

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 921**

51 Int. Cl.:

C07D 277/66 (2006.01)

A61K 31/428 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04720788 .1**

96 Fecha de presentación: **15.03.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1611115**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.01.2006**

54

Título: **Compuestos derivados de BENZOTIAZOL, composiciones y usos**

30

Prioridad:

14.03.2003 US 388173

22.08.2003 US 645847

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

02.01.2013

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

02.01.2013

73

Titular/es:

**UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE
COMMONWEALTHSYSTEM OF HIGHER
EDUCATION (100.0%)
200 GARDNER STEEL CONFERENCE CENTER,
THACKERAY & O'HARA STREETS
PITTSBURGH, PA 15260-4002, US**

72

Inventor/es:

**KLUNK, WILLIAM, E.;
MATHIS, JR., CHESTER A. y
WANG, YANMING, DR.**

74

Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 393 921 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 derivados de benzotiazol, composiciones y usos

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a compuestos de tioflavina y derivados específicos que son adecuados para obtención de imágenes de depósitos de amiloide en pacientes vivos. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método de obtención de imágenes de depósitos de amiloide en el cerebro *in vivo* a fin de permitir la diagnosis ante-mortem de la enfermedad de Alzheimer con derivados de Tioflavina. La presente invención se refiere también a también usos terapéuticos para tales compuestos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La enfermedad de Alzheimer ("AD") es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por pérdida de memoria y otros déficits cognitivos. McKhann et al., *Neurology* 34:939 (1984). Es la causa más común de demencia en los Estados Unidos. La AD puede atacar a personas tan jóvenes como de 40-50 años, pero, debido a que la presencia de la enfermedad es difícil de determinar sin una peligrosa biopsia de cerebro, el momento de la aparición se desconoce. La prevalencia de AD aumenta con la edad, alcanzando estimaciones de la población afectada a porcentajes tan altos como 40-50% para edades de 85-90. Evans et al., *JAMA* 262:2551 (1989); Katzman, *Necrology* 43:13 (1993).

20 Estudios realizados sugieren que la deposición de amiloide en el cerebro es un evento temprano causal en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (AD). La progresión de la deposición de amiloide da como resultado la formación de placas neuríticas y madejas neurofibrilares en regiones del cerebro que están implicadas en el aprendizaje y la memoria. Una placa neurítica de Alzheimer típica comprende neuritas distróficas que rodean un núcleo de material amiloide. El componente principal del núcleo de amiloide es una proteína denominada amiloide-beta (A β).

25 En la práctica, AD se diagnostica definitivamente por examen de tejido cerebral, usualmente en la autopsia. Khachaturian, *Arch. Neurol.* 42:1097 (1985); McKhann et al., *Neurology* 34:939 (1984). Neuropatológicamente, esta enfermedad se caracteriza por la presencia de placas neuríticas (NP), madejas neurofibrilares (NFT), y pérdida neuronal, junto con una diversidad de otros hallazgos. Mann, *Mech. Ageing Dev.* 31:213 (1985). Las cortes de tejido cerebral post-mortem de víctimas de la enfermedad de Alzheimer exhiben la presencia de amiloide en la forma de núcleos proteináceos extracelulares de las placas neuríticas que son características de AD.

30 Los núcleos de amiloide de estas placas neuríticas están compuestos de una proteína denominada el amiloide β (A β) que está dispuesta en una configuración predominantemente de hoja plegada 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 invariante 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).

35 La deposición inicial de A β ocurre probablemente mucho antes que sean perceptibles los síntomas clínicos. Los "criterios microscópicos mínimos" recomendados actualmente para la diagnosis de AD están basados en el número de placas neuríticas encontradas en el cerebro. Khachaturian, *Arch. Neurol.*, supra (1985). Sin embargo, la evaluación de los recuentos de placas neuríticas tiene que demorarse hasta después de la muerte.

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

45 El amiloide cerebral se demuestra fácilmente por tinción de secciones de cerebro con Tioflavina S o rojo Congo. Puchtler et al., *J. Histochem. Cytochem.* 10:35 (1962). El amiloide teñido con rojo Congo se caracteriza por una apariencia dicroica, exhibiendo un color de polarización amarillo-verde. La fijación dicroica es el resultado de la estructura de hoja plegada beta de las proteínas de amiloide. Glenner, G.N. *Eng. J. Med.* 302:1283 (1980). Una exposición detallada de la bioquímica e histoquímica del amiloide puede encontrarse en Glenner, N. *Eng. J. Med.*, 302:1333 (1980).

50 Hasta ahora, la diagnosis de AD se ha realizado en la mayoría de los casos por evaluación de criterios clínicos, biopsias de cerebro y estudios de tejido post-mortem. Los esfuerzos de investigación para desarrollar métodos para la diagnosis de la enfermedad de Alzheimer *in vivo* incluyen (1) test genético, (2) métodos de inmunoensayo y (3) técnicas de obtención de imágenes.

55 La evidencia de que las anomalías en el metabolismo de A β son necesarias y suficientes para el desarrollo de AD se basa en el descubrimiento de mutaciones puntuales en la proteína precursora de A β en varias familias raras con una forma autosómica dominante de AD. Hardy, *Nature Genetics* 1:233 (1992); Hardy et al., *Science* 256: 184

(1992). Estas mutaciones ocurren cerca de los puntos de escisión N- y C-terminales necesarios para la generación de A β a partir de su proteína precursora. St. George-Hyslop et al., *Science* 235:885 (1987); Kang et al., *Nature* 325:733 (1987); Potter WO 92/17152. El análisis genético de un gran número de familias AD ha demostrado, sin embargo, que AD es genéticamente heterogénea. St. George-Hyslop et al., *Nature* 347: 194 (1990). La conexión con los marcadores del cromosoma 21 se demuestra sólo en algunas familias con AD de aparición temprana y en ninguna familia con AD 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 dominios transmembranales múltiples y se asemeja a una proteína de integral membrana. Este gen puede dar cuenta de hasta el 70% de la AD dominante autosómica de aparición temprana. Datos preliminares sugieren que esta mutación en el cromosoma 14 causa un aumento en la producción de A β . Scheuner et al., *Soc. Neurosci. Abstr.* 21:1500 (1995). Una mutación en un gen muy similar ha sido identificada en el cromosoma 1 en poblaciones alemanas emparentadas del Volga con AD de aparición temprana. Levy-Lahad et al., *Science* 269:973-977 (1995).

El cribado para el genotipo de la apolipoproteína E ha sido sugerido como ayuda en la diagnosis de AD. Scott, *Nature* 366:502 (1993); Roses, *Ann. Neurol.* 38:6-14 (1995). Sin embargo, esta tecnología presenta dificultades, debido que el alelo de la apolipoproteína E4 es sólo un factor de riesgo para AD, no un marcador de la enfermedad. El mismo está ausente en muchos pacientes de AD y presente en muchas personas ancianas no dementes. Bird, *Ann. Neurol.* 38: 2-4 (1995).

Se han desarrollado métodos de inmunoensayo para detectar la presencia de marcadores neuroquímicos en pacientes de AD y para detectar una proteína amiloide relacionada con AD en el líquido cefalorraquídeo. Warner, *Anal. Chem.* 59:1203A (1987); Patente Mundial No. 92/17152 por Potter; Glenner et al., Patente U.S. No. 4.666.829. No se ha demostrado que estos métodos para la diagnosis de AD detecten AD en todos los pacientes, particularmente en las fases iniciales de la enfermedad, y son relativamente invasivos, por requerir una punción medular. Asimismo, se han realizado intentos para desarrollar anticuerpos monoclonales como sondas para obtención de imágenes de A β . Majocho et al., *J. Nucl. Med.*, 33:2184 (1992); Majocho et al., WO 89/06242 y Majocho et al., Patente U.S. 5.231.000. La desventaja principal de las sondas de anticuerpos es la dificultad de lograr que estas grandes moléculas atraviesen la barrera hematoencefálica. La utilización de anticuerpos para diagnosis *in vivo* de AD requeriría anomalías acusadas en la barrera hematoencefálica a fin de lograr acceso al cerebro. No existe ninguna prueba funcional convincente de que existan fiablemente anomalías en la barrera hematoencefálica en AD. Kalaria, *Cerebrovascular & Brain Metabolism Reviews* 4:226 (1992).

Se ha utilizado el péptido A β radiomarcado para marcar placas de tipo difuso, compacto y neurítico en secciones de cerebro AD. Véase Maggio et al., WO 93/04194. Sin embargo, estos péptidos comparten todas las desventajas de los anticuerpos. Específicamente, los péptidos no atraviesan normalmente la barrera hematoencefálica en las cantidades necesarias para la obtención de imágenes y dado que estas sondas reaccionan con las placas difusas, pueden no ser específicas para AD.

Las placas neuríticas y las madejas neurofibrilares son los dos sellos patológicos más característicos de AD. Klunk y Abraham, *Psychiatric Development*, 6:121-152 (1988). Las placas aparecen tempranamente en el neocórtex donde se distribuyen de modo relativamente uniforme. Thal et al., *Neurology* 58:1791-1800 (2002). Las madejas aparecen primeramente en áreas límbicas tales como el córtex transentorrinal y progresan en un patrón topográfico predecible hasta el neocórtex. Braak y Braak, *Acta Neuropathologica* 82:239-259 (1991). Arnold *et al.* mapearon la distribución de NFT y placas neuríticas en los cerebros de pacientes con AD. Arnold *et al.* *Cereb. Cortex* 1:103-116 (1991). Comparadas con las NFT, las placas neuríticas, en general, estaban distribuidas más uniformemente en todo el córtex, con las excepciones un número notablemente menor de placas neuríticas en el perialocórtex y el allocórtex límbico (las áreas con mayor densidad de NFT). Por tinción con Tioflavina-S, los lóbulos temporal y occipital tenían las densidades más altas de placas neuríticas, los lóbulos límbico y frontal tenían las mínimas, 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 AD en los cerebros de individuos de edad avanzada supuestamente no dementes. Sus observaciones sugieren que la mayoría de los individuos de edad superior a 55 años tienen al menos un pequeño número de NFT y placas. Subtipos de SP definidos inmunohistoquímicamente tenían patrones distintos de distribución con placas A β -inmunorreactivas presentes en áreas neocorticales mucho mayores que las áreas límbicas, siendo infrecuentes las placas Alz-50 inmunorreactivas y limitándose a aquellas áreas que contienen neuronas Alz-50-positivas y NFT. Estos patrones sugerían un conjunto de cualidades comunes en los procesos patológicos que conducen a NFT y SP tanto en el envejecimiento como en AD.

Persiste el debate en cuanto si las placas y madejas son subproductos del proceso neurodegenerativo encontrado en la AD o si son ellas la causa de la muerte de las células neuronales. 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). Existen pruebas claras de que la pérdida de sinapsis neurocorticales y en el hipocampo está bien correlacionada con un estado cognitivo premórbido. Algunos investigadores sugieren que la disrupción de la estructura y función de los microtúbulos, causada por la hiperfosforilación de la proteína tau asociada a los microtúbulos juega el papel etiológico fundamental en la pérdida de sinapsis en particular y en la AD en general. Terry, *J. of Neuropath. & Exp. Neurol.* 55:1023-1025 (1996); Terry, *J of Neural Transmission - Suppl.* 53:141-145 (1998). Se ha estipulado que el deterioro por oxidación y la rotura de membranas juegan papeles importantes en la

AD. Perry, *Free Radical Biology & Medicine* 28:831-834 (2000); Pettegrew et al., *Annals of the New York Academy of Sciences* 826:282-306 (1997). Factores vasculares que incluyen hipoperfusión cerebral sutil crónica han sido implicados también en la patogénesis de AD. De la Torre, *Annals of the New York Academy of Sciences* 903:424-436 (2000); Di Lorio et al., *Aging (Milano)* 11:345-352 (1999). Si bien es probable que todos estos factores jueguen cierto papel en la patogénesis de AD, evidencias crecientes apuntan a anomalías en el procesamiento del péptido amiloide-beta (A β), un péptido de 4 kD que se agrega en una estructura fibrilar, de hoja plegada β . Glenner y Wong, *Biochemical & Biophysical Research Communications* 120:885-890 (1984). Se ha propuesto que A β juega un papel importante en la patogénesis de AD por varias razones: 1) los depósitos de A β son los marcadores neuropatológicos más tempranos de AD en el Síndrome de Down, y pueden preceder a la formación de NFT en varias décadas, Mann et al., *Neurodegeneration* 1:201-215 (1992); Naslund, et al., *JAMA* 283:1571-1577 (2000). 2) La β -amiloidosis es relativamente específica de AD y trastornos estrechamente afines; Selkoe, *Trends in Neurosciences* 16:403-409 (1993); 3) A β es tóxico para las neuronas cultivadas, 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 parece ser dependiente de la estructura secundaria de la hoja beta y 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 A β existe con seguridad en un equilibrio distribuido a través de fracciones monómeras, oligómeras y fibrilares/de placa, la forma oligómera de A β ha sido fuertemente implicada como el componente neurotóxico principal. Selkoe, *Alzheimer disease*, editado por R.D.Terry, et al., pp. 293-310 Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (1999); Selkoe, *Science* 298, 789-91 (2002). El reconocimiento de los efectos tóxicos del A β oligómero ha constituido una base de compromiso para ciertos oponentes de la "hipótesis de la cascada de amiloide" de AD. Terry, *Ann. Neurol.* 49:684 (2001). Quizás la evidencia más fuerte de un papel de A β en la patogénesis de AD proviene del descubriendo de mutaciones en el gen de la proteína precursora de amiloide (APP), que conducen a ciertas formas de AD familiar de aparición temprana. Goate et al., *Nature* 349:704-706 (1991). Adicionalmente, todas las formas familiares de AD dominante autosómica tienen en común un nivel elevado de la forma de agregación más rápida de A β de 42 aminoácidos. Younkin Rinsho *Shinkeigaku - Clinical Neurology* 37:1099 (1997). En contraste, no se ha demostrado que ninguna mutación en la proteína tau cause AD. En lugar de ello, las mutaciones en tau (cromosoma 17) están ligadas a demencia frontotemporal con Parkinsonismo. Goedert et al., *Neurol* 21:955-958 (1998). Evidencias recientes han demostrado una buena correlación entre los niveles de A β en el cerebro y el deterioro cognitivo en AD y la deposición de amiloide parece ser un evento muy temprano, quizás el primero, en la patogénesis de AD, precediendo a cualquier empeoramiento cognitivo. Naslund, et al., *JAMA* 283:1571-1577 (2000). Su presencia puede modular cierto número de caminos bioquímicos que dan como resultado la deposición de otras proteínas adicionales, la activación de astroglia y microglia, y finalmente la muerte de las células neuronales y la consiguiente disfunción cognitiva.

Los datos sugieren que los compuestos fijadores de amiloide tendrán potencial terapéutico en AD y diabetes mellitus tipo 2. Reacciones morfológicas que incluyen astrocitosis reactiva, neuritis distrófica, células de microglia activadas, pérdida de sinapsis, y activación completa del complemento encontradas alrededor de las placas neuríticas significan todas ellas que están ocurriendo procesos neurotóxicos y de degeneración celular en las áreas adyacentes a estos depósitos de A β . Joachim et al., *Am. J. Pathol.* 135: 309 (1989); Masliah *et al., loc. cit.* 137: 1293 (1990); Lue y Rogers, *Dementia* 3: 308 (1992). Se ha consignado neurotoxicidad inducida por A β y degeneración celular en cierto número de tipos de células *in vitro*. Yankner et al., *Science* 250: 279 (1990); Roher et al., *BBRC* 174: 572 (1991); Frautschy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 83362 (1991); Shearman *et al., loc. cit.* 91: 1470 (1994). Se ha demostrado que la agregación del péptido A β es necesaria para neurotoxicidad *in vitro*. Yankner, *Neurobiol. Aging*, 13:615 (1992). Recientemente, tres laboratorios han publicado resultados que sugieren que el rojo Congo inhibe la neurotoxicidad inducida por A β y la degeneración celular *in vitro*. Burgevin et al., *NeuroReport* 5: 2429 (1994); Lorenzo y Yankner, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 12243 (1994); Pollack et al., *Neuroscience Letters* 184: 113 (1995); Pollack et al., *Neuroscience Letters* 197: 211 (1995). El mecanismo parece implicar a la vez inhibición de la formación de fibrillas y prevención de las propiedades neurotóxicas de las fibrillas formadas. Lorenzo y Yankner, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:12243 (1994). Se ha demostrado también que el rojo Congo protege las células de los islotes pancreáticos contra la toxicidad causada por amilina. Lorenzo y Yankner, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:12243 (1994). La amilina es un péptido similar a A β que se acumula en el páncreas en la diabetes mellitus tipo 2.

Es conocido en la técnica que ciertos tintes azoicos, tales como el rojo Congo, pueden ser carcinógenos. Morgan et al., *Environmental Health perspectives*, 102 (Supl.)2:63-78, (1994). Esta potencial carcinogenicidad parece estar basada en gran parte en el hecho de que los colorantes azoicos se metabolizan en gran parte a la amina libre afín por las bacterias intestinales. Cerniglia et al., *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 107: 1224-1229, (1982). En el caso de los colorantes de bencidina (y muchas otras bencidinas sustituidas), la amina libre es el carcinógeno propiamente dicho. Estos hechos tienen pocas implicaciones para los estudios de imagen de amiloide en los cuales una cantidad extremadamente pequeña del colorante radiomarcado con alta actividad específica podría inyectarse directamente en el torrente sanguíneo. En este caso, la cantidad administrada sería insignificante, y el colorante eludiría las bacterias intestinales.

En el caso del uso terapéutico, estos hechos tienen importancia crítica. La liberación de un carcinógeno conocido por un compuesto terapéutico es inaceptable. Un segundo problema con el metabolismo de los colorantes diazoicos

es que gran parte del fármaco administrado es metabolizada por las bacterias intestinales antes de la absorción. Esta biodisponibilidad reducida sigue siendo una desventaja aun cuando los metabolitos liberados son inocuos.

La Tioflavina T es un colorante básico descrito primeramente como un colorante selectivo del amiloide en 1959 por Vassar y Culling (Arch. Pathol. 68:487 (1959)). Schwartz et al. (Zbl. Path. 106:320 (1964)) fueron los primeros en demostrar el uso de Tioflavina S, un colorante ácido, como colorante del amiloide en 1964. Las propiedades tanto de Tioflavina T como de Tioflavina S han sido estudiadas desde entonces en detalle. Kelenyi J. Histochem. Cytochem. 15: 172 (1967); Burns et al. J. Path. Bact. 94:337 (1967); Guntern et al. Experientia 48: 8 (1992); LeVine Meth. Enzymol. 309: 274 (1999). La Tioflavina S se utiliza comúnmente en el estudio post-mortem de la deposición de amiloide en el cerebro AD, habiéndose demostrado que ésta es una de las técnicas más sensibles para demostración de las placas seniles. Vallet et al. Acta Neuropathol. 83:170 (1992). La Tioflavina T ha sido utilizada frecuentemente como reactivo para estudiar la agregación de las proteínas de amiloide solubles en fibrillas de hoja beta. LeVine, Prot. Sci. 2:404 (1993). Se han propuesto derivados de aminos cuaternarias afines a Tioflavina T como agentes de obtención de imágenes de amiloide, aunque no se ha presentado prueba alguna de la absorción de estos agentes en el cerebro. Caprathe et al. Patente U.S. No. 6.001.331.

Dado que la deposición inicial de amiloide puede ocurrir mucho antes que sean perceptibles los síntomas clínicos de AD, la detección y cuantificación de los depósitos de amiloide podría facilitar la diagnosis de AD en sus fases tempranas, pre-sintomáticas. Véase la patente U.S. No. 6.417.178. Técnicas de obtención de imágenes, tales como la tomografía por emisión de positrones (PET) y la tomografía computarizada por emisión de fotones simples (SPECT), son eficaces en la monitorización de la acumulación de depósitos de amiloide en el cerebro y su correlación con la progresión de la AD. La aplicación de estas técnicas requiere el desarrollo de radioligandos que penetren fácilmente en el cerebro y se fijen selectivamente a los depósitos de amiloide *in vivo*.

Wang et al., J. of Mol. Neurosci. 19, 11 (2002), describe el uso de 2-(3'-yodo-4'-aminofenil)-6-hidroxibenzotiazol radiomarcado con ¹²⁵I para cuantificación *in vivo* de depósitos de amiloide.

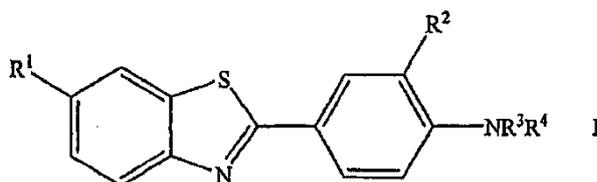
La imposibilidad de evaluar la deposición de amiloide en AD hasta después de la muerte impide el estudio de esta enfermedad devastadora. Se precisa un método de cuantificación de la deposición de amiloide antes de la muerte, no sólo como herramienta de diagnóstico en casos moderados o clínicamente confusos sino también en la monitorización de la eficacia de las terapias dirigidas a prevenir la deposición de Aβ. Por esta razón, sigue siendo de la máxima importancia el desarrollo de un método seguro y específico para diagnosticar AD antes de la muerte por obtención de imágenes de amiloide en el parénquima cerebral *in vivo*. Aun cuando se han realizado diversos intentos para diagnosticar AD *in vivo*, en la actualidad no existe ninguna sonda ante-mortem para el amiloide cerebral. Ningún método ha utilizado una sonda de afinidad alta para amiloide que tenga toxicidad baja, pueda atravesar la barrera hematoencefálica, y se fije más eficazmente al cerebro AD que al cerebro normal a fin de identificar los depósitos de amiloide AD en el cerebro antes de la muerte de un paciente. Así, no se ha demostrado que ningún método *in vivo* para la diagnosis de AD cumpla estos criterios.

Existe necesidad de compuestos fijadores de amiloide que sean no tóxicos y puedan atravesar la barrera hematoencefálica, y, por consiguiente, puedan utilizarse en diagnósticos. A este fin, los autores de la presente invención han encontrado que la variación de la sustitución en diferentes posiciones puede aumentar la afinidad de fijación dependiendo de la posición del sustituyente.

Adicionalmente, los presentes inventores han desarrollado una serie de derivados de tioflavina T desprovistos de carga como agentes de obtención de imágenes de amiloide que exhiben afinidad alta para los depósitos de amiloide y permeabilidad elevada a través de la barrera hematoencefálica. Estudios extensos *in vitro* e *in vivo* de estos agentes de obtención de imágenes de amiloide sugieren que los mismos se fijan específicamente a los depósitos de amiloide a concentraciones típicas de las alcanzadas durante los estudios de tomografía por emisión de positrones. En el medio complejo del cerebro humano, la fijación inespecífica de los compuestos productores de imágenes de amiloide es baja, incluso en cerebros de control desprovistos de depósitos de amiloide. A concentración nanomolar, estos compuestos parecen no fijarse a las madejas neurofibrilares.

SUMARIO DE LA INVENCION

Es por consiguiente una realización de la presente invención proporcionar compuestos que permiten un método seguro y específico para la diagnosis de AD antes de la muerte por obtención de imágenes *in vivo* de amiloide en el parénquima cerebral. Los compuestos útiles para este propósito están de acuerdo con la fórmula I siguiente:



o una sal, hidrato, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable del compuesto, en donde:

R¹ es hidrógeno, -OH, -NO₂, -CN, -COOR, -OCH₂OR, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alqueno, C₂-C₆ alquino, C₁-C₆ alcoxi o halo, en donde uno o más de los átomos de R¹ puede(n) ser un átomo radiomarcado;

R es C₁-C₆ alquilo, en donde uno o más de los átomos de carbono puede(n) ser un átomo radiomarcado;

R² es un radiofluro;

5 R³ es hidrógeno, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alqueno o C₂-C₆ alquino; y

R⁴ es hidrógeno, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alqueno o C₂-C₆ alquino.

En otra realización, los compuestos fijadores de amiloide de la invención se fijan a Aβ con una constante de disociación (K_D) comprendida entre 0,0001 y 10,0 μM cuando se mide por fijación al péptido Aβ sintético o a tejido cerebral de la enfermedad de Alzheimer.

10 Un método para sintetizar los compuestos fijadores de amiloide de la presente invención que tienen al menos uno de los sustituyentes seleccionados del grupo constituido por ¹⁸F y ¹⁹F comprende el paso de marcar el compuesto fijador de amiloide en donde al menos uno de los sustituyentes es un trialkilestano, por reacción del compuesto con una sustancia que contiene ¹⁸F o ¹⁹F.

15 Una realización adicional de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para obtención de imágenes *in vivo* de depósitos de amiloide, que comprende (a) un compuesto fijador de amiloide de la presente invención y (b) un portador farmacéuticamente aceptable.

20 La invención hace posible un método *in vivo* para detectar depósitos de amiloide en un individuo, que comprende los pasos de: (a) administrar una cantidad detectable de una composición farmacéutica que comprende el compuesto marcado fijador de amiloide y detectar la fijación del compuesto al depósito de amiloide en el individuo. En un aspecto preferido de esta realización, el depósito de amiloide está localizado en el cerebro de un individuo. En un aspecto particularmente preferido de esta realización, el individuo es sospechoso de padecer una enfermedad o síndrome seleccionado del grupo constituido por Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Alzheimer familiar, Síndrome de Down y homocigosis para el alelo de la apolipoproteína E4. En otro aspecto particularmente preferido de esta realización, la detección se selecciona del grupo constituido por obtención de imágenes gamma, obtención de imágenes de resonancia magnética y espectroscopia de resonancia magnética. En un aspecto preferido del método, la obtención de imágenes gamma es PET o SPECT. En otra realización preferida del método, la composición farmacéutica se administra por inyección intravenosa. En otra realización preferida del método, la ratio de (i) fijación del compuesto a un área cerebral distinta del cerebelo a (ii) fijación del compuesto al cerebelo en un individuo, se compara con la ratio en un individuo normal.

30 En otra realización del método, la detección de depósitos de amiloide *in vivo* se utiliza en la diagnosis de la enfermedad de Alzheimer.

35 La invención hace posible también un método de detección de depósitos de amiloide en tejido humano o animal de biopsia o post-mortem que comprende los pasos de: (a) incubar tejido fijado en formalina o recién congelado con una solución de un compuesto fijador de amiloide de la presente invención para formar un depósito marcado y a continuación, (b) detectar los depósitos marcados. En un aspecto preferido de esta realización, la solución se compone de 25-100% etanol, siendo el resto de la solución agua, en donde la solución está saturada con un compuesto fijador de amiloide de acuerdo con la presente invención. En un aspecto particularmente preferido de este método, la solución se compone de un tampón acuoso (tal como Tris o fosfato) que contiene 0-50% etanol, en donde la solución contiene 0,0001 a 100 μM de un compuesto fijador de amiloide de acuerdo con la presente invención. En una realización particularmente preferida del método, la detección se efectúa por técnicas microscópicas seleccionadas del grupo constituido por microscopía en campo brillante, de fluorescencia, confocal láser, y de polarización cruzada.

45 La invención hace posible además un método de cuantificación de la cantidad de amiloide en tejido de biopsia o post-mortem que comprende los pasos de: a) incubar un derivado radiomarcado de un compuesto fijador de amiloide de la presente invención con un homogeneizado de tejido de biopsia o post-mortem, b) separar el derivado radiomarcado fijado al tejido del derivado radiomarcado no fijado al tejido de un compuesto fijador de amiloide de la presente invención, c) cuantificar el derivado radiomarcado fijado al tejido de un compuesto fijador de amiloide de la presente invención, y d) convertir las unidades de derivado radiomarcado fijado al tejido de un compuesto fijador de amiloide de la presente invención en unidades de microgramos de amiloide por 100 mg de tejido por comparación con un estándar.

55 La invención permite también un método de diferenciación de un cerebro con enfermedad de Alzheimer de un cerebro normal que comprende los pasos de: a) obtener tejido de (i) el cerebelo y (ii) otra área del mismo cerebro distinta del cerebelo, procedente de individuos normales y de individuos que se sospecha padecen la enfermedad de Alzheimer; b) incubar los tejidos con un derivado radiomarcado de un compuesto de tioflavina fijador de amiloide de acuerdo con la presente invención de tal modo que el amiloide contenido en el tejido se fija al derivado radiomarcado de un compuesto fijador de amiloide de la presente invención; c) cuantificar la cantidad de amiloide fijada al derivado radiomarcado de un compuesto fijador de amiloide de la presente invención de acuerdo con el método citado anteriormente; d) calcular la ratio de la cantidad de amiloide en el área del cerebro distinta del cerebelo a la cantidad de amiloide en el cerebelo; e) comparar la ratio para la cantidad de amiloide en el tejido de individuos normales con

la ratio para la cantidad de amiloide en el tejido de individuos sospechosos de padecer la enfermedad de Alzheimer; y f) determinar la presencia de la enfermedad de Alzheimer si la ratio del cerebro de un individuo sospechoso de padecer la enfermedad de Alzheimer es superior a 90% de las ratios obtenidas de los cerebros de individuos normales.

- 5 Otra realización de la presente invención se refiere a compuestos de la presente invención que son útiles en la fijación específica a depósitos de amiloide sobre las madejas neurofibrilares.

La invención hace posible también un método de fijación selectiva a las placas de amiloide pero no a las madejas neurofibrilares de tejido cerebral *in vivo* que contiene ambas por administración de una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención de tal modo que la concentración en sangre del compuesto administrado se mantiene por debajo de 10 nM *in vivo*.

Otra realización se refiere al uso de un compuesto de Fórmula I para la preparación de un medicamento para la diagnosis de enfermedad de Alzheimer en un paciente que se encuentra en necesidad de ello.

Otras realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica por consideración de la memoria descriptiva y la práctica de la invención aquí descrita. Se pretende que la memoria descriptiva se considere como meramente ilustrativa, viniendo indicados el alcance y el espíritu reales de la invención por las reivindicaciones que siguen. Adicionalmente, todos los documentos a que se hace referencia en esta memoria se incorporan expresamente por referencia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra las estructuras de una Tioflavina S y Tioflavina T;
 la Figura 2 muestra las estructuras de dos derivados de tioflavina de acuerdo con la invención;
 la Figura 3 muestra cuatro secciones seriadas del córtex frontal de cerebro con tinción fluorescente de un paciente de AD;
 la Figura 4 muestra sitios propuestos de fijación de Crisamina G y Tioflavina T en fibrillas de hoja beta;
 la Figura 5 muestra un ensayo de competición utilizando Crisamina G, Tioflavina S y Tioflavina T, y derivados de la presente invención (BTA-0, BTA-1 y BTA-2);
 la Figura 6 muestra la radiactividad a lo largo del tiempo en el córtex cerebral de babuinos inyectados con BTA-1, 6-MeO-BTA-1 y 6-Me-BTA-1 marcados; y
 la Figura 7 muestra una imagen de tomografía transversal por emisión de positrones de dos niveles de cerebro de babuino después de inyección i.v. de [N-metil-¹¹C]BTA-1;
 la Figura 8 muestra secciones post-mortem de cerebro humano y cerebro de ratón transgénico teñidos con un derivado de la presente invención (BTA-1);
 la Figura 9 muestra la marcación *in vivo* de placas de amiloide y amiloide vascular teñidos con un derivado de la presente invención (BTA-1) en ratones transgénicos vivos cuyas imágenes se han obtenido por microscopía multifotónica;
 la Figura 10A muestra una comparación de datos de fijación de [³H] a homogeneizados de un cerebro de control, cerebro de enfermedad de Alzheimer y cerebro de demencia por enfermedad distinta del Alzheimer;
 la Figura 10B muestra la ratio de los datos de una comparación del córtex frontal y el cerebelo para cada cerebro individual en un cerebro de control, cerebro de enfermedad de Alzheimer y cerebro de demencia por enfermedad distinta del Alzheimer;
 la Figura 11A-F muestra la especificidad de los compuestos de inventiva para las placas de amiloide sobre las madejas neurofibrilares, donde A y B muestran el córtex entorrinal, C y D muestran el córtex frontal y E y F muestran el cerebelo de un cerebro de control Braak en fase II;
 La Tabla de la Figura 12 muestra la fijación de [³H] BTA-1 a áreas especificadas de un cerebro de control Braak II y un cerebro AD Braak VI (AD02);
 la Figura 13 muestra una gráfica de Scratchard de la fijación de [³H] BTA-1 a homogeneizados de materia gris frontal de AD y materia blanca frontal subyacente del mismo cerebro AD;
 la Figura 14 muestra un autorradiograma y una micrografía fluorescente que muestran la superposición de la fijación de [I-125]6-OH-BTA-0-3'-I a placas y amiloide cerebrovascular y depósitos de amiloide teñidos por el tinte de amiloide, X-34. Izquierda: autorradiograma de la fijación de [I-125]6-OH-BTA-0-3'-I a tejido congelado reciente de cerebro AD post-mortem. Las áreas oscuras muestran la localización de [I-125]6-OH-BTA-0-3'-I y están perfiladas en rojo. La estructura de [I-125]6-OH-BTA-0-3'-I se muestra en la parte inferior izquierda. Derecha: la misma pieza de tejido cerebral AD post-mortem teñida con el tinte de amiloide X-34. Las áreas brillantes indican placas y amiloide cerebrovascular. Centro: Superposición del perfil rojo del autorradiograma de la izquierda con la tinción por X-34 que muestra una correspondencia aproximadamente 1:1 de la fijación de [I-125]6-OH-BTA-0-3'-I a placas y amiloide cerebrovascular. Recuadro insertado: muestra una ampliación de 2,25 veces del área recuadrada en la Figura central. La barra representa 1000 µm;
 la Figura 15 muestra curvas tiempo-actividad de la penetración y el aclaramiento de la radiactividad de tres regiones de cerebro de babuino después de la inyección de Compuesto B (2-(3-[¹⁸F]-fluoro-4-metilamino-fenil)-benzotiazol-6-ol);
 la Figura 16 muestra curvas tiempo-actividad de la penetración y el aclaramiento de la radiactividad de cerebelo de babuino (región de referencia desprovista de fijación específica) después de la inyección de los

radioligandos [carbonil-¹¹C]WAY100635, [¹¹C] (+)-McN5652, y [¹⁸F]altanserina comparados con el comportamiento del Compuesto B;

la Figura 17 muestra curvas tiempo-actividad de la penetración y el aclaramiento de la radiactividad de tres regiones de cerebro de babuino después de la inyección de Compuesto C (2-[4-(3-¹⁸F-fluoropropilamino)fenil]benzotiazol-6-ol);

la Figura 18 muestra curvas tiempo-actividad de la penetración y el aclaramiento de la radiactividad de cerebelo de babuino (región de referencia desprovista de fijación específica) después de la inyección de los radioligandos [carbonil-¹¹C]WAY100635, [¹¹C] (+)-McN5652, y [¹⁸F]altanserina comparados con el comportamiento del Compuesto C.

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención aprovecha la capacidad de los compuestos de tioflavina y derivados radiomarcados de los mismos para atravesar la barrera hematoencefálica *in vivo* y fijarse a A β depositado en placas neuríticas (pero no difusas), a A β depositado en amiloide cerebrovascular, y al amiloide constituido por la proteína depositada en NFT. Los presentes compuestos son derivados distintos de aminas cuaternarias de Tioflavina S y T que se sabe tiñen el amiloide en secciones de tejido y se fijan a A β sintético *in vitro*. Kelenyi, J. Histochem. Cytochem. 15: 172 (1967); Burns et al. J. Path. Bact. 94:337 (1967); Guntern et al. Experientia 48: 8 (1992); LeVine, Meth. Enzymol. 309: 274 (1999).

Los derivados de tioflavina de la presente invención tienen cada una de las características siguientes: (1) fijación específica a A β sintético *in vitro* y (2) aptitud para atravesar una barrera hematoencefálica no comprometida *in vivo*.

20 Modelización Molecular

La modelización molecular se realizó utilizando el programa de modelización por computadora Alchemy2000, un producto de Tripost, Inc. (St. Louis, MO) para generar las cadenas peptídicas de A β en la conformación anti-paralela de hoja beta. Kirschner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:503 (1986). Los péptidos de amiloide se pusieron en horquillas, véase Hilbich et al., J. Mol. Biol. 218:149 (1991) y se utilizaron sin afinidad estructural ulterior. Los péptidos A β se alinearon de tal modo que las cadenas alternadas estaban espaciadas a una distancia de 4,76 Å, característica de las fibrillas de hoja beta. Kirschner, *supra*. Los derivados de Tioflavina T se minimizaron energéticamente y se alinearon con el modelo de fibrillas para maximizar el contacto con Asp-23/Gln-15/His-13 de A β (1-42).

Caracterización de la Fijación Específica al Péptido A β Sintético: Afinidad, Cinética, Fijación Máxima

Las características de fijación de los derivados de tioflavina se analizaron utilizando A β (1-40) sintético y 2-(4'-[¹¹C]-metilamino-fenil)-benzotiazol ([N-metil-¹¹C]BTA-1) en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,0) o tampón de glicina/20% etanol (pH 8,0) como ha sido descrito previamente para la fijación de Crisamina-G. Klunk et al. Neurobiol. Aging 15:691 (1994).

La secuencia de aminoácidos para A β (1-40) es como sigue:

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

"Alquilo" se refiere a un radical hidrocarbonado saturado de cadena lineal o ramificada. Ejemplos incluyen sin limitación metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *terc*-butilo, n-pentilo y n-hexilo.

"Alquenilo" se refiere a un radical hidrocarbonado insaturado de cadena lineal o ramificada que comprende al menos un enlace doble carbono-carbono. Ejemplos incluyen sin limitación etenilo, propenilo, isopropenilo, butenilo, isobutenilo, *terc*-butenilo, *n*-pentenilo y *n*-hexenilo.

5 "Alquinilo" se refiere a un radical hidrocarbonado insaturado de cadena lineal o ramificada que comprende al menos un enlace triple carbono-carbono. Ejemplos incluyen sin limitación etinilo, propinilo, isopropinilo, butinilo, isobutinilo, *terc*-butinilo, pentinilo y hexinilo.

"Alcoxi" se refiere a un grupo alquilo unido a través de un eslabón oxígeno. "Halo" hace referencia a un radical fluoro, cloro, bromo o yodo.

10 "Cantidad eficaz" se refiere a la cantidad requerida para producir un efecto deseado. Ejemplos de una "cantidad eficaz" incluyen cantidades que permiten la obtención de imágenes de depósitos de amiloide *in vivo*, que producen niveles aceptables de toxicidad y biodisponibilidad para uso farmacéutico, y/o previenen la degeneración celular y la toxicidad asociadas con la formación de fibrillas.

15 "Portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente o material de encapsulación de disolvente, implicado en el soporte o transporte del compuesto diana desde un órgano, o porción del cuerpo, a otro órgano o porción del cuerpo. Cada portador 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 portador farmacéuticamente aceptable incluyen sin limitación: (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 carboximetil-
20 celulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto pulverizado; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales 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) agentes tampón, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua exenta de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones tamponadas en pH; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhidridos; y (22) otras sustancias no tóxicas compatibles empleadas en formulaciones farmacéuticas como se identifican, por ejemplo, en REMINGTON's PHARMACEUTICAL SCIENCES, edición 15ª (Mack Publishing Co., 1975), en las páginas 1405-1412 y 1461-1487, y en THE NATIONAL FORMULARY XIV, edición 14ª (American
30 Pharmaceutical Association, 1975).

35 "Sal farmacéuticamente aceptable" hace referencia a una sal de ácido o base del compuesto de inventiva, sal que posee la actividad farmacológica deseada y no es indeseable biológicamente ni desde ningún otro punto de vista. La sal puede formarse con ácidos que incluyen sin limitación acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, canforato, canfosulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidrocloreto, hidrobromuro, hidroyoduro, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalenesulfonato, nicotinato, oxalato, tiocianato, tosilato y undecanoato. Ejemplos de una sal de base incluyen sin limitación sales de amonio, sales de metal alcalino tales como sales de sodio y potasio, sales de metal alcalinotérreo tales como sales de calcio y magnesio, sales con bases orgánicas tales como sales de dicitlohexilamina, de *N*-metil-
40 *D*-glucamina, y sales con aminoácidos tales como arginina y lisina. En algunas realizaciones, los grupos que contienen nitrógeno básico pueden cuaternizarse con agentes que incluyen haluros de alquilo inferior 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, laurilo, miristilo y estearilo; y haluros de aralquilo tales como bromuros de fenetilo.

45 "Profármaco" hace referencia a un derivado del compuesto de inventiva que sufre biotransformación, tal como metabolismo, antes de exhibir su(s) efecto(s) farmacológico(s). El profármaco está formulado con el o los objetivos de estabilidad química mejorada, aceptación y acatamiento mejorados por el paciente, biodisponibilidad mejorada, duración de acción prolongada, selectividad de órganos mejorada, formulación mejorada (v.g., hidrosolubilidad aumentada), y/o menores efectos secundarios (v.g., toxicidad). El profármaco puede prepararse fácilmente a partir
50 del compuesto de inventiva utilizando métodos convencionales, tales como el descrito en BURGER's MEDICINAL CHEMISTRY AND DRUG CHEMISTRY, 5ª edición, vol. 1 (1995), páginas 172-178 y 949-982.

55 "Animal" hace referencia a un organismo vivo que tiene sensibilidad y poder de movimiento voluntario, y que requiere para su existencia oxígeno y alimento orgánico. Ejemplos incluyen, sin limitación, miembros de las especies humana, equina, porcina, bovina, murina, canina y felina. En el caso de un humano, puede hacerse referencia también a un "animal" como un "paciente".

"Mamífero" hace referencia a un animal vertebrado de sangre caliente.

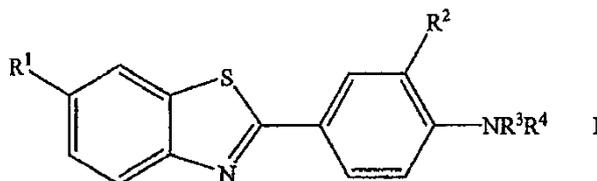
"Tratamiento" hace referencia a

- (i) evitación de que ocurra una enfermedad, trastorno o afección en un animal que puede estar predispuesto a la enfermedad, trastorno y/o afección pero no le ha sido diagnosticada todavía;
- (ii) inhibición de la enfermedad, trastorno o afección, es decir, detención de su desarrollo; y/o
- (iii) alivio de la enfermedad, trastorno o afección, es decir, logro de la regresión de la enfermedad, trastorno y/o afección.

A no ser que el contexto dicte claramente otra cosa, las definiciones de los términos singulares pueden extrapolarse para aplicarlas a sus equivalentes plurales cuando aparecen en la solicitud; análogamente, las definiciones de términos plurales pueden extrapolarse para aplicarse a sus equivalentes singulares cuando aparecen en la solicitud.

COMPUESTOS

Esta invención proporciona un compuesto radiomarcado de fórmula I



o una sal, hidrato, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable del compuesto, en donde:

- R¹ es hidrógeno, -OH, -NO₂, -CN, -COOR, -OCH₂OR, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ alcoxi o halo, en donde uno o más de los átomos de R¹ puede(n) ser un átomo radiomarcado;
- R es C₁-C₆ alquilo, en donde uno o más de los átomos de carbono puede(n) ser un átomo radiomarcado;
- R² es un radiofluro;
- R³ es hidrógeno, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo o C₂-C₆ alquinilo; y
- R⁴ es hidrógeno, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo o C₂-C₆ alquinilo.

Ejemplos de un carbono radiomarcado incluyen, sin limitación, ¹¹C, ¹³C, y ¹⁴C. En una realización, R¹ es -OH.

Como se indica, R² es un radiofluro. Como un ejemplo de los compuestos, R¹ es -OH o C₁-C₆ alcoxi; R² es ¹⁸F; y R³ y R⁴ son independientemente hidrógeno o C₁-C₆ alquilo. Como otro ejemplo, R¹ es -OH; R³ es hidrógeno, R⁴ es -CH₃.

- En otra realización adicional, los compuestos de inventiva se fijan selectivamente al amiloide, particularmente Aβ sintético *in vitro* o Aβ depositado en placas neuríticas; atraviesan *in vivo* una barrera hematoencefálica no comprometida; están biodisponibles; y/o carecen de toxicidad.

MÉTODOS DE USO

- Los compuestos de inventiva pueden utilizarse para determinar la presencia, localización y/o cantidad de uno o más depósitos de amiloide en un órgano o área del cuerpo, con inclusión del cerebro, de un animal. El o los depósitos de amiloide incluyen, sin limitación, depósito(s) de Aβ. Dejando que prosiga la secuencia temporal de la deposición de amiloide, el compuesto de inventiva puede utilizarse adicionalmente para correlacionar la deposición de amiloide con el comienzo de síntomas clínicos asociados con una enfermedad, trastorno o afección. Los compuestos de inventiva pueden utilizarse finalmente para, y para el diagnóstico de, una enfermedad, trastorno o afección caracterizada por deposición de amiloide, tal como AD, AD familiar, síndrome de Down, amiloidosis, diabetes mellitus tipo II, y homocigosis para el alelo de la apolipoproteína E4.

- El método de esta invención determina la presencia y localización de depósitos de amiloide en un órgano o área del cuerpo, preferiblemente el cerebro, de un paciente. El método presente comprende la administración de una cantidad detectable de una composición farmacéutica que contiene un compuesto de fijación de amiloide de la presente invención denominado un "compuesto detectable", o una sal soluble en agua y 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 amiloide. Una "cantidad eficaz para obtención de imágenes" significa que la cantidad del compuesto detectable que se administra es suficiente para permitir la obtención de imágenes de la fijación del compuesto al amiloide.

- La invención emplea sondas de amiloide que, en asociación con técnicas no invasivas de producción de neuroimágenes tales como espectroscopia de resonancia magnética (MRS) o la obtención de imágenes (MRI), u obtención de imágenes gamma tales como tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada por emisión de fotones simples (SPECT) se utilizan para cuantificar la deposición de amiloide *in vivo*. El término "obtención de imágenes *in vivo*" hace referencia a cualquier método que permita la detección de un derivado de tioflavina marcado como se describe en esta memoria. Para la obtención de imágenes gamma, la radiación emitida

por un órgano o área que se examina se mide y se expresa como fijación total o como una ratio en la cual la fijación total en un tejido está normalizada a (por ejemplo, dividida por) la fijación total en otro tejido del mismo individuo durante el mismo procedimiento de obtención de imágenes *in vivo*. La fijación total *in vivo* se define como la señal completa detectada en un tejido por una técnica de obtención de imágenes *in vivo* sin necesidad de corrección por una segunda inyección de una cantidad idéntica de compuesto marcado junto con un gran exceso de compuesto sin marcar, pero por lo demás químicamente idéntico. Un "individuo" es un mamífero, preferiblemente un humano, y muy preferiblemente un humano que se sospecha padece demencia.

Para propósitos de obtención de imágenes *in vivo*, el tipo de instrumento de detección disponible es un factor importante en la selección de un marcador dado. Por ejemplo, los isótopos radiactivos y ^{19}F son particularmente adecuados para obtención de imágenes *in vivo* en los métodos de la presente invención. El tipo de instrumento utilizado guiará la selección del radionucleido o isótopo estable. Por ejemplo, el radionucleido seleccionado debe tener un tipo de desintegración detectable por un tipo de instrumento dado. Otra consideración hace referencia a la semivida del radionucleido. La semivida debería ser suficientemente larga a fin de que el mismo sea detectable todavía en el momento de máxima absorción por la diana, pero lo bastante corta para que el hospedador no sufra una radiación deletérea. Los compuestos radiomarcados de la invención pueden detectarse utilizando obtención de imágenes gamma en las cuales se detecta una irradiación gamma emitida de la longitud de onda apropiada. Los métodos de obtención de imágenes gamma incluyen, pero sin carácter limitante, SPECT y PET. Preferiblemente, para la detección SPECT, el radiomarcador seleccionado carecerá de emisión particulada, pero producirá un gran número de fotones en un intervalo de 140-200 keV. Para la detección PET, el radiomarcador será un radionucleido emisor de positrones tal como ^{19}F que se aniquilarán para formar dos rayos gamma de 511 keV que serán detectados por la cámara PET.

En la presente invención, se producen compuestos/sondas fijadores de amiloide que son útiles para obtención de imágenes *in vivo* y cuantificación de la deposición de amiloide. Estos compuestos deben utilizarse en asociación con técnicas no invasivas de producción de neuroimágenes tales como espectroscopia de resonancia magnética (MRS) u obtención de imágenes (MRI), tomografía por emisión de positrones (PET) y tomografía computarizada por emisión de fotones simples (SPECT). De acuerdo con esta invención, los derivados de tioflavina pueden marcarse con ^{19}F o ^{13}C para MRS/MRI por métodos generales de química orgánica conocidos en la técnica. Por ejemplo, véase ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY: REACTION, MECHANISMS, AND STRUCTURE, 3ª edición (1985), cuyos contenidos se incorporan en esta memoria por referencia. Los derivados de tioflavina pueden estar también radiomarcados con ^{18}F , ^{11}C , ^{75}Br , o ^{76}Br para PET por métodos bien conocidos en la técnica y han sido descritos por Fowler, J. y Wolf, A. en POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY AND AUTORADIOGRAPHY 391-450 (Raven Press, 1986), cuyos contenidos se incorporan en esta memoria por referencia. Los derivados de tioflavina pueden estar radiomarcados también con ^{123}I para SPECT por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véase, v.g., Kulkarni, Int. J. Rad. Appl. & Inst. (parte B) 18:647 (1991), cuyos contenidos se incorporan en esta memoria por referencia. Adicionalmente, los derivados de tioflavina pueden marcarse con cualquier isótopo reactivo adecuado de yodo, tal como, pero sin carácter limitante, ^{131}I , ^{125}I , o ^{123}I , por yodación de un aminoderivado diazotado directamente por la vía de un yoduro de diazonio, véase Greenbaum, F. Am. J. Pharm. 108:17 (1936), o por conversión de la amina diazotada inestable en el triazeno estable, o por conversión de un precursor halogenado no radiactivo en un derivado estable de triazeno que puede convertirse luego en el compuesto yodado por varios métodos bien conocidos en la técnica. Véase, Satyamurthy y Barrio, J. Org. Chem. 48: 4394 (1983), Goodman et al., J. Org. Chem. 49: 2322 (1984), y Mathis et al., J. Label. Comp. and Radiopharm. 1994: 905; Chumpradit et al., J. Med. Chem. 34: 877 (1991); Zhuang et al., J. Med. Chem. 37: 1406 (1994); Chumpradit et al., J. Med. Chem. 37: 4245 (1994). Por ejemplo, un triazeno o derivado de triazeno estable de tioflavina o sus análogos se hace reaccionar con un agente de halogenación que contiene ^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{76}Br , ^{75}Br , ^{18}F o ^{19}F . Así pues, los derivados estables de triazeno de tioflavina y sus análogos son nuevos precursores útiles para la síntesis de muchos de los compuestos radiomarcados en la presente invención. Como tales, estos derivados de triazeno son una realización de esta invención.

Los derivados de tioflavina pueden estar radiomarcados también con radiomarcadores metálicos conocidos, tales como tecnecio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$). La modificación de los sustituyentes para introducir ligandos que fijan tales iones metálicos puede ser realizada sin experimentación excesiva por una persona con experiencia ordinaria en la técnica de los radiomarcadores. El derivado de tioflavina radiomarcado con metal puede utilizarse luego para detectar depósitos de amiloide. La preparación de derivados radiomarcados de $\text{Tc}^{99\text{m}}$ es bien conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, Zhuang et al., "Neutral and stereospecific Tc-99m complexes: [99mTc]N-benzil-3,4-di-(N-2-mercaptoetil)-amino-pyrrolidines (P-BAT)" Nuclear Medicine & Biology 26(2):217-24, (1999); Oya et al., "Small and neutral Tc(v)O BAT, bisaminoetanotiol (N2S2) complexes for developing new brain imaging agents" Nuclear Medicine & Biology 25(2):135-40, (1998); y Hom et al., "Technetium-99m-labeled receptor-specific small-molecule radiopharmaceuticals: recent developments and encouraging results" Nuclear Medicine & Biology 24(6):485-98, (1997).

Los métodos de la presente invención pueden utilizar isótopos detectables por espectroscopia de resonancia magnética nuclear para propósitos de obtención de imágenes y espectroscopia *in vivo*. Elementos particularmente útiles en espectroscopia de resonancia magnética incluyen ^{19}F y ^{13}C .

Radioisótopos adecuados para los propósitos de esta invención incluyen emisores beta, emisores gamma, emisores de positrones, y emisores de rayos X. Estos radioisótopos incluyen ^{131}I , ^{123}I , ^{18}F , ^{11}C , ^{75}Br , y ^{76}Br . Isótopos estables adecuados para uso en Obtención de imágenes de Resonancia Magnética (MRI) o Espectroscopia (MRS), de acuerdo con esta invención, incluyen ^{19}F y ^{13}C . Radioisótopos adecuados para cuantificación *in vitro* de amiloide en

5 homogeneizados de tejido de biopsia o tejido post-mortem incluyen ^{125}I , ^{14}C , y ^3H . Los radiomarcadores preferidos son ^{14}C o ^{18}F para uso en la obtención de imágenes PET *in vivo*, ^{123}I para uso en obtención de imágenes SPECT, ^{19}F para MRS/MRI, y ^3H o ^{14}C para estudios *in vitro*. Sin embargo, cualquier método convencional para visualización de sondas de diagnóstico puede utilizarse de acuerdo con esta invención.

De acuerdo con el aspecto de la invención que se refiere a un método de detección de depósitos de amiloide en

10 tejido de biopsia o tejido post-mortem, el método implica la incubación de tejido fijado en formalina con una solución de un compuesto de tioflavina fijador de amiloide de la presente invención. Preferiblemente, la solución es 25-100% etanol (siendo el resto agua), saturado con un compuesto de tioflavina fijador de amiloide de acuerdo con la presente invención. Después de la incubación, el compuesto tiñe o marca el depósito de amiloide en el tejido, y el depósito teñido o marcado puede ser detectado o visualizado por cualquier método estándar. Tales medios de

15 detección incluyen técnicas microscópicas tales como microscopía en campo brillante, de fluorescencia, confocal láser y de polarización cruzada.

El método de cuantificación de la cantidad de amiloide en tejido de biopsia o post-mortem implica incubar un derivado marcado de tioflavina de acuerdo con la presente invención, o una sal no tóxica soluble en agua del mismo,

20 con homogeneizado de tejido de biopsia o post-mortem. El tejido se obtiene y se homogeneiza por métodos bien conocidos en la técnica. El marcador preferido es un radiomarcador, aunque otros marcadores tales como enzimas, compuestos quimioluminiscentes y compuestos inmunofluorescentes son bien conocidos por los técnicos experimentados. El radiomarcador preferido es ^{121}I , ^{14}C o ^3H que está contenido 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 tioflavina fijadores de amiloide de la presente

25 invención. El tejido fijado se separa luego del tejido no fijado por cualquier mecanismo conocido por el técnico experimentado, tal como filtración. El tejido fijado puede cuantificarse luego por cualesquiera medios conocidos por el técnico experimentado. Las unidades de derivado de tioflavina radiomarcado fijado al tejido se convierten luego en unidades de microgramos de amiloide por 100 mg de tejido por comparación con una curva estándar generada por incubación de cantidades conocidas de amiloide con el derivado de tioflavina radiomarcado.

El método de diferenciación de un cerebro enfermo de Alzheimer de un cerebro normal implica la obtención de tejido

30 de (a) el cerebelo y (b) otra área del mismo cerebro, distinta del cerebelo, de individuos normales y de individuos sospechosos de padecer la enfermedad de Alzheimer. Tales tejidos se preparan en homogeneizados separados utilizando métodos bien conocidos por el profesional experimentado, y se incuban luego con un compuesto de tioflavina radiomarcado fijador de amiloide. La cantidad de tejido que se fija al compuesto de tioflavina radiomarcado

35 fijador de amiloide se calcula luego para cada tipo de tejido (v.g. cerebelo, no-cerebelo, normal, anormal) y se calcula la ratio para la fijación de tejido de no-cerebelo a tejido de cerebelo para tejido de individuos normales y para tejido de pacientes sospechosos de padecer enfermedad de Alzheimer. Estas ratios se comparan luego. Si la ratio del cerebro sospechoso de padecer enfermedad de Alzheimer es superior al 90% de las ratios obtenidas de cerebros normales, se hace el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer. Las ratios normales pueden obtenerse a

40 partir de datos obtenidos previamente, o alternativamente, pueden recalcularse al mismo tiempo que se estudia el tejido cerebral sospechoso.

La capacidad de los presentes compuestos para fijarse específicamente a las madejas neurofibrilares con respecto a las placas de amiloide es particularmente cierta a concentraciones menores que 10 nM, lo cual incluye el intervalo

45 de concentraciones *in vivo* de los radiotrazadores PET. A estas bajas concentraciones, que contienen únicamente madejas y no contienen placa alguna, no se produce una fijación significativa cuando se compara con tejido cerebral de control que no contiene placas ni madejas. Sin embargo, la incubación de tejido de homogeneizados de tejido de cerebro que contiene principalmente placas y algunas madejas con compuestos radiomarcados de las fórmulas descritas en esta memoria, da como resultado un aumento significativo de la fijación cuando se compara con tejido

50 de control sin placas o madejas. Este dato sugiere la ventaja de que estos compuestos son específicos para los depósitos de A β a concentraciones menores que 10 nM. Estas bajas concentraciones son detectables en los estudios PET, lo que hace posible la detección por PET utilizando compuestos radiomarcados de las fórmulas descritas en esta memoria que son específicos para depósitos A β . El uso de tales compuestos permite la detección por PET en depósitos de A β tales como los encontrados en las placas y el amiloide cerebrovascular. Dado que se ha

55 consignado que los niveles de A β en el córtex frontal se incrementan antes de la formación de las madejas, esto sugeriría que los compuestos radiomarcados de la presente invención, utilizados como trazadores PET, podrían ser específicos para los cambios más tempranos en el córtex AD. Naslund et al., JAMA 283:1571 (2000).

Método para Detección de Depósitos de Amiloide *In Vivo*.

Esta invención proporciona adicionalmente un método para detectar depósitos de amiloide *in vivo*, que comprende:

- 60 (i) administrar a un animal una cantidad eficaz de un compuesto de inventiva, en donde el compuesto se fijaría a cualesquiera depósitos de amiloide en el animal; y
- (ii) detectar la fijación del compuesto a los depósitos de amiloide en el animal.

Después que ha transcurrido un tiempo suficiente para que el compuesto se fije al o a los depósitos de amiloide, por ejemplo 30 minutos a 48 horas después de la administración, la fijación puede detectarse por 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 no invasivas de producción de neuroimágenes (tales como espectroscopia de resonancia magnética (MRS), obtención de imágenes de resonancia magnética (MRI)), y técnicas de obtención de imágenes gamma tales como tomografía computarizada por emisión de fotones simples (SPECT) y tomografía por emisión de positrones (PET). Para la obtención de imágenes gamma, la radiación emitida por el órgano o área que se examina se mide y se expresa como fijación total o como una ratio en la cual la fijación total en un tejido se normaliza a (por ejemplo, se divide por) la fijación total en otro tejido del mismo individuo durante el mismo procedimiento de obtención de imágenes *in vivo*. La fijación total *in vivo* se define como la señal completa detectada en un tejido por una técnica de obtención de imágenes *in vivo* sin necesidad de corrección por una segunda inyección de una cantidad idéntica de compuesto marcado junto con gran exceso de compuesto sin marcar pero por lo demás químicamente idéntico.

El tipo de instrumento de detección disponible puede ser un factor en la selección del isótopo radiactivo halógeno o de carbono. Por ejemplo, el radioisótopo seleccionado debería tener un tipo de desintegración que sea detectable por un instrumento dado. Otra consideración se refiere a la semi-vida del radioisótopo. La semivida debería ser suficientemente larga a fin de que sea detectable todavía el momento de máxima absorción por la diana, pero lo bastante corta para que el hospedador no sufra una radiación deletérea. Para la detección SPECT, el radiomarcador seleccionado puede carecer de emisión particulada, pero puede producir un gran número de fotones en un intervalo de 140-200 keV. Para la detección PET, el radioisótopo seleccionado puede ser un radioisótopo emisor de positrones, que se aniquila para formar dos rayos gamma de 511 keV detectables por una cámara PET.

Radioisótopos útiles incluyen, sin limitación: ^{125}I , ^{14}C o ^3H para cuantificación *in vitro* de amiloide en homogeneizados de tejido de biopsia o tejido post-mortem; ^{11}C y ^{18}F para PET en obtención de imágenes *in vivo*; ^{123}I para obtención de imágenes SPECT; ^{18}F para MRS/MRI; ^3H o ^{14}C para estudios *in vitro*; y ^{18}F y ^{13}C para espectroscopia de resonancia magnética. En una realización, la detección se efectúa por obtención de imágenes gamma, imágenes de resonancia magnética o espectroscopia de resonancia magnética. En otra realización, la obtención de imágenes gamma es PET o SPECT.

El compuesto de inventiva puede administrarse por cualquier medio conocido por una persona con experiencia ordinaria en la técnica. Por ejemplo, la administración al animal puede ser local o sistémica y realizarse por vías oral, parenteral, por inhalación, spray, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal, o por un depósito implantado. El término "parenteral", como se utiliza en esta memoria, incluye técnicas de inyección e infusión subcutánea, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intraesternal, intracraneal, e intraósea. El protocolo exacto de administración variará dependiendo de diversos factores que incluyen la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del paciente; la determinación de procedimientos específicos de administración sería rutinaria para una persona con experiencia ordinaria en la técnica.

Niveles de dosis del orden de aproximadamente 0,001 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ a aproximadamente 10.000 $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$ de un compuesto de la invención son útiles para los métodos de inventiva. En una realización, el nivel de dosis es aproximadamente 0,001 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ a aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$. En otra realización, el nivel de dosis es aproximadamente 0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ a aproximadamente 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$. En otra realización adicional, el nivel de dosis es aproximadamente 0,1 $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$ a aproximadamente 100 $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$.

El nivel de dosis específico para cualquier paciente particular variará dependiendo de diversos factores, incluyen la actividad y la posible toxicidad del compuesto específico empleado; la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración; la velocidad de excreción; la combinación de fármacos, y la forma de administración. Típicamente, los resultados dosificación-efecto *in vitro* proporcionan orientación útil en cuanto a las dosis apropiadas para administración al paciente. Son también útiles los estudios en modelos animales. Las consideraciones para determinación de los niveles de dosis apropiados son bien conocidas en la técnica y están dentro de la experiencia de un médico generalista.

Cualquier régimen conocido de administración para regulación de la temporización y secuencia de suministro de fármacos puede utilizarse y repetirse en caso necesario para efectuar el tratamiento de los métodos de la invención. El régimen puede incluir pretratamiento y/o co-administración con uno o más agentes terapéuticos adicionales.

En una realización, los compuestos de la invención se administran a un animal que se sospecha padece o que se halla en riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección caracterizada por deposición de amiloide. Por ejemplo, el animal puede ser un humano de edad avanzada.

En otra realización, los compuestos de inventiva se fijan a A β con una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 0,0001 μM a aproximadamente 10,0 μM cuando se mide por fijación a péptido A β sintético o tejido de cerebro AD.

Método para Detección de Depósitos de Amiloide *In Vitro*

Esta invención proporciona adicionalmente un método para detección de depósitos de amiloide *in vitro* que comprende:

- 5 (i) poner en contacto un tejido corporal con una cantidad eficaz de un compuesto de la invención, en donde el compuesto se fijaría a cualesquiera depósitos de amiloide en el tejido; y
 (ii) detectar la fijación del compuesto a los depósitos de amiloide en el tejido.

La fijación puede detectarse por cualquier medio conocido en la técnica. Ejemplos de medios de detección incluyen, sin limitación, técnicas microscópicas, tales como microscopía en campo brillante, de fluorescencia, confocal láser y de polarización cruzada.

- 10 En una realización, el tejido es tejido de biopsia o tejido post-mortem que está fijado en formalina o recién congelado. En otra realización, el tejido es un homogeneizado. En otra realización adicional, el compuesto de la invención se encuentra en una solución que comprende adicionalmente 25-99% etanol, siendo el resto de la solución agua. En otra realización adicional, la solución comprende 0-50% etanol y 0,0001 a 100 μ M del compuesto.
 15 En otra realización adicional, el método comprende además (iii) separar del tejido el o los depósitos de amiloide fijados al compuesto; y (iv) cuantificar el o los depósitos de amiloide fijados al compuesto de la invención. El o los depósitos de amiloide fijados pueden separarse del tejido por cualquier medio conocido en la técnica, tal como filtración. La cantidad del o de los depósitos de amiloide fijados puede convertirse en unidades de μ g de depósitos de amiloide por 100 mg de tejido por comparación con una curva estándar generada por incubación de cantidades conocidas de amiloide con el compuesto de la invención o sal, hidrato, solvato o profármaco farmacéuticamente
 20 aceptable.

Método para Diferenciación del Cerebro Enfermo de Alzheimer de un Cerebro Normal

Esta invención proporciona adicionalmente un método para diferenciación de un cerebro enfermo de Alzheimer de un cerebro normal que comprende:

- 25 (i) obtención de tejidos de (a) el cerebelo y (b) otra área del mismo cerebro, de un animal normal y de un animal que se sospecha padece enfermedad de Alzheimer;
 (ii) poner en contacto los tejidos con un compuesto de la invención;
 (iii) cuantificar el amiloide fijado al compuesto;
 (iv) calcular la ratio de la cantidad de amiloide en el área del cerebro distinta del cerebelo a la cantidad de amiloide en el cerebelo;
 30 (v) comparar la ratio para un animal normal con la ratio para un animal sospechoso de padecer enfermedad de Alzheimer.

Puede hacerse un diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer si la ratio para un animal sospechoso de padecer enfermedad de Alzheimer es, por ejemplo, superior a 90% de la ratio para un animal normal. Para este método, un animal "normal" es uno que no padece enfermedad de Alzheimer.

35 COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA

Esta invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende:

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

- 40 La composición puede comprender uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables adicionales, que incluyen, sin limitación, uno o más agentes humectantes, agentes tampón, agentes de suspensión, agentes lubricantes, emulsificadores, desintegrantes, absorbentes, conservantes, agentes tensioactivos, colorantes, saborizantes, edulcorantes, y agentes terapéuticos.

- La composición puede formularse en forma sólida, líquida, de gel o de suspensión para: (1) administración oral como, por ejemplo, un medicamento bebible (solución o suspensión acuosa o no acuosa), tableta (por ejemplo, destinada a absorción bucal, sublingual o sistémica), bolus, polvo, gránulo, pasta para aplicación a la lengua, cápsula de gelatina dura, cápsula de gelatina blanda, spray bucal, emulsión y microemulsión; (2) administración parenteral por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural como, por ejemplo, una solución, suspensión o formulación estéril de liberación sostenida; (3) aplicación tópica como, por ejemplo, una crema, ungüento, parche de liberación controlada o spray aplicado a la piel; (4) administración intravaginal o intrarrectal
 45 como, por ejemplo, un pesario, crema o espuma; (5) administración sublingual; (6) administración ocular; (7) administración transdérmica; o (8) administración nasal.
 50

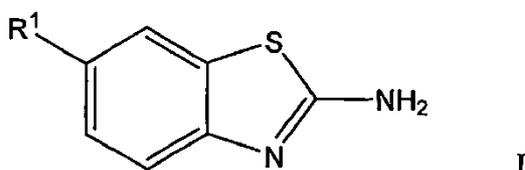
- En una realización, la composición se formula para administración intravenosa y el portador incluye un restablecedor de fluidos y/o nutrientes. En otra realización, la composición es capaz de fijarse específicamente a amiloide *in vivo*, es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, es no tóxica a los niveles de dosis apropiados y/o tiene una duración de efecto satisfactoria. En otra realización adicional, la composición comprende aproximadamente 10 mg de seroalbúmina humana y desde aproximadamente 0,5 a 500 mg del compuesto de la invención por mililitro de tampón de fosfato que contiene NaCl.
 55

Los ejemplos que siguen se ofrecen para ilustrar la presente invención. Debe entenderse, sin embargo, que la invención no debe considerarse limitada a las condiciones específicas o detalles descritos en estos ejemplos. A lo largo de la memoria descriptiva, cualesquiera y la totalidad de las referencias a un documento disponible públicamente, con inclusión de patentes U.S., se incorporan específicamente en esta solicitud de patente por referencia.

EJEMPLOS

Todos los reactivos utilizados en la síntesis se adquirieron de Aldrich Chemical Company y se utilizaron sin purificación ulterior, a no ser que se indique otra cosa. Los puntos de fusión se determinaron en Mel-TEMP II y no se corrigieron. Los espectros ^1H NMR de todos los compuestos se midieron en Bruker 300 utilizando TMS como referencia interna y estaban de acuerdo con las estructuras asignadas. La TLC se realizó utilizando Gel de Sílice 60 F₂₅₄ de EM Sciences y se detectó bajo una lámpara UV. La cromatografía flash se realizó en gel de sílice 60 (mallas 230-400) adquirido de Mallinckrodt Company. Las TLC de fase inversa se adquirieron de Whiteman Company.

Metodología General para la Síntesis del Compuesto de Fórmula I:



- 15 R¹ es hidrógeno, -OH, -NO₂, -CN, -COOR, -OCH₂OR, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenoilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ alcoxi o halo, en donde uno o más de los átomos de R¹ puede(n) ser un átomo radiomarcado;
R es C₁-C₆ alquilo, en donde uno o más de los átomos de carbono pueden ser un átomo radiomarcado;
se hidroliza por uno de los dos procedimientos siguientes:

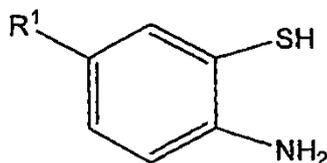
Preparación de 2-aminotiofenol por hidrólisis:

- 20 El 2-aminobenzotiazol sustituido en 6 (172 mmoles) se suspende en 50% KOH (180 g KOH disueltos en 180 ml de agua) y etilenglicol (40 ml). La suspensión se calienta a reflujo durante 48 horas. Después de enfriar a la temperatura ambiente, se añade tolueno (300 ml) y la mezcla de reacción se neutraliza con ácido acético (180 ml). La capa orgánica se separa y la capa acuosa se extrae con otros 200 ml de tolueno. Las capas de tolueno se combinan, se lavan con agua y se secan sobre MgSO₄. La evaporación del disolvente da el producto deseado.

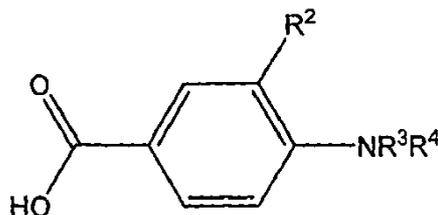
Preparación de 2-aminotiofenol por hidrazinólisis:

El benzotiazol sustituido en 6 (6,7 mmoles) se suspende en etanol (11 ml, anhidro) y se añade hidrazina (2,4 ml) en atmósfera de nitrógeno a la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 1 hora. Se evapora el disolvente y el residuo se disuelve en agua (10 ml) y se ajusta a un pH de 5 con ácido acético. Se recoge el precipitado por filtración y se lava con agua para dar el producto deseado.

- 30 El 2-amino-1-tiofenol sustituido en 5 resultante de la fórmula



se acopla a un ácido benzoico de la fórmula:



- 35 en donde R² es hidrógeno, y R³ y R⁴ son independientemente hidrógeno, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenoilo o C₂-C₆ alquinilo por la reacción siguiente:

Una mezcla del 2-aminotiofenol sustituido en 5 (4,0 mmoles), el ácido benzoico (4,0 mmoles), y ácido polifosfórico (PPA) (10 g) se calienta a 220°C durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfría a la temperatura ambiente y se vierte en solución de carbonato de potasio al 10% (~ 400 ml). El precipitado se recoge por filtración a presión reducida para dar el producto deseado, que puede purificarse por cromatografía flash o recristalización.

- 5 El hidrógeno de R² puede sustituirse con un halo no radiactivo o un halo radiactivo por la reacción siguiente:

A una solución de 2-(4'-aminofenil)-benzotiazol sustituido en 6 (1 mg) en 250 µl de ácido acético en un vial herméticamente cerrado se añaden 40 µl de solución de cloramina T (28 mg disueltos en 500 µl de ácido acético) seguidos por 27 µl (aprox. 5 mCi) de [¹²⁵I]yoduro de sodio (actividad específica 2175 Ci/mmol). La mezcla de reacción se agita a la temperatura ambiente durante 2,5 horas y se extingue con solución saturada de hidrogenosulfuro de sodio. Después de dilución con 20 ml de agua, la mezcla de reacción se carga en SepPak C8 Plus y se eluye con 2 ml de metanol. Dependiendo de la naturaleza del sustituyente en la posición 6, puede ser necesario emplear grupos protectores. Por ejemplo, el grupo 6-hidroxi se protege como el derivado metanosulfonilo (mesiloxi). Para desprotección del grupo metanosulfonilo, se añaden 0,5 ml de NaOH 1M a la solución eluida del compuesto intermedio radioyodado. La mezcla se calienta a 50°C durante 2 horas. Después de ser extinguida con 500 µl de ácido acético 1M, la mezcla de reacción se diluye con 40 ml de agua y se carga en un SepPak C8 Plus. El producto radioyodado, que tiene una radiactividad de aprox. 3 mCi, se eluye del SepPak con 2 ml de metanol. La solución se concentra en una corriente de nitrógeno hasta 300 µl y el producto bruto se purifica por HPLC en una columna Phenomenex ODS (tampón MeCN/TEA, 35:65, pH 7,5, caudal 0,5 ml/minuto hasta 4 minutos, 1,0 ml/minuto entre los 4 y los 6 minutos, y 2,0 ml/minuto después de 6 minutos, tiempo de retención 23,6). Las soluciones recogidas se cargan en un SepPak C8 Plus. La elución con 1 ml de etanol dio aprox. 1 mCi del producto radioyodado final.

Cuando cualquiera o ambos de R³ y R⁴ son hidrógeno, entonces R³ y R⁴ pueden convertirse en C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo o C₂-C₆ alquinilo por reacción con un haluro de alquilo, alquenilo o alquinilo en las condiciones siguientes:

Para dialquilación: A una solución de 2-(4'-aminofenil)-benzotiazol sustituido en 6 (0,59 mmoles) en DMSO (anhidro, 2 ml) se añaden haluro de alquilo, alquenilo o alquinilo (2,09 mmoles) y K₂CO₃ (500 mg, 3,75 mmoles). La mezcla de reacción se calienta a 140°C durante 16 horas. Después de enfriar a la temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vierte en agua y se extrae con acetato de etilo (3 x 10 ml). Se combinan las capas orgánicas y se evapora el disolvente. El residuo se purifica en columna flash para dar el dimetilaminofenil)-benzotiazol sustituido en 6 deseado.

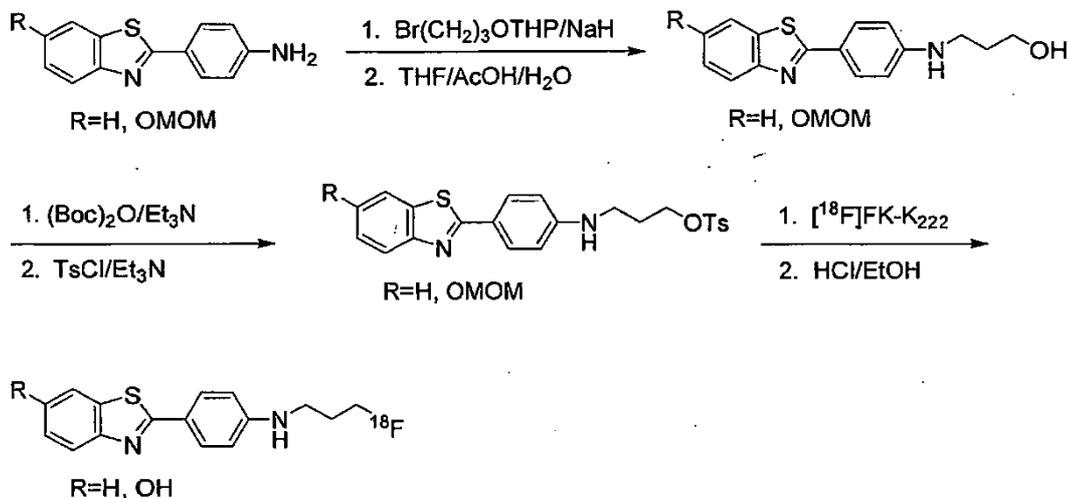
Para monoalquilación: A una solución de 2-(4'-aminofenil)-benzotiazol sustituido en 6 (0,013 mmoles) en DMSO (anhidro, 0,5 ml) se añade haluro de alquilo, alquenilo o alquinilo (0,027 mmoles) y K₂CO₃ anhidro (100 mg, 0,75 mmoles). La mezcla de reacción se calienta a 100°C durante 16 horas. Después de enfriar a la temperatura ambiente, la mezcla de reacción se purifica directamente por TLC preparativa de fase normal para dar los derivados de 2-(4'-metilaminofenil)-benzotiazol sustituidos en 6 deseados.

Cuando R² es hidrógeno o un halo no radiactivo, R⁴ es C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo o C₂-C₆ alquinilo, en donde el alquilo, alquenilo o alquinilo comprende un carbono radiactivo o está sustituido con un halo radiactivo, el compuesto puede sintetizarse por una de las secuencias siguientes:

Para incorporación de carbono radiactivo:

Se produce aproximadamente 1 Ci de dióxido de carbono [¹¹C] utilizando un ciclotrón de iones negativos CTI/Siemens RDS 112 por irradiación de una diana de nitrógeno gaseoso (¹⁴N₂) que contiene 1% de oxígeno gaseoso con una corriente de haces de protones de 40 µA de 11 MeV durante 60 minutos. El dióxido de carbono [¹¹C] se convierte en yoduro de metilo [¹¹C] haciéndolo reaccionar primeramente con una solución saturada de hidruro de litio y aluminio en THF seguido por la adición de ácido yodhídrico a la temperatura de reflujo para generar yoduro de metilo [¹¹C]. El yoduro de metilo [¹¹C] se transporta en una corriente de nitrógeno gaseoso a un vial de reacción que contiene el precursor para radiomarcación. El precursor, 2-(4'-aminofenil)-benzotiazol sustituido en 6 (~ 3,7 µmoles), se disuelve en 400 µl de DMSO. Se añade KOH seco (10 mg), y el vial en V de 3 ml se agita vorticialmente durante 5 minutos. Se borbotea a través de la solución yoduro de metilo [¹¹C] añadido sin portador a 30 ml/minuto a la temperatura ambiente. La reacción se calienta durante 5 minutos a 95°C utilizando un baño de aceite. El producto de reacción se purifica por HPLC semi-preparativa utilizando una columna Prodigy ODS-Prep eluida con tampón de 60% acetonitrilo/40% fosfato de trietilamonio de pH 7,2 (caudal a 5 ml/minuto durante 0-7 minutos, incrementado luego a 15 ml/minuto durante 7-30 minutos). La fracción que contiene [N-metil-¹¹C]-2-(4'-metilaminofenil)-benzotiazol sustituido en 6 (a aproximadamente 15 min) se recoge y se diluye con 50 ml de agua, después de lo cual se eluye a través de un cartucho Waters SepPak C18 Plus. El SepPak C18 se lava con 10 ml de agua, y el producto se eluye con 1 ml de etanol (absoluto) en un vial estéril seguido por 14 ml de solución salina. Las puridades radioquímica y química son > 95% como se determina por HPLC analítica (k' = 4,4 utilizando la columna analítica Prodigy ODS (3) eluida con tampón de 65/35 acetonitrilo/fosfato de trietilamonio de pH 7,2). El rendimiento radioquímico es como promedio 17% para EOS basado en yoduro de metilo [¹¹C], y la actividad específica es como promedio aproximadamente 160 GBq/µmol (4,3 Ci/µmol) al final de la síntesis.

Para incorporación de halógeno radiactivo:



Una mezcla de 2-(4'-aminofenil)-benzotiazol sustituido en 6 (pueden ser necesarios grupos protectores dependiendo de la naturaleza del sustituyente en 6 como se ha indicado arriba) (0,22 mmoles), NaH (4,2 mmoles) y 2-(3-bromopropoxi)tetrahidro-2-H-pirano (0,22 mmoles) en THF (8 ml) se calienta a reflujo durante 23 horas. El disolvente se elimina por destilación y el residuo se disuelve en acetato de etilo y agua, se separa la capa orgánica y la capa acuosa se extrae con acetato de etilo (10 ml x 6). La capa orgánica se combina y se seca sobre MgSO_4 después de lo cual se evapora a sequedad. Se añade al residuo $\text{AcOH/THF/H}_2\text{O}$ (5 ml, 4/2/1) y se calienta a 100°C durante 4 horas. Se elimina el disolvente por evaporación y el residuo se disuelve en acetato de etilo (~ 10 ml), se lava con solución de NaHCO_3 , se seca sobre MgSO_4 y se evapora a sequedad para dar un residuo que se purifica con TLC preparativa (hexano:acetato de etilo = 60:40) para dar el 2-(4'-(3"-hidroxipropilamino)-fenil)-benzotiazol sustituido en 6 deseado (45%).

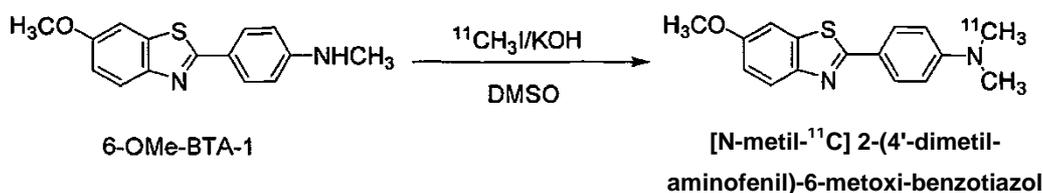
A una solución de 2-(4'-(3"-hidroxipropilamino)-fenil)benzotiazol sustituido en 6 (0,052 mmoles) y Et_3N (0,5 ml) disuelto en acetona (5 ml) se añade $(\text{Boc})_2\text{O}$ (50 mg, 0,22 mmoles). La mezcla de reacción se agita a la temperatura ambiente durante 6 horas seguida por adición de cloruro de tosilo (20 mg, 0,11 mmoles). La mezcla de reacción se agita a la temperatura ambiente durante 24 horas más. Se elimina el disolvente y el residuo se disuelve en acetato de etilo (10 ml), se lava con solución de NaCO_3 , se seca sobre MgSO_4 , se evapora, y se purifica en una columna flash (hexano/acetato de etilo = 4/1) para dar el 2-(4'-(3"-toluenosulfonoxipropilamino)-fenil)-benzotiazol sustituido en 6 deseado (13%). Este 2-(4'-(3"-toluenosulfonoxipropilamino)-fenil)-benzotiazol sustituido en 6 se somete luego a radiofluoración por métodos estándar como sigue:

Una diana de ciclotrón que contiene 0,35 ml de agua enriquecida en [O-18] al 95% se irradia con protones de 11 MeV a 20 μA de corriente de haz durante 60 minutos, y el contenido se transfiere a un vial de reacción de 5 ml que contiene Kryptofix 222 (22,3 mg) y K_2CO_3 (7,9 mg) en acetonitrilo (57 μl). La solución se evapora 3 veces a sequedad a 110°C bajo una corriente de argón, siguiendo la adición de partes alícuotas de 1 ml de acetonitrilo. Se añaden al fluoruro [F-18] desecado 3 mg de 2-(4'-(3"-toluenosulfonoxipropilamino)-fenil)-benzotiazol sustituido en 6 en 1 ml de DMSO, y el vial de reacción se cierra herméticamente y se calienta a 85°C durante 30 minutos. Se añaden al vial de reacción 0,5 ml de MeOH/HCl (concentrado) (2/1 v/v), y se calienta el vial a 120°C durante 10 minutos. Después del calentamiento, se añaden 0,3 ml de tampón de acetato de sodio 2 M a la solución de reacción seguido de purificación por HPLC semi-prep utilizando una columna Phenomenex Prodigy ODS-Prep C18 (10 μm , 250 x 10 mm) eluida con 40% acetonitrilo/60% 60 mM trietilamina-tampón de fosfato (v/v) pH 7,2 a un caudal de 5 ml/minuto durante 15 minutos, después de lo cual se incrementa el flujo a 8 ml/minuto durante el resto de la separación. El producto, 2-(4'-(3"-fluoropropilamino)-fenil)-benzotiazol sustituido en 6 con [F-18], se eluye a ~ 20 minutos en un volumen de aproximadamente 16 ml. La fracción que contiene 2-(4'-(3"-fluoropropilamino)-fenil)-benzotiazol sustituido en 6 con [F-18] se diluye con 50 ml de agua y se eluye a través de un cartucho Waters C18 SepPak Plus. El cartucho SepPak se lava luego con 10 ml de agua, y el producto se eluye utilizando 1 ml de etanol (absoluto) en un vial estéril. La solución se diluye con 10 ml de solución salina normal estéril para inyección intravenosa en animales. Se obtiene el producto 2-(4'-(3"-fluoropropilamino)-fenil)-benzotiazol sustituido en 6 con [F-18] con un rendimiento radioquímico de 2-12% al final de la radiosíntesis de 120 minutos (sin corregir por desintegración) con una actividad específica media de 1500 Ci/mmol.

Ejemplos de Síntesis

Ejemplo de Referencia 1: Se sintetizó [N-metil- ^{11}C]2-(4'-dimetilaminofenil)-6-metoxi-benzotiazol de acuerdo con el Esquema I.

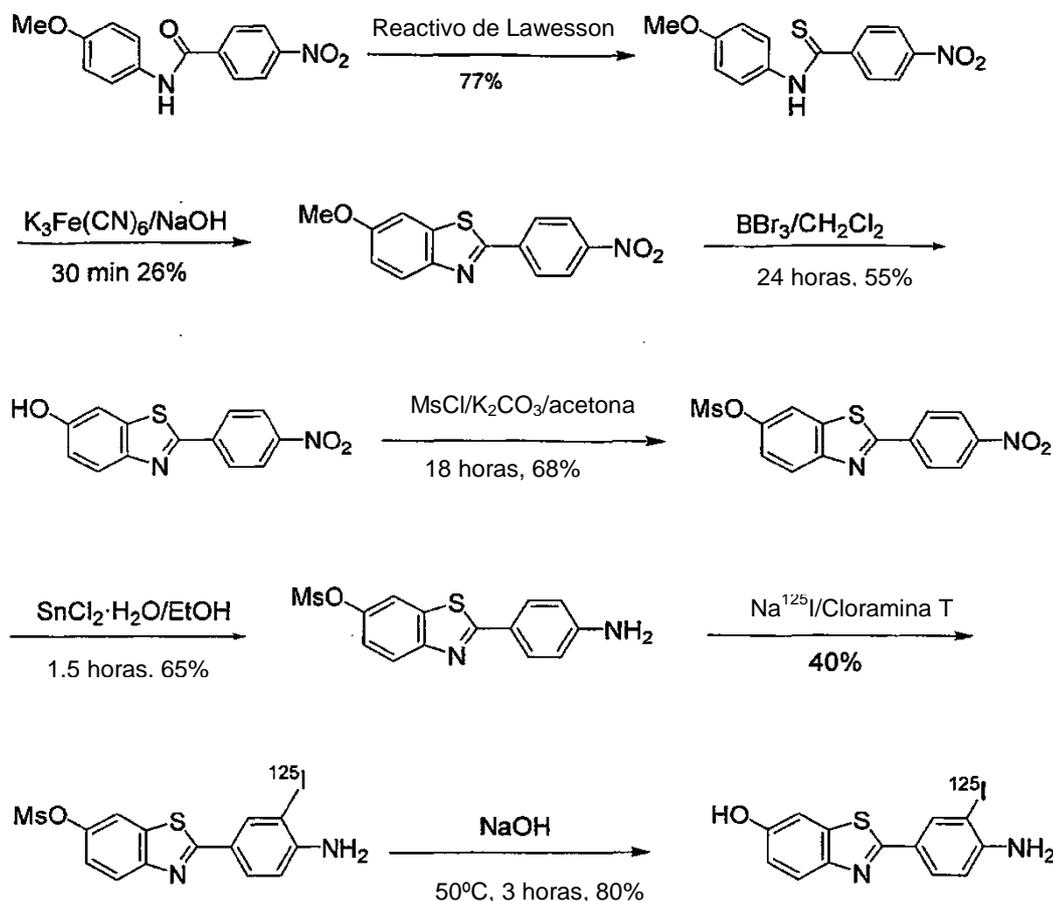
ESQUEMA I



Se produjo aproximadamente 1 Ci de dióxido de carbono [¹¹C] utilizando un ciclotrón de iones negativos CTI/Siemens RDS 112 negativo por irradiación de una diana de nitrógeno gaseoso (¹⁴N₂) que contenía 1% de oxígeno gaseoso con una corriente de haz de 40 μA de protones de 11 MeV durante 60 minutos. El dióxido de carbono [¹¹C] se convierte en yoduro de metilo [¹¹C] haciéndolo reaccionar primeramente con una solución saturada de hidruro de litio y aluminio en THF seguido por la adición de ácido yodhídrico a temperatura de reflujo para generar yoduro de metilo [¹¹C]. El yoduro de metilo [¹¹C] se transporta en una corriente de nitrógeno gaseoso a un vial de reacción que contiene el precursor para radiomarcación. El precursor, 6-CH₃O-BTA-1 (1,0 mg, 3,7 μmoles), se disolvió en 400 μl de DMSO. Se añadió KOH seco (10 mg), y el vial V de 3 ml se agitó vorticialmente durante 5 minutos. Se borboteó a través de la solución yoduro de [¹¹C]metilo añadido sin portador a la temperatura ambiente a 30 ml/minuto. La reacción se calentó durante 5 minutos a 95°C utilizando un baño de aceite. El producto de reacción se purificó por HPLC semi-preparativa utilizando una columna Prodigy ODS-Prep eluida con tampón de 60% acetonitrilo/40% fosfato de trietilamonio de pH 7,2 (caudal de 5 ml/minuto durante 0-7 minutos, incrementado luego a 15 ml/minuto durante 7-30 minutos). La fracción que contenía [N-metil-¹¹C]-2-(4'-dimetilaminofenil)-6-metoxi-benzotiazol (a aproximadamente 15 min) se recogió y se diluyó con 50 ml de agua, después de lo cual se eluyó a través de un cartucho Waters SepPak C18 Plus. El SepPak C18 se lavó con 10 ml de agua, y el producto se eluyó con 1 ml de etanol (absoluto) en un vial estéril seguido por 14 ml de solución salina. Las purezas radioquímica y química eran > 95% como se determinó por HPLC analítica (k' = 4,4 utilizando la columna analítica Prodigy ODS (3) eluida con tampón de 65/35 acetonitrilo/fosfato de trietilamonio de pH 7,2). El rendimiento radioquímico era como promedio 17% al final de la síntesis basado en yoduro de metilo [¹¹C], y la actividad específica era como promedio aproximadamente 160 GBq/μmol (4,3 Ci/μmol) al final de la síntesis.

Ejemplo de Referencia 2: Se sintetizó 2-(3'-¹²⁵I-yodo-4'-amino-fenil)-benzotiazol-6-ol de acuerdo con el Esquema II.

ESQUEMA II

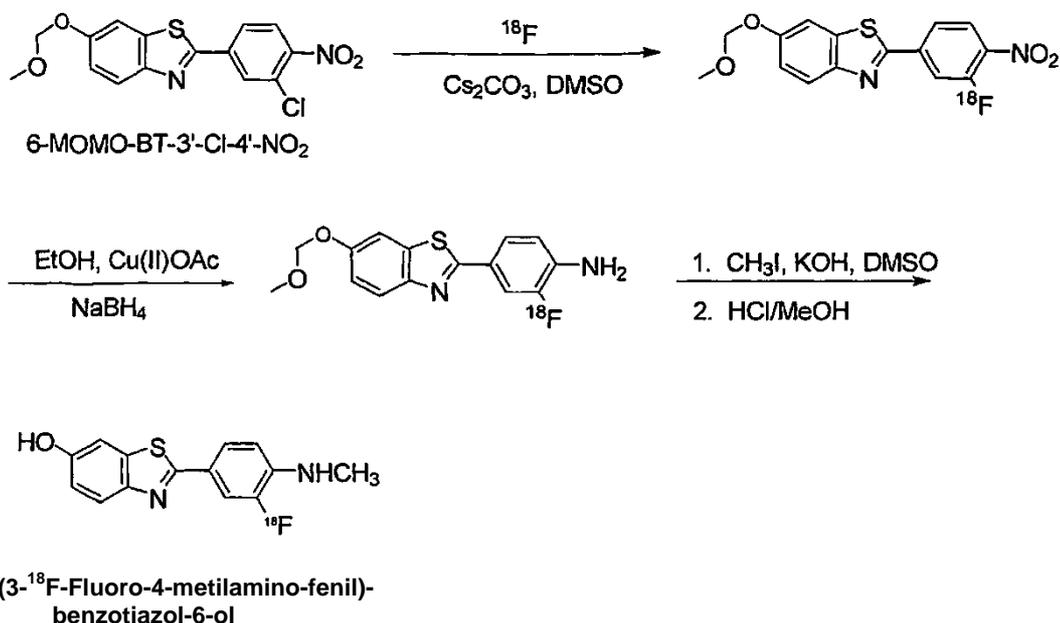


5 A una solución de 2-(4'-aminofenil)-6-metanosulfoniloxi-benzotiazol (1 mg) en 250 μl de ácido acético en un vial herméticamente cerrado se añadieron 40 μl de solución de cloramina T (28 mg, disuelta en 500 μl de ácido acético) seguido por 27 μl (aprox. 5 mCi) de [^{125}I]yoduro de sodio (actividad específica 2175 Ci/mmol). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 2,5 horas y se extinguió con solución saturada de hidrogenosulfito de sodio. Después de dilución con 20 ml de agua, la mezcla de reacción se cargó en C8 Plus SepPak y se eluyó con 2 ml de metanol. Para desprotección del grupo metanosulfonilo, se añadieron 0,5 ml de NaOH 1 M a la solución eluida del compuesto intermedio radioyodado. La mezcla se calentó a 50°C durante 2 horas. Después de ser extinguida por 500 μl de ácido acético 1 M, la mezcla de reacción se diluyó con 40 ml de agua y se cargó en una columna C8 Plus SepPak. El producto radioyodado, que tenía una radiactividad de aprox. 3 mCi, se eluyó del SepPak con 2 ml de metanol. La solución se concentró por medio de una corriente de nitrógeno a 300 μl y el producto bruto se purificó por HPLC en una columna Phenomenex ODS (tampón MeCN/TEA, 35:65, pH 7,5, caudal 0,5 ml/minuto hasta 4 minutos, 1,0 ml/minuto a los 4-6 minutos, y 2,0 ml/minuto después de 6 minutos, tiempo de retención 23,6). Las fracciones recogidas se cargaron en un C8 Plus SepPak. La elución con 1 ml de etanol dio aprox. 1 mCi del producto radioyodado final.

20 La preparación de los derivados radiomarcados con ^{123}I transcurre análogamente a la síntesis arriba reseñada. Por ejemplo, el reemplazamiento del [^{125}I]yoduro de sodio con [^{123}I]yoduro de sodio en el método de síntesis proporcionaría el compuesto radiomarcado con ^{123}I . Una sustitución de este tipo de un átomo radiohalo por otro es bien conocida en la técnica, véase por ejemplo Mathis CA, Taylor SE, Biegon A, Enas JD. [125I]5-Iodo-6-nitroquipazine: a potent and selective ligand for the 5-hydroxytryptamine uptake complex I. In vitro studies. Brain Research 1993; 619:229-235; Jagust W, Eberling JL, Roberts JA, Brennan KM, Hanrahan SM, Van Brocklin H, Biegon A, Mathis CA. In vivo imaging of the 5-hydroxytryptamine reuptake site in primate brain using SPECT and [123I]5-iodo-6-nitroquipazine. European Journal of Pharmacology 1993; 242:189-193; Jagust WJ, Eberling JL, Biegon A, Taylor SE, VanBrocklin H, Jordan S, Hanrahan SM, Roberts JA, Brennan KM, Mathis CA. [Iodine-123]5-Iodo-6-Nitroquipazine: SPECT Radiotracer to Image the Serotonin Transporter. Journal of Nuclear Medicine 1996; 37:1207-1214.

Ejemplo 3: Se sintetizó 2-(3- ^{18}F -fluoro-4-metilamino-fenil)-benzotiazol-6-ol de acuerdo con el Esquema III.

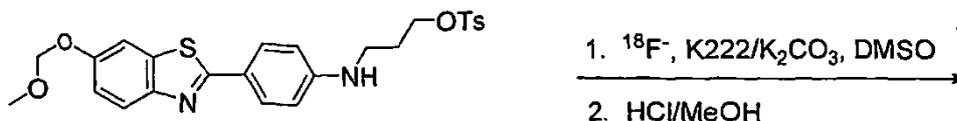
ESQUEMA III



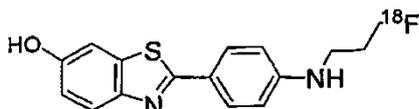
- 5 Una diana de ciclotrón que contenía 0,35 ml de agua enriquecida en [O-18] al 95% se irradió con protones de 11 MeV a 20 μ A de corriente de haz durante 60 minutos, y el contenido se transfirió a un vial de reacción de 5 ml que contenía 2 mg de Cs₂CO₃ en acetonitrilo (57 μ l). La solución se evaporó 3 veces a sequedad a 110°C en una corriente de argón utilizando partes alícuotas de 1 ml de acetonitrilo. Se añadieron al [F-18] fluoruro secado 6 mg de 6-MOMO-BT-3'-Cl-4'-NO₂ en 1 ml de DMSO, y el vial de reacción se cerró herméticamente y se calentó a 120°C durante 20 minutos (la incorporación radioquímica para este primer paso de radiosíntesis era aproximadamente 20% de fluoruro [F-18] solubilizado). Se añadieron a la mezcla de reacción bruta 8 ml de agua y 6 ml de dietil-éter, se agitó la mezcla y se dejó separar. Se separó la fase de éter y se evaporó a sequedad en una corriente de argón a 120°C. Se añadieron a la muestra seca 0,5 ml de EtOH absoluto junto con 3 mg de acetato de cobre (II) y 8 mg de NaBH₄. La reacción de reducción se dejó transcurrir durante 10 minutos a la temperatura ambiente (el rendimiento bruto para el paso de reducción fue aproximadamente 40%). Se añadieron a la mezcla de reacción 8 ml de agua y 6 ml de dietil-éter, se sacudió la mezcla y se separó la fase de éter. La fase de éter dietílico se secó en una corriente de argón a 120°C. Se añadieron al vial de reacción 700 μ l de DMSO que contenía 30 micromoles de CH₃I y 20 mg de KOH seco. El vial de reacción se calentó a 120°C durante 10 minutos. Se añadió una solución de 700 μ l de 2:1 MeOH/HCl (concentrado) y se calentó durante 15 minutos a 120°C. Después del calentamiento, se añadió 1 ml de tampón de acetato de sodio 2 M a la solución de reacción seguido por purificación por HPLC semi-prep utilizando una columna Phenomenex Prodigy ODS-prep C18 (10 μ m, 250 x 10 mm) eluida con 35% acetonitrilo/65% 60 mM trietilamina-tampón de fosfato (v/v) de pH 7,2 a un caudal de 5 ml/minuto durante 2 minutos, después de lo cual se incrementó el flujo a 15 ml/minuto durante el resto de la separación. El producto, 2-(3-¹⁸F-fluoro-4-metilamino-fenil)-benzotiazol-6-ol, se eluyó a ~ 15 minutos en un volumen de aproximadamente 16 ml. La fracción que contenía 2-(3-¹⁸F-fluoro-4-metilamino-fenil)-benzotiazol-6-ol se diluyó con 50 ml de agua y se eluyó a través de un cartucho Waters C18 SepPak Plus. El cartucho SepPak se lavó luego con 10 ml de agua, y el producto se eluyó utilizando 1 ml de etanol (absoluto) a un vial estéril. La solución se diluyó con 10 ml de solución salina estéril normal para inyección intravenosa en animales. Se obtuvo el producto 2-(3-¹⁸F-fluoro-4-metilamino-fenil)-benzotiazol-6-ol con un rendimiento radioquímico de 0,5% (n = 4) al final de la radiosíntesis de 120 minutos (sin corregir por desintegración) con una actividad específica media de 1000 Ci/mmol. Las purzas radioquímica y química de 2-(3-¹⁸F-fluoro-4-metilaminofenil)-benzotiazol-6-ol se evaluaron por radio-HPLC con detección UV a 350 nm utilizando una columna Phenomenex Prodigy ODS (3) C18 (5 μ m, 250 x 4,6 mm) eluida con 40% acetonitrilo/60% trietilamina-tampón de fosfato 60 mM (v/v), pH 7,2. El 2-(3-¹⁸F-fluoro-4-metilamino-fenil)-benzotiazol-6-ol tenía un tiempo de retención de ~ 11 minutos a un caudal de 2 ml/min (k' = 5,5). La pureza radioquímica era > 99%, y la pureza química era > 90%. La identidad radioquímica de 2-(3-¹⁸F-fluoro-4-metilamino-fenil)-benzotiazol-6-ol se confirmó por radio-HPLC en fase inversa utilizando una muestra de control de calidad del producto radioquímico final coinyectado con un estándar auténtico (frío).

Ejemplo de referencia 4: Se sintetizó 2-[4-(3-¹⁸F-fluoro-propilamino)-fenil]-benzotiazol-6-ol de acuerdo con el Esquema IV

ESQUEMA IV

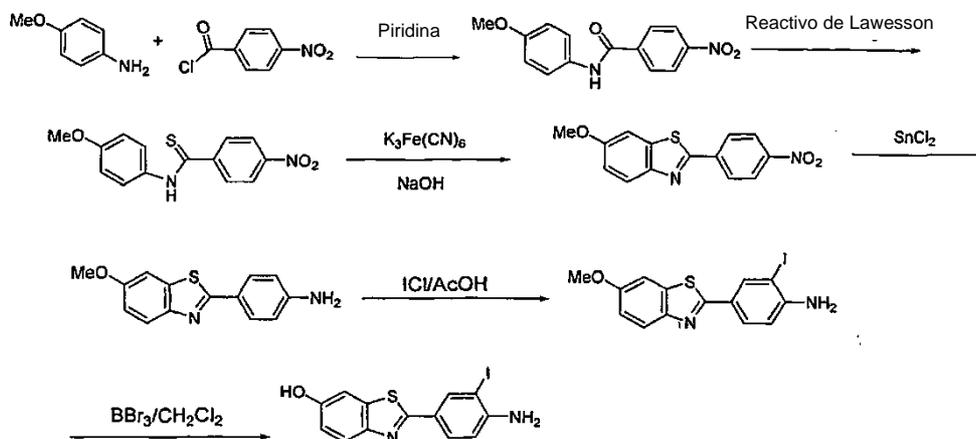


6-MOMO-BTA-N-Pr-OTs

2-[4-(3- ^{18}F -Fluoro-propilamino)-fenil]-Benzotiazol-6-ol

- 5 Una diana de ciclotrón que contenía 0,35 ml de agua enriquecida en [O-18] al 95% se irradió con protones de 11 MeV a 20 μA de corriente de haz durante 60 minutos, y el contenido se transfirió a un vial de reacción de 5 ml que contenía Kryptofix 222 (22,3 mg) y K_2CO_3 (7,9 mg) en acetonitrilo (57 μl). La solución se evaporó 3 veces a sequedad a 110°C en una corriente de argón después de la adición de partes alícuotas de 1 ml de acetonitrilo. Se añadieron al fluoruro [F-18] secado 3 mg de 6-MOMO-BTA-N-Pr-OTs en 1 ml de DMSO, y el vial de reacción se cerró herméticamente y se calentó a 85°C durante 30 minutos. Se añadieron al vial de reacción 0,5 ml de MeOH/HCl (concentrado) (2/1 v/v), y el vial se calentó a 120°C durante 10 minutos. Después del calentamiento, se añadieron 0,3 ml de tampón de acetato de sodio 2 M a la solución de reacción seguido por purificación por HPLC semi-prep utilizando una columna Phenomenex Prodigy ODS-Prep C18 (10 μm , 250 x 10 mm) eluida con 40% acetonitrilo/60% trietilamina-tampón de fosfato 60 mM (v/v) pH 7,2 a un caudal de 5 ml/minuto durante 15 minutos, después de lo cual se aumentó el flujo a 8 ml/minuto durante el resto de la separación. El producto, [F-18] 6-HO-BTA-N-PrF, se eluyó a ~ 20 minutos en un volumen de aproximadamente 16 ml. La fracción que contenía [F-18] 6-HO-BTA-N-PrF se diluyó con 50 ml de agua y se eluyó a través de un cartucho Waters C18 SepPak Plus. El cartucho SepPak se lavó luego con 10 ml de agua, y el producto se eluyó utilizando 1 ml de etanol (absoluto) a un vial estéril. La solución se diluyó con 10 ml de solución salina estéril normal para inyección intravenosa en animales. El producto [F-18] 6-HO-BTA-N-PrF se obtuvo con un rendimiento radioquímico de $8 \pm 4\%$ (n = 8) al final de la radiosíntesis de 120 minutos (sin corregir por desintegración) con una actividad específica media de 1500 Ci/mmol. Las perezas radioquímica y química de [F-18] 6-HO-BTA-N-PrF se evaluaron por radio-HPLC con detección UV a 350 nm utilizando una columna Phenomenex Prodigy ODS (3) C18 (5 μm , 250 x 4,6 mm) eluida con 40% acetonitrilo/60% trietilamina-tampón de fosfato 60 mM (v/v), pH 7,2. El [F-18] 6-HO-BTA-N-PrF tenía un tiempo de retención de ~ 12 minutos a un caudal de 2 ml/minuto ($k' = 6,1$). La pureza radioquímica era > 99%, y la pureza química era > 90%. La identidad radioquímica de [F-18] 6-HO-BTA-N-PrF se confirmó por radio-HPLC de fase inversa utilizando una muestra de control de calidad del producto radioquímico final coinyectado con un estándar auténtico (frío).

Ejemplo de referencia 5: Síntesis de 2-(3'-yodo-4'-aminofenil)-6-hidroxi-benzotiazol



Preparación de 4-metoxi-4'-nitrobenzanilida

Se disolvió p-anisidina (1,0 g, 8,1 mmoles) en piridina anhidra (15 ml), y se añadió cloruro de 4-nitrobenzoílo (1,5 g, 8,1 mmoles). La mezcla de reacción se dejó en reposo a la temperatura ambiente durante 16 horas. Se vertió la mezcla de reacción en agua y el precipitado se recogió con el filtrado a vacío y se lavó con bicarbonato de sodio al 5% (2 x 10 ml). El producto se utilizó en el paso siguiente sin purificación ulterior. ¹HNMR(300MHz, DMSO-d₆) δ: 10,46(s, 1H, NH), 8,37(d, J=5,5Hz, 2H, H-3',5'), 8,17(d, J=6,3Hz, 2H, H-2',6'), 7,48(d, J=6,6Hz, 2H), 6,97(d, J=6,5Hz, 2H), 3,75(s, 3H, MeO).

Preparación de 4-metoxi-4'-nitrotiobenzanilida

Una mezcla de 4-metoxi-4'-nitrotiobenzanilina (1,0 g, 3,7 mmoles) y reactivo de Lawesson (0,89 g, 2,2 mmoles, 0,6 equiv.) en clorobenceno (15 ml) se calentó a reflujo durante 4 horas. Se evaporó el disolvente y el residuo se purificó en una columna flash (hexano:acetato de etilo = 4:1) para dar 820 mg (77,4%) del producto como un sólido de color anaranjado. ¹HNMR(300MHz, DMSO-d₆) δ: 8,29(d, 2H, H-3',5'), 8,00(d, J=8,5Hz, 2H, H-2',6'), 7,76(d, 2H), 7,03(d, J=8,4Hz, 2H), 3,808,37(d, J=5,5Hz, 2H, H-3',5'), 8,17(d, J=6,3Hz, 2H, H-2',6'), 7,48(d, J=6,6Hz, 2H), 6,97(d, J=6,5Hz, 2H), 3,75(s, 3H, MeO), (s, 3H, MeO).

15 Preparación de 6-metoxi-2-(4-nitrofenil)benzotiazol

Se humedeció 4-metoxi-4'-nitrotiobenzanilida (0,5 g, 1,74 mmoles) con un poco de etanol (~ 0,5 ml), y se añadió solución acuosa de hidróxido de sodio al 30% (556 mg, 13,9 mmoles, 8 equiv.). La mezcla se diluyó con agua para proporcionar una solución/suspensión final de hidróxido de sodio acuoso al 10%. Se añadieron partes alícuotas de esta mezcla con intervalos de 1 min a una solución agitada de ferricianuro de potasio (2,29 g, 6,9 mmoles, 4 equiv.) en agua (5 ml) a 80-90°C. La mezcla de reacción se calentó durante 0,5 horas más y se dejó enfriar luego. El precipitado se recogió por filtración a vacío y se lavó con agua, se purificó en una columna flash (hexano:acetato de etilo = 4:1) para dar 130 mg (26%) del producto. ¹HNMR(300MHz, acetona-d₆) δ: 8,45(m, 4H), 8,07(d, J=8,5Hz, 1H, H-4), 7,69(s, 1H, H-7), 7,22(d, J=9,0Hz, 1H, H-5), 3,90(s, 3H, MeO).

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

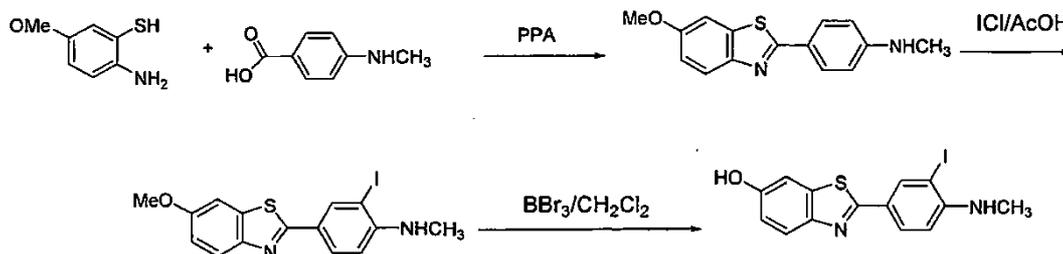
Una mezcla de 6-metoxi-2-(4-nitrofenil)benzotiazoles (22 mg, 0,077 mmoles) y cloruro de estaño (II) Tomograph (132 mg, 0,45 mmoles) en etanol hirviente se agitó bajo nitrógeno durante 4 horas. Se evaporó el etanol y el residuo se disolvió en acetato de etilo (10 ml), se lavó con hidróxido de sodio 1 N (2 ml) y agua (5 ml), y se secó sobre MgSO₄. La evaporación del disolvente proporcionó 19 mg (97%) del producto como un sólido amarillo.

Preparación de 2-(3'-yodo-4'-aminofenil)-6-metoxibenzotiazol

En una solución de 2-(4'-aminofenil)-6-metoxi-benzotiazol (22 mg, 0,09 mmoles) en ácido acético glacial (2,0 ml) se inyectó solución 1 M de cloruro de yodo en CH₂Cl₂ (0,10 ml, 0,10 mmoles, 1,2 eq.) en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 16 horas. Se eliminó el ácido acético glacial a presión reducida y el residuo se disolvió en CH₂Cl₂. Después de neutralizar la solución con NaHCO₃, se separó la capa acuosa y se extrajo con CH₂Cl₂. Se combinaron las capas orgánicas y se secaron sobre MgSO₄. Después de la evaporación del disolvente, el residuo se purificó por TLC preparativa (hexanos:acetato de etilo = 6:1) para dar 2-(4'-amino-3'-yodofenil)-6-metoxi-benzotiazol (25 mg, 76%) como un sólido pardo. ¹HNMR (300MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,35 (d, J=2,0 Hz, 1H), 7,87 (dd, J₁=2,0 Hz, J₂=9,0 Hz, 1H), 7,31 (d, J=2,2 Hz, 1H), 7,04 (dd, J₁=2,2 Hz, J₂=9,0 Hz, 1H), 6,76 (d, J=9,0 Hz, 1H), 3,87 (s, 3H).

Preparación de 2-(3'-yodo-4'-aminofenil)-6-hidroxibenzotiazol

En una solución de 2-(4'-amino-3'-yodofenil)-6-metoxi-benzotiazol (5) (8,0 mg, 0,02 mmoles) CH₂Cl₂ (2,0 ml) se inyectó solución 1 M de BBr₃ en CH₂Cl₂ (0,20 ml, 0,20 mmoles) en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 18 horas. Después de extinguir la reacción con agua, la mezcla se neutralizó con NaHCO₃. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 3 ml). Se combinaron las capas orgánicas y se secaron sobre MgSO₄. Se evaporó luego el disolvente a presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparativa (hexanos:acetato de etilo = 7:3) para dar 2-(3'-yodo-4'-aminofenil)-6-hidroxibenzotiazol (4,5 mg, 58%) como un sólido pardo. ¹HNMR (300 MHz, acetona-d₆) δ (ppm): 8,69 (s, 1H), 8,34 (d, J=2,0 Hz, 1H), 7,77 (dd, J₁=2,0 Hz, J₂=8,4 Hz, 1H), 7,76 (d, J=8,8 Hz, 1H), 7,40 (d, J=2,4 Hz, 1H), 7,02 (dd, J₁=2,5 Hz, J₂=8,8 Hz, 1H), 6,94 (d, J=8,5 Hz, 1H), 5,47 (br., 2H), HRMS *m/z* 367,9483 (M⁺ calculado para C₁₃H₉N₂O₂SI 367,9480).

Ejemplo de referencia 6: Síntesis de 2-(3'-yodo-4'-metilaminofenil)-6-hidroxibenzotiazol**Preparación de 6-metoxi-2-(4-metilaminofenil)-benzotiazol**

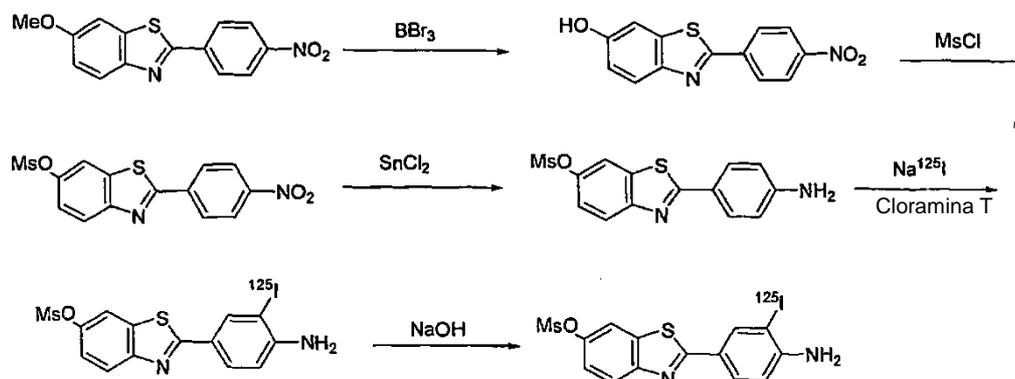
5 Una mezcla de ácido 4-metilaminobenzoico (11,5 g, 76,2 mmoles) y 5-metoxi-2-aminotiofenol (12,5 g, 80 mmoles) se calentó en PPA (~ 30 g) a 170°C en atmósfera de N₂ durante 1,5 horas. La mezcla de reacción se enfrió luego a la temperatura ambiente y se vertió en solución de K₂CO₃ al 10%. El precipitado se filtró a presión reducida. El producto bruto se recristalizó dos veces en acetona/agua y THF/agua, seguido por el tratamiento con carbón activo para dar 4,6 g (21%) de 6-metoxi-2-(4-metilaminofenil)-benzotiazol como un sólido amarillo. ¹HNMNR (300 MHz, acetona-d₆) δ: 7,84(d, J=8,7Hz, 2H, H-2' 6'), 7,78(dd, J₁=8,8Hz, J₂=1,3Hz, 1H, H-4), 7,52(d, J=2,4Hz, 1H, H-7), 7,05(dd, J₁=8,8Hz, J₂=2,4Hz, H-5), 6,70(d, J=7,6Hz, 2H, H-3' 5'), 5,62(s, 1H, NH), 3,88(s, 3H, OCH₃), 2,85(d, J=6,2Hz, 3H, NCH₃).

Preparación de 2-(3'-yodo-4'-metilaminofenil)-6-metoxi-benzotiazol

15 A una solución de 2-(4'-metilaminofenil)-6-metoxi-benzotiazol (20 mg, 0,074 mmoles) disuelto en ácido acético glacial (2 ml) se añadió ICl (90 µl, 0,15 mmoles, 1,2 eq, 1 M en CH₂Cl₂) bajo N₂. La reacción se dejó en agitación a la temperatura ambiente durante 18 horas. Se eliminó luego el ácido acético glacial a presión reducida. El residuo se disolvió en CH₂Cl₂ y se neutralizó con NaHCO₃. La capa acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ y las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄ y se evaporaron. El residuo se purificó por TLC preparativa (hexano:EA = 2:1) para dar 2-(4'-metilamino-3'-yodofenil)-6-metoxi-benzotiazol (8 mg, 27%) como un sólido pardo. ¹HNMNR(300MHz, CDCl₃)δ(ppm): 8,39(d, J=2,0Hz, 1H), 7,88 (d, J=9,0Hz, 1H), 7,33 (d, J=2,2Hz, 1H), 7,06 (dd, J₁=2,2Hz, J₂=9,0Hz, 1H), 6,58 (d, J=9,0Hz, 1H), 3,89(s, 3H, OCH₃).

Preparación de 2-(3'-yodo-4'-metilamino-fenil)-6-hidroxi-benzotiazol

25 A una solución de 2-(4'-metilamino-3'-yodofenil)-6-metoxi-benzotiazol (12 mg, 0,03 mmoles) disuelto en CH₂Cl₂ (4 ml) se añadió BBr₃ (400 µl, 0,4 mmoles, 1 M en CH₂Cl₂) bajo N₂. La reacción se dejó en agitación a la temperatura ambiente durante 18 horas. Se añadió luego agua para extinguir la reacción y la solución se neutralizó con NaHCO₃, y se extrajo con acetato de etilo (3 x 5 ml). Se combinaron las capas orgánicas, se secaron sobre MgSO₄ y se evaporaron. El residuo se purificó por TLC preparativa (hexano:EA = 7:3) para dar 2-(4'-metilamino-3'-yodofenil)-6-hidroxi-benzotiazol (5 mg, 43%) como un sólido pardo. ¹H-NMR(300MHz, CDCl₃) δ(ppm): 8,37 (d, H=2,0Hz, 1H), 7,88 (dd, J₁=2,0Hz, J₂=8,4Hz, 1H), 7,83 (d, J=8,8Hz, 1H), 7,28 (d, J=2,4Hz, 1H), 6,96 (dd, J₁=2,5Hz, J₂=8,8Hz, 1H), 6,58 (d, J=8,5Hz, 1H), 2,96 (s, 3H, CH₃).

Ejemplo de referencia 7: Radiosíntesis de [¹²⁵I] 6-OH-BTA-0-3'-1**Preparación de 2-(4'-nitrofenil)-6-hidroxibenzotiazol**

35 A una suspensión de 2-(4'-nitrofenil)-6-metoxi-benzotiazol (400 mg, 1,5 mmoles) en CH₂Cl₂ (10 ml) se añadió BBr₃ (1 M en CH₂Cl₂, 10 ml, 10 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 24 horas. Se

extinguió luego la reacción con agua, y se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 ml). Se combinaron las capas orgánicas y se lavaron con agua, se secaron sobre MgSO_4 , y se evaporaron. El residuo se purificó por cromatografía flash (gel de sílice, hexanos:acetato de etilo = 1:1) para dar el producto como un sólido amarillo (210 mg, 55%).

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

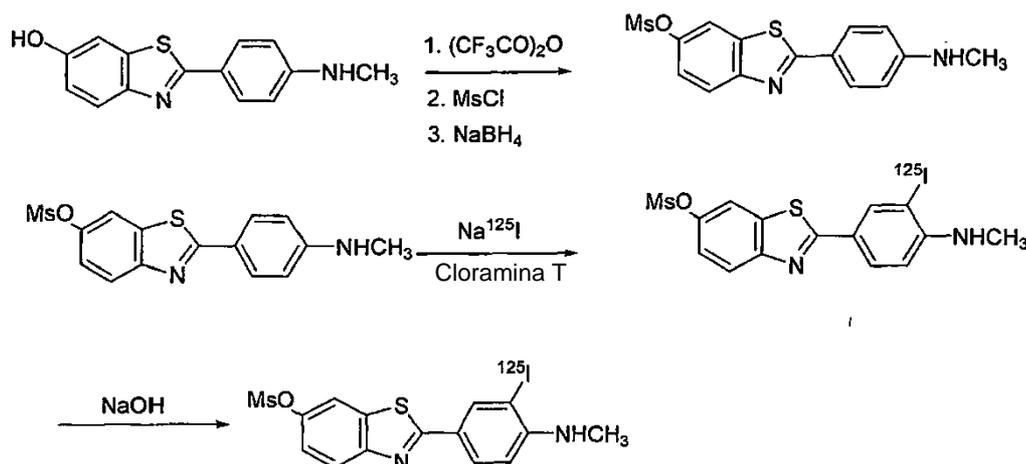
Preparación de 2-(4'-nitrofenil)-6-metilsulfoxi-benzotiazol

A una solución de 2-(4'-nitrofenil)-6-hidroxi-benzotiazol (50 mg, 0,18 mmoles) disuelto en acetona (7 ml, anhidro) se añadió K_2CO_3 (100 mg, 0,72 mmoles, pulverizado) y MsCl (200 μl). Después de agitar durante 2 horas, la mixtura de reacción se filtró. El filtrado se concentró y el residuo se purificó en una columna flash (gel de sílice, hexano:acetato de etilo = 4:1) para dar 2-(4'-nitrofenil)-6-metilsulfoxi-benzotiazol (44 mg, 68%) como un sólido amarillo claro. $^1\text{HNMNR}$ (300MHz, acetona- d_6) δ (ppm): 8,50-8,40(m, 4H), 8,29(d, $J=2,3\text{Hz}$, 1H), 8,23(d, $J=8,9\text{Hz}$, 1H), 7,61(dd, $J_1=2,3\text{Hz}$, $J_2=8,9\text{Hz}$, 1H).

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

A una solución de 2-(4'-nitrofenil)-6-metilsulfoxi-benzotiazol (35 mg, 0,10 mmoles) disuelto en etanol (10 ml) se añadió $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (50 mg). La mixtura de reacción se calentó a reflujo durante 1,5 horas. Se eliminó luego el disolvente a presión reducida. El residuo se disolvió en acetato de etilo (10 ml), se lavó con NaOH 1 N, con agua, y se secó sobre MgSO_4 . La evaporación del disolvente proporcionó 2-(4'-aminofenil)-6-metilsulfoxi-benzotiazol (21 mg, 65%), como un sólido pardo claro. $^1\text{HNMNR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,02(d, $J=6,2\text{Hz}$, 1H), 7,92(d, $J=8,7\text{Hz}$, 2H), 7,84(d, $J=2,4\text{Hz}$, 1H), 7,38(dd, $J_1=2,4\text{Hz}$, $J_2=6,2\text{Hz}$, 1H), 6,78(d, $J=8,7\text{Hz}$, 2H), 2,21(s, 3H, CH_3).

Ejemplo de referencia 8: Radiosíntesis de [^{125}I] 6-OH-BTA-1-3'-I



A una solución de 2-(4'-metilaminofenil)-6-hidroxi-benzotiazol (300 mg, 1,17 mmoles) disuelto en CH_2Cl_2 (20 ml) se añadieron Et_3N (2 ml) y ácido trifluoroacético (1,5 ml). La mixtura de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 3 horas. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se disolvió el residuo en acetato de etilo (30 ml), se lavó con solución de NaHCO_3 , salmuera, agua, y se secó sobre MgSO_4 . Después de evaporación del disolvente, el residuo se disolvió en acetona (20 ml, pre-secada sobre K_2CO_3), se añadió K_2CO_3 (1,0 g, pulverizado), seguido por MsCl (400 mg, 3,49 mmoles). La mixtura de reacción se agitó a la temperatura ambiente y se monitorizó por TLC Tomograph; el material de partida desapareció. El residuo se filtró a continuación. El filtrado se evaporó a presión reducida. El residuo se disolvió en acetato de etilo (30 ml), y se lavó con solución de NaHCO_3 , salmuera, agua, y se secó sobre MgSO_4 . Después de evaporación del disolvente, el residuo se disolvió en EtOH y se añadió NaBH_4 . La mixtura de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 2 horas. Se evaporó el disolvente y el residuo se disolvió en agua, se extrajo con acetato de etilo (20 ml x 3), se combinaron los extractos y se secaron sobre MgSO_4 . Después de evaporación del disolvente, el residuo se purificó en una columna flash (hexanos/acetato de etilo = 8:1) para dar el producto (184mg, 47,0%) como un sólido pardo. $^1\text{HNMNR}$ (300MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,94(d, $J=8,8\text{Hz}$, 1H), 7,87(d, $J=8,7\text{Hz}$, 2H), 7,77(d, $J=2,3\text{Hz}$, 1H), 7,30(dd, $J_1=8,8\text{Hz}$, $J_2=2,3\text{Hz}$, 1H), 6,63(d, $J=8,7\text{Hz}$, 2H), 3,16(s, CH_3), 2,89(s, NCH_3).

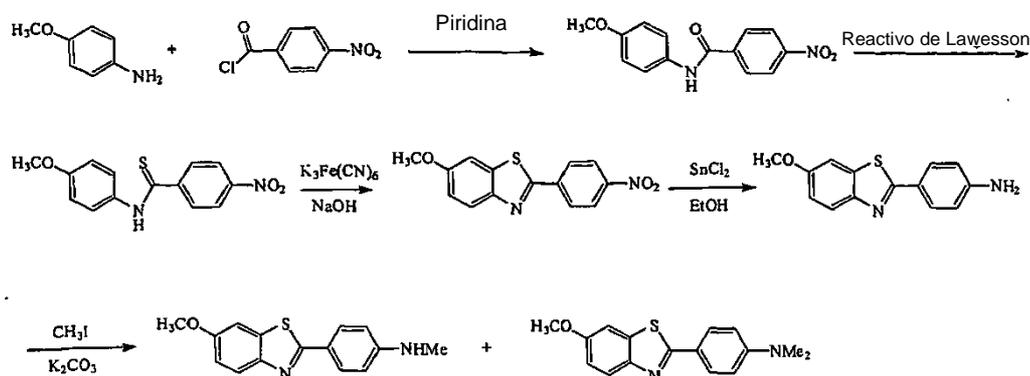
Procedimientos generales para radiomarcación:

A una solución de 2-(4'-aminofenil)-6-metansulfonoxi-benzotiazol o 2-(4'-metilaminofenil)-6-metilsulfoxi-benzotiazol (1 mg) en 250 μl de ácido acético en un vial herméticamente cerrado se añadieron 40 μl de solución de cloramina T (28 mg disueltos en 500 μl de ácido acético), seguido por 27 μl (aprox. 5 mCi) de [^{125}I]yoduro de sodio (actividad específica 2175 Ci/mmol). La mixtura de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 2,5 horas, y se extinguió con solución saturada de hidrogenosulfito de sodio. Después de dilución con 20 ml de agua, la mixtura de

reacción se cargó en C8 Plus SepPak y se eluyó con 2 ml de metanol. Para la desprotección del grupo metanosulfonilo, se añadieron 0,5 ml de NaOH 1 M a la solución eluida del compuesto intermedio radioyodado. La mezcla se calentó a 50°C durante 2 horas. Después de ser extinguida con 500 µl de ácido acético 1 M, la mezcla de reacción se diluyó con 40 ml de agua y se cargó en un equipo C8 Plus SepPak. El producto radioyodado, que tenía una radiactividad de aprox. 3 mCi, se eluyó del equipo SepPak con 2 ml de metanol. La solución se concentró por medio de una corriente de nitrógeno a 300 µl y el producto bruto se purificó por HPLC en una columna Phenomenex ODS (tampón MeCN/TEA, 35:65, pH 7,5, caudal 0,5 ml/min, hasta 4 min, 1,0 ml/min a 4-6 min, y 2,0 ml/min después de 6 minutos, tiempo de retención 23,6). Las fracciones recogidas se cargaron en un equipo C8 Plus SepPak. La elución con 1 ml de etanol dio aprox. 1 mCi del producto radioyodado final.

10 Ejemplo 9: Síntesis de derivados de 2-(4'-aminofenil)-benzotiazol

Ruta 1: Ejemplo de la síntesis de 6-MeO-BTA-0, -1, -2, que son representativos del grupo de compuestos de tioflavina (Shi et al., "Antitumor Benzothiazoles. 3. Synthesis of 2-(4-Aminophenyl)benzothiazoles and Evaluation of Their Activities against Breast Cancer Cell Lines in Vitro and in Vivo" J Med. Chem. 39:3375-3384, 1996).



15

Preparación de 4-metoxi-4'-nitrobenzanilida

Se disolvió p-anisidina (1,0 g, 8,1 mmoles) en piridina anhidra (15 ml), y se añadió cloruro de 4-nitrobenzoilo (1,5 g, 8,1 mmoles). La mezcla de reacción se dejó en reposo a la temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se vertió en agua y el precipitado se recogió por filtración a vacío y se lavó con bicarbonato de sodio al 5% (2 x 10 ml). El producto se utilizó en el paso siguiente sin purificación ulterior. ¹HNMR(300MHz, DMSO-d₆) δ: 10,46(s, 1H, NH), 8,37(d, J=5,5Hz, 2H, H-3',5'), 8,17(d, J=6,3Hz, 2H, H-2',6'), 7,48(d, J=6,6Hz, 2H), 6,97(d, J=6,5Hz, 2H), 3,75(s, 3H, MeO).

20

Preparación de 4-metoxi-4'-nitrotiobenzanilida

Una mezcla de 4-metoxi-4'-nitrotiobenzanilina (1,0 g, 3,7 mmoles) y reactivo de Lawesson (0,89 g, 2,2 mmoles, 0,6 equiv.) en clorobenceno (15 ml) se calentó a reflujo durante 4 horas. Se evaporó el disolvente y el residuo se purificó en una columna flash (hexano:acetato de etilo = 4:1) para dar 820 mg (77,4%) del producto como un sólido de color anaranjado. ¹HNMR(300MHz, DMSO-d₆) δ: 8,29(d, 2H, H-3',5'), 8,00(d, J=8,5Hz, 2H, H-2',6'), 7,76(d, 2H), 7,03(d, J=8,4Hz, 2H), 3,808,37(d, J=5,5Hz, 2H, H-3',5'), 8,17(d, J=6,3Hz, 2H, H-2',6'), 7,48(d, J=6,6Hz, 2H), 6,97(d, J=6,5Hz, 2H), 3,75(s, 3H, MeO), (s, 3H, MeO).

25

30 Preparación de 6-metoxi-2-(4-nitrofenil)benzotiazol

Se humedeció 4-metoxi-4'-nitrotiobenzanilida (0,5 g, 1,74 mmoles) con un poco de etanol (~ 0,5 ml), y se añadió solución acuosa al 30% de hidróxido de sodio (556 mg, 13,9 mmoles, 8 equiv.). La mezcla se diluyó con agua para proporcionar una solución/suspensión final de hidróxido de sodio acuoso al 10%. Se añadieron partes alícuotas de esta mezcla a intervalos de 1 min a una solución agitada de ferricianuro de potasio (2,29 g, 6,9 mmoles, 4 equiv.) en agua (5 ml) a 80-90°C. La mezcla de reacción se calentó durante 0,5 horas más y se dejó enfriar luego. El precipitado se recogió por filtración a vacío y se lavó con agua, se purificó en columna flash (hexano:acetato de etilo = 4:1) para dar 130 mg (26%) del producto. ¹HNMR(300MHz, acetona-d₆) δ: 8,45(m, 4H), 8,07(d, J=8,5Hz, 1H, H-4), 7,69(s, 1H, H-7), 7,22(d, J=9,0Hz, 1H, H-5), 3,90(s, 3H, MeO).

35

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

Una mezcla de 6-metoxi-2-(4-nitrofenil)benzotiazoles (22 mg, 0,077 mmoles) y cloruro de estaño (II) Tomograph (32 mg, 0,45 mmoles) en etanol a ebullición se agitó bajo nitrógeno durante 4 horas. Se evaporó el etanol y el residuo se disolvió en acetato de etilo (10 ml), se lavó con hidróxido de sodio 1 N (2 ml) y agua (5 ml), y se secó sobre MgSO₄. La evaporación del disolvente proporcionó 19 mg (97%) del producto como un sólido amarillo.

40

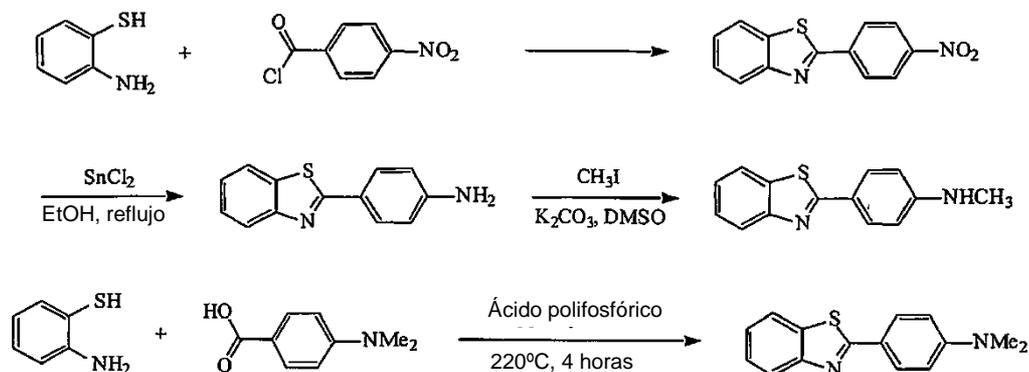
Preparación de 6-metoxi-2-(4-metilaminofenil)benzotiazol y 6-metoxi-2-(4-dimetilaminofenil)-benzotiazol

Una mezcla de 6-metoxi-2-(4-aminofenil)benzotiazol (15 mg, 0,059 mmoles), Mel (8,3 mg, 0,060 mmoles) y K_2CO_3 (100 mg, 0,72 mmoles) en DMSO (anhidro, 0,5 ml) se calentó a 100°C durante 16 horas. La mezcla de reacción se purificó por TLC en fase inversa (MeOH:H₂O = 7:1) para dar 2,0 mg (13,3%) de 6-metoxi-2-(4-metilaminofenil)benzotiazol y 6 mg (40%) de 6-metoxi-2-(4-dimetilaminofenil)benzotiazol. ¹HNMR de 6-metoxi-2-(4-metilaminofenil)benzotiazol (300MHz, Acetona-d₆) δ: 7,85(d, J=8,7Hz, 2H, H-2' 6'), 7,75(dd, J=8,8Hz, J=1,3Hz, 1H, H-4), 7,49(d, J=2,4Hz, 1H, H-7), 7,01(dd, J=8,8Hz, J=2,4Hz, H-5), 6,78(d, J=7,6Hz, 2H, H-3' 5'), 3,84(s, 3H, MeO), 2,91(s, 3H, Nme), ¹HNMR de 6-metoxi-2-(4-dimetilaminofenil)benzotiazol (300MHz, acetona-d₆) δ: 7,85(d, J=8,7Hz, 2H, H-2' 6'), 7,75(dd, J=8,8Hz, J=1,3Hz, 1H, H-4), 7,49(d, J=2,4Hz, 1H, H-7), 7,01 (dd, J=8,8Hz, J=2,4Hz, H-5), 6,78(d, J=7,6Hz, 2H, H-3' 5'), 3,84(s, 3H, MeO), 3,01 (s, 6H, Nme₂).

Siguiendo la misma estrategia arriba indicada, pueden sintetizarse los otros derivados de 2-(4'-aminofenil)-benzotiazol sustituyendo el derivado de anilina sustituido apropiado (v.g., 2-, 3-, ó 4-metilaminilina) y el derivado de cloruro de 4-nitro-benzoilo apropiado (v.g. cloruro de 2- ó 3-metil-4-nitro-benzoilo).

Ejemplo 10: Síntesis de derivados de BTA sin sustitución

15 Ruta 2: Ejemplo de la síntesis de compuestos BTA-0, -1, -2, que son representativos del grupo de compuestos de tioflavina (Garmaise et al., "Anthelmintic Quaternary Salts. III. Benzothiazolium Salts", J. Med. Chem. 12:30-36 (1969) (los números de referencia de los compuestos cuyos nombres aparecen más adelante se refieren al esquema de síntesis representado):

**20 Preparación de 2-(4-nitrofenil)benzotiazol**

Se añadió gota a gota una solución de cloruro de 4-nitrobenzoilo (1,49 g, 8,0 mmoles) en benceno (anhidro, 10 ml) a 2-aminotiofenol (1,0 g, 8,0 mmoles en 10 ml de benceno) a la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 16 horas. Se extinguió la reacción con agua (20 ml). La capa acuosa se separó y se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 ml). Las capas orgánicas reunidas se secaron y se evaporaron. El producto bruto se purificó en una columna flash (hexano:acetato de etilo = 85:15) para dar 1,5 g (73,2%) de producto como un sólido amarillo claro.

Preparación de 2-(4-aminofenil)benzotiazol

Una mezcla de 2-(4-nitrofenil)benzotiazol (105 mg, 0,40 mmoles) y cloruro de estaño (II) Tomograph (205 mg, 0,91 mmoles) en etanol (20 ml) se calentó a reflujo bajo N₂ durante 4 horas. Después de eliminar el etanol por evaporación a vacío, se disolvió el residuo en acetato de etilo (20 ml), y se lavó con solución de NaOH (1 N, 3 x 20 ml) y agua (3 x 20 ml), se secó y se evaporó a sequedad para dar 102 mg (97%) del producto.

Preparación de 2-(4-metilaminofenil)benzotiazol y 2-(4-dimetilaminofenil)benzotiazol

Una mezcla de 2-(4-aminofenil)benzotiazol (15 mg, 0,066 mmoles), Mel (9,4 mg, 0,066 mg) y K_2CO_3 (135 mg, 0,81 mmoles) en DMSO (anhidro, 0,5 ml) se calentó a 100°C durante 16 horas. La mezcla de reacción se purificó por TLC de fase inversa (MeOH:H₂O = 6:1) para dar 1,5 mg (10%) de 2-(4-metilaminofenil)benzotiazol y 2,5 mg (16,7%) de 2-(4-dimetilaminofenil)benzotiazol.

Preparación de 2-(4-dimetilaminofenil)benzotiazol

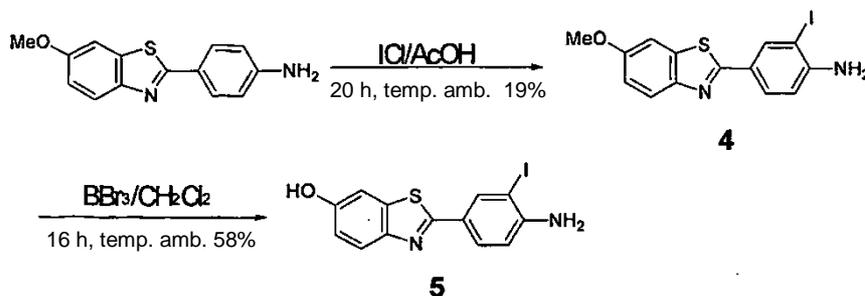
La mezcla de 2-aminotiofenol (0,5 g, 4,0 mmoles), ácido 4-dimetilaminobenzoico (0,66 g, 4,0 mmoles) y PPA (10 g) se calentó a 220°C durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfrió a la temperatura ambiente y se vertió en una solución de carbonato de potasio al 10% (~ 400 ml). El residuo se recogió por filtración a vacío para dar 964 mg del producto, que tenía una pureza aproximada de 90% basada en el análisis ¹HNMR. La recristalización de 100 mg en MeOH dio 80 mg del producto puro. ¹HNMR(300MHz, acetona-d₆) δ: 7,12(d, J=7,7Hz, 1H, H-7), 7,01(d, J=9,0Hz, 1H,

H-4), 6,98(d, J=9,1Hz, 2H, H-2',6'), 6,56(t, J=7,8Hz, J=7,3Hz, 1H, H-5 o H-6), 5,92(d, J=8,9Hz, 1H, H-3',5'), 2,50(s, 6H, Nme₂).

5 Siguiendo la misma estrategia indicada anteriormente, pueden sintetizarse los otros derivados de 2-(4'-aminofenil)-benzotiazol por sustitución del derivado de cloruro de 4-nitro-benzoílo apropiado (v.g., cloruro de 2- ó 3-metil-4-nitro-benzoílo) o el derivado de ácido 4-dimetilaminobenzoico apropiado (v.g. ácido 2- ó 3- metil-4-dimetilamino-benzoico).

Ejemplo 11. Síntesis de compuestos yodados

Ruta 3: Ejemplo de la síntesis de 2-(3'-yodo-4'-aminofenil)-6-hidroxibenzotiazol, que es representativo para la síntesis de otros compuestos yodados (los números de referencia de los compuestos cuyos nombres aparecen más adelante se refieren al esquema de síntesis representado).



10

Preparación de 2-(3'-yodo-4'-aminofenil)-6-metoxibenzotiazol

En una solución de 2-(4'-aminofenil)-6-metoxibenzotiazol (22 mg, 0,09 mmoles) en ácido acético glacial (2,0 ml) se inyectó solución 1 M de cloruro de yodo en CH₂Cl₂ (0,10 ml, 0,10 mmoles, 1,2 eq.) en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 16 horas. Se eliminó el ácido acético glacial a presión reducida y el residuo se disolvió en CH₂Cl₂. Después de neutralizar la solución con NaHCO₃, se separó la capa acuosa y se extrajo con CH₂Cl₂. Se combinaron las capas orgánicas y se secaron sobre MgSO₄. Después de la evaporación del disolvente, el residuo se purificó por TLC preparativa (hexanos:acetato de etilo = 6:1) para dar 2-(4'-amino-3'-yodofenil)-6-metoxibenzotiazol (25 mg, 76%) como un sólido pardo. ¹HNMR (300MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,35 (d, J=2,0 Hz, 1H), 7,87 (dd, J₁=2,0 Hz, J₂=9,0 Hz, 1H), 7,31 (d, J=2,2 Hz, 1H), 7,04 (dd, J₁=2,2 Hz, J₂=9,0 Hz, 1H), 6,76 (d, J=9,0 Hz, 1H), 3,87 (s, 3H).

15

20

Preparación de 2-(3'-yodo-4'-aminofenil)-6-hidroxibenzotiazol

En una solución de 2-(4'-amino-3'-yodofenil)-6-metoxibenzotiazol (8,0 mg, 0,02 mmoles) en CH₂Cl₂ (2,0 ml) se inyectó solución 1 M de BBr₃ en CH₂Cl₂ (0,20 ml, 0,20 mmoles) en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 18 horas. Después de extinguir la reacción con agua, la mezcla se neutralizó con NaHCO₃. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 3 ml). Las capas orgánicas se combinaron y se secaron sobre MgSO₄. El disolvente se evaporó luego a presión reducida y el residuo se purificó por TLC preparativa (hexanos:acetato de etilo = 7:3) para dar 2-(3'-yodo-4'-aminofenil)-6-hidroxibenzotiazol (4,5 mg, 58%) como un sólido pardo. ¹HNMR (300 MHz, acetona-d₆) δ (ppm): 8,69 (s, 1H), 8,34 (d, J=2,0 Hz, 1H), 7,77 (dd, J₁=2,0 Hz, J₂=8,4 Hz, 1H), 7,76 (d, J=8,8 Hz, 1H), 7,40 (d, J=2,4 Hz, 1H), 7,02 (dd, J₁=2,5 Hz, J₂=8,8 Hz, 1H), 6,94 (d, J=8,5 Hz, 1H), 5,47 (br., 2H), HRMS m/z 367,9483 (M⁺ calculado para C₁₃H₉N₂OSI 367,9480).

25

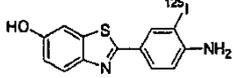
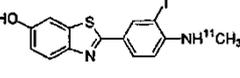
30

Ejemplos Biológicos

Ejemplo 1. Determinación de la Afinidad para Aβ y Absorción de los Derivados de Tioflavina en el Cerebro

Se realizaron estudios de fijación iniciales utilizando Aβ(1-40) sintético a fin de determinar si los cuatro compuestos representados a continuación se fijaban significativamente a sitios de depósitos de amiloide en el cerebro.

Estructuras	K _i (nM)	logP	2 min (%ID/g)	30 min (%ID/g)	Ratio 2:30 min
	8,32	3,17	9,08	3,4	2,7
	4,94	3,90	4,40	2,68	1,6

Estructuras	K _i (nM)	logP	2 min (%ID/g)	30 min (%ID/g)	Ratio 2:30 min
	11,1	1,65	5,64	0,36	15,7
	3,22	2,35	7,76	2,66	2,91

Los datos que se muestran en la Tabla 1 indican que estos compuestos exhibían afinidad relativamente alta para A β , con valores K_i < 10 nM, y penetraban fácilmente en el cerebro del ratón con valores de absorción > 0,4% ID/g*kg (o > 13% ID/g para animales de 30 g). Además, los valores de concentración de la radiactividad en el cerebro a los 30 min eran menores que 0,1% ID/g*kg, dando como resultado ratios de concentración de 2 min a 30 min > 4.

Ejemplo 2. Tinción de depósitos de amiloide en cerebro de ratón AD y Tg post-mortem

Secciones de tejido cerebral post-mortem de cerebro AD y un ratón Transgénico PS1/APP de 8 meses de edad se tiñeron con BTA-1 sin marcar. El modelo de ratón PS1/APP combina dos mutaciones de genes humanos que se sabe causan la enfermedad de Alzheimer en un ratón doblemente transgénico que deposita fibrillas de A β en placas de amiloide en el cerebro comenzando tan tempranamente como a los 3 meses de edad. Micrografías típicas de fluorescencia se muestran en la Figura 8, y la tinción de las placas de amiloide por BTA-1 en tejido de ratón post-mortem tanto AD como PS1/APP, es claramente visible. El amiloide cerebrovascular se teñía también brillantemente (Fig. 8, derecha). El otro sello neuropatológico característico del cerebro AD, las madejas neurofibrilares (NFT), se tiñen más débilmente por BTA-1 en el cerebro AD (Fig. 8, izquierda). No se han observado NFT en los modelos de ratón transgénico de deposición de amiloide.

Ejemplo 3. Marcación y detección *in vivo* de depósitos de amiloide en ratones transgénicos

Se inyectaron 3 ratones transgénicos PS1/APP de 17 meses de edad por vía intraperitoneal (ip) con una sola dosis de 10 mg/kg de BTA-1 en una solución de DMSO, propilenglicol, y PBS de pH 7,5 (v/v/v 10/45/45). Veinticuatro horas más tarde, se empleó microscopia de fluorescencia multifotónica para obtener imágenes de alta resolución en los cerebros de ratones vivos utilizando una técnica de ventana craneal. Imágenes típicas *in vivo* de BTA-1 en un ratón PS1/APP vivo se muestran en la Figura 9, y son claramente distinguibles las placas y el amiloide cerebrovascular. Los estudios de microscopia multifotónica demuestran la especificidad *in vivo* de BTA-1 para A β en los ratones transgénicos PS1/APP vivos.

Ejemplo 4. Especificidad de los Compuestos de la Invención para las placas Alzheimer sobre las madejas Alzheimer

Con objeto de abordar las contribuciones relativas de la fijación de [³H]BTA-1 a los depósitos A β y tau en la sustancia gris frontal del cerebro AD, se comparó la fijación de [³H]BTA-1 en homogeneizados de córtex entorrinal (EC), sustancia gris frontal y cerebelo de un cerebro AD típico y un cerebro de control Braak en fase II. Este cerebro de control tenía números frecuentes de NFT en el córtex entorrinal (Fig. 5A), pero carecía de placas neuríticas o difusas en cualquier área del cerebro (Fig. 11C). Los números de NFT en el EC de Cntl 04 eran similares a los números encontrados en muchos casos de AD (Fig. 11B). La fijación de [³H]BTA-1 en la región EC rica en NFT de este cerebro Cntl 04 no era mayor que la fijación de [³H]BTA-1 en el cerebelo exento de placas y NFT y la materia gris frontal de este cerebro (Figura 11, Tabla). Un examen similar de estas mismas áreas cerebrales en un cerebro Braak VI AD (Figura 11, tabla), exhibía una baja fijación en el cerebelo y EC y niveles más de 10 veces mayores en la sustancia gris frontal, en la que existen números frecuentes de placas neuríticas (Fig. 11D). La patología NFT extensa en el EC de los cerebros Cntl y AD, acoplada con la baja fijación de [³H]BTA-1 en el EC sugiere que o bien la fijación de BTA-1 a NFT observada a concentraciones 100 nM de BTA-1 no ocurre a 1,2 nM, o que, a concentraciones nanomolares bajas, la cantidad absoluta total de fijación de [³H]BTA-1 a los depósitos NFT es pequeña en comparación con la cantidad de [³H]BTA-1 fijada a depósitos A β en las placas y el amiloide cerebrovascular de la sustancia gris frontal de AD. El cerebro AD exhibía depósitos difusos de placas de amiloide en el EC (Fig. 11B) que no parecían producir una fijación importante de [³H]BTA-1. El córtex frontal tenía placas de amiloide extensas que eran a la vez compactas y difusas y estaban asociadas con niveles altos de fijación de [³H]BTA-1 (Fig. 11D y Tabla).

Ejemplo 5. Estudios de entrada en el cerebro de ratón *in vivo*

Se realizaron experimentos para evaluar la penetración en el cerebro de 2-(3-(¹²⁵I)-yodo-4'-amino-fenil)-benzotiazol-6-ol (Compuesto A), 2-(3-[¹⁸F]-fluoro-4'-metilamino-fenil)-benzotiazol-6-ol (Compuesto B), y 2-[4-(3-[¹⁸F]-fluoro-

propilamino)-fenil]benzotiazol-6-ol (Compuesto C) en ratones jóvenes de tipo salvaje que no tenían depósito alguno de amiloide en su cerebro. Este estudio refleja la entrada en el cerebro y el aclaramiento del tejido cerebral normal. Un criterio necesario para un buen agente de obtención de imágenes PET es el aclaramiento rápido de las áreas cerebrales que no contienen el sitio de fijación diana. Una medida de la velocidad de aclaramiento de la fijación inespecífica es proporcionada por la ratio de los valores de 2 minutos a 30 minutos (% ID-kg)/g.

Los estudios se realizaron en ratones hembra Swiss-Webster (23-35 g) de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Utilización de Animales de Laboratorio adoptada por el NIH y con la aprobación del Comité Institucional Local de Cuidado y Uso de Animales. Los ratones se inyectaron en una vena lateral de la cola con 0,37-3,7 MBq (10-100 μ Ci) de un Compuesto A, Compuesto B o Compuesto C de actividad específica alta ($\sim 2,0/\mu$ mol) contenido en $\leq 0,10$ ml de una solución constituida por 95% de solución salina isotónica y 5% de etanol. Los ratones se anestesiaron y se sacrificaron por extirpación cardíaca después de punción cardíaca para obtener muestras de sangre arterial a los 2 minutos o 30 minutos después de la inyección. Se extirparon rápidamente los cerebros de los ratones y se dividieron en el cerebelo y las fracciones restantes del cerebro entero (con inclusión del tallo cerebral). Las muestras de cerebro se sometieron a conteo en un contador de pozo gamma, y los conteos se corrigieron por desintegración para el tiempo de inyección con relación a estándares ^{125}I o ^{18}F preparados a partir de la solución de inyección para determinar el porcentaje de dosis inyectada (% ID) en las muestras. Las muestras de cerebro se pesaron para determinar el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g), y esta cantidad se multiplicó por el peso corporal total (en kg) para determinar la concentración de radiactividad normalizada para el peso corporal [(% ID-kg/g) de cada muestra de tejido. Compuesto A, Compuesto B y Compuesto C exhibían entrada relativamente alta en el cerebro en los momentos iniciales y un aclaramiento rápido en los momentos posteriores. Las concentraciones de radiactividad (% ID-kg/g) a los 2 minutos y los 30 minutos y las ratios de 2 minutos a 30 minutos se presentan a continuación en la Tabla 2.

TABLA 2

	Conc. de Radiactividad	Conc. de Radiactividad	2 min./30 min.
	A los 2 min. (%ID-kg/g)	A los 30 min. (%ID-kg/g)	Ratio
Compuesto A	0,141	0,009	16
Compuesto B	0,29	0,030	10
Compuesto C	0,17	0,011	16

25 Ejemplo 7. Estudios de imagen en babuinos *in vivo*

Se realizaron estudios de imagen PET en babuinos (*Papio anubis*) adultos (peso 15-35 kg, edades 6-12 años) con el Compuesto B y el Compuesto C de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Utilización de Animales de Laboratorio, adoptada por el NIH y con la aprobación del Comité Institucional Local de Cuidado y Uso de Animales. Antes de la producción de las imágenes PET, los animales se sedaron inicialmente con quetamina (10-15 mg/kg, i.m.), se les administró atropina (0,5 mg, i.m.) para controlar la salivación y el ritmo cardíaco, y se intubaron. Los babuinos se mantuvieron subsiguientemente sobre un ventilador con anestesia de isoflurano (0,5-1,25%) y aire medicinado. Se administró bromuro de pancuronio en caso necesario (por vía intravenosa, hasta 0,06 mg/kg/hora, titulado hasta efecto) para mantener los animales inmovilizados durante el estudio. Se insertó un catéter en la arteria femoral para monitorizar la presión sanguínea y para tomar muestras de sangre arterial, y se colocó un catéter intravenoso en una vena antecubital para inyección de radiotrazador y para administrar fluidos en la medida necesaria a lo largo del curso del estudio de obtención de imágenes. La presión sanguínea, los ritmos cardíaco y respiratorio, y los niveles de saturación de CO_2 espirado y oxígeno se monitorizaron continuamente durante los estudios PET. La temperatura corporal rectal en la línea base ($\sim 37^\circ\text{C}$) se mantuvo utilizando una manta calefactora (Gaymar, Orchard Park, NY) y regulador de temperatura (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH). Antes del escaneo, se fijó la cabeza de los babuinos de tal modo que los planos de imagen se adquirieran aproximadamente paralelos a la línea del meato orbital.

Los datos PET se adquirieron utilizando un escáner ECAT HR+PET (CTI PET Systems, Knoxville, TN) en modo de obtención de imágenes 3D (63 cortes paralelas; 15,2 cm de campo de visión axial; 4,1 mm de resolución de anchura completa semimáxima en el plano). Se utilizó una Neuro-Inserción (CTI PET Systems) para reducir la contribución de eventos de fotones dispersos. Después que los babuinos se posicionaron en el escáner PET, se obtuvo un escaneo de transmisión con ventana (10-15 minutos) para corrección de la atenuación de los datos de emisión PET utilizando varillas rotativas $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$. El Compuesto B y el Compuesto C se administraron por vía intravenosa durante 20 segundos, y se adquirieron una serie dinámica de escaneos PET a lo largo de 90 minutos utilizando 26 marcos de duración creciente (6 x 20 segundos, 4 x 30 segundos, 6 x 60 segundos, 4 x 5 minutos; 6 x 10 minutos). Se inyectaron aproximadamente 185 MBq (~ 5 mCi) de un Compuesto B o Compuesto C de actividad específica alta ($> 14,8$ GBq/ μ mol) en un babuino. En otros estudios, se inyectaron 148-296 MBq (4-8 mCi) de un radiotrazador PET de referencia de actividad específica alta ($> 18,5$ GBq/ μ mol), que incluía [^{11}C] (+)-McN5652, [carbonil-

^{11}C]WAY100635, o ^{18}F] altanserina. Los datos PET se reconstruyeron utilizando un filtro Hanning (punto de corte Nyquist) y se corrigieron por desintegración, atenuación de fotones, y dispersión.

Se realizó un escaneo MRI para cada babuino utilizando un escáner 1.5T GE Signa (GE Medical Systems, Milwaukee, WI) equipado con un serpentín de cabeza estándar. Se adquirió una secuencia volumétrica MR en gradiente Spoiled de recuerdo (SPGR) con parámetros para contraste alto entre materia gris, materia blanca, y líquido cefalorraquídeo (CSF) en el plano coronal (TE = 5, TR = 24, ángulo de incidencia = 40° , grosor de corte = 1,5 mm, NEX = 2, campo de visión 12 cm, tamaño de vóxel = $0,94 \times 1,25 \times 1,5$ mm). Cada imagen MR individual de babuino se registró conjuntamente con los datos PET utilizando el algoritmo de registro automático de imágenes (AIR) para alineamiento de imágenes en modalidad cruzada y nuevo corte. Los 16 marcos individuales (0-9 minutos después de la inyección) de las imágenes dinámicas PET se sumaron para dar imágenes constituidas por un solo marco. Antes del registro conjunto, tanto las imágenes MR como las imágenes PET sumadas se editaron utilizando el paquete de software ANALYZE (Mayo Clinic, Rochester, MN) para eliminar los tejidos extracerebrales que podrían confundir posiblemente el proceso de registro conjunto. Las imágenes MR editadas se registraron luego conjuntamente con la imagen PET sumada y se cortaron de nuevo para proporcionar imágenes MR en la misma orientación espacial y resolución que las imágenes PET sumadas. Se ha demostrado que el registro conjunto de las series de datos MR y PET en el babuino es una aplicación fiable y potente del método AIR.

Se definieron las regiones de interés (ROIs) en la imagen MR registrada conjuntamente y se aplicaron a las series de datos dinámicas PET para determinar los datos regionales tiempo-actividad para la materia blanca (materia blanca cerebral posterior al córtex prefrontal y anterior a los ventrículos laterales), el córtex temporal, el cerebelo (córtex cerebral), y otras áreas del cerebro (datos no presentados). Los datos tiempo-actividad PET se convirtieron en unidades de microcuries por mililitro utilizando un factor de calibración basado en modelo y se normalizaron subsiguientemente para la dosis inyectada y la masa corporal del animal ((% ID-kg)/g).

La Figura 15 muestra una curva tiempo-actividad (TAC) PET representativa de radiactividad en 3 regiones cerebrales de un babuino después de la inyección intravenosa de Compuesto B. Las TACs indican una penetración excelente en el cerebro de la radiactividad en los momentos iniciales (aproximadamente $0,40\% \text{ID-kg/g}$, razonablemente de acuerdo con la penetración en el cerebro del Compuesto B en los ratones a los 2 minutos de la inyección) en la totalidad de las 3 regiones y aclaramiento relativamente rápido de la radiactividad regional desde 0 a 90 minutos después de la inyección en el cerebro de este babuino de control. Las regiones del cerebro que contenían niveles más altos de materia blanca demostraban concentraciones algo mayores (~ 30%) de radiactividad a los 90 minutos que las regiones que estaban dominadas por materia gris, tales como el córtex temporal. La concentración de radiactividad en el córtex de los babuinos era prácticamente idéntica a la existente en el córtex cerebelar en todos los momentos. La velocidad de aclaramiento de la radiactividad era considerablemente más lenta para el cerebro del babuino que para el cerebro del ratón, exhibiendo el Compuesto B un tiempo medio de aclaramiento de aproximadamente 17 minutos de la materia gris del cerebro del babuino. El Compuesto radiotrazador B exhibía una concentración de radiactividad en el cerebro desde el principio al final en el cerebro del babuino de aproximadamente 4, lo que reivindicaba que sólo aproximadamente el 25% de la radiactividad máxima pico se mantenía en el cerebro en momentos posteriores. Estos resultados eran consistentes con la ausencia esperada de placas de amiloide en los cerebros de estos animales de control e indicaban que se retenía muy poca actividad en el cerebro de los babuinos normales. La comparación del comportamiento *in vivo* del Compuesto B en el cerebro del babuino con la de la entrada y el aclaramiento de otros radioligandos PET satisfactorios en una región de referencia del cerebro desprovista de sitios de fijación específica (es decir, el cerebelo) fue útil.

La Figura 16 compara las TACs cerebelares en los babuinos de [carbonil- ^{11}C]WAY100635, [^{11}C](+)-McN5652, [^{18}F]altanserina y Compuesto B. Las velocidades relativamente rápidas de aclaramiento de la fijación inespecífica [carbonil- ^{11}C]WAY100635 y [^{18}F]altanserina son importantes para el éxito de estos radioligandos PET en relación con la obtención de imágenes de los sistemas receptores de serotonina 5-HT_{1A} y serotonina 5-HT_{2A}. En contraste, el aclaramiento relativamente lento *in vivo* de [^{11}C](+)-McN5652 ha limitado la utilidad de este radioligando para obtención de imágenes del sistema transportador de serotonina. Las propiedades de aclaramiento del cerebro del Compuesto B indicaban que la velocidad relativamente rápida de aclaramiento inespecífico de este radiotrazador ($t_{1/2} = 17$ minutos) era similar a la de otros agentes de obtención de imágenes de neuroreceptores PET útiles.

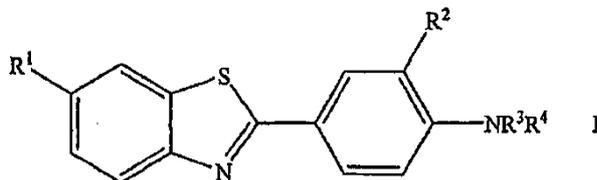
La Figura 17 muestra una TAC PET representativa de radiactividad en 3 regiones cerebrales de un babuino después de la inyección intravenosa del Compuesto C. Las TACs indican una concentración excelente en el cerebro de la radiactividad en los momentos iniciales (aproximadamente $0,22\% \text{ID-kg/g}$, en concordancia satisfactoria con la penetración en el cerebro de Compuesto C en los ratones a los 2 minutos de la inyección) en las 3 regiones y aclaramiento relativamente rápido de la radiactividad regional de los 0 a 90 minutos después de la inyección en el cerebro de este babuino de control. Las regiones del cerebro que contenían niveles más altos de materia blanca demostraban concentraciones ligeramente mayores (< 10%) de radiactividad a los 90 minutos que las regiones en las que predominaba materia gris, tales como el córtex temporal. La concentración de radiactividad en el córtex de los babuinos era prácticamente idéntica a la existente en el córtex cerebelar en todos los momentos. La velocidad de aclaramiento de la radiactividad era considerablemente más lenta para el cerebro de babuino que para el cerebro de ratón, exhibiendo el Compuesto C un semi-tiempo de aclaramiento de aproximadamente 10 minutos de la materia gris del cerebro de babuino. El compuesto radiotrazador C exhibía una concentración de radiactividad en el cerebro

5 temprana a tardía en el cerebro de babuino de aproximadamente 6, lo que indicaba que sólo aproximadamente el 15% de la radiactividad máxima pico permanecía en el cerebro en momentos posteriores. Estos resultados eran consistentes con la ausencia esperada de placas amiloides en los cerebros de estos animales de control, e indicaban que se retenía muy poca actividad en el cerebro del babuino normal. La comparación del comportamiento in vivo del Compuesto C en el cerebro de babuino con el de la entrada y el aclaramiento de otros radioligandos eficaces de PET en una región cerebral de referencia desprovista de sitios de fijación específicos (es decir, el cerebelo) fue útil.

10 La Figura 18 compara las TACs cerebelares en babuinos de [carbonil-¹¹C]WAY100635, [¹¹C](+)-McN5652, [¹⁸F]altanserina y Compuesto C. Las velocidades relativamente rápidas de aclaramiento de la fijación inespecífica de [carbonil-¹¹C]WAY100635 y [¹⁸F]altanserina son importantes para el éxito de estos radioligandos PET para la obtención de imágenes de los sistemas receptores de serotonina 5-HT_{1A} y serotonina 5-HT_{2A}. En contraste, el aclaramiento in vivo relativamente lento de [¹¹C](+)-McN5652 ha limitado la utilidad de este radioligando para la obtención de imágenes del sistema transportador de serotonina. Las propiedades de aclaramiento del cerebro del Compuesto C indicaban que la velocidad relativamente rápida de aclaramiento inespecífico de este radiotrazador
15 ($t_{1/2} = 10$ minutos) era similar a la de otros agentes de obtención de imágenes de neuroreceptores de PET útiles.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I

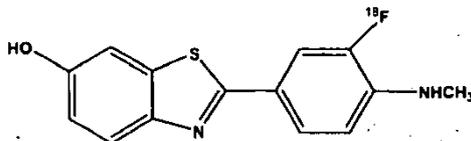


- 5 o una sal, hidrato, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable del MISMO, en donde:
 R¹ es hidrógeno, -OH, -NO₂, -CN, -COOR, -OCH₂OR, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ alcoxi o halo, en donde uno o más de los átomos de R¹ es opcionalmente un átomo radiomarcado;
 R es C₁-C₆ alquilo, en donde uno o más de los átomos de carbono es opcionalmente un átomo radiomarcado;
- 10 R² es un radiofluoro;
 R³ es hidrógeno, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo o C₂-C₆ alquinilo; y
 R⁴ es hidrógeno, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo o C₂-C₆ alquinilo.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde:

- 15 R¹ es -OH o C₁-C₆ alcoxi;
 R² es ¹⁸F; y
 R³ y R⁴ son independientemente hidrógeno o C₁-C₆ alquilo.

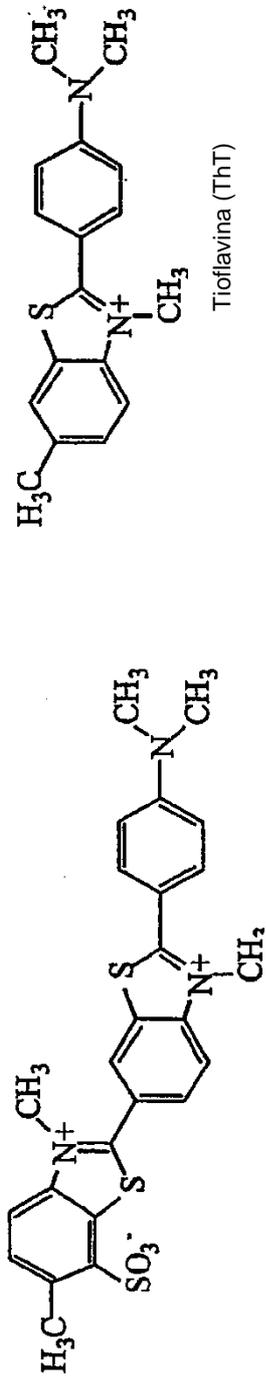
3. El compuesto de la reivindicación 2, que tiene la estructura siguiente:



4. Una composición farmacéutica que comprende
 20 (i) una cantidad eficaz de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y
 (ii) un portador farmacéuticamente aceptable.

5. Uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para la preparación de una composición para uso en la detección de depósitos de amiloide *in vivo* en un mamífero.

FIG. 1



Estructura Propuesta de un Componente Principal de Thioflavina S (ThS)

FIG. 2

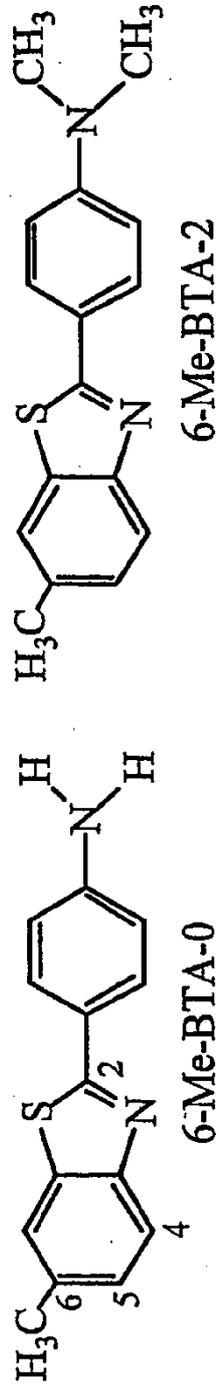


FIG. 3

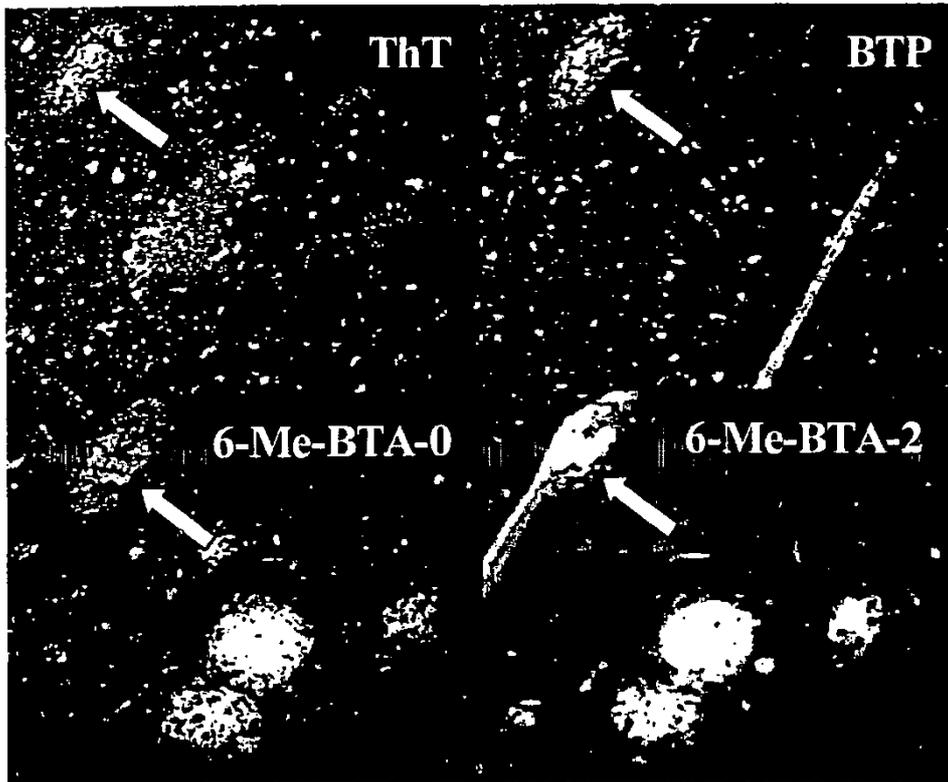


FIG. 4

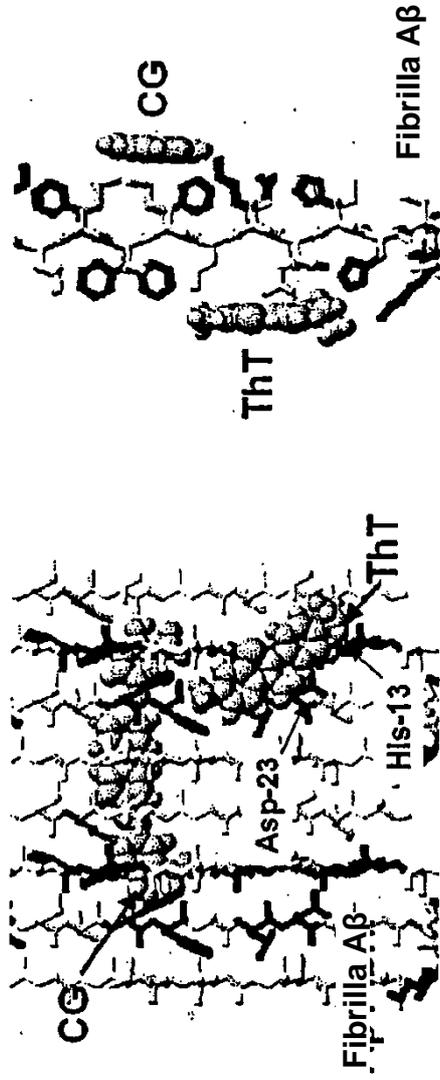
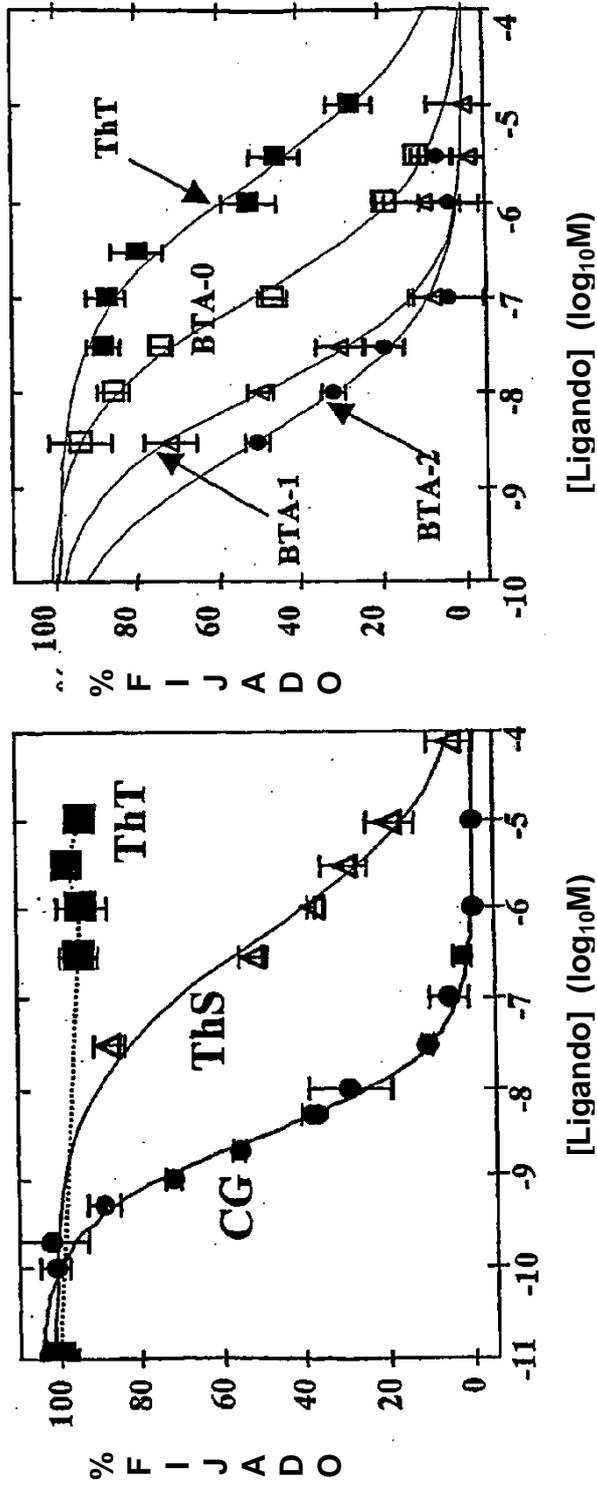


FIG. 5



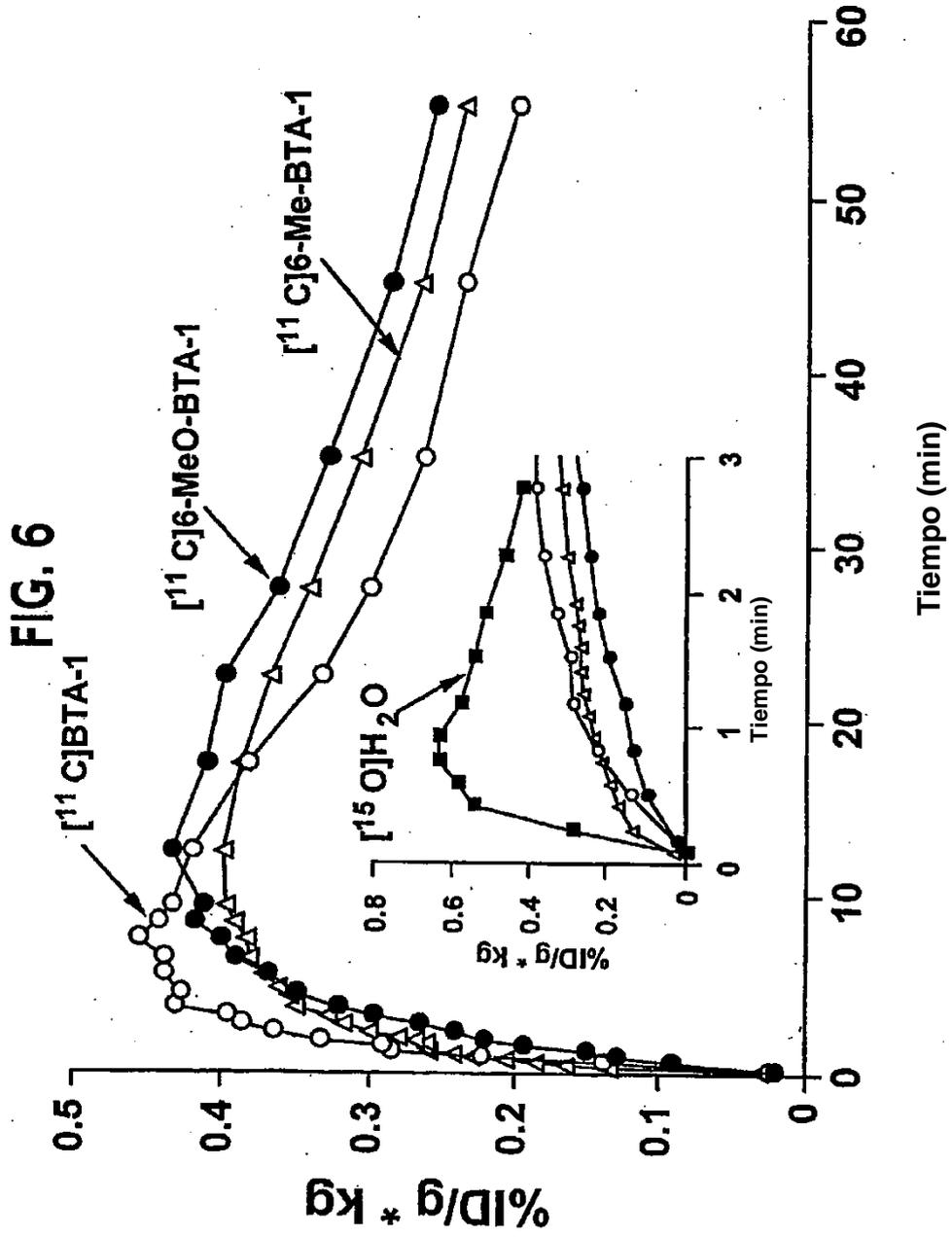


FIG. 7

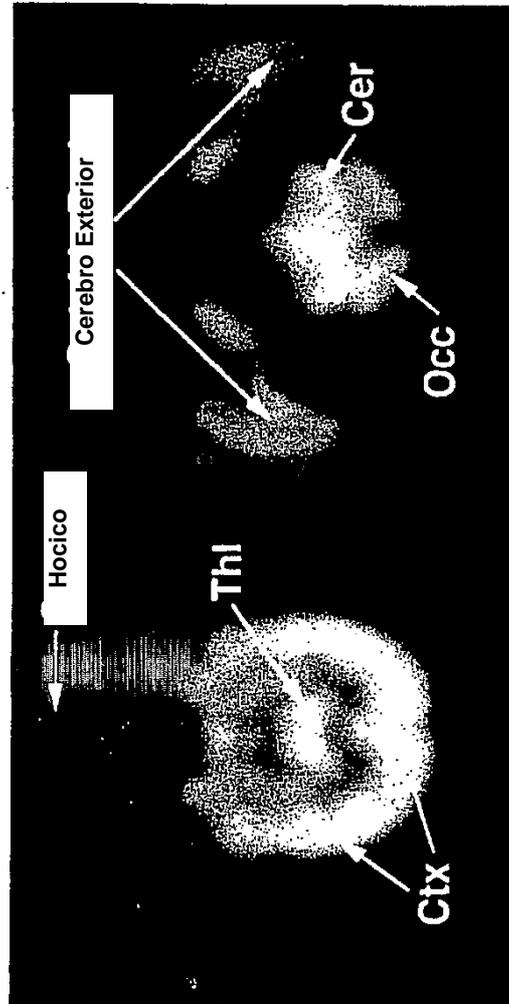


FIG. 8

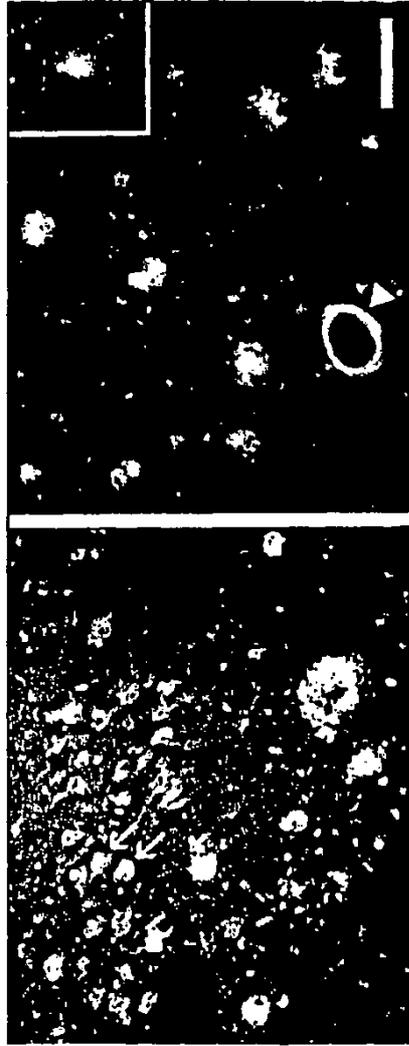


FIG. 9

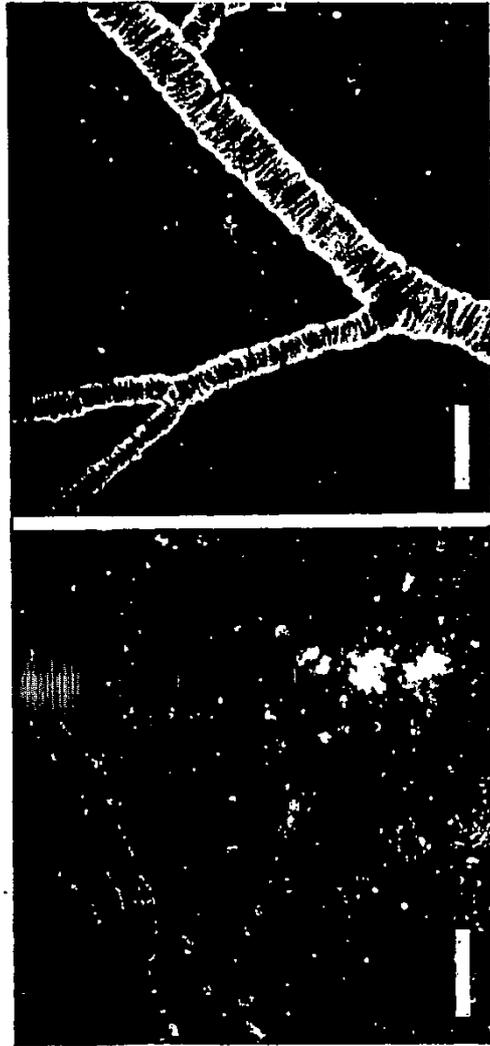


Figura 10

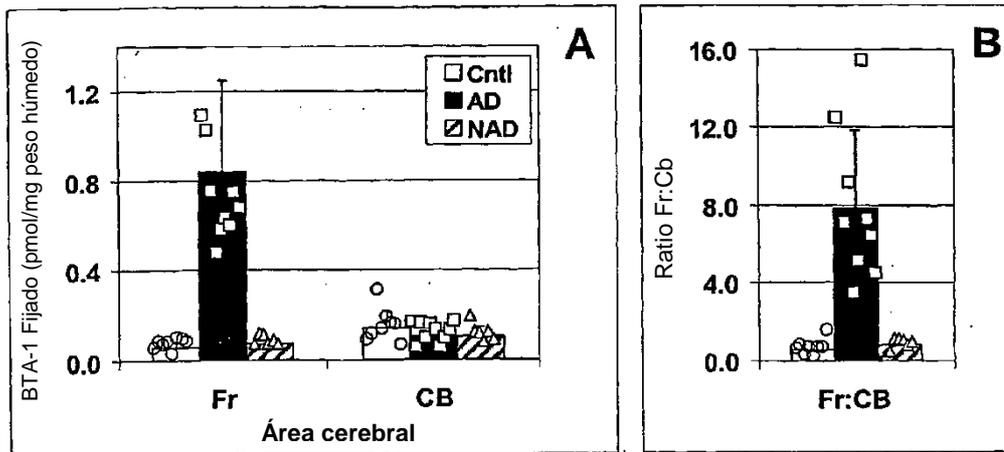


Figura 11

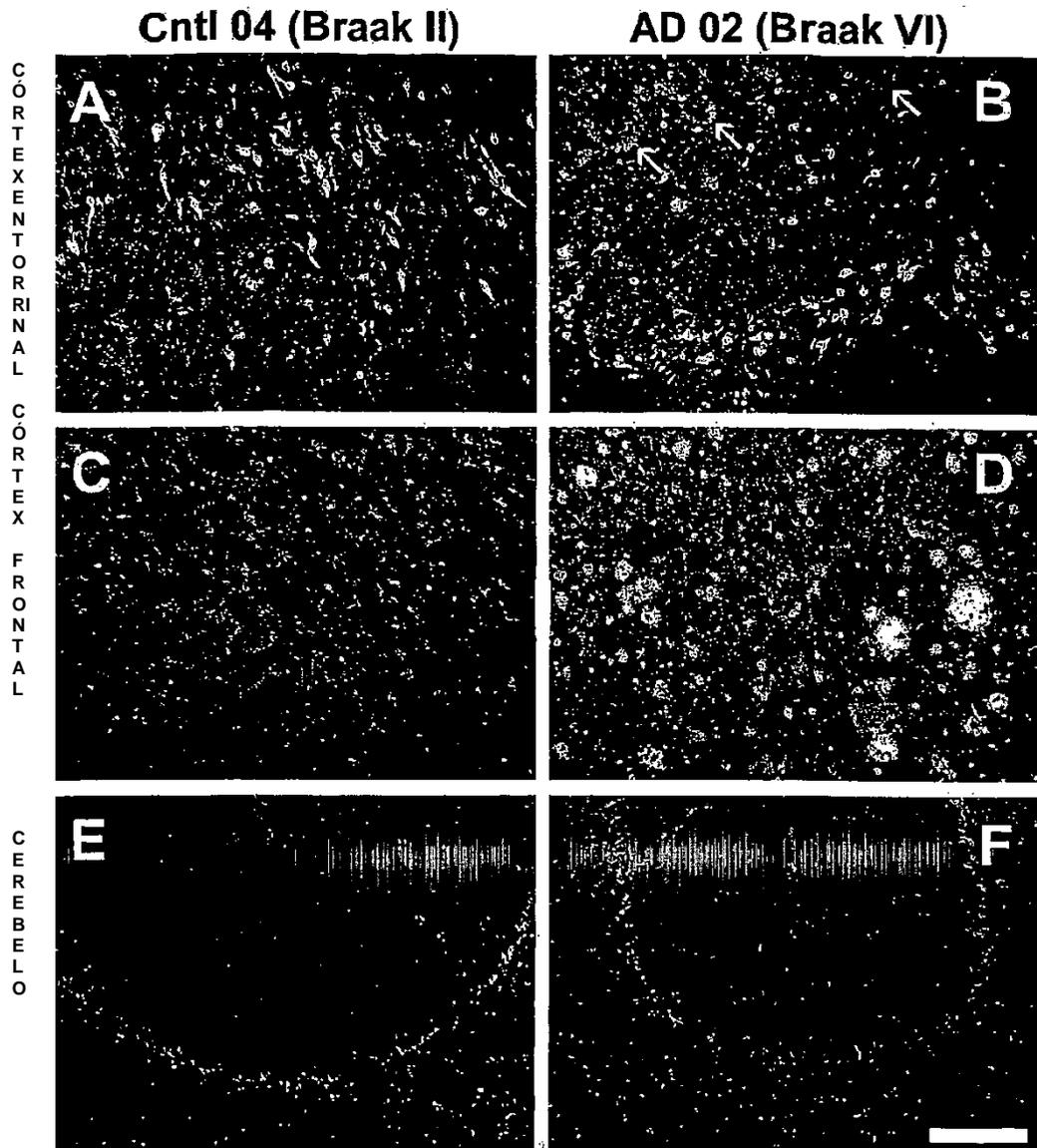


Figura 12

Fijación de [³H]BTA-1 a Áreas Especificadas de un Cerebro Braak II de Control (Cntl 04) y un Cerebro Braak VI AD (AD 02)

Área Cerebral	Pmol BTA-1/mg peso húmedo (media ± SD)		Valor p**
	Cntl 04	AD 02	
EC*	0,078 ± 0,006	0,082 ± 0,008	0,489
Fr*	0,093 ± 0,004	0,887 ± 0,011	0,00001
Cb*	0,078 ± 0,0001	0,043 ± 0,004	0,005

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

** Comparación del test t de Student de los valores del control y AD.

Figura 13

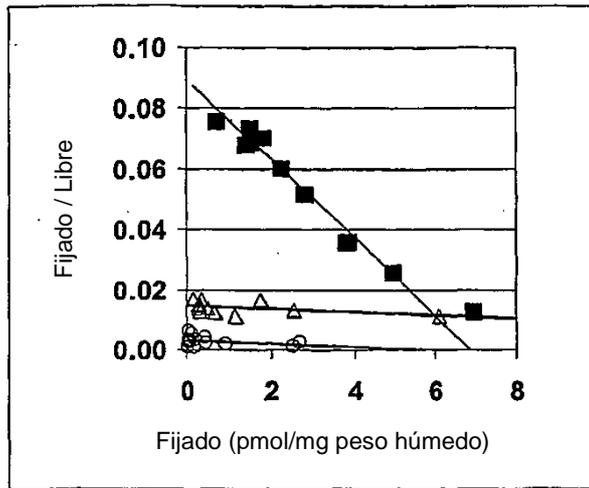
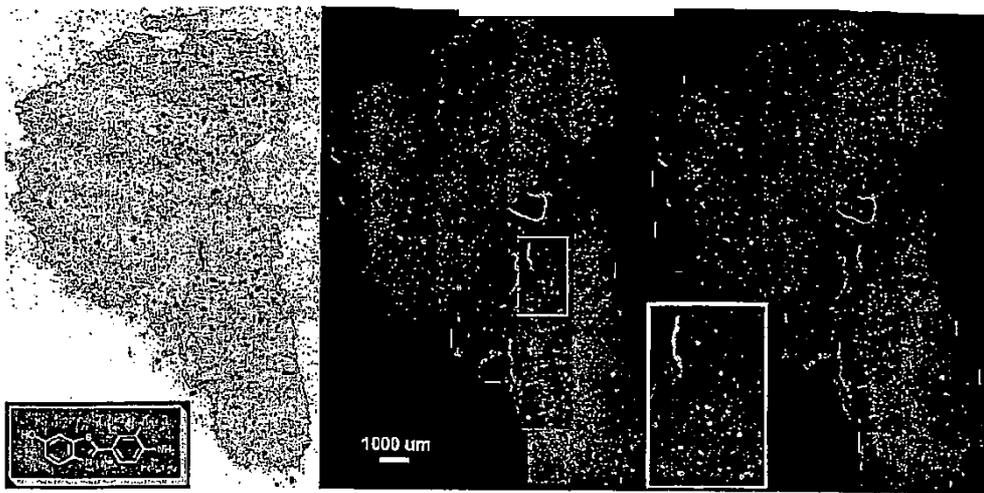


Figura 14



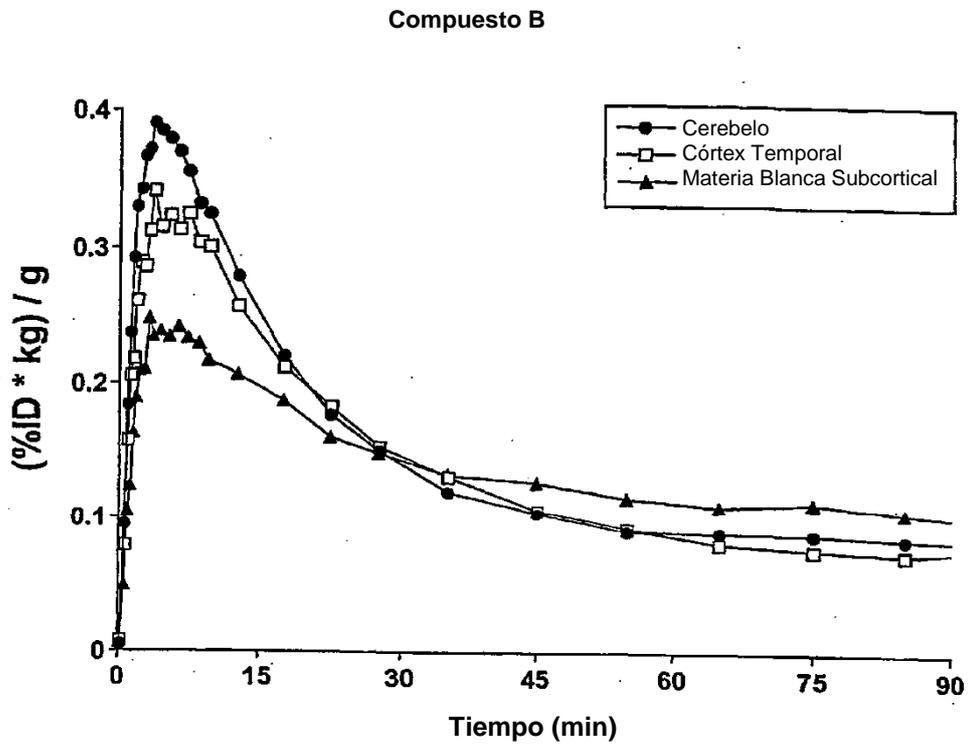


FIGURA 15

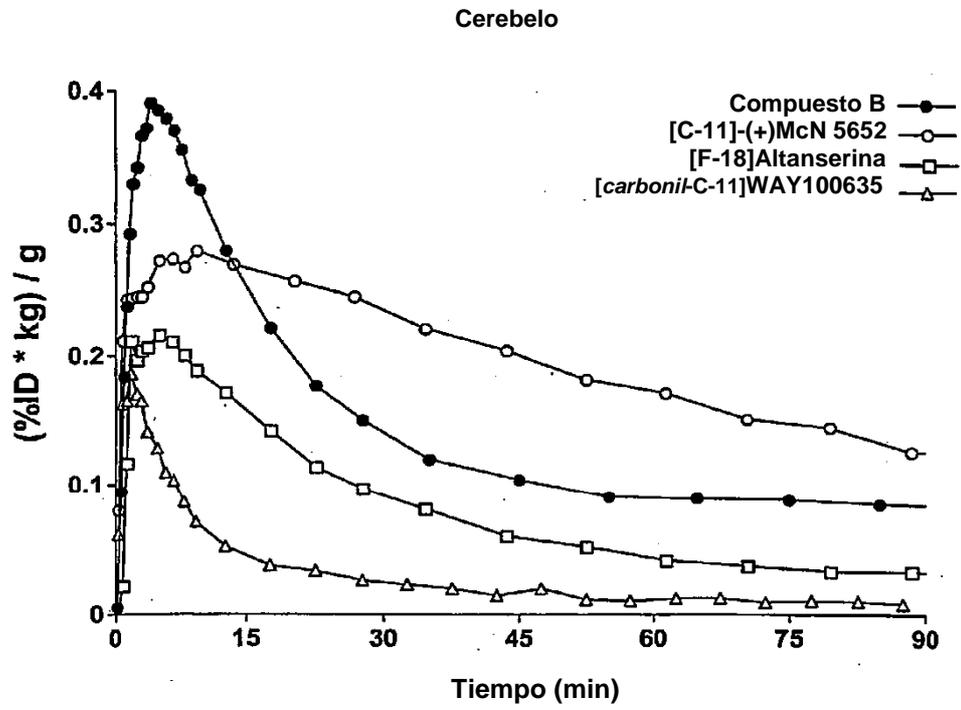


FIGURA 16

Compuesto C

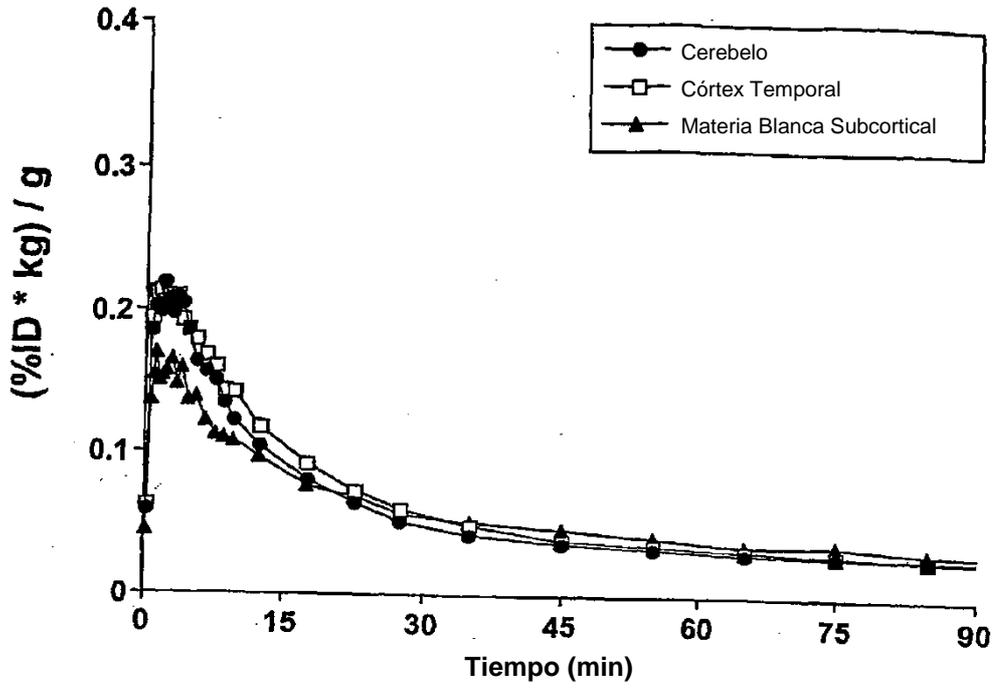


FIGURA 17

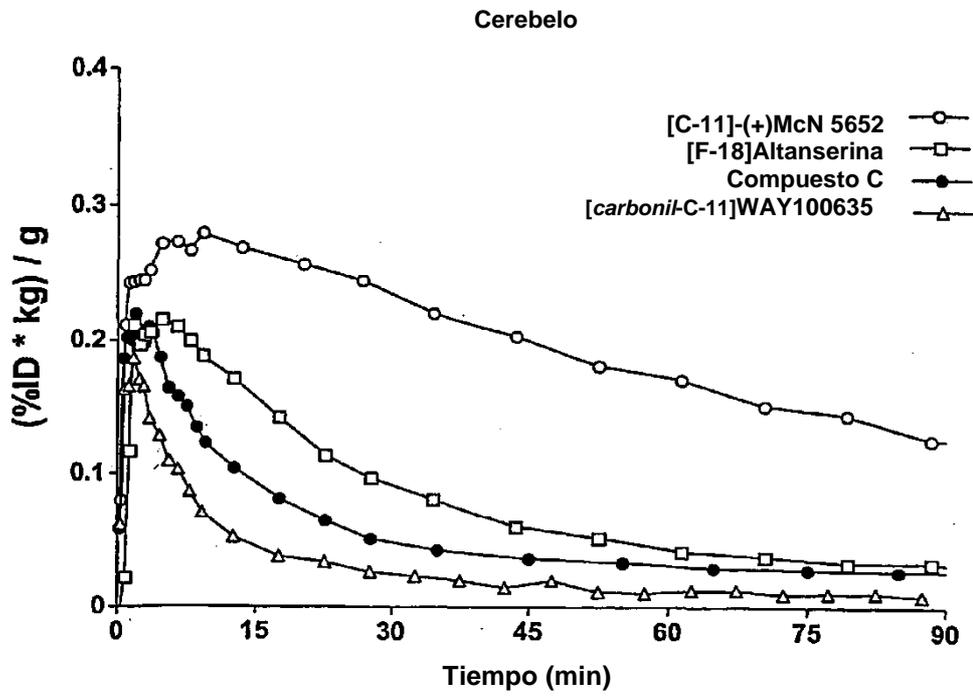


FIGURA 18