>19</sup>F, <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>C, <sup>14</sup>C y <sup>3</sup>H.

20 2. Compuesto de fijación a amiloide de acuerdo con la reivindicación 1, en el que cada uno de R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> y R<sub>10</sub> es H, y R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> son independientemente OR<sub>11</sub>.

3. Compuesto de fijación a amiloide de acuerdo con la reivindicación 2, en el que Y comprende al menos una marcación detectable.

4. Compuesto de fijación a amiloide de acuerdo con la reivindicación 2 que tiene la fórmula siguiente:



5. Composición farmacéutica que comprende
- (i) una cantidad eficaz de un compuesto de fijación a amiloide de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4; y
  - (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 6. Compuesto de fijación a amiloide de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en un método de detección de depósito o depósitos de amiloide *in vivo*, comprendiendo dicho método:
- (i) administrar a un mamífero una cantidad eficaz de un compuesto de fijación a amiloide de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el compuesto puede fijarse a cualquier depósito o depósitos de amiloide en el mamífero; y
- 10 (ii) detectar la fijación del compuesto al depósito o depósitos de amiloide en el mamífero.
7. Compuesto para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el depósito o depósitos de amiloide están localizados en el cerebro del mamífero.
8. Compuesto para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el mamífero es un humano que se sospecha que tiene la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Alzheimer familiar, el síndrome de Down o
- 15 que es homocigoto para el alelo apolipoproteína E4.
9. Método de detección de depósito o depósitos de amiloide *in vitro* que comprende:
- (i) poner en contacto un tejido corporal con una cantidad eficaz de un compuesto de fijación a amiloide de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el compuesto se puede fijar a todo depósito o depósitos de amiloide en el tejido; y
- 20 (ii) detectar la fijación del compuesto al depósito o depósitos de amiloide en el tejido.
10. Método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el método comprende adicionalmente:
- (iii) separar del tejido el depósito o depósitos de amiloide fijados al compuesto; y
  - (iv) cuantificar el depósito o depósitos de amiloide fijados al compuesto.
- 25 11. Compuesto de fijación a amiloide de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en un método que permite diferenciar entre un cerebro enfermo de Alzheimer y un cerebro normal que comprende:
- (i) obtener tejidos de (i) el cerebelo y de (ii) otra área del mismo cerebro, de un mamífero normal y de un mamífero que se sospecha que tiene la enfermedad de Alzheimer;
  - (ii) poner en contacto los tejidos con un compuesto de fijación a amiloide de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4;
- 30 (iii) cuantificar la amiloide fijada al compuesto;
- (iv) calcular la proporción entre (a) la cantidad de amiloide en el área del cerebro que no corresponde al cerebelo y (b) la cantidad de amiloide en el cerebelo; y
  - (v) comparar la proporción para un mamífero normal con la proporción para un mamífero del que se sospecha que tiene la enfermedad de Alzheimer.
- 35 12. Compuesto de fijación a amiloide de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la proporción entre (i) la fijación del compuesto a un área del cerebro que no corresponda al cerebelo y (ii) la fijación del compuesto al cerebelo, en un sujeto, se compara con la proporción para los sujetos normales.
13. Método de detección de depósitos de amiloide en tejido de animal o de humano obtenido por biopsia o autopsia que comprende las etapas de:
- 40 (a) incubar el tejido fijado en formol o congelado en fresco con una solución de un compuesto de fijación a amiloide de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para formar un depósito marcado; y
- (b) detectar el depósito marcado.
- 45 14. Método para cuantificar la cantidad de amiloide en el tejido obtenido por biopsia o autopsia que comprende las etapas de:

- 5 a) incubar un derivado radiomarcado de un compuesto de fijación a amiloide de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo con un homogeneizado de tejido obtenido por biopsia o por autopsia, en el que al menos uno de los sustituyentes en el compuesto está marcado con una radiomarcación seleccionada entre el grupo que consiste en  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ , y un sustituyente con carbono, en el que al menos un carbono es  $^{14}\text{C}$ ;
- b) separar el derivado radiomarcado del compuesto fijado al tejido del que no está fijado al tejido,
- c) cuantificar el derivado radiomarcado del compuesto fijado al tejido, y
- d) convertir las unidades de derivado radiomarcado del compuesto fijado al tejido en unidades de microgramos de amiloide por 100 mg de tejido por comparación con un estándar.
- 10 15. Método para fijar selectivamente un compuesto de fijación a amiloide de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a placas de amiloide, pero no a ovillos neurofibrilares, en el tejido encefálico que contiene a ambos, comprendiendo dicho método la puesta en contacto de las placas de amiloide, en ensayos de tinción o fijación *in vitro*, con un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 a una concentración por debajo de unos 10 nM.
- 15 16. Compuesto de fijación a amiloide de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para uso en un método de fijación selectiva *in vivo* de un compuesto de fijación a amiloide de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a placas de amiloide, pero no a ovillos neurofibrilares, en el tejido encefálico que contiene a ambos, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de tal forma que la concentración sanguínea del compuesto administrado permanezca por debajo de unos 10 nM *in vivo*.
- 20 17. Compuesto de fijación a amiloide de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para uso en un método *in vivo* o *in vitro* de detección en un sujeto de al menos un depósito de amiloide que comprende al menos una proteína amiloidógena, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 25 (a) administrar, a un sujeto que padece una enfermedad relacionada con una amiloidosis, una cantidad detectable de una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fijación a amiloide de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable; y
- (b) detectar la fijación del compuesto a un depósito de amiloide que comprende al menos una proteína amiloidógena.
- 30 18. Compuesto para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el sujeto padece una enfermedad relacionada con una amiloidosis sistémica.
19. Compuesto para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 18, en el que al menos un depósito de amiloide está localizado en tejido seleccionado entre el grupo que consiste en nervio periférico, piel, lengua, corazón o hígado.
- 35 20. Compuesto para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 18, en el que al menos un depósito de amiloide está localizado en un órgano parenquimatoso.
21. Compuesto para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 20, en el que el órgano se selecciona entre el grupo que consiste en bazo, riñón, hígado y glándula suprarrenal.
- 40 22. Compuesto para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 18, en el que la enfermedad relacionada con una amiloidosis sistémica se selecciona entre el grupo que consiste en mieloma múltiple, macroglobulinemia, linfoma, enfermedad inflamatoria crónica, artritis reumatoide, enfermedad infecciosa, dermatomiositis, esclerodermia, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, tuberculosis, osteomielitis crónica, bronquiectasia, absceso cutáneo, absceso pulmonar, cáncer, enfermedad de Hodgkin, amiloidosis heredofamiliar, fiebre mediterránea familiar, demencia familiar y polineuropatía amiloide familiar.
- 45 23. Compuesto para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el sujeto está recibiendo hemodiálisis para la insuficiencia renal crónica.
24. Compuesto para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el sujeto padece una enfermedad relacionada con una amiloidosis localizada.
- 50 25. Compuesto para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 24, en el que al menos un depósito de amiloide está localizado en el páncreas.
26. Compuesto para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 24, en el que la enfermedad relacionada

con una amiloidosis localizada se selecciona entre el grupo que consiste en mieloma primario, demencia familiar, encefalopatías espongiiformes, tumor tiroideo de células C, insulinoma, prolactinoma y tumor de Pindborg.

5 27. Compuesto de fijación a amiloide de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en un método de identificación de un paciente como prodrómico de una enfermedad relacionada con un depósito de amiloide, que comprende:

- A) administrar al paciente, que presenta signos de demencia clínica o signos clínicos de un trastorno cognitivo leve, un compuesto de fijación a amiloide de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; luego
- B) tomar imágenes de dicho paciente para obtener datos;

10 y

- C) analizar dichos datos para evaluar la cantidad de amiloide en dicho paciente por referencia a una cantidad normal, por lo que se identifica a dicho paciente como prodrómico de una enfermedad relacionada con un depósito de amiloide.

15 28. Compuesto para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 27, en el que el paciente tiene un diagnóstico de trastorno cognitivo leve.

29. Compuesto para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 27, en el que la enfermedad amiloide es la enfermedad de Alzheimer.

20 30. Compuesto para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 27, en donde dichos datos indican que un trastorno de demencia de origen incierto está provocado por una enfermedad relacionada con un depósito de amiloide.

31. Compuesto para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 27, que comprende la distinción entre la enfermedad de Alzheimer y la demencia frontotemporal.

32. Compuesto para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 27, que comprende adicionalmente la vigilancia de dicho paciente para detectar la aparición de la enfermedad de Alzheimer.

25 33. Compuesto para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 27, que comprende el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un paciente diagnosticado clínicamente con un trastorno cognitivo leve.

34. Compuesto para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 27, en el que el paciente presenta un trastorno de demencia de origen incierto.

30 35. Compuesto para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 27 o 34, en el que el paciente tiene una EA sin diagnosticar.

36. Compuesto de fijación a amiloide de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en un método de determinación de la eficacia terapéutica del tratamiento de la amiloidosis, que comprende:

- A) administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de fijación a amiloide de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- 35 B) tomar imágenes de dicho paciente; luego
- C) administrar a dicho paciente que lo necesita al menos un fármaco antiamilóide;
- D) posteriormente, administrar a dicho paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4;
- E) tomar imágenes de dicho paciente; y
- 40 F) comparar la cantidad de depósitos de amiloide en dicho paciente antes del tratamiento con dicho al menos un fármaco antiamilóide con la cantidad de depósitos de amiloide en dicho paciente después del tratamiento con dicho al menos un fármaco antiamilóide.

37. Compuesto para uso en un método de acuerdo con la reivindicación 36, en el que dicha amiloidosis es la EA.