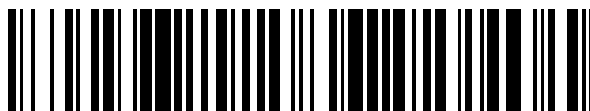


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 665**

51 Int. Cl.:

A61K 51/04 (2006.01)

G01N 33/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2009 E 09760593 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013 EP 2349352**

54 Título: **Uso de 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida como un biomarcador de los niveles de los receptores periféricos de las benzodiazepinas**

30 Prioridad:

28.10.2008 EP 08291013

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

02.04.2014

73 Titular/es:

SANOFI (50.0%)
54, rue La Boétie
75008 Paris, FR y
COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (50.0%)

72 Inventor/es:

BENAVIDES, JESUS;
BOUTIN, HERVÉ;
CASTEL, MARIE-NOËLLE;
DAMONT, ANNELAURE;
DOLLE, FRÉDÉRIC;
HANTRAYE, PHILIPPE;
MARGUET, FRANK;
ROONEY, THOMAS;
RIVRON, LUC;
TAVITIAN, BERTRAND y
THOMINIAUX, CYRILLE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 452 665 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 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida como un biomarcador de los niveles de los receptores periféricos de las benzodiazepinas

5 La presente invención se refiere al uso de 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida como biomarcador para la detección, en un individuo, de los niveles de PBR (receptor periférico de benzodiazepinas) asociados con estados normales y patológicos. La presente invención también se ocupa de un método de detección de los niveles de PBR para los propósitos anteriores.

10 Bajo estados fisiológicos normales, el PBR, también conocido como proteína translocadora 18 kDa (TSPO) (Papadopoulos, B. et al. (2006) *Trends Pharmacol. Sci.* 27: 402-409), se expresa en bajos niveles en el cerebro, principalmente en las células microgliales, y se expresa en gran medida en varios tejidos periféricos, tales como las glándulas adrenales, glándula pineal, glándulas salivares, gónadas, riñón, pulmón, corazón y músculo esquelético (Chen, M-K. y Guilarte, T. (2008) *Pharmacology and Therapeutics* 118: 1-17; Venneti, S. et al. (2006) *Progress in Neurobiol.* 80: 308-322). Estudios de localización subcelular con el ligando de referencia del PBR, el [3H]PK11195, han demostrado que el PBR está localizado en la membrana exterior de las mitocondrias (Anholt, R.R. et al. (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 576-583; Antkiewicz-Michaluk, L. et al. (1988) *Mol. Pharmacol.* 34: 272-278). Sin embargo, estudios inmunohistoquímicos también han mostrado que el PBR se expresa en células sanguíneas (desprovistas de mitocondrias) (Olson, J.M. et al. (1988) *Eur. J. Pharmacol.* 152: 47-53) y puede estar localizado en la membrana plasmática (O'Beirne, G. et al. (1990) *Eur. J. Biochem.* 188: 131-138; Woods, M.J. et al. (1996) *Biochem. Pharmacol.* 51: 1283-1292). También se ha observado una localización nuclear o perinuclear del PBR en el cáncer de mama (Hardwick, M. et al. (1999) *Cancer Res.* 59: 831-842), células de glioma humanas (Brown, R.C. et al. (2000) *Cancer Lett.* 156: 125-132), células de tumor hepático (Corsi, L. et al. (2005) *Life Sci.* 76: 2523-2533) y células gliales (Kuhlmann, A.C. y Guilarte, T.R. (2000) *J. Neurochem.* 74: 1694 - 1704).

25 Se observa un notable aumento en los niveles de PBR después de un daño celular, inflamación o proliferación, y está asociado con varios estados patológicos agudos y crónicos (Chen, M-K. y Guilarte, T. (2008) *Pharmacology and Therapeutics* 118: 1-17; Venneti, S. et al. (2006) *Progress in Neurobiology* 80: 308-322). Estas incluyen: lesiones cerebrales, tales como ictus y daño por isquemia-reperfusión (Gerhard, A. et al. (2000) *Neuroreport* 11: 2957-2960; Gerhard, A. et al. (2005) *Neuroimage* 24: 404-412), daño cerebral traumático (Raghavendra, R. et al. (2000) *Exp. Neurol.* 161: 102-114); infecciones cerebrales, tales como encefalitis (Banati, R.B. et al. (1999) *Neurology* 53: 2199-2203; Cagin, A. et al. (2001) *Brain* 124: 2014-2027); enfermedades neurológicas, tales como esclerosis múltiple (Banati, R.B. et al. (2000) *Brain* 123: 2321-2337), enfermedad de Alzheimer y demencia (Cagnin, A. et al. (2001) *Lancet* 358: 461-467; Versijpt, J.J. et al. (2003) *Eur. Neurol.* 50: 39-47), enfermedad de Parkinson (Ouchi, Y. et al. (2005) *Ann. Neurol.* 57: 168-175; Gerhard, A. et al. (2006) *Neurobiol. Dis.* 21: 404-412), esclerosis lateral amiotrófica (Turner, M.R. et al. (2004) *Neurobiol. Dis.* 15: 601-609), degeneración cortico-basal (Gerhard A. et al. (2004) *Mov. Disord.* 19: 1221-1226; Henkel, K. et al. (2004) *Mov. Disord.* 19: 817-821), enfermedad de Huntington (Messmer, K. y Reynolds, G.P. (1998) *Neurosci. Lett.* 241: 53-56; Pavese, N. et al. (2006) *Neurology* 66: 1638-1643) y epilepsia (Sauvageau, A. et al. (2002) *Metab. Brain Dis.* 17: 3-11). El aumento de los niveles de PBR en patologías del SNC se observa principalmente en las células microgliales (Chen, M-K. y Guilarte, T. (2008) *Pharmacology and Therapeutics* 118: 1-17; Venneti, S. et al. (2006) *Progress in Neurobiology* 80: 308-322).

40 También se observan grandes aumentos en el PBR en el cáncer (Cornu, P. et al. (1992) *Acta. Neurichir.* 119: 146-152; Hardwick, M. et al. (1999) *Cancer Res.* 59: 831-842; Maaser, K. et al. (2002) *Cancer Res.* 8: 3205-3209), inflamación pulmonar (Audi, S.H. et al. (2002) *Lung.* 180: 241-250; Hardwick, M.J. et al. (2005) *Mol. Imaging.* 4: 432-438), isquemia cardíaca (Mazzone, A. et al. (2000) *J. Am. Coll. Cardiol.* 36: 746-750), isquemia renal (Zhang, K. et al. (2006) *J. Am. Coll. Surg.* 203: 353-364), reumatismo (fibromialgia) (Faggioli, P. et al. (2004) *Rheumatology (Oxford)* 43: 1224-1225), degeneración del nervio ciático (Mills, C.D. et al. (2005) *Mol. Cell. Neurosci.* 30: 228-237), artritis psoriática (Guisti, L. et al. (2004) *Clin. Biochem.* 37: 61-66) y aterosclerosis (Fujimura, Y. et al. (2008) *Atherosclerosis*, 201: 108-111; Laitinen, I. et al. (2008) *Eur. J. Nuc. Med. Mol. Imaging* 36: 73-80).

50 Por contraste, se observa una disminución en los niveles de PBR en el cerebro de los pacientes de esquizofrenia (Kurumaji, A. et al. (1997) *J. Neural. Transm.* 104: 1361-1370; Wodarz, N. et al. (1998) *Psychiatry Res.* 14: 363-369) y en la artritis reumatoide (Bribes, E. et al. (2002) *Eur. J. Pharmacol.* 452: 111-122) y osteoartritis (Bazzichi, L. et al. (2003) *Clin. Biochem.* 36: 57-60).

La capacidad de tomar imágenes de los niveles de PBR in vivo en el cerebro y otros tejidos podría servir, por lo tanto, como un importante biomarcador de la progresión de la enfermedad, para determinar y evaluar la eficacia de un tratamiento terapéutico y para evaluar la ocupación del receptor PBR in vivo.

55 El ligando PET de referencia para PBR, [11C]PK11195, ha sido usado de manera extensa para la toma de imágenes in vivo de los niveles de PBR en varios estados neuropatológicos (Chen, M-K y Guilarte, T. (2008) *Pharmacology and Therapeutics* 118: 1-17; Venneti, S. et al. (2006) *Progress in Neurobiology* 80: 308-322). Sin embargo, el [11C]PK11195 muestra una absorción en el cerebro relativamente baja, una alta unión no específica y una pobre relación señal a ruido. Estas propiedades limitan la sensibilidad del [11C]PK11195 para la toma de imágenes PET de los niveles de PBR y estudios de ocupación en el SNC. El desarrollo de ligandos PET para PBR mejorados, con una

unión específica más alta y mayor sensibilidad que el $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ proporcionaría, por lo tanto, un importante avance para la toma de imágenes de los niveles de PBR en el cerebro y otros tejidos.

5 Entre los compuestos descritos y reivindicados en los documentos WO 99/06406 y WO 00/44384, un derivado de piridazino[4,5-b]indol, la 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida, fue identificado como particularmente interesante para el uso como ligando PET (o SPECT) para el PBR. Este compuesto tiene una alta afinidad por el PBR in vitro e in vivo (Ferzaz, B. et al. (2002) J. Pharm. Exp. Therap. 301: 1067-1078).

Compendio de la invención

10 La presente invención se ocupa del uso de una forma radiomarcada de 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida como biomarcador para la detección de niveles de PBR asociados con estados normales y niveles de PBR asociados con estados patológicos.

La presente invención también se ocupa de un método para la detección de niveles de PBR asociados con estados normales y niveles de PBR asociados con estados patológicos usando una forma radiomarcada de 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida.

15 Definiciones

Por razones de conveniencia y para facilitar la lectura, el compuesto 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida se ha renombrado como "A" en algunos capítulos de la presente solicitud.

Para la presente invención, las siguientes palabras se deben entender de la manera que sigue.

20 • Biomarcador: una característica que puede ser medida objetivamente (es decir, con precisión y reproducibilidad aceptables) y usada como indicador de un proceso fisiológico normal o patológico y para evaluar la acción de terapias médicas. Un biomarcador puede ser un parámetro biológico, anatómico, fisiológico, bioquímico o molecular que puede ser detectado en un tejido o en un fluido biológico.

25 • Inflamación: respuesta al daño o la destrucción de los tejidos. En la periferia, la inflamación aguda consiste en infiltrados leucocíticos caracterizados por células polimorfonucleares (neutrófilos) y la inflamación crónica consiste en células mononucleares (macrófagos, linfocitos, células del plasma). En el cerebro, la inflamación incorpora un amplio espectro de respuestas celulares, que incluyen la activación de la microglía y los astrocitos y la participación de citocinas y quimiocinas, proteínas del complemento, proteínas de fase aguda, daño oxidativo, y procesos moleculares relacionados. Estos sucesos pueden tener efectos perjudiciales sobre la función neuronal, conduciendo a un daño neuronal y activación glial posterior y finalmente neurodegeneración. En respuesta a la inflamación cerebral, las células gliales (mayoritariamente microglía) se activan y sobreexpresan el PBR. Los niveles de PBR en el cerebro son, por lo tanto, un indicador de la neuroinflamación, y pueden ser considerados como un biomarcador de la neuroinflamación para la presente invención.

35 • Estados patológicos: estos estados pueden incluir enfermedades neurológicas: cualquier daño, trastorno o enfermedad que afecte a la función del sistema nervioso central. Estos pueden incluir daños cerebrales agudos, tales como ictus, daño por isquemia-reperfusión y daño cerebral traumático; infecciones cerebrales, tales como encefalitis; enfermedades neurológicas, tales como esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, demencia, degeneración cortico-basal, enfermedad de Huntington y epilepsia; los estados patológicos también pueden incluir enfermedades psiquiátricas, tales como esquizofrenia; procesos inflamatorios periféricos, tales como inflamación pulmonar, aterosclerosis, isquemia cardíaca, isquemia renal, reumatismo (fibromialgia), artritis psoriática, artritis reumatoide y osteoartritis; enfermedades proliferativas, tales como cáncer.

40 • Ocupación del receptor: una medida de la cantidad de unión a una diana bioquímica o receptor. El nivel de ocupación del receptor para un fármaco se puede medir comparando las medidas de tiempo-actividad obtenidas con un ligando PET radiomarcado solo y cuando el ligando PET es dado después de la administración del fármaco sin marcar. El ligando PET debe unirse al mismo receptor que el fármaco sin marcar. La cantidad del ligando PET radiomarcado que se une al receptor disminuye en presencia de concentraciones crecientes del fármaco sin marcar. La magnitud de esta disminución se define como la ocupación del receptor del fármaco sin marcar.

50 • Toma de imágenes por PET: la tomografía de emisión de positrones es una técnica de toma de imágenes que produce una imagen o mapa tridimensional de procesos funcionales en el cuerpo. El sistema detecta pares de rayos gamma emitidos indirectamente por un radionúclido emisor de positrones (trazador), que es introducido en el cuerpo sobre una molécula biológicamente activa. Después se reconstruyen imágenes de la concentración del trazador en espacio tridimensional dentro del cuerpo mediante análisis por ordenador. Los materiales usados para la PET son escintiladores como germanato de bismuto, oxi-ortosilicato de lutecio u ortosilicato de gadolinio, debido a su alto poder de detención de rayos γ y velocidad de conversión de señales. La micro PET es la aplicación de la PET para la toma de imágenes en animales pequeños.

• Toma de imágenes por SPECT: la tomografía computerizada de emisión de fotones individuales es otra técnica de toma de imágenes que produce una imagen o mapa tridimensional de procesos funcionales en el cuerpo. El sistema detecta directamente rayos gamma emitidos por un radionúclido emisor de fotones individuales (trazador), que es introducido en el cuerpo sobre una molécula biológicamente activa. Después se reconstruyen también imágenes de la concentración del trazador en espacio tridimensional dentro del cuerpo mediante análisis por ordenador.

• Forma radiomarcada: cualquier molécula donde uno o varios átomos han sido reemplazados por isótopos que permiten su detección. Los radioisótopos emisores de positrones usados más frecuentemente para la toma de imágenes por PET son: carbono-11 (ó ^{11}C , $t_{1/2}=20$ min), nitrógeno-13 (ó ^{13}N , $t_{1/2}=10$ min), oxígeno-15 (ó ^{15}O , $t_{1/2}=2$ min). También son de consideración moléculas a las que se han añadido átomos adicionales con el fin de marcar los derivados con otros radioisótopos emisores de positrones para la toma de imágenes por PET, tales como flúor-18 (ó ^{18}F , $t_{1/2}=110$ min), pero también galio-68 (^{68}Ga , $t_{1/2}=68$ min), cobre-64 (^{64}Cu , $t_{1/2}=12,7$ h), bromo-76 (ó ^{76}Br , $t_{1/2}=16,1$ h) y yodo-124 (ó ^{124}I , $t_{1/2}=4,2$ días). Finalmente, también son de consideración moléculas a las que se han añadido otros átomos adicionales con el fin de marcar los derivados con radioisótopos emisores de fotones individuales para la toma de imágenes por SPECT, tales como yodo-123 (ó ^{123}I , $t_{1/2}=13,1$ h) o tecnecio-99m (ó $^{99\text{m}}\text{Tc}$, $t_{1/2}=6,0$ h).

La síntesis de ligandos radiomarcados y la sustitución de un átomo por un isótopo se pueden realizar mediante varias técnicas conocidas por las personas expertas en la técnica. Por ejemplo, para la sustitución de un átomo de carbono por un carbono-11, se pueden usar varios derivados, tales como yoduro de ^{11}C metilo o triflato de ^{11}C metilo (Welch M.J. et al. (2003) en Handbook of Radiopharmaceuticals - Radiochemistry and Applications (Welch MJ, Redvanly CS Eds.), New York-Chichester-Brisbane-Toronto, Wiley-Interscience Pub., 1-848). En el caso de A, varios grupos metilo pueden ser marcados con carbono-11, tales como las funciones N,N-dimetilacetamida o N-metilindol.

En el caso de un marcado con flúor-18, el radioisótopo puede unirse directamente a la estructura central (A) por sustituciones nucleófilas alifáticas o aromáticas (incluyendo heteroaromáticas (Dollé F. et al. (2005) Curr. Pharm. Design 11: 3221-3235)) o sustituciones electrófilas, o enlazarse mediante la adición de un grupo espaciador, siendo ambas técnicas conocidas por las personas expertas en la técnica (Kilbourn MR. (1990) en Fluorine-18 Labeling of Radiopharmaceuticals, Nuclear Science Series (Kilbourn MR Ed.), National Academy Press, Washington, D.C., 1-149; Lasne M.-C. et al. (2002) Topics in Current Chemistry 222: 201-258; Cai L. et al. (2008) Eur. J. Org. Chem. 17: 2853-2873; Dollé F. et al. (2008) en Fluorine and Health: Molecular Imaging, Biomedical Materials and Pharmaceuticals, Tressaud A, Haufe G (Eds). Elsevier: Amsterdam-Boston-Heidelberg-London-New York-Oxford-Paris-San Diego-San Francisco-Singapore-Sydney-Tokyo, 3-65). De particular interés es el uso de un enlazante de alquilo, alquenilo o alquinilo para la adición del átomo de flúor-18 (Damont A. et al. (2008) J. Label. Compds Radiopharm. 51: 286-292; Dollé F. et al. (2006) Bioorg. Med. Chem. 14: 1115-1125; Dollé F. et al. (2007) J. Label. Compds Radiopharm. 50: 716-723).

En el caso de un marcado con otro halógeno (tal como bromo-76, yodo-123 o yodo-124), el radioisótopo también puede unirse directamente por sustituciones nucleófilas o electrófilas a la estructura central (A) o enlazarse mediante la adición de un grupo espaciador, siendo ambas técnicas conocidas por las personas expertas en la técnica (Mazière B. et al. (2001) Curr. Pharm. Des. 7: 1931-1943; Coenen H.H. et al. (2006) en Radioiodination reactions for pharmaceuticals – Compendium for effective synthesis strategies, Coenen H.H., Mertens J., Mazière B. (Eds), Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 1-101).

En el caso del marcado con radioisótopos metálicos (tales como galio-68, cobre-64 o tecnecio-99m), el método preferido usado, que será considerado por una persona experta en la técnica, es el uso de un agente quelante bifuncional basado en, por ejemplo, los poliaminocarboxilatos de cadena abierta ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), el macrociclo poliaminocarboxílico ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), mercaptoacetildi- y triglicina (MAG2, MAG3), bis-(S-benzoil-tioglicolilo)diaminopropanoato ((SBT)2DAP) y ácido hidrazinonicotínico (HYNIC), que facilitan la complejación del catión radiometálico en una función y la unión covalente a la molécula central en otra (Brunner U.K. et al. (1995) Radiotracer production – Radiometals and their chelates en Principle of Nuclear Medicine, Wagner H.N. (Ed). Saunders: Philadelphia, 220-228; Weiner R.E. et al. (2003) Chemistry of gallium and indium radiopharmaceuticals en Handbook of Radiopharmaceuticals - Radiochemistry and Applications (Welch MJ, Redvanly CS Eds.), New York-Chichester-Brisbane-Toronto, Wiley-Interscience Pub., 363-400; Anderson C.J. et al. (2003) Chemistry of copper radionucleides and radiopharmaceutical products en Handbook of Radiopharmaceuticals - Radiochemistry and Applications (Welch MJ, Redvanly CS Eds.), New York-Chichester-Brisbane-Toronto, Wiley-Interscience Pub., 401-422; Mahmood A. et al. (2003) Technetium radiopharmaceuticals en Handbook of Radiopharmaceuticals - Radiochemistry and Applications (Welch MJ, Redvanly CS Eds.), New York-Chichester-Brisbane-Toronto, Wiley-Interscience Pub., 323-362).

La adición directa del átomo de flúor-18 (o bromo-76, yodo-123 o yodo-124) se puede realizar, por ejemplo, sobre los anillos aromáticos de 3-fenilo y/o del piridazino[4,5-b]indol, así como sobre cualquier otra posición químicamente accesible (tal como la función acetamida). La adición indirecta de estos radiohalógenos (por ejemplo mediante el uso de un grupo espaciador), o la adición de los isótopos radiactivos metálicos mencionados anteriormente (galio-68,

cobre-64 o tecnecio-99m, mediante el uso de un agente quelante), también se puede realizar en cualquier posición químicamente accesible del núcleo de la N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida (A) (véanse las referencias anteriores).

- Administración: con preferencia, la administración de un biomarcador radiomarcado es mediante una vía de administración intravenosa.

Una primera realización es el uso de 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida como biomarcador para la detección, en un individuo, de los niveles de PBR (receptor periférico de benzodiazepinas) asociados con estados patológicos, en el que dicho compuesto está radiomarcado, en donde la radiomarca se elige entre carbono-11, radiohalógenos y radiometales. Preferentemente dicho compuesto se radiomarca con carbono-11 y más preferentemente se radiomarca con carbono-11 sobre el carbono del grupo metilo situado en la posición 5 del núcleo de indol.

En otra realización, la 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida se radiomarca con radiometales, preferentemente sobre el anillo de 3-fenilo en la posición para, en la posición 7 del piridazino[4,5-b]indol en sustitución del átomo de cloro (con o sin un espaciador, ver más adelante), o en cualquier posición de N-metilo (función N,N-dimetilacetamida o el grupo metilo situado en la posición 5 del núcleo de indol).

En otra realización, la 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida se radiomarca con radiohalógenos, preferentemente se radiomarca con el radiohalógeno flúor-18, preferentemente sobre el anillo de 3-fenilo en la posición para, en la posición 7 del piridazino[4,5-b]indol en sustitución del átomo de cloro (con o sin un espaciador, ver más adelante), o en cualquier posición de N-metilo (función N,N-dimetilacetamida o el grupo metilo situado en la posición 5 del núcleo de indol).

En algunas realizaciones, la detección de los niveles de PBR y la inflamación se realiza mediante la toma de imágenes por PET (tomografía de emisión de positrones) o mediante la toma de imágenes por SPECT (tomografía computerizada de emisión de fotones individuales).

En algunas realizaciones de la invención, se usa una forma radiomarcada de 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida como biomarcador para la detección de cambios en los niveles de PBR y de la inflamación asociados con estados patológicos, en donde dichos estados patológicos se seleccionan entre lesiones cerebrales, tales como ictus, daño por isquemia-reperusión y daño cerebral traumático; infecciones cerebrales, tales como encefalitis; enfermedades neurológicas, tales como esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, demencia, degeneración cortico-basal, enfermedad de Huntington y epilepsia; enfermedades psiquiátricas, tales como esquizofrenia; procesos inflamatorios periféricos, tales como inflamación pulmonar, aterosclerosis, isquemia cardíaca, isquemia renal, reumatismo (fibromialgia), artritis psoriática, artritis reumatoide y osteoartritis; enfermedades proliferativas, tales como cáncer.

En algunas realizaciones de la invención, se usa una forma radiomarcada de 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida como biomarcador de niveles de PBR e inflamación, en donde la inflamación es neuroinflamación.

En algunas realizaciones de la invención, se usa una forma radiomarcada de 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida para evaluar la eficacia de un tratamiento terapéutico.

La presente invención también se ocupa de un método para la detección del PBR asociado con estados patológicos que usa una forma radiomarcada de 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida.

En algunas realizaciones, la forma radiomarcada de 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida contiene una radiomarca elegida entre carbono-11, radiohalógenos y radiometales. En algunas realizaciones, la forma radiomarcada de 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida se marca con carbono-11.

En algunas realizaciones, la forma radiomarcada de 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida se radiomarca sobre el carbono del grupo metilo situado en la posición 5 del núcleo de indol.

En algunas realizaciones, la forma radiomarcada de 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida se radiomarca con radiometales, preferentemente sobre el anillo de 3-fenilo en la posición para, en la posición 7 del piridazino[4,5-b]indol en sustitución del átomo de cloro (con o sin un espaciador, ver más adelante), o en cualquier posición de N-metilo (función N,N-dimetilacetamida o el grupo metilo situado en la posición 5 del núcleo de indol).

En algunas realizaciones, la 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida se radiomarca con radiohalógenos, preferentemente se radiomarca con el radiohalógeno flúor-18, preferentemente sobre el anillo de 3-fenilo en la posición para, en la posición 7 del piridazino[4,5-b]indol en sustitución del átomo de

cloro (con o sin un espaciador, ver más adelante), o en cualquier posición de N-metilo (función N,N-dimetilacetamida o el grupo metilo situado en la posición 5 del núcleo de indol).

5 En algunas realizaciones de la invención, los estados patológicos se seleccionan entre daños cerebrales, tales como ictus, daño por isquemia-reperusión, daño cerebral traumático; infecciones cerebrales, tales como encefalitis; enfermedades neurológicas, tales como esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, demencia, degeneración cortico-basal, enfermedad de Huntington y epilepsia; enfermedades psiquiátricas, tales como esquizofrenia; procesos inflamatorios periféricos, tales como inflamación pulmonar, aterosclerosis, isquemia cardíaca, isquemia renal, reumatismo (fibromialgia), artritis psoriática, artritis reumatoide y osteoartritis; enfermedades proliferativas, tales como cáncer.

10 Otra realización acorde con la invención es un método de detección del PBR asociado con estados patológicos, en donde la inflamación es neuroinflamación.

Otra realización acorde con la invención es un método de detección del PBR asociado con estados patológicos, que se realiza para estudios de ocupación.

15 Otra realización es 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida para uso en un método de detección del PBR e inflamación, comprendiendo dicho método las etapas siguientes:

a) Administrar una forma radiomarcada de 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida ;

b) Adquirir imágenes en una región de interés en el cerebro u otros tejidos periféricos usando la técnica PET (o SPECT);

20 c) Cuantificación de los niveles del PBR en una región de interés cuantificando la señal de PET asociada con una forma radiomarcada de 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida en esta región de interés;

d) Comparar la señal de PET (SPECT) obtenida en la etapa c) con la señal obtenida en una región de control de interés ;

25 e) Determinar la presencia de inflamación asociada con estados patológicos.

Los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la presente invención. Por razones de conveniencia y para facilitar la lectura, el compuesto 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida se ha renombrado como "A" en las figuras y los resultados.

30 Figura 1: Curvas de tiempo-actividad de [11C]-A y [11C]PK11195 en estriado ("striatum") de rata lesionado e intacto. Los datos se expresan como porcentaje de dosis inyectada por centímetro cúbico en función del tiempo de post-inyección (min).

Figura 2: La relación de la absorción de [11C]-A y [11C]PK11195 en estriado de rata lesionado frente a intacto controlateral.

35 Figura 3: Curvas de tiempo-actividad de [11C]-A en estriado de rata lesionado (ipsi) e intacto (contro). La flecha indica la adición de un exceso de 1mg/kg de PK11195 20 min después de la inyección de [11C]-A en estriado de rata lesionado (ipsi + PK) e intacto contralateral (contro + PK). Los datos se expresan como porcentaje de dosis inyectada por centímetro cúbico en función del tiempo de post-inyección (min).

40 Figura 4: Curvas de tiempo-actividad de [11C]-A en estriado de rata lesionado (ipsi A) e intacto (contro A). La flecha indica la adición de un exceso de 1mg/kg de A 20 min después de la inyección de [11C]-A en estriado de rata lesionado (ipsi A + A) e intacto contralateral (contro A+ A). Los datos se expresan como porcentaje de dosis inyectada por centímetro cúbico en función del tiempo de post-inyección (min).

45 Figura 5: Autorradiografía de [11C]-A (18 nM) en secciones de cerebro de rata (20 µm) 7-8 días después de la lesión. La unión no específica fue evaluada usando un exceso de bien PK11195 sin marcar (23 µM) o bien de A (22 µM). La especificidad para el PBR frente a sitios centrales de unión de benzodiazepinas fue evaluada usando un exceso de Flumazenil sin marcar (27 µM). Los datos se expresan como dpm por unidad de área arbitraria. * indica una diferencia significativa con relación a la unión de [11C]-A (18 nM) en el estriado lesionado.

Figura 6: Curvas de tiempo-actividad de [11C]-A y [11C]PK11195 en el cerebro entero (cerebelo excluido) de ratones transgénicos APP/S1 y PS1 de tipo salvaje (WT) de 11-12 meses. Los datos se expresan como porcentaje de dosis inyectada por centímetro cúbico en función del tiempo de post-inyección (min).

50 Figura 7: Autorradiografía de [11C]-A (18 nM) en secciones de cerebro entero de ratones transgénicos APP/PS1 y PS1 de tipo salvaje (WT) de 20-23 meses de edad. La unión no específica fue evaluada usando un exceso de bien PK11195 sin marcar (23 µM) o bien de A (22 µM). La especificidad para el PBR frente a sitios centrales de unión de

benzodiazepinas fue evaluada usando un exceso de Flumazenil sin marcar (27 μ M). Los datos se expresan como dpm por unidad de área arbitraria.

Figura 8: Curvas de tiempo-actividad (CTAs) de [11C]-A en 4 regiones cerebrales diferentes de un primate no humano (estriado derecho (R-str) e izquierdo (L-str), córtex prefrontal, cerebelo) e imágenes PET sumadas correspondientes de rodajas coronales de cerebro seleccionadas a lo largo de 120 min a diferentes puntos de tiempo del estudio : línea de base (A, B) y 24 h después de la lesión en el estriado derecho (C, D). El panel (E, F) muestra las curvas de tiempo-actividad de [11C]-A a 48 h después de la lesión en el estriado izquierdo y a 7 meses después de la lesión en el estriado derecho. Los datos se expresan como porcentaje de dosis inyectada por 100 ml (%ID/100 ml) en función del tiempo de post-inyección (min).

Figura 9: Curvas de tiempo-actividad de [11C]-A en 4 regiones cerebrales diferentes (estriado derecho (R-str) e izquierdo (L-str), córtex prefrontal, cerebelo) e imágenes PET sumadas correspondientes de rodajas coronales de cerebro seleccionadas a lo largo de 120 min a cuatro diferentes puntos de tiempo del estudio : línea de base (A, B), a 48 h después de la lesión (C, D), a 9 días después de la lesión (E, F) y a 16 días después de la lesión en el estriado izquierdo y a 48 h después de la lesión en el estriado derecho (G, H). La flecha indica el tiempo de administración del exceso de PK11195 sin marcar (1 mg/kg). Los datos se expresan como porcentaje de dosis inyectada por 100 ml (%ID/100 ml) en función del tiempo de post-inyección (min).

Figura 10: Análisis de metabolitos de [11C]-A en el plasma y el cerebro.

Figura 11: Formas seleccionadas de A marcadas con carbono-11 y marcadas con flúor-18.

Métodos

Radiosíntesis de ligandos

Marcado con carbono-11

[11C]PK11195 ((R)-N-[11C]Metil-N-(1-metilpropil)-1-(2-clorofenil)isoquinolina-3-carboxamida, enantiómero R). La preparación de [11C]PK11195 se basa en modificaciones menores de procedimientos publicados (Camsonne C. et al. (1984) J. Label. Comp. Radiopharm 21: 985-991; Cremer J.E. et al. (1992) Int. J. Rad. Appl. Instrum. B. 19: 159-66; Boutin, H. et al. (2007) Glia 55: 1459-68; Boutin, H. et al. (2007) J. Nucl. Med. 48: 573-581), e incluye las siguientes etapas : (1) atrapar a -10°C yoduro de [11C]metilo en DMF/DMSO (2/1 (v:v), 300 μ l) que contiene 1,5 a 2,0 mg del precursor para el marcado y 15-20 mg de hidróxido de potasio en polvo (exceso) ; (2) calentar a 110°C durante 3 min ; (3) recoger la mezcla con 0,5 ml de la fase móvil de HPLC, y (4) purificación usando HPLC semipreparativa. Se realizaron controles de calidad, en particular determinaciones de pureza radioquímica y química, sobre una alícuota del lote de producción final. [11C]-A (Marcado en la función N-metilindol: 7-Cloro-N,N-dimetil-5-[11C]metil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida). La preparación del [11C]-A incluye las siguientes etapas: (1) atrapar a -10°C triflato de [11C]metilo en DMF (300 μ l) que contiene 0,2 a 0,3 mg del precursor para el marcado y 4 mg de carbonato de potasio en polvo (exceso) ; (2) calentar a 120°C durante 3 min ; (3) recoger la mezcla con 0,5 ml de la fase móvil de HPLC, y (4) purificación usando HPLC semipreparativa. Se realizaron controles de calidad, en particular determinaciones de pureza radioquímica y química, sobre una alícuota del lote de producción final.

[11C]-A (Marcado en la función N,N-dimetilacetamida: 7-Cloro-N-[11C]metil-N,5-dimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida).

La preparación de [11C]-A también incluye las siguientes etapas : (1) atrapar a -10°C yoduro de [11C]metilo en una mezcla 1/2 (v:v) de DMF y DMSO (100/200 μ l) que contiene 0,5 a 1,0 mg del precursor para el marcado y 5 μ l de una disolución 1M de hidróxido de tetrabutilamonio en metanol ; (2) calentar a 120°C durante 3 min ; (3) recoger la mezcla con 0,5 ml de la fase móvil de HPLC, y (4) purificación usando HPLC semipreparativa. Se realizaron controles de calidad, en particular determinaciones de pureza radioquímica y química, sobre una alícuota del lote de producción final.

Marcado con flúor-18

La preparación de todos los derivados de A marcados con flúor-18 incluye al menos las siguientes etapas : (1) fluoración usando una fuente de [18F]fluoruro a temperatura de moderada a alta en un disolvente seleccionado (300 a 900 μ l) que contiene 1 a 10 mg del precursor apropiado para el marcado, y (2) purificación usando por ejemplo HPLC semipreparativa. Como se describió anteriormente, se realizaron controles de calidad, en particular determinaciones de pureza radioquímica y química, sobre una alícuota del lote de producción final.

No hay restricción particular en la naturaleza de las fuentes de aniones [18F]fluoruro para ser usadas en esta reacción, y se pueden usar igualmente aquí cualesquiera fuentes de aniones [18F]fluoruro usadas convencionalmente en las reacciones de este tipo, a condición de que no tengan un efecto adverso sobre otras partes de la molécula. Los ejemplos de fuentes adecuadas de aniones [18F]fluoruro incluyen: [18F]fluoruros de metales alcalinos, tales como [18F]fluoruro de sodio, [18F]fluoruro de potasio, [18F]fluoruro de cesio; [18F]fluoruro

de amonio, [18F]fluoruros de tetraalquilamonio, tales como [18F]fluoruro de tetrabutilamonio. De estos, se prefieren los [18F]fluoruros de metales alcalinos, y notablemente un fluoruro de potasio. La fuente de aniones [18F]fluoruro puede ser activada por la presencia de un ligando capaz de complejar las especies contracatiónicas de la fuente de aniones [18F]fluoruro. El ligando puede ser notablemente un ligando multidentado cíclico o policíclico. Los ejemplos de ligandos adecuados incluyen notablemente éteres corona tales como 1,4,7,10,13-pentaoxaciclooctadecano (18-C-6) o criptandos tales como 4,7,13,16, 21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo-[8,8,8]hexacosano, comercializado bajo el nombre K222®. Preferiblemente, la fuente de aniones [18F]fluoruro es un complejo de [18F]fluoruro de metal alcalino-criptato, notablemente un complejo [18F]fluoruro de potasio-criptato, preferiblemente el [18F]fluoruro de potasio - 4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo-[8,8,8]hexacosano (K[18F]/K222). El complejo K[18F]/K222® se puede preparar por cualquier método convencional (Dollé F. et al. (1999) J. Med. Chem. 42: 2251-2259 o Dolci L. et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. 7: 467-479).

La reacción de fluoración se puede realizar en diversos disolventes, y puede tener lugar sobre un amplio intervalo de temperaturas. En general, es conveniente llevar a cabo la reacción a una temperatura de aproximadamente 50°C a aproximadamente 200°C, y los disolventes usados más a menudo son el sulfóxido de dimetilo (DMSO), dimetilformamida (DMF) y acetonitrilo. El tiempo requerido para la reacción también puede variar ampliamente (desde aproximadamente 5 min hasta 15 min por ejemplo), dependiendo de muchos factores, notablemente la temperatura de reacción, la naturaleza de los reactivos y disolventes y la cantidad del precursor de marcado usado (Kilbourn MR. (1990) en Fluorine-18 Labeling of Radiopharmaceuticals, Nuclear Science Series (Kilbourn MR Ed.), National Academy Press, Washington, D.C., 1-149; Lasne M.-C. et al. (2002) Topics in Current Chemistry, 222: 201-258; Dollé F. et al. (2005) Curr. Pharm. Design 11: 3221-3235; Cai L. et al. (2008) Eur. J. Org. Chem. 17: 2853-2873; Dollé F. et al. (2008) en Fluorine and Health: Molecular Imaging, Biomedical Materials and Pharmaceuticals, Tressaud A, Haufe G (Eds). Elsevier: Amsterdam-Boston-Heidelberg-London-New York-Oxford-Paris-San Diego-San Francisco-Singapore-Sydney-Tokyo, 3-65). Los compuestos radiofluorados así preparados se purifican usualmente por HPLC, como se describe para los derivados marcados con carbono-11, pero también pueden ser recuperados o prepurificados de la mezcla de reacción mediante el uso de otras técnicas de cromatografía conocidas o simplemente por filtración sobre una columna de separación rellena previamente.

[18F]Fluoroetoxi-A (7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-(4-[18F]fluoroetoxi)-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida)

La preparación de [18F]fluoroetoxi-A incluye las siguientes etapas : (1) recoger el complejo K[18F]F-Kryptofix®222 con una disolución de DMSO (600 µl) que contiene el precursor tosiloxi para el marcado (2,0-8,0 mg) ; (2) calentar a 165°C durante 3-10 min ; (3) prepurificación usando un cartucho PrepSep C-8 o C-18 y (4) purificación usando HPLC semipreparativa. Se realizaron controles de calidad, en particular determinaciones de pureza radioquímica y química, sobre una alícuota del lote de producción final.

Marcado con otros halógenos (bromo-76, yodo-123, yodo-124)

La preparación de todos los demás derivados radiohalogenados (bromo-76, yodo-123, yodo-124) siguió técnicas estándar y procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica (Mazière B. et al. (2001) Curr. Pharm. Des. 7: 1931-1943; Coenen H.H. et al. (2006) en Radioiodination reactions for pharmaceuticals – Compendium for effective synthesis strategies, Coenen H.H., Mertens J., Mazière B. (Eds), Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 1-101).

Marcado con radiometales (galio-68, cobre-64 y tecnecio-99m)

La preparación de derivados marcados con radiometales (galio-68, cobre-64 y tecnecio-99m) también siguió técnicas estándar y procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica (Brunner U.K. et al. (1995) Radiotracer production – Radiometals and their chelates en Principle of Nuclear Medicine, Wagner H. N. (Ed). Saunders: Philadelphia, 220-228; Weiner R.E. et al. (2003) Chemistry of gallium and indium radiopharmaceuticals en Handbook of Radiopharmaceuticals - Radiochemistry and Applications (Welch MJ, Redvanly CS Eds.), New York-Chichester-Brisbane-Toronto, Wiley-Interscience Pub., 363-400; Anderson C.J. et al. (2003) Chemistry of copper radionucleides and radiopharmaceuticals products en Handbook of Radiopharmaceuticals - Radiochemistry and Applications (Welch MJ, Redvanly CS Eds.), New York-Chichester-Brisbane-Toronto, Wiley-Interscience Pub., 401-422; Mahmood A. et al. (2003) Technetium radiopharmaceuticals en Handbook of Radiopharmaceuticals - Radiochemistry and Applications (Welch MJ, Redvanly CS Eds.), New York-Chichester-Brisbane-Toronto, Wiley-Interscience Pub., 323-362).

Formulación

La formulación de [11C]PK11195, [11C]-A o cualesquiera otros derivados de A radiomarcados como disolución para inyección intravenosa incluye a menudo una retirada de los disolventes de la HPLC basada en el cartucho Waters SepPak® y/o una simple dilución con NaCl ac. al 0,9% (suero salino fisiológico) a una concentración en etanol por debajo de 10%.

Modelos animales

Todos los estudios se realizaron de acuerdo con la legislación francesa y las directivas europeas.

Modelo de neuroinflamación en ratas

5 Se mantuvieron ratas Wistar (peso corporal medio 300 g, centre d'Élevage René Janvier, Francia) en instalaciones de humedad controlada, termorreguladas, bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h (la luz encendida entre las 7 h AM y 7 h PM) y se les dejó libre acceso a comida y agua. Se indujo neuroinflamación por inyección estereotáxica de AMPA (propionato de alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol) (15 mM en amortiguador PBS, Sigma®) usando una microjeringa de 1 µl y microbomba (velocidad de inyección: 0,5 µl/min, UltraMicroPump II® y Micro4® Controller, WPI Inc., EE.UU.), como se ha descrito previamente (Boutin, H. et al. (2007) *Glia* 55: 1459-68.; Boutin, H. et al. (2007) *J. Nucl. Med.* 48: 573-581). Se inyectó AMPA (0,5 µl) en el estriado derecho (Bregma +0.7 mm, desde la sutura sagital: 2,7 mm, profundidad desde la superficie del cerebro: 5,5 mm). Los animales fueron mantenidos normotérmicos (temperatura corporal: 36,7 ± 0,5 °C, media ± DS) durante la cirugía mediante el uso de una manta calefactora (Homeothermic Blanket Control Unit, Harvard Apparatus Limited®, Edenbridge, Kent, Reino Unido).

Modelo de neuroinflamación en primates

15 Se alojaron macacos *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) que pesaban 4-5 kg en instalaciones de humedad controlada, termorreguladas, bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h (la luz encendida entre las 7 h a.m. y 7 h p.m.) y se les dejó libre acceso a comida y agua. Se indujo neuroinflamación mediante inyecciones estereotáxicas locales de ácido quinolínico (ácido quinolínico, Sigma, St. Louis, MO; disuelto en PBS 0,1 M, pH 7,2) en el estriado de los primates (1 sitio de inyección en el caudate y 2 sitios de inyección en el putamen) durante dos intervenciones quirúrgicas diferentes en las que se inyectó el ácido quinolínico en un hemisferio en el día 1 y el segundo hemisferio 20 2 semanas o 7 meses después (Fig. 8 y 9). Durante cada sesión quirúrgica los animales recibieron 60 nmol de ácido quinolínico distribuido sobre tres diferentes sitios del estriado, un sitio de 5 µl en el caudate y dos sitios de 10 µl en el putamen, usando una jeringa Hamilton de 10 µl unida a una aguja de calibre 26. Las coordenadas estereotáxicas, determinadas según el atlas estereotáxico de Swabó y Cowan (1984), fueron como sigue: sitio del caudate [AP +19 mm, ML ±6 mm, DV -14 mm desde el seno]; sitio putaminal 1 [AP: +19 mm, ML: ±12 mm, DV: -17 mm desde el cero estereotáxico]; sitio putaminal 2 [AP: +17 mm, ML: ±13 mm, DV: -16 mm desde el seno]. La excitotoxina fue inyectada a una velocidad de 0,1 µl/min y la jeringa de inyección se dejó en su lugar durante 5 min adicionales para evitar el retroflujo de la toxina. Durante toda la cirugía, la temperatura de los primates fue mantenida normotérmica (temperatura rectal, 36 °C ± 0,6 °C, media ± SD). Después de retirar la aguja, se suturó la piel y se dejó que los animales se recuperaran de la anestesia, y se devolvieron a sus jaulas cuando estuvieron totalmente despiertos.

Ratones transgénicos

35 Se obtuvo la generación y caracterización de ratones transgénicos PS1M146L (PS1) simple y APP751SL×PS1M146L (APP×PS1) doble, como se ha descrito previamente (Blanchard, V. et al. (2003) *Exp. Neurol.* 184: 247-263). En estos animales se expresa APP a un alto nivel en todas las neuronas corticales bajo el control del promotor Thy-1. El PS1 humano con la mutación M146L se expresa bajo el control del promotor de la reductasa HMG-CoA. Se encontró que el nivel de la carga amiloide era muy reproducible a una edad dada. Ambos ratones PS1 simple y APP×PS1 doble, proporcionados por Sanofi-Aventis, se usaron para la toma de imágenes PET a la edad de 11-12 meses y para la autorradiografía a 20-23 meses.

Escaneos microPET y adquisición de datos

40 Ratas y ratones transgénicos

45 Se realizó una toma de imágenes de microPET 7 días después de la inyección de AMPA en las ratas y en los ratones transgénicos de 11-12 meses de edad. Tanto en los ratones como en las ratas, la anestesia fue inducida por isoflurano al 5%, y después de esto fue mantenida mediante 2-2,5% de isoflurano en una mezcla de 70%/30% de NO₂/O₂. Para los escaneos PET, se puso la cabeza de la rata en un armazón estereotáxico casero compatible con la adquisición de PET, y las ratas fueron mantenidas normotérmicas (temperatura rectal: 36,7 ± 0,5 °C, media ± DS). Se pusieron los ratones en un lecho equipado con una máscara anestésica que permitía el calentamiento del flujo de aire, y la temperatura rectal fue monitorizada usando la manta calefactora Homeothermic Blanket Control Unit. Todos los protocolos de la toma de imágenes fueron realizados con un escáner Concorde Focus 220 PET usando bien [11C]PK11195 o bien [11C]-A.

50 En las ratas, se inyectaron los compuestos radiomarcados y ligandos sin marcar en la vena caudal con el uso de un catéter de calibre 24. Los compuestos radiomarcados fueron inyectados al mismo tiempo en el inicio de la adquisición de PET y los compuestos sin marcar fueron inyectados 20 min después de la inyección de los radiotrazadores. Los datos de PET fueron adquiridos durante 80 min. En los ratones, los compuestos radiomarcados fueron inyectados en la vena caudal usando agujas del calibre 28 inmediatamente antes del inicio del escaneo PET. 55 Los datos de PET fueron adquiridos durante 60 min.

Primates

Las sesiones de toma de imágenes se realizaron antes y a diversos tiempos después de la inyección de ácido quinolínico (24 h, 48 h, 9 días, 16 días y 7 meses después de la lesión). Se inyectó [11C]-A y se siguió la cinética cerebral por PET durante 90 min.

- 5 Una hora antes de la toma de imágenes PET, los animales fueron anestesiados por inyección intramuscular de una mezcla de ketamina / xilazina (15 mg/kg / 1,5 mg/kg) y entubados. Después se pusieron catéteres en una vena safenosa para la inyección del radiotrazador y en una arteria femoral para la toma de muestras de sangre. Los animales fueron mantenidos anestesiados mediante una inyección intravenosa de propofol (Diprivan® 1%; 0,05 mg.kg-1.min-1).
- 10 Para asegurar el correcto posicionamiento del animal en el aparato, la cabeza del animal fue sujeta en un armazón estereotáctico casero. Se realizaron escaneos PET usando el Focus micro-PET de alta resolución (CTI-Siemens, Knoxville, TN), el cual adquiere 95 planos contiguos simultáneamente. Para la corrección de la atenuación, se realizó primero un escaneo de transmisión usando una varilla rotatoria de ⁶⁸Ge como fuente. Los macacos fueron inyectados por vía intravenosa con $192,29 \pm 33,67$ MBq de [11C]-A y la adquisición de imágenes se realizó durante 90 min. Todas las adquisiciones PET fueron realizadas en modo lista (modo 3D) y las imágenes fueron reconstruidas usando el siguiente esquema de tiempo: (4 imágenes de 25 s) + (4 imágenes de 30 s) + (2 imágenes de 1 min) + (5 imágenes de 2 min) + (3 imágenes de 5 min) + (3 imágenes de 10 min) y (1 imagen de 15 min), para un tiempo total de 90 min para la [11C]-A.

Análisis de imágenes

- 20 El análisis de las imágenes PET se realizó usando ASIPro VM™ (CTI Concorde Microsystems' Analysis Tools and System Setup/Diagnostics Tool) y Brainvisa/Anatomist (<http://brainvisa.info/>).

Análisis de metabolitos en la sangre y el cerebro de las ratas

- 25 Ratas Wistar macho adultas, naive u operadas (peso corporal 300-400 g) fueron inyectadas por vía intravenosa en la vena de la cola con [11C]-A. Los animales fueron sacrificados 10, 20 ó 30 min después. Se recogió una muestra de sangre y se aisló el plasma por centrifugación (5 min, 3000 rpm). Las proteínas del plasma fueron precipitadas de 400 µl de suero por adición de 400 µl de acetonitrilo. Después de una centrifugación (5 min, 3000 rpm), el sobrenadante fue inyectado sobre la columna de HPLC. Los cerebros de las ratas fueron retirados y los hemisferios fueron separados. Se realizó una homogeneización por sonicación en 1 ml de acetonitrilo por hemisferio. Después de una centrifugación rápida, el sobrenadante fue separado del precipitado y concentrado a presión reducida antes de la inyección sobre la HPLC (véase la sección de radioquímica para las condiciones de la HPLC).

Autorradiografía

- 35 Se realizó una autorradiografía de [11C]-A usando secciones cerebrales de 20 µm de las ratas (7-8 días después de la lesión) o los ratones (20-23 meses). La unión no específica fue evaluada usando un exceso o bien de PK11195 sin marcar o bien de A. La especificidad para el PBR frente a los sitios de unión de benzodiazepinas centrales fue evaluada usando un exceso de Flumazenil sin marcar. Las secciones fueron incubadas durante 20 min en Amortiguador Tris (TRIZMA pre-set Crystals, Sigma®, ajustado a pH 7,4 a 4°C, 50 mM con NaCl 120 mM), después se aclararon 2 veces durante 2 min con amortiguador frío, seguido de un lavado rápido en agua destilada fría. Después, las secciones se pusieron en contacto directo con una pantalla Phosphor-Imager y fueron expuestas durante una noche. Los autorradiogramas fueron analizados usando el software ImageQuant™.

EJEMPLO 1

- 40 Radiosíntesis de [11C]PK11195: La purificación final por HPLC de [11C]PK11195 se realizó en una columna de HPLC semipreparativa Waters Symmetry® C-18 (eluyente : agua / acetonitrilo / TFA : 40 / 60 / 0,1 [v:v:v] ; caudal : 7 ml/min), y se recogió el pico correspondiente a [11C]PK11195 radioquímicamente puro (Rt : 6,5-7,0 min). Por regla general, partiendo de un lote de producción en ciclotrón de [11C]CO₂ de 55,5 GBq, se obtuvieron aproximadamente 4,5-5,0 GBq de [11C]PK11195 a los 30 min de radiosíntesis (incluyendo la purificación por HPLC y la formulación). La pureza radioquímica (determinada por HPLC analítica en una columna Waters Symmetry-M® C-18) fue mayor que 95% y las radiactividades específicas oscilaron de 50 a 90 GBq/µmol (al final de la radiosíntesis).

EJEMPLO 2

- 50 Radiosíntesis de [11C]-A (marcado en la función N-metilindol): La purificación final por HPLC de [11C]-A se realizó en una columna de HPLC Zorbax® SB-C-18 semipreparativa (eluyente : NaCl ac. al 0,9% / EtOH / tampón fosfato ac. 1M (pH 2,3) : 50 / 50 / 0,1 [v:v:v] ; caudal : 6 ml/min) y se recogió el pico correspondiente a [11C]-A radioquímicamente puro (Rt : 8,0-8,5 min). Por regla general, partiendo de un lote de producción en ciclotrón de [11C]CO₂ de 55,5 GBq, se obtuvieron aproximadamente 4,5-6,0 GBq de [11C]-A a los 25 min de radiosíntesis (incluyendo la purificación por HPLC y la formulación). La pureza radioquímica (determinada por HPLC analítica en

una columna Waters Symmetry-M® C-18) fue mayor que 95% y las radiactividades específicas oscilaron de 50 a 90 GBq/μmol (al final de la radiosíntesis).

EJEMPLO 3

5 Radiosíntesis de [11C]-A (marcado en la función N,N-dimetilacetamida): La purificación final por HPLC de [11C]-A se realizó en una columna de HPLC SymmetryPrep® C-18 semipreparativa (eluyente : agua / acetonitrilo / TFA : 50 / 50 / 0,1 [v:v:v] ; caudal : 5 ml/min) y se recogió el pico correspondiente a [11C]-A radioquímicamente pura (Rt : 8,0-8,5 min). Por regla general, partiendo de un lote de producción en ciclotrón de [11C]CO₂ de 55,5 GBq, se obtuvieron aproximadamente 3,5-5,0 GBq de [11C]-A a los 25 min de radiosíntesis (incluyendo la purificación por HPLC y la formulación). La pureza radioquímica (determinada por HPLC analítica en una columna Waters Symmetry-M® C-18) fue mayor que 95% y las radiactividades específicas oscilaron de 50 a 90 GBq/μmol (al final de la radiosíntesis).

EJEMPLO 4

15 i) Síntesis de 4-hidroxi-A. La 4-hidroxi-A se puede resintetizar según la solicitud de patente internacional WO 00/44384. Rf: 0,15 (SiO₂-TLC (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5 v:v)). 1H NMR (DMSO-d₆) δ 9,71 (s, 1 H), 7,94 (s, 1 H), 7,86 (d, 1H, J: 8,4 Hz), 7,39 (d, 1 H, J: 8,4 Hz), 7,32 (d, 2H, J: 8,8 Hz), 6,84 (d, 2H, J: 8,8 Hz), 4,27 (s, 3H), 4,20 (s, 2H), 3,16 (s, 3H), 2,84 (s, 3H). 13C NMR (DMSO-d₆) δ 168,6 [C], 157,1 [C], 154,8 [C], 141,2 [C], 140,9 [C], 133,6 [C], 132,1 [C], 130,9 [C], 127,8 [2.CH], 124,0 [CH], 122,6 [CH], 118,9 [C], 117,3 [C], 115,3 [2.CH], 111,6 [CH], 40,0 [CH₂], 37,4 [CH₃], 35,4 [CH₃], 32,0 [CH₃].

20 ii) Radiosíntesis de [11C]metoxi-A. El marcado con carbono-11 y la purificación final por HPLC se puede realizar como se describe para la preparación de [11C]-A (ejemplo 2 / ejemplo 3) usando el derivado 4-hidroxi de A sintetizado justo anteriormente (ejemplo 4i).

EJEMPLO 5

25 Procedimiento general para la síntesis de (fluoro)alcoxi-A y tosiloalcoxi-A. A una suspensión de K₂CO₃ (101 mg, 0,73 mmol) en DMF seco (8-12 ml) se le añade el derivado 4-hidroxi de A (150 mg, 0,36 mmol, véase la solicitud de patente internacional WO 00/44384), en disolución en DMF seco (2 ml). La mezcla de reacción se agita durante 30 min a temperatura ambiente, seguido de la adición gradual del reactivo de alquilación apropiado (2 eq.) en disolución en DMF (2 ml). La mezcla entera se agitó durante 2 h a 70°C y se agitó una hora adicional a temperatura ambiente. Después de la mezcla se calmó por adición de una disolución de NH₄Cl ac. saturado y se extrajo con CH₂Cl₂. Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH 98:2 a 95:5 v/v como eluyente) para dar la (fluoro)alcoxi-A esperada como polvos blancos o sólidos esponjosos blancos.

EJEMPLO 6

35 Síntesis de metoxi-A. Se usó el procedimiento general anterior (ejemplo 5) con yoduro de metilo para dar el compuesto diana en un rendimiento de 40%. Rf: 0,35 (SiO₂-TLC (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5 v:v)). 1H NMR (CDCl₃) δ 7,94 (d, 1H, J: 8,4 Hz), 7,53 (m, 3H), 7,33 (dd, 1H, J: 8,4, 1,6 Hz), 7,00 (d, 2H, J: 8,8 Hz), 4,32 (s, 3H), 4,18 (s, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,22 (s, 3H), 3,00 (s, 3H). 13C NMR (CDCl₃) δ 168,4 [C], 158,9 [C], 155,3 [C], 141,6 [C], 140,1 [C], 134,6 [C], 133,2 [C], 131,3 [C], 127,3 [2.CH], 123,3 [CH], 123,0 [CH], 119,0 [C], 117,4 [C], 113,9 [2.CH], 110,6 [CH], 55,5 [CH₃], 39,6 [CH₂], 37,6 [CH₃], 35,7 [CH₃], 31,6 [CH₃].

EJEMPLO 7

40 Síntesis de fluoroetoxi-A. Se usó el procedimiento general anterior (ejemplo 5) con 4-metilbencenosulfonato de 2-fluoroetilo (sintetizado según Damont A. et al. (2008) J. label. Compds Radiopharm. 51: 286-292) para dar el compuesto diana en un rendimiento de 63%. Rf: 0,38 (SiO₂-TLC (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5 v:v)). 1H NMR (CD₂Cl₂) δ 7,89 (d, 1H, J: 8,8 Hz), 7,58 (d, 1H, J: 1,6 Hz), 7,54 (d, 2H, J: 9,2 Hz), 7,34 (dd, 1H, J: 8,8, 1,6 Hz), 7,03 (d, 2H, J: 9,2 Hz), 4,78 (dt, 2H, J_{2H-F}: 47,6, J_{3H-H}: 4,0 Hz), 4,32 (s, 3H), 4,27 (dt, 2H, J_{3H-F}: 28,4 Hz, J_{3H-H}: 4,0 Hz), 4,16 (s, 2H), 3,19 (s, 3H), 2,96 (s, 3H). 13C NMR (CD₂Cl₂) δ 168,2 [C], 157,6 [C], 155,1 [C], 141,3 [C], 140,7 [C], 140,3 [C], 135,4 [C], 132,8 [C], 127,4 [2.CH], 123,2 [CH], 122,6 [CH], 118,9 [C], 117,2 [C], 114,3 [2.CH], 110,7 [CH], 82,0 [d, J_{1C-F}: 169 Hz, CH₂], 67,5 [d, J_{2C-F}: 20 Hz, CH₂], 39,5 [CH₂], 37,4 [CH₃], 35,2 [CH₃], 31,6 [CH₃]. Anál. Calc. para C₂₃H₂₂ClF₂N₄O₃·0,15 H₂O: C, 60,11, H, 4,89, N, 12,19, encontrado : C, 60,00, H, 4,96, N, 12,18.

EJEMPLO 8

50 Síntesis de fluoropropoxi-A. Se usó el procedimiento general anterior (ejemplo 5) con 4-metilbencenosulfonato de 3-fluoropropilo para dar el compuesto diana en un rendimiento de 58%. Rf: 0,39 (SiO₂-TLC (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5 v:v)). 1H NMR (CD₂Cl₂) δ 7,89 (d, 1H, J: 8,4 Hz), 7,58 (d, 1H, J: 1,6 Hz), 7,52 (d, 2H, J: 9,2 Hz), 7,34 (dd, 1H, J: 8,4, 1,6 Hz), 7,01 (d, 2H, J: 9,2 Hz), 4,67 (dt, 2H, J_{2H-F}: 46,8 Hz, J_{3H-H}: 6,0 Hz), 4,31 (s, 3H), 4,16 (m, 4H), 3,19 (s, 3H), 2,96 (s, 3H), 2,20 (dq₅, 2H, J_{3H-F}: 26,0 Hz, J_{3H-H}: 6,0). 13C NMR (CD₂Cl₂) δ 168,2 [C], 158,0 [C], 155,1 [C], 141,3 [C], 140,3 [C], 135,0 [C], 132,8 [C], 131,3 [C], 127,3 [2.CH], 123,2 [CH], 122,5 [CH], 119,0 [C], 117,2 [C], 114,2

[2.CH], 110,7 [CH], 80,8 [d, J1C-F: 163 Hz, CH2], 63,9 [d, J3C-F: 6,0 Hz, CH2], 39,5 [CH2], 37,4 [CH3], 35,2 [CH3], 31,5 [CH3], 30,3 [CH2, J2C-F: 20,0 Hz].

EJEMPLO 9

5 Síntesis de fluorobutoxi-A. Se usó el procedimiento general anterior (ejemplo 5) con bromuro de 4-fluorobutilo para dar el compuesto diana en un rendimiento de 70%. Rf: 0,40 (SiO₂-TLC (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5 v:v)). 1H NMR (CD₂Cl₂) δ 7,90 (d, 1 H, J: 8,8 Hz), 7,58 (d, 1 H, J: 1,6 Hz), 7,51 (d, 2H, J: 9,2 Hz), 7,34 (dd, 1H, J: 8,8, 1,6 Hz), 6,99 (d, 2H, J: 9,2 Hz), 4,54 (dt, 2H, J2H-F: 47,2 Hz, J3H-H : 5,6 Hz), 4,33 (s, 3H), 4,16 (s, 2H), 4,08 (t, 2H, J: 5,6 Hz), 3,19 (s, 3H), 2,96 (s, 3H), 1,97-1,85 (m, 4H). 13C NMR (CD₂Cl₂) δ 168,2 [C], 158,2 [C], 155,1 [C], 141,3 [C], 140,2 [C], 134,9 [C], 132,8 [C], 131,4 [C], 127,3 [2.CH], 123,2 [CH], 122,5 [CH], 119,0 [C], 117,2 [C], 114,2 [2.CH], 110,7 [CH], 83,8 [d, J1C-F: 163 Hz, CH2], 67,6 [CH2], 39,5 [CH2], 37,4 [CH3], 35,2 [CH3], 31,5 [CH3], 27,1 [CH2, J2C-F: 20,0 Hz], 25,1 [CH2, J3C-F: 5,0 Hz].

EJEMPLO 10

15 Síntesis de 2-(fluoroetoxi)etoxi-A. Se usó el procedimiento general anterior (ejemplo 5) con 4-metilbencenosulfonato de 2-(2-fluoroetoxi)etilo para dar el compuesto diana en un rendimiento de 69%. Rf: 0,45 (SiO₂-TLC (CH₂Cl₂/acetona: 80/20 v:v)). 1H NMR (CD₂Cl₂) δ 7,91 (d, 1 H, J: 8,4 Hz), 7,60 (d, 1H, J: 1,6 Hz), 7,54 (d, 2H, J: 8,8 Hz), 7,36 (dd, 1H, J: 8,4, 1,6 Hz), 7,04 (d, 2H, J: 8,8 Hz), 4,61 (dt, 2H, J2H-F: 48,0 Hz, J3H-H : 4,0 Hz), 4,34 (s, 3H), 4,22 (t, 2H, J: 4,8 Hz), 4,17 (s, 2H), 3,91 (t, 2H, J: 4,8 Hz), 3,83 (dt, 2H, J3H-F: 30,0, J3H-H: 4,0 Hz), 3,21 (s, 3H), 2,98 (s, 3H). 13C NMR (CD₂Cl₂) δ 168,2 [C], 157,9 [C], 155,1 [C], 141,3 [C], 140,3 [C], 135,1 [C], 132,8 [C], 131,4 [C], 127,3 [2.CH], 123,2 [CH], 122,5 [CH], 119,0 [C], 117,2 [C], 114,3 [2.CH], 110,7 [CH], 83,2 [d, J1C-F: 167 Hz, CH2], 70,4 [d, J2C-F: 19 Hz, CH2], 69,7 [CH2], 67,8 [CH2], 39,5 [CH2], 37,4 [CH3], 35,2 [CH3], 31,6 [CH3].

EJEMPLO 11

25 Síntesis de 2-(2-(fluoroetoxi)etoxi)etoxi-A. Se usó el procedimiento general anterior (ejemplo 5) con 4-metilbencenosulfonato de 2-(2-(2-fluoroetoxi)etoxi)etilo para dar el compuesto diana en un rendimiento de 63%. Rf: 0,32 (SiO₂-TLC (CH₂Cl₂/acetona: 80/20 v:v)). 1H NMR (CD₂Cl₂) δ 7,91 (d, 1 H, J: 8,8 Hz), 7,60 (d, 1H, J: 1,6 Hz), 7,54 (d, 2H, J: 8,8 Hz), 7,36 (dd, 1H, J: 8,8, 1,6 Hz), 7,04 (d, 2H, J: 8,8 Hz), 4,57 (dt, 2H, J2H-F: 47,6 Hz, J3H-H : 4,4 Hz), 4,33 (s, 3H), 4,21 (t, 2H, J: 4,4 Hz), 4,17 (s, 2H), 3,88 (t, 2H, J: 4,8 Hz), 3,80-3,65 (m, 6H), 3,21 (s, 3H), 2,98 (s, 3H). 13C NMR (CD₂Cl₂) δ 168,2 [C], 158,0 [C], 155,1 [C], 141,3 [C], 140,3 [C], 135,1 [C], 132,8 [C], 131,4 [C], 127,3 [2.CH], 123,2 [CH], 122,5 [CH], 119,0 [C], 117,2 [C], 114,3 [2.CH], 110,7 [CH], 83,2 [d, J1C-F: 167 Hz, CH2], 70,7 [CH2], 70,6 [CH2], 70,3 [d, J2C-F: 19 Hz, CH2], 69,6 [CH2], 67,8 [CH2], 39,5 [CH2], 37,4 [CH3], 35,2 [CH3], 31,6 [CH3].

EJEMPLO 12

35 Síntesis de tosiloxi-etoxi-A. Se usó el procedimiento general anterior (ejemplo 5) con bis(4-metilbencenosulfonato) de etano-1,2-diilo (sintetizado según Damont A. et al. (2008) J. label. Compds Radiopharm. 51: 286-292) para dar el compuesto diana en un rendimiento de 45%. Rf: 0,72 (SiO₂-TLC (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5 v:v)). 1H NMR (CD₂Cl₂) δ 7,89 (d, 1H, J: 8,8 Hz), 7,84 (d, 2H, J: 8,4 Hz), 7,60 (d, 1H, J: 1,6 Hz), 7,53 (d, 2H, J: 8,8 Hz), 7,41 (d, 2H, J: 8,4 Hz), 7,36 (dd, 1H, J: 8,8, 1,6 Hz), 6,91 (d, 2H, J: 8,8 Hz), 4,40 (t, 2H, J: 4,4 Hz), 4,32 (s, 3H), 4,22 (t, 2H, J: 4,4 Hz), 4,17 (s, 2H), 3,21 (s, 3H), 2,98 (s, 3H), 2,48 (s, 3H). 13C NMR (CD₂Cl₂) δ 168,1 [C], 157,2 [C], 155,0 [C], 145,2 [C], 141,2 [C], 140,3 [C], 135,5 [C], 132,8 [C], 132,7 [C], 131,3 [C], 129,9 [2.CH], 127,9 [2.CH], 127,4 [2.CH], 123,2 [CH], 122,6 [CH], 118,9 [C], 117,2 [C], 114,4 [2.CH], 110,7 [CH], 68,3 [CH2], 65,8 [CH2], 39,5 [CH2], 37,4 [CH3], 35,2 [CH3], 31,6 [CH3], 21,3 [CH3]. La tosiloxi-propoxi-A, tosiloxi-butoxi-A, 2-(tosiloxi-etoxi)etoxi-A y 2-(2-(tosiloxi-etoxi)etoxi)etoxi-A como precursores para el marcado con flúor-18 de los derivados de fluoroalcoxi-A descritos anteriormente se pueden preparar como se acaba de describir anteriormente con el reactivo de alquilación apropiado.

EJEMPLO 13

45 Radiosíntesis de [18F]fluoroetoxi-A: La purificación final por HPLC de [18F]fluoroetoxi-A se realizó en una columna de HPLC Symmetry® C-18 semipreparativa (eluyente : agua / acetonitrilo / TFA : 60 / 40 / 0,1 [v:v:v] ; caudal : 5 ml/min) y se recogió el pico correspondiente a [18F]fluoroetoxi-A radioquímicamente puro (Rt : 11,0-13,0 min). Partiendo de un lote de producción en ciclotrón de [18F]fluoruro de 37 GBq, se obtuvieron aproximadamente 3,7 GBq de [18F]fluoroetoxi-A a los 90 min de radiosíntesis (incluyendo la purificación por HPLC y formulación). La pureza radioquímica (determinada por HPLC analítica en una columna Waters Symmetry-M® C-18) fue mayor que 95% y las radiactividades específicas mayores que 50 GBq/μmol (al final de la radiosíntesis).

50 La [18F]fluoropropoxi-A, [18F]fluorobutoxi-A, 2-([18F]fluoroetoxi)etoxi-A y 2-(2-([18F]fluoroetoxi)etoxi)etoxi-A se pueden preparar como se acaba de describir anteriormente a partir de los derivados de tosiloxi-alcoxi-A correspondientes (ejemplo 12) como precursores para el marcado con flúor-18.

EJEMPLO 14

- La absorción del [11C]-A es significativamente más alta en el estriado lesionado de ratas inyectadas con AMPA (la región en la que se induce la expresión del PBR) comparado con el estriado controlateral intacto, del cual se espera que no exprese o exprese cantidades no significativas de PBR (Figura 1). La absorción de [11C]-A es también significativamente más alta que la absorción observada con el ligando PET de referencia para PBR, [11C]PK11195, en el estriado lesionado (Figura 1). La relación de la absorción en el estriado lesionado frente al intacto es también significativamente más alta para la [11C]-A que para el [11C]PK11195 (Figura 2). El potencial de unión (PU) y el R1 son significativamente más altos para la [11C]-A que para el [11C]PK11195 (PU = 1,65 ± 0,36 frente a 0,66 ± 0,15; R1 = 1,26 ± 0,08 frente a 1,10 ± 0,05).
- 5 Tanto el PK11195 (Figura 3) como la A sin marcar (Figura 4) (1 mg/kg por vía intravenosa; 20 min después de la inyección de [11C]-A) redujeron significativamente la absorción cerebral de [11C]-A en el estriado lesionado. Ambos compuestos sin marcar indujeron un pequeño aumento en la unión de la [11C]-A en el lado controlateral, lo cual es debido probablemente a un aumento en la concentración en sangre de [11C]-A debido a la liberación de [11C]-A desde sitios de unión extracerebrales.
- 10 El análisis de los metabolitos presentes en la sangre y el plasma de las ratas a 10 y 20 min después de la inyección de [11C]-A y de los metabolitos presentes en el cerebro de las ratas a 10, 20 y 30 min después de la inyección de [11C]-A detectaron esencialmente el compuesto padre solamente (Figura 10).

- Además, la autorradiografía de la unión de la [11C]-A en secciones del cerebro reflejó los resultados de la toma de imágenes con una alta relación ipsilateral a contralateral (3.8), lo que es suprimido por un exceso de PK11195 sin marcar ó A (Figura 5). Se observó una pequeña, pero significativa reducción de la unión de la [11C]-A con flumazenil sin marcar, un antagonista de las benzodiazepinas (Figura 5)
- 20

EJEMPLO 15

- Tanto en los ratones transgénicos APP×PS1 como PS1 de tipo salvaje, la absorción de la [11C]-A en el cerebro entero (cerebelo excluido) es más alta que la absorción del [11C]PK11195 (Figura 6). Sin embargo, la absorción tanto de [11C]-A como [11C]PK11195 no es significativamente más alta en los APP×PS1 frente a los PS1 de tipo salvaje. Por contraste, la unión específica de la [3H]-A es aproximadamente 2 veces mayor en secciones de cerebro entero de ratones APP×PS1 comparado con ratones PS1 de tipo salvaje (Figura 7).
- 25

- Estos datos demuestran que la [11C]-A puede detectar de manera específica el aumento de la unión del PBR y la inflamación en un modelo agudo de neuroinflamación en rata y en un modelo en ratón de la enfermedad de Alzheimer. La toma de imágenes PET in vivo confirma que se puede usar [11C]-A para adquirir imágenes de la sobreexpresión del receptor PBR y la neuroinflamación en roedores. Además, la unión del receptor PBR observada mediante la toma de imágenes PET con [11C]-A es mayor que la observada con el ligando PET de referencia del receptor PBR, [11C]PK11195.
- 30

EJEMPLO 16

- La absorción de [11C]-A es significativamente más alta en el estriado derecho lesionado de un primate inyectado con ácido quinolínico comparado con la absorción de [11C]-A en el estriado contralateral no inyectado y dos regiones cerebrales de control no inyectadas (cerebelo, córtex prefrontal) 24 h después de la inyección de la excitotoxina (Figura 8). La absorción de [11C]-A en el estriado contralateral no inyectado permaneció estable y en el mismo nivel que la absorción de [11C]-A en las regiones cerebrales de un primate no inyectado (Figura 8). El aumento en la absorción de [11C]-A se podía visualizar a 48 h después de la inyección de la excitotoxina (en el hemisferio izquierdo), mientras que la absorción de [11C]-A a 7 meses después de la inyección de la excitotoxina (cinética en el estriado derecho lesionado 7 meses antes) había vuelto a los niveles de la línea de base. Una caracterización más detallada de la fase temprana de la neuroinflamación demuestra que el aumento de la absorción de [11C]-A puede ser visualizado desde 24 h hasta 16 días (Figura 9). La administración sistémica de un gran exceso de PK11195 sin marcar 30 min después de la inyección del radiotrazador dio como resultado un desplazamiento específico de la unión de la [11C]-A en el estriado lesionado, sin observarse cambios apreciables en las regiones cerebrales de control no lesionadas (Figura 9).
- 35
- 40
- 45

Aplicaciones:

- La presente invención se puede aplicar como una herramienta de diagnóstico y como una herramienta para seguir la evolución y progresión de patologías en las que los niveles del PBR están alterados y en las que está presente la inflamación. La invención también se puede aplicar a estudios de ocupación del receptor y para evaluar la eficacia de tratamientos terapéuticos en estados patológicos y como un biomarcador translacional para la investigación de modelos animales a humanos.
- 50

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida radiomarcada como biomarcador para la detección, en un individuo, de los niveles del receptor periférico de benzodiazepina (PBR) asociados con estados normales y patológicos, en el que la radiomarca se elige entre carbono-11, radiohalógenos y radiometales.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que la 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida está radiomarcada con carbono-11.
- 10 3. Uso según las reivindicaciones 1 y 2, en el que la 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida está radiomarcada con carbono-11 sobre el carbono del grupo metilo situado en la posición 5 del núcleo de indol.
4. Uso según la reivindicación 1, en el que la 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida está radiomarcada con radiohalógenos.
5. Uso según las reivindicaciones 1 ó 4, en el que la 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida está radiomarcada con el radiohalógeno flúor-18.
- 15 6. Uso según las reivindicaciones 1 ó 5, en el que la 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida está radiomarcada con flúor-18 en la posición para del anillo de 3-fenilo.
7. Uso según las reivindicaciones 1-6, en el que la detección de los niveles de PBR se realiza por adquisición de imágenes PET (tomografía de emisión de positrones) o adquisición de imágenes SPECT (tomografía computerizada de emisión de fotones individuales).
- 20 8. Uso según las reivindicaciones 1-7, en el que la detección de los niveles de PBR se realiza por adquisición de imágenes PET (tomografía de emisión de positrones).
9. Uso según las reivindicaciones 1-8, en el que los estados patológicos relacionados con cambios en los niveles de PBR se seleccionan entre daños cerebrales, infecciones cerebrales y enfermedades neurológicas.
- 25 10. Uso según las reivindicaciones 1-8, en el que los estados patológicos relacionados con cambios en los niveles de PBR se seleccionan entre enfermedades psiquiátricas.
11. Uso según las reivindicaciones 1-8, en el que los estados patológicos relacionados con cambios en los niveles de PBR se seleccionan entre enfermedades proliferativas.
12. Uso según las reivindicaciones 1-8, en el que los estados patológicos relacionados con cambios en los niveles de PBR se seleccionan entre procesos inflamatorios periféricos.
- 30 13. Uso según las reivindicaciones 1-8, en el que la detección de los niveles de PBR se realiza para estudios de ocupación.
14. Uso según las reivindicaciones 1-8, en el que la detección de los niveles de PBR se realiza para evaluar la eficacia de un tratamiento terapéutico.
- 35 15. Método para la detección de niveles de PBR asociados con estados normales y cambios en los niveles de PBR asociados con estados patológicos, en los que la detección se realiza usando una forma radiomarcada de 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida, en donde la radiomarca se elige entre carbono-11, radiohalógenos y radiometales.
- 40 16. Método según la reivindicación 15, en el que la forma radiomarcada de 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida contiene carbono-11.
17. Método según las reivindicaciones 15-16, en el que la 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida está radiomarcada con carbono-11 sobre el carbono del grupo metilo situado en la posición 5 del núcleo de indol.
18. Método según la reivindicación 15, en el que la 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida está radiomarcada con flúor-18.
- 45 19. Método según la reivindicación 15, en el que la 7-cloro-N,N,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida está radiomarcada con flúor-18 en la posición para del anillo de 3-fenilo.
20. Método según las reivindicaciones 15-19, en el que los estados patológicos relacionados con cambios en los niveles de PBR se seleccionan entre daños cerebrales, infecciones cerebrales y enfermedades neurológicas.

21. Método según las reivindicaciones 15-19, en el que los estados patológicos relacionados con cambios en los niveles de PBR se seleccionan entre enfermedades psiquiátricas.
22. Método según las reivindicaciones 15-19, en el que los estados patológicos relacionados con cambios en los niveles de PBR se seleccionan entre enfermedades proliferativas.
- 5 23. Método según las reivindicaciones 15-19, en el que los estados patológicos relacionados con cambios en los niveles de PBR se seleccionan entre procesos inflamatorios periféricos.
24. Método según las reivindicaciones 15-19, en el que la detección de los niveles de PBR se realiza para estudios de ocupación.
- 10 25. Método según las reivindicaciones 15-19, en el que la detección de los niveles de PBR se realiza para evaluar la eficacia de un tratamiento terapéutico.

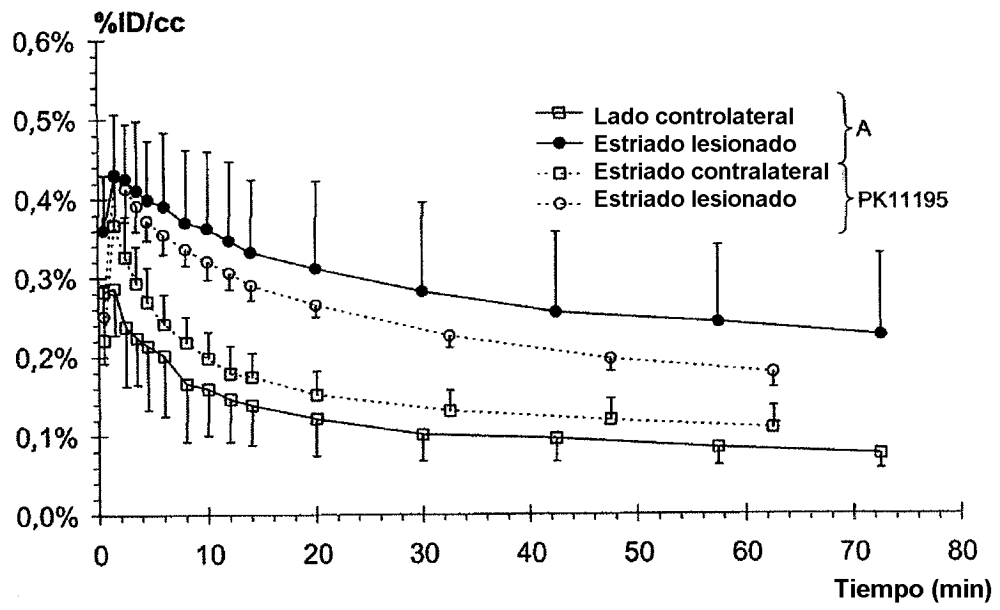


Figura 1

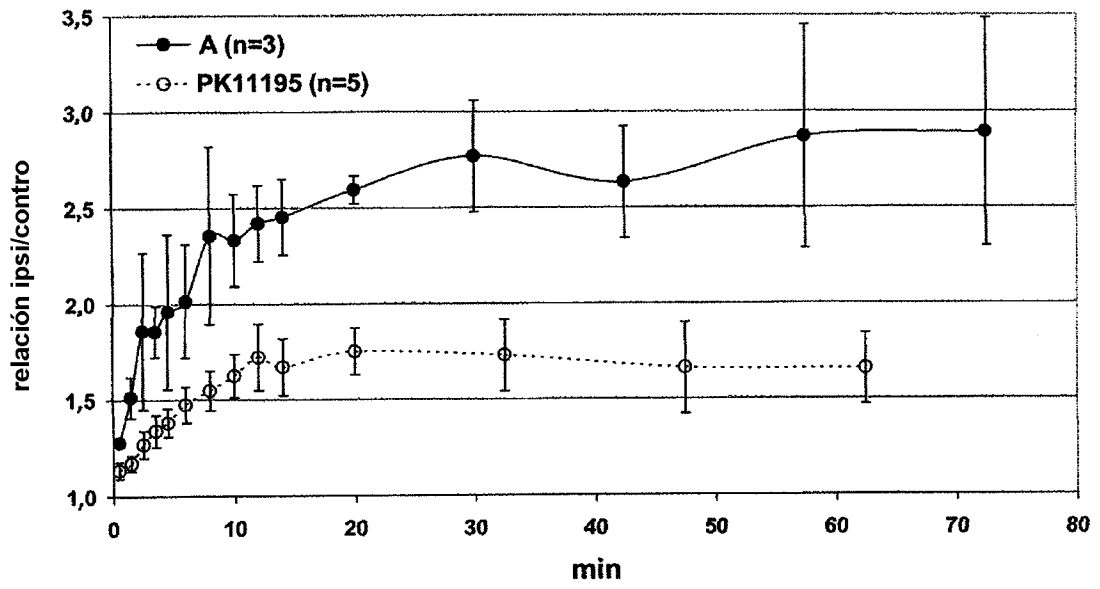


Figura 2

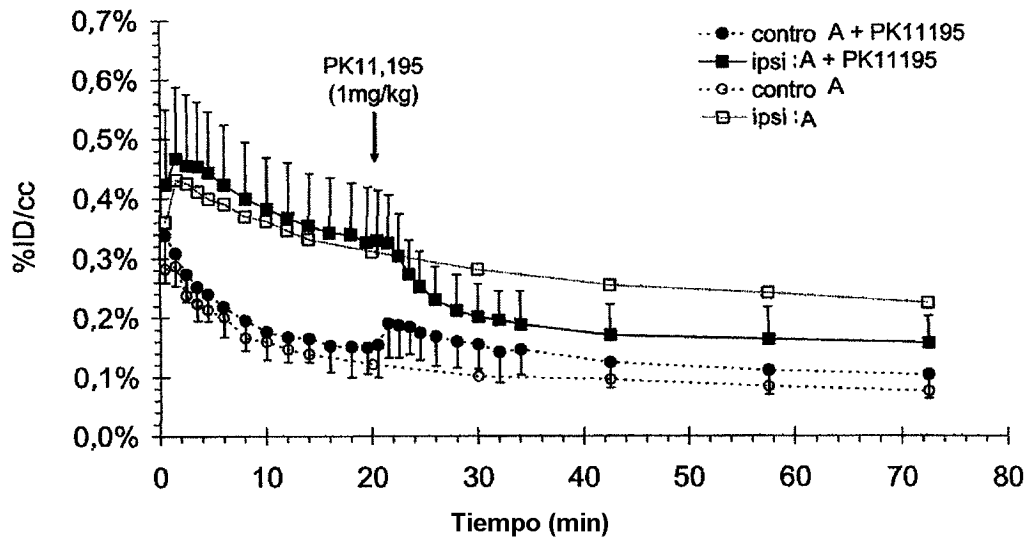


Figura 3

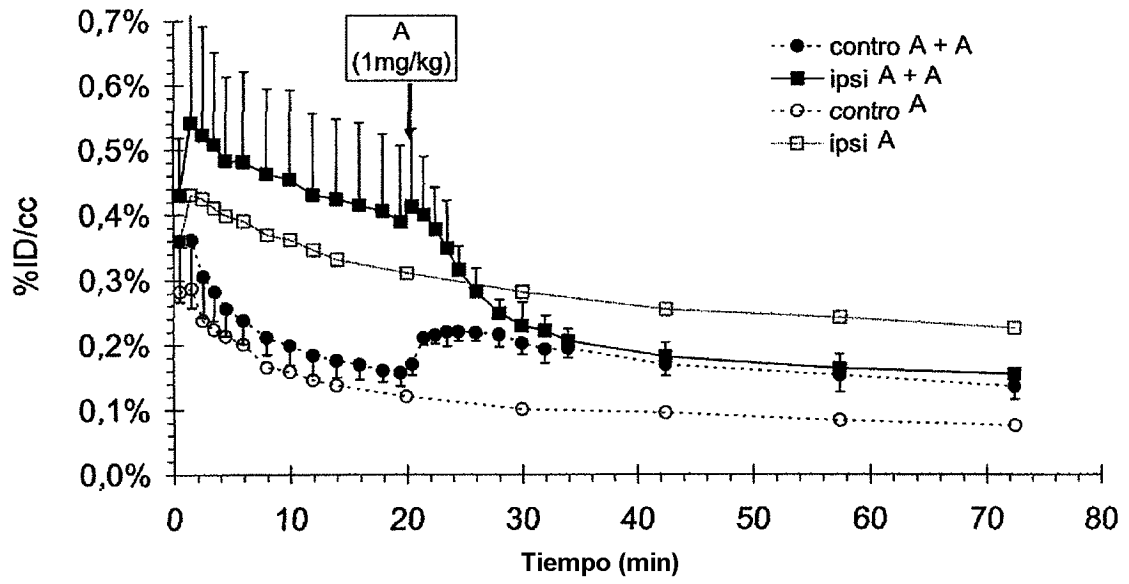


Figura 4

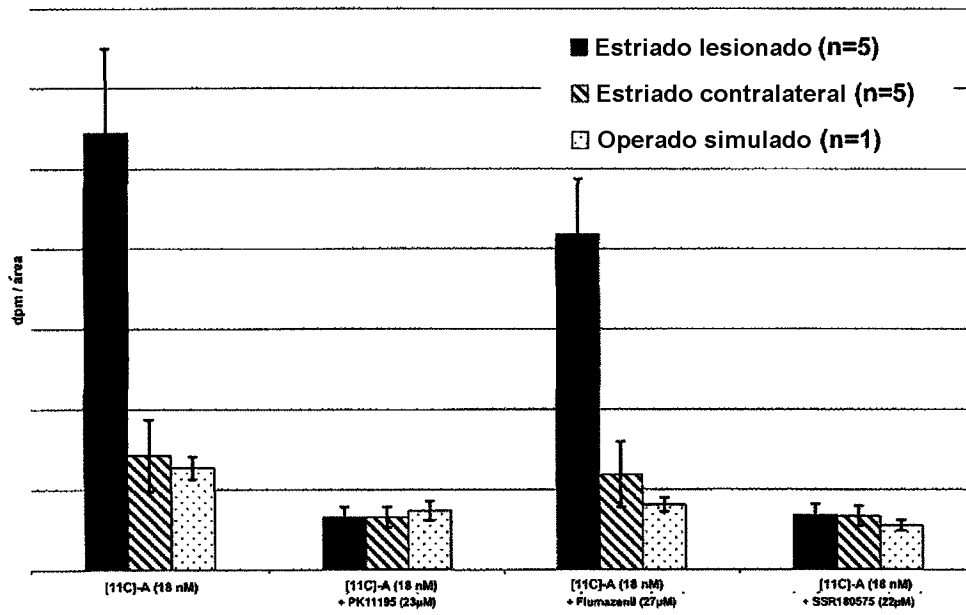


Figura 5

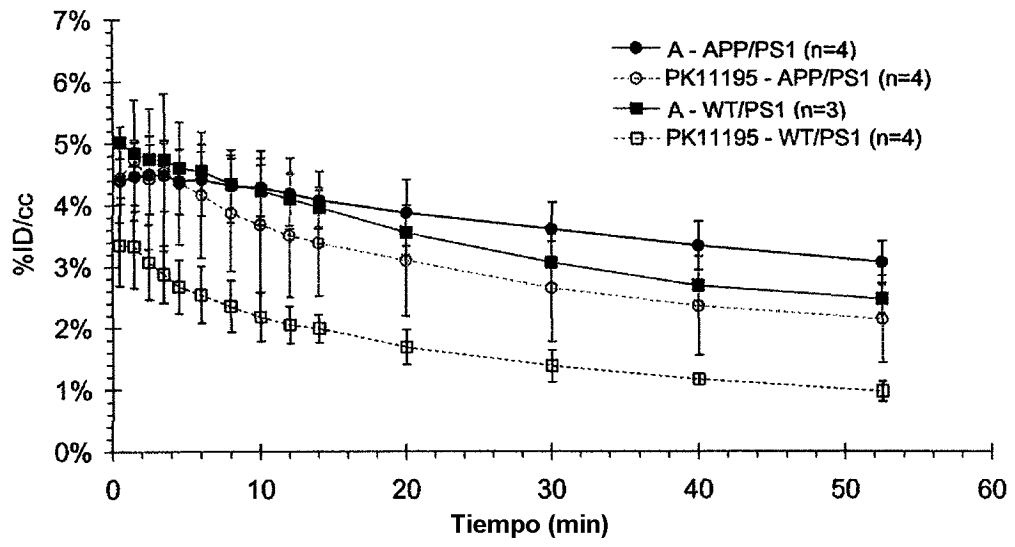


Figura 6

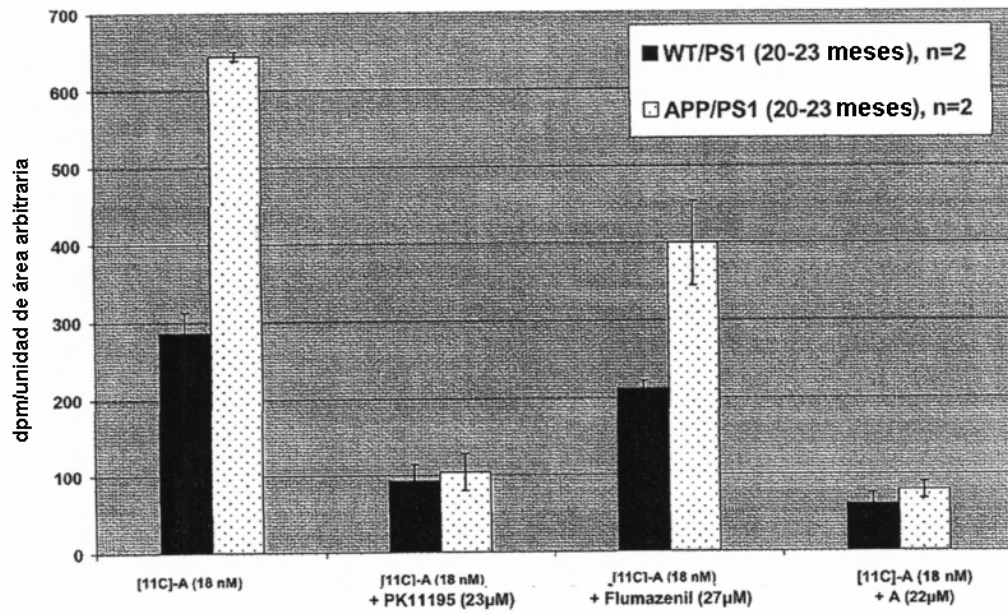


Figura 7

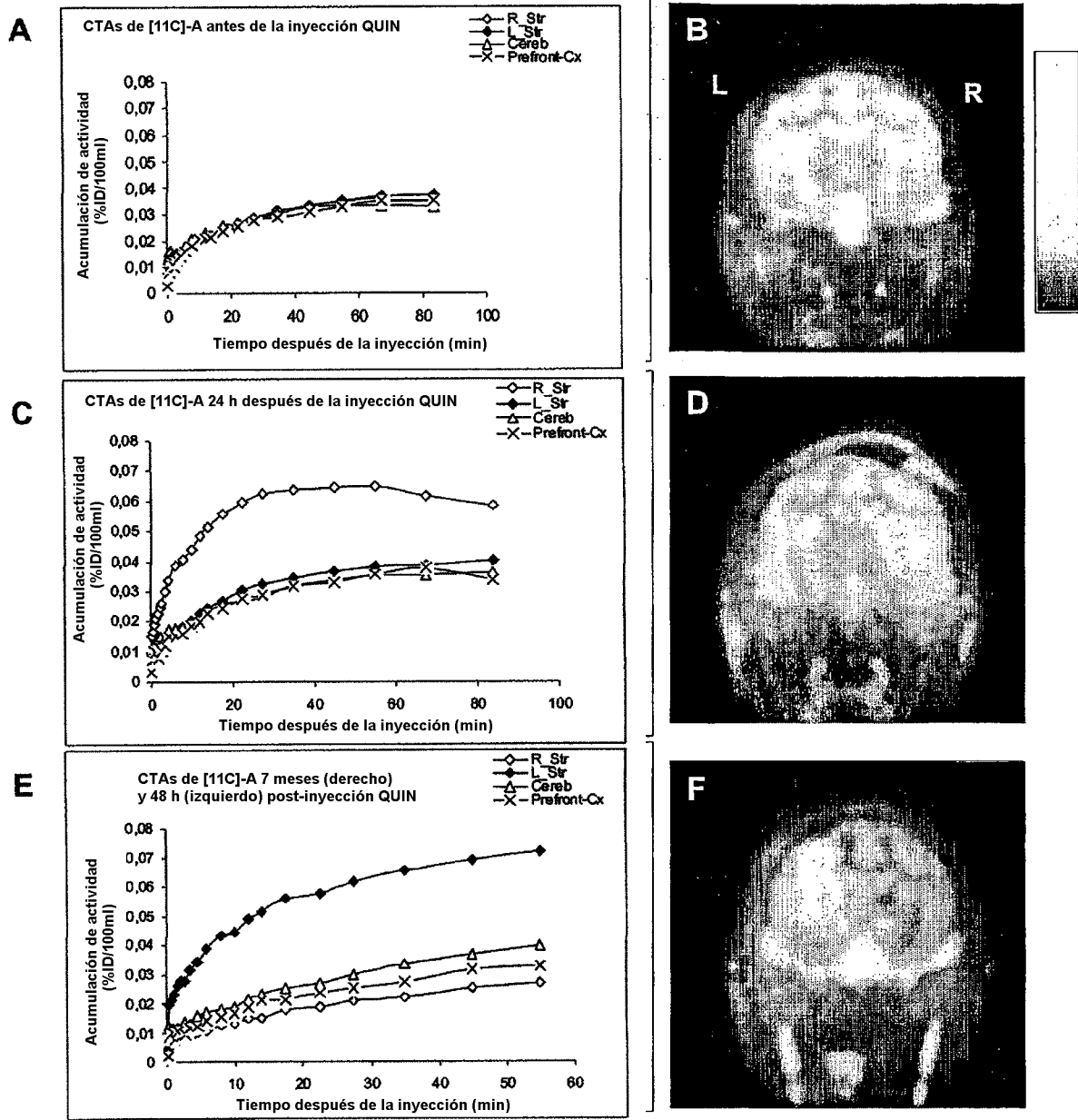


Figura 8

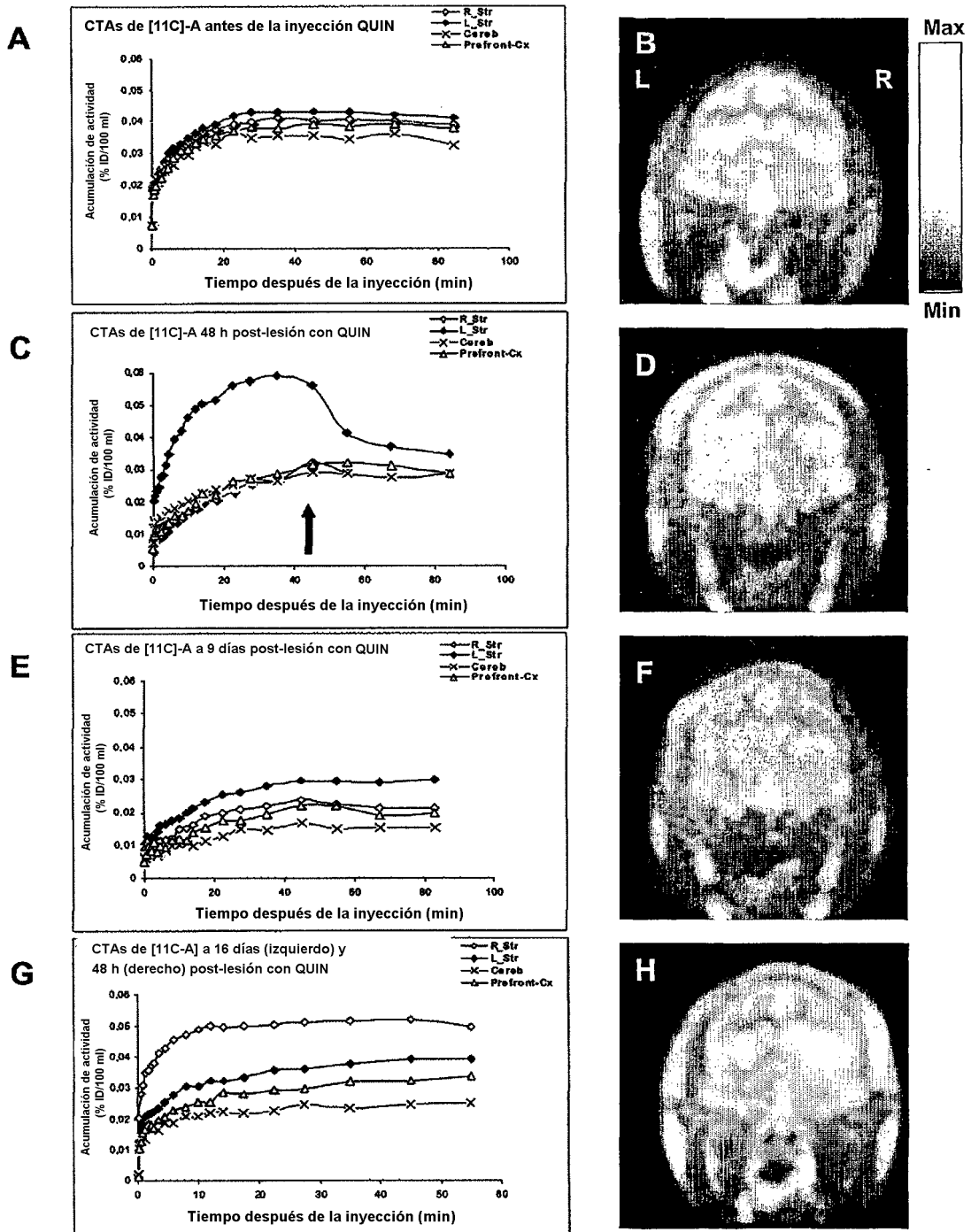
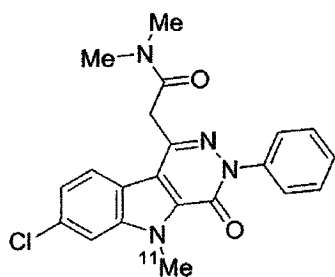


Figura 9

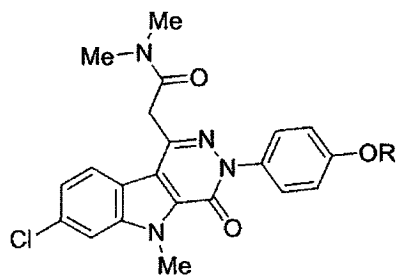
Ligando	Sacrificio (min post-inyección)	relación plasma/sangre	% de forma intacta por HPLC	Número de metabolitos	Rendimiento de la extracción	% de forma intacta por HPLC	Número de metabolitos	Rendimiento de la extracción
-A	10	0,1	100	0	89	100	0	99
-A	20	0,1	100	0	n.d.	100/100*	0	n.d.
-A	30	0,1	Nivel indetectable			100/100*	0	n.d.

* lado lesionado / controlateral

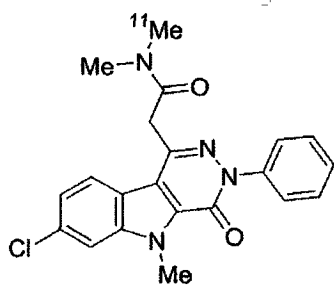
Figura 10



[indol-N-metil-¹¹C]-A



derivados de [¹⁸F/¹¹C]-A



[acetamida-N-metil-¹¹C]-A

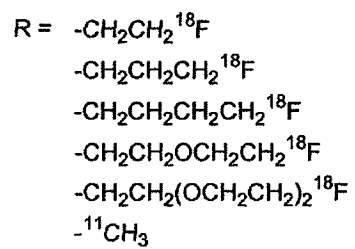


Figura 11