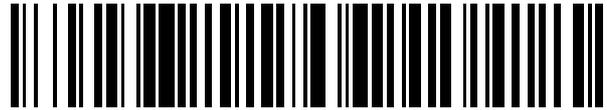


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 963**

51 Int. Cl.:

A61K 51/04 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2005 E 05787557 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013 EP 1771208**

54 Título: **Uso de derivados de tioflavina radiomarcados en formación de imágenes de amiloide para evaluación de las terapias antiamiloides**

30 Prioridad:

02.07.2004 US 584487 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.11.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KLUNK, WILLIAM E. y
MATHIS, CHESTER A., JR**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 427 963 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

Uso de derivados de tioflavina radiomarcados en formación de imágenes de amiloide para evaluación de las terapias anti-amiloide

5

ANTECEDENTES

La amiloidosis es un grupo diverso de procesos de enfermedad caracterizados por depósitos de tejido extracelular, en uno o muchos órganos, de materiales proteínicos que se denominan genéricamente amiloide. El amiloide puede distinguirse macroscópicamente por una reacción de tinción con yodo similar a la del almidón (de donde se deriva el término amiloide), microscópicamente por su distribución extracelular y sus propiedades tintóreas y ópticas cuando se tiñe con rojo Congo, así como por su estructura de fibrillas proteínicas como se muestra por microscopía electrónica y cristalografía de rayos X (véase Tabla 1). Enfermedades de amiloidosis ilustrativas son Enfermedad de Alzheimer ("AD"), Síndrome de Down, Diabetes Mellitus Tipo 2, y Deterioro Cognitivo Moderado (MCI)

10

15

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. 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 biopsia peligrosa del cerebro, el momento de su aparición se desconoce. La prevalencia de AD aumenta con la edad, alcanzando las estimaciones de la población afectada proporciones tan altas como 40-50% para edades de 85-90. Evans et al., *JAMA* 262:2551 (1989); Katzman, *Neurology* 43:13 (1993).

20

Neuropatológicamente, AD 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 rodajas post-mortem de tejido cerebral de víctimas de AD exhiben la presencia de amiloide en la forma de núcleos proteínicos extracelulares de placas neuríticas que son características de AD. Los núcleos de amiloide de estas placas neuríticas están compuestos de una proteína denominada el amiloide β ($A\beta$) que está dispuesta en una configuración laminar constituida predominantemente por hojas plegadas beta.

25

Se cree que AD aflige a cerca de 4 millones de americanos y quizás 20-30 millones de personas en todo el mundo. La AD está reconocida como un problema importante de salud pública en las naciones desarrolladas. Varias dianas terapéuticas han surgido de la elucidación creciente de la base molecular de AD. Por ejemplo, han sido aprobados 4 inhibidores de colinesterasa para el tratamiento sintomático de los pacientes con AD - tacrina (Cognex, Warner-Lambert, Morris Plains, New Jersey); donepezil (Aricept, Eisai, Inc., Teaneck, New Jersey, y Pfizer, Inc., Nueva York, Nueva York); rivastigmina (Exelon, Novartis, Basilea, Suiza); y galantamina (Reminyl, Janssen, Titusville, New Jersey). Nuevas terapias AD potenciales que están siendo desarrolladas actualmente implican inmunoterapia, inhibidores de secretasas o fármacos antiinflamatorios. Sin embargo, hasta la fecha, no está disponible fármaco alguno que haya demostrado modificar el curso del deterioro cognitivo.

35

NORDBERG A.: INTERNATIONAL PSYCHOGERIATRICS, vol. 15, No. 3, 2003, páginas 223-237, da a conocer estudios con formación funcional de imágenes utilizando tomografía de emisión de positrones (PET) y pruebas de imagen de resonancia magnética que revelan que el proceso de la enfermedad puede detectarse cuando se manifiestan muy tempranamente síntomas subjetivos de AD.

40

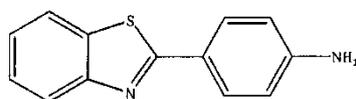
Un obstáculo importante para el desarrollo de terapias anti-amiloide se ilustra por la cita siguiente de (Hock, C. et al., 2003, *Neuron*, 38: 547-554), dirigida al uso de inmunoterapia como terapia anti-amiloide: "no sabemos si la carga de $A\beta$ -amiloide en el cerebro se redujo en los pacientes de nuestro estudio; serán precisas técnicas de formación de imágenes *in vivo* para responder a esta cuestión." La posibilidad de cuantificar la carga de amiloide antes del tratamiento y seguir luego los efectos del tratamiento es crítica para el desarrollo eficiente de esta clase de fármacos. La presente invención emplea pruebas de imagen de amiloide como marcador sustitutivo de la eficacia para las terapias anti-amiloide.

50

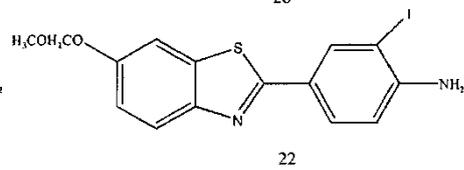
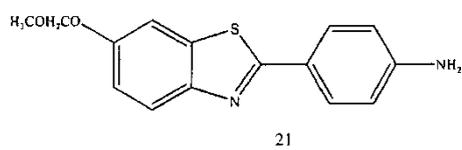
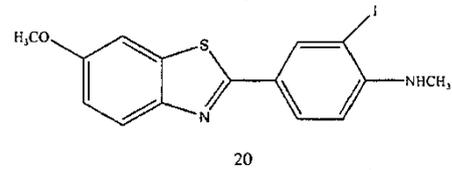
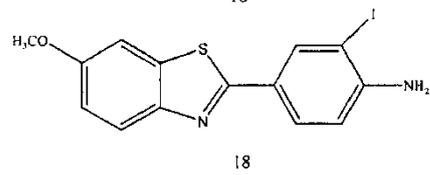
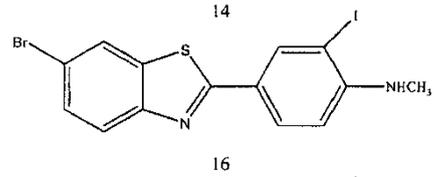
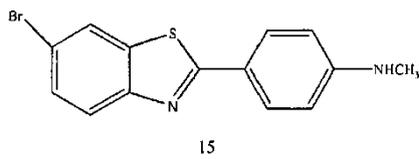
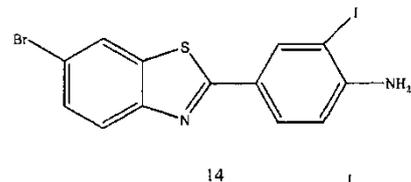
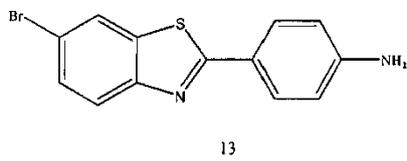
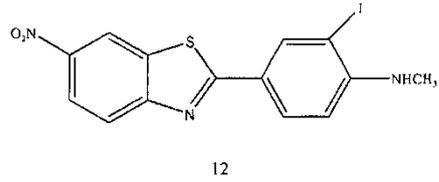
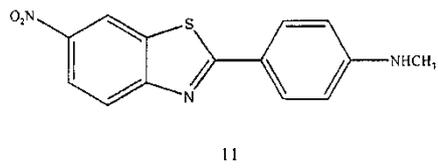
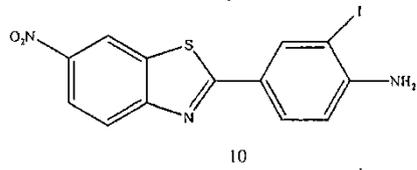
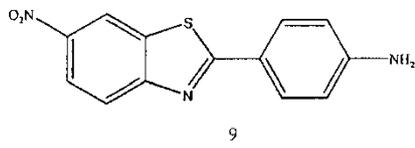
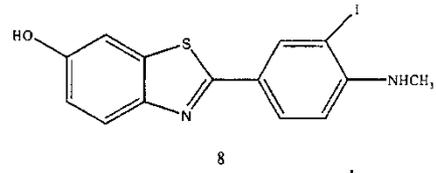
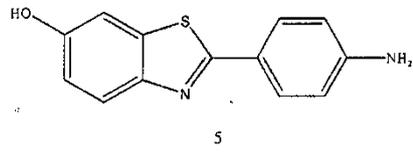
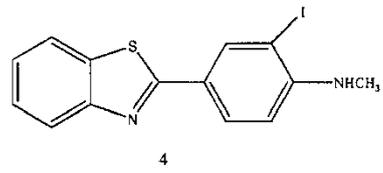
SUMARIO DE LA INVENCION

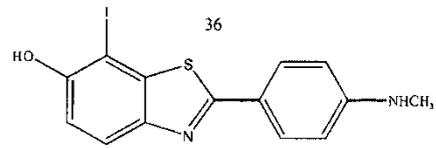
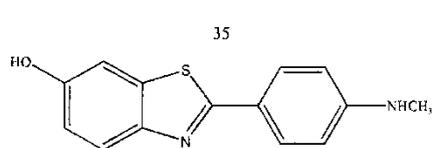
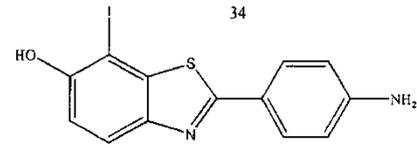
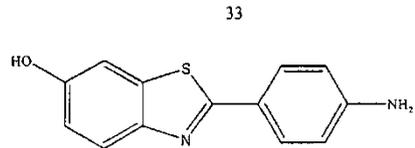
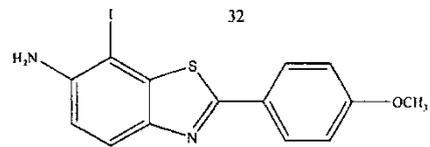
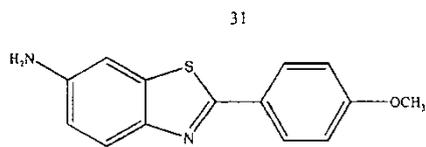
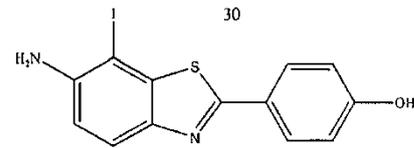
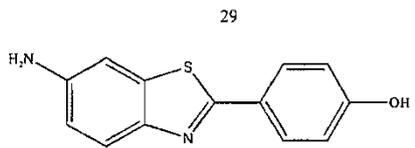
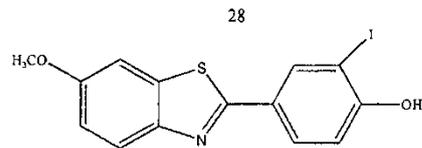
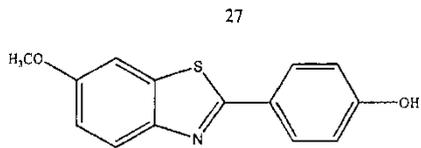
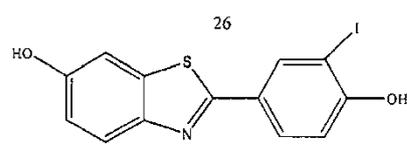
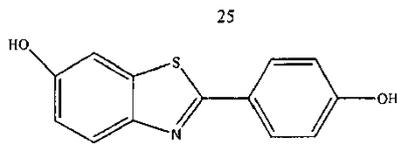
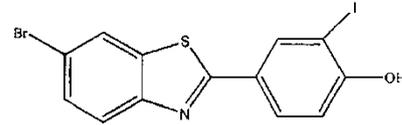
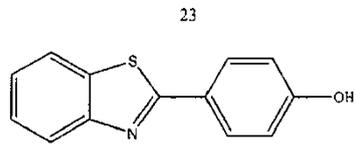
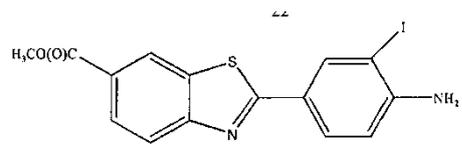
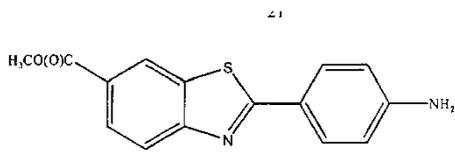
La presente invención está dirigida a un compuesto seleccionado del grupo constituido por las estructuras 1, 4, 5, 8-16, 18, y 20-45, en donde el compuesto comprende al menos un marcador detectable seleccionado del grupo constituido por ^3H , ^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{76}Br , ^{75}Br , ^{18}F , ^{19}F , ^{11}C , ^{13}C , y ^{14}C :

55



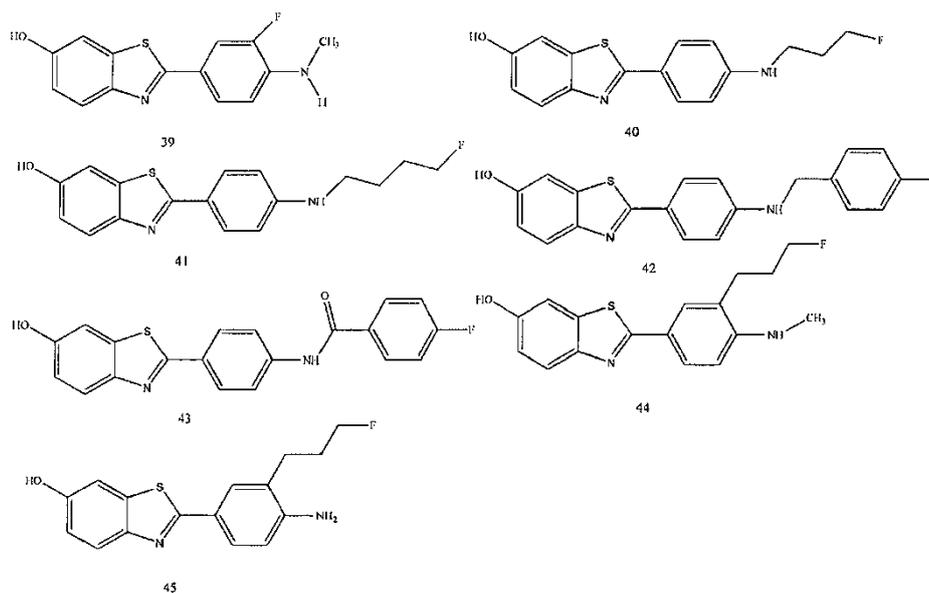
1





37

38



para uso en un método de determinación de la eficacia de la terapia en el tratamiento de la amiloidosis, comprendiendo dicho método:

- 5 (A) administrar a un paciente en necesidad de ello una cantidad eficaz de un compuesto como se define arriba;
- (B) formar imágenes de dicho paciente; y a continuación
- 10 (C) administrar a dicho paciente en necesidad de ello al menos un agente antiamiloidé;
- (D) administrar subsiguientemente a dicho paciente en necesidad de ello una cantidad eficaz de un compuesto como se define arriba;
- 15 (E) formar imágenes de dicho paciente; y
- (F) comparar los niveles de deposición de amiloide en dicho paciente antes del tratamiento con dicho al menos un agente antiamiloidé con los niveles de deposición de amiloide en dicho paciente después del
- 20 tratamiento con dicho al menos un agente antiamiloidé.

En algunas realizaciones, el agente antiamiloidé comprende uno o más anticuerpos contra el péptido A β .

En otras realizaciones, el agente antiamiloidé comprende uno o más inhibidores de β - y/o γ -secretasa.

En algunas realizaciones, el agente antiamiloidé comprende una molécula pequeña que se fija a A β 1-42, tal como un péptido señuelo.

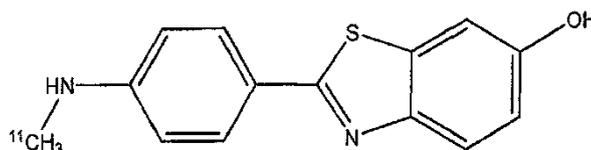
En otras realizaciones, la amiloidosis es AD.

En alguna realización, la amiloidosis es un trastorno de deposición de amiloide, en donde una realización preferida abarca amiloidosis que es un trastorno de deposición de placas de amiloide.

En algunas realizaciones, la formación de imágenes se selecciona del grupo constituido por formación de imágenes gamma, formación de imágenes de resonancia magnética, y espectroscopia de resonancia magnética.

En otras realizaciones, la formación de imágenes se realiza por formación de imágenes gamma, y la formación de imágenes gamma es PET o SPECT.

En algunas realizaciones, el compuesto de la invención es:



En otras realizaciones, el compuesto de la invención contiene un marcador ^{11}C .

- 5 En algunas realizaciones, el agente antiamiloides es un agente de disipación periférica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 FIG. 1 muestra la fijación de 1nM {N-metil- ^3H }2-[4'-(metilamino)fenil]6-hidroxi-benzotiazol (" ^3H]PIB") al corteza frontal (Fr) y el cerebelo (Cb) de un cerebro de control (Cntl; n = 4; barras blancas; círculos), cerebro AD (AD; n = 5; barras negras; cuadrados) y un caso de AD tratado con AN-1792 (n = 1 repetido x 1; barras sombreadas; triángulos). Los resultados indican que el tratamiento con una vacuna AN-1792 disminuye la fijación del trazador de amiloide, 2-[4'-(metilamino)fenil]6-hidroxi-benzotiazol ("PIB") a homogeneizados de cerebro.

15 FIG. 2 muestra la inmunorreactividad (ir) con A β 42 y la marcación histofluorescente con X-34 de hoja plegada β en el corteza temporal de dos pacientes de AD 572 (A,D) y 5180 (B,E) comparados con un paciente AD representativo de etapa final (C,F). Barra de escala = 200 μm . Las áreas grandes desprovistas de placas en el caso 572 están marcadas con asteriscos. El caso 5180 está desprovisto de placas, pero exhibe algunas madejas neurofibrilares y elementos neuríticos teñidos por X-34.

20 FIG. 3 muestra la inmunorreactividad con A β 42 y la marcación histofluorescente con X-34 de hoja plegada β en el corteza frontal de los pacientes 572 (A,D) y 5180 (B,E), comparados con un paciente de enfermedad de Alzheimer representativo de etapa final. Barra de escala = 200 μm . Las áreas desprovistas de placas en el caso 572 están marcadas con asteriscos. El caso 5180 está desprovisto de placas, pero exhibe algunas madejas neurofibrilares teñidas por X-34 (véase Figura 4).

30 FIG. 4 muestra la tinción con X-34 de madejas neurofibrilares que contienen hoja plegada beta, hebras de neuropilo, neuritas distróficas y placas seniles en los pacientes 572 y 5180. Obsérvese que el paciente 5180 tiene elementos neuríticos abundantes, pero no exhibe placa alguna. Las áreas aclaradas de los elementos teñidos con X-34 están marcadas con asteriscos. Estas áreas aclaradas sugieren acusadamente la presencia de placas antes del tratamiento con AN-1792. Barra de escala = 100 μm .

35 Fig. 5: El gráfico superior representa datos ELISA en las cartas de para A β 42 en los casos 572 y 5180 en las cortezas frontal, parietal, temporal y cerebelar. Éstos se comparan con datos publicados para las cortezas frontal, parietal y temporal de controles de edad avanzada y pacientes de AD (Naslund et al., 2000, JAMA 283, 1571-1577). El gráfico inferior representa la fijación de [^3H]PIB en los casos 572 y 5180 en las cortezas frontal, parietal, temporal y cerebelar, comparados con la fijación de [^3H]PIB a las mismas áreas de controles de edad avanzada (n = 4) y pacientes de AD (n = 5). Obsérvese que la fijación de [^3H]PIB está bien correlacionada con los datos ELISA e histológicos en las Figuras 2-4.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

45 La presente invención está dirigida a compuestos para uso en un método para determinación de la eficacia de la terapia en el tratamiento de la amiloidosis. El método implica el uso de formación de imágenes de amiloide como un marcador sustitutivo. Los marcadores sustitutivos son un tipo especial de biomarcador que pueden utilizarse en lugar de medidas clínicas como punto final clínico para propósitos de aprobación de fármacos. Así, los métodos descritos en esta memoria son útiles en pruebas de desarrollo de fármacos. Por ejemplo, la medida de los niveles de colesterol es ahora un marcador sustitutivo aceptado de la aterosclerosis. Adicionalmente, los métodos son clínicamente útiles para ayudar a las decisiones de seguimiento de los pacientes. En este sentido, las evaluaciones cuantitativas de la carga de amiloide pueden mejorar las decisiones clínicas concernientes a la dosis de fármaco o las selecciones de tratamiento. La presente invención implica el uso de formación de imágenes de amiloide como un marcador sustitutivo de la eficacia para las terapias antiamiloides.

55 El término "amiloidosis" se refiere a una enfermedad asociada con la deposición de amiloide, tal como Enfermedad de Alzheimer, Síndrome de Down, Diabetes Mellitus Tipo 2, Amiloidosis Hereditaria con Hemorragia Cerebral (holandesa), amiloide A (reactivo), amiloide secundario, MCI, (fiebre familiar mediterránea), nefropatía amiloide familiar con urticaria y sordera (Síndrome de Muckle-Wells), cadena L lambda de amiloide o cadena L kappa de amiloide (idiopática, asociada a mieloma o a macroglobulinemia), A β 2M (hemodiálisis crónica), ATTR (polineuropatía amiloide familiar (portuguesa, japonesa, sueca)), cardiomiopatía amiloide familiar (danesa), amiloide cardiaco aislado, amiloidosis sistémica senil, ALAPP o insulinooma de amilina, factor natriurético atrial (amiloides atrial aislado), procalcitonina (carcinoma medular del tiroides), gelsolina (amiloidosis familiar (finlandesa)), cistatina C

(hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (islandica)), AApo-A-1 (polineuropatía amiloidótica familiar – Iowa), AApo-A-II (senescencia acelerada en los ratones), amiloide asociado con fibrinógeno; y Asor o PrP-27 (escrip, enfermedad de Creutzfeldt Jacob), síndrome de Gertsman-Straussler-Scheinker, encefalitis espongiiforme bovina) o en casos de personas que son homocigóticas para el alelo E4 de apolipoproteína, y la condición asociada con la homocigosis para el alelo E4 de apolipoproteína o la enfermedad de Huntington. La invención abarca enfermedades asociadas con reposición de placas de amiloide. Preferiblemente, la enfermedad asociada con la deposición de amiloide es AD.

El método proporciona un medio de evaluación del éxito de las terapias antiamiloides. En algunas realizaciones, el método proporciona un medio para evaluar el éxito clínico de las terapias antiamiloides. En algunas realizaciones, el método puede utilizarse para evaluar el éxito clínico en individuos moderadamente deteriorados con pocos o ningún síntoma clínico a seguir. El método básico de determinación de la eficacia de la terapia en el tratamiento de la amiloidosis implica:

(A) administrar a un paciente en necesidad de ello una cantidad eficaz de un compuesto como se define arriba

(B) formar imágenes de dicho paciente; a continuación

(C) administrar a dicho paciente en necesidad de ello al menos un agente antiamiloides;

(D) administrar subsiguientemente a dicho paciente en necesidad de ello una cantidad eficaz de un compuesto como se define arriba;

(E) formar imágenes dicho paciente; y

(F) comparar los niveles de deposición de amiloide en dicho paciente antes del tratamiento con al menos un agente antiamiloides con los niveles de deposición de amiloide en dicho paciente después del tratamiento con al menos un agente antiamiloides.

SONDAS DE AMILOIDE

La sonda de amiloide de la presente invención es cualquier compuesto como se define arriba.

En realizaciones preferidas, la sonda de amiloide es {N-metil-¹¹C}2-[4'-(metilamino)fenil]6-hidroxibenzotiazol (" [¹¹C]PIB") o {N-metil-³H}2-[4'-(metilamino)fenil]6-hidroxibenzotiazol (" [³H]PIB").

"Cantidad eficaz" se refiere a la cantidad requerida para producir un efecto deseado. Ejemplos de una "cantidad eficaz" incluyen cantidades que permiten detectar y producir imágenes de depósito(s) de amiloide *in vivo* o *in vitro*, 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.

Los compuestos definidos anteriormente, a los que se hace referencia también en esta memoria como "compuestos de tioflavina", "derivados de tioflavina", o "sondas de amiloide", tienen cada una de las características siguientes: (1) fijación específica a Aβ sintético *in vitro* y (2) capacidad para atravesar *in vivo* una barrera hematoencefálica no comprometida.

Los compuestos de tioflavina y derivados radiomarcados de los mismos de las estructuras 1, 4, 5, 8-16, 18, 20-45 atraviesan la barrera hematoencefálica *in vivo* y se fijan a Aβ depositado en las placas neuríticas (pero no difusas), a Aβ depositado en amiloide cerebrovascular, y al amiloide constituido por la proteína depositada en NFT. Los presentes compuestos son derivados de aminos no cuaternarios de Tioflavina S y T que se sabe tiñen el amiloide en secciones de tejido y se fijan a Aβ 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).

El método empleado por esta invención determina la presencia y localización de los depósitos de amiloide en un órgano o área corporal, preferiblemente el cerebro, de un paciente. El método comprende la administración de una cantidad detectable de un compuesto como se ha definido arriba. Una sonda de amiloide puede administrarse a un paciente como una composición farmacéutica o una sal soluble en agua de la misma farmacéuticamente aceptable.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de ácido o de base del compuesto de inventiva, sal que posee la actividad farmacológica deseada y no es indeseable biológicamente ni en ningún otro sentido. 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, hidrocloreuro, hidrobromuro, hidroyoduro, 2-hidroxietano-sulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, 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

alcalinotérrico tales como sales de calcio y magnesio, sales con bases orgánicas tales como sales de dicitohexilamina, N-metil-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; dialquil-sulfatos tales como dimetil, dietil, dibutil y diamil-sulfatos; 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.

Por regla general, la dosificación del derivado de tioflavina marcado detectablemente varía dependiendo de consideraciones tales como edad, condición, sexo, y extensión de la enfermedad en el paciente, contraindicaciones, en su caso, terapias concomitantes y otras variables, que deben ser ajustadas por un médico experto en la técnica. La dosificación puede variar desde 0,001 µg/kg a 10 µg/kg, preferiblemente 0,01 µg/kg a 1,0 µg/kg.

La administración al individuo puede ser local o sistémica y realizarse por vía intravenosa, intraarterial, intratecal, por la vía del fluido espinal) o análogas. La administración puede ser también intradérmica o intracavitaria, dependiendo del lugar del cuerpo a examinar. Después que ha transcurrido un tiempo suficiente para que el compuesto se fije al amiloide, por ejemplo 30 minutos a 48 horas, el área del sujeto sometido a investigación se examina por técnicas rutinarias de formación de imágenes tales como MRS/MRI, SPECT, formación de imágenes de centelleo planares, PET, así como cualesquiera técnicas de imagen nuevas. El protocolo exacto variará necesariamente dependiendo de factores específicos para el paciente, como se ha indicado arriba, y dependiendo del lugar del cuerpo a examinar, el método de administración y el tipo de marcador utilizado; la determinación de procedimientos específicos sería cuestión de rutina para el especialista experimentado. Para formación de imágenes del cerebro, preferiblemente, la cantidad (fijación total o específica) del derivado de tioflavina fijado marcado radiactivamente o análogo de la presente invención se mide y se compara (como una ratio) con la cantidad de derivado de tioflavina marcado fijada al cerebelo del paciente. Esta ratio se compara luego por la misma ratio en un cerebro normal de la misma edad.

Las sondas de amiloide de la presente invención se administran ventajosamente en la forma de composiciones inyectables, pero pueden formularse también en sistemas de suministro de fármacos bien conocidos (v.g., oral, rectal, parenteral (intravenosa, intramuscular, o subcutánea), intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, local (polvos, ungüentos o gotas), o como una pulverización bucal o nasal). Una composición típica para tal propósito comprende un portador farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la composición puede contener aproximadamente 10 mg de seroalbúmina humana y desde aproximadamente 0,05 a 500 microgramos del derivado de tioflavina marcado por mililitro de tampón de fosfato que contiene NaCl. Otros portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas, excipientes no tóxicos, con inclusión de sales, conservantes, tampones y análogos), como se describe, por ejemplo, en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Edición 15^a, Easton: Mack Publishing Co. pp. 1405-1412 y 1461-1487 (1975) y en THE NATIONAL FORMULARY XIV., Ed.14^a, Washington: American Pharmaceutical Association (1975).

Sondas de amiloide particularmente preferidas de la presente invención son aquéllas que, además de fijar específicamente amiloide *in vivo* y ser capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, son también no tóxicas a niveles de dosificación apropiados y tienen una duración de efecto satisfactoria.

De acuerdo con la presente invención, una composición farmacéutica que comprende una sonda de amiloide como se define arriba se administra a individuos en los cuales se prevé la formación de amiloide o fibrillas de amiloide, v.g., pacientes diagnosticados clínicamente con enfermedad de Alzheimer u otra enfermedad asociada con deposición de amiloide.

Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Portadores acuosos incluyen agua, soluciones alcohólico/acuosas, soluciones salinas, vehículos parenterales tales como cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, etc. Los vehículos intravenosos incluyen restablecedores de fluidos y nutrientes. Los conservantes incluyen agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes y gases inertes. El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición farmacéutica se ajustan de acuerdo con la habilidad rutinaria en la técnica. Véase, Goodman y Gilman's THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTICS (7^a edición).

55 FORMACIÓN DE IMÁGENES

La invención emplea sondas de amiloide que, en asociación con técnicas no invasivas de formación de neuroimágenes por resonancia magnética tales como espectroscopia (MRS) u formación de imágenes simple (MRI), u formación de imágenes gamma tales como tomografía de emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada de emisión de fotones simples (SPECT), se utilizan para cuantificar la deposición de amiloide *in vivo*. El método implica formar imágenes de un paciente para establecer una línea base de deposición de amiloide. El término "línea base" hace referencia a la cantidad y distribución de deposición de amiloide en un paciente antes de la iniciación de la terapia anti-amiloide. El método implica adicionalmente al menos una sesión de formación de imágenes de un paciente después de la administración en una terapia anti-amiloide. El método presente puede implicar formación de imágenes de un paciente antes y después del tratamiento con al menos un agente anti-amiloide. La formación de imágenes puede realizarse en cualquier momento durante el tratamiento.

El término "formación de imágenes *in vivo*" hace referencia a cualquier método que permite la detección de un derivado de tioflavina marcado como se ha definido arriba. Para formación 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 para (por ejemplo, se divide por) la fijación total en otro tejido del mismo individuo durante el mismo procedimiento de formación de imágenes *in vivo*. La fijación total *in vivo* se define como la señal total detectada en un tejido por una técnica de formación 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 químicamente idéntico por lo demás. Un "individuo" es un mamífero, preferiblemente un humano, y muy preferiblemente un humano sospechoso de padecer una enfermedad asociada con deposición de amiloide, tal como AD y/o demencia. Los términos "individuo" y "paciente" se utilizan intercambiabilmente en esta memoria.

Para propósitos de formación de imágenes *in vivo*, el tipo de instrumento de detección disponible es un factor importante en la selección de un marcador dado. Por ejemplo, isótopos radiactivos y ^{18}F son particularmente adecuados para formación 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 semi-vida del radionucleido. La semi-vida debe ser suficientemente larga a fin de que sea todavía detectable en el momento de absorción máxima por la diana, pero lo bastante corta para que el hospedador no se vea sometido a una radiación deletérea. Los compuestos radiomarcados de la invención pueden detectarse utilizando la formación de imágenes gamma en las cuales se detecta la irradiación gamma emitida de la longitud de onda apropiada. Métodos de formación de imágenes gamma incluyen, pero sin carácter limitante, SPECT y PET. Preferiblemente, para la detección SPECT, el radiomarcador seleccionado carecerá de emisión de partículas, 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 ^{18}F que se anularán para formar dos rayos gamma de 511 keV que serán detectados por la cámara PET.

En la presente invención, se administran a un paciente los compuestos/sondas de fijación de amiloide, que son útiles para formación de imágenes *in vivo* y cuantificación de la deposición de amiloide. Estos compuestos deben utilizarse en asociación con técnicas no invasivas de formación de neuroimágenes tales como espectroscopia (MRS) u formación de imágenes (MRI) de resonancia magnética, tomografía de edición de positrones (PET), y tomografía computarizada de emisión de fotones simples (SPECT). De acuerdo con esta invención, los derivados de tioflavina pueden marcarse con ^{18}F o ^{13}C para MRS/MRI por métodos generales de química orgánica conocidos en la técnica. Véase, v.g., March, J. ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY: REACTIONS, MECHANISMS, AND STRUCTURE (3ª edición, 1985). Los derivados de tioflavina pueden estar radiomarcados también 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. in POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY AND AUTORADIOGRAPHY (Phelps, M., Mazziota, J., y Schelbert, H. eds.) 391-450 (Raven Press, NY 1986). Los derivados de tioflavina pueden estar también radiomarcados 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). Adicionalmente, los derivados de tioflavina pueden estar marcados con ^{131}I , ^{125}I , o ^{123}I , por yodación directa de un amino-derivado diazotado por 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 de tri-alkil-estaño 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. Labell. Comp. and Radiopharm. 1994: 905; Chumpradit et al., J. Med. Chem. 34: 877 (1991); Zhuang et al., J. Med. Chem. 37: 1406 (1994); Chumpradit et al., J. Med. Chem. 37: 4245 (1994). Por ejemplo, un triazeno o derivado de tri-alkil-estaño 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, los derivados estables de tri-alkil-estaño de tioflavina y sus análogos son nuevos precursores útiles para la síntesis de muchos de los compuestos radiomarcados comprendidos en la presente invención.

Los métodos utilizados en la invención pueden utilizar isótopos detectables por espectroscopia de resonancia magnética nuclear para propósitos de formación de imágenes y espectroscopia *in vivo*. Elementos particularmente útiles en espectroscopia de resonancia magnética incluyen ^{18}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 Formación de Imágenes (MRI) o Espectroscopia (MRS) de Resonancia Magnética, de acuerdo con esta invención, incluyen ^{18}F y ^{13}C . Radioisótopos adecuados para cuantificación *in vitro* de amiloide en homogeneizados de tejido de biopsia o tejido post-mortem incluyen ^{125}I , ^{14}C , y ^3H . Los radiomarcadores preferidos son ^{11}C y ^{18}F para uso en formación de imágenes PET *in vivo*, ^{123}I para uso en formación de imágenes SPECT, ^{19}F para MRS/MRI, y ^3H o ^{14}C para estudios *in vitro*.

De acuerdo con un aspecto de la invención que está relacionado con un método de detección de depósitos de amiloide en tejido de biopsia, el método implica incubar tejido fijado en formalina con una solución de un compuesto fijador de amiloide de tioflavina seleccionado de los compuestos arriba descritos. Preferiblemente, la solución es 25-100% etanol, (siendo el resto agua) saturado con un compuesto de tioflavina fijador de amiloide de acuerdo con la

invención. Después de la incubación, el compuesto tñe 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 métodos de detección incluyen técnicas microscópicas tales como microscopía en campo brillante, de fluorescencia, láser-confocal y de polarización cruzada.

5 El método de cuantificación de la cantidad de amiloide en tejido de biopsia implica incubar un derivado marcado de tioflavina de acuerdo con la presente invención, o una sal no tóxica insoluble en agua del mismo, con homogeneizado de biopsia o tejido post-mortem. El tejido se obtiene y se homogeneiza por métodos bien conocidos en la técnica. El radiomarcador preferido es ^{125}I , ^{14}C o ^3H que está contenido en un sustituyente sustituido en uno de los compuestos arriba definidos. El tejido que contiene depósitos de amiloide se fijará a los derivados marcados de los compuestos de tioflavina fijadores de amiloide de la presente invención. El tejido fijado se separa luego del tejido no fijado por cualquier mecanismo conocido por especialista experimentado, tal como filtración. El tejido fijado puede cuantificarse luego por cualquier medio conocido por el especialista 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.

La capacidad del compuesto arriba definido para fijarse específicamente a las placas de amiloide sobre madejas neurofibrilares es particularmente real a concentraciones menores que 10 nM, que incluye el intervalo de concentración *in vivo* de radiomarcadores PET. A estas bajas concentraciones, en homogeneizados de tejido cerebral que contienen únicamente madejas y que carecen de placas, no da como resultado una fijación significativa cuando se compara con tejido cerebral de control que no contiene placas ni madejas. Sin embargo, la incubación de homogeneizados de tejido cerebro que contiene principalmente placas y algunas madejas con compuestos radiomarcados como se define arriba, da como resultado un aumento significativo en la fijación cuando se compara con el tejido de control sin placas o madejas. Este dato sugiere la ventaja de que estos compuestos son específicos para los depósitos A β a concentraciones inferiores a 10 nM. Estas bajas concentraciones son detectables luego por estudios PET, haciendo posible la detección PET utilizando compuestos radiomarcados como se han definido arriba que son específicos para depósitos de A β . El uso de tales compuestos permite la detección PET en depósitos A β tales como los encontrados en placas y amiloide cerebrovascular. Dado que se ha informado que los niveles de A β en la corteza frontal se incrementan antes de la formación de madejas, esto sugeriría que los compuestos radiomarcados, utilizados como trazadores PET, podrían ser específicos para los cambios más precoces en la corteza AD. Naslund et al. JAMA 283:1571 (2000).

TERAPIAS ANTI-AMILOIDE

35 El presente método para determinar la eficacia de la terapia en el tratamiento de la amiloidosis implica administrar a un paciente en necesidad de ello un compuesto de fórmulas (I) o (II) o la estructura 1-45 y formar imágenes del paciente, y, después de dicha formación de imágenes, administrar al menos un agente antiamiloide/terapia antiamiloide a dicho paciente. La cantidad administrada, la ruta de administración, y la duración de la terapia son determinadas por un experto en la técnica basándose en la edad, el peso, y el estado del paciente. Tales determinaciones están dentro del alcance del especialista experimentado. Cantidades adecuadas incluyen, pero sin carácter limitante, 0,01 a 100 mg/kg. Rutas de administración adecuadas incluyen, pero sin carácter limitante, las rutas oral, subcutánea e intravenosa. Las duraciones adecuadas de la terapia incluyen, pero sin carácter limitante, una sola dosis a 4 dosis por día administradas durante tiempo indefinido. Tiempos adecuados para la formación de imágenes incluyen, pero sin carácter limitante, desde inmediatamente después de la primera dosis a diez años después de la dosis más reciente. Aumentos preferidos para la formación de imágenes serían entre 7 días y 6 meses después de la dosis más reciente.

Un "agente antiamiloide" o una "terapia antiamiloide" es cualquier agente o combinación de agentes que tratan o previenen la amiloidosis. Ejemplos de enfermedades asociadas con la deposición de amiloide, amiloidosis, incluyen Enfermedad de Alzheimer, Síndrome de Down, diabetes mellitus Tipo 2, amiloidosis hereditaria con hemorragia cerebral (holandesa), amiloide A (reactivo), amiloidosis secundaria, MCI, fiebre familiar mediterránea, nefropatía familiar de amiloide con urticaria y sordera (síndrome de Muckle-Wells), cadena L lambda de amiloide o cadena L kappa de amiloide (idiopática, asociada a mieloma o macroglobulinemia), A beta 2M (hemodiálisis crónica), ATTR (polineuropatía amiloide familiar (portuguesa, japonesa, sueca)), cardiomiopatía familiar de amiloide (danesa), amiloide cardiaco aislado, amiloidosis sistémicas seniles, AIAPP o amilina-insulinoma, factor natriurético atrial (amiloide atrial aislado), procalcitonina (carcinoma medular del tiroides), gelsolina (amiloidosis familiar (finlandesa)), cistatina C (hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (islandesa)), AApo-A-I (neuropatía amiloidótica familiar - Iowa), AApo-A-II (senescencia acelerada en los ratones), amiloide asociado a fibrinógeno; y Asor o Pr P-27 (escrapie, enfermedad de Creutzfeldt Jacob, síndrome de Gertsman-Straussler-Scheinker, encefalitis espongiiforme de los bovinos) o en casos de personas que son homocigóticas para el alelo E4 de apolipoproteína, y la condición asociada con homocigosidad para el alelo E4 de apolipoproteína o enfermedad de Huntington. La invención abarca enfermedades asociadas con la deposición de placas de amiloide. Preferiblemente, la enfermedad asociada con la deposición de amiloide es AD.

65 El término "terapia" incluye tratamiento y/o prevención de la enfermedad.

“Tratamiento” se refiere a:

- (i) prevención de la aparición de 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 la misma;
- (ii) inhibición de la enfermedad, trastorno o afección, es decir, detección de su desarrollo; y/o
- (iii) alivio de la enfermedad, trastorno o afección, es decir, motivación de la regresión de la enfermedad, trastorno y/o afección.

El término “tratamiento” o “terapia” no significa necesariamente curación total. Cualquier alivio de cualquier síntoma o efecto patológico indeseable de la enfermedad en cualquier grado o la ralentización del progreso de la enfermedad pueden considerarse tratamiento. Adicionalmente, el tratamiento puede incluir actos que pueden empeorar el estado general de bienestar o el aspecto del paciente. Por ejemplo, la administración de quimioterapia en pacientes de cáncer que puede hacer que los pacientes se sientan “peor” se considera también tratamiento.

El término “prevención” se refiere a la disminución de la probabilidad de que un organismo contraiga o desarrolle una enfermedad asociada con la deposición de amiloide. El término “prevención” se refiere preferiblemente a reducir el porcentaje de individuos que desarrollan la enfermedad con relación a un grupo de control que no se somete a la administración de un agente anti-amiloide.

La presente invención está dirigida a la producción de imágenes de amiloide que sirven como marcador sustitutivo de la eficacia para una terapia anti-amiloide. La administración de una sonda de amiloide para establecer una línea base de deposición de amiloide y la formación subsiguiente de imágenes de un paciente antes y después del tratamiento del paciente con un agente anti-amiloide permite la determinación de la eficacia de la terapia anti-amiloide. El presente método puede utilizarse para determinar la eficacia de cualquier tratamiento anti-amiloide debido a que puede administrarse una sonda de amiloide, y el paciente puede someterse a pruebas de formación de imágenes, antes y después de cualquier terapia anti-amiloide. El presente método contempla la determinación de terapias anti-amiloide que son ineficaces para el tratamiento de enfermedades asociadas con la deposición de amiloide, así como las terapias anti-amiloide que son eficaces para el tratamiento de enfermedades asociadas con la deposición de amiloide. Una persona con experiencia ordinaria en la técnica puede determinar las condiciones y la dosificación de la terapia anti-amiloide de acuerdo con protocolos apropiados. Por tanto, la presente invención contempla determinar la eficacia de las terapias anti-amiloide que se conocen actualmente, así como terapias que están todavía por descubrir. Terapias anti-amiloide-ilustrativas se describen más adelante.

En algunas realizaciones, se determina por el presente método la eficacia de los inhibidores de acetilcolinesterasa en el tratamiento de la amiloidosis. La terapia de acetilcolinesterasa está basada en estudios de patrones de degeneración en AD que identifican disminuciones sustanciales entre grupos de neuronas en el prosencéfalo basal. Estas células utilizan todas ellas el transmisor acetilcolina, y su pérdida significa que estaba liberándose menos acetilcolina en sus terminales antiguos en la corteza. Varios fármacos, tales como tacrina, donepezil, rivastigmina, y galantamina han sido desarrollados basándose en estos descubrimientos, suponiéndose que actúan por inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (Ingram, V., American Scientist, 2003, 91(4): 312-321).

En otras realizaciones, se determina por el presente método la eficacia de una terapia anti-amiloide dirigida a enzimas responsables de la formación de fragmentos nocivos de la proteína precursora de amiloide (APP) en el tratamiento de la amiloidosis. En algunas realizaciones, los fragmentos nocivos de la proteína precursora de amiloide (APP) están constituidos por el péptido A β plegado defectuosamente. Por ejemplo, la superproducción de fragmentos A β 1-42 está considerada por algunos científicos como una causa raíz de AD. El fragmento A β 1-42 se forma por escisión de APP por la enzima β -secretasa (BACE1) (que produce el término amino) y la enzima γ -secretasa (que escinde el término carboxilo de APP). Inhibidores de estas enzimas secretasa pueden utilizarse como terapias anti-amiloide (Ingram, V., American Scientist, 2003, 91(4): 312-321).

En algunas realizaciones, puede determinarse por el presente método la eficacia de las estrategias inmunoterapéuticas en el tratamiento de la amiloidosis. La inmunoterapia actúa utilizando el sistema inmunitario del paciente para localizar y destruir las placas de amiloide, y muchas estrategias inmunoterapéuticas están siendo perseguidas activamente por los científicos. Las estrategias inmunoterapéuticas pueden ser pasivas o activas. Por ejemplo, en la inmunoterapia activa, un paciente puede recibir una inyección o aplicación por pulverización nasal del péptido A β , conduciendo a una respuesta inmune anti-amiloide. La inmunoterapia pasiva, por otra parte, podría implicar eludir la proteína amiloide beta, utilizando en su lugar antisuero que ha sido producido ya en respuesta al amiloide beta. La inmunoterapia, que implica anticuerpos contra el péptido A β , ha sido estudiada para el tratamiento de AD. Por ejemplo, AN-1792 es una preparación de amiloide-beta (A β ; longitud 1-42) sintético preagregado junto con el adyuvante QS-21 (Hock, C. et al., 2003, Neuron, 38:547-554). Aproximadamente 300 pacientes de AD han sido tratados con esta preparación antes de la suspensión de la prueba clínica debido a efectos secundarios (Birmingham, K. y Frantz, S., 2002, Nature Medicine, 8: 199-200).

En otras realizaciones, se determina por el método presente la eficacia de las estrategias neuroprotectoras en el tratamiento de la amiloidosis. Por ejemplo, muchos clínicos recomiendan que los pacientes tomen dosis altas (1000-2000 UI/día) de vitamina E. Otros tipos de estrategias neuroprotectoras que han sido sugeridas para el tratamiento de la amiloidosis son dosis elevadas de vitamina C, moduladores de los canales de calcio, agentes de eliminación de radicales libres, y formadores de quelatos de iones metálicos (Selkoe, et al., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2003, 43:145-84).

En algunas realizaciones, se determina por el presente método la eficacia de las estrategias con fármacos antiinflamatorios (NSAIDs) en el tratamiento de la amiloidosis. Los tratamientos que implican NSAIDs están basados en la evidencia de que una respuesta inflamatoria celular en la corteza está provocada por la acumulación progresiva de péptido A β . Fármacos antiinflamatorios ilustrativos son prednisona, inhibidores no específicos de las ciclooxigenasas, e inhibidores de la ciclooxigenasa-2. (Clark, M., et al., *Annals of Internal Medicine*, 2003, 138(5):400-410; y Hardy, John, *Annu. Rev. Med.*, 2004, 55:15-25).

En algunas realizaciones, se determina por el presente método la eficacia de terapias de disminución del colesterol que incluyen, pero sin carácter limitante, inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A-reductasa (estatinas). Los tratamientos que implican fármacos reductores del colesterol (tales como las estatinas), están basados en la evidencia epidemiológica de que los pacientes tratados con estatinas tienen una menor incidencia de AD y que las estatinas pueden alterar el metabolismo de A β para reducir los niveles de A β (Wolozin, B (2002) *Cholesterol and Alzheimer's Disease. Biochemical Society Transactions*, 30:525-529). Fármacos de estatina reductores de colesterol ilustrativos incluyen lovastatina, pravastatina, rosuvastatina, fluvastatina, atorvastatina y simvastatina. Otros fármacos reductores de colesterol incluyen niacina, colestiramina, fenofibrato, colesevelam y ezetimiba.

En otras realizaciones, se determina por el presente método la eficacia de moléculas pequeñas que eliminan la neurotoxicidad del A β 1-42 agregado en el tratamiento de la amiloidosis. Un fármaco de este tipo, administrado preferiblemente al comienzo de la progresión de la enfermedad, podría "destoxificar" el péptido A β que se acumula gradualmente antes de infligir cualquier deterioro permanente a las neuronas. (Clark M., et al., *Annals of Internal Medicine*, 2003, 138 (5): 400-410).

En algunas realizaciones, se determina por el presente método la eficacia de "péptidos señuelo" en el tratamiento de la amiloidosis. Los péptidos señuelo son pequeñas moléculas que se fijan al péptido agregante A β 1-42 y le obligan a asumir una estructura no tóxica. Péptidos señuelo ilustrativos son péptidos pequeños (de 5, 6 ó 9 aminoácidos de longitud), seleccionados de grandes bibliotecas de fragmentos proteínicos por su capacidad para formar una asociación estrecha con A β 1-42 marcado. Clark, M., et al., *Annals of Internal Medicine*, 2003, 138 (5): 400-410).

En otras realizaciones, se determina por el presente método la eficacia de la modulación de la homeostasis del colesterol en el tratamiento de la amiloidosis. El uso crónico de fármacos reductores del colesterol ha sido asociado recientemente con una menor incidencia de la AD. Concurrentemente, se ha demostrado que las dietas ricas en colesterol aumentan la patología de A β en los animales, y se ha demostrado que los fármacos reductores del colesterol reducen la patología en ratones transgénicos APP. Se encuentran actualmente en curso pruebas clínicas para el estudio del efecto de la modulación de la homeostasis del colesterol en el tratamiento de AD. (Hardy, John, *Annu. Rev. Med.* 2004, 55: 15-25).

Se cree que ciertos anticuerpos tales como el denominado m256 (DeMattos,RB, Bales,KR, Cummins,DJ, Dodart,JC, Paul,SM, Holtzman,DM (2001) "Peripheral antiA beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:8850-8855) o moléculas distintas de anticuerpos (Matsuoka,Y, Saito,M, LaFrancois,J, Saito,M, Gaynor,K, Olm, V, Wang,L, Casey,E, Lu,Y, Shiratori,C, Lemere,C, Duff,K (2001) "Novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease by peripheral administration of agents with an affinity to beta-amyloid." *Journal of Neuroscience*. 23:29-33) disminuyen el amiloide cerebral por fijarse a los péptidos A β en la sangre, creando con ello un disipador periférico

disminuyen el amiloide cerebral por fijación a péptidos A β en la sangre, creando con ello una "disipación periférica" y desplazando el equilibrio de A β del cerebro a la sangre, donde el mismo puede ser aclarado del cuerpo. Tales agentes se designan en esta memoria como "agentes de disipación periférica".

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA TERAPIA ANTI-AMILOIDE

El presente método para determinación de la eficacia de la terapia en el tratamiento de la amiloidosis implica administrar a un paciente en necesidad de ello un compuesto como se define arriba y formar imágenes del paciente. Después de la formación de dichas imágenes, se administra a dicho paciente al menos un agente antiamiloide. A continuación, se administra al paciente una cantidad eficaz de un compuesto como se ha definido arriba y se obtienen nuevamente imágenes del paciente. Finalmente, se comparan los niveles basales de la deposición de amiloide en el paciente antes del tratamiento con el agente antiamiloide con los niveles de deposición de amiloide en el paciente después del tratamiento con el agente antiamiloide. Una comparación de este tipo está dentro del alcance de un especialista experimentado.

En algunas realizaciones, los niveles de deposición de amiloide en el paciente antes del tratamiento con el agente anti-amiloide serán mayores que los niveles de deposición de amiloide en el paciente después del tratamiento con el agente anti-amiloide. Un resultado de este tipo indica que el agente anti-amiloide/la terapia anti-amiloide es eficaz en el tratamiento de enfermedades asociadas con la deposición de amiloide.

5 Por ejemplo, AN-1792 es una preparación del amiloide-beta ($A\beta$; longitud 1-2) sintético preagregado junto con adyuvante QS-21. Aproximadamente 300 pacientes de AD han sido tratados con esta preparación antes de la suspensión de la prueba clínica debida a efectos secundarios (Birmingham, K. y Frantz, S., 2002, Nature Medicine, 8: 199-200). A pesar de este contratiempo, se ha generado optimismo acerca de este enfoque por dos hallazgos. En primer lugar, en el único informe de autopsia publicado hasta ahora con relación a un paciente de AD tratado con AN-1792, se encontraron varios hallazgos inusuales que incluían: (i) áreas extensas de neocórtex con muy pocas placas de $A\beta$; (ii) las áreas de la corteza que estaban desprovistas de placas $A\beta$ contenían densidades de madejas, hilos de neuropilo y angiopatía de amiloide cerebral (CAA) similares a AD no inmunizada, pero carecían de neuritas distróficas asociadas a placas y racimos de astrocitos; (iii) en algunas regiones desprovistas de placas, la inmunorreactividad con $A\beta$ estaba asociada con microglia (Nicoll, J. et al., 2003, Nature Medicine, 9: 448-452). En segundo lugar, en un pequeño subconjunto de 30 pacientes tratados con AN-1792, aquellos pacientes que generaban anticuerpos contra $A\beta$, como se determinó por un ensayo de inmunorreactividad de las placas de amiloide tisular (TAPIR) exhibían tasas significativamente más lentas de disminución de las funciones y actividades cognitivas de la vida diaria, como se indicaba por el Mini Mental State Examination, el Disability Assessment for Dementia, y el Visual Paired Associates Test de recuerdo retardado de la Wechsler Memory Scale, en comparación con pacientes sin tales anticuerpos (Hock, C. et al., 2003, Neuron, 38: 547-554).

Se ha demostrado previamente que el trazador PET de formación de imágenes de amiloide de benzotiazol {N-metil- ^{11}C }2-[4'-(metilamino)fenil]6-hidroxibenzotiazol ($[^{11}C]$ PIB) exhibe una clara diferencia en retención entre los pacientes AD y los individuos de control, y que la retención de $[^{11}C]$ PIB sigue la topografía conocida de deposición de amiloide en el cerebro AD (Klunk, et al., 2004, Ann. Neurol., 55 (3): 306-19). Para determinar si las sondas de imágenes de amiloide de benzotiazol podrían ser sensibles a los cambios en la deposición de amiloide cerebral causados por una terapia anti-amiloide en general, se realizó un test por inmunización con AN-1792. Se realizaron estudios respecto a la fijación de {N-metil- 3H }2-[4'-(metilamino)fenil]6-hidroxibenzotiazol ($[^3H]$ PIB) a homogeneizados de la corteza frontal y de cerebelo obtenidos de individuos de control (n=4), pacientes de AD (n=5) y de un caso aislado de AD tratado con AN-1792 (por duplicado). Véase, v.g., el Ejemplo 9. La corteza frontal de los pacientes de AD acusaba una fijación elevada de $[^3H]$ PIB comparada con el cerebro de control. En cambio, la fijación de $[^3H]$ PIB al cerebro tratado con AN-1792 no acusaba aumento alguno de fijación de $[^3H]$ PIB con respecto a la corteza frontal de control. Considerados en su conjunto, estos datos sugieren que las sondas de imágenes de amiloide de benzotiazol que son útiles como trazadores PET, tales como $[^{11}C]$ PIB, podrían detectar cambios en la deposición de amiloide en el cerebro AD inducida por el tratamiento con AN-1792 y por otras terapias que tienen un efecto significativo sobre la deposición de amiloide en AD.

A no ser que el contexto dicte claramente otra cosa, las definiciones de términos singulares pueden extrapolarse para aplicación a sus homólogos plurales tal como aparecen en la solicitud; y análogamente, las definiciones de términos plurales se pueden extrapolar para aplicación a sus homólogos singulares tal como aparecen en la solicitud.

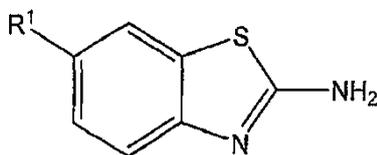
Para ilustrar la presente invención se proporcionan los ejemplos siguientes, en los cuales los Ejemplos 3, 4, y 6 se refieren a la invención reivindicada.

EJEMPLOS

Los compuestos de la invención se pueden preparar por métodos que son bien conocidos en la técnica. Véase, v.g. WO 02/16.333 y la publicación de patente U. S. No. 2003/0236.391, publicada el 25 de diciembre de 2003.

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 lámpara UV. La cromatografía flash se realizó sobre gel de sílice 60 (mallas 230-400), adquirida de Mallinckrodt Company. La TLC de fase inversa se adquirió de Whiteman Company.

Metodología General para la Síntesis del Compuesto de la Invención:



R¹ es hidrógeno, -OH, -NO₂, -COOR, CH₃, -OCH₂OR, CH₃, CH₃O- o Br, en donde uno o más de los átomos de R¹ pueden ser un átomo radiomarcado;

5 se hidroliza por uno de los dos procedimientos siguientes:

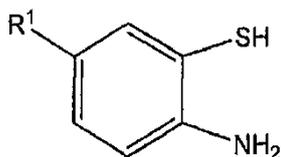
Preparación de 2-aminotiofenol por hidrólisis:

10 El 2-aminobenzotiazol sustituido en posición 6 (172 mmol) se suspende en KOH al 50% (180 g de 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.

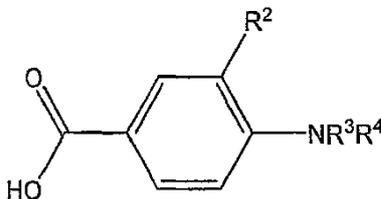
15 Preparación de 2-aminotiofenol por hidracinólisis:

El benzotiazol sustituido en posición 6 (6,7 mmol) se suspende en etanol (11 ml, anhidro) y se añade hidracina (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 pH 5 con ácido acético. El precipitado se recoge por filtración y se lava con agua para dar el producto deseado.

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



25 se acopla a un ácido benzoico de la fórmula



30 en donde R² es hidrógeno, R³ es hidrógeno y R⁴ es hidrógeno o metilo por la metodología siguiente:

Una mezcla de 2-aminotiofenol sustituido en posición 5 (4,0 mmol), el ácido benzoico (4,0 mmol), 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.

El hidrógeno R² puede sustituirse con un halógeno no radiactivo o un halógeno radiactivo por la reacción siguiente:

40 A una solución de 2-(4'-aminofenil)-benzotiazol sustituido en posición 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 microlitros de ácido acético) seguido por 27 µl (aprox. 5mCi) de yoduro de sodio [¹²⁵I] (actividad específica 2175 Ci/milimol). La mezcla de reacción se agita a la temperatura ambiente durante 2,5 horas y se apaga con solución saturada de hidrogenosulfito 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 la desprotección del grupo metanosulfonilo, se añaden 0,5 ml de NaOH 1M a la solución eluida del compuesto intermedio radiomarcado. La mezcla se calienta a 5 °C durante 2 horas. Después de ser apagada por 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 radiomarcado, que tiene una radiactividad de aprox. 3 mCi, se eluye del SepPak con 2 ml de metanol. La solución se condensa con una corriente de nitrógeno a 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 a los 4-6 minutos, y 2,0 ml/minuto después de 6 minutos, tiempo de retención 23,6). las fracciones recogidas se cargan en un SepPak C8 Plus. La elución con 1 ml de etanol dio aprox. 1 mCi del producto radiomarcado final.

55

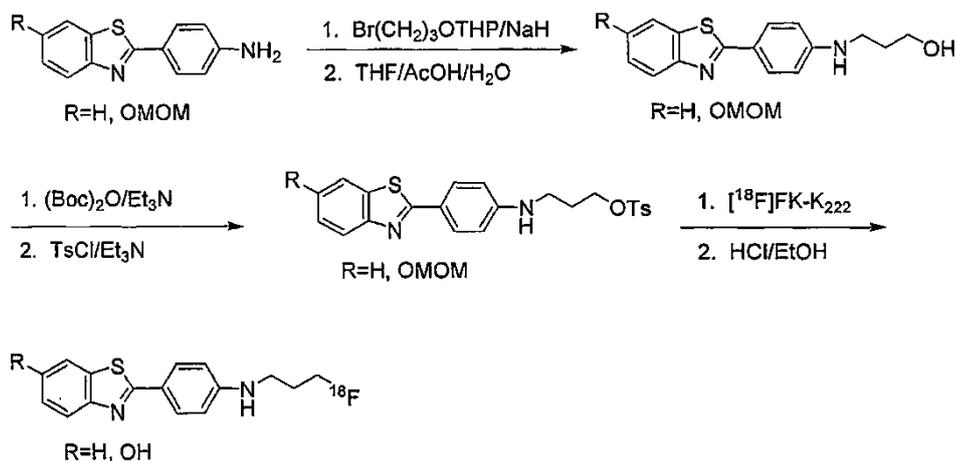
Cuando ambos R³ y R⁴ son hidrógeno, entonces R⁴ puede convertirse en metilo por reacción con haluro de metilo en las condiciones siguientes:

- 5 A una solución de 2-(4'-aminofenil)-benzotiazol sustituido en posición 6 (0,013 mmol) en DMSO (anhidro, 0,5 ml) se añade haluro de metilo (0,027 mmol) y K₂CO₃ anhidro (100 mg, 0,75 mmol). La mixtura de reacción se calienta a 100 °C durante 16 horas. Después de enfriar a la temperatura ambiente, la mixtura de reacción se purifica directamente por TLC preparativa en fase normal para dar los derivados de 2-(4'-metil-aminofenil)-benzotiazol sustituidos en posición 6 deseados.
- 10 Cuando R² es hidrógeno o un halógeno no radiactivo, R⁴ es C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alqueno o C₂-C₆ alquino, en donde el alquilo, alqueno o alquino comprende un carbono radiactivo o está sustituido con un halógeno radiactivo, pudiendo sintetizarse el compuesto por una de las secuencias siguientes:

Para incorporación de carbono radiactivo:

- 15 Aproximadamente 1 Ci de dióxido de carbono [¹¹C] se produce 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 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 1 vial de reacción que contiene el precursor para radiomarcación. El precursor, 2-(4'-aminofenil)-benzotiazol sustituido en posición 6 (~3,7 μmol), se disuelve en 400 μl de DMSO. Se añade KOH seco (10 mg), y el vial en V de 3 ml se agita enérgicamente durante 5 minutos. Se borbotea a través de la solución yoduro de metilo [¹¹C] sin portador añadido a 30 ml/minuto a la temperatura ambiente. Se calienta la reacción 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 60% acetonitrilo/40% tampón de fosfato de trietilamonio de pH 7,2 (caudal de 5 ml/minuto durante 0-7 minutos, aumentado luego a 15 ml/minuto durante 7-30 minutos). La fracción que contiene [N-metil-¹¹C]-2-(4'-metilaminofenil)-benzotiazol sustituido en posición 6 (a aproximadamente 15 minutos) se recoge y se diluye con 50 ml de agua, después del cual se eluye a través de 1 cartucho Waters SepPak C18 Plus. El cartucho SepPak C18 Plus se lava con 10 ml de agua, y el producto se eluye con 1 ml de etanol (absoluto) en 1 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 acetonitrilo/tampón de fosfato de trietilamonio 65/35, pH 7,2). El rendimiento radioquímico alcanza un promedio de 17% en EOS basado en yoduro de metilo [¹¹C], y la actividad específica alcanza un promedio de 160 GBq/μmol (4,3 Ci/μmol) al final de la síntesis.
- 35

Para incorporación de halógeno radiactivo:

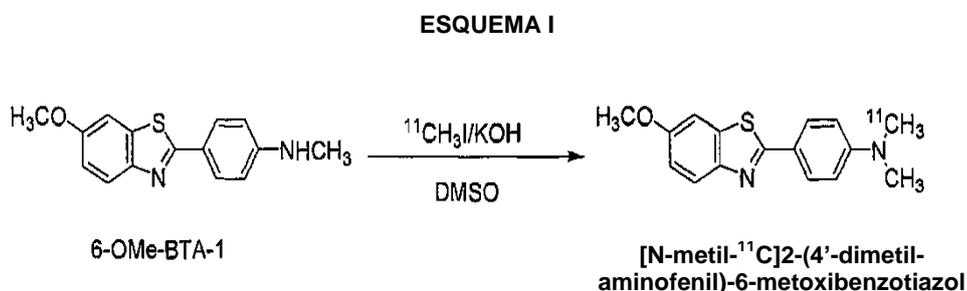


- 40 Una mixtura de 2-(4'-aminofenil)-benzotiazol sustituido en posición 6 (puede ser necesarios grupos protectores dependiendo de la naturaleza del sustituyente en posición 6 como se ha indicado arriba) (0,22 mmol), NaH (4,2 mmol) y 2-(-3-bromopropoxi)tetrahydro-2-H-pirano (0,22 mmol) en THF (8 ml) se calienta a reflujo durante 23 horas. Se elimina el disolvente 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 seca sobre MgSO₄ y se evapora a sequedad. Se añade al residuo solución AcOH/THF/H₂O (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 NaHCO₃, se seca sobre MgSO₄, y se evapora a sequedad para dar un residuo que se purifica por TLC preparativa (hexano: acetato de etilo = 60:40) para dar el 2-(4'-(3'-hidroxipropilamino)-fenil)-benzotiazol (45%).
- 50

A una solución de 2-(4'-(3"-hidroxipropilamino)-fenil)-benzotiazol sustituido en posición 6 (0,052 mmol) y Et₃N (0,5 ml) disuelto en acetona (5 ml) se añade (Boc)₂O (50 mg, 0,22 mmol). La mixtura de reacción se agita la temperatura ambiente durante 6 horas, seguido por adición de cloruro de tosilo (20 mg, 0,11 mmol). La mixtura 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 NaCO₃, se seca sobre MgSO₄, se evapora, y se purifica con columna flash (hexano/acetato de etilo = 4/1) para dar el 2-(4'-(3"-toluenosulfonoxipropilamino)-fenil)-benzotiazol sustituido en posición 6 deseado (13%). Este 2-(4'-(3"-toluenosulfonoxipropilamino)-fenil)-benzotiazol sustituido en posición 6 se somete a continuación a radiofluoración por métodos estándar como sigue:

Una diana de ciclotrón que contiene 0,35 ml de agua enriquecida con [O-18] al 95% se irradia con protones de 11 MeV a 20 µA de corriente de haz durante 60 minutos, y los contenidos se transfieren a un vial de reacción de 5 ml que contiene Kryptofix 222 (22,3 mg) y K₂CO₃ (7,9 mg) en acetonitrilo (57 µl). La solución se evapora a sequedad 3 veces a 110 °C bajo una corriente de argón después de la adición de partes alícuotas de 1 ml de acetonitrilo. Al fluoruro [F-18] secado se añaden 3 mg de 2-(4'-(3"-toluenosulfonoxipropilamino)-fenil)-benzotiazol 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 a la solución de reacción 0,3 ml de tampón de acetato de sodio 2M, seguido de purificación por HPLC semi-preparativa utilizando una columna Phenomenex Prodigy ODS-prep C₁₈ (10 µm 250 x 10 mm) eluida con 40% acetonitrilo/60% tampón trietilamina-fosfato 60 mM (v/v) pH 7,2 a un caudal de 5 ml/minuto durante 15 minutos, después de lo cual se aumenta el flujo a 8 ml/minuto durante el resto de la separación. El producto, 2-(4'-(3"-fluoropropilamino)-fenil)-benzotiazol sustituido en posición 6 [F-18] se eluye en ~20 minutos en un volumen de aproximadamente 16 ml. La fracción que contiene 2-(4'-(3"-fluoropropilamino)-fenil)-benzotiazol sustituido en posición 6 [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) a un vial estéril. La solución se diluye con 10 ml de solución salina estéril normal para inyección intravenosa en animales. El producto 2-(4'-(3"-fluoropropilamino)-fenil)-benzotiazol sustituido en posición 6 [F-18] se obtiene con un rendimiento radioquímico de 2-12% al final de la biosíntesis de 120 minutos (sin corregir por desintegración) con una actividad específica media de 1500 Ci/milimol.

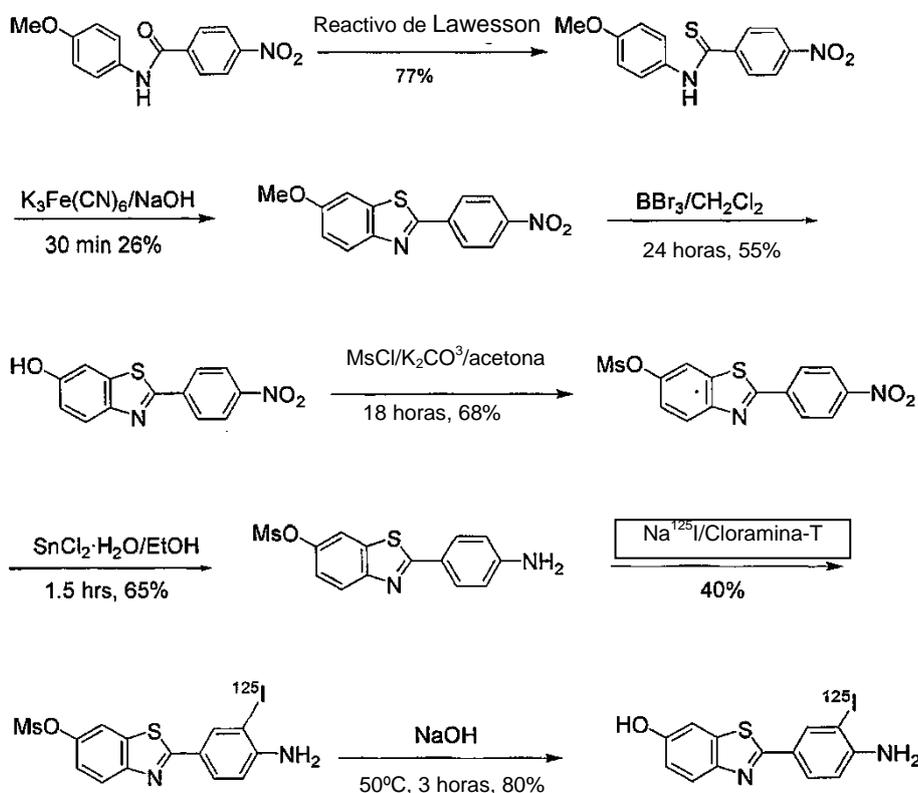
Ejemplo 1: Se sintetizó [N-metil-¹¹C]2-(4'-dimetilaminofenil)-6-metoxibenzotiazol de acuerdo con el esquema I.



Se produjo aproximadamente 1 Ci de dióxido de [¹¹C]carbono utilizando un ciclotrón de iones negativos CTI/Siemens RDS 112 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 [¹¹C]carbono se convierte en yoduro de [¹¹C] metilo 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 [¹¹C] metilo. El yoduro de [¹¹C] metilo se conduce en 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 µmol), se disolvió en 400 µl de DMSO. Se añadió KOH seco (10 mg), y el vial de 3 ml en V se agitó enérgicamente durante 5 minutos. Se borboteo yoduro de [¹¹C] metilo sin portador añadido a través de la solución a 30 ml/minuto a la temperatura ambiente. La reacción se calentó durante 5 minutos a 20 °C utilizando un baño de aceite. El producto de reacción se purificó por HPLC semi preparativa utilizando una columna Prodigy ODS-Prep eluida con 60% acetonitrilo/40% tampón de fosfato de trietilamonio de pH 7,2 (flujo a 5 ml/minuto durante 0-7 minutos, aumentado luego a 15 ml/minuto durante 7-30 minutos). La fracción que contenía [N-metil-¹¹C]2-(4'-dimetilaminofenil)-6-metoxibenzotiazol (a aproximadamente 15 minutos) se recogió y se diluyó con 50 ml de agua y se diluyó a través de un cartucho Waters SepPak Plus C18. El SepPak C18 se lavó con 10 ml de agua, y el producto se eluyó con 1 ml de etanol (absoluto) a un vial estéril seguido por 14 ml de solución salina. Las purezas radioquímica y química eran > 95% con se determinó por HPLC analítica (k' = 4,4 utilizando la columna analítica Prodigy ODS (3) eluida con 65/35 tampón acetonitrilo/fosfato de trietilamonio, pH 7,2). El rendimiento radioquímico promediaba 17% en EOS basado en yoduro de [¹¹C]metilo, y la actividad específica promediaba aproximadamente 160 GBq/µmol (4,3 Ci/µmol) al final de la síntesis.

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

Esquema II



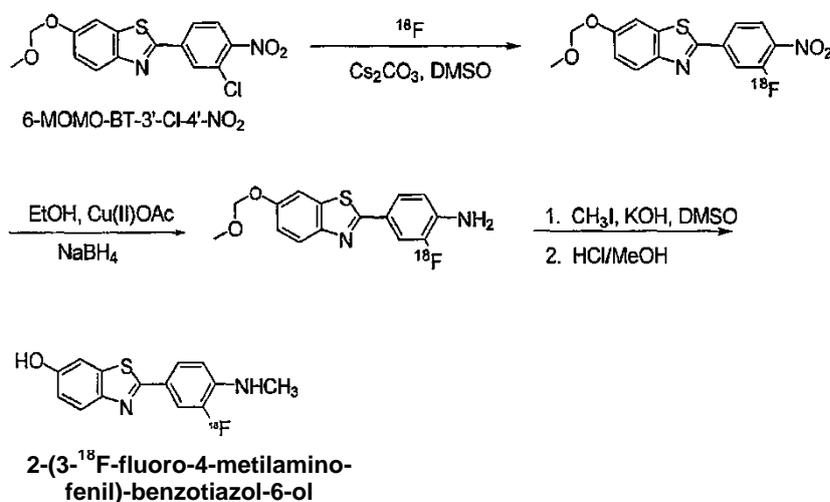
5

A una solución de 2-(4'-aminofenil)-6-metanosulfonoxibenzotiazol (1 mg) en 250 μ l de ácido acético en un vial herméticamente cerrado se añadieron 40 μ l de solución de cloramina T (28 mg disueltos en 500 μ l de ácido acético) seguido por 27 μ l (aprox. 5 mCi) de yoduro de sodio [¹²⁵I] (actividad específica 2175 Ci/milimol). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 2,5 horas y se apagó 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 metanosulfonylo, se añadieron 0,5 ml de NaOH 1M a la solución eluida del compuesto intermedio radioyodado. La mezcla se calentó a 50°C durante 2 horas. Después de ser enfriada por 500 μ l de ácido acético 1 M, la mezcla de reacción se diluyó con 40 ml de agua y se cargó en un 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 condensó por una corriente de nitrógeno hasta 300 μ l, 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 en 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.

La preparación de los derivados radioyodados con ¹²³I procede análogamente a la síntesis arriba reseñada. Por ejemplo, el reemplazamiento de [¹²⁵I]yoduro de sodio con [¹²³I] yoduro de sodio en el método de síntesis proporcionaría el compuesto radiomarcado con ¹²³I. Dicha sustitución de un átomo de radiohalógeno 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.)

30

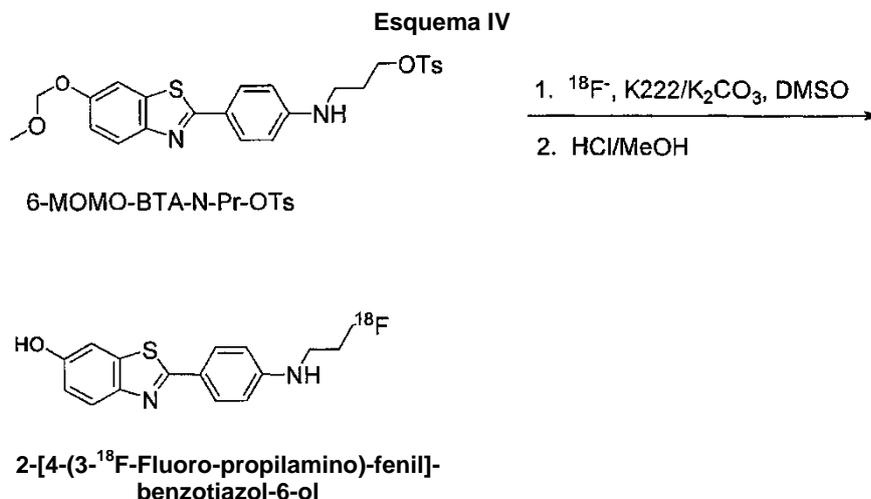
Ejemplo 3: Se sintetizó 2-(3-¹⁸F-fluoro-4-metilamino-fenil)-benzotiazol-6-ol de acuerdo con el Esquema III.



5

Una diana de ciclotrón que contenía 0,35 ml de agua enriquecida con [O-18] al 95% se irradió con protones de 11 MeV a 20 μA de corriente de haz durante 60 minutos, y los contenidos se transfirieron a un vial de reacción de 5 ml que contenía 2 mg de Cs_2CO_3 en acetonitrilo (57 μl). La solución se evaporó a sequedad a 110 °C en corriente de argón 3 veces utilizando partes alícuotas de 1 ml de acetonitrilo. Al fluoruro [¹⁸F] seco se añadieron 6 mg de 6-MOMO-BT-3'-Cl-4'-NO₂ en 1 ml de DMSO, y el vial de reacción se selló y se calentó a 120°C durante 20 minutos (la incorporación radioquímica para este primer paso de radiosíntesis fue aproximadamente 20% de fluoruro [¹⁸F] solubilizado). A la mezcla de reacción bruta se añadieron 8 ml de agua y 6 ml de dietil-éter, y la mezcla se agitó y se dejó separar. La fase etérea se retiró 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 proceder 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 agitó la mezcla y se separó la fase etérea. La fase de dietil-éter se secó en corriente de argón a 120°C. Se añadieron al vial de reacción 700 μl de DMSO que contenía 30 μmol 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 μl 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-preparativa utilizando una columna Phenomenex Prodigy ODS C18 (10 μm 250 x 10 mm) eluida con 35% acetonitrilo/65% tampón trietilamina-fosfato 60 mM (v/v) pH 7,2 a un caudal de 5 ml/minuto durante 2 minutos, y luego se aumentó 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 normal estéril para inyección intravenosa en animales. El producto 2-(3-¹⁸F-fluoro-4-metilamino-fenil)-benzotiazol-6-ol se obtuvo con 0,5% de rendimiento radioquímico (n = 4) al final de la radiosíntesis de 120 minutos (sin corregir por desintegración) con una actividad específica media de 1000 Ci/milimol. Las puridades radioquímica y química de 2-(3-¹⁸F-fluoro-4-metilamino-fenil)-benzotiazol-6-ol se ensayaron 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% tampón trietilamina-fosfato 60 mM (v/v) pH 7,2. El 2-(3-¹⁸F-fluoro-4-metilaminofenil)-benzotiazol-6-ol tenía un tiempo de retención de ~11 minutos a un caudal de 2 ml/minuto (k' = 5,5). La pureza radioquímica era > 99%, y la pureza química era > 90%. La identidad radioquímica de 2-(3-¹⁸F-fluoro-4-metilaminofenil)-benzotiazol-6-ol se confirmó por radio-HPLC de fase inversa utilizando una muestra de control de calidad del producto radioquímico final co-inyectada con un estándar auténtico (frío).

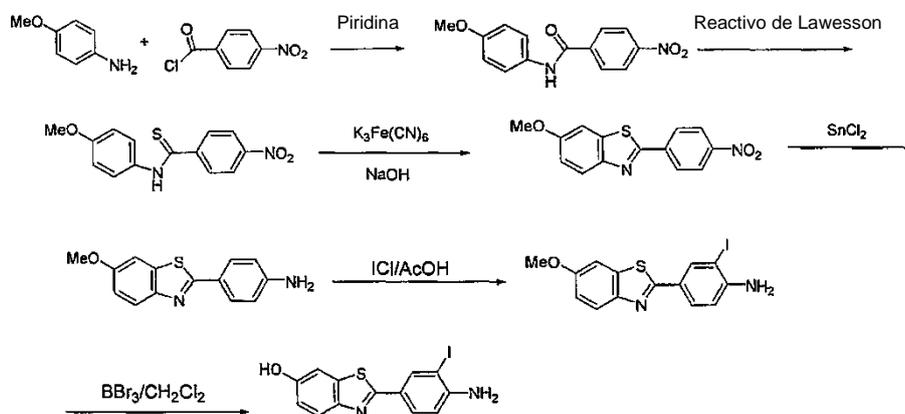
Ejemplo 4: Se sintetizó 2-[4-(3-¹⁸F-Fluoro-propilamino)-fenil]-benzotiazol-6-ol de acuerdo con el esquema IV.



5

Una diana de ciclotrón que contenía 0,35 ml de agua enriquecida con [O-18] al 95% se irradió con protones de 11 MeV a 20 μ A de corriente de haz durante 60 minutos, y los contenidos se transfirieron a un vial de reacción de 5 ml que contenía Kryptofix 222 (22,3 mg) y K₂CO₃ (7,9 mg) en acetonitrilo (57 μ l). La solución se evaporó a sequedad 3 veces a 110 °C bajo una corriente de argón después de la adición de partes alícuotas de 1 ml de acetonitrilo. Al fluoruro [F-18] secado se añadieron 3 mg de 6-MOMO-BTA-N-Pr-OTs en 1 ml de DMSO, y el vial de reacción se selló 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 a la solución de reacción 0,3 ml de tampón de acetato de sodio 2M, seguido de purificación por HPLC semi-preparativa utilizando una columna Phenomenex Prodigy ODS prep C18 (10 μ m 250 x 10 mm) eluida con 40% acetonitrilo/60% tampón trietilamina-fosfato 60 mM (v/v) pH 7,2 a un caudal de 5 ml/minuto durante 15 minutos, y el flujo se aumentó luego a 8 ml/minuto durante el resto de la separación. El producto [F-18]6-HO-BTA-N-PrF se eluyó al cabo de ~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 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/milimol. Las purzas 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 μ m, 250 x 4,6 mm) eluida con 40% acetonitrilo/60% tampón trietilamina-fosfato 60 mM (v/v) pH 7,2. [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 > 90%, 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 co-inyectada con un estándar auténtico (frío).

30 **Ejemplo 5: Síntesis de 2-(3'-yodo-4'-aminofenil)-6-hidroxibenzotiazol**



Preparación de 4-metoxi-4'-nitrobenzanilida

Se disolvió p-anisidina (1,0 g, 8,1 mmol) en piridina anhidra (15 ml), y se añadió cloruro de 4-nitrobenzoílo (15 g, 8,1 mmol). 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 por filtración a presión de 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).

10 Preparación de 4-metoxi-4'-nitrotiobenzanilida

Una mezcla de 4-metoxi-4'-nitrotiobenzanilina (1,0 g, 3,7 mmol) y reactivo de Lawesson (0,89 gramos, 2,2 milimoles, 0,6 equivalentes) en clorobenceno (15 ml) se calentó a reflujo durante 4 horas. Se evaporó el disolvente y el residuo se purificó en columna flash (hexano: acetato de etilo = 4:1) para dar 820 mg (77,4%) de producto como 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).

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

Se humedeció 4-metoxi-4'-nitrotiobenzanilida (0,5 g, 1,74 mmol) con un poco de etanol (~0,5 ml), y se añadió solución acuosa de hidróxido de sodio al 30% (556 miligramos, 13,9 milimoles, 8 equivalentes). La mezcla se diluyó con agua para proporcionar una solución/suspensión final de hidróxido sodio acuoso al 10%. Se añadieron partes alícuotas de esta mezcla con intervalos de 1 minuto a una solución agitada de ferricianuro de potasio (2,29 g, 6,9 milimoles, 4 equivalentes) 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 presión de vacío y se lavó con agua, purificándose luego 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).

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

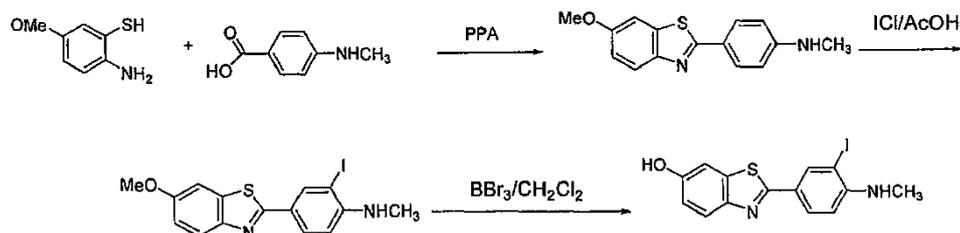
Una mezcla de 6-metoxi-2-(4-nitrofenil)benzotiazol (22 mg, 0,077 mmol) y cloruro de estaño (II) (132 mg, 0,45 mmol) en etanol hirviente se agitó bajo nitrógeno durante 4 horas. Se evaporó el etanol y el residuo se disolvió en acetato de etilo (10 ml), se lavó con hidróxido de sodio 1N (2 ml) y agua (5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

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

En una solución de 2-(4'-aminofenil)-6-metoxibenzotiazol (22 mg, 0,09 mmol) en ácido acético glacial (2,0 ml) se inyectó una solución 1M de cloruro de yodo en CH₂Cl₂ (0,10 ml, 0,10 mmol, 1,2 equivalentes) en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 16 horas. El ácido acético glacial se eliminó 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. Las capas orgánicas se combinaron 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 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).

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

En una solución de 2-(4'-amino-3'-yodofenil)-6-metoxibenzotiazol (5) (8,0 mg, 0,02 mmol) en CH₂Cl₂ (2,0 ml) se inyectó solución 1M de BBr₃ en CH₂Cl₂ (0,20 ml, 20 mmol) en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 18 horas. Después de apagar 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. 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 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 6: Síntesis de 2-(3'-yodo-4'-metilaminofenil)-6-hidroxibenzotiazol**5 Preparación de 6-metoxi-2-(4-metilaminofenil)benzotiazol**

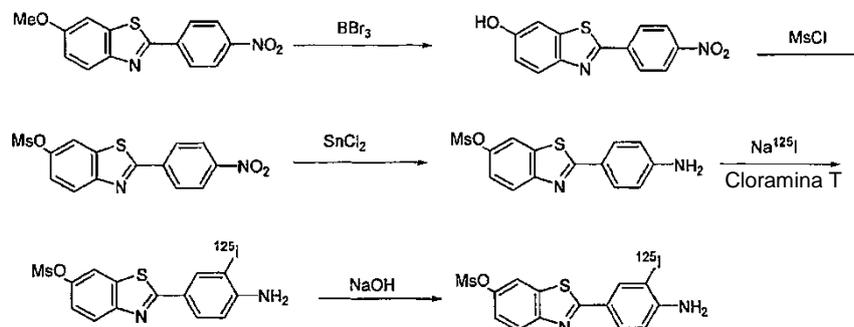
Una mezcla de ácido 4-metilaminobenzoico (11,5 g, 76,2 mmol) y 5-metoxi-2-aminotiofenol (12,5 g, 80 mmol) se calentó en PPA (~30 g) a 170 °C en atmósfera de N₂ durante 1,5 horas. La mezcla de reacción se enfrió luego a la temperatura ambiente y se vertió en solución de K₂CO₃ al 10%. El precipitado se filtró a presión reducida. El producto bruto se cristalizó dos veces en acetona/agua y THF/agua seguido por tratamiento con carbón activo para dar 4,6 g (21%) de 6-metoxi-2-(4-metilaminofenil)benzotiazol como un sólido amarillo. ¹HNMR (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).

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

A una solución de 2-(4'-metilaminofenil)-6-metoxibenzotiazol (20 mg, 0,074 mmol) disuelto en ácido acético glacial (2 ml) se añadió ICl (90 µl, 0,15 mmol, 1,2 equivalentes, 1M en CH₂Cl₂) bajo N₂. La reacción se dejó en agitación a la temperatura ambiente durante 18 horas. El ácido acético glacial se eliminó luego 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-metoxibenzotiazol (8 mg, 27%) como un sólido pardo. ¹HNMR(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).

25 Preparación de 2-(3'-yodo-4'-metilamino-fenil)-6-hidroxibenzotiazol

A una solución de 2-(4'-metilamino- 3'-yodofenil)-6-metoxibenzotiazol (2 mg, 0,03 mmol) disuelto en CH₂Cl₂ (4 ml) se añadió BBR³ (400 µl, 0,4 mmol, 1M en CH₂Cl₂) bajo N₂. La reacción se dejó en agitación a la temperatura ambiente durante 18 horas. Se añadió luego agua para apagar la reacción y la solución se neutralizó con NaHCO₃ y se extrajo con acetato de etilo (3 x 5 ml). Las capas orgánicas se combinaron, 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-hidroxibenzotiazol (5 mg, 43%) como un sólido pardo. ¹HNMR (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 7: Radiosíntesis de [¹²⁵I] 6-OH-BTA-0-3'-I**40 Preparación de 2-(4'-nitrofenil)-6-hidroxibenzotiazol**

A una suspensión de 2-(4'-nitrofenil)-6-metoxibenzotiazol (400 mg, 1,5 mmol) en CH₂Cl₂ (10 ml) se añadió BBR³ (1M en CH₂Cl₂, 10 ml, 10 mmol). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 24 horas. La reacción se extinguió luego con agua, y se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 ml). Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con agua, se secaron sobre MgSO₄, 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 %). $^1\text{H NMR}$ (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).

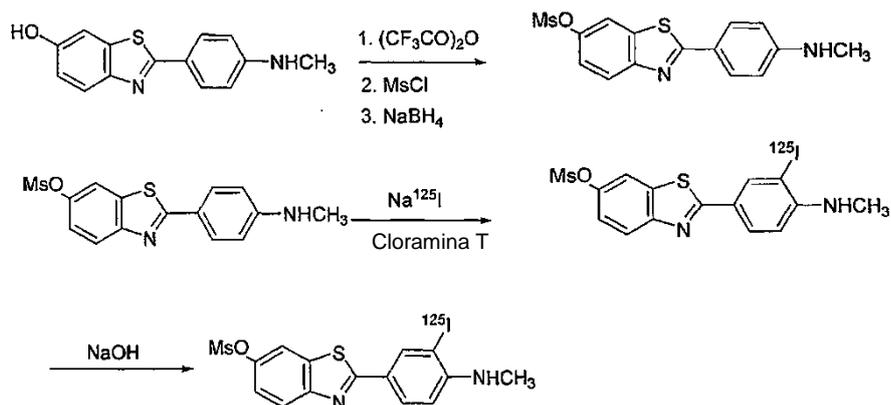
5 Preparación de 2-(4'-nitrofenil)-6-metilsulfoxibenzotiazol

A una solución de 2-(4'-nitrofenil)-6-hidroxibenzotiazol (50 mg, 0,18 mmol) disuelto en acetona (7 ml, anhidra) se añadió K_2CO_3 (100 mg, 0,72 mmol, pulverizado) y MsCl (200 μl). Después de agitar durante 2 horas, la mezcla 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-metilsulfoxibenzotiazol (44 mg, 68%) como sólido amarillo pálido. $^1\text{H NMR}$ (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).

15 Preparación de 2-(4'-aminofenil)-6-metilsulfoxibenzotiazol

A una solución de 2-(4'-nitrofenil)-6-metilsulfoxibenzotiazol (35 mg, 0,10 mmol) disuelto en etanol (10 ml) se añadió $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (50 mg). La mezcla 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 1N, con agua, y se secó sobre MgSO_4 . La evaporación del disolvente proporcionó 2-(4'-aminofenil)-6-metilsulfoxibenzotiazol (21 mg, 65%) como un sólido pardo claro. $^1\text{H NMR}$ (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 8: Radiosíntesis de [^{125}I] 6-OH-BTA-1-3'-I



25 A una solución de 2-(4'-metilaminofenil)-6-hidroxibenzotiazol (300 miligramos, 1,17 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 (20 ml) se añadieron Et_3N (2 ml) y ácido trifluoroacético (1,5 ml). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 3 horas. Se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo se disolvió 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, presecada sobre K_2CO_3), y se añadió K_2CO_3 (1,0 g, pulverizado) seguido por MsCl (400 mg, 3,49 milimoles). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente y se monitorizó por TLC ... desaparición del material de partida. El residuo se filtró luego. 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 mezcla 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), y los extractos se combinaron y secaron sobre MgSO_4 . Después de evaporación del disolvente, el residuo se purificó en columna flash (hexanos/acetato de etilo = 8:1) para dar el producto (184 mg, 47,0%) como un sólido pardo. $^1\text{H NMR}$ (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:

45 A una solución de 2-(4'-aminofenil)-6-metilsulfoxibenzotiazol o 2-(4'-metilaminofenil)-6-metilsulfoxibenzotiazol (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 yoduro de sodio [^{125}I] (actividad específica 2.175 Ci/milimol). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 2,5 horas y se apagó con solución saturada de hidrogenosulfuro de sodio. Después de dilución con 20 ml de agua, la mezcla de reacción se cargó en Plus SepPak C8 y se eluyó con 2 ml de metanol. Para la desprotección del grupo metanosulfonylo, se añadieron 0,5 ml de NaOH 1M a la solución eluida del compuesto intermedio radioyodado. La mezcla se calentó a 50 $^\circ\text{C}$ durante 2 horas. Después de ser extinguida por 500 μl de ácido acético 1M, la mezcla de reacción se diluyó

con 40 µl de agua y se cargó en un Plus SepPak C8. El producto radioyodado, que tenía una radiactividad de aprox. 3 mCi, se eluyó del SepPak con 2 ml de metanol. La solución se condensó por 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 en 4-6 min, y 2,0 ml/min después de 6 min, tiempo de retención 23,6). Las fracciones recogidas se cargaron en un Plus SepPak C8. La elución con 1 ml de etanol dio aprox. 1 mCi del producto radioyodado final.

Ejemplo 9. El tratamiento con la vacuna AN-1792 disminuye la fijación del trazador de amiloide, PIB, a los homogeneizados de cerebro

El trazador PET de imágenes de benzotiazol amiloide {N-metil-¹¹C}2-[4'-(metilamino)fenil]6-hidroxibenzotiazol ("["¹¹C]PIB") exhibe una diferencia clara en retención entre los pacientes AD y los Individuos de control. Esta retención de [¹¹C]PIB sigue la topografía conocida de la deposición de amiloide en el cerebro AD (Klunk et al. 2004, Ann. Neurol., 55(3): 306-19). Para determinar si las presentes sondas de imágenes de benzotiazol-amiloide son sensibles a cambios en la deposición cerebral de amiloide causados por una terapia anti-amiloide en general, se realizaron estudios respecto a la fijación de {N-metil-³H} 2-[4'-(metilamino)fenil]6-hidroxibenzotiazol ([³H]PIB) a homogeneizados de cerebro post-mortem de dos casos AD tratados con AN-1792. Se obtuvieron bloques congelados de corteza frontal, temporal y parietal y de cerebelo de cerebros de control (n = 4), cerebros AD (n = 5) y de dos cerebros de la prueba con AN-1792 (Ferrer et al. 2004, Brain Pathology 14,11-20; Masliah et al. 2005, Neurology 64,129-131). Se seccionaron los bloques (40 mm) y cada segunda sección se sometió a análisis histológico con anticuerpos específicos para Aβ40 o Aβ42 o el derivado fluorescente de rojo Congo, X-34 (específico de hoja beta). Las secciones intermedias se combinaron y se homogeneizaron en solución salina tamponada con Tris con inhibidores de proteasa. Una parte alícuota se sometió a ELISA para Aβ y otra parte alícuota se ensayó respecto a fijación de [³H]PIB después de dilución con solución salina tamponada con fosfato (100 mg de tejido, incubados con [³H]PIB 1 nM, se filtró, se lavó y se sometió a conteo para determinar el [³H]PIB fijado.

Neurológicamente, estos cerebros eran notables por una ausencia focal de placas en varias áreas corticales (Figuras 2-4). El caso Masliah (caso# 5180) estaba notablemente desprovisto de placas (Figuras 2-4) y exhibía niveles basales de Aβ y fijación de [³H]PIB (Figura 5). El caso Ferrer (caso #172) exhibía disminuciones muy evidentes en deposición de placas en el corteza frontal (Figuras 3 y 4), que estaban correlacionadas con niveles menores de Aβ y fijación de [³H] PIB (Figura 5).

Estos hallazgos respaldan las conclusiones siguientes:

1. La fijación de PIB proporciona evidencia de carga de amiloide disminuida en los casos tratados con AN-1792.
- 2.
3. Las disminuciones en la fijación de PIB están correlacionadas con evidencia histológica para eliminación de placas y con evidencia ELISA para eliminación de Aβ.
- 4.
5. Debería ser posible detectar disminuciones *in vivo* de la carga de amiloide que están causadas por terapias anti-amiloide.
- 6.

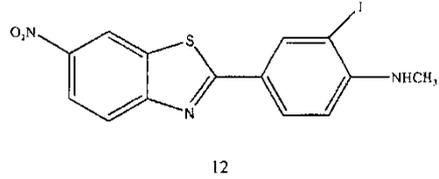
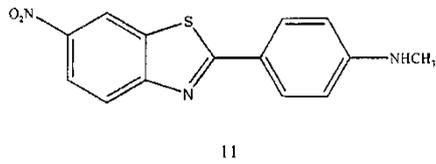
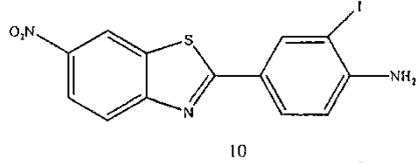
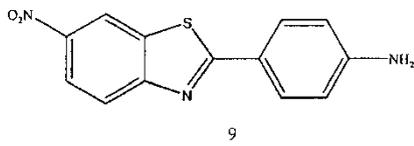
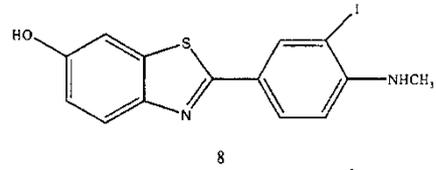
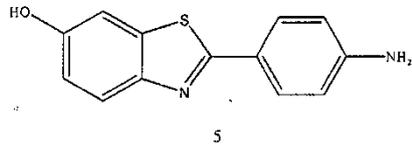
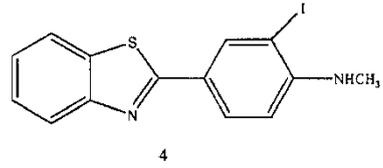
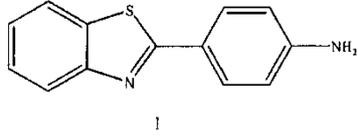
Adicionalmente, la naturaleza focal del aclaramiento de amiloide significa que podría monitorizarse todo el cerebro, y la formación de imágenes PET es muy adecuada para esto.

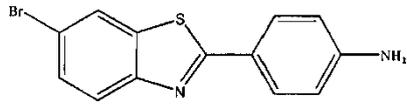
Otras realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica después de la consideración de la memoria descriptiva y la práctica la invención expuesta en esta memoria. Debe entenderse que la memoria descriptiva se considera únicamente como ilustrativa, estando indicados el verdadero alcance y espíritu de la invención por las reivindicaciones siguientes.

Como se utilizan en esta memoria y en las reivindicaciones que siguen, debe entenderse que los artículos singulares tales como "un", "una", y "uno", se refieren tanto al singular como al plural.

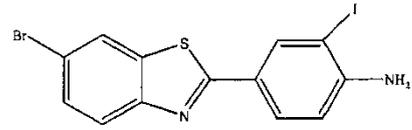
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado del grupo constituido por las estructuras 1, 4, 5, 8-16, 18, y 20-45, en donde el compuesto comprende al menos un marcador detectable seleccionado del grupo constituido por ^3H , ^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{76}Br , ^{75}Br , ^{18}F , ^{19}F , ^{11}C , ^{13}C , y ^{14}C :

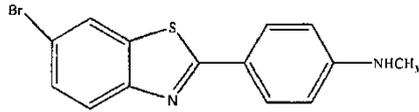




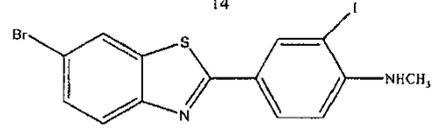
13



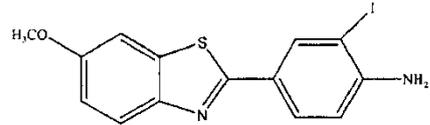
14



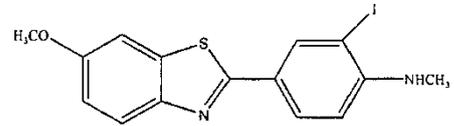
15



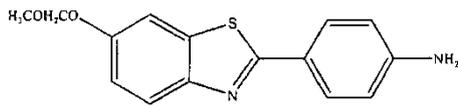
16



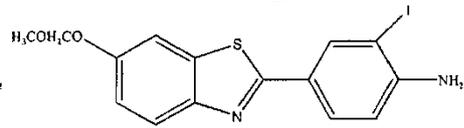
18



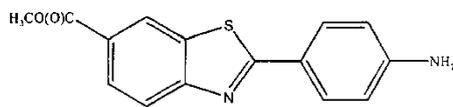
20



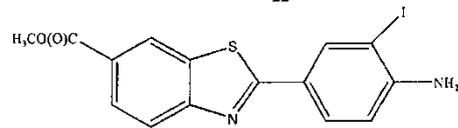
21



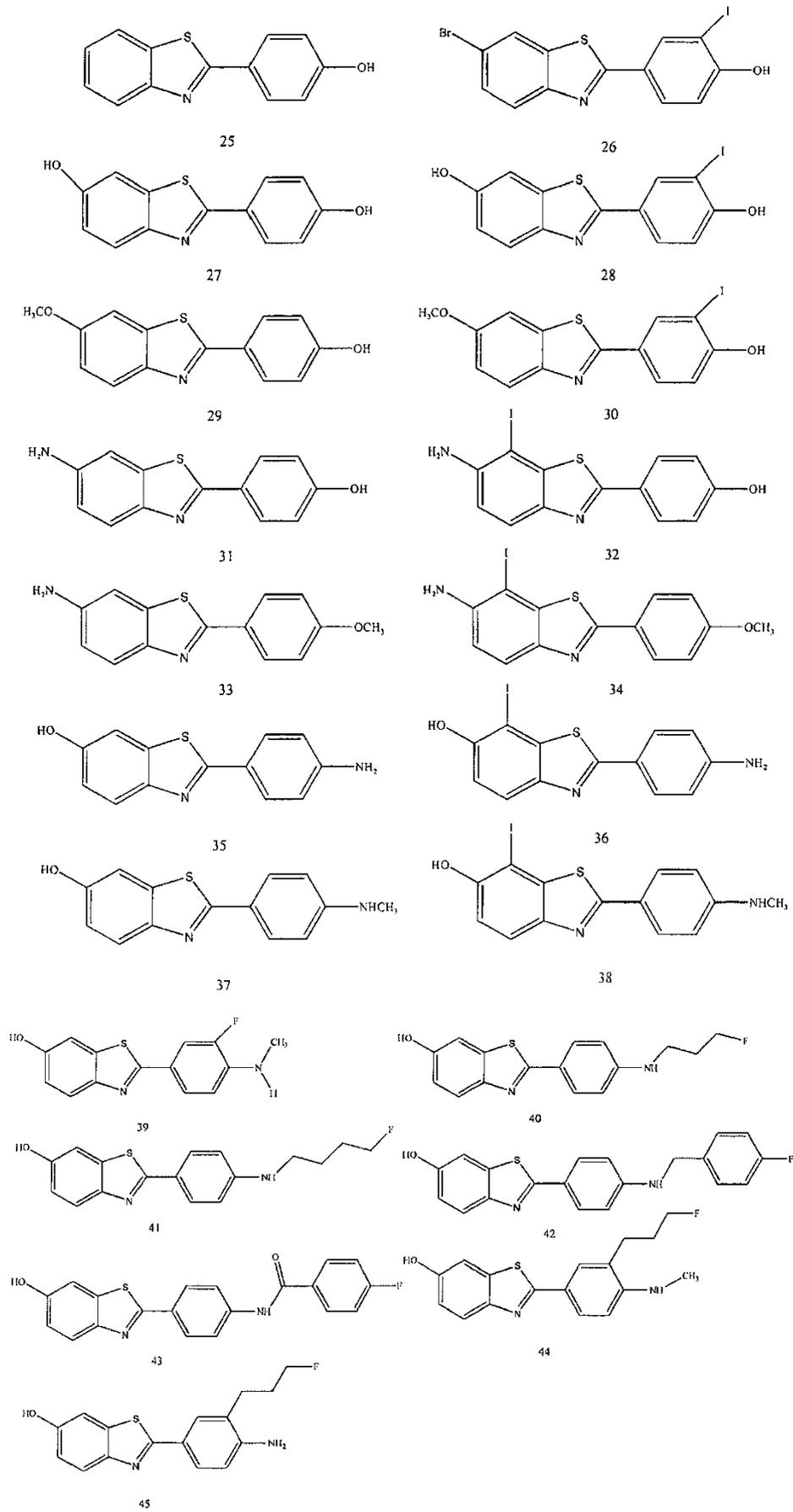
22



23



24



para uso en un método de determinación de la eficacia de la terapia en el tratamiento de la amiloidosis, comprendiendo dicho método:

- 5 (A) administrar a un paciente en necesidad de ello una cantidad eficaz de un compuesto como se define arriba;
- (B) formar imágenes de dicho paciente; y a continuación
- 10 (C) administrar a dicho paciente en necesidad de ello al menos un agente antiamiloides;
- (D) administrar subsiguientemente a dicho paciente en necesidad de ello una cantidad eficaz de un compuesto como se define arriba;
- 15 (E) formar imágenes de dicho paciente; y
- (F) comparar los niveles de deposición de amiloide en dicho paciente antes del tratamiento con dicho al menos un agente antiamiloides con los niveles de deposición de amiloide en dicho paciente después del tratamiento con dicho al menos un agente antiamiloides.
- 20

Figura 1

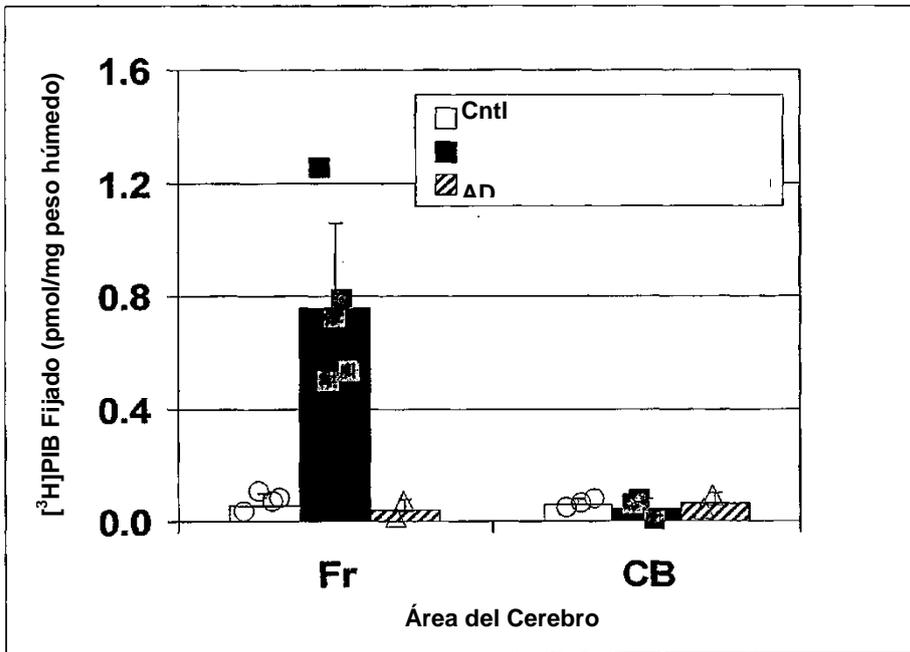


Figura 2

Corteza Temporal

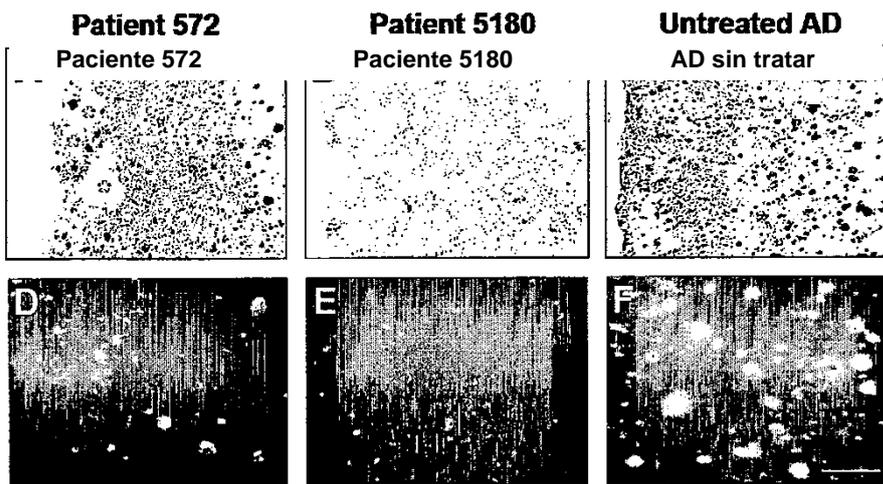


Figura 3

Corteza Frontal

Paciente 572

Paciente 5180

AD sin tratar

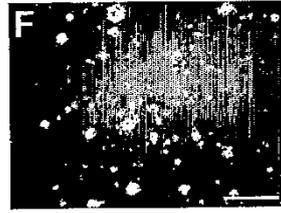
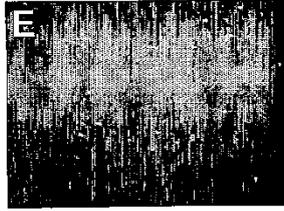
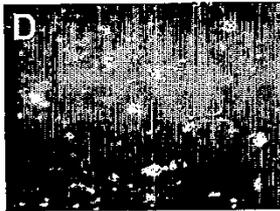
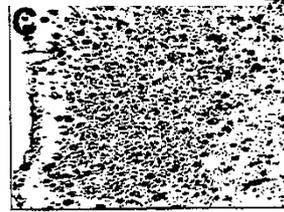
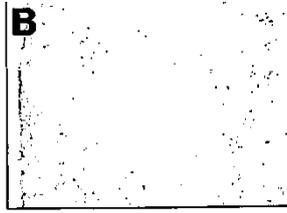


Figura 4

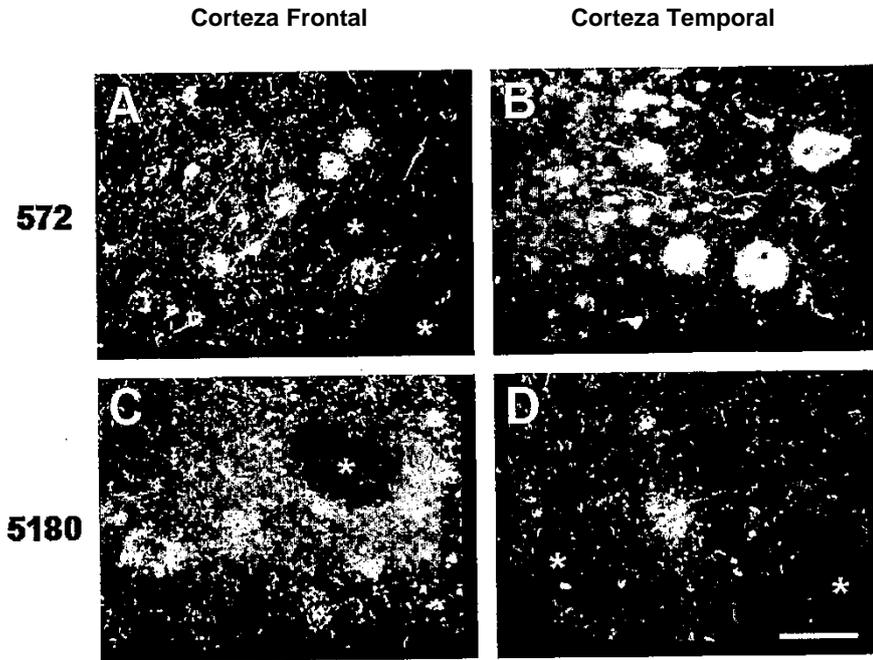


Figura 5

