

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 516 867**

51 Int. Cl.:

A61K 51/04 (2006.01)

C07D 401/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2010** **E 10768973 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014** **EP 2493513**

54 Título: **Ligandos de PDE10 radiomarcados**

30 Prioridad:

30.10.2009 EP 09174702

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

31.10.2014

73 Titular/es:

JANSSEN PHARMACEUTICA NV (100.0%)
Turnhoutseweg 30
2340 Beerse, BE

72 Inventor/es:

ANDRÉS-GIL, JOSÉ IGNACIO;
DE ANGELIS, MERI;
BORMANS, GUY MAURITS R. y
CELEN, SOFIE JEANNE LEOPOLDINE

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 516 867 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

Ligandos de PDE10 radiomarcados

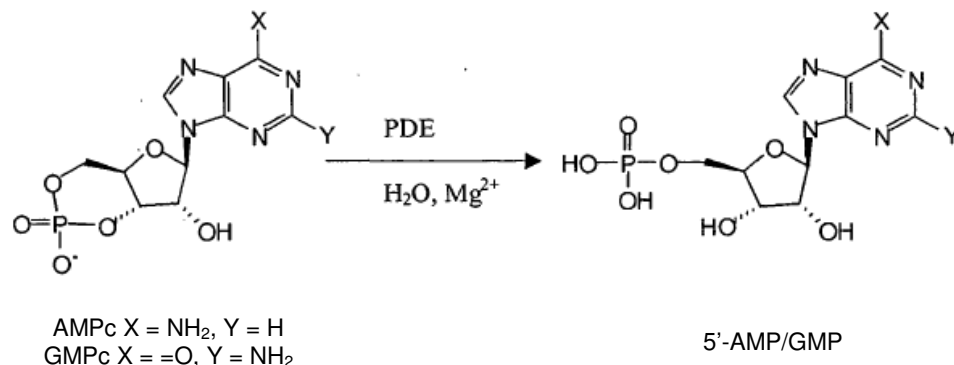
5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a ligandos de PDE10 radiomarcados selectivos, novedosos, que son útiles para la obtención de imágenes y la cuantificación de la enzima PDE10A en tejidos, usando tomografía de emisión de positrones (PET). La invención también se refiere a composiciones que comprenden tales compuestos, a procedimientos para preparar tales compuestos y composiciones, y al uso de tales compuestos y composiciones para la obtención de imágenes de un tejido, células o un huésped, *in vitro* o *in vivo*.

Antecedentes de la invención

Las fosfodiesterasas (PDE) son una familia de enzimas codificadas por 21 genes y subdivididas en 11 familias distintas según las propiedades estructurales y funcionales. Estas enzimas inactivan metabólicamente segundos mensajeros intracelulares que se producen ampliamente, adenosina monofosfato 3',5'-cíclico (AMPc) y guanosina monofosfato 3',5'-cíclico (GMPc). Estos dos mensajeros regulan una amplia variedad de procesos biológicos, incluyendo la producción y la acción de mediadores proinflamatorios, la función de canales iónicos, la contracción muscular, el aprendizaje, la diferenciación, la apoptosis, la lipogénesis, glucogenólisis y la gluconeogénesis. Realizan esto mediante la activación de proteína cinasa A (PKA) y proteína cinasa G (PKG), que a su vez fosforilan una amplia variedad de sustratos incluyendo factores de transcripción y canales iónicos que regulan innumerables respuestas fisiológicas. En las neuronas, esto incluye la activación de cinasas dependientes de AMPc y GMPc y la fosforilación posterior de proteínas implicadas en la regulación aguda de la transmisión sináptica así como en la supervivencia y diferenciación neuronal. Las concentraciones intracelulares de AMPc y GMPc están estrictamente reguladas mediante la tasa de biosíntesis por ciclasas y mediante la tasa de degradación por PDE. Las PDE son hidrolasas que inactivan AMPc y GMPc mediante hidrólisis catalítica del enlace éster en 3', formando el 5'-monofosfato inactivo (esquema 1).

Esquema 1



Basándose en la especificidad de sustrato, las familias de PDE pueden dividirse en tres grupos: i) las PDE específicas de AMPc, que incluyen PDE4, 7 y 8; ii) las enzimas PDE5 y 9 selectivas de GMPc; y iii) las PDE de sustrato doble, PDE1, 2 y 3, así como PDE10 y 11. El descubrimiento de la fosfodiesterasa 10A (PDE10A) se notificó en 1999. De las 11 familias de PDE conocidas, PDE10A tiene la distribución más restringida con expresión elevada sólo en el cerebro y los testículos. En el cerebro, ARNm y proteína de PDE10A se expresan altamente en el cuerpo estriado. Esta distribución única de PDE10A en el cerebro, junto con el aumento de su caracterización farmacológica, apunta al posible uso de inhibidores de PDE10A para tratar trastornos neurológicos y psiquiátricos tales como esquizofrenia.

La tomografía de emisión de positrones (PET) es una técnica de obtención de imágenes no invasiva que ofrece la resolución espacial y temporal más alta de todas las técnicas de obtención de imágenes nucleares y tiene la ventaja añadida de que puede permitir la cuantificación real de concentraciones de trazador en tejidos. Usa radionúclidos que emiten de positrones tales como, por ejemplo, ¹⁵O, ¹³N, ¹¹C y ¹⁸F para la detección.

El documento WO 2006/072828 (Pfizer) da a conocer compuestos de quinolina heteroaromáticos como inhibidores de PDE10 selectivos. El documento WO 2007/129183 (Pfizer) da a conocer compuestos de heteroarilo bicíclicos como inhibidores de PDE10.

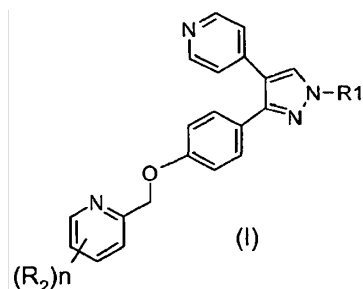
Zhude Tu *et al.* dan a conocer [¹¹C]-papaverina como trazador de PET para la obtención de imágenes de PDE10A (Nuclear Medicine and Biology, 37, 509-516, 2010) y concluyen que no es un radioligando ideal para la obtención de

imágenes clínica de PDE10A en el sistema nervioso central. Se opina que se requieren análogos que tengan selectividad superior por PDE10A con respecto a PDE3 y propiedades farmacocinéticas mejoradas.

El documento WO 2010/097367 da a conocer compuestos de quinolina radiomarcados, por ejemplo 2-{4-[1-(2-¹⁸F]fluoroetil)-4-piridin-4-il-1H-pirazol-3-il]-fenoximetil}-quinolina, útiles como ligandos de PDE10A.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un compuesto que tiene la fórmula (I)



o una forma estereoisomérica del mismo, en la que

R¹ es 2-fluoroetilo, 2,2,2-trifluoroetilo o 3-fluoropropilo;

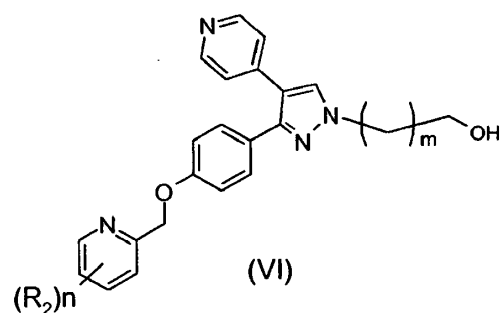
n es 1, 2 ó 3;

cada R² es independientemente alquilo C₁₋₃, ciclopropilo, alquiloilo C₁₋₃, alquiloilo C₁₋₃, halo, trifluorometilo, trifluorometoxilo, difluorometoxilo o ciano,

en la que al menos un F es [¹⁸F],

o un solvato o una forma de sal del mismo.

La invención también se refiere a compuestos precursores para la síntesis de los compuestos de fórmula (I) tal como se definió anteriormente, teniendo dichos compuestos la fórmula (VI).



o una forma estereoisomérica de los mismos, en la que

m es 1 ó 2;

n es 1, 2 ó 3;

cada R² es independientemente alquilo C₁₋₃, ciclopropilo, alquiloilo C₁₋₃, alquiloilo C₁₋₃, halo, trifluorometilo, trifluorometoxilo, difluorometoxilo o ciano,

o un solvato o una forma de sal del mismo

En el presente documento también se dan a conocer compuestos de referencia que corresponden a los [¹⁹F]-compuestos de fórmula (I).

Se muestra de manera ilustrativa de la invención una composición estéril que comprende un compuesto de fórmula (I) descrito en el presente documento, disuelto en una formulación apropiada.

Se muestra a modo de ejemplo un uso de un compuesto de fórmula (I) tal como se describe en el presente documento para, o un método de, obtención de imágenes de un tejido, células o un huésped, *in vitro* o *in vivo*.

5 Se muestra adicionalmente a modo de ejemplo de la invención un método de obtención de imágenes de un tejido, células o un huésped, que comprende poner en contacto con o administrar a un tejido, células o un huésped un compuesto de fórmula (I) descrito en el presente documento, y la obtención de imágenes del tejido, las células o el huésped con un sistema de obtención de imágenes mediante tomografía de emisión de positrones.

10 Adicionalmente, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un compuesto según la fórmula (I) tal como se describe en el presente documento, que comprende la etapa de hacer reaccionar un compuesto según la fórmula (V) tal como se describe en el presente documento, con $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ o $^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$ en presencia de una base en un disolvente inerte.

15 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a compuestos de fórmula (I) tal como se definió anteriormente en el presente documento y a los solvatos y las formas de sal farmacéuticamente aceptables de los mismos. La presente invención se refiere además a compuestos precursores de fórmula (VI).

20 En una realización, R^1 es 2-fluoroetilo.

En otra realización R^2 es 6-metilo, 3,5-dimetilo o 5-metoxilo.

25 En una realización preferida, el compuesto de fórmula (I) es 2-[[4-[1-(2-fluoroetil)-4-(4-piridinil)-1H-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-3,5-dimetil-piridina.succinato (B-3).

Los compuestos de fórmula (I) y las composiciones que comprenden los compuestos de fórmula (I) pueden usarse para la obtención de imágenes de un tejido, células o un huésped, *in vitro* o *in vivo*. En particular, la invención se refiere a un método de obtención de imágenes o de cuantificación de PDE10A en un tejido, células o un huésped *in vitro* o *in vivo*.

Las células y los tejidos son preferiblemente células y tejidos del sistema nervioso central en los que PDE10 es abundante. Como ya se mencionó, PDE10A es abundante en tejido del sistema nervioso central, más en particular, en tejido del sistema nervioso central que forma el cerebro; más en particular, que forma el cuerpo estriado.

40 Cuando se realiza el método *in vivo*, el huésped es un mamífero. En tales casos particulares, el compuesto de fórmula (I) se administra por vía intravenosa, por ejemplo, mediante inyección con una jeringa o por medio de una vía intravenosa periférica, tal como un catéter corto.

45 Cuando el huésped es un ser humano, el compuesto de fórmula (I) o una composición estéril que comprende una solución salina estéril de un compuesto de fórmula (I), puede administrarse en particular mediante administración intravenosa en el brazo, en cualquier vena identificable, en particular en el dorso de la mano, o en la vena mediana cubital en el codo.

50 Por tanto, en una realización particular, la invención se refiere a un método de obtención de imágenes de un tejido o células en un mamífero, que comprende la administración intravenosa de un compuesto de fórmula (I), tal como se define en el presente documento, o una composición que comprende un compuesto de fórmula (I) al mamífero, y la obtención de imágenes del tejido o las células con un sistema de obtención de imágenes mediante tomografía de emisión de positrones.

55 Por tanto, en una realización particular adicional, la invención se refiere a un método de obtención de imágenes de un tejido o células en un ser humano, que comprende la administración intravenosa de un compuesto de fórmula (I), tal como se define en el presente documento, o una composición de solución salina estéril que comprende un compuesto de fórmula (I) al ser humano, y la obtención de imágenes del tejido o las células con un sistema de obtención de imágenes mediante tomografía de emisión de positrones.

60 En una realización adicional, la invención se refiere a un método de obtención de imágenes o de cuantificación de PDE10A en un mamífero, que comprende la administración intravenosa de un compuesto de fórmula (I), o una composición que comprende un compuesto de fórmula (I) al mamífero, y la obtención de imágenes con un sistema de obtención de imágenes mediante tomografía de emisión de positrones.

65 En otra realización, la invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) para la obtención de imágenes de un tejido, células o un huésped, *in vitro* o *in vivo*, o la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I), para su uso en la obtención de imágenes de un tejido, células o un huésped *in vitro* o *in vivo*, usando tomografía de emisión de positrones.

Definiciones

“Alquilo C₁₋₃”, por sí mismo o en combinación con otros términos indicará un grupo alquilo saturado lineal o ramificado que tiene 1, 2 ó 3 átomos de carbono, por ejemplo metilo, etilo, 1-propilo y 2-propilo.

Tal como se usan en el presente documento, el término “composición” pretende abarcar un producto que comprende los componentes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que resulta, directa o indirectamente, de combinaciones de los componentes especificados en las cantidades especificadas.

El término “formas estereoisoméricas” tal como se usa anteriormente en el presente documento o a continuación en el presente documento, define todas las formas estereoisoméricas posibles que pueden presentar las sales de adición de los compuestos según la fórmula (I) y sus sales de adición. A menos que se mencione o indique lo contrario, la denominación química de compuestos indica la mezcla de todas las formas estereoquímicamente isoméricas posibles.

Las sales aceptables de los compuestos de fórmula (1) son aquellas en las que el contraión es farmacéuticamente aceptable. Sin embargo, también pueden usarse sales de ácidos y bases que no son farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, en la preparación o purificación de un compuesto farmacéuticamente aceptable. Todas las sales, sean farmacéuticamente aceptables o no, están incluidas dentro del ámbito de la presente invención. Se define que las sales farmacéuticamente aceptables comprenden las formas de sal de adición de ácido no tóxicas, terapéuticamente activas, que pueden formar los compuestos según la fórmula (I). Dichas sales pueden obtenerse tratando la forma de base de los compuestos según la fórmula (I) con ácidos apropiados, por ejemplo ácidos inorgánicos, por ejemplo hidrácidos halogenados, en particular ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico; ácidos orgánicos, por ejemplo ácido acético, ácido hidroxiacético, ácido propanoico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido ciclámico, ácido salicílico, ácido p-aminosalicílico y ácido pamoico.

A la inversa, dichas formas de sal pueden convertirse en la forma de base libre mediante tratamiento con una base apropiada.

El término “huésped” se refiere a un mamífero, en particular a seres humanos, ratas, ratones, perros y ratas.

El término “célula” se refiere a una célula que expresa o incorpora la enzima PDE10A.

Los compuestos de piridina de la presente invención difieren estructuralmente de los compuestos de la técnica anterior en que comprenden invariablemente un resto bicíclico heteroaromático. Funcionalmente difieren en que tienen lipofilicidad reducida y, por tanto, presentan menos unión no específica a proteínas y grasa cerebrales, haciéndolos más atractivos como posibles radioligandos de PET. En comparación con 2-{4-[1-(2-[¹⁸F]fluoroetil)-4-piridin-4-il-1H-pirazol-3-il]-fenoximetil}-quinolina, los compuestos de la presente invención tienen cinéticas más rápidas lo que da como resultado tiempos de adquisición más cortos en la aplicación clínica para obtener valores de volumen de distribución robustos y alcanzar razones de cuerpo estriado con respecto a cerebelo superiores dando como resultado imágenes *in vivo* de calidad superior y cuantificación más precisa del potencial de unión a PDE10A.

Preparación

Los compuestos según la invención pueden prepararse generalmente mediante una sucesión de etapas, conociendo el experto en la técnica cada una de ellas. En particular, los compuestos pueden prepararse según los siguientes métodos de síntesis.

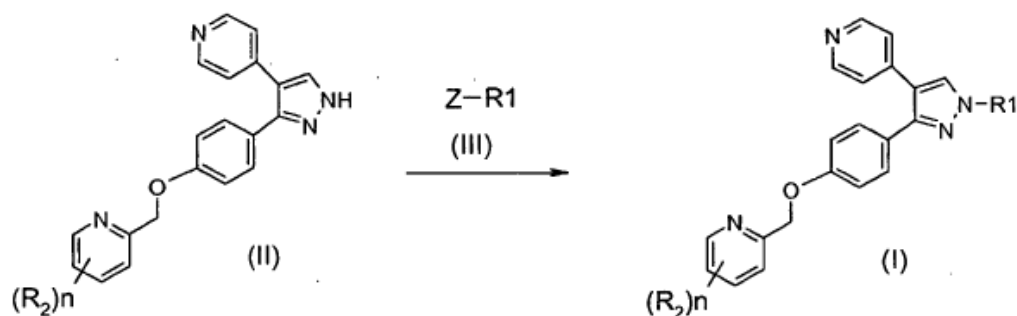
A. PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS FINALES

Pueden prepararse compuestos de fórmula (I) en su versión no radiomarcada mediante métodos de síntesis bien conocidos por el experto en la técnica. Pueden prepararse compuestos de la invención, por ejemplo, mediante tres métodos generales diferentes:

Método A:

Siguiendo la secuencia de reacción mostrada en el esquema 2.

Esquema 2

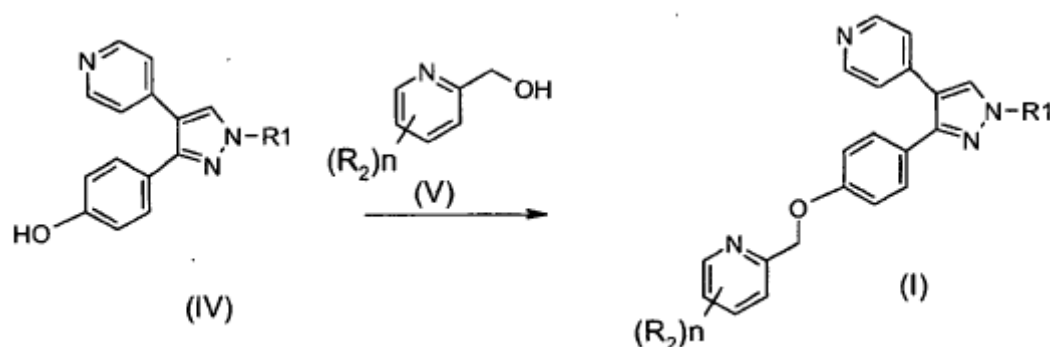


Por tanto, puede hacerse reaccionar el compuesto de fórmula (II) con un agente alquilante disponible comercialmente de fórmula (III), en la que Z es un grupo saliente adecuado tal como halo, por ejemplo bromo o yodo, en presencia de una base adecuada tal como carbonato de cesio o carbonato de potasio, en un disolvente inerte tal como, por ejemplo, dimetilformamida, agitando la mezcla de reacción a una temperatura adecuada, normalmente a 100-150°C, usando calentamiento convencional o bajo irradiación de microondas, durante el tiempo requerido para lograr que se complete la reacción, normalmente 10-20 minutos en un horno microondas. La reacción de alquilación proporciona habitualmente una mezcla de los dos regioisómeros posibles, derivados de la alquilación en ambos átomos de nitrógeno del anillo de pirazol, que pueden separarse mediante métodos cromatográficos, mediante o bien cromatografía en columna o bien HPLC. Alternativamente, Z puede ser un grupo hidroxilo, en cuyo caso la reacción con el compuesto (II) puede realizarse usando condiciones de Mitsunobu convencionales, que el experto en la técnica conoce bien. Por tanto, puede hacerse reaccionar el compuesto (II) con el compuesto (III) en el que Z es hidroxilo en presencia de azodicarboxilato de dietilo, di-terc-butilo o diisopropilo y trifenilfosfina, en un disolvente inerte tal como por ejemplo tetrahidrofurano, agitando la mezcla de reacción a una temperatura adecuada, normalmente a 120°C bajo irradiación de microondas, durante un periodo de tiempo adecuado para permitir que se complete la reacción, normalmente 20 minutos. La reacción de Mitsunobu proporciona habitualmente una mezcla de los dos regioisómeros posibles, derivados de la alquilación en ambos átomos de nitrógeno del anillo de pirazol, que pueden separarse mediante métodos cromatográficos, mediante o bien cromatografía en columna o bien HPLC.

Método B:

Alternativamente, también pueden prepararse compuestos de fórmula (I) mediante una secuencia de reacción tal como se muestra en el esquema 3.

Esquema 3

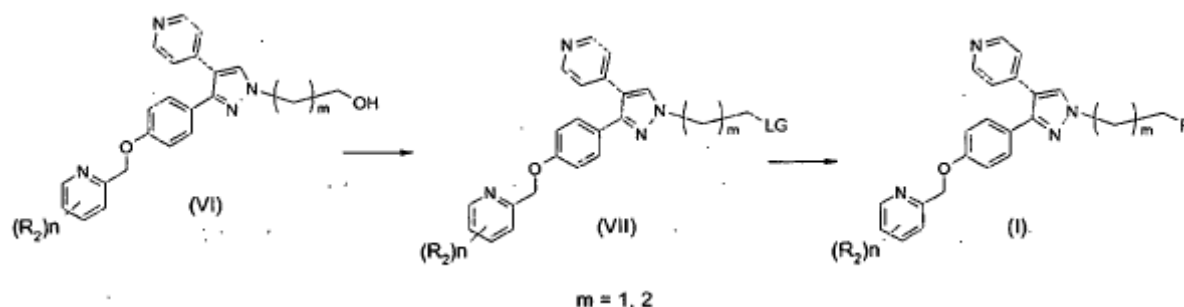


Por tanto, puede hacerse reaccionar un compuesto de fórmula (IV) con un compuesto de fórmula (V) usando condiciones de Mitsunobu convencionales, que el experto en la técnica conoce bien. Por tanto, puede hacerse reaccionar el compuesto (IV) con el compuesto (V) en presencia de azodicarboxilato de dietilo, di-terc-butilo o diisopropilo y trifenilfosfina, en un disolvente inerte tal como por ejemplo tetrahidrofurano, agitando la mezcla de reacción a una temperatura adecuada, normalmente a 120°C bajo irradiación de microondas, durante un periodo de tiempo adecuado para permitir que se complete la reacción, normalmente 15-20 minutos. Los compuestos de fórmula (V) o bien están disponibles comercialmente o bien se describen en la bibliografía química y pueden prepararse mediante procedimientos de síntesis convencionales sencillos bien conocidos por el experto en la técnica.

Método C:

Alternativamente, también pueden prepararse compuestos de fórmula (I) en la que R1 es 2-fluoroetilo o 3-fluoropropilo, mediante una secuencia de reacción tal como se muestra en el esquema 4.

Esquema 4



Por tanto, en un compuesto de fórmula (VI) puede transformarse el grupo hidroxilo en un grupo saliente LG adecuado, tal como metanosulfonato o tosilato, mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, proporcionando un producto intermedio de fórmula (VII). Entonces puede sustituirse el grupo saliente por flúor usando métodos convencionales bien conocidos por el experto en la técnica, tal como, por ejemplo, haciéndolo reaccionar con fluoruro de tetrabutilamonio en un disolvente inerte tal como por ejemplo tetrahidrofurano, agitando la mezcla de reacción a una temperatura adecuada, normalmente a 70°C bajo irradiación de microondas, durante un periodo de tiempo adecuado para permitir que se complete la reacción, normalmente 10 minutos. Alternativamente, también pueden prepararse compuestos de fórmula (I) mediante la reacción directa de un producto intermedio de fórmula (VI) con un agente de fluoración tal como, por ejemplo, trifluoruro de (N,N-dietilamino)azufre (DAST), mediante procedimientos conocidos en la técnica.

La incorporación de átomos de flúor radiactivos en la cadena lateral R1 de los compuestos de fórmula (I) en la que R1 es 2-fluoroetilo o 3-fluoropropilo, puede realizarse usando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, mediante la reacción de un precursor adecuado de fórmula (VII) con un reactivo de fluoración radiactivo nucleófilo, tal como $K[^{18}F]/\text{Kryptofix}^{\circledR} 222$ o sales de tetraalquilamonio que incorporan fluoruro radiactivo, en un disolvente inerte tal como, por ejemplo, dimetilformamida, agitando la mezcla de reacción a una temperatura adecuada, usando calentamiento convencional o bajo irradiación de microondas, durante el tiempo requerido para lograr que se complete la reacción. Alternativamente, también puede realizarse la incorporación de flúor radiactivo mediante la reacción de alquilación de un producto intermedio de fórmula (II) con o bien 1-bromo-2- $[^{18}F]$ fluoroetano o bien 1-bromo-3- $[^{18}F]$ fluoropropano, en presencia de una base tal como, por ejemplo, carbonato de cesio, en un disolvente inerte tal como, por ejemplo, dimetilformamida, agitando la mezcla de reacción a una temperatura adecuada, usando calentamiento convencional o bajo irradiación de microondas, durante el tiempo requerido para lograr que se complete la reacción, normalmente 15 minutos a 90°C usando calentamiento convencional. En este caso puede separarse el compuesto (I) radiomarcado deseado del otro regioisómero radiomarcado y del precursor que no ha reaccionado mediante HPLC.

También puede realizarse la incorporación de o bien átomos de carbono radiactivos o bien átomos de flúor radiactivos en los grupos sustituyentes de R2 de los compuestos de fórmula (I) usando técnicas radioquímicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede incorporarse un grupo $[^{11}C]$ -metoxilo mediante la reacción de un precursor adecuado de fórmula (I), en la que un R2 es OH, con $[^{11}C]CH_3I$ o $[^{11}C]CH_3OTf$ en presencia de una base, tal como por ejemplo carbonato de cesio, en un disolvente inerte tal como por ejemplo dimetilformamida, agitando la mezcla de reacción a una temperatura adecuada usando calentamiento convencional, durante un periodo de tiempo adecuado para permitir que se complete la reacción. Puede lograrse la incorporación de un átomo de flúor radiactivo en R2, por ejemplo, mediante la reacción de un precursor adecuado de fórmula (I) en la que un R2 es un grupo nitro, un cloro o un bromo en cualquier posición 4 ó 6 del anillo de piridinilo, con un reactivo de fluoración radiactivo nucleófilo, tal como $K[^{18}F]/\text{Kryptofix}^{\circledR} 222$, en un disolvente inerte tal como, por ejemplo, dimetilformamida, dimetilsulfóxido o acetonitrilo, agitando la mezcla de reacción a una temperatura adecuada usando calentamiento convencional o bajo irradiación de microondas, durante el tiempo requerido para lograr que se complete la reacción.

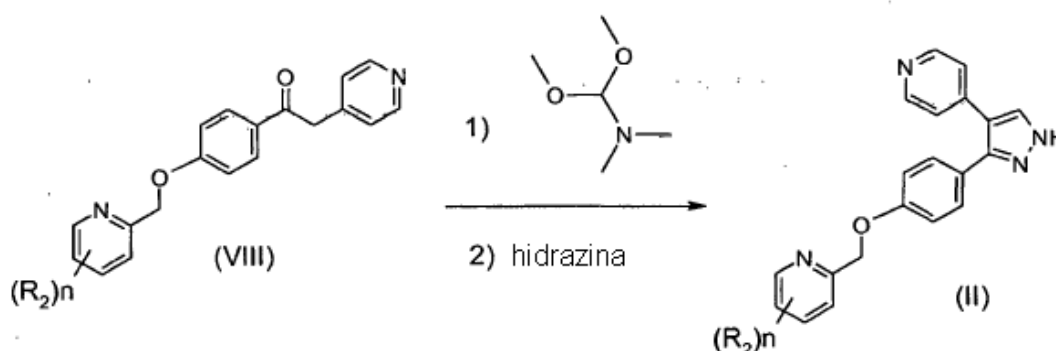
Pueden realizarse las transformaciones de diferentes grupos funcionales presentes en los compuestos finales, en otros grupos funcionales según la fórmula (I), mediante métodos de síntesis bien conocidos por el experto en la técnica. Por tanto, por ejemplo, un compuesto de fórmula (I) en la que R2 es un átomo de bromo puede reaccionar con éster metílico del ácido (fluorosulfonil)difluoroacético, en presencia de yoduro de cobre en un disolvente inerte tal como, por ejemplo, dimetilformamida, agitando la mezcla de reacción a una temperatura adecuada, normalmente a 120°C, usando calentamiento convencional o bajo irradiación de microondas, durante el tiempo requerido para lograr que se complete la reacción, normalmente 2 h de calentamiento convencional, para proporcionar un compuesto de fórmula (I) en la que R2 es trifluorometilo. En otro ejemplo, puede hacerse reaccionar un compuesto de fórmula (I) en la que R2 es un átomo de bromo con un ácido alquil o cicloalquilborónico, en presencia de una base adecuada tal como, por ejemplo, carbonato de sodio acuoso y un catalizador de complejo de paladio tal como,

por ejemplo, tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) en un disolvente inerte tal como, por ejemplo, dioxano, agitando la mezcla de reacción a una temperatura adecuada usando calentamiento convencional o bajo irradiación de microondas, durante el tiempo requerido para lograr que se complete la reacción, normalmente 15 minutos a 130°C en un horno microondas, para proporcionar un compuesto de fórmula (I) en la que R2 es alquilo C₁₋₃ o ciclopropilo.

B. PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS INTERMEDIOS

Pueden prepararse compuestos intermedios de fórmula (II) mediante métodos de síntesis bien conocidos por el experto en la técnica, tal como, por ejemplo, mediante la secuencia de reacción mostrada en el esquema 5, que se basa en el método descrito en J. Med. Chem. 2009, 52 (16), 5188-5196.

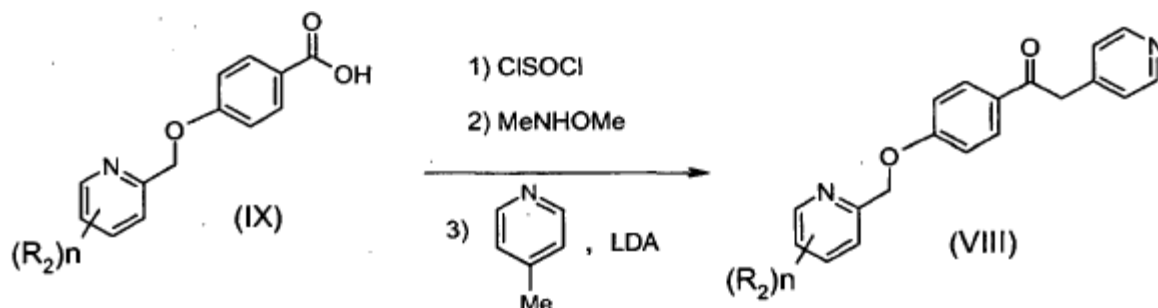
Esquema 5



Por tanto, puede hacerse reaccionar un compuesto de fórmula (VIII) con dimetoximetil-dimetilamina disponible comercialmente en exceso, agitando la mezcla de reacción a temperatura de reflujo durante el tiempo requerido para lograr que se complete la reacción, normalmente 1 hora. Tras evaporación hasta sequedad puede tratarse el residuo resultante con hidrato de hidrazina en metanol, agitando la mezcla de reacción a temperatura de reflujo durante el tiempo requerido para lograr que se complete la reacción, normalmente 1 hora.

Pueden prepararse compuestos intermedios de fórmula (VIII) mediante una reacción en secuencia de tres etapas, siguiendo esencialmente el mismo método de síntesis tal como se describe en J. Med. Chem. 2009, 52 (16), 5188-5196, tal como se muestra en el esquema 6.

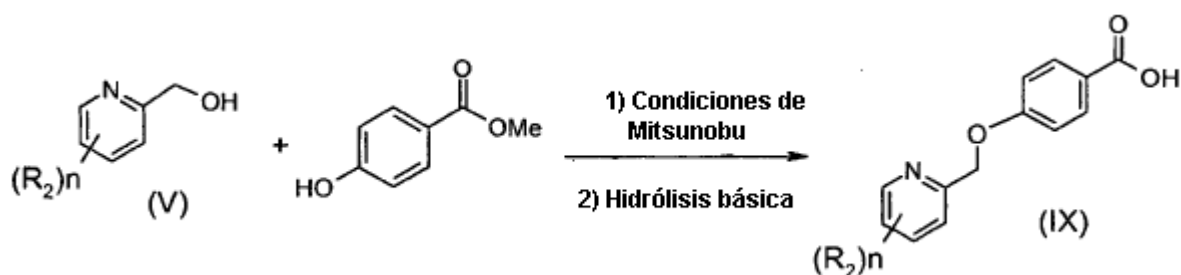
Esquema 6



Por tanto, puede hacerse reaccionar un compuesto de fórmula (IX) en primer lugar con cloruro de tionilo, con el fin de formar el cloruro de acilo correspondiente, y luego *in situ* con O,N-dimetilhidroxilamina, en presencia de una base adecuada tal como, por ejemplo, trietilamina, en un disolvente inerte tal como, por ejemplo, tetrahidrofurano, agitando la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante el tiempo requerido para lograr que se complete la reacción, normalmente entre 6 y 18 horas. Posteriormente, puede hacerse reaccionar la N-metoxi-N-metilbenzamida así obtenida con 4-picolina, en presencia de un reactivo de organolitio, normalmente diisopropilamida de litio, en un disolvente inerte y seco tal como, por ejemplo, tetrahidrofurano, agitando la mezcla de reacción a -78°C durante el periodo de tiempo requerido para garantizar que se complete la reacción.

Pueden prepararse compuestos intermedios de fórmula (IX) mediante métodos de síntesis bien conocidos por el experto en la técnica, tal como, por ejemplo, mediante la secuencia de reacción mostrada en el esquema 7.

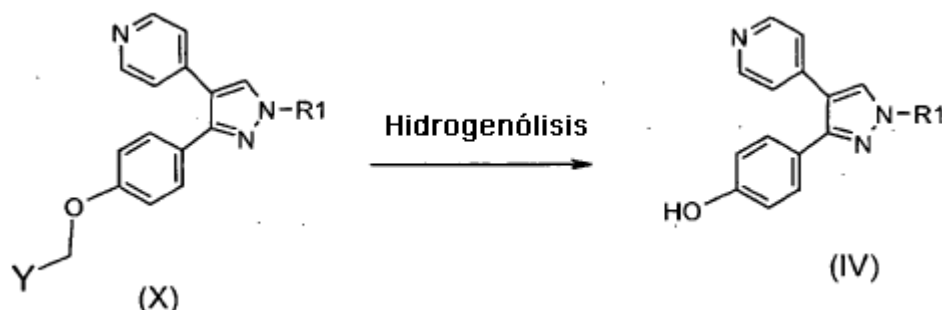
Esquema 7



Por tanto, puede hacerse reaccionar en primer lugar un compuesto de fórmula (V) con éster metílico del ácido 4-hidroxibenzoico disponible comercialmente, usando condiciones de Mitsunobu convencionales, que el experto en la técnica conoce bien. Por tanto, puede hacerse reaccionar el compuesto (V) con éster metílico del ácido 4-hidroxibenzoico en presencia de azodicarboxilato de dietilo, di-terc-butilo o diisopropilo y trifenilfosfina, en un disolvente inerte tal como por ejemplo tetrahidrofurano, agitando la mezcla de reacción a una temperatura adecuada, normalmente a 120°C bajo irradiación de microondas, durante un periodo de tiempo adecuado para permitir que se complete la reacción, normalmente 20 minutos. Posteriormente, puede hidrolizarse el derivado de éster metílico del compuesto (IX) correspondiente así obtenido en condiciones básicas, usando una base diluida tal como, por ejemplo, hidróxido de sodio o hidróxido de potasio acuoso en un disolvente inerte tal como, por ejemplo, metanol, tetrahidrofurano o una mezcla de metanol/tetrahidrofurano, agitando la mezcla de reacción a una temperatura adecuada, o bien a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo adecuado para permitir que se complete la reacción, normalmente 18 horas, o bien a 150°C bajo irradiación de microondas durante 10 minutos. Los compuestos de fórmula (V) o bien están disponibles comercialmente o bien se describen en la bibliografía química y pueden prepararse mediante procedimientos de síntesis convencionales sencillos bien conocidos por el experto en la técnica.

Pueden prepararse compuestos intermedios de fórmula (IV) mediante métodos de síntesis bien conocidos por el experto en la técnica, tal como, por ejemplo, mediante la secuencia de reacción mostrada en el esquema 8.

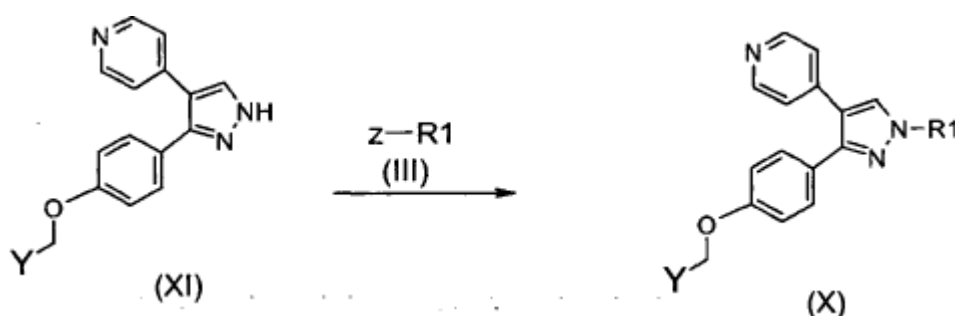
Esquema 8



Por tanto, puede someterse un compuesto de fórmula (X) en la que Y es fenilo o 2-quinolinilo a una reacción de hidrogenólisis, en un disolvente inerte adecuado tal como, por ejemplo, etanol, en presencia de un catalizador tal como, por ejemplo, paladio al 5% o al 10% sobre carbono activado, durante un periodo de tiempo que garantiza que se complete la reacción, normalmente a 50-80°C y 1 atmósfera de hidrógeno en un aparato H-Cube.

Pueden prepararse compuestos intermedios de fórmula (X) mediante métodos de síntesis bien conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, de un modo similar al definido anteriormente en el método A para la síntesis de los compuestos de fórmula (I), mediante la secuencia de reacción mostrada en el esquema 9.

Esquema 9



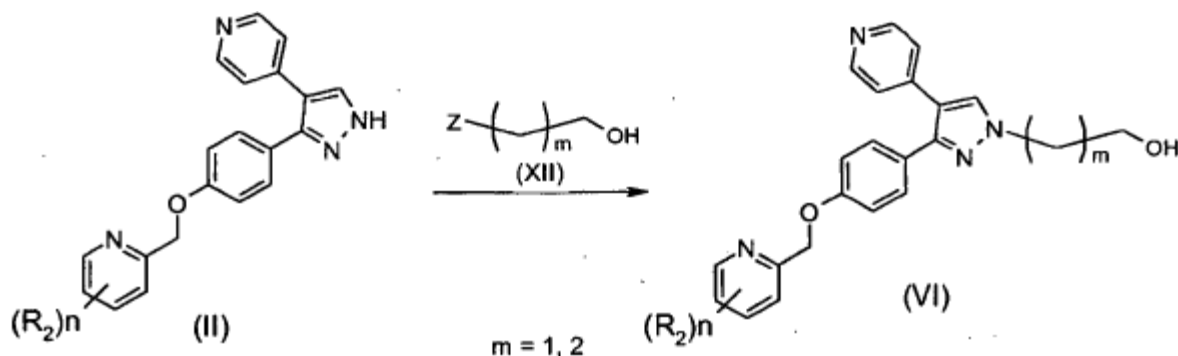
Por tanto, puede hacerse reaccionar un compuesto de fórmula (XI) en la que Y es fenilo o 2-quinolinilo con un agente alquilante disponible comercialmente de fórmula (III), en la que Z es un grupo saliente adecuado tal como halo, por ejemplo bromo o yodo, en presencia de una base adecuada tal como carbonato de cesio o carbonato de potasio, en un disolvente inerte tal como, por ejemplo, dimetilformamida, agitando la mezcla de reacción a una temperatura adecuada, normalmente a 100-150°C, usando calentamiento convencional o bajo irradiación de microondas, durante el tiempo requerido para lograr que se complete la reacción, normalmente 5-20 minutos en un horno microondas. En el caso particular en el que R1 es -CH₂-CO-OAlk, la temperatura de reacción típica es temperatura ambiente y el tiempo requerido es de 3 horas. La reacción de alquilación proporciona habitualmente una mezcla de los dos regioisómeros posibles, derivados de la alquilación en ambos átomos de nitrógeno del anillo de pirazol, que pueden separarse mediante métodos cromatográficos, mediante o bien cromatografía en columna o bien HPLC.

Alternativamente, Z puede ser un grupo hidroxilo, en cuyo caso la reacción con el compuesto (XI) puede realizarse usando condiciones de Mitsunobu convencionales, que el experto en la técnica conoce bien. Por tanto, puede hacerse reaccionar el compuesto (XI) con el compuesto (III) en el que Z es hidroxilo en presencia de azodicarboxilato de dietilo, di-terc-butilo o diisopropilo y trifenilfosfina, en un disolvente inerte tal como por ejemplo tetrahidrofurano, agitando la mezcla de reacción a una temperatura adecuada, normalmente a 120°C bajo irradiación de microondas, durante un periodo de tiempo adecuado para permitir que se complete la reacción, normalmente 20 minutos. La reacción de Mitsunobu proporciona habitualmente una mezcla de los dos regioisómeros posibles, derivados de la alquilación en ambos átomos de nitrógeno del anillo de pirazol, que pueden separarse mediante métodos cromatográficos, mediante o bien cromatografía en columna o bien HPLC.

La síntesis del compuesto de fórmula (XI) en la que Y es fenilo se describe en la solicitud de patente WO 2006/072828. La síntesis del compuesto de fórmula (XI) en la que Y es 2-quinolinilo se describe en J. Med. Chem. 2009, 52 (16), 5188-5196.

Pueden prepararse compuestos intermedios de fórmula (VI) mediante métodos de síntesis bien conocidos por el experto en la técnica, tal como, por ejemplo, mediante la secuencia de reacción mostrada en el esquema 10.

Esquema 10

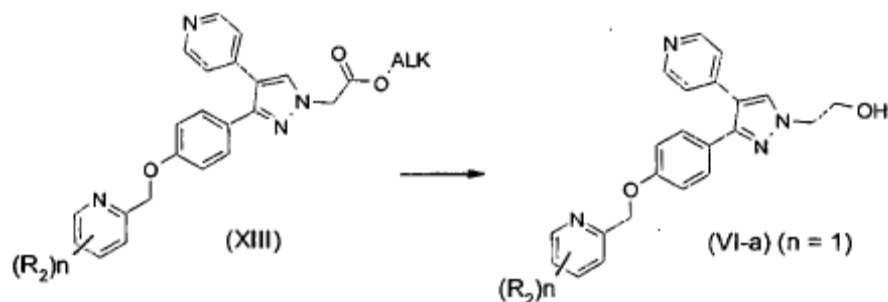


Por tanto, puede hacerse reaccionar un compuesto de fórmula (II) con un agente alquilante disponible comercialmente de fórmula (XII), en la que Z es un grupo saliente adecuado tal como halo, siendo bromo el más preferido, en presencia de una base adecuada tal como carbonato de cesio o carbonato de potasio, en un disolvente inerte tal como, por ejemplo, dimetilformamida, agitando la mezcla de reacción a una temperatura adecuada, normalmente a 100°C, usando calentamiento convencional o bajo irradiación de microondas, durante el tiempo requerido para lograr que se complete la reacción, normalmente 10 minutos en un horno microondas. La reacción de alquilación proporciona habitualmente una mezcla de los dos regioisómeros posibles, derivados de la alquilación en ambos átomos de nitrógeno del anillo de pirazol, que pueden separarse mediante métodos cromatográficos,

mediante o bien cromatografía en columna o bien HPLC.

Alternativamente, también pueden prepararse compuestos de fórmula (VI-a) en la que n es 1 mediante la secuencia de reacciones mostrada en el esquema 11.

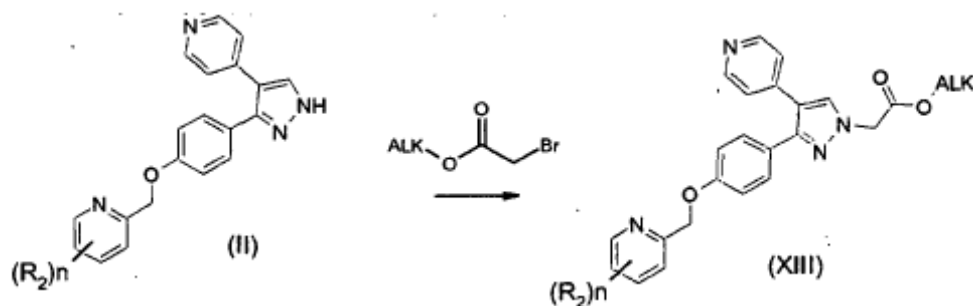
Esquema 11



Por tanto, puede reducirse el grupo éster de un compuesto de fórmula (XIII) dando lugar a alcohol mediante métodos de síntesis bien conocidos por el experto en la técnica, tal como, por ejemplo, reacción con borohidruro de sodio o cianoborohidruro de sodio, en un disolvente inerte adecuado o una mezcla de disolventes, tales como por ejemplo diclorometano y metanol, agitando la mezcla de reacción a una temperatura adecuada, normalmente a temperatura ambiente, durante el tiempo requerido para lograr que se complete la reacción, normalmente 2 horas, para proporcionar el compuesto de fórmula (VI-a) en la que n es 1.

Pueden prepararse compuestos intermedios de fórmula (XIII) mediante métodos de síntesis bien conocidos por el experto en la técnica, tal como, por ejemplo, mediante la secuencia de reacción mostrada en el esquema 12.

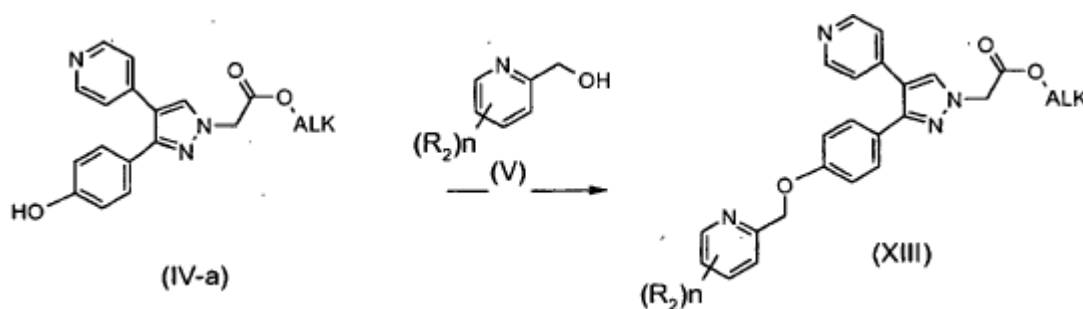
Esquema 12



Por tanto, puede hacerse reaccionar un compuesto de fórmula (II) con bromoacetato de metilo o etilo disponible comercialmente, en presencia de una base adecuada tal como carbonato de cesio o carbonato de potasio, en un disolvente inerte tal como, por ejemplo, dimetilformamida, agitando la mezcla de reacción a una temperatura adecuada, normalmente a temperatura ambiente, durante el tiempo requerido para lograr que se complete la reacción, normalmente 3-6 horas, para proporcionar un compuesto de fórmula (XIII). La reacción de alquilación proporciona habitualmente una mezcla de los dos regioisómeros posibles, derivados de la alquilación en ambos átomos de nitrógeno del anillo de pirazol, que pueden separarse mediante métodos cromatográficos, mediante o bien cromatografía en columna o bien HPLC.

Alternativamente, también puede prepararse un compuesto intermedio de fórmula (XIII) mediante una secuencia de reacción tal como se muestra en el esquema 13.

Esquema 13



Por tanto, puede hacerse reaccionar un compuesto de fórmula (IV-a) con un compuesto de fórmula (V) usando condiciones de Mitsunobu convencionales, que el experto en la técnica conoce bien. Por tanto, puede hacerse reaccionar el compuesto (IV-a) con el compuesto (V) en presencia de azodicarboxilato de dietilo, di-terc-butilo o diisopropilo y trifenilfosfina, en un disolvente inerte tal como por ejemplo tetrahidrofurano, agitando la mezcla de reacción a una temperatura adecuada, normalmente a 120 °C bajo irradiación de microondas, durante un periodo de tiempo adecuado para permitir que se complete la reacción, normalmente 15-20 minutos. Puede sintetizarse el compuesto de fórmula (IV-a) siguiendo la secuencia de reacción de hidrogenólisis que se mostró anteriormente en el esquema 8, partiendo de un compuesto de fórmula (X-a) en la que R1 es -CH₂-CO-OAlk, que puede sintetizarse según la secuencia de reacción mostrada anteriormente en el esquema 9.

Se determinó la actividad de los compuestos de fórmula (I) midiendo la inhibición de PDE10A2 - AMPc de rata y la pCl50 osciló entre 6,60 y 8,79. También se midió la selectividad con respecto otras PDE y en todos los casos era > 50 veces y en la mayoría de los compuestos > 100 veces.

Aplicaciones

Los compuestos según la presente invención encuentran diversas aplicaciones para la obtención de imágenes de tejidos, células o un huésped, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por tanto, por ejemplo, pueden usarse para mapear la distribución diferencial de PDE10 en sujetos de diferente edad y sexo. Además, permiten explorar para determinar la distribución diferencial de PDE10 en sujetos afectados por diferentes enfermedades o trastornos. Por tanto, la distribución anómala puede ser útil en el diagnóstico, detección de casos, estratificación de poblaciones de sujetos y en la monitorización de la progresión de la enfermedad en sujetos individuales. Los radioligandos pueden encontrar utilidad además en la determinación de la ocupación de sitios de PDE10A por otros ligandos. Como los radioligandos se administran en cantidades traza, no resultará ningún efecto terapéutico a partir de los mismos.

Parte experimental

I. QUÍMICA:

A continuación en el presente documento, el término "CL/EM" significa cromatografía de líquidos/espectrometría de masas, "CG/EM" significa cromatografía de gases/espectrometría de masas, "HPLC" significa cromatografía de líquidos de alta resolución, "DCM" significa diclorometano, "DMF" significa dimetilformamida, "EtOAc" significa acetato de etilo, "THF" significa tetrahidrofurano, "min" significa minutos, "h" significa horas, "R_t" significa tiempo de retención (en minutos), "[M+H]⁺" significa la masa protonada de la base libre del compuesto, "[M-H]" significa la masa desprotonada de la base libre del compuesto, "p.f." significa punto de fusión.

Se realizaron reacciones asistidas por microondas en un reactor de modo único: Reactor de microondas Biotage Initiator™ Sixty (Biotage) o en un reactor de modo múltiple: MicroSYNTH Labstation (Milestone, Inc.).

Se realizaron reacciones de hidrogenación en un hidrogenador de flujo continuo H-CUBE® de ThalesNano Nanotechnology Inc.

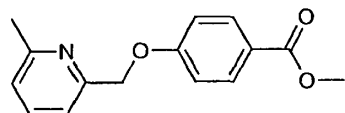
Se llevó a cabo cromatografía en capa fina (CCF) sobre placas de gel de sílice 60 F254 (Merck) usando disolventes de calidad para reactivo. Se realizó cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice, tamaño de partícula de 230-400 de malla y tamaño de poro de 60 Å (Merck) con técnicas convencionales. Se realizó cromatografía en columna ultrarrápida automatizada usando cartuchos listos para conectarse de Merck, sobre gel de sílice irregular, tamaño de partícula de 15-40 μm (columnas ultrarrápidas desechables de fase normal) en un sistema SPOT o FLASH de Armen Instrument.

Se ilustran varios métodos para preparar los compuestos de esta invención en los siguientes ejemplos. A menos que se indique lo contrario, se obtuvieron todos los materiales de partida de proveedores comerciales y se usaron sin purificación adicional.

A. Síntesis de productos intermedios y precursores

Producto intermedio 1

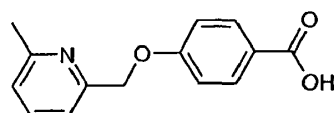
Éster metílico del ácido 4-(6-metil-piridin-2-ilmetoxi)-benzoico (I-1)



Se calentó una mezcla de 6-metil-2-piridinmetanol (7,0 g, 56,84 mmol), 4-hidroxibenzoato de metilo (8,65 g, 56,84 mmol), azodicarboxilato de diisopropilo (14,65 ml, 73,9 mmol) y trifenilfosfina (19,38 g, 73,9 mmol) en THF (42 ml) en un horno microondas a 120°C durante 20 min (se dividió la reacción en 7 lotes). Tras este tiempo, se extinguió la mezcla con agua, se extrajo con DCM, se evaporó el disolvente hasta sequedad a vacío y se purificó el residuo bruto mediante cromatografía en columna (gel de sílice; heptano/EtOAc desde 80/20 hasta 50/50). Se recogieron las fracciones deseadas y se evaporaron a vacío para proporcionar el producto intermedio deseado I-1 como un aceite naranja puro a alrededor del 50%, siendo la impureza principal óxido de trifenilfosfina. Se usó la mezcla en la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional (25 g, 85,5%). C₁₅H₁₅NO₃.

Producto intermedio 2

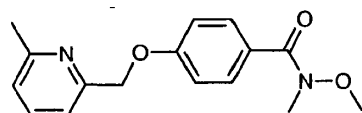
Ácido 4-(6-metil-piridin-2-ilmetoxi)-benzoico (I-2)



A una disolución del producto intermedio I-1 en 150 ml de una mezcla de metanol/THF (2:1) se le añadió hidróxido de sodio acuoso 2 M (49 ml, 97,2 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche, después a 60°C durante 2 h. Tras la evaporación del disolvente orgánico se lavó la fase acuosa con EtOAc y entonces se acidificó con HCl diluido hasta que el pH fue de 5-6. Se separó por filtración el compuesto intermedio I-2 que precipitó, se secó y se usó para la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional (9,0 g, 76,2%). C₁₄H₁₃NO₃.

Producto intermedio 3

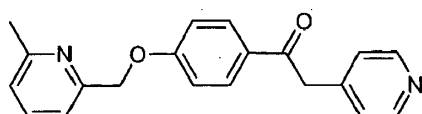
N-Metoxi-N-metil-4-(6-metil-piridin-2-ilmetoxi)-benzamida (I-3)



Se agitó una mezcla del producto intermedio I-2 (9,0 g, 37,0 mmol) y cloruro de tionilo (50 ml) a temperatura ambiente durante 3 h. Entonces se concentró la mezcla hasta sequedad y se disolvió el cloruro de ácido bruto en THF (100 ml). Entonces se añadieron lentamente trietilamina (20,5 ml, 148 mmol) y clorhidrato O,N-dimetilhidroxilamina (10,8 g, 111 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Tras extinguir con agua, se extrajo la mezcla con EtOAc, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (gel de sílice; heptano/EtOAc desde 40/60 hasta 0/100) para dar el compuesto intermedio I-3 como un aceite naranja que se usó para la siguiente reacción sin purificación adicional (6,2 g, 46,8%). C₁₆H₁₈N₂O₃.

Producto intermedio 4

2-Piridin-4-il-1-[4-(6-metil-piridin-2-ilmetoxi)-fenil]-etanona (I-4)

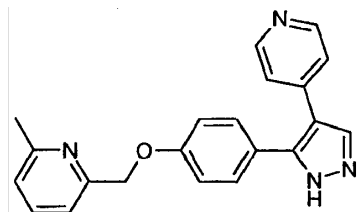


A una disolución de diisopropilamida de litio (disolución 2 M en THF, 43,3 ml, 86,6 mmol) en THF (35 ml) se le añadió gota a gota 4-metilpiridina (8,43 ml, 86,6 mmol) a 0°C bajo nitrógeno. Tras 30 min, se enfrió hasta -78°C y se añadieron gota a gota 35 ml de esta disolución a otra disolución del producto intermedio I-3 (6,2 g, 17,32 mmol) en

THF (65 ml) también enfriada hasta -78°C . Se agitó la mezcla a esta temperatura durante 2 h y entonces se añadieron gota a gota 20 ml más de la disolución preparada inicialmente. Se agitó la disolución resultante a -78°C durante una hora adicional. Tras este tiempo, se extinguió la mezcla de reacción con agua y se extrajo con DCM. Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a vacío. Se lavó el residuo bruto obtenido y se trituró con dietil éter proporcionando el compuesto intermedio I-4 (4,7 g, 85,2%) como un sólido de color amarillo pálido. $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$.

Producto intermedio 5

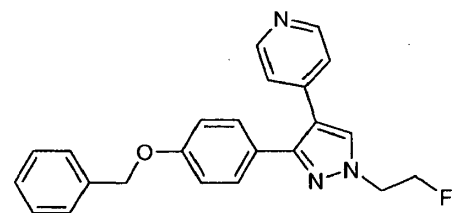
2-Metil-6-[4-(4-piridin-4-il-2H-pirazol-3-il)-fenoximetil]-piridina (I-5)



Se agitó una disolución del producto intermedio I-4 (4,7 g, 14,76 mmol) en dimetoximetil-dimetilamina (15 ml) a reflujo durante 1 h. Tras la evaporación del disolvente, se disolvió el residuo bruto en metanol (50 ml) y se añadió hidrato de hidrazina (1,08 ml, 22,14 mmol). Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 1 h, tiempo tras el que se evaporó el disolvente proporcionando un residuo sólido que se lavó y trituró con una mezcla de dietil éter/EtOAc, para proporcionar el compuesto intermedio I-5 (3,4g, 67,3%) como un sólido de color amarillo pálido. $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}$. CL/EM: Rt 2,48, m/z 343 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (método 7).

Producto intermedio 6

4-[3-(4-Benciloxi-fenil)-1-(2-fluoroetil)-1H-pirazol-4-il]-piridina (I-6)

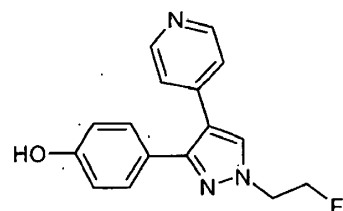


Se calentó una mezcla de 4-[3-(4-benciloxi-fenil)-1H-pirazol-4-il]-piridina (6,7 g, 20,47 mmol) que se sintetizó siguiendo el método descrito en la solicitud de patente WO 2006/072828, 1-bromo-2-fluoroetano (3,12 g, 24,56 mmol) y carbonato de cesio (20 g, 61,4 mmol) en DMF (42 ml) en un horno microondas a 150°C durante 5 min (se dividió la reacción en 6 lotes). Tras enfriar hasta temperatura ambiente, se desechó el sólido por filtración y se extinguió la disolución con agua y se extrajo adicionalmente con EtOAc. Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo bruto mediante cromatografía en columna (gel de sílice; acetonitrilo/diisopropil éter desde 30/70 hasta 80/20, y luego de nuevo con EtOAc/heptano 70/30). Se recogieron las fracciones deseadas y se evaporaron hasta sequedad proporcionando el compuesto intermedio deseado I-6 (4 g, 52,3%) como un aceite. $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}$. CL/EM: Rt 4,22, m/z 374 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (método 1).

También se aisló el regioisómero correspondiente I-6' 4-[5-(4-benciloxi-fenil)-1-(2-fluoroetil)-1H-pirazol-4-il]-piridina a partir de la purificación cromatográfica (2 g, 26,2%). $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}$.

Producto intermedio 7

4-[1-(2-Fluoroetil)-4-piridin-4-il-1H-pirazol-3-il]-fenol (I-7)

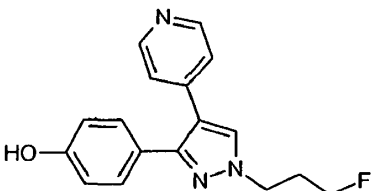


Se disolvió el compuesto intermedio I-6 (4 g, 10,71 mmol) en etanol (200 ml) y se sometió a hidrogenación en un

sistema H-Cube® usando Pd/C al 5% como catalizador (modo de hidrógeno completo, 2,5 ml/min) a 80°C y presión atmosférica. Se evaporó el disolvente hasta sequedad a vacío proporcionando el compuesto intermedio I-7 (2,5 g, 82,4%) que se usó para la siguiente reacción sin purificación adicional. $C_{16}H_{14}FN_3O$. CL/EM: Rt 1,57, m/z 284 $[M + H]^+$ (método 8).

Producto intermedio 8

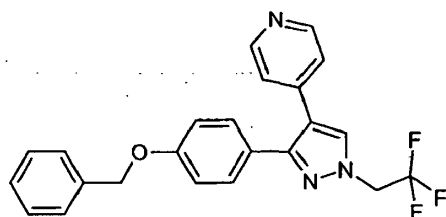
4-[1-(3-Fluoropropil)-4-piridin-4-il-1H-pirazol-3-il]-fenol (I-8)



Siguiendo el procedimiento para la preparación del compuesto intermedio I-7 pero sustituyendo 4-[3-(4-benciloxi-fenil)-1-(2-fluoroetil)-1H-pirazol-4-il]-piridina por 4-[3-(4-benciloxi-fenil)-1-(2-fluoropropil)-1H-pirazol-4-il]-piridina se proporcionó el compuesto intermedio I-8 (90%). $C_{17}H_{16}FN_3O$. CL/EM: Rt 1,81, m/z 298 $[M + H]^+$ (método 7).

Producto intermedio 9

4-[3-(4-Benciloxi-fenil)-1-(2,2,2-trifluoroetil)-1H-pirazol-4-il]-piridina (I-9)

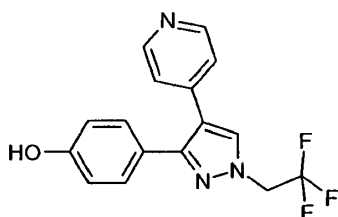


Se calentó una mezcla de 4-[3-(4-benciloxi-fenil)-1H-pirazol-4-il]-piridina (2,0 g, 6,11 mmol) que se sintetizó siguiendo el método descrito en la solicitud de patente WO 2006/072828, 1,1,1-trifluoro-2-yodoetano (0,733 ml, 7,33 mmol) y carbonato de cesio (5,97 g, 18,3 mmol) en DMF (12 ml) en un horno microondas a 120°C durante 20 min. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, se extinguió la mezcla con agua y se extrajo adicionalmente con EtOAc. Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a vacío. Se purificó el residuo bruto mediante cromatografía en columna (gel de sílice; acetonitrilo/diisopropil éter desde 50/50 hasta 80/20). Se recogieron las fracciones deseadas y se evaporaron hasta sequedad proporcionando el compuesto intermedio deseado I-9 puro a alrededor del 80% (1,2 g, 38,4%) como un aceite. $C_{23}H_{18}F_3N_3O$. CL/EM: Rt 4,86, m/z 410 $[M + H]^+$ (método 2).

También se aisló el regioisómero correspondiente I-9' 4-[5-(4-benciloxi-fenil)-1-(2,2,2-trifluoroetil)-1H-pirazol-4-il]-piridina a partir de la purificación cromatográfica (0,4 g, 14,6%). $C_{23}H_{18}F_3N_3O$.

Producto intermedio 10

4-[4-Piridin-4-il-1-(2,2,2-trifluoroetil)-1H-pirazol-3-il]-fenol (I-10)

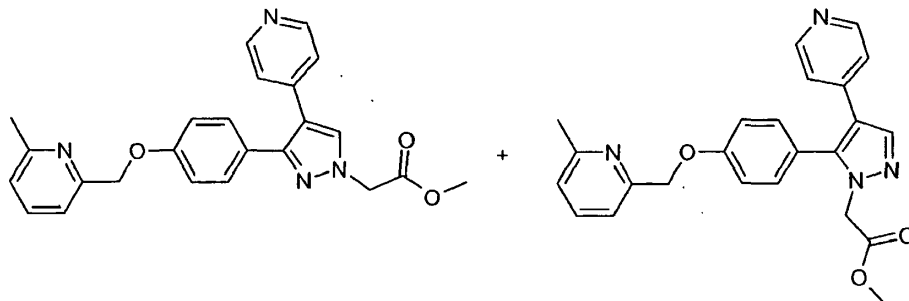


Se disolvió el compuesto intermedio I-9 en etanol (50 ml) y se sometió a hidrogenación en un sistema H-Cube® usando Pd/C al 5% como catalizador (modo de hidrógeno completo, 1,5 ml/min) a 80°C y presión atmosférica. Se evaporó el disolvente hasta sequedad a vacío proporcionando el compuesto intermedio I-10 (0,55 g, 75,4%) como un sólido blanco, que se usó para la siguiente reacción sin purificación adicional. $C_{16}H_{12}F_3N_3O$. CL/EM: Rt 1,82, m/z 320 $[M + H]^+$ (método 7).

Producto intermedio 11

Éster metílico del ácido {3-[4-(6-metilpiridin-2-ilmetoxi)-fenil]-4-piridin-4-il-pirazol-1-il}-acético (I-11) y éster metílico del ácido {5-[4-(6-metilpiridin-2-ilmetoxi)-fenil]-4-piridin-4-il-pirazol-1-il}-acético (I-11')

5



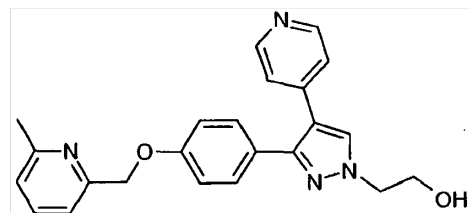
A una disolución con agitación del producto intermedio I-5 (0,30 g, 0,876 mmol) en DMF (6 ml) se le añadieron bromoacetato de metilo (0,10 ml, 1,051 mmol) y carbonato de cesio (0,86 g, 2,63 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 6 h. Entonces se extinguió con agua y se extrajo con EtOAc. Se separaron los disolventes orgánicos, se secaron sobre sulfato de sodio y se evaporaron hasta sequedad a vacío. Se purificó el residuo bruto mediante cromatografía en columna (gel de sílice; EtOAc/metanol de 100/0 a 90/10). Se recogieron las fracciones deseadas y se evaporaron a vacío para proporcionar una mezcla de los dos regioisómeros I-11 e I-11' que se usó tal cual para la siguiente reacción sin purificación adicional (0,21 g, 49,2%). $C_{24}H_{22}N_4O_3$.

10

15

Producto intermedio 12

2-{3-[4-(6-Metilpiridin-2-ilmetoxi)-fenil]-4-piridin-4-il-pirazol-1-il}-etanol (I-12)



20

A una disolución con agitación de la mezcla de productos intermedios I-11 e I-11' (0,21 g, 0,507 mmol) en una mezcla de DCM (4 ml) y metanol (1 ml) se le añadió borohidruro de sodio (0,096 g, 2,536 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 h. Entonces se extinguió la mezcla con agua, se extrajo con más DCM, se secó el disolvente orgánico sobre sulfato de sodio y se evaporó hasta sequedad. Se purificó el residuo bruto mediante cromatografía en columna (gel de sílice; EtOAc/metanol de 100/0 a 90/10). Se recogieron las fracciones deseadas y se evaporaron a vacío para proporcionar el compuesto intermedio I-12 (0,12 g, 61,2%). $C_{23}H_{22}N_4O_2$. CL/EM: Rt 3,48, m/z 387 $[M + H]^+$ (método 3).

25

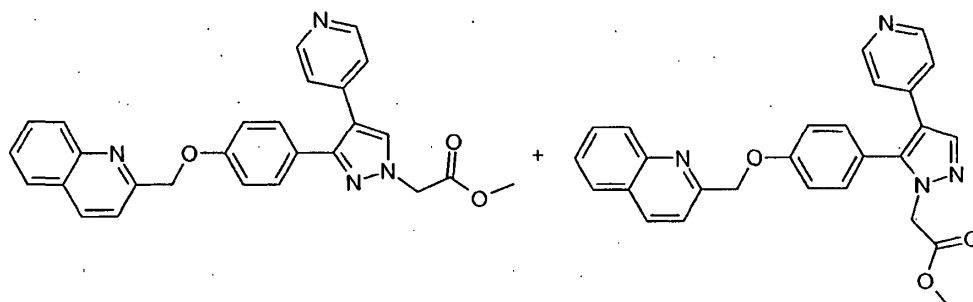
30

También se aisló el regioisómero correspondiente I-12' 2-{5-[4-(6-metilpiridin-2-ilmetoxi)-fenil]-4-piridin-4-il-pirazol-1-il}-etanol a partir de la separación cromatográfica (0,045 g, 23%). $C_{23}H_{22}N_4O_2$.

Producto intermedio 13

35

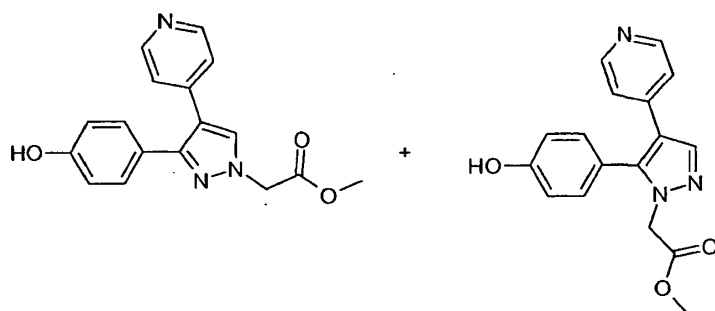
Éster metílico del ácido {4-piridin-4-il-3-[4-(quinolin-2-ilmetoxi)-fenil]-pirazol-1-il}-acético (I-13) y éster metílico del ácido {4-piridin-4-il-5-[4-(quinolin-2-ilmetoxi)-fenil]-pirazol-1-il}-acético (I-13')



A una disolución con agitación de 2-[4-(4-piridin-4-il-2H-pirazol-3-il)-fenoximetil]-quinolina (0,5 g, 1,33 mmol) que se sintetizó siguiendo el método descrito en J. Med. Chem. 2009, 52 (16), 5188-5196, en DMF (10 ml) se le añadieron bromoacetato de metilo (0,15 ml, 1,60 mmol) y carbonato de cesio (1,30 g, 3,99 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 3 h. Entonces se extinguió con agua y se extrajo con EtOAc. Se separaron los disolventes orgánicos, se secaron sobre sulfato de sodio y se evaporaron hasta sequedad a vacío. Se purificó el residuo bruto mediante cromatografía en columna (gel de sílice; EtOAc/metanol de 100/0 a 95/5). Se recogieron las fracciones deseadas y se evaporaron a vacío para proporcionar una mezcla de los dos regioisómeros I-13 e I-13' que se usó para la siguiente reacción sin purificación adicional (0,47 g, 47%). $C_{27}H_{22}N_4O_3$.

Producto intermedio 14

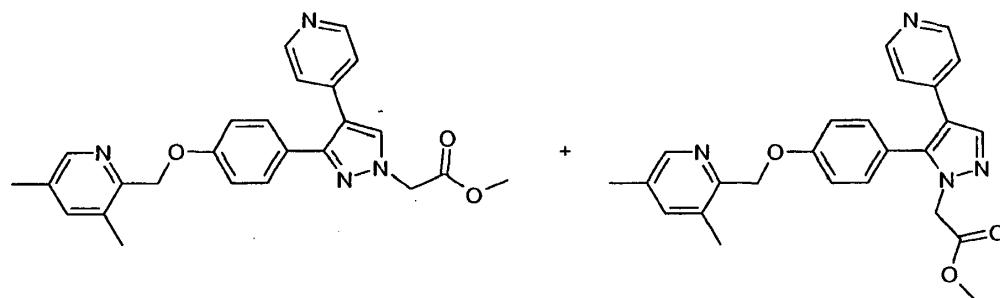
Éster metílico del ácido [3-(4-hidroxifenil)-4-piridin-4-il-pirazol-1-il]-acético (I-14) y éster metílico del ácido [5-(4-hidroxifenil)-4-piridin-4-il-pirazol-1-il]-acético (I-14')



Se disolvió la mezcla de compuestos intermedios I-13 e I-13' (0,47 g, 1,043 mmol) en etanol (20 ml) y se sometió a hidrogenación en un sistema H-Cube® usando Pd/C al 5% como catalizador (modo de hidrógeno completo, 1,5 ml/min) a 70°C y presión atmosférica. Se evaporó el disolvente hasta sequedad a vacío para dar un aceite amarillo que se hizo sólido mediante tratamiento con DCM. Se lavó el sólido con más DCM proporcionando una mezcla de los dos productos intermedios I-14 y I-14' que se usó para la siguiente reacción sin purificación adicional (0,235 g, 73%). $C_{17}H_{15}N_3O_3$. CL/EM: Rt 0,95 (regioisómero principal), Rt 1,00 (regioisómeros minoritarios), m/z 310 $[M + H]^+$ (método 8).

Producto intermedio 15

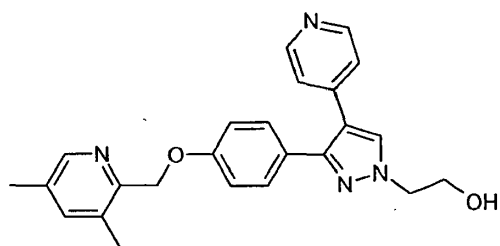
Éster metílico del ácido {3-[4-(3,5-dimetilpiridin-2-ilmetoxi)-fenil]-4-piridin-4-il-pirazol-1-il}-acético (I-15) y éster metílico del ácido {5-[4-(3,5-dimetilpiridin-2-ilmetoxi)-fenil]-4-piridin-4-il-pirazol-1-il}-acético (I-15')



Se calentó una mezcla de los dos regioisómeros I-14 e I-14' (0,235 g, 0,760 mmol), 3,5-dimetil-2-hidroximetilpiridina (0,156 g, 1,14 mmol), azodicarboxilato de diisopropilo (0,262 g, 1,14 mmol) y trifenilfosfina (0,299 g, 1,14 mmol) en THF (6 ml) en un horno microondas a 120°C durante 20 min. Tras este tiempo, se extinguió la mezcla con una disolución acuosa saturada de carbonato de sodio, se extrajo con EtOAc, se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó el disolvente hasta sequedad a vacío. Se purificó el residuo bruto mediante cromatografía en columna (gel de sílice; EtOAc/metanol de 100/0 a 95/5). Se recogieron las fracciones deseadas y se evaporó el disolvente a vacío para proporcionar una mezcla de los dos compuestos intermedios I-15 e I-15' que se usó para la siguiente reacción sin purificación adicional (0,18 g, 55%). $C_{25}H_{24}N_4O_3$.

Producto intermedio 16

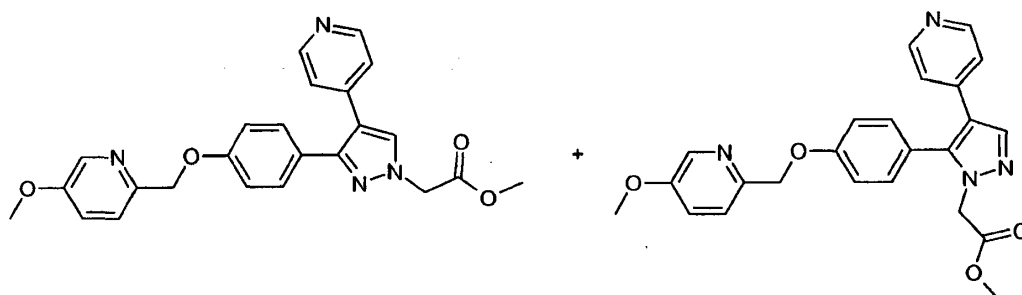
2-[3-[4-(3,5-Dimetilpiridin-2-ilmetoxi)-fenil]-4-piridin-4-il-pirazol-1-il]-etanol (I-16)



A una disolución con agitación de la mezcla de productos intermedios I-15 e I-15' (0,18 g, 0,420 mmol) en una mezcla de DCM (4 ml) y metanol (1 ml) se le añadió borohidruro de sodio (0,079 g, 2,10 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 h. Entonces se extinguió la mezcla con agua, se extrajo con más DCM, se secó el disolvente orgánico sobre sulfato de sodio y se evaporó hasta sequedad. Se purificó el residuo bruto mediante cromatografía en columna (gel de sílice; EtOAc/metanol de 100/0 a 90/10). Se recogieron las fracciones deseadas y se evaporaron a vacío para proporcionar el compuesto intermedio I-16 (0,12 g, 61,2%). No se aisló el otro regioisómero a partir de la separación cromatográfica. $C_{24}H_{24}N_4O_2$. CL/EM: Rt 2,53, m/z 401 $[M + H]^+$ (método 6).

Producto intermedio 17

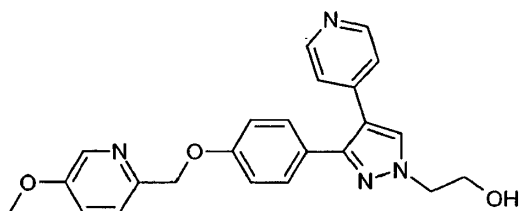
Éster metílico del ácido {3-[4-(5-metoxipiridin-2-ilmetoxi)-fenil]-4-piridin-4-il-pirazol-1-il}-acético (I-17) y éster metílico del ácido {5-[4-(5-metoxilopiridin-2-ilmetoxi)-fenil]-4-piridin-4-il-pirazol-1-il}-acético (I-17')



Se calentó una mezcla de los dos regioisómeros I-14 e I-14' (0,17 g, 0,550 mmol), (5-metoxipiridin-2-il)metanol (0,115 g, 0,825 mmol) tal como se describe en Bioorg. Med. Chem. 2005, 13, 6763-6770, azodicarboxilato de diisopropilo (0,190 g, 0,825 mmol) y trifetilfosfina (0,216 g, 0,825 mmol) en THF (4 ml) en un horno microondas a 120°C durante 20 min. Tras este tiempo, se evaporó el disolvente hasta sequedad a vacío y se purificó el residuo bruto mediante cromatografía en columna (gel de sílice; EtOAc/metanol de 100/0 a 95/5). Se recogieron las fracciones deseadas y se evaporó el disolvente a vacío para proporcionar una mezcla de los dos compuestos intermedios I-17 e I-17' que se usó para la siguiente reacción sin purificación adicional (0,18 g, 76%). $C_{24}H_{22}N_4O_4$.

Producto intermedio 18

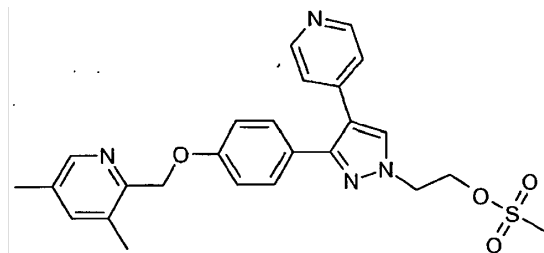
2-{3-[4-(5-Metoxipiridin-2-ilmetoxi)-fenil]-4-piridin-4-il-pirazol-1-il}-etanol (I-18)



A una disolución con agitación de la mezcla de productos intermedios I-17 e I-17' (0,18 g, 0,418 mmol) en una mezcla de DCM (4 ml) y metanol (1 ml) se le añadió borohidruro de sodio (0,079 g, 2,09 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 h. Entonces se extinguió la mezcla con agua, se extrajo con más DCM, se secó el disolvente orgánico sobre sulfato de sodio y se evaporó hasta sequedad a vacío. Se purificó el residuo bruto mediante cromatografía en columna (gel de sílice; EtOAc/metanol desde 100/0 hasta 90/10). Se recogieron las fracciones deseadas y se evaporaron a vacío para proporcionar el compuesto intermedio I-18 (0,09 g, 53,5%). No se aisló el otro regioisómero a partir de la separación cromatográfica. $C_{23}H_{22}N_4O_3$. CL/EM: Rt 2,87, m/z 403 $[M + H]^+$ (método 2).

Producto intermedio 19

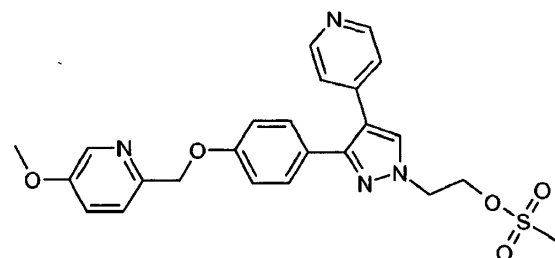
Éster 2-{3-[4-(3,5-dimetilpiridin-2-ilmetoxi)-fenil]-4-piridin-4-il-pirazol-1-il}-etilico del ácido metanosulfónico (I-19)



A una disolución del producto intermedio I-16 (5 mg, 0,012 mmol) en DCM (1 ml) se le añadió piridina (11 µl) y se agitó esta disolución a 0°C. Entonces se añadió anhídrido metanosulfónico (16,5 mg, 0,095 mmol) y se continuó agitando durante 4 horas a 0°C tras lo cual se evaporó el disolvente purgando con nitrógeno. Se redisolvió la mezcla en bruto en metanol (0,5 ml), se diluyó con agua (4,5 ml) y se hizo pasara a través un cartucho C₁₈ SepPak® (Waters, Milford, MA, EE.UU.) que se acondicionó previamente con metanol (3 ml) y agua milliQ® (6 ml). Entonces se aclaró el cartucho tres veces con un volumen adicional de agua (2 ml) para eliminar el máximo posible de anhídrido metanosulfónico que no había reaccionado. Se eluyó el producto del cartucho usando acetonitrilo (3 ml) y se evaporaron los disolventes a presión reducida. Antes de la evaporación de los disolventes, se realizó un análisis de HPLC para examinar la conversión del hidroxiprecursor I-16 en su derivado de O-mesilo I-19. Se realizó este análisis de HPLC en una columna analítica XTerra™ RP C₁₈ (Waters), que se eluyó con mezclas en gradiente de agua y acetonitrilo (0 min: 95:5 v/v, 25 min: 10:90 v/v, 30 min: 10:90 v/v, gradiente lineal) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. El análisis mostró que la tasa de conversión promedio era del 98% (n=9). Se eliminó el agua residual mediante destilación azeotrópica con acetonitrilo y se secó la mezcla durante la noche en el horno de vacío. En el día de los experimentos de radiomarcage, que es habitualmente el siguiente día, se disolvió este producto de reacción en DMF anhidro (1,5 ml) y se usó (0,3 ml) para radiofluoración nucleófila directa. C₂₅H₂₆N₄O₄S. µl

Producto intermedio I-20

Éster 2-{3-[4-(5-metoxipiridin-2-ilmetoxi)-fenil]-4-piridin-4-il-pirazol-1-il}-etilico del ácido metanosulfónico (I-20)



A una disolución del producto intermedio I-18 (5 mg, 0,012 mmol) en DCM (1 ml) se le añadió piridina (11 µl) y se agitó esta disolución a 0°C. Entonces se añadió anhídrido metanosulfónico (16,5 mg, 0,095 mmol) y se continuó agitando durante 4 horas a 0°C tras lo cual se evaporó el disolvente purgando con nitrógeno. Se redisolvió la mezcla en bruto en metanol (0,5 ml), se diluyó con agua (4,5 ml) y se hizo pasar a través de un cartucho C₁₈ SepPak® (Waters, Milford, MA, EE.UU.) que se acondicionó previamente con metanol (3 ml) y agua milliQ® (6 ml). Entonces se aclaró el cartucho tres veces con un volumen adicional de agua (2 ml) para eliminar al máximo posible el anhídrido metanosulfónico que no había reaccionado. Se eluyó el producto del cartucho usando acetonitrilo (3 ml) y se evaporaron los disolventes a presión reducida. Antes de la evaporación de los disolventes, se realizó un análisis de HPLC para examinar la conversión del hidroxiprecursor I-18 en su derivado de O-mesilo I-20. Se realizó este análisis de HPLC en una columna analítica XTerra™ RP C₁₈ (Waters), que se eluyó con mezclas en gradiente de agua y acetonitrilo (0 min: 95:5 v/v, 25 min: 10:90 v/v, 30 min: 10:90 v/v, gradiente lineal) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. El análisis mostró que la tasa de conversión promedio era del 98% (n = 9). Se eliminó el agua residual mediante destilación azeotrópica con acetonitrilo y se secó la mezcla durante la noche en el horno de vacío. En el día de los experimentos de radiomarcage, que es habitualmente el siguiente día, se disolvió este producto de reacción en DMF anhidro (1,5 ml) y se usó (0,3 ml) para radiofluoración nucleófila directa. C₂₄H₂₄N₄O₅S.

B. Preparación de los compuestos finales

Ejemplo B1

2-[[4-[1-(2-fluoroetil)-4-(4-piridinil)-1H-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-6-metil-piridina.diclorhidrato (B-1)

Se calentó una mezcla del compuesto intermedio I-5 (0,30 g, 0,876 mmol), 1-bromo-2-fluoroetano (0,083 ml, 1,051 mmol) y carbonato de cesio (0,86 g, 2,63 mmol) en DMF (5 ml) en un horno microondas a 150°C durante 10 min. Tras este tiempo, se extinguió la mezcla de reacción con agua y se extrajo con EtOAc. Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio y se evaporó el disolvente hasta sequedad a vacío. Se purificó el residuo bruto mediante cromatografía en columna (gel de sílice; EtOAc/metanol de 100/0 a 90/10) para dar una mezcla de los dos isómeros. Se sometió adicionalmente esta mezcla a otra purificación mediante cromatografía en columna (gel de sílice; acetonitrilo/metanol de 100/0 a 95/5). Se recogieron las fracciones deseadas y se evaporaron a vacío para proporcionar el compuesto deseado B-1 como un aceite (0,15 g, 44,1%). El tratamiento de este compuesto oleoso con una disolución de cloruro de hidrógeno en alcohol isopropílico, seguido por cristalización en dietil éter/DCM proporcionó la sal del ácido clorhídrico del compuesto B-1 como un sólido amarillo. $C_{23}H_{21}FN_4O \cdot 2HCl$. CL/EM: Rt 3,82, m/z 389 $[M + H]^+$ (método 3).

1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2,66 (s, 3 H), 4,56 (dt, $J=28,0$, 4,6 Hz, 2 H), 4,88 (dt, $J=47,2$, 4,6 Hz, 2 H), 5,37 (s, 2 H), 7,15 (d, $J=8,8$ Hz, 2 H), 7,44 (d, $J=8,6$ Hz, 2 H), 7,57 (d, $J=7,2$ Hz, 1 H), 7,67 (d, $J=7,2$ Hz, 1 H), 7,80 (d, $J=6,9$ Hz, 2 H), 8,13 (t, $J=7,1$ Hz, 1 H), 8,71 (s, 1 H), 8,74 (d, $J=6,9$ Hz, 2 H).

También se aisló el regioisómero correspondiente 2-{4-[2-(2-fluoroetil)-4-piridin-4-il-2H-pirazol-3-il]-fenoximetil}-6-metil-piridina (B-1') a partir de la separación cromatográfica con una pureza del 70% (0,15 g, 30,8%) como un aceite. $C_{23}H_{21}FN_4O$.

Radiosíntesis: Producción de bromuro de $[^{18}F]$ fluoroetilo y $[^{18}F]B-1$

Se produjo $[^{18}F]$ fluoruro ($[^{18}F]F^-$) mediante una reacción $[^{18}O(p,n)^{18}F]$ por irradiación de 1,95 ml de $[^{18}O]H_2O$ enriquecido al 97% (Rotem HYOX18, Rotem Industries, Beer Sheva, Israel) en un anticátodo de niobio usando protones de 18 MeV de un ciclotrón Cyclone 18/9 (Ion Beam Applications, Louvain-la-Neuve, Bélgica). Tras irradiación durante aproximadamente 60 min, se separó el $[^{18}F]F^-$ resultante de $[^{18}O]H_2O$ usando un cartucho de intercambio aniónico SepPak™ Light Accell plus QMA (Waters), que se acondicionó previamente mediante tratamientos consecutivos con disolución de K_2CO_3 0,5 M (10 ml) y agua (2×10 ml). Entonces se eluyó el $[^{18}F]F^-$ del cartucho en un vial de reacción cónico (1 ml) usando una disolución que contenía carbonato de potasio (2,47 mg) y Kryptofix® 222 (27,92 mg) disueltos en H_2O/CH_3CN (0,75 ml; 5:95 v/v). Se evaporaron los disolventes a 110°C aplicando calentamiento convencional durante 2 min. Tras la evaporación del disolvente, se secó adicionalmente $[^{18}F]F^-$ mediante destilación azeotrópica de trazas de agua usando acetonitrilo (1 ml) a una temperatura de 110°C hasta sequedad completa.

Se añadió una disolución de triflato de 2-bromoetilo (5 μ l, IsoSciences, Pensilvania, EE.UU.) en o-diclorobenceno (0,7 ml) al vial que contenía $[^{18}F]F^-$. Entonces se destiló el $[^{18}F]FetBr$ resultante a 120°C con un flujo de helio (3-4 ml/min) y se burbujó en un segundo vial de reacción que contenía el precursor I-5 (0,2 mg) y una pequeña cantidad (1-3 mg) de Cs_2CO_3 en DMF anhidro (0,2 ml). Tras la destilación de una cantidad suficiente de radiactividad en la disolución de precursor, se cerró el vial de reacción y se calentó a 90°C durante 15 min. Tras la reacción, se diluyó la mezcla en bruto con 1,6 ml de agua y se inyectó en el sistema de HPLC que consistía en una columna semipreparativa XBridge™ (C_{18} , 5 μ m, 4,6 mm $\times$ 150 mm; Waters) que se eluyó con una mezcla de tampón acetato de sodio 0,05 M pH 5,5 y EtOH (70:30 v/v) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Se realizó la detección por UV del eluato de HPLC a 254 nm. Se recogió el producto radiomarcado $[^{18}F]B-1$ tras aproximadamente 37 min (el isómero no deseado eluye tras aproximadamente 45 min). En promedio se recogieron 50 mCi ($n = 2$) de $[^{18}F]B-1$ purificado en un volumen de 1,5-2 ml (fase móvil). Entonces se diluyó el pico recogido correspondiente al $[^{18}F]B-1$ con solución salina normal (Mini Plasco®, Braun, Melsungen, Alemania) para reducir la concentración de etanol hasta $< 5\%$ y se filtró de manera estéril a través de un filtro de membrana de 0,22 μ m (Millex®-GV, Millipore, Irlanda). Se analizó la pureza del radiotrazador usando un sistema de HPLC analítica que consistía en una columna XBridge™ (C_{18} , 3,5 μ m, 3 mm $\times$ 100 mm; Waters) que se eluyó con una mezcla de tampón acetato de sodio 0,05 M pH 5,5 y acetonitrilo (70:30 v/v) a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min (Rt = 7,5 min). Se sintetizó $[^{18}F]B-1$ con un rendimiento radioquímico del 57% (con respecto a la radiactividad de partida de $[^{18}F]FetBr$ $n=2$). La pureza radioquímica tal como se examinó usando el sistema de HPLC analítica descrito anteriormente era $> 99\%$.

Ejemplo B2

2-[[4-[1-(3-fluoropropil)-4-(4-piridinil)-1H-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-6-metil-piridina.clorhidrato (B-2)

Se calentó una mezcla del compuesto intermedio I-5 (0,30 g, 0,876 mmol), 3-fluoropropan-1-ol (0,103 g, 1,314 mmol), azodicarboxilato de diisopropilo (0,261 ml, 1,314 mmol) y trifenilfosfina (0,345 g, 1,314 mmol) en THF (3 ml) en un horno microondas a 120°C durante 20 min. Tras este tiempo, se evaporó el disolvente hasta sequedad a vacío y se purificó el residuo bruto mediante cromatografía en columna (gel de sílice; acetonitrilo/metanol de 100/0 a 95/5). Se recogieron las fracciones deseadas y se evaporaron a vacío para proporcionar el compuesto deseado B-2 como un aceite incoloro, que se convirtió en la sal del ácido clorhídrico correspondiente (0,075 g, 19,5%) (estequiometría exacta desconocida) como un sólido blanco. $C_{24}H_{23}FN_4O \cdot HCl$. CL/EM: Rt 4,09, m/z 403 $[M + H]^+$ (método 3).

¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2,20 - 2,34 (m, 2 H), 2,62 (s, 3 H), 4,33 (t, *J*=6,9 Hz, 2 H), 4,54 (ddd, *J*=47,3, 5,6, 5,5 Hz, 2 H), 5,32 (s, 2 H), 7,14 (d, *J*=8,7 Hz, 2 H), 7,43 (d, *J*=8,7 Hz, 2 H), 7,50 (d, *J*=6,6 Hz, 1 H), 7,60 (d, *J*=6,4 Hz, 1 H), 7,78 (d, *J*=6,6 Hz, 2 H), 8,05 (s. a., 1 H), 8,69 (s, 1 H), 8,73 (d, *J*=6,4 Hz, 2 H).

5 También se aisló el regioisómero correspondiente 2-{4-[2-(3-fluoropropil)-4-piridin-4-il-2*H*-pirazol-3-il]-fenoximetil}-6-metil-piridina (B-2') a partir de la separación cromatográfica y se convirtió en su sal del ácido clorhídrico correspondiente (0,07 g, 18,2%) como un polvo blanco. C₂₄H₂₃FN₄O.

10 Ejemplo B3

2-[[4-1-(2-fluoroetil)-4-(4-piridinil)-1*H*-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-3,5-dimetil-piridina.succinato (B-3)

15 Se calentó una mezcla del compuesto intermedio I-7 (0,20 g, 0,706 mmol), 3,5-dimetil-2-hidroximetilpiridina (0,126 g, 0,918 mmol), azodicarboxilato de diisopropilo (0,211 g, 0,918 mmol) y trifenilfosfina (0,241 g, 0,918 mmol) en THF (4 ml) en un horno microondas a 120°C durante 15 min. Tras este tiempo, se extinguió la mezcla con una disolución acuosa saturada de carbonato de sodio y se extrajo con DCM. Se secó el disolvente orgánico sobre sulfato de sodio y se evaporó hasta sequedad a vacío. Se purificó el residuo bruto mediante cromatografía en columna (gel de sílice; EtOAc/metanol de 100/0 a 95/5). Se recogieron las fracciones deseadas y se evaporó el disolvente a vacío para proporcionar el compuesto B-3 como un aceite incoloro. Se disolvió el residuo en metanol (2 ml) y se añadió lentamente una disolución de ácido succínico (0,073 g, 0,619 mmol) en metanol (2 ml). Se evaporó el disolvente hasta sequedad y se lavó el residuo sólido varias veces con dietil éter, proporcionando la sal del ácido succínico del compuesto final B-3 (0,295 g, 80,3%) como un sólido blanco. C₂₄H₂₃FN₄O.C₄H₆O₄. CL/EM: Rt 3,08, *m/z* 403 [M + H]⁺ (método 7).

25 ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2,28 (s, 3 H), 2,35 (s, 3 H), 2,42 (s, 4 H), 4,49 (dt, *J*=27,7, 4,7 Hz, 2 H), 4,85 (dt, *J*=47,2, 4,6 Hz, 2 H), 5,16 (s, 2 H), 7,05 (d, *J*=8,8 Hz, 2 H), 7,23 (d, *J*=6,0 Hz, 2 H), 7,32 (d, *J*=8,8 Hz, 2 H), 7,48 (s, 1 H), 8,23 (s, 2 H), 8,46 (d, *J*=5,8 Hz, 2 H), 12,15 (s. a., 2 H).

30 Radiosíntesis: Producción de [¹⁸F]fluoruro y [¹⁸F]B-3

Se produjo [¹⁸F]fluoruro ([¹⁸F]F⁻) de una manera similar a la descrita anteriormente para la radiosíntesis de [¹⁸F]FetBr con la modificación de que se eluyó [¹⁸F]F⁻ del cartucho usando una disolución de 0,45 ml de la disolución de Kryptofix® 222/K₂CO₃ y 0,3 ml de acetonitrilo.

35 Se añadió el precursor de radiomarcaje I-19 (~0,6 mg en 0,3 ml de DMF) al complejo [¹⁸F]F⁻/K₂CO₃/Kryptofix® 222 secado y se llevó a cabo la reacción de sustitución nucleófila mediante calentamiento convencional a 90°C durante 15 min. Tras la reacción, se diluyó la mezcla en bruto con 1,4 ml de agua y se inyectó en el sistema de HPLC que consistía en una columna semipreparativa XBridge™ (C₁₈, 5 µm, 4,6 mm × 150 mm; Waters) que se eluyó con una mezcla de tampón acetato de sodio 0,05 M pH 5,5 y EtOH (65:35 v/v) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Se realizó la detección por UV del eluato de HPLC a 254 nm. Se recogió el producto radiomarcado [¹⁸F]B-3 tras aproximadamente 26 min. En promedio se recogieron 100 mCi (*n*=7, mín. 60 mCi, máx. 180 mCi) de [¹⁸F]B-3 purificado en un volumen de 1,5-2 ml (fase móvil). Entonces se diluyó el pico recogido correspondiente a [¹⁸F]B-3 con solución salina normal (Mini Plasco®, Braun, Melsungen, Alemania) para reducir la concentración de etanol hasta < 5% y se filtró de manera estéril a través de un filtro de membrana de 0,22 µm (Millex®-GV, Millipore, Irlanda). Se analizó la pureza del radiotrazador usando un sistema de HPLC analítica que consistía en una columna XBridge™ (C₁₈, 3,5 µm, 3 mm × 100 mm; Waters) que se eluyó con una mezcla de tampón acetato de sodio 0,05 M pH 5,5 y acetonitrilo (65:35 v/v) a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min (Rt = 5,6 min). Se realizó la detección por UV del eluato de HPLC a 254 nm. Se sintetizó [¹⁸F]B-3 con un rendimiento radioquímico del 16% (con respecto a la radiactividad de partida [¹⁸F]F⁻, *n*=7). La pureza radioquímica tal como se examinó usando el sistema de HPLC analítica descrito anteriormente era > 98%. Se encontró que la radiactividad específica promedio del trazador tal como se examinó usando el sistema de HPLC analítica descrito anteriormente era de 176 GBq/µmol (4764 Ci/mmol, *n*=7) al final de la síntesis (EOS).

55 Ejemplo B4

2-[[4-[1-(2-fluoroetil)-4-(4-piridinil)-1*H*-pirazol-3-il]fenoxilmetil]-5-metoxi-piridina (B-4)

60 Se calentó una mezcla del compuesto intermedio I-7 (0,13 g, 0,344 mmol), (5-metoxilopiridin-2il)metanol (0,072 g, 0,516 mmol) preparado tal como se describe en Bioorg.Med.Chem. 2005, 13, 6763-6770, azodicarboxilato de diisopropilo (0,10 ml, 0,516 mmol) y trifenilfosfina (0,135 g, 0,516 mmol) en THF (4 ml) en un horno microondas a 120°C durante 20 min. Tras este tiempo, se extinguió la mezcla con una disolución acuosa saturada de carbonato de sodio, se extrajo con EtOAc, se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó hasta sequedad a vacío. Se purificó el residuo bruto mediante cromatografía en columna (gel de sílice; EtOAc/metanol de 100/0 a 95/5). Se recogieron las fracciones deseadas y se evaporó el disolvente a vacío para proporcionar el compuesto B-4 (0,12 g, 86,2%) como

un sólido blanco. $C_{23}H_{21}FN_4O_2$. CL/EM: Rt 2,7, m/z 405 $[M + H]^+$ (método 7). 1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 3,87 (s, 3 H), 4,47 (dt, $J=27,0$, 4,7 Hz, 2 H), 4,84 (dt, $J=46,9$, 4,6 Hz, 2 H), 5,17 (s, 2 H), 6,97 (d, $J=8,8$ Hz, 2 H), 7,18 (d, $J=6,0$ Hz, 2 H), 7,22 (dd, $J=8,6$, 3,0 Hz, 1 H), 7,39 (d, $J=8,8$ Hz, 2 H), 7,44 (d, $J=8,6$ Hz, 1 H), 7,70 (s, 1 H), 8,30 (d, $J=3,0$ Hz, 1 H), 8,48 (d, $J=6,2$ Hz, 2 H).

5 Radiosíntesis: Producción de $[^{18}F]$ fluoruro y $[^{18}F]$ B-4

Se produjo $[^{18}F]$ fluoruro ($[^{18}F]F^-$) exactamente de la misma manera tal como se describió anteriormente para la radiosíntesis del compuesto $[^{18}F]$ B-3.

Se añadió el precursor de radiomarcaje I-20 (~0,6 mg en 0,3 ml de DMF) al complejo $[^{18}F]F/K_2CO_3/Kryptofix^{\text{®}} 222$ secado y se llevó a cabo la reacción de sustitución nucleófila mediante calentamiento convencional a 90°C durante 10 min. Tras la reacción, se diluyó la mezcla en bruto con 1,4 ml de agua y se inyectó en el sistema de HPLC que consistía en una columna semipreparativa XBridge[™] (C_{18} , 5 μm , 4,6 mm $\times$ 150 mm; Waters) que se eluyó con una mezcla de tampón acetato de sodio 0,05 M pH 5,5 y EtOH (70:30 v/v) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Se realizó la detección por UV del eluato de HPLC a 254 nm. Se recogió el producto radiomarcado $[^{18}F]$ B-4 tras aproximadamente 35 min. Normalmente, se recogieron aproximadamente 90 mCi de $[^{18}F]$ B-4 purificado en un volumen de 1,5-2 ml (fase móvil). Entonces se diluyó el pico recogido correspondiente a $[^{18}F]$ B-4 con solución salina normal (Mini Plasco[®], Braun, Melsungen, Alemania) para reducir la concentración de etanol hasta < 5% y se filtró de manera estéril a través de un filtro de membrana de 0,22 μm (Millex[®]-GV, Millipore, Irlanda). Se analizó la pureza del radiotrazador usando un sistema de HPLC analítica que consistía en una columna XBridge[™] (C_{18} , 3,5 μm , 3 mm $\times$ 100 mm; Waters) que se eluyó con una mezcla de tampón acetato de sodio 0,05 M pH 5,5 y acetonitrilo (70:30 v/v) a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min (Rt = 7,2 min). Se realizó la detección por UV del eluato de HPLC a 254 nm. Se sintetizó $[^{18}F]$ B-4 con un rendimiento radioquímico del 15% (con respecto a la radiactividad de partida $[^{18}F]F^-$, $n=2$). La pureza radioquímica tal como se examinó usando el sistema de HPLC analítica descrito anteriormente era > 99%. Se encontró que la radiactividad específica promedio del trazador tal como se examinó usando el sistema de HPLC analítica descrito anteriormente era de 141 GBq/ μmol (3800 Ci/mmol, $n=2$) al EOS.

30 Ejemplo B5

5-metoxi-2-[[4-[4-(4-piridinil)-1-(2,2,2-trifluoroetil)-1-*H*-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-piridina (B-5)

Se calentó una mezcla del compuesto intermedio I-10 (0,15 g, 0,47 mmol), (5-metoxilopiridin-2-il)metanol (0,098 g, 0,70 mmol), azodicarboxilato de diisopropilo (0,14 ml, 0,70 mmol) y trifenilfosfina (0,185 g, 0,70 mmol) en THF (3 ml) en un horno microondas a 120°C durante 20 min. Tras este tiempo, se extinguió la mezcla con una disolución acuosa saturada de carbonato de sodio y se extrajo con EtOAc. Se secó el disolvente orgánico sobre sulfato de sodio y se evaporó hasta sequedad a vacío. Se purificó el residuo bruto mediante cromatografía en columna (gel de sílice; EtOAc/metanol de 100/0 a 95/5). Se recogieron las fracciones deseadas y se evaporó el disolvente a vacío para proporcionar el compuesto B-5 (0,11 g, 53,2%) como un aceite incoloro que solidificó dejándolo estar, proporcionando un sólido blanco. $C_{23}H_{19}F_3N_4O_2$. CL/EM: Rt 4,27, m/z 441 $[M + H]^+$ (método 2). 1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 3,87 (s, 3 H), 4,77 (q, $J=8,3$ Hz, 2 H), 5,17 (s, 2 H), 6,97 (d, $J=9,0$ Hz, 2 H), 7,19 (d, $J=6,2$ Hz, 2 H), 7,23 (dd, $J=8,6$, 3,0 Hz, 1 H), 7,38 (d, $J=8,8$ Hz, 2 H), 7,44 (d, $J=8,6$ Hz, 1 H), 7,71 (s, 1 H), 8,30 (d, $J=2,8$ Hz, 1 H), 8,51 (d, $J=6,0$ Hz, 2 H).

45 Ejemplo B6

2-bromo-6-[[4-[1-(2-fluoroetil)-4-(4-piridinil)-1-*H*-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-piridina.0,75 succinato (B-6)

Se calentó una mezcla de compuesto intermedio I-7 (0,30 g, 1,06 mmol), (6-bromo-piridin-2-il)metanol (0,30 g, 1,59 mmol), azodicarboxilato de diisopropilo (0,315 ml, 1,59 mmol) y trifenilfosfina (0,417 g, 1,59 mmol) en THF (5 ml) en un horno microondas a 100°C durante 30 min. Tras este tiempo, se extinguió la mezcla con una disolución acuosa saturada de carbonato de sodio y se extrajo con DCM. Se secó el disolvente orgánico sobre sulfato de sodio y se evaporó hasta sequedad a vacío. Se purificó el residuo bruto mediante cromatografía en columna (gel de sílice; en primer lugar EtOAc/heptano 70/30 y luego dietil éter/DCM 70/30). Se recogieron las fracciones deseadas y se evaporó el disolvente a vacío para proporcionar el compuesto B-6 (0,30 g, 53,1%) como un aceite incoloro. Se convirtió una cantidad del compuesto B-6 (0,08 g) en la sal del ácido succínico correspondiente de una manera similar a la descrita anteriormente para el compuesto final B-3, proporcionando el compuesto final B-6 como un sólido blanco. $C_{22}H_{18}BrFN_4O_4 \cdot 0,75 C_4H_6O_4$. CL/EM: Rt 3,22, m/z 453 $[M + H]^+$ (método 7).

1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2,42 (s, 3 H), 4,50 (dt, $J=27,7$, 4,6 Hz, 2 H), 4,85 (dt, $J=47,2$, 4,7 Hz, 2 H), 5,20 (s, 2 H), 7,06 (d, $J=8,8$ Hz, 2 H), 7,22 (d, $J=6,0$ Hz, 2 H), 7,35 (d, $J=8,8$ Hz, 2 H), 7,59 (d, $J=7,4$ Hz, 1 H), 7,63 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H), 7,82 (t, $J=7,7$ Hz, 1 H), 8,24 (s, 1 H), 8,46 (d, $J=6,0$ Hz, 2 H), 12,16 (s. a., 1,5 H).

65 Ejemplo B7

2-[[4-[1-(2-fluoroetil)-4-(4-piridinil)-1H-pirazol-3-il]fenoxilmetil]-6-(trifluorometil)-piridina (B-7)

Se disolvió el compuesto B-6 (0,45 g, 0,725 mmol) en DMF (3 ml) y entonces se añadieron éster metílico del ácido (fluorosulfonyl)difluoroacético (0,464 ml, 3,62 mmol) y yoduro de cobre (0,69 g, 3,62 mmol) a la disolución. Se calentó la mezcla de reacción a 120°C en un tubo sellado durante 2 h. Se extinguió la mezcla de reacción con hidróxido de sodio 1 M acuoso y se extrajo con DCM: Se secó el disolvente orgánico sobre sulfato de sodio y se evaporó hasta sequedad a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (gel de sílice; EtOAc/heptano de 70/30 a 100/0). Se recogieron las fracciones deseadas y se evaporó el disolvente a vacío para dar el compuesto deseado como un aceite amarillo, que contenía óxido de trifenilfosfina como impureza principal. Se purificó adicionalmente el compuesto bruto mediante HPLC preparativa (C18 XBridge 30 x 100; gradiente de carbonato de amonio ac. a pH 9/acetonitrilo de desde 80/20 hasta 0/100) proporcionando B-7 como un aceite incoloro. Se hizo el compuesto sólido mediante la adición de dietil éter/heptano y finalmente se recrystalizó en diisopropil éter proporcionando el compuesto final B-7 (0,023 g, 7,2%) como un sólido blanco. C₂₃H₁₈F₄N₄O. CL/EM: Rt 3,73, *m/z* 443 [M + H]⁺ (método 4).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 4,50 (dt, *J*=27,8, 4,7 Hz, 2 H), 4,85 (dt, *J*=47,2, 4,6 Hz, 2 H), 5,31 (s, 2 H), 7,09 (d, *J*=8,8 Hz, 2 H), 7,22 (d, *J*=6,0 Hz, 2 H), 7,35 (d, *J*=8,8 Hz, 2 H), 7,89 (d, *J*=7,9 Hz, 1 H), 7,89 (d, *J*=7,6 Hz, 1 H), 8,18 (t, *J*=7,9 Hz, 1 H), 8,24 (s, 1 H), 8,46 (d, *J*=6,0 Hz, 2 H).

Ejemplo B8

2-Ciclopropil-6-[[4-[4-(2-fluoroetil)-4-(4-piridinil)-1H-pirazo]-3-il]fenoxi]metil]-piridina.succinato (B-8)

Se calentó una mezcla de compuesto B-6 (0,14 g, 0,263 mmol), ácido ciclopropilborónico (0,029 g, 0,341 mmol) y tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) (0,015 g, 0,013 mmol) en una mezcla de carbonato de sodio ac./dioxano 1:1 (5 ml) en un horno microondas a 130°C durante 15 min. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, se diluyó la mezcla en bruto con agua y se extrajo con DCM. Se secó el disolvente orgánico sobre sulfato de sodio y se evaporó hasta sequedad a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (gel de sílice; EtOAc), se recogieron las fracciones deseadas y se evaporó el disolvente a vacío para dar el compuesto deseado como un aceite incoloro, que contenía óxido de trifenilfosfina como impureza principal. Se purificó adicionalmente el compuesto mediante HPLC preparativa (C18 XBridge 19 x 100; gradiente de carbonato de amonio ac. a pH 9/acetonitrilo desde 80/20 hasta 0/100) proporcionando B-8 como un aceite incoloro. Se disolvió el residuo en metanol (2 ml) y se añadió lentamente una disolución de ácido succínico (0,017 g, 0,144 mmol) en metanol (1 ml). Se evaporó el disolvente hasta sequedad y se trató el residuo con DCM/diisopropil éter, proporcionando la sal del ácido succínico del compuesto final B-8 (0,076 g, 54,4%) como un sólido blanco. C₂₅H₂₃FN₄O·C₄H₆O₄. CL/EM: Rt 4,19, *m/z* 415 [M + H]⁺ (método 2).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0,87 - 0,99 (m, 4 H), 2,05 - 2,16 (m, 1 H), 2,42 (s, 4 H), 4,49 (dt, *J*=27,7, 4,6 Hz, 2 H), 4,85 (dt, *J*=47,2, 4,7 Hz, 2 H), 5,10 (s, 2 H), 7,04 (d, *J*=9,0 Hz, 2 H), 7,20 - 7,24 (m, 3 H), 7,26 (d, *J*=7,4 Hz, 1 H), 7,33 (d, *J*=8,8 Hz, 2 H), 7,68 (t, *J*=7,7 Hz, 1 H), 8,24 (s, 1 H), 8,45 (d, *J*=6,2 Hz, 2 H), 12,17 (s. a., 1 H).

Se prepararon los siguientes compuestos siguiendo uno de los métodos de síntesis descritos anteriormente.

3-metoxi-2-[[4-[4-(4-piridinil)-1-(2,2,2-trifluoroetil)-1H-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-piridina (B-9)

Siguiendo el procedimiento para la preparación del compuesto B-5 pero sustituyendo (5-metoxilopiridin-2-il)metanol por (3-metoxipiridin-2-il)metanol se proporcionó el compuesto final B-9 (58%) como un sólido blanco que se cristalizó adicionalmente en diisopropil éter. C₂₃H₁₉F₃N₄O₂. CL/EM: Rt 3,01, *m/z* 441 [M + H]⁺ (método 7)).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3,89 (s, 3 H), 4,77 (q, *J*=8,3 Hz, 2 H), 5,26 (s, 2 H), 7,02 - 7,07 (m, 2 H), 7,17 - 7,21 (m, 2 H), 7,23 (dd, *J*=8,3, 1,6 Hz, 1 H), 7,27 (dd, *J*=8,3, 4,6 Hz, 1 H), 7,34 - 7,41 (m, 2 H), 7,70 (s, 1 H), 8,25 (dd, *J*=4,4, 1,6 Hz, 1 H), 8,49 - 8,53 (m, 2 H).

3-(2-fluoroetoxi)-2-[[4-[4-(4-piridinil)-1-(2,2,2-trifluoroetil)-1H-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-piridina.succinato (B-10)

Siguiendo el procedimiento para la preparación del compuesto B-5 pero sustituyendo (5-metoxilopiridin-2-il)metanol por [3-(2-fluoroetoxi)-piridin-2-il]-metanol se proporcionó el compuesto final B-10 que se convirtió en la sal del ácido succínico correspondiente, de una manera similar a la descrita anteriormente para el compuesto final B-3, que se cristalizó en dietil éter proporcionando la sal del ácido succínico del compuesto final B-10 (33,8%) como un sólido blanco. C₂₄H₂₀F₄N₄O₂·C₄H₆O₄. CL/EM: Rt 2,96, *m/z* 473 [M + H]⁺ (método 7).

¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2,40 (s, 4 H), 4,31 - 4,42 (m, 2 H), 4,67 - 4,82 (m, 2 H), 5,21 (q, *J*=9,0 Hz, 2 H), 5,18 (s, 2 H), 7,05 (d a., *J*=8,7 Hz, 2 H), 7,22 - 7,26 (m, 2 H), 7,31 (d a., *J*=8,7 Hz, 2 H), 7,40 (dd, *J*=8,4, 4,9 Hz, 1 H), 7,56 (d, *J*=8,4 Hz, 1 H), 8,19 (dd, *J*=4,5, 1,0 Hz, 1 H), 8,28 (s, 1 H), 8,45 - 8,52 (m, 2 H), 12,19 (s. a., 2 H).

5-(2-fluoroetoxi)-2-[[4-[4-(4-piridinil)-1-(2,2,2-trifluoroetil)-1H-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-piridina (B-11)

Siguiendo el procedimiento para la preparación del compuesto B-5 pero sustituyendo (5-metoxilopiridin-2-il)metanol

por [5-(2-fluoroetoxi)-piridin-2-il]-metanol se proporcionó el compuesto final B-11 (20,3%) como un sólido blanco tras la cristalización en diisopropil éter/heptanos. $C_{24}H_{20}F_4N_4O_2$. CL/EM: Rt 3,9, m/z 473 $[M + H]^+$ (método 5).

5 1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 4,22 - 4,34 (m, 2 H), 4,70 - 4,87 (m, 2 H), 4,77 (q, $J=8,3$ Hz, 2 H), 5,18 (s, 2 H), 6,94 - 7,00 (m, 2 H), 7,17 - 7,21 (m, 2 H), 7,27 (dd, $J=8,6$, 2,8 Hz, 1 H), 7,35 - 7,41 (m, 2 H), 7,46 (d, $J=8,6$ Hz, 1 H), 7,71 (s, 1 H), 8,33 (d, $J=2,8$ Hz, 1 H), 8,49 - 8,54 (m, 2 H).

2-[[4-[1-(3-fluoropropil)-4-(4-piridinil)-1H-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-3-metoxi-piridina (B-12)

10 Siguiendo el procedimiento para la preparación del compuesto B-5, pero sustituyendo (5-metoxilopiridin-2-il)metanol por (3-metoxipiridin-2-il)metanol e I-10 por el compuesto intermedio I-8, se proporcionó el compuesto final B-12 (40%) como un sólido blanco. $C_{24}H_{23}FN_4O_2$. CL/EM: Rt 3,78, m/z 419 $[M + H]^+$ (método 2).

15 1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 2,34 (dquin, $J=26,9$, 6,0, 6,0, 6,0, 6,0 Hz, 2 H), 3,89 (s, 3 H), 4,33 (t, $J=6,8$ Hz, 2 H), 4,51 (dt, $J=47,1$, 5,5 Hz, 2 H), 5,25 (s, 2 H), 7,01 - 7,06 (m, 2 H), 7,16 - 7,20 (m, 2 H), 7,23 (dd, $J=8,4$, 1,2 Hz, 1 H), 7,27 (dd, $J=8,4$, 4,7 Hz, 1 H), 7,34 - 7,41 (m, 2 H), 7,63 (s, 1 H), 8,25 (dd, $J=4,5$, 1,6 Hz, 1 H), 8,45 - 8,50 (m, 2 H).

20 3-(2-fluoroetoxi)-2-[[4-[1-(3-fluoropropil)-4-(4-piridinil)-1H-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-piridina.succinato (B-13)

25 Siguiendo el procedimiento para la preparación del compuesto B-5, pero sustituyendo (5-metoxilopiridin-2-il)metanol por [3-(2-fluoroetoxi)-piridin-2-il]-metanol e I-10 por el compuesto intermedio I-8, se proporcionó el compuesto final B-13 que se convirtió en la sal del ácido succínico correspondiente, de una manera similar a la descrita anteriormente para el compuesto final B-3, que se cristalizó en dietil éter/diisopropil éter proporcionando la sal del ácido succínico del compuesto final B-13 (39,2%) como un sólido blanco. $C_{25}H_{24}F_2N_4O_2 \cdot C_4H_6O_4$. CL/EM: Rt 2,75, m/z 451 $[M + H]^+$ (método 7).

30 1H -RMN (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 2,25 (dquin, $J=26,3$, 6,4, 6,4, 6,4, 6,4 Hz, 2 H), 2,42 (s, 4 H), 4,27 (t, $J=6,9$ Hz, 2 H), 4,37 (dt, $J=29,8$, 3,8 Hz, 2 H), 4,53 (dt, $J=47,4$, 5,7 Hz, 2 H), 4,75 (dt, $J=47,7$, 3,5 Hz, 2 H), 5,18 (s, 2 H), 7,04 (d a., $J=8,7$ Hz, 2 H), 7,19 - 7,25 (m, 2 H), 7,31 (d a., $J=8,7$ Hz, 2 H), 7,40 (dd, $J=8,4$, 4,6 Hz, 1 H), 7,56 (d, $J=8,1$ Hz, 1 H), 8,19 (d, $J=4,6$ Hz, 1 H), 8,23 (s, 1 H), 8,45 (d a., $J=6,1$ Hz, 2 H), 12,17 (s. a., 2 H).

2-[[4-[1-(3-fluoropropil)-4-(4-piridinil)-1H-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-5-metoxi-piridina.0,5 succinato (B-14)

35 Siguiendo el procedimiento para la preparación del compuesto B-5, pero sustituyendo (5-metoxilopiridin-2-il)metanol por (5-metoxilopiridin-2-il)metanol e I-10 por el compuesto intermedio I-8, se proporcionó el compuesto final B-14 como un aceite incoloro, que se convirtió en la sal del ácido succínico correspondiente, de una manera similar a la descrita anteriormente para el compuesto final B-3, que se cristalizó en dietil éter proporcionando la sal del ácido succínico del compuesto final B-14 (25,6%) como un sólido blanco. $C_{24}H_{23}FN_4O_2 \cdot 0,5C_4H_6O_4$. CL/EM: Rt 3,97, m/z 419 $[M + H]^+$ (método 2).

45 1H -RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 2,24 (dquin, $J=26,4$, 6,2 Hz, 2 H), 2,41 (s, 2 H), 3,84 (s, 3 H), 4,27 (t, $J=6,9$ Hz, 2 H), 4,52 (dt, $J=47,2$, 5,7 Hz, 2 H), 5,11 (s, 2 H), 7,03 (d a., $J=8,8$ Hz, 2 H), 7,17 - 7,25 (m, 2 H), 7,31 (d a., $J=8,8$ Hz, 2 H), 7,43 (dd, $J=8,3$, 3,0 Hz, 1 H), 7,50 (d, $J=8,6$ Hz, 1 H), 8,23 (s, 1 H), 8,29 (d, $J=2,8$ Hz, 1 H), 8,40 - 8,48 (m, 2 H), 12,18 (s. a., 1 H).

5-(2-fluoroetoxi)-2-[[4-[1-(3-fluoropropil)-4-(4-piridinil)-1H-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-piridina (B-15)

50 Siguiendo el procedimiento para la preparación del compuesto B-5, pero sustituyendo (5-metoxilopiridin-2-il)metanol por [5-(2-fluoroetoxi)-piridin-2-il]-metanol e I-10 por el compuesto intermedio I-8, se proporcionó el compuesto B-15 como un aceite incoloro que solidificó dejándolo estar. Finalmente se lavó el compuesto con diisopropil éter para proporcionar el compuesto final B-15 (35,8%) como un sólido blanco. $C_{25}H_{24}F_2N_4O_2$. CL/EM: Rt 3,69, m/z 451 $[M + H]^+$ (método 5).

55 1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 2,34 (dquin, $J=26,9$, 6,2, 6,2, 6,2, 6,2 Hz, 2 H), 4,23 - 4,33 (m, 2 H), 4,33 (t, $J=6,7$ Hz, 2 H), 4,51 (dt, $J=47,4$, 5,7 Hz, 2 H), 4,71 - 4,86 (m, 2 H), 5,17 (s, 2 H), 6,94 - 6,99 (m, 2 H), 7,18 (d a., $J=6,1$ Hz, 2 H), 7,27 (dd, $J=8,7$, 2,9 Hz, 1 H), 7,35 - 7,41 (m, 2 H), 7,46 (d, $J=8,7$ Hz, 1 H), 7,64 (s, 1 H), 8,33 (d a., $J=2,9$ Hz, 1 H), 8,48 (d a., $J=6,1$ Hz, 2 H).

60 2-[[4-[1-(2-fluoroetil)-4-(4-piridinil)-1H-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-3-metoxi-piridina.succinato (B-16)

65 Siguiendo el procedimiento para la preparación del compuesto B-4 pero sustituyendo (5-metoxilopiridin-2-il)metanol por (3-metoxipiridin-2-il)metanol se proporcionó el compuesto B-16 que se convirtió en la sal del ácido succínico correspondiente, de una manera similar a la descrita anteriormente para el compuesto final B-3, que se cristalizó en dietil éter proporcionando la sal del ácido succínico del compuesto final B-16 (32,5%) como un sólido blanco.

$C_{23}H_{21}FN_4O_2 \cdot C_4H_6O_4$. CL/EM: Rt 3,52, m/z 405 $[M + H]^+$ (método 2).

1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2,41 (s, 4 H), 3,86 (s, 3 H), 4,49 (dt, $J=27,7$, 4,8 Hz, 2 H), 4,85 (dt, $J=47,2$, 4,8 Hz, 2 H), 5,13 (s, 2 H), 7,03 (d a., $J=8,8$ Hz, 2 H), 7,18 - 7,26 (m, 2 H), 7,31 (d a., $J=8,8$ Hz, 2 H), 7,41 (dd, $J=8,3$, 4,6 Hz, 1 H), 7,52 (dd, $J=8,4$, 1,0 Hz, 1 H), 8,16 (dd, $J=4,6$, 1,4 Hz, 1 H), 8,23 (s, 1 H), 8,43 - 8,48 (m, 2 H), 12,16 (s. a., 2 H).

3-(2-fluoroetoxi)-2-[[4-[1-(2-fluoroetil)-4-(4-piridinil)-1H-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-piridina.succinato (B-17)

Seguendo el procedimiento para la preparación del compuesto B-4 pero sustituyendo (5-metoxipiridin-2-il)metanol por [3-(2-fluoroetoxi)-piridin-2-il]-metanol se proporcionó el compuesto B-17 que se convirtió en la sal del ácido succínico correspondiente, de una manera similar a la descrita anteriormente para el compuesto final B-3, que se cristalizó en dietil éter proporcionando la sal del ácido succínico del compuesto final B-17 (78,3%) como un sólido blanco. $C_{24}H_{22}F_2N_4O_2 \cdot C_4H_6O_4$. CL/EM: Rt 2,52, m/z 437 $[M + H]^+$ (método 7).

1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2,42 (s, 4 H), 4,32 - 4,41 (m, 2 H), 4,49 (dt, $J=27,7$, 4,6 Hz, 2 H), 4,68 - 4,81 (m, 2 H), 4,85 (dt, $J=47,1$, 4,9 Hz, 2 H), 5,18 (s, 2 H), 7,04 (d a., $J=8,7$ Hz, 2 H), 7,21 - 7,25 (m, 2 H), 7,32 (d a., $J=9,0$ Hz, 2 H), 7,40 (dd, $J=8,4$, 4,6 Hz, 1 H), 7,56 (d, $J=8,1$ Hz, 1 H), 8,19 (d, $J=4,6$ Hz, 1 H), 8,23 (s, 1 H), 8,44 - 8,48 (m, 2 H), 12,16 (s. a., 2 H).

3-fluoro-2-[[4-[1-(2-fluoroetil)-4-(4-piridinil)-1H-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-piridina.1,2 succinato (B-18)

Seguendo el procedimiento para la preparación del compuesto B-6 pero sustituyendo (6-bromopiridin-2-il)metanol por (3-fluoropiridin-2-il)metanol se proporcionó el compuesto B-18 que se convirtió en la sal del ácido succínico correspondiente, de una manera similar a la descrita anteriormente para el compuesto final B-3, que se cristalizó en dietil éter proporcionando la sal del ácido succínico del compuesto final B-18 (23,9%) como un sólido blanco. $C_{22}H_{18}F_2N_4O \cdot 1,2C_4H_6O_4$. CL/EM: Rt 2,63, m/z 393 $[M + H]^+$ (método 7).

1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2,41 (s, 4,8 H), 4,50 (dt, $J=27,7$, 4,6 Hz, 2 H), 4,85 (dt, $J=46,9$, 4,9 Hz, 2 H), 5,25 (d, $J=2,1$ Hz, 2 H), 7,04 - 7,10 (m, 2 H), 7,19 - 7,25 (m, 2 H), 7,30 - 7,37 (m, 2 H), 7,54 (dt, $J=8,5$, 4,4 Hz, 1 H), 7,78 - 7,84 (m, 1 H), 8,24 (s, 1 H), 8,42 - 8,51 (m, 3 H), 12,26 (s. a., 2,4 H).

5-(2-fluoroetoxi)-2-[[4-[1-(2-fluoroetil)-4-(4-piridinil)-1H-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-piridina (B-19)

Seguendo el procedimiento para la preparación del compuesto B-4, pero sustituyendo (5-metoxipiridin-2-il)metanol por [5-(2-fluoroetoxi)-piridin-2-il]-metanol se proporcionó el compuesto B-19 (56,3%) como un sólido blanco tras tratamiento con diisopropil éter. $C_{24}H_{22}F_2N_4O_2$. CL/EM: Rt 3,48, m/z 437 $[M + H]^+$ (método 5).

1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 4,22 - 4,34 (m, 2 H), 4,47 (dt, $J=27,1$, 4,9 Hz, 2 H), 4,70 - 4,87 (m, 2 H), 4,84 (dt, $J=46,9$, 4,6 Hz, 2 H), 5,18 (s, 2 H), 6,97 (d a., $J=8,8$ Hz, 2 H), 7,16 - 7,21 (m, 2 H), 7,27 (dd, $J=8,6$, 2,8 Hz, 1 H), 7,36 - 7,42 (m, 2 H), 7,46 (d, $J=8,6$ Hz, 1 H), 7,70 (s, 1 H), 8,33 (d, $J=2,8$ Hz, 1 H), 8,45 - 8,52 (m, 2 H).

5-bromo-2-[[4-[1-(2-fluoroetil)-4-(4-piridinil)-1H-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-piridina (B-20)

Seguendo el procedimiento para la preparación del compuesto B-6 pero sustituyendo (6-bromopiridin-2-il)metanol por (5-bromopiridin-2-il)metanol se proporcionó el compuesto B-20 (15,6%) como un sólido blanco tras tratamiento con dietil éter. $C_{22}H_{18}BrFN_4O$. CL/EM: Rt 3,29, m/z 453 $[M + H]^+$ (método 7).

1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 4,47 (dt, $J=27,0$, 4,6 Hz, 2 H), 4,84 (dt, $J=46,9$, 4,9 Hz, 2 H), 5,18 (s, 2 H), 6,93 - 6,98 (m, 2 H), 7,17 - 7,20 (m, 2 H), 7,38 - 7,42 (m, 2 H), 7,45 (dd, $J=8,3$, 0,7 Hz, 1 H), 7,70 (d, $J=0,5$ Hz, 1 H), 7,85 (dd, $J=8,3$, 2,3 Hz, 1 H), 8,47 - 8,51 (m, 2 H), 8,66 (dd, $J=2,3$, 0,5 Hz, 1 H).

6-[[4-[1-(2-fluoroetil)-4-(4-piridinil)-1H-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-3-piridincarbonitrilo (B-21)

Seguendo el procedimiento para la preparación del compuesto B-6 pero sustituyendo (6-bromopiridin-2-il)metanol por 6-(hidroximetil)nicotinonitrilo se proporcionó el compuesto B-21 (39,4%) como un sólido blanco. $C_{23}H_{18}FN_5O$. CL/EM: Rt 3,11, m/z 400 $[M + H]^+$ (método 4).

1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 4,48 (dt, $J=27,2$, 4,6 Hz, 2 H), 4,85 (dt, $J=46,8$, 4,6 Hz, 2 H), 5,28 (s, 2 H), 6,96 (d a., $J=9,0$ Hz, 2 H), 7,16 - 7,21 (m, 2 H), 7,39 - 7,45 (m, 2 H), 7,72 (d, $J=8,4$ Hz, 1 H), 7,71 (s, 1 H), 8,00 (dd, $J=8,1$, 2,0 Hz, 1 H), 8,49 (d a., $J=6,1$ Hz, 2 H), 8,87 (d, $J=1,4$ Hz, 1 H).

2-[[4-[1-(2-fluoroetil)-4-(4-piridinil)-1H-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-5-(trifluorometil)-piridina (B-22)

Seguendo el procedimiento para la preparación del compuesto B-6 pero sustituyendo (6-bromopiridin-2-il)metanol

por (5-trifluorometil-piridin-2-il)metanol se proporcionó el compuesto B-22 (29,4%) como un sólido blanco. $C_{23}H_{18}F_4N_4O$. CL/EM: Rt 3,37, m/z 443 $[M + H]^+$ (método 7).

1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 4,48 (dt, $J=27,0$, 46 Hz, 2 H), 4,84 (dt, $J=46,9$, 4,6 Hz, 2 H), 5,29 (s, 2 H), 6,95 - 7,00 (m, 2 H), 7,16 - 7,21 (m, 2 H), 7,39 - 7,45 (m, 2 H), 7,70 (d, $J=6,5$ Hz, 1 H), 7,70 (s, 1 H), 7,97 (dd, $J=8,2$, 2,0 Hz, 1 H), 8,46 - 8,53 (m, 2 H), 8,86 (s. a., 1 H).

5-ciclopropil-2-[[4-[1-(2-fluoroetil)-4-(4-piridinil)-1H-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-piridina (B-23)

10 Siguiendo el procedimiento para la preparación del compuesto B-4, pero sustituyendo (5-metoxipiridin-2-il)metanol por (5-ciclopropil-piridin-2-il)metanol se proporcionó el compuesto B-23 como un aceite incoloro que solidificó dejándolo estar. Finalmente se lavó el compuesto con diisopropil éter para proporcionar el compuesto final B-23 (45,6%) como un sólido blanco. $C_{25}H_{23}FN_4O$. CL/EM: Rt 3,24, m/z 415 $[M + H]^+$ (método 7).

15 1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0,67 - 0,78 (m, 2 H), 0,96 - 1,10 (m, 2 H), 1,87 - 1,95 (m, 1 H), 4,47 (dt, $J=26,9$, 4,8 Hz, 2 H), 4,84 (dt, $J=47,1$, 4,7 Hz, 2 H), 5,19 (s, 2 H), 6,94 - 6,99 (m, 2 H), 7,16 - 7,21 (m, 2 H), 7,32 (dd, $J=8,1$, 2,3 Hz, 1 H), 7,36 - 7,41 (m, 3 H), 7,70 (s, 1 H), 8,40 (d, $J=2,0$ Hz, 1 H), 8,48 (d a., $J=6,1$ Hz, 2 H).

2-[[4-[1-(2-fluoroetil)-4-(4-piridinil)-1H-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-6-metoxi-piridina.succinato (B-24)

20 Siguiendo el procedimiento para la preparación del compuesto B-4 pero sustituyendo (5-metoxipiridin-2-il)metanol por (6-metoxipiridin-2-il)metanol se proporcionó el compuesto B-24 que se convirtió en la sal del ácido succínico correspondiente, de una manera similar a la descrita anteriormente para el compuesto final B-3, que se cristalizó en dietil éter proporcionando la sal del ácido succínico del compuesto final B-24 (25,8%) como un sólido blanco. $C_{23}H_{21}FN_4O_2 \cdot C_4H_6O_4$. CL/EM: Rt 4,16, m/z 405 $[M + H]^+$ (método 2).

30 1H -RMN (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 2,42 (s, 4 H), 3,86 (s, 3 H), 4,49 (dt, $J=27,7$, 4,9 Hz, 2 H), 4,85 (dt, $J=47,4$, 4,9 Hz, 2 H), 5,11 (s, 2 H), 6,77 (d, $J=8,4$ Hz, 1 H), 7,03 - 7,09 (m, 2 H), 7,12 (d, $J=7,2$ Hz, 1 H), 7,20 - 7,25 (m, 2 H), 7,31 - 7,36 (m, 2 H), 7,74 (dd, $J=8,2$, 7,4 Hz, 1 H), 8,24 (s, 1 H), 8,42 - 8,49 (m, 2 H), 12,17 (s. a., 2 H).

2-etoxi-6-[[4-[1-(2-fluoroetil)-4-(4-piridinil)-1H-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-piridina.succinato (B-25)

35 Siguiendo el procedimiento para la preparación del compuesto B-4 pero sustituyendo (5-metoxipiridin-2-il)metanol por (6-etoxipiridin-2-il)metanol se proporcionó el compuesto B-25 que se convirtió en la sal del ácido succínico correspondiente, de una manera similar a la descrita anteriormente para el compuesto final B-3, que se cristalizó en dietil éter proporcionando la sal del ácido succínico del compuesto final B-25 (39,6%) como un sólido blanco. $C_{24}H_{23}FN_4O_2 \cdot C_4H_6O_4$. CL/EM: Rt 3,56, m/z 419 $[M + H]^+$ (método 7).

40 1H -RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 1,31 (t, $J=6,9$ Hz, 3 H), 2,41 (s, 4 H), 4,30 (q, $J=7,2$ Hz, 2 H), 4,49 (dt, $J=27,7$, 4,6 Hz, 2 H), 4,85 (dt, $J=47,4$, 4,9 Hz, 2 H), 5,10 (s, 2 H), 6,74 (d, $J=8,3$ Hz, 1 H), 7,03 - 7,08 (m, 2 H), 7,10 (d, $J=7,2$ Hz, 1 H), 7,20 - 7,25 (m, 2 H), 7,29 - 7,37 (m, 2 H), 7,73 (dd, $J=8,2$, 7,3 Hz, 1 H), 8,24 (s, 1 H), 8,43 - 8,48 (m, 2 H), 12,19 (s. a., 2 H).

6-[[4-[1-(2-fluoroetil)-4-(4-piridinil)-1H-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-2-piridincarbonitrilo (B-26)

45 Siguiendo el procedimiento para la preparación del compuesto B-6 pero sustituyendo (6-bromopiridin-2-il)metanol por 6-hidroximetil-2-cianopiridina se proporcionó el compuesto B-26 (40,8%) como un sólido blanco tras tratamiento con dietil éter. $C_{23}H_{18}FN_5O$. CL/EM: Rt 2,68, m/z 400 $[M + H]^+$ (método 7).

50 1H -RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 4,50 (dt, $J=27,5$, 4,4 Hz, 2 H), 4,85 (dt, $J=47,4$, 4,9 Hz, 2 H), 5,28 (s, 2 H), 7,05 - 7,10 (m, 2 H), 7,23 (d a., $J=4,4$ Hz, 2 H), 7,33 - 7,38 (m, 2 H), 7,89 (dd, $J=7,9$, 0,9 Hz, 1 H), 8,03 (dd, $J=7,6$, 0,9 Hz, 1 H), 8,13 (t, $J=7,7$ Hz, 1 H), 8,24 (s, 1 H), 8,47 (s. a., 2 H).

3-bromo-2-[[4-[1-(2-fluoroetil)-4-(4-piridinil)-1H-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-6-metoxi-piridina (B-27)

55 Siguiendo el procedimiento para la preparación del compuesto B-6 pero sustituyendo (6-bromopiridin-2-il)metanol por 3-bromo-2-(hidroximetil)-6-metoxipiridina se proporcionó el compuesto final B-27 (54,1%) como un sólido blanco. $C_{23}H_{20}BrFN_4O_2$. CL/EM: Rt 4,58, m/z 483 $[M + H]^+$ (método 2).

60 1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 3,85 (s, 3 H), 4,47 (dt, $J=26,8$, 4,6 Hz, 2 H), 4,84 (dt, $J=46,9$, 4,6 Hz, 2 H), 5,22 (s, 2 H), 6,61 (d, $J=8,6$ Hz, 1 H), 6,98 - 7,03 (m, 2 H), 7,17 - 7,21 (m, 2 H), 7,36 - 7,41 (m, 2 H), 7,68 - 7,72 (m, 2 H), 8,46 - 8,51 (m, 2 H).

2-[[4-[1-(2-fluoroetil)-4-(4-piridinil)-1H-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-3,4,5-trimetil-piridina.succinato (B-28)

65

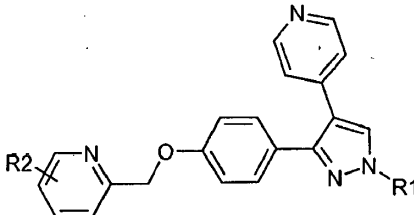
Seguendo el procedimiento para la preparación del compuesto B-3 pero sustituyendo 3,5-dimetil-2-hidroximetilpiridina por (3,4,5-trimetilpiridin-2-il)metanol se proporcionó el compuesto final B-28 (56,8%) en su forma de sal del ácido succínico como un sólido blanco. $C_{25}H_{25}FN_4O \cdot C_4H_6O_4$. CL/EM: Rt 3,53, m/z 417 $[M + H]^+$ (método 6).

1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2,26 (s, 3 H), 2,30 (s, 3 H), 2,35 (s, 3 H), 2,48 (s, 4 H), 4,55 (dt, $J=27,7$, 4,6 Hz, 2 H), 4,91 (dt, $J=47,1$, 4,6 Hz, 2 H), 5,23 (s, 2 H), 7,09 - 7,14 (m, 2 H), 7,27 - 7,31 (m, 2 H), 7,35 - 7,41 (m, 2 H), 8,21 (s, 1 H), 8,28 (s, 1 H), 8,50 - 8,54 (m, 2 H), 12,22 (s. a., 2 H).

Ensayo *in vitro*

Se expresó PDE10A de rata recombinante (rPDE10A) en células Sf9 usando un constructo de baculovirus de rPDE10A recombinante. Se recogieron las células tras 48 h de infección y se purificó la proteína rPDE10A mediante cromatografía de quelatos metálicos sobre Ni-Sepharose 6FF. Se disolvieron los compuestos sometidos a prueba y se diluyeron en el 100% de DMSO hasta una concentración de 100 veces la concentración final en el ensayo. Se añadieron diluciones de compuesto (0,4 μ l) en placas de 384 pocillos a 20 μ l de tampón de incubación (Tris 50 mM pH 7,8, MgCl₂ 8,3 mM, EGTA 1,7 mM). Se añadieron 10 μ l de enzima rPDE10A en tampón de incubación y se inició la reacción mediante la adición de 10 μ l de sustrato hasta una concentración final de AMPc 60 nM y 3H-AMPc 0,008 μ Ci. Se incubó la reacción durante 60 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, se detuvo la reacción con 20 μ l de perlas de SPA con PDE 17,8 mg/ml. Tras la sedimentación de las perlas durante 30 minutos, se midió la radiactividad en un contador de centelleo Topcount de Perkin Elmer y se expresaron los resultados como cpm. Para los valores de blanco se omitió la enzima de la reacción y se substituyó por tampón de incubación. Se obtuvieron valores control mediante la adición de una concentración final del 1% de DMSO en lugar de compuesto. Se ajustó una curva de ajuste óptimo mediante un método de suma de mínimos cuadrados para representar el % del valor control menos el valor de blanco frente a la concentración de compuesto y de esta curva se derivó un valor de pCI50.

Tabla: Compuestos finales

					
N.º de comp.	R1	R2	Datos fis.	Puntos de fusión °C	pCI50
B1	CH ₂ CH ₂ F	6-metilo	.2 HCl	227,22 (DSC)	8,6
B2	CH ₂ CH ₂ CH ₂ F	6-metilo	.x HCl	106,51 (DSC)	7,7
B3	CH ₂ CH ₂ F	3,5-dimetilo	.succinato	138,81 (DSC)	8,79
B4	CH ₂ CH ₂ F	5-metoxilo	Base libre	117,52 (DSC)	8,48
B5	CH ₂ CF ₃	5-metoxilo	Base libre	136,3	8,29
B6	CH ₂ CH ₂ F	6-bromo	.0,75 succinato	108,78 (DSC)	8,01
B7	CH ₂ CH ₂ F	6-trifluorometilo	Base libre		6,96
B8	CH ₂ CH ₂ F	6-ciclopropilo	.succinato	91,25 (DSC)	7,48
B9	CH ₂ CF ₃	3-metoxilo	Base libre	147,0	8,29
B10	CH ₂ CF ₃	3-(2-fluoroetoxilo)	.succinato	140,72 (DSC)	8,2
B11	CH ₂ CF ₃	5-(2-fluoroetoxilo)	Base libre	descompuesto	6,97
B12	CH ₂ CH ₂ CH ₂ F	3-metoxilo	Base libre	165,9	7,88
B13	CH ₂ CH ₂ CH ₂ F	3-(2-fluoroetoxilo)	.succinato	118,38 (DSC)	7,86
B14	CH ₂ CH ₂ CH ₂ F	5-metoxilo	.0,5 succinato	126,64 (DSC)	7,84
B15	CH ₂ CH ₂ CH ₂ F	5-(2-fluoroetoxilo)	Base libre	206,8	6,6
B16	CH ₂ CH ₂ F	3-metoxilo	.succinato	178,95 (DSC)	8,43
B17	CH ₂ CH ₂ F	3-(2-fluoroetoxilo)	.succinato	114,18 (DSC)	8,42

B18	CH ₂ CH ₂ F	3-fluoro	.1,2 succinato		7,79
B19	CH ₂ CH ₂ F	5-(2-fluoroetoxilo)	Base libre	212,7	7
B20	CH ₂ CH ₂ F	5-bromo	Base libre	125,8	8,02
B21	CH ₂ CH ₂ F	5-ciano	Base libre	descompuesto	7,1
B22	CH ₂ CH ₂ F	5-trifluorometilo	Base libre	133,23 (DSC)	7,04
B23	CH ₂ CH ₂ F	5-ciclopropilo	Base libre	descompuesto	7,46
B24	CH ₂ CH ₂ F	6-metoxilo	.succinato	113,25 (DSC)	8,53
B25	CH ₂ CH ₂ F	6-etoxilo	.succinato	119,65 (DSC)	7,68
B26	CH ₂ CH ₂ F	6-ciano	Base libre	148,7	7,48
B27	CH ₂ CH ₂ F	3-bromo-6-metoxilo	Base libre	119,2	7,55
B28	CH ₂ CH ₂ F	3,4,5-trimetilo	.succinato	197,08 (DSC)	8,36

C. Parte analítica

Puntos de fusión:

5 Los valores son valores pico, y se obtienen con incertidumbres experimentales que se asocian comúnmente con este método analítico.

10 Para varios compuestos, indicados como "DSC" en la tabla anterior, se determinaron los puntos de fusión con un aparato DSC823e (Mettler-Toledo). Se midieron los puntos de fusión con un gradiente de temperatura de 30°C/minuto. La temperatura máxima fue de 400°C.

15 Para varios compuestos, se determinaron los puntos de fusión en tubos capilares abiertos en un aparato Mettler FP62. Se midieron los puntos de fusión con un gradiente de temperatura de 10°C/minuto. La temperatura máxima fue de 300°C. Se leyó el punto de fusión a partir de una presentación visual digital.

Resonancia magnética nuclear (RMN)

20 Se registraron espectros de ¹H-RMN o bien en un espectrómetro Bruker DPX-400 o en un Bruker AV-500 con secuencias de pulso convencionales, funcionando a 400 MHz y 500 MHz, respectivamente. Se notifican los desplazamientos químicos (δ) en partes por millón (ppm) campo abajo con respecto a tetrametilsilano (TMS), que se usó como patrón interno.

Métodos de CL/EM:

25 Para la caracterización mediante CL/EM de los compuestos de la presente invención, se usaron los siguientes métodos.

Procedimiento general para instrumentos HP 1100-MS (TOF o SQD)

30 Se realizó la medición de HPLC usando un sistema HP 1100 (Agilent Technologies) que comprende una bomba (cuaternaria o binaria) con desgasificador, un inyector automático, un horno de columna, un detector por red de diodos (DAD) y una columna tal como se especifica en los métodos respectivos. Se configuró el detector de EM con o bien una fuente de ionización por electrospray o bien una fuente de ionización dual ESCI (electrospray combinada con ionización química a presión atmosférica). Se usó nitrógeno como gas nebulizador. Se mantuvo la temperatura de fuente o bien a 140°C o bien a 100°C. Se realizó la adquisición de datos con o bien software MassLynx-Openlynx o bien software Chemsation-Agilent Data Browser.

Procedimiento general para el instrumento Acquity-SQD

40 Se realizó la medición de UPLC (cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución) usando un sistema Acquity UPLC (Waters) que comprende un organizador de muestra, una bomba binaria con desgasificador, un horno de cuatro columnas, un detector de red de diodos (DAD) y una columna tal como se especifica en los métodos respectivos. Se configuró el detector de EM con una fuente de ionización dual ESCI (electrospray combinada con ionización química a presión atmosférica). Se usó nitrógeno como gas nebulizador. Se mantuvo la temperatura de fuente a 140°C. Se realizó la adquisición de datos con software MassLynx-Openlynx.

Procedimiento EM para métodos de CL 1 y 2: Se adquirieron espectros de masas de alta resolución (detector de

tiempo de vuelo, TOF) sólo en modo de ionización positiva o en modos positivos/negativos mediante barrido desde 100 hasta 750 umas. El voltaje de la aguja capilar era de 2,5 kV para el modo positivo, de 2,9Kv para el modo de ionización negativa. El voltaje de cono era de 20 V para ambos modos de ionización positiva y negativa. Leucina-encefalina era la sustancia patrón usada para la calibración interna del detector de masas.

Procedimiento EM para métodos de CL 3, 4, 5, 6, 7 y 8: Se adquirieron espectros de masas de baja resolución (cuadrupolo individual, detector de SQD) sólo en modo de ionización positiva o en modos positivos/negativos mediante barrido desde 100 hasta 1000 umas. El voltaje de la aguja capilar era de 3 kV para el modo de ionización positiva el voltaje de cono era de 20V, 25V o 20V/50V. Para el modo de ionización negativa, el voltaje de cono era de 30V.

Método 1

Además del procedimiento general: Se llevó a cabo HPLC de fase inversa en un cartucho XDB-C18 (1,8 µm, 2,1 x 30 mm) de Agilent, a 60°C con una velocidad de flujo de 1 ml/min, a 60°C. Las condiciones de gradiente usadas son: del 90% de A (disolución de acetato de amonio 0,5 g/l), el 5% de B (acetonitrilo), el 5% de C (metanol) al 50% de B y el 50% de C, luego al 100% de B y se ejecuta hasta 9,0 minutos equilibrado a las condiciones iniciales. Volumen de inyección de 2 µl.

Método 2

Además del procedimiento general: Se llevó a cabo HPLC de fase inversa en una columna Sunfire-C18 (2,5 µm, 2,1 x 30 mm) de Waters, con una velocidad de flujo de 1,0 ml/min, a 60°C. Las condiciones de gradiente usadas son: del 95% de A (disolución de acetato de amonio 0,5 g/l + el 5% de acetonitrilo), el 5% de B (acetonitrilo o acetonitrilo/metanol 1/1), al 100% de B y se ejecuta hasta 9 ó 7 minutos equilibrado a las condiciones iniciales. Volumen de inyección de 2 µl.

Método 3

Además del procedimiento general: Se llevó a cabo HPLC de fase inversa en un cartucho XDB-C18 (1,8 µm, 2,1 x 30 mm) de Agilent, con una velocidad de flujo de 0,8 ml/min, a 60°C. Las condiciones de gradiente usadas son: del 90% de A (disolución de acetato de amonio 0,5 g/l), el 10% de B (mezcla de acetonitrilo/metanol, 1/1), al 100% de B y se ejecuta hasta 9,0 minutos equilibrado a las condiciones iniciales. Volumen de inyección de 2 µl.

Método 4

Además del procedimiento general: Se llevó a cabo HPLC de fase inversa en una columna Sunfire-C18 (2,5 µm, 2,1 x 30 mm) de Waters, con una velocidad de flujo de 1,0 ml/min, a 60°C. Las condiciones de gradiente usadas son: del 95% de A (disolución de acetato de amonio 0,5 g/l + el 5% de acetonitrilo), el 5% de B (mezcla de acetonitrilo/metanol, 1/1), al 100% de B y se ejecuta hasta 7 minutos equilibrado a las condiciones iniciales. Volumen de inyección de 2 µl.

Método 5

Además del procedimiento general: Se llevó a cabo HPLC de fase inversa en una columna XBridge-C18 (2,5 µm, 2,1 x 30 mm) de Waters, con una velocidad de flujo de 1,0 ml/min, a 60°C. Las condiciones de gradiente usadas son: del 95% de A (disolución de acetato de amonio 0,5 g/l + el 5% de acetonitrilo), el 5% de B (mezcla de acetonitrilo/metanol, 1/1), al 100% de B y se ejecuta hasta 9,0 minutos equilibrado a las condiciones iniciales. Volumen de inyección de 2 µl.

Método 6

Además del procedimiento general: Se llevó a cabo HPLC de fase inversa en una columna Eclipse Plus-C18 (3,5 µm, 2,1 x 30 mm) de Agilent, con una velocidad de flujo de 1,0 ml/min, a 60°C. Las condiciones de gradiente usadas son: del 95% de A (disolución de acetato de amonio 0,5 g/l + el 5% de acetonitrilo), el 5% de B (acetonitrilo o mezcla de acetonitrilo/metanol, 1/1), al 100% de B y se ejecuta hasta 7 minutos equilibrado a las condiciones iniciales. Volumen de inyección de 2 µl.

Método 7

Además del procedimiento general: Se llevó a cabo UPLC de fase inversa en una columna BEH-C18 (1,7 µm, 2,1 x 50 mm) de Waters, con una velocidad de flujo de 0,8 ml/min, a 60°C. Las condiciones de gradiente usadas son: del 95% de A (disolución de acetato de amonio 0,5 g/l + el 5% de acetonitrilo), el 5% de B (mezcla de acetonitrilo/metanol, 1/1), al 20% de A, el 80% B, luego al 100% de B y se ejecuta hasta 7 ó 5 minutos equilibrado a las condiciones iniciales. Volumen de inyección de 0,5 µl.

Método 8

Además del procedimiento general: Se llevó a cabo UPLC de fase inversa en una columna BEH-C18 (1,7 μ m, 2,1 x 50 mm) de Waters, con una velocidad de flujo de 1,0 ml/min, a 50°C. Las condiciones de gradiente usadas son: del 95% de A (disolución de acetato de amonio 0,5 g/l + el 5% de acetonitrilo), el 5% de B (acetonitrilo), al 40% de A, el 60% de B, luego al 5% de A, el 95% de B y se ejecuta hasta 5 minutos equilibrado a las condiciones iniciales. Volumen de inyección de 0,5 μ l.

II. ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN:

Método general

Se llevaron a cabo estudios de biodistribución en ratas Wistar macho sanas (peso corporal 200 - 500 g) a los 2 min, 30 min y 60 min tras la inyección (p.i.) (n=3/punto de tiempo). Para [18 F]B-4 sólo se estudiaron los puntos de tiempo de 2 min y 30 min. Se inyectaron a las ratas aproximadamente 30 μ Ci del trazador a través de la vena de la cola bajo anestesia (isoflurano al 2,5% en O₂ a una velocidad de flujo de 1 l/min) y se sacrificaron por decapitación en los puntos de tiempo especificados anteriormente. Se recogieron la sangre y los órganos principales en tubos tarados y se pesaron. Se midió la radiactividad en sangre, órganos y otras partes del cuerpo usando un contador gamma automatizado. Se calculó la distribución de la radiactividad en diferentes partes del cuerpo en diferentes puntos de tiempo p.i. del trazador y se expresó como el porcentaje de dosis inyectada (% de DI), y como el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% de DI/g) para los órganos seleccionados. El % de DI se calcula como cpm en órgano/cpm totales recuperados. Para el cálculo de la radiactividad total en sangre, se supuso que la masa de sangre constituía el 7% de la masa corporal.

A. Resultados de biodistribución para el compuesto [18 F]B-1

Los resultados del estudio de distribución *in vivo* de [18 F]B-1 en ratas Wistar macho se presentan en las tablas 1 y 2. La tabla 1 muestra los valores de % de DI a los 2 min, 30 min y 60 min p.i. del radiotrazador. A los 2 min p.i. estaba presente aproximadamente el 4,0% de la dosis inyectada en la sangre, y se produjo su aclaramiento hasta el 2,2% hacia los 60 min tras la inyección del trazador. La captación cerebral inicial total del trazador fue del 0,59%, siendo el 0,49% de la DI en el cerebro y el 0,09% en el cerebelo. A los 60 min tras la inyección del radiotrazador, estaba presente el 54% de DI en el hígado e intestinos. Debido a su carácter lipófilo, la excreción urinaria del trazador fue mínima estando presente sólo ~2,6% de DI en el sistema urinario a los 60 min p.i. Se observó aumento de la acumulación en el estómago (3% de DI, 10% de DI, 17% de DI a los 2, 30 y 60 min p.i., respectivamente). En vista de la gran masa del cadáver, estaba presente una cantidad significativa de la dosis inyectada (~28% de DI) en el cadáver en todos los puntos de tiempo examinados. Normalmente, el cadáver constituye hasta > 90% del peso corporal total del animal. La tabla 2 muestra los valores de % de DI/g para los diferentes órganos a los 2 min, 30 min y 60 min p.i.

Tabla 1. Biodistribución de [18 F]B-1 en ratas normales a los 2, 30 y 60 min p.i.

Órgano	% de DI ^a		
	2 min	30 min	60 min
Orina	0,09 $\pm$ 0,1	0,29 $\pm$ 0,0	1,22 $\pm$ 0,2
Riñones	4,24 $\pm$ 0,5	1,44 $\pm$ 0,2	1,38 $\pm$ 0,1
Hígado	41,94 $\pm$ 2,2	45,29 $\pm$ 5,2	34,49 $\pm$ 8,0
Bazo + Páncreas	1,92 $\pm$ 0,2	0,57 $\pm$ 0,2	0,43 $\pm$ 0,1
Pulmones	0,92 $\pm$ 0,2	0,42 $\pm$ 0,1	0,26 $\pm$ 0,1
Corazón	0,60 $\pm$ 0,1	0,21 $\pm$ 0,0	0,16 $\pm$ 0,0
Estómago	3,09 $\pm$ 0,1	9,73 $\pm$ 1,7	16,74 $\pm$ 4,6
Intestinos	10,79 $\pm$ 1,5	14,67 $\pm$ 3,3	19,61 $\pm$ 1,5
Cuerpo estriado	0,036 $\pm$ 0,012	0,013 $\pm$ 0,001	0,006 $\pm$ 0,002
Hipocampo	0,018 $\pm$ 0,004	0,006 $\pm$ 0,000	0,005 $\pm$ 0,001
Corteza	0,069 $\pm$ 0,008	0,026 $\pm$ 0,004	0,018 $\pm$ 0,004
Resto del cerebro	0,367 $\pm$ 0,054	0,127 $\pm$ 0,010	0,116 $\pm$ 0,027
Cerebro total	0,490 $\pm$ 0,067	0,172 $\pm$ 0,012	0,145 $\pm$ 0,032

Cerebelo	0,091 ± 0,018	0,028 ± 0,000	0,023 ± 0,005
Sangre	3,96 ± 0,5	2,40 ± 0,4	2,16 ± 0,4
Cadáver	33,12 ± 2,3	25,50 ± 2,1	23,68 ± 3,9

Los datos se expresan como la media ± DE; n = 3 por punto de tiempo; “ porcentaje de dosis inyectada calculado como cpm en órgano/cpm totales recuperadas

Tabla 2. Concentración de [¹⁸F]B-1 en diferentes órganos a los 2, 30 y 60 min p.i.

Órgano	% de DI/g ^a		
	2 min	30 min	60 min
Riñones	1,75 ± 0,24	0,61 ± 0,11	0,46 ± 0,02
Hígado	3,40 ± 0,31	3,72 ± 0,87	2,53 ± 0,23
Bazo + Páncreas	1,47 ± 0,15	0,39 ± 0,04	0,26 ± 0,07
Pulmones	0,69 ± 0,34	0,27 ± 0,04	0,16 ± 0,05
Corazón	0,76 ± 0,09	0,24 ± 0,03	0,15 ± 0,04
Cuerpo estriado	0,648 ± 0,075	0,250 ± 0,029	0,162 ± 0,042
Hipocampo	0,307 ± 0,041	0,096 ± 0,012	0,074 ± 0,050
Corteza	0,734 ± 0,148	0,204 ± 0,016	0,113 ± 0,031
Resto del cerebro	0,411 ± 0,023	0,138 ± 0,013	0,107 ± 0,030
Cerebro total	0,444 ± 0,026	0,148 ± 0,014	0,105 ± 0,035
Cerebelo	0,607 ± 0,019	0,145 ± 0,020	0,079 ± 0,021
Sangre	0,21 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,02
Cerebro + Cerebelo	0,47 ± 0,03	0,15 ± 0,02	0,10 ± 0,03

5 Los datos se expresan como la media ± DE; n = 3 por punto de tiempo; ^a los valores de % de DI/g se calculan como % de DI/peso del órgano en g

10 Puesto que los riñones y el hígado son órganos excretorios, tienen los valores más altos de % de DI/g, siendo aproximadamente el 1,8% de DI/g para los riñones y el 3,4% de DI/g para el hígado a los 2 min p.i. Los valores de % de DI/g para diferentes regiones de cerebro, concretamente cuerpo estriado, hipocampo, corteza y cerebelo se presentan en la tabla 2. Con el fin de corregir las diferencias en el peso corporal entre diferentes animales, se normalizaron los valores de % de DI/g de tejido para el peso corporal. Los valores normalizados se presentan en la tabla 3. Para todas las regiones cerebrales estudiadas hay un aumento significativo en la concentración de radiactividad desde 2 hasta 30 min (≤ 0,07 % de DI/g corregido para el peso corporal a los 30 min p.i.), lo que indica

15 lavado significativo del trazador desde todas las regiones cerebrales estudiadas.

Tabla 3. Concentración de [¹⁸F]B-1 en diferentes órganos a los 2, 30 y 60 min p.i. formalizada para el peso corporal del animal

Órgano	% de DI/g × peso corporal en kg ^a		
	2 min	30 min	60 min
Riñones	0,47 ± 0,05	0,17 ± 0,01	0,15 ± 0,01
Hígado	0,92 ± 0,05	1,02 ± 0,13	0,81 ± 0,13
Bazo + Páncreas	0,40 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,08 ± 0,02
Pulmones	0,19 ± 0,08	0,08 ± 0,02	0,05 ± 0,02
Corazón	0,21 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,01
Cuerpo estriado	0,175 ± 0,02	0,070 ± 0,01	0,051 ± 0,01
Hipocampo	0,083 ± 0,01	0,027 ± 0,01	0,023 ± 0,02
Corteza	0,199 ± 0,04	0,057 ± 0,01	0,036 ± 0,01
Resto del cerebro	0,111 ± 0,00	0,039 ± 0,01	0,034 ± 0,01

Cerebro total	0,120 ± 0,01	0,042 ± 0,01	0,033 ± 0,01
Cerebelo	0,164 ± 0,01	0,041 ± 0,01	0,025 ± 0,01
Sangre	0,06 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Cerebro + Cerebelo	0,13 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01

Los datos se expresan como la media ± DE; n = 3 por punto de tiempo; ^a los valores de % de DI/g se calculan como % de DI/peso del órgano en g

5 La tabla 4 muestra las razones de 2 min/30 min y 2 min/60 min de los valores de % de DI/g (normalizados para el peso corporal del animal) para diferentes regiones del cerebro. Para todas las regiones cerebrales, las razones de 2 min/30 min son ≥ 2,49 lo que indica que el trazador ya comenzó el lavado durante este periodo de tiempo. Se observó el lavado más lento para el cuerpo estriado, la región con la mayor expresión de PDE10.

10 Tabla 4: Aclaramiento de [¹⁸F]B-1 desde diferentes regiones del cerebro calculado como la razón de 2 min con respecto a 30 min y de 2 min con respecto a 60 min para los valores de % de DI/g (normalizados para el peso corporal)

Región cerebral	2 min/30 min	2 min/60 min
Cuerpo estriado	2,49	3,41
Hipocampo	3,06	3,63
Corteza	3,47	5,55
Resto del cerebro	2,86	3,29
Cerebro total	2,88	3,60
Cerebelo	4,01	6,60
Sangre	1,65	1,83

15 La tabla 5 presenta las razones entre el cuerpo estriado y otras regiones del cerebro así como la sangre en diferentes puntos de tiempo tras la inyección de [¹⁸F]B-1. El cuerpo estriado se considera como la región rica en PDE10A y el cerebelo como la región de referencia. Por tanto, se desean razones altas de cuerpo estriado con respecto a cerebelo con el fin de tener imágenes de buena calidad *in vivo*. La razón máxima de cuerpo estriado con respecto a cerebelo fue de aproximadamente 2, que es bastante baja para un buen trazador de obtención de imágenes de PDE10.

20 Los resultados de estos estudios de biodistribución indican que no hay retención significativa de [¹⁸F]B-1 en la región rica en PDE10A, cuerpo estriado.

Tabla 5: Razones de cuerpo estriado con respecto a otra región cerebral (calculadas a partir de los valores de % de DI/g normalizados para el peso corporal del animal) a los 2 min, 30 min y 60 min p.i. de [¹⁸F]B-1

Región cerebral	2 min	30 min	60 min
cuerpo estriado/hipocampo	2,11	2,59	2,24
cuerpo estriado/corteza	0,88	1,22	1,43
cuerpo estriado/cerebelo	1,07	1,72	2,06
cuerpo estriado/sangre	3,10	2,05	1,66

25 B. Resultados de biodistribución para el compuesto [¹⁸F]B-3

30 Los resultados del estudio de distribución *in vivo* de [¹⁸F]B-3 en ratas Wistar macho se presentan en las tablas 6 y 7. La tabla 6 muestra los valores de % de DI a los 2 min, 30 min y 60 min p.i. del radiotrazador. La captación cerebral inicial total del trazador fue bastante baja: el 0,39% de la DI a los 2 min p.i., siendo el 0,31% de DI en el cerebro y el 0,07% de DI en el cerebelo. A los 30 min p.i., estaba presente el 0,035% de DI en el cuerpo estriado, que tiene la expresión más alta de PDE10A, y donde se espera que el radiotrazador muestre unión. El aclaramiento desde la circulación sanguínea fue bastante lento. A los 2 min p.i., estaba presente aproximadamente el 4,0% de la dosis inyectada en la sangre, y esto se aclaró hasta el 3,3% hacia los 60 min p.i. El trazador se aclaró principalmente por

35 el sistema hepatobiliar ya que había en total un 50% de DI presente en hígado e intestinos 60 min tras la inyección del radiotrazador. Debido a su carácter lipófilo, la excreción urinaria del trazador fue mínima estando presente sólo ~3,2% de DI en el sistema urinario a los 60 min p.i. También hay una alta acumulación inesperada en el estómago (2,6% de DI, 6,7% de DI, 20% a los 2, 30 y 60 min p.i., respectivamente). En vista de la gran masa del cadáver,

estaba presente una cantidad significativa de la dosis inyectada (~27% de DI) en el cadáver en todos los puntos de tiempo examinados. Normalmente, el cadáver constituye hasta > 90% del peso corporal total del animal.

La tabla 7 muestra los valores de % de DI/g para diferentes órganos a los 2 min, 30 min y 60 min p.i.

5

Tabla 6. Biodistribución de [^{18}F]B-3 en ratas normales a los 2, 30 y 60 min p.i.

Órgano	% de DI ^a		
	2 min	30 min	60 min
Orina	0,17 ± 0,0	1,11 ± 0,2	1,69 ± 0,2
Riñones	3,66 ± 0,6	1,22 ± 0,2	1,48 ± 0,0
Hígado	47,78 ± 2,3	42,62 ± 1,5	30,31 ± 5,7
Bazo + Páncreas	1,01 ± 0,3	0,31 ± 0,1	0,31 ± 0,0
Pulmones	0,72 ± 0,1	0,47 ± 0,1	0,38 ± 0,1
Corazón	0,39 ± 0,0	0,18 ± 0,0	0,18 ± 0,0
Estómago	2,55 ± 0,4	6,70 ± 1,2	19,96 ± 3,9
Intestinos	8,78 ± 1,0	21,48 ± 2,5	19,44 ± 2,8
Cuerpo estriado	0,023 ± 0,006	0,035 ± 0,006	0,030 ± 0,006
Hipocampo	0,011 ± 0,002	0,006 ± 0,001	0,006 ± 0,002
Corteza	0,035 ± 0,010	0,019 ± 0,002	0,017 ± 0,002
Resto del cerebro	0,236 ± 0,038	0,121 ± 0,025	0,115 ± 0,026
Cerebro total	0,305 ± 0,049	0,180 ± 0,027	0,169 ± 0,032
Cerebelo	0,071 ± 0,016	0,026 ± 0,004	0,023 ± 0,009
Sangre	3,98 ± 0,4	3,93 ± 0,4	3,34 ± 0,7
Cadáver	32,20 ± 1,2	23,51 ± 2,0	24,04 ± 1,5

Los datos se expresan como la media ± DE; n = 3 por punto de tiempo; ^a Porcentaje de dosis inyectada calculado como cpm en órgano/cpm totales recuperadas

10 Tabla 7. Concentración de [^{18}F]B-3 en diferentes órganos a los 2, 30 y 60 min p.i.

Órgano	% de DI ^a		
	2 min	30 min	60 min
Riñones	1,86 ± 0,27	0,61 ± 0,06	0,48 ± 0,02
Hígado	5,52 ± 0,17	4,72 ± 0,16	2,44 ± 0,40
Bazo + Páncreas	1,09 ± 0,16	0,30 ± 0,05	0,20 ± 0,02
Pulmones	0,58 ± 0,08	0,37 ± 0,07	0,24 ± 0,03
Corazón	0,58 ± 0,11	0,24 ± 0,02	0,16 ± 0,02
Cuerpo estriado	0,462 ± 0,059	0,575 ± 0,098	0,564 ± 0,156
Hipocampo	0,202 ± 0,033	0,095 ± 0,010	0,077 ± 0,015
Corteza	0,308 ± 0,038	0,122 ± 0,014	0,086 ± 0,020
Resto del cerebro	0,281 ± 0,045	0,150 ± 0,014	0,123 ± 0,023
Cerebro total	0,288 ± 0,042	0,166 ± 0,013	0,133 ± 0,023
Cerebelo	0,286 ± 0,064	0,107 ± 0,016	0,085 ± 0,030
Sangre	0,27 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,15 ± 0,03
Cerebro + Cerebelo	0,30 ± 0,08	0,16 ± 0,01	0,13 ± 0,02

Los datos se expresan como la media ± DE; n = 3 por punto de tiempo; ^a los valores de % de DI/g se calculan como % de DI/peso del órgano en g

Puesto que los riñones y el hígado son órganos excretorios, tienen los valores más altos de % de DI/g, siendo aproximadamente el 1,9% de DI/g para los riñones y el 5,5% de DI/g para el hígado a los 2 min p.i. Los valores de % de DI/g para diferentes regiones de cerebro, concretamente cuerpo estriado, hipocampo, corteza y cerebelo se presentan en la tabla 7. Con el fin de corregir las diferencias en el peso corporal entre diferentes animales, se normalizaron los valores de % de DI/g de tejido para el peso corporal. Los valores normalizados se presentan en la tabla 8. A los 2 min p.i., se observa la concentración de radiactividad más alta en cerebro en la región del cuerpo estriado (el 0,098% de DI/g corregido para el peso corporal) y esto aumenta con el tiempo (el 0,121% de DI/g corr. a los 30 min y el 0,178% de DI/g corr. a los 60 min p.i.). Esta acumulación de radiactividad en el cuerpo estriado es compatible con la expresión superior de la enzima PDE10 en esta región. Para el hipocampo, la corteza y el cerebelo, las regiones con expresión mínima de PDE10A, la concentración a los 30 min está disminuida en comparación con el punto de tiempo de 2 min, lo que indica lavado del trazador desde estas regiones cerebrales. El ligero aumento a los 60 min para estas regiones cerebrales puede deberse a la formación de radiometabolito(s) que entra(n) en el cerebro.

Tabla 8. Concentración de [^{18}F]B-3 en diferentes órganos a los 2, 30 y 60 min p.i. normalizada para el peso corporal del animal

Órgano	% de DI/g $\times$ peso corporal en kg ^a		
	2 min	30 min	60 min
Riñones	0,39 $\pm$ 0,07	0,13 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,00
Hígado	1,17 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,03	0,77 $\pm$ 0,13
Bazo + Páncreas	0,23 $\pm$ 0,04	0,06 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01
Pulmones	0,12 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,01
Corazón	0,12 $\pm$ 0,03	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01
Cuerpo estriado	0,098 $\pm$ 0,01	0,121 $\pm$ 0,02	0,178 $\pm$ 0,05
Hipocampo	0,043 $\pm$ 0,01	0,020 $\pm$ 0,00	0,024 $\pm$ 0,00
Corteza	0,066 $\pm$ 0,01	0,026 $\pm$ 0,00	0,027 $\pm$ 0,01
Resto del cerebro	0,060 $\pm$ 0,01	0,032 $\pm$ 0,00	0,039 $\pm$ 0,01
Cerebro total	0,061 $\pm$ 0,01	0,035 $\pm$ 0,00	0,042 $\pm$ 0,01
Cerebelo	0,061 $\pm$ 0,02	0,023 $\pm$ 0,00	0,027 $\pm$ 0,01
Sangre	0,06 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01
Cerebro + Cerebelo	0,06 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01

La tabla 9 muestra las razones de 2 min/30 min y 2 min/60 min de los valores de % de DI/g (normalizados para el peso corporal del animal) para diferentes regiones del cerebro. Para las razones de 2 min/30 min, el cerebelo tiene la razón más alta de 2,71, lo que indica que el aclaramiento del trazador es el más rápido desde esta región, seguido por la corteza (2,54) y el hipocampo (2,14), las regiones con expresión mínima de PDE10. Para el cuerpo estriado, por otra parte, la razón de 2 min/60 min (0,55) fue inferior a la razón de 2 min/30 min (0,81), lo que indica acumulación de [^{18}F]B-3 en el cuerpo estriado rico en PDE10A.

Tabla 9: Aclaramiento de [^{18}F]B-3 desde diferentes regiones del cerebro calculado como la razón de 2 min con respecto a 30 min y de 2 min con respecto a 60 min para los valores de % de DI/g (corregido para el peso corporal del animal)

Región cerebral	2 min/30 min	2 min/60 min
Cuerpo estriado	0,81	0,55
Hipocampo	2,14	1,77
Corteza	2,54	2,39
Resto del cerebro	1,90	1,53
Cerebro total	1,75	1,45
Cerebelo	2,71	2,27
Sangre	1,01	1,19

La tabla 10 presenta las razones entre el cuerpo estriado y otras regiones del cerebro así como la sangre en diferentes puntos de tiempo tras la inyección de [^{18}F]B-3. El cuerpo estriado se considera como la región rica en PDE10A y el cerebelo como la región de referencia. Por tanto, se desean razones altas de cuerpo estriado con respecto a cerebelo con el fin de tener imágenes de buena calidad *in vivo*. A los 2 min p.i., la razón de cuerpo estriado con respecto a cerebelo fue de aproximadamente 1,6 y esta razón aumentó hasta 6,6 hacia los 60 min tras la inyección del trazador. Las razones de cuerpo estriado con respecto a corteza y de cuerpo estriado con respecto a hipocampo también fueron $\geq 6,5$ (60 min p.i.), lo que confirma la retención específica de [^{18}F]B-3 en el cuerpo estriado.

10 Tabla 10: Razones de cuerpo estriado con respecto a otra región cerebral (calculadas a partir de los valores de % de DI/g normalizados para el peso corporal del animal) a los 2 min, 30 min y 60 min p.i. de [^{18}F]B-3

Región cerebral	2 min	30 min	60 min
cuerpo estriado/hipocampo	2,28	6,03	7,32
cuerpo estriado/corteza	1,50	4,69	6,50
cuerpo estriado/cerebelo	1,61	5,38	6,63
cuerpo estriado/sangre	1,73	2,16	3,74

15 Los resultados de estos estudios de biodistribución indican que aunque la captación cerebral inicial fue bastante baja, existe una acumulación continua de [^{18}F]B-3 en el cuerpo estriado, mientras que existe un lavado en el tiempo desde la región de referencia, el cerebelo. Esto sugiere la retención específica de [^{18}F]B-3 en la región rica en PDE10A, el cuerpo estriado.

C. Resultados de biodistribución para el compuesto [^{18}F]B-4

20 Los resultados del estudio de distribución *in vivo* de [^{18}F]B-4 en ratas Wistar macho se presentan en las tablas 11 y 12. Debido a la captación cerebral inicial bastante baja y a la escasa acumulación en el cuerpo estriado, no se realizó el análisis de biodistribución de 60 min. La tabla 11 muestra los valores de % de DI a los 2 min y 30 min p.i. del radiotrazador. La captación cerebral inicial total del trazador fue bastante baja: el 0,40% de la DI a los 2 min p.i., siendo el 0,32% de DI en el cerebro y el 0,07% de DI en el cerebelo. A los 30 min p.i., estaba presente el 0,019% de DI en el cuerpo estriado, que es bastante baja puesto que el cuerpo estriado tiene la expresión más alta de PDE10A, y en esta región del cerebro se espera que el radiotrazador muestre unión. El trazador se aclaró principalmente a través del hígado (el 47% de DI a los 30 min p.i.) al interior de los intestinos (el 12% de DI a los 30 min p.i.). Debido a su carácter lipófilo, la excreción urinaria del trazador fue mínima, estando presente sólo ~2,5% de DI en el sistema urinario a los 30 min p.i. También hay una alta acumulación inesperada en el estómago (el 2,8% de DI y el 8% de DI, a los 2 y 30 min p.i., respectivamente). La tabla 12 muestra los valores de % de DI/g para diferentes órganos a los 2 min y 30 min p.i.

Tabla 11. Biodistribución de [^{18}F]B-4 en ratas normales a los 2 y 30 min p.i.

Órgano	% de DI ^a	
	2 min	30 min
Orina	0,28 $\pm$ 0,1	0,75 $\pm$ 0,1
Riñones	4,99 $\pm$ 0,2	1,71 $\pm$ 0,3
Hígado	35,98 $\pm$ 3,1	47,40 $\pm$ 3,5
Bazo + Páncreas	2,37 $\pm$ 0,2	0,56 $\pm$ 0,1
Pulmones	1,12 $\pm$ 0,0	0,35 $\pm$ 0,1
Corazón	0,62 $\pm$ 0,2	0,28 $\pm$ 0,1
Estómago	2,80 $\pm$ 0,2	8,08 $\pm$ 3,7
Intestinos	12,02 $\pm$ 2,1	11,98 $\pm$ 1,9
Cuerpo estriado	0,018 $\pm$ 0,003	0,019 $\pm$ 0,003
Hipocampo	0,006 $\pm$ 0,002	0,004 $\pm$ 0,000
Corteza	0,036 $\pm$ 0,007	0,022 $\pm$ 0,002
Resto del cerebro	0,257 $\pm$ 0,014	0,162 $\pm$ 0,030
Cerebro total	0,317 $\pm$ 0,014	0,208 $\pm$ 0,027

Cerebelo	0,065 ± 0,011	0,028 ± 0,002
Sangre	4,55 ± 0,4	3,35 ± 0,5
Cadáver	36,93 ± 1,3	26,15 ± 1,2

Los datos se expresaron como la media ± DE; n = 3 por punto de tiempo; ^a Porcentaje de dosis inyectada calculado como cpm en órgano/cpm totales recuperadas

Tabla 12. Concentración de [¹⁸F]B-4 en diferentes órganos a los 2 y 30 min p.i.

Órgano	% de DI ^a	
	2 min	30 min
Riñones	1,34 ± 0,35	0,68 ± 0,12
Hígado	2,32 ± 0,28	3,85 ± 0,04
Bazo + Páncreas	1,17 ± 0,03	0,40 ± 0,02
Pulmones	0,46 ± 0,07	0,24 ± 0,02
Corazón	0,45 ± 0,13	0,24 ± 0,04
Cuerpo estriado	0,467 ± 0,002	0,458 ± 0,041
Hipocampo	0,193 ± 0,031	0,108 ± 0,013
Corteza	0,355 ± 0,012	0,145 ± 0,026
Resto del cerebro	0,248 ± 0,030	0,149 ± 0,019
Cerebro total	0,263 ± 0,029	0,157 ± 0,019
Cerebelo	0,231 ± 0,031	0,104 ± 0,005
Sangre	0,14 ± 0,04	0,18 ± 0,03
Cerebro + Cerebelo	0,269 ± 0,066	0,151 ± 0,016

5 Los datos se expresan como la media ± DE; n = 3 por punto de tiempo; ^a los valores de % de DI/g se calculan como % de DI/peso del órgano en g

10 Puesto que los riñones y el hígado son órganos excretorios, tienen los valores más altos de % de DI/g, siendo aproximadamente el 1,3% de DI/g para los riñones y el 2,3% de DI/g para el hígado a los 2 min p.i. Los valores de % de DI/g para diferentes regiones de cerebro, concretamente cuerpo estriado, hipocampo, corteza y cerebelo se presentan en la tabla 12. Con el fin de corregir las diferencias en el peso corporal entre diferentes animales, se normalizaron los valores de % de DI/g de tejido para el peso corporal. Los valores normalizados se presentan en la tabla 13. A los 2 min p.i. se observa la concentración de radiactividad más alta en cerebro en el cuerpo estriado (el 0,226% de DI/g corregido para el peso corporal). Para el hipocampo, la corteza y el cerebelo este valor fue del 0,091% de DI/g corr., el 0,168% de DI/g corr., el 0,109% de DI/g corr., respectivamente. A los 30 min p.i., la concentración en el cuerpo estriado disminuyó hasta el 0,125% de DI/g corregido para el peso corporal. Para las otras regiones cerebrales, el lavado fue superior (≤ 0,040% de DI/g corregido para el peso corporal a los 30 min p.i.).

20 Tabla 13. Concentración de [¹⁸F]B-4 en diferentes órganos a los 2 y 30 min p.i. normalizada para el peso corporal del animal

Órgano	% de DI/g × peso corporal en kg ^a	
	2 min	30 min
Riñones	0,63 ± 0,17	0,19 ± 0,03
Hígado	1,09 ± 0,08	1,05 ± 0,03
Bazo + Páncreas	0,55 ± 0,03	0,11 ± 0,01
Pulmones	0,22 ± 0,03	0,07 ± 0,00
Corazón	0,21 ± 0,06	0,07 ± 0,01
Cuerpo estriado	0,226 ± 0,01	0,125 ± 0,01
Hipocampo	0,091 ± 0,01	0,029 ± 0,00
Corteza	0,168 ± 0,00	0,040 ± 0,01
Resto del cerebro	0,117 ± 0,01	0,041 ± 0,00
Cerebro total	0,124 ± 0,01	0,043 ± 0,00
Cerebelo	0,109 ± 0,01	0,029 ± 0,00
Sangre	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,01
Cerebro + Cerebelo	0,13 ± 0,01	0,04 ± 0,00

25 La tabla 14 muestra las razones de 2 min/30 min y 2 min/60 min de los valores de % de DI/g (normalizados para el peso corporal) para diferentes regiones del cerebro. Para las razones de 2 min/30 min, la corteza tiene la razón más alta de 4,24, lo que indica que el aclaramiento del trazador es más rápido desde esta región, seguido por el cerebelo (3,82) y el hipocampo (3,08), que no expresan PDE10. Para el cuerpo estriado, la razón de 2 min/30 min fue la más baja (1,80), lo que indica lavado más lento de [¹⁸F]B-4 desde la región rica en PDE10, el cuerpo estriado.

Tabla 14: Aclaramiento de [¹⁸F]B-4 desde diferentes regiones del cerebro calculado como razón de 2 min con respecto a 30 min para los valores de % de DI/g normalizados para el peso corporal del animal

Región cerebral	2 min/30 min
Cuerpo estriado	1,80
Hipocampo	3,08
Corteza	4,24
Resto del cerebro	2,87
Cerebro total	2,90
Cerebelo	3,82
Sangre	1,36

La tabla 15 presenta las razones entre el cuerpo estriado y otras regiones del cerebro, así como sangre en diferentes puntos de tiempo tras la inyección de [^{18}F]B-4. Cuerpo estriado se considera como la región rica en PDE10A y cerebelo como la región de referencia. Por tanto, se desean razones altas de cuerpo estriado con respecto a cerebelo con el fin de tener imágenes de buena calidad *in vivo*. A los 2 min p.i., la razón de cuerpo estriado con respecto a cerebelo fue de aproximadamente 2,07 y esta razón aumentó hasta 4,38 hacia los 30 min tras la inyección del trazador. Las razones de cuerpo estriado con respecto a corteza y de cuerpo estriado con respecto a hipocampo también fueron $\geq 3,16$, lo que confirma retención de [^{18}F]B-4 en el cuerpo estriado.

Tabla 15: Razones de cuerpo estriado con respecto a otra región cerebral (calculadas a partir de los valores de % de DI/g normalizados para el peso corporal del animal) a los 2 min y 30 min p.i. de [^{18}F]B-4

Región cerebral	2 min	30 min
cuerpo estriado/hipocampo	2,49	4,25
cuerpo estriado/corteza	1,35	3,16
cuerpo estriado/cerebelo	2,07	4,38
cuerpo estriado/sangre	3,47	2,61

III. ANÁLISIS DE RADIOMETABOLITOS DEL COMPUESTO [^{18}F]B-3

A. Análisis de radiometabolitos en plasma a 2/30/60 minutos p.i.

Se estudió la estabilidad metabólica del compuesto [^{18}F]B-3 en ratas normales ($n=2$) mediante la determinación de las cantidades relativas del trazador original y los radiometabolitos en plasma a los 2, 30 y 60 min p.i. del trazador. Tras la administración intravenosa (i.v.) de aproximadamente 1,7 mCi de [^{18}F]B-3 a través de la vena de la cola bajo anestesia (isoflurano al 2,5% en O_2 a una velocidad de flujo de 1 l/min), se recogió sangre a través de la vena de la cola en los puntos de tiempo mencionados anteriormente (del mismo animal) en tubos que contenían heparina de litio (tubos LH PST de 4,5 ml; BD vacutainer, BD, Franklin Lakes, EE.UU.) y se almacenaron en hielo para detener el metabolismo. A continuación, se centrifugó la sangre durante 10 min a 3000 rpm para separar el plasma. Se aisló un volumen de aproximadamente 0,1 ml de muestra de plasma y se realizaron adiciones conocidas con aproximadamente 10 μl de B-3 no radiactivo auténtico (disolución 1 mg/ml) y 10 μl de producto intermedio 1-7 (disolución 1 mg/ml, metabolito principal según los estudios *in vitro*) para su identificación. Entonces se inyectó el plasma en un sistema de HPLC que consistía en una columna Chromolith Performance (C_{18} , 3 mm $\times$ 100 mm, Merck) que se eluyó con mezclas de NaOAc 0,05 M, pH 5,5 (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). Se usó el método siguiente para el análisis: elución isocrática con 100% de A durante 4 min a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min, luego gradiente lineal hasta el 90% de B en 14 min a una velocidad de flujo de 1 ml/min, y elución isocrática con una mezcla del 10% de A y 90% de B a una velocidad de flujo de 1 ml/min hasta 17 min. Tras hacer pasar a través de un detector UV en línea (254 nm), se recogió el eluato de HPLC como fracciones de 1 ml (recogida de fracciones cada min) usando un colector de fracciones automático. Para una buena separación entre el trazador intacto y el radiometabolito polar [^{18}F]I-7, se recogieron fracciones cada 30 s comenzando a partir de 8 min tras la inyección de HPLC hasta 12 min tras la inyección de HPLC. Se midió la radiactividad en todas las fracciones usando un contador gamma automatizado. El pico correspondiente al [^{18}F]B-3 intacto eluyó a -18 min, mientras que el radiometabolito [^{18}F]I-7 esperado eluyó desde ~13 hasta 15 min. También se detectó un radiometabolito polar no identificado que eluía desde 3 hasta 5 min en el cerebro. Un resumen de los resultados del análisis de radiometabolitos en plasma se presenta en la tabla 16.

Tabla 16. Porcentajes relativos de trazador intacto y radiometabolitos en plasma de rata a los 2, 30 y 60 min p.i. de [^{18}F]B-3. Los resultados se presentan como la media $\pm$ DE ($n=2$)

%	Mean $\pm$ DE (n=2)		
	2 min	30 min	60 min
Metabolitos polares	3,7 $\pm$ 2,6	47,0 $\pm$ 4,1	61,6 $\pm$ 7,7
Trazador intacto	96,3 $\pm$ 2,6	53,0 $\pm$ 4,1	38,4 $\pm$ 7,7

El análisis muestra que a los 2 min tras la inyección del radiotrazador, aproximadamente el 96% de la radiactividad recuperada en plasma estaba en forma de trazador intacto. A los 30 min p.i., se detectó un 47% de los radiometabolitos polares en plasma y esta cantidad aumentó hasta el 62% a los 60 min p.i. El radiometabolito más polar probablemente surge de la escisión y la oxidación de la cadena de [^{18}F]fluoro-etilo, ya que este metabolito polar también se detecta en el cerebro (véase más adelante). El segundo radiometabolito polar, que eluye cerca del trazador intacto, podría identificarse como [^{18}F]I-7. La radiactividad correspondiente a las fracciones (más lipófilas) que eluyen tras el trazador intacto fue insignificante y esto indica no formación de radiometabolitos lipófilos que, si están presentes, podrían penetrar en la barrera hematoencefálica.

B. Análisis de radiometabolitos en cerebro perfundido a los 30/60 minutos p.i.

Para cada punto de tiempo estudiado se inyectaron a dos ratas aproximadamente 0,6 mCi de [^{18}F]B-3. A los 30 min o 60 min tras la inyección del trazador, se sacrificaron las ratas mediante la administración de una sobredosis de Nembutal. Cuando dejaron de respirar, se perfundieron las ratas con solución salina (Mini Plasco®, Braun, Melsungen, Alemania) hasta que el hígado se volvió pálido. Se aisló el cerebro, se separaron el cerebro y cerebelo y se homogeneizaron en 3 ml y 2 ml de acetonitrilo, respectivamente, durante aproximadamente 2 min. Se diluyó un volumen de 1 ml de este homogeneizado con un volumen igual de agua y se filtró una parte de este homogenizado a través de un filtro de 0,22 μm (Millipore, Bedford, EE.UU.). Se diluyeron aproximadamente 0,4 ml del filtrado con 0,1 ml de agua y se realizaron adiciones conocidas con 10 μl de B-3 no radiactivo auténtico (disolución 1 mg/ml) y 10 μl de 1-7 (disolución 1 mg/ml, metabolito principal según los estudios *in vitro*) para su identificación. Entonces se inyectó el homogeneizado de cerebro/cerebelo en un sistema de HPLC que consistía en una columna analítica XBridge™ (C₁₈, 5 μm , 3 mm $\times$ 100 mm, Waters) eluida con una mezcla de tampón acetato de sodio 0,05 M, pH 5,5 y acetonitrilo (70:30 v/v) a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min. Se recogió el elutato de HPLC como fracciones de 1 ml (recogida de fracciones cada minuto) tras hacer pasar a través del detector UV, y se midió la radiactividad en las fracciones usando un contador gamma automatizado.

El pico correspondiente al [^{18}F]B-3 intacto eluyó a ~15 min, mientras que el radiometabolito principal [^{18}F]I-7 presente en plasma no se detectó en cerebro. También se detectó el metabolito polar que eluye a aproximadamente 2 min en plasma (véase anteriormente) y atraviesa la barrera hematoencefálica como puede deducirse a partir de los estudios de incubación *in vitro* (véase más adelante). Un resumen de los resultados del análisis de radiometabolitos en cerebro de rata perfundido se presenta en la tabla 17. La fracción de radiometabolitos apolares detectados en cerebro es insignificante. El porcentaje de metabolitos polares detectados en cerebelo es superior en comparación con el cerebro. A los 30 min p.i., estaba presente aproximadamente el 86% de la radiactividad recuperada como trazador intacto en el cerebro, en el cerebelo esto fue de ~69%. Tras 60 min, la cantidad de trazador intacto en el cerebro estaba disminuida hasta ~72%, en el cerebelo esto fue de aproximadamente el 47%.

Tabla 17. Porcentajes relativos de trazador intacto y radiometabolitos en cerebro y cerebelo de rata perfundidos a los 30 y 60 min p.i. de [^{18}F]B-3. Los resultados se presentan como la media $\pm$ DE (n=2)

%	30 min p.i.		60 min p.i.	
	Cerebro	Cerebelo	Cerebro	Cerebelo
metabolito polar	14,4 $\pm$ 10,1	30,6 $\pm$ 9,8	28,2 $\pm$ 7,9	53,0 $\pm$ 11,3
trazador intacto	85,6 $\pm$ 10,1	69,4 $\pm$ 9,8	71,8 $\pm$ 7,9	47,0 $\pm$ 11,3

C. Análisis de radiometabolitos de sangre, plasma y homogeneizado de cerebro de rata tras incubación *in vitro* con [^{18}F]B-3 a 37°C durante 60 min

Se incubaron sangre, plasma y cerebro homogeneizado de una rata con aproximadamente 0,17 mCi de [^{18}F]B-3 a 37°C. Tras 60 min de incubación, se colocaron las muestras en hielo para detener el metabolismo. Se prepararon muestras de sangre y homogeneizado de cerebro y se analizaron en RP-HPLC tal como se describió anteriormente. La cantidad de radiometabolitos detectados en sangre, plasma y cerebro de rata tras una hora de incubación fue insignificante. Esto indica que el radiometabolito -polar (que se suponía que era un derivado de [^{18}F]fluoroetilo) observado en cerebro y cerebelo de rata perfundidos a los 30 y 60 min p.i. de [^{18}F]B-3, se forma de manera periférica (en el hígado) y atraviesa la barrera hematoencefálica.

IV. ESTUDIOS DE OBTENCIÓN DE IMÁGENES EN MICROPET

Se realizaron experimentos de obtención de imágenes en un dispositivo de exploración microPET Focus™ 220 (Concorde Microsystems, Knoxville, TN, EE.UU.) usando ratas Wistar macho con peso corporal que variaba entre 300 y 600 g. Durante todas las sesiones de exploración, se mantuvieron los animales bajo anestesia con gas (isoflurano al 2,5% en O₂ a una velocidad de flujo de 1 l/min). Se obtuvieron exploraciones dinámicas de 120 min en modo lista. Tras la reconstrucción de las imágenes, se registraron conjuntamente de manera semiautomática con un patrón de [¹¹C]racloprida del cerebro de rata y se generaron volúmenes de interés (VOI) para diferentes estructuras cerebrales anatómicas (cuerpo estriado, corteza cerebral y cerebelo) a partir de los cuales se construyeron curvas de tiempo-actividad (TAC) para cada imagen individual, usando el software PMOD (PMOD Technologies Ltd.). Se realizó la normalización para el peso corporal del animal y la dosis inyectada. La concentración de radiactividad en las diferentes regiones cerebrales se expresó como SUV (valor de captación normalizado) como una función del tiempo en segundos tras la inyección del radiotrazador. Se calcularon los valores paramétricos de potencial de unión (BP) para todas las imágenes obtenidas mediante el uso de un modelo tisular de referencia simplificado en el que se usó la TAC del cerebelo como la TAC de entrada para la unión no específica, usando el mismo software (PMOD).

A. Estudios en microPET con el compuesto [¹⁸F]B-3

Se inyectaron a tres ratas aproximadamente 2,2 mCi de formulación de [¹⁸F]B-3 de alta actividad específica a través de la vena de la cola bajo anestesia (isoflurano al 2,5% en O₂ a una velocidad de flujo de 1 l/min) y se exploraron como nivel inicial durante 2 horas.

Se observó una señal de alta intensidad en el cuerpo estriado con sólo radiactividad de fondo en las regiones corticales así como en el cerebelo. Las TAC muestran que tras la inyección de [¹⁸F]B-3 hay una alta captación inicial del radiotrazador en el cuerpo estriado, las regiones corticales y el cerebelo. Tras esta alta captación inicial debida a la actividad de acumulación de sangre, se aclaró la radiactividad no específica desde las regiones corticales y el cerebelo. En el cuerpo estriado, la concentración de radiactividad alcanzó su máximo (SUV promedio de 1,04) a aproximadamente los 16 min p.i. y esto permaneció a un nivel similar hasta aproximadamente 53 min p.i. Se obtuvieron razones pico de cuerpo estriado con respecto a cerebelo de 5,6 a 1 (n=3) a los 23 min tras la inyección y estas razones permanecieron en torno a 5,6 hasta aproximadamente 53 min tras la inyección. Tras esto, las razones disminuyeron lentamente hasta el final del experimento debido al aclaramiento de la actividad desde el cuerpo estriado. Se calculó el valor de BP mediante el uso de un modelo tisular de referencia simplificado donde se consideró la TAC del cuerpo estriado como la TAC rica en PDE10 y se usó la TAC del cerebelo como la TAC pobre en PDE10. El BP promedio en el nivel inicial fue de 4,1 (n=3).

Se realizaron estudios de pretratamiento donde se administró el análogo B-3 no radiactivo a través de la vía subcutánea a una dosis de 2,5 mg/kg de peso corporal en una rata (uno de los tres animales que se usaron en la exploración de nivel inicial). A los 60 min tras el pretratamiento, se inyectaron a la rata 2,24 mCi formulación de [¹⁸F]B-3 de alta actividad específica a través de la vena de la cola bajo anestesia (isoflurano al 2,5% en O₂ a una velocidad de flujo de 1 l/min) y se realizó una exploración dinámica durante 2 horas.

Cuando se pretrató el animal con compuesto "frío", la razón de cuerpo estriado con respecto a cerebelo disminuyó hasta 1,9. Además, hubo una reducción de aproximadamente el 80% en los valores de BP con pretratamiento en comparación con las exploraciones de nivel inicial (BP tras el bloqueo = 0,8 (n=1)).

Los estudios de biodistribución así como los estudios de obtención de imágenes en microPET han mostrado retención específica o lavado más lento de este trazador desde la región rica en PDE-10, el cuerpo estriado. Por tanto, [¹⁸F]B-3 es un agente adecuado para la obtención de imágenes y la cuantificación de PDE10A usando PET.

B. Estudio de nivel inicial en microPET con el compuesto [¹⁸F]B-4

Se inyectaron a una rata aproximadamente 4 mCi de la formulación de [¹⁸F]B-4 de alta actividad específica a través de la vena de la cola bajo anestesia (isoflurano al 2,5% en O₂ a una velocidad de flujo de 1 l/min) y se exploraron como nivel inicial durante 2 horas.

Se observó una señal de alta intensidad en el cuerpo estriado con sólo radiactividad de fondo en las regiones corticales así como en el cerebelo. Las TAC muestran que tras la inyección de [¹⁸F]B-4 hay una alta captación inicial del radiotrazador en el cuerpo estriado, las regiones corticales y el cerebelo. Tras esta alta captación inicial debida a la actividad de acumulación de sangre, se aclaró la radiactividad no específica desde las regiones corticales y el cerebelo. El aclaramiento desde el cuerpo estriado fue más lento, lo que indica retención del trazador en esta región. Se obtuvieron razones pico de cuerpo estriado con respecto a cerebelo de 4,4 a 1 a aproximadamente 6 min tras la inyección y estas razones permanecieron en torno a 4,4 hasta aproximadamente 13 min tras la inyección. Tras esto, la razón disminuyó bastante rápido debido al aclaramiento de la actividad desde el cuerpo estriado. Se calculó el valor de BP a partir de estas imágenes mediante el uso de un modelo tisular de referencia simplificado donde se usó el cerebelo como tejido de referencia. El BP en el nivel inicial fue de 2,5 (n=1).

Los estudios de biodistribución así como los estudios de obtención de imágenes en microPET han mostrado

retención específica o lavado más lento de [^{18}F]B-4 desde la región rica en PDE-10, el cuerpo estriado. Compuesto [^{18}F]B-4 también podría ser un agente adecuado para la obtención de imágenes de la expresión de PDE10A en el cerebro usando PET.

5 Comparación de las cinéticas de [^{18}F]B-3 y [^{18}F]Ref

Se compararon las cinéticas de dos ligandos de PDE10A de PET prometedores, [^{18}F]B-3 y [^{18}F]Ref (2-{4-[1-(2-[^{18}F]fluoroetil)-4-piridin-4-il-1H-pirazol-3-il]-fenoximetil}-quinolina, documento WO 2010/097367).

- 10 Se inyectaron a ratas Wistar macho normales i.v. a través de la vena de la cola bajo anestesia (isoflurano al 2,5% en O_2 a una velocidad de flujo de 1 l/min) trazador de alta actividad específica [^{18}F]B-3 o [^{18}F]Ref y se sometieron a exploración dinámicamente usando $\square$ PET durante 120 min. Durante las sesiones de exploración, se mantuvieron los animales bajo anestesia con gas (isoflurano al 2,5% en O_2 a una velocidad de flujo de 1 l/min). La concentración de radiactividad en las diferentes regiones cerebrales se expresó como valor de SUV como una función del tiempo p.i.
- 15 del radiotrazador mediante normalización para el peso corporal del animal y dosis inyectada.

Curvas de tiempo-actividad de nivel inicial

- 20 Para ambos trazadores, hubo un lavado claro de radiactividad desde el cerebelo y la corteza, regiones cerebrales donde la expresión de PDE10A es mínima. Ambos trazadores se mantuvieron en el cuerpo estriado, sin embargo las cinéticas en esta región cerebral son diferentes para ambos ligandos de PET. [^{18}F]Ref alcanza su concentración de radiactividad máxima [SUV promedio de 0,73] a aproximadamente 57 min p.i. y esto permanece al mismo nivel hasta el final del experimento.
- 25 [^{18}F]B-3 alcanza su concentración de radiactividad máxima [SUV promedio de 1,04] a aproximadamente 16 min p.i. El lavado de [^{18}F]B-3 desde el cuerpo estriado comienza aproximadamente a los 53 min p.i. La cinética más rápida de [^{18}F]B-3 en comparación con [^{18}F]Ref también se refleja en las razones de cuerpo estriado con respecto a cerebelo. Para [^{18}F]B-3, se obtuvieron razones pico de cuerpo estriado con respecto a cerebelo de aproximadamente 5,6 a los 23 min p.i. y estas razones permanecieron en torno a 5,6 hasta aproximadamente 53 min p.i. Tras esto, las
- 30 razones disminuyeron lentamente hasta el final del experimento debido al aclaramiento de la actividad desde el cuerpo estriado. Para [^{18}F]Ref, se alcanzó una razón máxima de cuerpo estriado con respecto a cerebelo de 4,2 tras aproximadamente 32 min p.i., que permaneció constante hasta el final de la exploración.

TABLA 18. Comparación de algunos parámetros cinéticos de [^{18}F]Ref y [^{18}F]B-3 en el nivel inicial

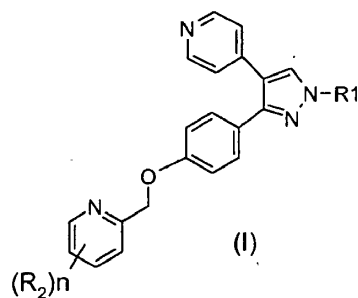
	[^{18}F]Ref	[^{18}F]B-3
(SUV 100 min/SUV MAX) _{cuerpo estriado}	1	0,7
(periodo de tiempo de SUV MAX) _{cuerpo estriado}	~57 min p.i. – fin de la exploración	~16 min - 53 min p.i.
Periodo de tiempo razón S/C MAX	~32 min p.i. – fin de la exploración	~23 min - 53 min p.i.
*SUV MAX en el cuerpo estriado	0,7	1,0
*razón S/C MAX	4,2	5,6

- 35 S/C = Razón de cuerpo estriado con respecto a cerebelo. *valores promedio a lo largo del periodo de tiempo de máximo

- 40 Las cinéticas más lentas requieren tiempos de adquisición más largos en aplicaciones clínicas para obtener valores de volumen de distribución robustos. Por tanto [^{18}F]B-3 es más prometedor como ligando de PDE10A para obtención de imágenes cerebrales en ser humano. Además, [^{18}F]B-3 alcanza una concentración de radiactividad superior en el cuerpo estriado y razones superiores de cuerpo estriado con respecto a cerebelo en comparación con [^{18}F]Ref (tabla 18) dando como resultado imágenes *in vivo* de calidad superior y cuantificación más precisa de potencial de unión de PDE10A.

REIVINDICACIONES

1.- Compuesto de fórmula (I)



o una forma estereoisomérica del mismo, en la que

R^1 es 2-fluoroetilo, 2,2,2-trifluoroetilo o 3-fluoropropilo;

n es 1, 2 ó 3;

cada R^2 es independientemente alquilo C_{1-3} , ciclopropilo, alquiloxilo C_{1-3} , haloalquiloxilo C_{1-3} , halo, trifluorometilo, trifluorometoxilo, difluorometoxilo o ciano,

en la que al menos un F es [^{18}F],

o un solvato o una forma de sal del mismo.

2.- Compuesto según la reivindicación 1, en el que R^1 es 2-fluoroetilo.

3.- Compuesto según la reivindicación 1, en el que R^2 es 6-metilo, 3,5-dimetilo o 5-metoxilo.

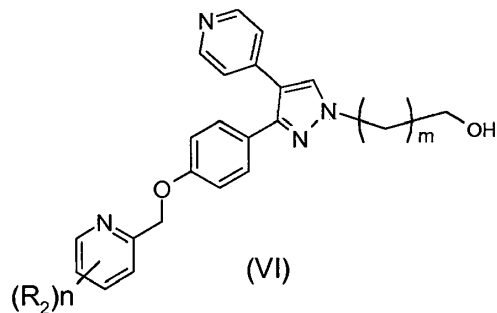
4.- Compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto es 2-[[4-[1-(2-fluoroetil)-4-(4-piridinil)-1H-pirazol-3-il]fenoxi]metil]-3,5-dimetilpiridina.succinato.

5.- Composición estéril que comprende un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 disuelto en solución salina.

6.- Uso de un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 para la obtención de imágenes de un tejido, células o un huésped, *in vitro* o *in vivo*.

7.- Método de obtención de imágenes de un tejido, células o un huésped, que comprende poner en contacto con o administrar a un tejido, células o un huésped un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, y obtener imágenes del tejido, las células o el huésped con un sistema de obtención de imágenes mediante tomografía de emisión de positrones.

8.- Compuesto precursor de fórmula (VI)



o una forma estereoisomérica del mismo, en la que

m es 1 ó 2;

n es 1, 2 ó 3;

cada R^2 es independientemente alquilo C_{1-3} , ciclopropilo, alquiloilo C_{1-3} , halo, trifluorometilo, trifluorometoxilo, difluorometoxilo o ciano,

5

o un solvato o una forma de sal del mismo.