

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 449**

51 Int. Cl.:

C07D 277/66 (2006.01)

C07D 277/64 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 31/428 (2006.01)

A61K 51/04 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

G01N 33/534 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2001 E 10185669 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015 EP 2264018**

54 Título: **Derivados de tioflavina para uso en diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

24.08.2000 US 227601 P

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

25.05.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF PITTSBURGH OF THE
COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER
EDUCATION (100.0%)
200 Gardner Steel Conference Center, Thackeray
& O'Hara Streets
Pittsburgh, PA 15260, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 536 449 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

Derivados de tioflavina para uso en diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a compuestos que son adecuados para producción de imágenes de depósitos de amiloide en pacientes vivos. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método de producción de imágenes de depósitos de amiloide en el cerebro *in vivo* a fin de permitir la diagnosis ante-mortem de la enfermedad de Alzheimer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

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

20 Los núcleos de amiloide de estas placas neuríticas están compuestos de una proteína denominada el amiloide β ($A\beta$) que está dispuesta en una configuración predominantemente de hoja plegada beta. Mori et al., *Journal of Biological Chemistry* 267:17082 (1992); Kirschner et al., *PNAS* 83:503 (1986). Las placas neuríticas son un aspecto precoz e invariante de la enfermedad (Mann et al., *J. Neurol. Sci.* 89:169; Mann, *Mech. Ageing.* 31:913 (1985); Terry et al., *J. Neuropathol. Exp. Neurol* 46: 262 (1987).

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

30 Las placas neuríticas que contienen amiloide son una característica prominente de áreas selectivas del cerebro en AD así como en el síndrome de Down y en personas homocigóticas para el alelo de la apolipoproteína E4 que son muy propensas a desarrollar AD. Corder et al., *Science* 261: 921 (1993); Divry, P., *J. Neurol. Psych.* 27: 643-657 (1927); Wisniewski et al., in Zimmerman, H.M. (ed.): *PROGRESS IN NEUROPATHOLOGY* (Grune y Stratton, N.Y. 1973) pp. 1-26. El amiloide cerebral se demuestra fácilmente por tinción de secciones de cerebro con tioflavina S o rojo Congo. Puchtler et al., *J. Histochem. Cytochem.* 10:35 (1962). El amiloide teñido con rojo Congo se caracteriza por un aspecto dicroico, que exhibe un color de polarización amarillo-verde. La fijación dicroica es el resultado de la estructura de hoja plegada beta de las proteínas de amiloide. Glenner G.N. *Eng. J. Med.* 302:1283 (1980). Una exposición detallada de la bioquímica e histoquímica del amiloide puede encontrarse en Glenner, N. *Eng. J. Med.*, 302:1333 (1980).

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

40 La evidencia de que las anomalías en el metabolismo de $A\beta$ son necesarias y suficientes para el desarrollo de AD está basada en el descubrimiento de mutaciones puntuales en la proteína precursora de $A\beta$ en varias familias raras con una forma autosómica dominante de AD. Hardy, *Nature Genetics* 1:233 (1992); Hardy et al., *Science* 256: 184 (1992). Estas mutaciones ocurren cerca de los puntos de escisión N- y C-terminales necesarios para la generación de $A\beta$ a partir de su proteína precursora. St. George-Hyslop et al., *Science* 235:885 (1987); Kang et al., *Nature* 325:733 (1987); Potter WO92/17152. El análisis genético de un gran número de familias AD ha demostrado, sin embargo, que AD es genéticamente heterogénea. St. George-Hyslop et al., *Nature* 347: 194 (1990). La conexión con los marcadores del cromosoma 21 se demuestra sólo en algunas familias con AD de aparición precoz y en ninguna familia con AD de aparición tardía. Más recientemente, Sherrington et al han identificado un gen en el cromosoma 14, cuyo producto se predice que contiene dominios transmembranales múltiples y se asemeja a una proteína de membrana integral (Sherrington et al., *Nature* 375:754-760 (1995)). Este gen puede dar cuenta de hasta el 70% de la AD dominante autosómica de aparición precoz. Datos preliminares sugieren que esta mutación en el

cromosoma 14 causa un aumento en la producción de A β . Scheuner et al., Soc. Neurosci. Abstr. 21:1500 (1995). Una mutación en un gen muy similar ha sido identificada en el cromosoma 1 en poblaciones emparentadas alemanas del Volga con AD de aparición precoz. Levy-Lahad et al., Science 269:973-977 (1995).

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

10 Se han desarrollado métodos de inmunoensayo para detectar la presencia de marcadores neuroquímicos en pacientes de AD y para detectar una proteína amiloide afín a AD en el líquido cefalorraquídeo. Warner, Anal. Chem. 59:1203A (1987); Patente Mundial No. 92/17152 por Potter; Glenner et al, Patente U.S. No. 4.666.829. No se ha demostrado que estos métodos para la diagnosis de AD detecten AD en todos los pacientes, particularmente en las etapas iniciales de la enfermedad, y son relativamente invasivos, por requerir una punción medular. Asimismo, se han realizado intentos para desarrollar anticuerpos monoclonales como sondas para producción de imágenes de A β .
15 Majocha et al., J. Nucl. Med., 33:2184 (1992); Majocha et al., WO89/06242 y Majocha et al., Patente U.S. 5.231.000. La desventaja principal de las sondas de anticuerpos es la dificultad de lograr que estas grandes moléculas atraviesen la barrera hematoencefálica. La utilización de anticuerpos para diagnosis *in vivo* de AD requeriría anomalías acusadas en la barrera hematoencefálica a fin de lograr acceso al cerebro. No existe ninguna prueba funcional convincente de que existan fiablemente anomalías en la barrera hematoencefálica en AD. Kalaria, Cerebrovascular & Brain Metabolism Reviews 4:226 (1992).
20

Se ha utilizado el péptido A β radiomarcado para marcar placas de tipo difuso, compacto y neurítico en secciones de cerebro AD. Véase Maggio et al., WO93/04194. Sin embargo, estos péptidos comparten todas las desventajas de los anticuerpos. Específicamente, los péptidos no atraviesan normalmente la barrera hematoencefálica en las cantidades necesarias para la producción de imágenes y dado que estas sondas reaccionan con las placas difusas,
25 pueden no ser específicas para AD.

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

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

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

directamente en el torrente sanguíneo. En este caso, la cantidad administrada sería insignificante, y el colorante eludiría las bacterias intestinales.

En el caso del uso terapéutico, estos hechos tienen importancia crítica. La liberación de un carcinógeno conocido por un compuesto terapéutico es inaceptable. Un segundo problema con el metabolismo de los colorantes diazoicos es que gran parte del fármaco administrado es metabolizada por las bacterias intestinales antes de la absorción. Esta biodisponibilidad reducida sigue siendo una desventaja incluso si los metabolitos liberados son inocuos.

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

WO97/26919 describe, entre otras cosas, un método de producción de imágenes de depósito de amiloide por administración de compuestos de benzotiazolio en los que los átomos de nitrógeno de los anillos de tiazol están cuaternizados.

WO01/14354 describe ciertos compuestos de benzotiazol para uso como agentes antitumorales. Los compuestos contienen opcionalmente el isótopo ¹⁸F para evaluar, por técnicas de producción de imágenes, la eficacia de los compuestos contra los tumores.

Así pues, existe necesidad de compuestos fijadores de amiloide que entren en el cerebro y se fijen selectivamente a amiloide.

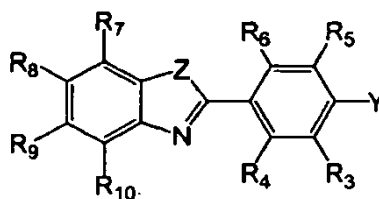
Existe una necesidad adicional de compuestos fijadores de amiloide que sean no tóxicos y biodisponibles y, en consecuencia, puedan utilizarse en terapéutica.

SUMARIO DE LA INVENCION

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar compuestos que permiten un método seguro y específico para la diagnosis de AD antes de la muerte por producción de imágenes in vivo de amiloide en el parénquima cerebral.

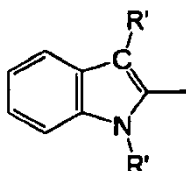
Es otro objeto de la presente invención proporcionar un método para identificación de depósitos de amiloide AD en el cerebro antes de la muerte de un paciente, utilizando una sonda de afinidad alta para el amiloide que tiene toxicidad baja, puede atravesar la barrera hematoencefálica, y puede diferenciar el cerebro AD del cerebro normal.

En la realización de estos y otros objetos de la invención, se proporciona, de acuerdo con un aspecto de la invención, un compuesto fijador de amiloide de la fórmula siguiente o una sal no tóxica soluble en agua del mismo:

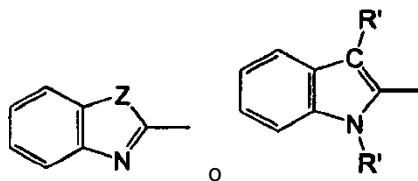


(I)

en donde Z es S, NR', O o CR', en cuyo caso la forma tautómera correcta del anillo heterocíclico resulta ser un indol en el cual R' es H o un grupo C₁-C₈ alquilo:



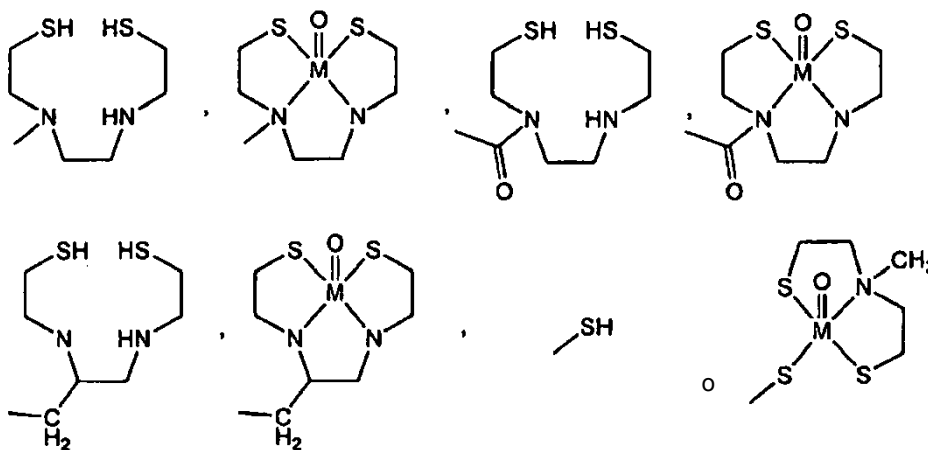
Y es NR^1R^2 , OR^2 o SR^2 ;
 en donde el nitrógeno de



no es una amina cuaternaria;

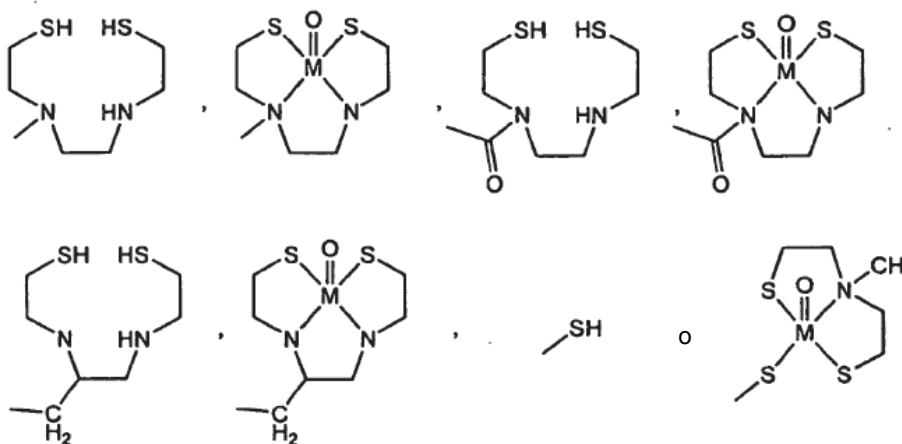
- 5 cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente del grupo constituido por H, un grupo C_1-C_8 alquilo, $(CH_2)_nOR'$ (en donde $n = 1, 2, \text{ ó } 3$), CF_3 , CH_2-CH_2X , $CH_2-CH_2-CH_2X$ (en donde $X = F, Cl, Br \text{ o } I$), $(C=O)-R'$, R_{ph} , $(CH_2)_nR_{ph}$ (en donde $n = 1, 2, 3 \text{ ó } 4$ y R_{ph} representa un grupo fenilo insustituido o sustituido, en donde los sustituyentes de R_{ph} se seleccionan del grupo constituido por F, Cl, Br, I, un grupo C_1-C_8 alquilo, $(CH_2)_nOR'$ (en donde $n = 1, 2, \text{ ó } 3$), CF_3 , CH_2-CH_2X , $O-CH_2-CH_2X$, $CH_2-CH_2-CH_2X$, $O-CH_2-CH_2-CH_2X$ (en donde $X = F, Cl, Br \text{ o } I$),
- 10 CN, $(C=O)-R'$, $N(R')_2$, NO_2 , $(C=O)N(R')_2$, $O(CO)R'$, OR' , SR' , $COOR'$ (en donde R' es H o un grupo C_1-C_8 alquilo), un trialquil-estaño y un grupo quelante (con o sin un grupo metálico quelado) de la forma W-L o V-W-L, en donde V se selecciona del grupo constituido por $-COO-$, $-CO-$, $-CH_2O-$ y $-CH_2NH-$; W es $-(CH_2)_n$ en donde $n = 0, 1, 2, 3, 4 \text{ ó } 5$; y L es:

15



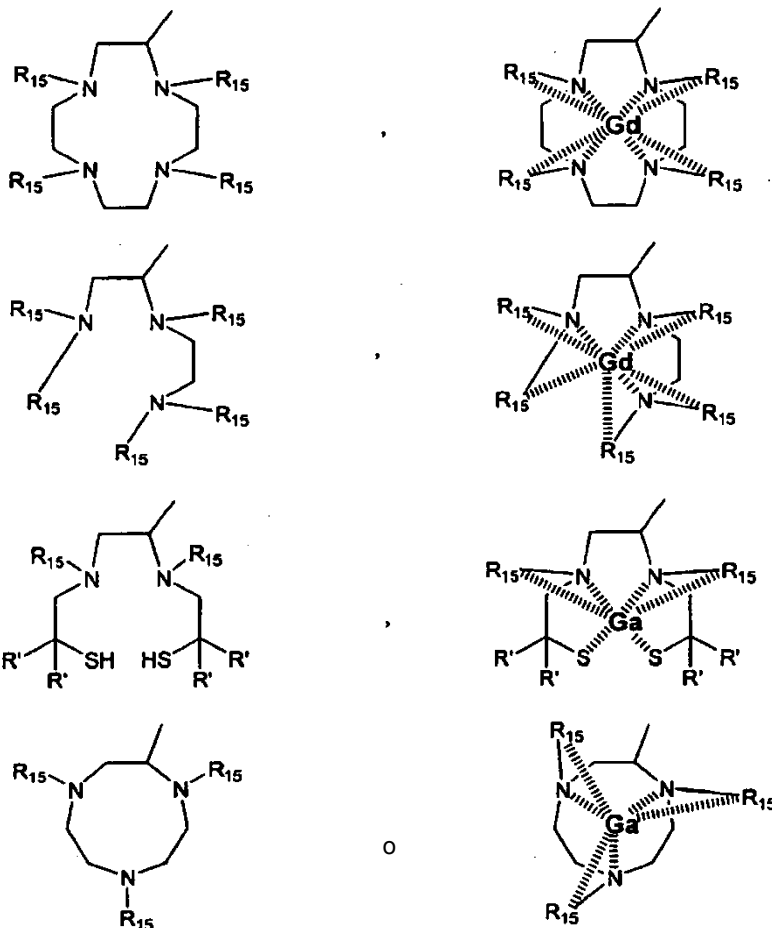
en donde M se selecciona del grupo constituido por Tc y Re;
 y R' es H o un grupo C_1-C_8 alquilo);

- 20 cada uno de R^3-R^{10} se selecciona independientemente del grupo constituido por H, F, Cl, Br, un grupo C_1-C_8 alquilo, $(CH_2)_nOR'$ (en donde $n = 1, 2, \text{ ó } 3$), CF_3 , CH_2-CH_2X , $O-CH_2-CH_2X$, $CH_2-CH_2-CH_2X$, $O-CH_2-CH_2-CH_2X$ (en donde $X = F, Cl, Br \text{ o } I$), CN, $(C=O)-R'$, $N(R')_2$, NO_2 , $(C=O)N(R')_2$, $O(CO)R'$, OR' , SR' , $COOR'$, R_{ph} , $CR'=CR'-R_{ph}$, $CR_2'=CR_2'-R_{ph}$, un trialquil-estaño y un grupo quelante (con o sin un grupo metálico quelado) de la forma W-L o V-W-L, en donde V se selecciona del grupo constituido por $-COO-$, $-CO-$, $-CH_2O-$ y $-CH_2NH-$; W es $-(CH_2)_n$ en donde $n = 0, 1, 2, 3, 4 \text{ ó } 5$;
- 25 y L es:



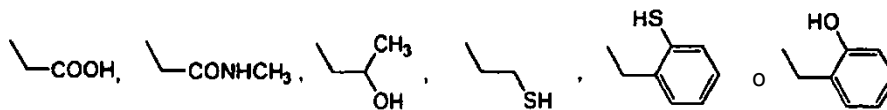
en donde M se selecciona del grupo constituido por Tc y Re;
 o en donde cada uno de R^1-R^{10} se selecciona independientemente del grupo constituido por un grupo quelante (con o sin un ion metálico quelado) de la forma W-L y V-W-L, en donde V se selecciona del grupo constituido por $-COO^-$ y $-CO-$; W es $-(CH_2)_n$ donde $n = 0, 1, 2, 3, 4, \text{ ó } 5$; L es:

5

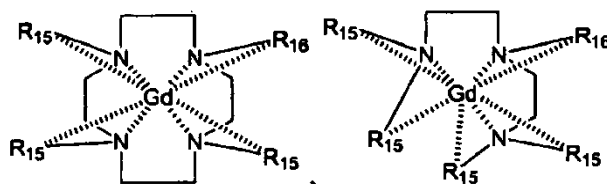


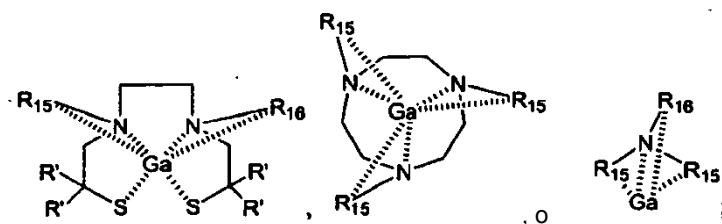
10

15 y en donde R^{15} se selecciona independientemente de lo siguiente:
 H,

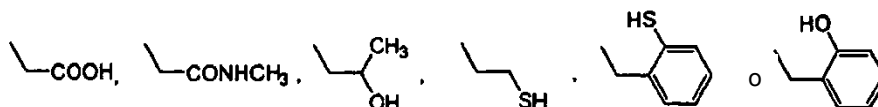


20 o un grupo quelante fijador de amiloide (con un grupo metálico quelado) o una sal del mismo no tóxica soluble en agua, de la forma:

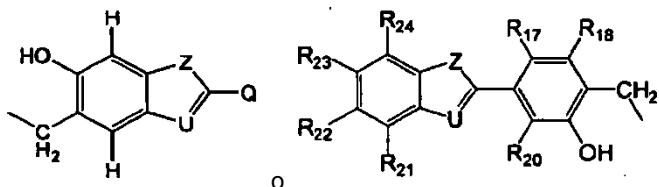




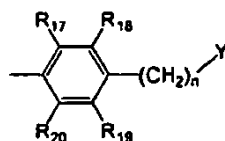
5 en donde R¹⁵ se selecciona independientemente de lo siguiente:
H,



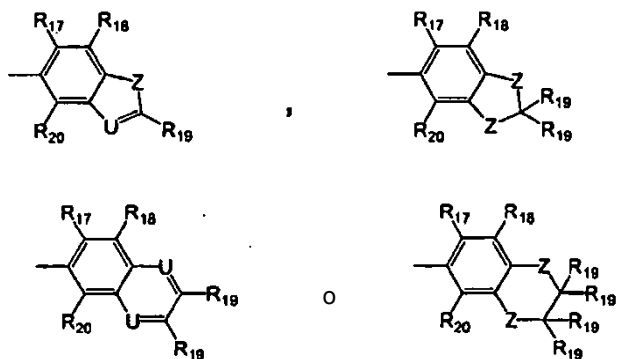
y R¹⁶ es



10 en donde Q se selecciona independientemente de una de las estructuras siguientes:



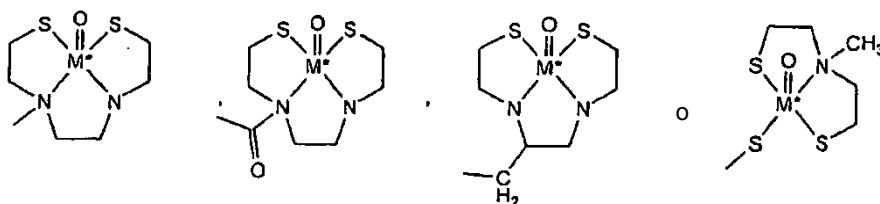
15 en donde n = 0, 1, 2, 3 ó 4,



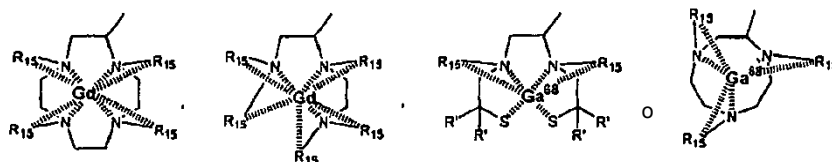
20 Z es S, NR', O, o C(R')₂ en donde R' es H o un grupo C₁-C₈ alquilo;
U es N o CR';

25 Y es NR¹R², OR² o SR²;
cada R¹⁷-R²⁴ se selecciona independientemente del grupo constituido por H, F, Cl, Br, I, un grupo C₁-C₈ alquilo, (CH₂)_nOR' (en donde n = 1, 2 ó 3), CF₃, CH₂-CH₂X, CH₂-CH₂-CH₂X, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂-CH₂X (en donde X = F, Cl, Br o I), CN, (C=O)-R', N(R')₂, NO₂, (C=O)N(R')₂, O(CO)R', OR', SR', COOR', R_{ph}, CR'=CR'-R_{ph} y CR'₂-CR₂-R_{ph}; en donde al menos uno de los sustituyentes R₁-R₁₀ se selecciona del grupo constituido por ³H, ¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ⁷⁶Br, ⁷⁵Br, CH₂-CH₂-X*, O-CH₂-CH₂-X*, CH₂-CH₂-CH₂-X*, O-CH₂-CH₂-CH₂-X* (en donde X* = ¹³¹I, ¹²³I, ⁷⁶Br o ⁷⁵Br), ¹⁹F, un sustituyente que contiene carbono seleccionado del grupo constituido por C₁-C₈ alquilo, (CH₂)_nOR', CF₃, CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂X, CH₂-CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂-CH₂X (en donde X=F, Cl, Br o I), CN, (C=O)-R', (C=O)N(R')₂, O(CO)R', COOR', CR'=CR'-R_{ph} y CR'₂-CR₂-R_{ph} en donde al menos un carbono es ¹¹C, ¹³C o ¹⁴C y un grupo quelante (con grupo metálico quelado) de la forma W-L* o V-W-L*, en donde V se selecciona del grupo constituido por -COO-, -CO-, -CH₂O- y -CH₂NH-; W es -(CH₂)_n donde n = 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; y L* es:

35

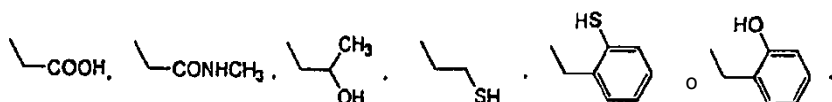


en donde M* es ^{99m}Tc ;
o L* es:

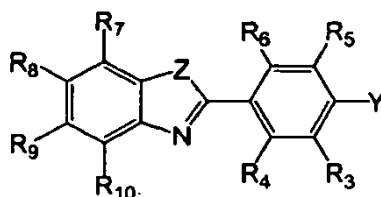


5 y en donde R¹⁵ se selecciona independientemente de lo siguiente:

H,



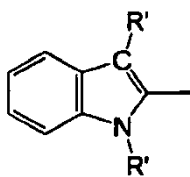
En otra realización, la invención se refiere a un método para sintetizar un compuesto de la fórmula siguiente o una sal no tóxica soluble en agua del mismo:



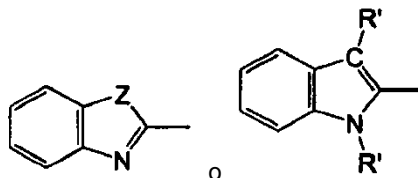
(I)

10

en donde Z es S, NR', O o CR', en cuyo caso la forma tautómera correcta del anillo heterocíclico resulta ser un indol en el cual R' es H o un grupo C₁-C₈ alquilo:



Y es NR¹R², OR² o SR²;
15 en donde el nitrógeno de



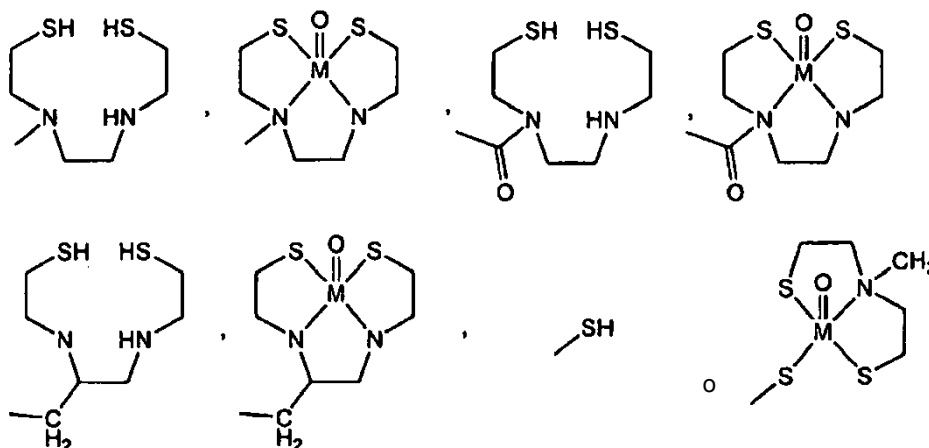
no es una amina cuaternaria;

20

cada uno de R¹ y R² se selecciona independientemente del grupo constituido por H, un grupo C₁-C₈ alquilo, (CH₂)_nOR' (en donde n = 1, 2, ó 3), CF₃, CH₂-CH₂X, CH₂-CH₂-CH₂X (en donde X = F, Cl, Br o I), (C=O)-R', R_{ph}, (CH₂)_nR_{ph} (en donde n = 1, 2, 3 ó 4 y R_{ph} representa un grupo fenilo insustituido o sustituido, en donde los sustituyentes de R_{ph} se seleccionan del grupo constituido por F, Cl, Br, I, un grupo C₁-C₈ alquilo, (CH₂)_nOR' (en donde n = 1, 2, ó 3), CF₃, CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂X, CH₂-CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂-CH₂X (en donde X = F, Cl, Br o I), CN, (C=O)-R', N(R')₂, NO₂, (C=O)N(R')₂, O(CO)R', OR', SR', COOR' (en donde R' es H o un grupo C₁-C₈ alquilo), un

trialquil-estaño y un grupo quelante (con o sin un grupo metálico quelado) de la forma W-L o V-W-L, en donde V se selecciona del grupo constituido por -COO-, -CO-, -CH₂O- y -CH₂NH-; W es -(CH₂)_n en donde n = 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; y L es:

5

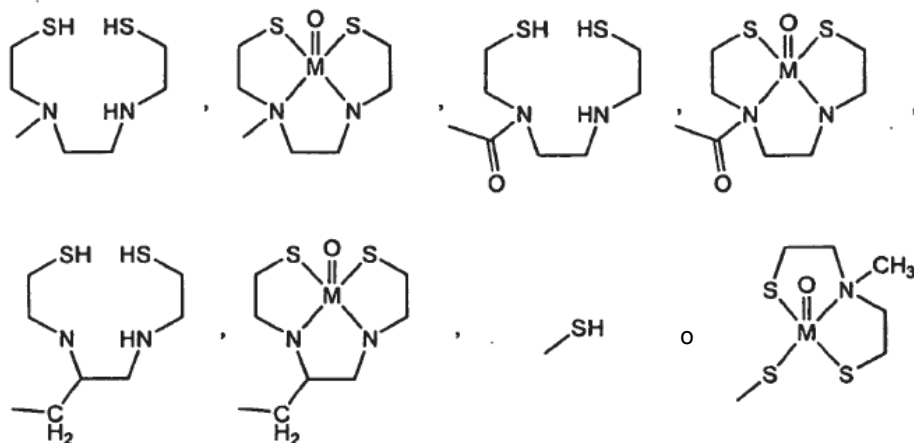


en donde M se selecciona del grupo constituido por Tc y Re;

y R' es H o un grupo C₁-C₈ alquilo;

10 cada uno de R³-R¹⁰ se selecciona independientemente del grupo constituido por H, F, Cl, Br, un grupo C₁-C₈ alquilo, (CH₂)_nOR' (en donde n = 1, 2, ó 3), CF₃, CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂X, CH₂-CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂-CH₂X (en donde X = F, Cl, Br o I), CN, (C=O)-R', N(R')₂, NO₂, (C=O)N(R')₂, O(CO)R', OR', SR', COOR', R_{ph}, CR=CR'-R_{ph}, CR₂'=CR₂'-R_{ph}, un trialquil-estaño y un grupo quelante (con o sin un grupo metálico quelado) de la forma W-L o V-W-L, en donde V se selecciona del grupo constituido por -COO-, -CO-, -CH₂O- y -CH₂NH-; W es -(CH₂)_n en donde n = 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; y L es:

15



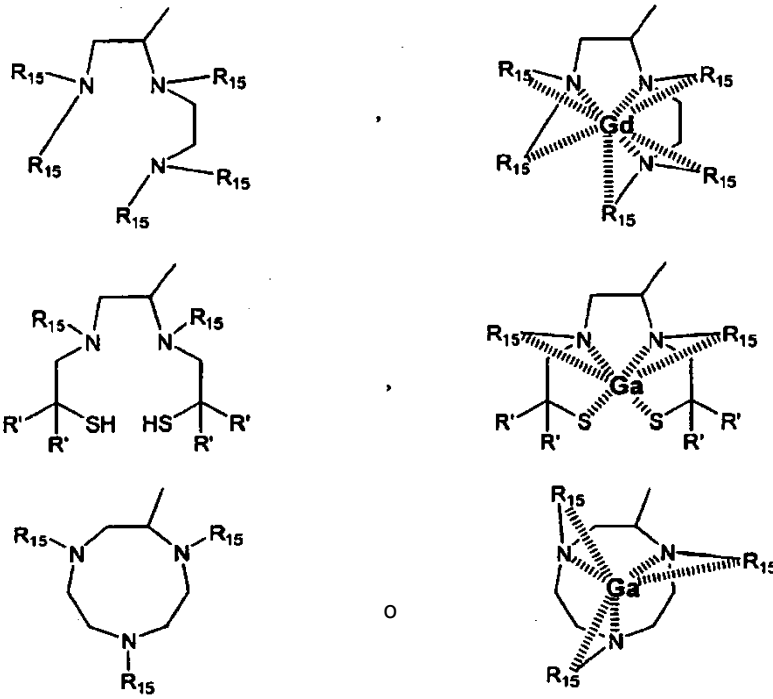
en donde M se selecciona del grupo constituido por Tc y Re;

o en donde cada uno de R¹-R¹⁰ se selecciona independientemente del grupo constituido por un grupo quelante (con o sin un ion metálico quelado) de la forma W-L y V-W-L, en donde V se selecciona del grupo constituido por -COO- y -CO-; W es -(CH₂)_n donde n = 0, 1, 2, 3, 4, ó 5; L es:

20

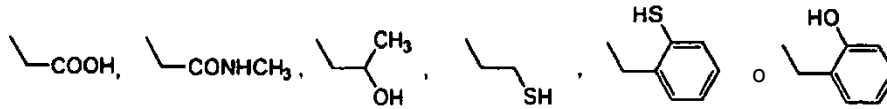


25



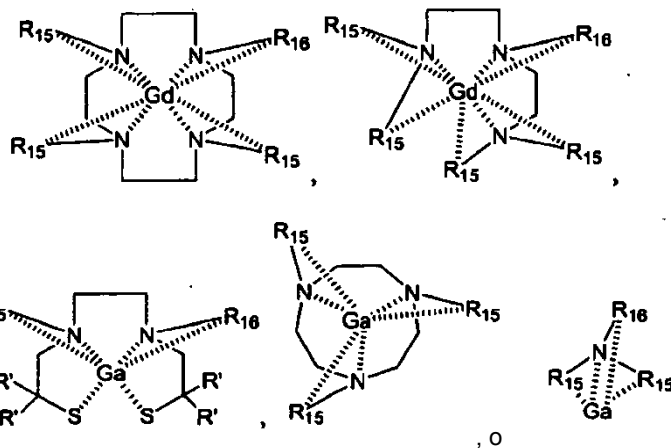
5

y en donde R¹⁵ se selecciona independientemente de lo siguiente:
H,



10

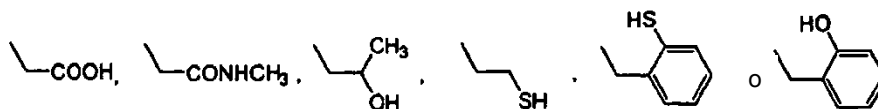
o un grupo quelante fijador de amiloide (con un grupo metálico quelado) o una sal del mismo no tóxica soluble en agua, de la forma:



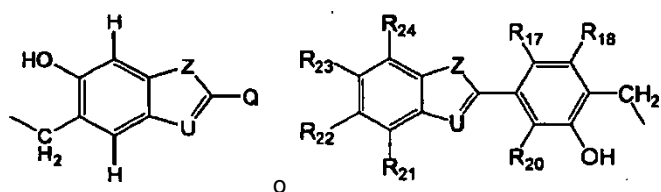
15

en donde R¹⁵ se selecciona independientemente de lo siguiente:
H,

20



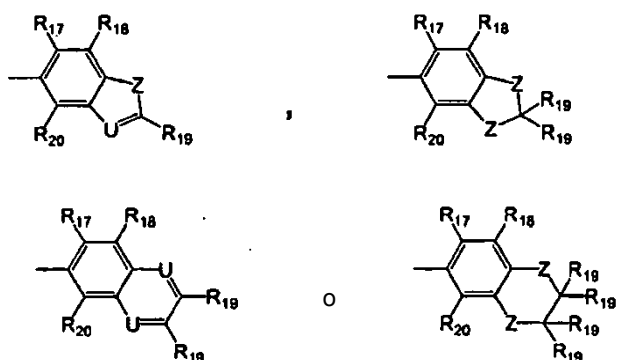
y R¹⁶ es



en donde Q se selecciona independientemente de una de las estructuras siguientes:



en donde n = 0, 1, 2, 3 ó 4,



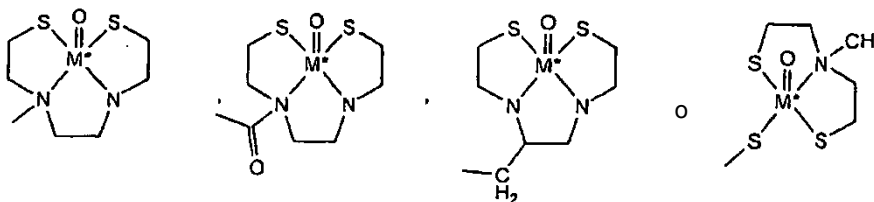
Z es S, NR', O, o C(R')₂ en donde R' es H o un grupo C₁-C₈ alquilo;

U es N o CR';

Y es NR¹R², OR² o SR²;

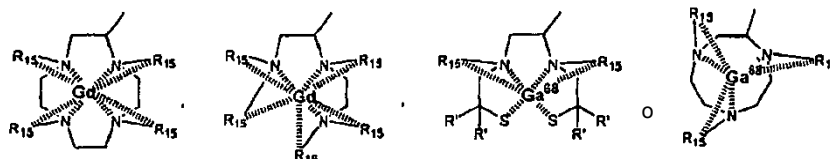
cada R¹⁷-R²⁴ se selecciona independientemente del grupo constituido por H, F, Cl, Br, I, un grupo C₁-C₈ alquilo, (CH₂)_nOR' (en donde n = 1, 2 ó 3), CF₃, CH₂-CH₂X, CH₂-CH₂CH₂X, O-CH₂-CH₂-CH₂X (en donde X = F, Cl, Br o I), CN, (C=O)-R', N(R')₂, NO₂, (C=O)N(R')₂, O(CO)R', OR', SR', COOR', R_{ph}, CR'=CR'-R_{ph} y CR₂'-CR₂'-R_{ph};

en donde al menos uno de los sustituyentes R₁-R₁₀ se selecciona del grupo constituido por ³H, ¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ⁷⁶Br, ⁷⁵Br, CH₂-CH₂-X*, O-CH₂-CH₂-X*, CH₂-CH₂-CH₂X*, O-CH₂-CH₂-CH₂X* (en donde X* = ¹³¹I, ¹²³I, ⁷⁶Br, ⁷⁵Br o ¹⁸F), ¹⁹F, un sustituyente que contiene carbono seleccionado del grupo constituido por C₁-C₈ alquilo, (CH₂)_nOR', CF₃, CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂X, CH₂-CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂-CH₂X (en donde X=F, Cl, Br o I), CN, (C=O)-R', (C=O)N(R')₂, O(CO)R', COOR', CR'=CR'-R_{ph} y CR₂'-CR₂'-R_{ph} en donde al menos un carbono es ¹¹C, ¹³C o ¹⁴C y un grupo quelante (con grupo metálico quelado) de la forma W-L* o V-W-L*, en donde V se selecciona del grupo constituido por -COO-, -CO-, -CH₂O- y -CH₂NH-; W es -(CH₂)_n donde n = 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; y L* es:



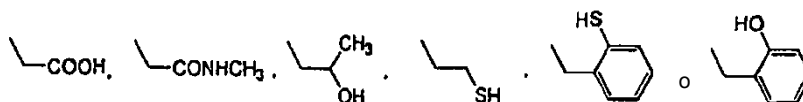
en donde M* es ^{99m}Tc;

o L* es:



y en donde R¹⁵ se selecciona independientemente de lo siguiente:

H,



que tiene al menos uno de los sustituyentes R^3-R^{10} seleccionados del grupo constituido por ^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{76}Br , ^{75}Br , ^{18}F y ^{19}F , que comprende el paso de marcar un compuesto como se ha definido arriba en el cual al menos uno de los sustituyentes R^3-R^{10} es un trialkil-estaño, por reacción del compuesto con una sustancia que contiene ^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{76}Br , ^{75}Br , ^{18}F o ^{19}F .

En una realización adicional, la invención se refiere a un método in vivo para detectar depósitos de amiloide en un individuo, que comprende los pasos de: (a) administrar una cantidad detectable de una composición farmacéutica que comprende (a) un compuesto fijador de amiloide como se ha preparado arriba o una sal no tóxica soluble en agua del mismo, y (b) un portador farmacéuticamente aceptable, y

(b) detectar la fijación del compuesto al depósito amiloide en el individuo.

En un aspecto preferido de esta realización, el depósito de amiloide está localizado en el cerebro del individuo. En un aspecto particularmente preferido de esta realización, el individuo es sospechoso de padecer una enfermedad o síndrome seleccionado del grupo constituido por Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Alzheimer familiar, Síndrome de Down y homocigosis para el alelo de la apolipoproteína E4. En otro aspecto particularmente preferido de esta realización, la detección se selecciona del grupo constituido por producción de imágenes gamma, producción de imágenes de resonancia magnética y espectroscopia de resonancia magnética. En un aspecto preferido de esta realización, la producción de imágenes gamma es PET o SPECT. En otro aspecto preferido de esta realización, la composición farmacéutica se administra por inyección intravenosa. En otro aspecto preferido de la realización, la ratio de (i) fijación del compuesto a un área cerebral distinta del cerebelo a (ii) fijación del compuesto al cerebelo, en un individuo, se compara con la ratio en un individuo normal.

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

Una realización adicional se refiere a un método de cuantificación de la cantidad de amiloide en tejido de biopsia o tejido post-mortem que comprende los pasos de: a) incubar un derivado radiomarcado de un compuesto fijador de amiloide como se ha preparado arriba con un homogeneizado de biopsia o tejido post-mortem, b) separar el derivado radiomarcado fijado al tejido del derivado radiomarcado no fijado al tejido de un compuesto fijador de amiloide de la presente invención, c) cuantificar el derivado radiomarcado fijado al tejido de un compuesto fijador de amiloide de la presente invención, y d) convertir las unidades de derivado radiomarcado fijado al tejido de un compuesto fijador de amiloide de la presente invención en unidades de microgramos de amiloide por 100 mg de tejido por comparación con un estándar.

Otra realización se refiere a un método de diferenciación de un cerebro con enfermedad de Alzheimer de un cerebro normal que comprende los pasos de: a) incubar tejido de (i) el cerebelo y (ii) otra área del mismo cerebro distinta del cerebelo, procedente de individuos normales y de individuos que se sospecha padecen enfermedad de Alzheimer con un compuesto fijador de amiloide como se ha preparado arriba de tal modo que el amiloide contenido en el tejido se fija al derivado radiomarcado de un compuesto fijador de amiloide de la presente invención; b) cuantificar la cantidad de amiloide fijada al derivado radiomarcado de un compuesto fijador de amiloide de la presente invención de acuerdo con el método arriba citado; c) calcular la ratio de la cantidad de amiloide en el área del cerebro distinta del cerebelo a la cantidad de amiloide en el cerebelo; d) comparar la ratio para la cantidad de amiloide en el tejido de individuos normales con la ratio para la cantidad de amiloide en el tejido de individuos sospechosos de padecer la enfermedad de Alzheimer; y e) determinar la presencia de enfermedad de Alzheimer si la ratio del cerebro de un individuo sospechoso de padecer enfermedad de Alzheimer es superior a 90% de las ratios obtenidas de los cerebros de individuos normales.

Otras realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la memoria descriptiva y la práctica de esta invención aquí descrita. Se pretende que la memoria descriptiva se considere como simplemente ilustrativa, estando indicado el verdadero alcance de la invención por las reivindicaciones siguientes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- La Figura 1 muestra las estructuras de una Tioflavina S y Tioflavina T;
 La Figura 2 muestra las estructuras de dos derivados de tioflavina de acuerdo con la invención;
 La Figura 3 muestra cuatro secciones seriadas del córtex frontal de cerebro con tinción fluorescente de un paciente de AD;
 La Figura 4 muestra sitios propuestos de fijación de Crisamina G y Tioflavina T en fibrillas de hojas beta;
 La Figura 5 muestra un ensayo de competición utilizando Crisamina G, Tioflavina S y Tioflavina T, y derivados de la presente invención (BTA-0, BTA-1 y BTA-2);
 La Figura 6 muestra la radiactividad a lo largo del tiempo en el córtex cerebral de babuinos inyectados con BTA-1, 6-Meo-BTA-1 y 6-Me-BTA-1 marcados; y
 La Figura 7 muestra una imagen de tomografía transversal por emisión de positrones de dos niveles de cerebro de babuino después de inyección i.v. de [N-metil-¹¹C]BTA-1.
 La Figura 8 muestra secciones tejido post-mortem de cerebro humano y cerebro de ratón transgénico teñidos con un derivado de la presente invención (BTA-1).
 La Figura 9 muestra la marcación in vivo de placas de amiloide y amiloide vascular teñidos con un derivado de la presente invención (BTA-1) en ratones transgénicos vivos cuyas imágenes se han obtenido por microscopía multifotónica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

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

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

Como se utiliza en esta memoria para describir los derivados de tioflavina, "alquilo inferior" es una cadena C₁-C₈ ramificada o lineal, preferiblemente C₁-C₆ y muy preferiblemente C₁-C₄ (v.g., metilo, etilo, propilo o butilo). Cuando R¹-R¹⁴ se define como "trialquil-estaño", el resto es un resto tri-C₁-C₈ alquil-Sn, preferiblemente un resto tri-C₁-C₆ alquil-Sn, y muy preferiblemente un resto tri-C₁-C₄ alquil-Sn (v.g., metilo, etilo, propilo o butilo).

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

La invención emplea sondas de amiloide que, en asociación con técnicas no invasivas de producción de neuroimágenes tales como espectroscopia de resonancia magnética (MRS) o de producción de imágenes (MRI), o producción de imágenes gamma tales como la tomografía por emisión de positrones (PET) o la tomografía computarizada por emisión de fotones simples (SPECT), se utilizan para cuantificar la deposición de amiloide *in vivo*. El término "producción de imágenes *in vivo*" hace referencia a cualquier método que permita la detección de un derivado marcado de tioflavina que se selecciona de las estructuras A-E o F-J, como se ha descrito arriba. Para producción de imágenes gamma, la radiación emitida por el órgano o área que se examina se mide y se expresa sea como la fijación total o como una ratio en la cual la fijación total en un tejido se normaliza para (por ejemplo se divide por) la fijación total en otro tejido del mismo individuo durante el mismo procedimiento de producción de imágenes *in vivo*. La producción de imágenes totales *in vivo* se define como la señal completa detectada en un tejido por una técnica de producción de imágenes *in vivo* sin necesidad de corrección por una segunda inyección de una cantidad idéntica de compuesto marcado junto con un gran exceso de compuesto sin marcar, pero por lo demás químicamente idéntico. Un "individuo" es un mamífero, preferiblemente un humano, y muy preferiblemente un humano que se sospecha padece demencia.

Para propósitos de producción de imágenes *in vivo*, el tipo de instrumento de detección disponible es un factor principal en la selección de un marcador dado. Por ejemplo, isótopos radiactivos y ¹⁹F son particularmente adecuados para producción de imágenes *in vivo* en los métodos de la presente invención. El tipo de instrumento utilizado guiará la selección del radionucleido o isótopo estable. Por ejemplo, el radionucleido seleccionado debe tener un tipo de desintegración detectable por un tipo de instrumento dado. Otra consideración hace referencia a la semivida del radionucleido. La semivida debe ser suficientemente larga a fin de que sea todavía detectable en el

momento de absorción máxima por la diana, pero lo suficientemente corta a fin de que el hospedador no sufra una radiación deletérea. Los compuestos radiomarcados de la invención pueden detectarse utilizando producción de imágenes gamma en la que se detecta irradiación gamma emitida de la longitud de onda apropiada. Métodos de producción de imágenes gamma incluyen, pero sin carácter limitante, SPECT y PET. Preferiblemente, para la detección SPECT, el radiomarcador seleccionado carecerá de emisión particulada, pero producirá un gran número de fotones en un intervalo de 140-200 keV. Para la detección PET, el radiomarcador será un radionucleido emisor de positrones tal como ^{19}F , que se destruirá para formar dos rayos gamma de 511 keV que serán detectados por la cámara PET.

En la presente invención, se producen compuestos/sondas fijadores de amiloide que son útiles para producción de imágenes *in vivo* y cuantificación de la deposición de amiloide. Estos compuestos tienen que utilizarse en asociación con técnicas no invasivas de producción de neuroimágenes tales como la espectroscopia de resonancia magnética MRS o de producción de imágenes (MRI), la tomografía por emisión de positrones (PET), y la tomografía computarizada por emisión de fotones simples (SPECT). De acuerdo con esta invención, los derivados de tioflavina pueden marcarse con ^{19}F o ^{13}C para MRS/MRI por métodos generales de química orgánica conocidos en la técnica. Véase, v.g., March, J. ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY: REACTIONS, MECHANISMS, AND STRUCTURE (3ª edición, 1985). Los derivados de tioflavina pueden radiomarcarse también con ^{18}F , ^{11}C , ^{75}Br , o ^{76}Br para PET por métodos bien conocidos en la técnica y han sido descritos por Fowler, J. y Wolf, A. in POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY AND AUTORADIOGRAPHY (Phelps, M., Mazziota, J., y Schelbert, H. eds.) 391-450 (Raven Press, NY 1986). Los derivados de tioflavina pueden radiomarcarse también con ^{123}I para SPECT por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véase, v.g., Kulkarni, Int. J. Rad. Appl. & Inst. (Parte B) 18:647 (1991). Adicionalmente, los derivados de tioflavina pueden marcarse con cualquier isótopo adecuado de yodo radiactivo tal como, pero sin carácter limitante, ^{131}I , ^{125}I , o ^{123}I , por yodación de un aminoderivado diazotado directamente por un yoduro de diazonio, véase Greenbaum, F. Am. J. Pharm. 108:17 (1976), o por conversión de la amina diazotada inestable en el triazeno estable, o por conversión de un precursor halogenado no radiactivo en un derivado estable de triaquil-estaño que puede convertirse luego en el compuesto yodado por varios métodos bien conocidos en la técnica. Véase Satyamurthy y Barrio J. Org. Chem. 48: 4394 (1983), Goodman et al., J. Org. Chem. 49: 2322 (1984), y Mathis et al., J. Label. Comp. y Radiopharm. 1994: 905; Chumpradit et al., J. Med. Chem. 34: 877 (1991); Zhuang et al., J. Med. Chem. 37: 1406 (1994); Chumpradit et al., J. Med. Chem. 37: 4245 (1994). Por ejemplo, un triazeno o derivado de triaquil-estaño estable de tioflavina o sus análogos se hace reaccionar con un agente de halogenación que contiene ^{131}I , ^{126}I , ^{123}I , ^{76}Br , ^{75}Br , ^{18}F o ^{19}F . Así pues, los derivados estables de tioflavina con triaquil-estaño y sus análogos son nuevos precursores útiles para la síntesis de muchos de los compuestos radiomarcados en la presente invención.

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

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

Radioisótopos adecuados para propósitos de esta invención incluyen emisores beta, emisores gamma, emisores de positrones, y emisores de rayos X. Estos radioisótopos incluyen ^{131}I , ^{123}I , ^{18}F , ^{11}C , ^{75}Br , y ^{76}Br . Isótopos estables adecuados para uso en Producción de Imágenes de Resonancia Magnética (MRI) o Espectroscopia (MRS), de acuerdo con esta invención, incluyen ^{19}F y ^{13}C . Radioisótopos adecuados para cuantificación *in vitro* de amiloide en homogeneizados de biopsia o tejido post-mortem incluyen ^{125}I , ^{14}C , y ^3H . los radiomarcadores preferidos son ^{11}C o ^{18}F para uso en la producción de imágenes PET *in vivo*, ^{123}I para uso en producción de imágenes SPECT, ^{19}F para MRS/MRI, y ^3H o ^{14}C para estudios *in vitro*. Sin embargo, cualquier método convencional para visualización de sondas de diagnóstico puede utilizarse de acuerdo con esta invención.

El método puede utilizarse para diagnosticar AD en casos moderados o clínicamente confusos. Esta técnica podría permitir también estudios longitudinales de deposición de amiloide en poblaciones humanas de alto riesgo para deposición de amiloide tales como el síndrome de Down, la AD familiar, y homocigosis para el alelo de la apolipoproteína E4. Corder et al., Science 261:921 (1993). Un método que permite seguir la secuencia temporal de la deposición de amiloide puede determinar si la deposición ocurre mucho antes de iniciarse la demencia o si la deposición no está relacionada con la demencia. Este método puede utilizarse para monitorizar la eficacia de las terapias dirigidas a prevenir la deposición de amiloide.

Generalmente, la dosis del derivado de tioflavina marcado detectablemente variará dependiendo de consideraciones tales como edad, condición, sexo, y alcance de la enfermedad en el paciente, contraindicaciones, en su caso, terapias concomitantes y otras variables, a ajustar por un médico experto en la técnica. La dosificación puede variar desde 0,001 µg/kg a 10 µg/kg, preferiblemente 0,01 µg/kg a 1,0 µg/kg.

- 5 La administración al individuo puede ser local o sistémica, y realizarse por vía intravenosa, intraarterial, intratecal (por la vía del líquido cefalorraquídeo), o análoga. La administración puede ser también intradérmica o intracavitaria, dependiendo del sitio del cuerpo a examinar. Después que ha transcurrido un tiempo suficiente para que el compuesto se fije al amiloide, por ejemplo 30 minutos a 48 horas, se examina el área del individuo a investigar por técnicas rutinarias de producción de imágenes tales como MRS/MRI, SPECT, producción de imágenes de centelleo
10 planas, PET, así como por cualesquiera técnicas nuevas de producción de imágenes,. El protocolo exacto variará necesariamente dependiendo de los factores específicos del paciente, como se ha indicado arriba, y dependiendo del sitio corporal a examinar, el método de administración y el tipo de marcador utilizado; la determinación de procedimientos específicos sería rutinaria para el técnico experto. Para producción de imágenes cerebrales, preferiblemente, la cantidad (fijación total o específica) del derivado de tioflavina fijado marcado radiactivamente o
15 análogo de la presente invención se mide y se compara (como una ratio) con la cantidad del derivado de tioflavina marcado fijada al cerebelo del paciente. Esta ratio se compara luego con la misma ratio en un cerebro normal de edad coincidente.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran ventajosamente en forma de composiciones inyectables, pero pueden formularse también en sistemas bien conocidos de suministro de fármacos
20 (v.g., por vía oral, rectal, parenteral (intravenosa, intramuscular, o subcutánea), intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, local, (polvos, ungüentos o gotas), o como un spray bucal o nasal). Una composición típica para dicho propósito comprende un portador farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la composición puede contener aproximadamente 10 mg de seroalbúmina humana y desde aproximadamente 0,5 a 500 microgramos del derivado de tioflavina marcado por mililitro de tampón de fosfato que contenga NaCl. Otros portadores farmacéuticamente
25 aceptables incluyen soluciones acuosas, excipientes no tóxicos, con inclusión de sales, conservantes, tampones y análogos, como se describe, por ejemplo, en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, edición 15ª, Easton: Mack Publishing Co. pp. 1405-1412 y 1461-1487 (1975) y THE NATIONAL FORMULARY XIV., edición 14ª, Washington: American Pharmaceutical Association (1975).

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

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

De acuerdo con la presente invención, una composición farmacéutica que comprende compuestos de tioflavina
40 fijadores de amiloide, se administra a individuos en los cuales se prevé la formación de amiloide o fibrillas de amiloide. En la realización preferida, dicho individuo es un humano e incluye, por ejemplo, aquéllos que se encuentran en riesgo de desarrollar amiloide cerebral, con inclusión de la población de edad avanzada no demente y pacientes que sufren enfermedades asociadas con amiloidosis y diabetes mellitus Tipo 2. El término "prevención" tiene por objeto incluir la mejora de la degeneración celular y la toxicidad asociadas con formación de fibrillas. Por
45 "mejora" se entiende el tratamiento o la prevención de formas más graves de degeneración celular y toxicidad en pacientes que ya manifiestan signos de toxicidad, tales como demencia.

La composición farmacéutica comprende compuestos de tioflavina fijadores de amiloide arriba descritos y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, dicha composición farmacéutica comprende seroalbúmina, compuestos de tioflavina fijadores de amiloide y un tampón de fosfato que contiene NaCl. Otros
50 portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas, excipientes no tóxicos, que incluyen sales, conservantes, tampones y análogos, como se describen, por ejemplo, en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, edición 15ª, Easton: Mack Publishing Co., pp. 1405-1412 y 1461-1487 (1975) y THE NATIONAL FORMULARY XIV., edición 14ª, Washington: American Pharmaceutical Association (1975), y en la UNITED STATES PHARMACOPEIA XVIII. edición 18ª, Washington: American Pharmaceutical Association (1995), cuyos contenidos se
55 incorporan por la presente por referencia.

Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal y ésteres orgánicos inyectables
60 tales como oleato de etilo. Portadores acuosos incluyen agua, soluciones alcohólico-acuosas, soluciones salinas, vehículos parenterales tales como cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, etc. Vehículos intravenosos incluyen restablecedores fluidos y nutrientes. Los conservantes incluyen antimicrobianos, anti-oxidantes, agentes quelantes y gases inertes. El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición farmacéutica se

ajustan de acuerdo con experiencia en la rutina en la técnica. Véase, Goodman y Gilman's THE PHARMACOLOGICAL BASIS FOR THERAPEUTIC (7ª edición).

De acuerdo con la invención, la composición farmacéutica de inventiva podría administrarse por vía oral, en la forma de un líquido o sólido, o inyectarse por vía intravenosa o intramuscular, en la forma de una suspensión o solución.

5 Por el término "cantidad farmacéuticamente eficaz" se entiende una cantidad que evita la degeneración celular y la toxicidad asociada con la formación de fibrillas. Dicha cantidad variaría necesariamente dependiendo de la edad, el peso y la condición del paciente y sería ajustada por quienes poseen una experiencia ordinaria en la técnica de acuerdo con protocolos bien conocidos. En una realización, una dosificación podría estar comprendida entre 0,1 y 100 mg/kg por día, o dividida en dosis más pequeñas a administrar de 2 a 4 veces por día. Un régimen de este tipo

10 podría continuarse sobre una base diaria durante la vida del paciente. Alternativamente, la composición farmacéutica podría administrarse por vía intramuscular en dosis de 0,1 a 100 mg/kg cada 1 a 6 semanas.

De acuerdo con el aspecto de la invención descrito arriba que se refiere a un método de detección de depósitos de amiloide en tejido de biopsia o tejido post-mortem, el método implica la incubación de tejido fijado en formalina con una solución de un compuesto de tioflavina fijador de amiloide como se ha preparado arriba. Preferiblemente, la

15 solución es 25-100% etanol (siendo el resto agua), saturado con un compuesto de tioflavina fijador de amiloide de acuerdo con la invención. Después de la incubación, el compuesto tiñe o marca el depósito de amiloide en el tejido, y el depósito teñido o marcado puede ser detectado o visualizado por cualquier método estándar. Tales medios de detección incluyen técnicas microscópicas tales como microscopía de campo brillante, de fluorescencia, láser-confocal y de polarización cruzada.

El método de cuantificación de la cantidad de amiloide en tejido de biopsia o tejido post-mortem implica incubar un derivado marcado de tioflavina de acuerdo con la presente invención, o una sal no tóxica soluble en agua del mismo, con un homogeneizado de tejido de biopsia o tejido post-mortem. El tejido se obtiene y se homogeneiza por métodos bien conocidos en la técnica. El marcador preferido es un radiomarcador, aunque otros marcadores tales como enzimas, compuestos quimioluminiscentes y compuestos inmunofluorescentes son bien conocidos por los

20 técnicos experimentados. El radiomarcador preferido es ^{125}I , ^{14}C o ^3H , y el sustituyente preferido del marcador de un compuesto fijador de amiloide es al menos uno de $\text{R}^3\text{-R}^{10}$. El tejido que contiene depósitos de amiloide se fijará a los derivados marcados de los compuestos de tioflavina fijadores de amiloide de la presente invención. El tejido fijado se separa luego del tejido no fijado por cualquier mecanismo conocido por el técnico experimentado, tal como filtración. El tejido fijado puede cuantificarse luego por cualesquiera medios conocidos por el técnico experimentado. Las unidades de derivado de tioflavina radiomarcado fijado al tejido se convierten luego en unidades de microgramos de amiloide por 100 mg de tejido por comparación con una curva estándar generada por incubación de cantidades conocidas de amiloide con el derivado de tioflavina radiomarcado.

25

30

El método de diferenciación de un cerebro enfermo de Alzheimer de un cerebro normal implica la obtención de tejido de (i) el cerebelo y (ii) otra área del mismo cerebro, distinta del cerebelo, de individuos normales y de individuos sospechosos de padecer la enfermedad de Alzheimer. Tales tejidos se preparan en homogeneizados separados utilizando métodos bien conocidos por el profesional experimentado, y se incuban luego con un compuesto de tioflavina radiomarcado fijador de amiloide. La cantidad de tejido que se fija al compuesto de tioflavina radiomarcado fijador de amiloide se calcula luego para cada tipo de tejido (v.g. cerebelo, no-cerebelo, normal, anormal) y se calcula la ratio para la fijación de tejido de no-cerebelo a tejido de cerebelo para el tejido de individuos normales y para el tejido de pacientes sospechosos de padecer enfermedad de Alzheimer. Estas ratios se comparan luego. Si la ratio del cerebro sospechoso de padecer enfermedad de Alzheimer es superior al 90% de las ratios obtenidas de cerebros normales, se hace el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer. Las ratios normales pueden obtenerse a partir de datos obtenidos previamente, o alternativamente, pueden recalcularse al mismo tiempo que se estudia el tejido cerebral sospechoso.

35

40

45 **Modelización Molecular**

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

50

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

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

55

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

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

Preparación de Derivados de Tioflavina para Tinción Tisular

- 5 Se utilizaron como farmacóforos tioflavina S (ThS) y tioflavina T (ThT) (véase, v.g., Fig. 1). Debe indicarse que ambos compuestos contienen aminas cuaternarias y son, por tanto, sumamente hidrófilos como consecuencia.

Se sintetizó [C-14]ThT y se utilizó para determinar el carácter lipófilo relativo por reparto entre octanol y solución salina tamponada con fosfato. Se encontró que el log del coeficiente de reparto, $\log P_{\text{oct}}$, era 0,57 para [C-14]ThT. Se determinó que la amina cuaternaria hace que ThT sea excesivamente polar para uso como agente eficaz de producción de imágenes del cerebro. Basándose en los resultados de derivados lipófilos de rojo Congo (fenoles sin carga al pH fisiológico, pero potencialmente ionizables con un pK_a de $\sim 8,5$) (Klunk et al. WO09847969A1, WO09847969A1, WO09924394A2), los inventores retiraron el grupo metilo del nitrógeno de benzotiazol para los derivados de ThT. La retirada del grupo metilo eliminó la amina cuaternaria cargada de la porción heterocíclica de la molécula, dejando una amina aromática que tiene típicamente valores $pK_b \sim 5,5$. Se utiliza nomenclatura abreviada para los derivados de ThT en la cual la cadena principal básica se designa BTA (para **B**enzo-**T**iazol-**A**nilina). Los sustituyentes en el anillo de benzotiazol se colocan antes de la 'B' y el número de grupos metilo en el nitrógeno de la anilina se coloca después de la 'A' (véase, v.g., Fig. 2).

i. Tinción Tisular Preliminar con ThT y derivados

ThT (véase, v.g., Fig. 1) es un colorante fluorescente que ha sido utilizado como tinte histológico para amiloide (Burns et al., "The specificity of the staining of amyloid deposits with thioflavine T" Journal of Pathology & Bacteriology 94:337-344;1967.). ThT tiñe débilmente las placas (véase, v.g., Fig. 3), madejas, hebras de neuropilo y el amiloide cerebrovascular (CVA) en el cerebro AD. La tinción tisular preliminar indica que tanto la amina primaria 2-(4'-aminofenil)-6-metil-benzotiazol (6-Me-BTA-O) como la amina terciaria 2-(4'-dimetilaminofenil)-6-metil-benzotiazol (6-Me-BTA-2) tiñen también las placas y las madejas en el cerebro AD tejido post-mortem (véase, v.g. Fig. 3). Experimentos en los cuales las concentraciones de 6-Me-BTA-O y 6-Me-BTA-2 se redujeron progresivamente indicaban que la tinción tanto por 6-Me-BTA-O como por 6-Me-BTA-1 podría detectarse todavía con soluciones de tinción que contenían únicamente 10 nM del compuesto BTA. En contraste, BTP (2-fenilbenzotiazol) no parece teñir las placas; sin embargo, este compuesto no es ni con mucho tan fluorescente como los derivados de BTA. Así pues, en el desarrollo de estos compuestos, la tinción tisular ha servido para el propósito dual de evaluar la especificidad de tinción en el tejido cerebral AD como para evaluar la afinidad de fijación por cribado de las soluciones de tinción a lo largo de una gama de concentraciones similares a la empleada en los ensayos de fijación.

ii. Modelos de Fijación de Derivados de Rojo Congo y ThT a A β

Existen algunas teorías acerca del mecanismo de fijación de ThT al amiloide β , pero ninguna teoría específica ha sido demostrada o aceptada. Sin embargo, el mecanismo parece ser específico y saturable (LeVine, "Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T" Meth. Enzymol. 309:272-284;1999). Por tanto, sería posible localizar el o los sitios potenciales de fijación en A β y desarrollar un modelo de fijación de una manera análoga a la utilizada para desarrollar el modelo de fijación del rojo Congo (CR)/Crisamina-G (CG) (Klunk et al., "Developments of small molecule probes for the beta-amyloid protein of Alzheimer's disease" Neurobiol. Aging 15:691-698;1994.), basado en las propiedades estructurales y de fijación siguientes. En primer lugar, ThT y CG tienen cargas opuestas al pH fisiológico, y es improbable que compartan un sitio de fijación común. Esto está respaldado por la falta de competición de ThT para la fijación de [3 H]CG a las fibrillas A β (véase, v.g., Fig. 5).

Estudios estructurales previos de fibrillas A β (Hilbich et al., "Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid beta A4 peptides of Alzheimer's disease" Journal of Molecular Biology 218:149-63;1991.) y la fijación de CR y CG a

fibrillas A β sugerían un modelo molecular en el cual CG se fija por una combinación de interacción electrostática e hidrófoba al área de Lys-16 (véase, v.g., Fig. 4). Los estudios de LeVine (LeVine *ibid*) ayudan a localizar el sitio de fijación de ThT a A β demostrando que ThT se fija satisfactoriamente a A β 12-28, pero en grado insignificante a A β 25-35. Esto sugiere que el sitio de fijación de ThT se encuentra en algún lugar entre los residuos 12 y 24 de A β . Es probable que la ThT (una amina cuaternaria) cargada positivamente sea atraída a los residuos cargados negativamente (ácidos) en A β . Entre los aminoácidos 12 y 24, los únicos residuos ácidos son Glu-22 y Asp-23. Si bien éstos son candidatos ambos, el modelo existente predice que Glu-22 está implicado muy cerca del sitio de fijación Lys-16 para CG. El modelo actual "de trabajo" localiza la fijación de ThT al área de Asp-23 - en el lado opuesto de la fibrilla respecto al sitio CG propuesto. Dado que la característica fundamental de la fijación de ThT (y CG) es la presencia de una fibrilla de hoja beta, la fijación tiene que requerir más que simplemente un solo residuo de aminoácido. El sitio de fijación existe cuando residuos que no interactúan normalmente en los monómeros se ponen juntos en la fibrilla de la hoja beta. Por tanto, sin ligarse a teoría alguna, se cree que ThT interactúa también por la vía de enlaces hidrógeno a His-13 y Gln-15 de una molécula A β separada adyacente que comprende la fibrilla de hoja beta.

15 iii. Radiomarcación de ThT y Ensayos de Fijación de Radioligandos

La evaluación de la fijación por tinción tisular es útil, particularmente para evaluación de la especificidad. El compuesto BTP, que no es muy fluorescente, puede no mostrar tinción sea debido a que no se fija suficientemente bien, o porque no es suficientemente fluorescente. Además de la tinción tisular de AD, pueden realizarse espectrofotométricamente ensayos de fijación cuantitativos (LeVine *ibid*). Este ensayo depende del desplazamiento metacromático espectral que ocurre cuando ThT se fija a la fibrilla de amiloide. Si bien este ensayo puede ser útil para cribado individual de compuestos altamente fluorescentes que exhiben este desplazamiento metacromático, no se ha determinado que el mismo sea útil para ensayos de competición. Por ejemplo, se observa comúnmente que los compuestos de test (v.g., CG) extinguen la fluorescencia del complejo ThT-A β (así como la de ThT sola). Los compuestos que extinguen, pero no se fijan al sitio ThT, parecerán fijarse falsamente. Por tanto, es preferible utilizar ThT radiomarcada en ensayos típicos de fijación de radioligandos con A β agregado. En este ensayo, la inhibición de la fijación de ThT radiomarcada a A β atrapado en los filtros podría representar una inhibición verdadera de la fijación de ThT y no requiere que el compuesto de test sea fuertemente fluorescente.

Los ejemplos siguientes se dan para ilustrar la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que la invención no debe considerarse limitada a las condiciones o detalles específicos descritos en estos ejemplos.

30 Los ejemplos 1, 2 y 5 no forman parte de la invención reivindicada.

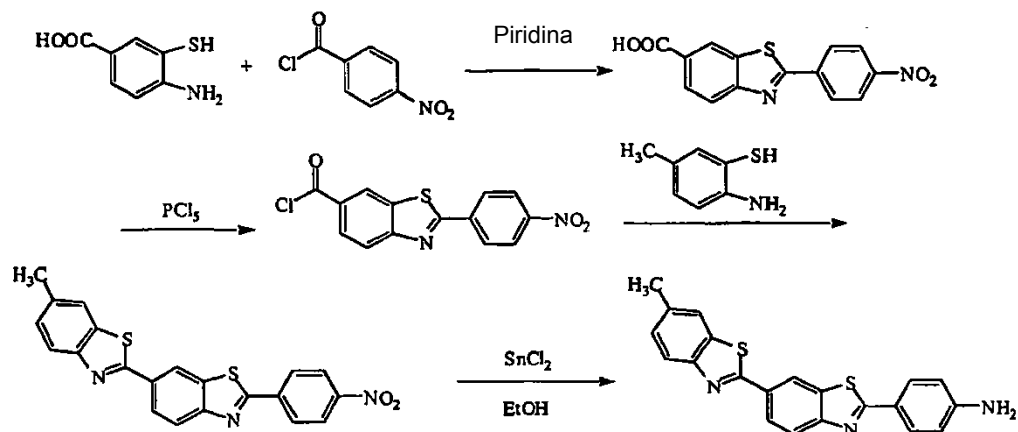
EJEMPLOS

Todos los reactivos utilizados en la síntesis se adquirieron de Aldrich Chemical Company y se utilizaron sin purificación ulterior. Los puntos de fusión se determinaron en Mel-TEMP II y no se corrigieron. Los espectros ^1H NMR de todos los compuestos se midieron en Bruker 300 utilizando TMS como referencia interna y estaban de acuerdo con las estructuras asignadas. La TLC se realizó utilizando Gel de Sílice 60 F $_{254}$ de EM Sciences y se detectó bajo una lámpara UV. La cromatografía flash se realizó en gel de sílice 60 (mallas 230-400) adquirido de Mallinckrodt Company. La TLC de fase inversa se adquirió de Whiteman Company.

Ejemplos de Síntesis

Ejemplo 1: Síntesis de derivados básicos de primulina :

40 Ruta 1: Un ejemplo de la síntesis de compuestos de primulina es según el esquema de reacción que se muestra a continuación:

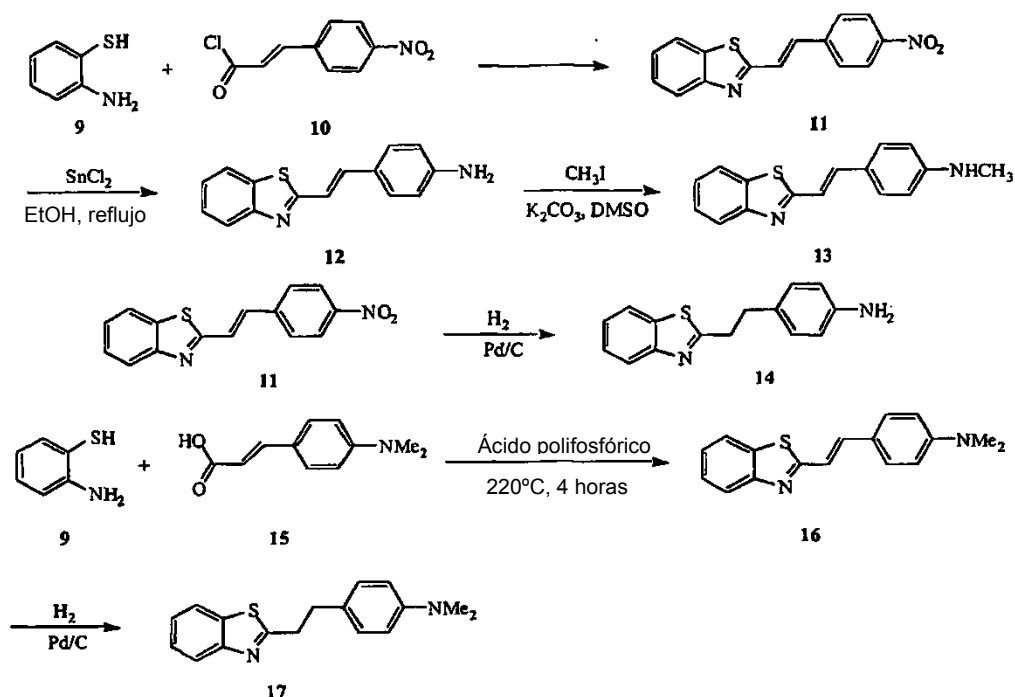


Los derivados de primulina se preparan basándose en el método de Schubert (Schubert, M. Zur Kenntnis der Dehydrothiolutolidin- und Primulin-sulfosäuren, Justus Liebigs Ann. Chem. 558, 10-33, 1947) por condensación de 2-amino-5-metil-tiofenol con cloruro 2-(p-nitrofenil)-benzotiazol-6-carboxílico y reducción subsiguiente del grupo nitro con cloruro de estaño en etanol. Los derivados básicos de primulina sustituidos se sintetizan con los cloruros de p-nitrobenzoílo sustituidos apropiados y 2-aminotiofenol sustituido en R⁷-R¹⁰.

Siguiendo la misma estrategia arriba indicada, los otros derivados de primulina reivindicados pueden sintetizarse empleando en su lugar el derivado de ácido 3-mercapto-4-aminobenzoico sustituido apropiado (v.g. ácido 2-, 5-, o 6-metil-3-mercapto-4-aminobenzoico), el derivado de cloruro de 4-nitro-benzoílo apropiado (v.g. cloruro de 2- o 3-metil-4-nitro-benzoílo) o el derivado de 2-amino-5-metil-tiofenol apropiado (v.g. 3,5-, 4,5-, o 5,6-dimetil-2-aminotiofenol).

10 Ejemplo 2: Síntesis de derivados de 2-[2-(4'-aminofenil)-etilenil]-benzotiazol

Ruta 3: Un ejemplo de la síntesis de BTEA-0, 1, 2 y BTAA-0, 1, 2, que son representativos del grupo de compuestos BTEA y BTAA fue según el esquema de reacción que se muestra a continuación:



(a) *Trans*-2-(4-Nitrofeniletetil)benzotiazol (11)

15 Se añadió gota a gota cloruro de *trans*-4-nitrocinnamilo **10** (1,77 g, 9,5 mmoles, 1,2 eq) en DMF (20 ml) a una solución de 2-aminotiofenol **9** (1,0 g, 8,0 mmoles) en DMF (15 ml) a la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se vertió en una solución de carbonato de sodio al 10% (100 ml). El precipitado se recogió por filtración a presión reducida. La recristalización en metanol dio 1,92 g (85,1%) del producto **11**.

20 (b) 2-(4-Aminofeniletetil)benzotiazol (12)

Una mezcla de 2-(4-nitrofeniletetil)benzotiazol **11** (500 mg, 1,7 mmoles) y cloruro de estaño(II) dihidratado (1,18 g, 5,2 mmoles) en etanol anhidro (20 ml) se calentó a reflujo bajo N₂ durante 4 horas. Se eliminó el etanol por evaporación a vacío. El residuo se disolvió en acetato de etilo (20 ml), se lavó con solución de NaOH (1 N, 3 x 20 ml) y agua (3 x 20 ml), y se secó sobre MgSO₄. La evaporación a sequedad dio 40 mg (8,0%) del producto **12**.

25 (c) 2-(4-Metiliminofeniletetil)benzotiazol (13)

Una mezcla de 2-(4-aminofeniletetil)benzotiazol **12** (7 mg), MeI (3,9 mg) y K₂CO₃ anhidro (100 mg) en DMSO (anhidro, 0,5 ml) se calentó a 100°C durante 16 horas. La mezcla de reacción se purificó por TLC en fase inversa (MeOH:H₂O = 7:1) para dar 2,5 mg (32,7%) del producto **13**.

(D) 2-(4-Aminofeniletileno)benzotiazol (14)

30 Se disolvió 2-(4-nitrofeniletetil)benzotiazol (30 mg, 0,10 mmoles) en MeOH (10 ml). Se añadió Pd/C (10%, 40 mg) y la mezcla de reacción se agitó en atmósfera de H₂ a la temperatura ambiente durante 60 horas. Se filtró el catalizador y se lavó con metanol (aprox. 2 ml). La evaporación del filtrado dio el producto bruto que se purificó por

TLC (hexanos:acetato de etilo = 70:40) para dar 15 mg (50%) del producto. ¹HNMR (300MHz, MeOH-d₄) δ: 7,88(d, J=8,3Hz, 1H, H-7), 7,86(d, J = 8,1 Hz, 1H, H-4), 7,48(dd, J₁ = J₂ = 6,2Hz, 1H, H-5 o H-6), 7,38(dd, J₁ = J₂ = 8,2Hz, 1H, H-5 o H-6), 6,96(d, J = 6,8Hz, 2H, H-2',6'), 6,62(d, J = 6,8Hz, 2H, H-3', 5'), 3,36(t, J = 7,4Hz, 2H, CH₂), 3,03(t, J=7,4Hz, 2H, CH₂).

5 (e) 2-(4-Dimetilaminofeniletetil)benzotiazol (16)

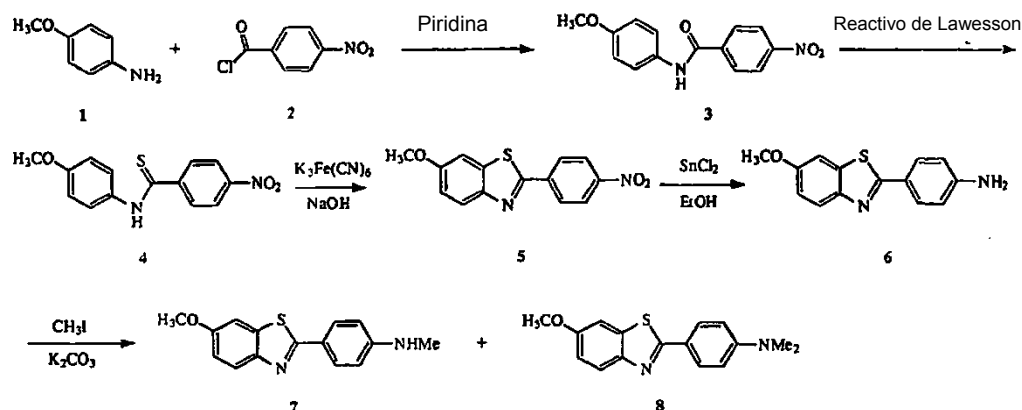
Una mezcla de 2-aminotiofenol **9** (0,51 g, 4,1 mmoles), ácido trans-4-dimetilaminocinámico **14** (0,79 g, 4,1 mmoles) y PPA (10 g) se calentó a 220°C durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfrió a la temperatura ambiente y se vertió en 10% en solución de carbonato de potasio (~ 400 ml). El residuo se recogió por filtración a presión reducida. La purificación en columna flash (hexanos:acetato de etilo = 2:1) dio 560 mg (48,7%) del producto **15** como un sólido amarillo.

10 (f) 2-(4-Dimetilaminofeniletieno)benzotiazol (17)

Se disolvió 2-(4-dimetilaminofeniletetil)benzotiazol (12 mg, 0,038 mmoles) se disolvió en MeOH (5 ml). Se añadió Pd/C (10%, 20 mg) y la mezcla de reacción se agitó en atmósfera de H₂ a la temperatura ambiente durante 16 horas. Se filtró el catalizador y se lavó con metanol (aprox. 1 ml). La evaporación del filtrado dio 7 mg (58%) del producto. ¹HNMR (300MHz, acetona-d₆) δ: 7,97(d, J = 8,3Hz, 1H, H-7), 7,93(d, J = 8,1Hz, 1H, H-4), 7,48(dt, J = 6,2Hz, J = 1,1Hz, 1H, H-5 o H-6), 7,38(dt, J = 8,2Hz, J = 1,1Hz, 1H, H-5 o H-6), 7,13(d, J = 6,8Hz, 2H, H-2',6'), 6,68(d, J = 6,8Hz, 2H, H-3', 5'), 3,37(t, J = 7,4Hz, 2H, CH₂), 3,09(t, J=7,4Hz, 2H, CH₂), 2,88(s, 6H, NMe₂).

Ejemplo 3: Síntesis de derivados de 2-(4'-aminofenil)benzotiazol

Ruta 1: Ejemplo de la síntesis de 6-MeO-BTA-0, -1, -2, que son representativos del grupo de compuestos BTA con sustituyentes R₇-R₁₀ así como R₃-R₆ (Shi et al., "Antitumor Benzothiazoles. 3. Synthesis of 2-(4-Aminophenyl)benzothiazoles and Evaluation of Their Activities against Breast Cancer Cell Lines in Vitro and in Vivo" J. Med. Chem. 39:3375-3384, 1996):



25 (a) 4-Metoxi-4'-nitrobenzanilida (3)

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

30 (b) 4-Metoxi-4'-nitrobenzanilida (4)

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

35 (c) 6-Metoxi-2-(4-nitrofenil)benzotiazol (5)

40 Se humedeció 4-metoxi-4'-nitrobenzanilida **4** (0,5 g, 1,74 mmoles) con un poco de etanol (~ 0,5 ml), y se añadió solución acuosa de hidróxido de sodio al 30% (556 mg, 13,9 mmoles, 8 equiv.). La mezcla se diluyó con agua para

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

(d) 6-Metoxi-2-(4-aminofenil)benzotiazol (**6**)

Una mezcla de 6-metoxi-2-(4-nitrofenil)benzotiazol **5** (22 mg, 0,77 mmoles) y cloruro de estaño(II) dihidratado (132 mg, 0,45 mmoles) en etanol a ebullición se agitó bajo nitrógeno durante 4 horas. Se evaporó el etanol y el residuo se disolvió en acetato de etilo (10 ml), se lavó con hidróxido de sodio 1 n (2 ml) y agua (5 ml), y se secó sobre MgSO₄. La evaporación del disolvente dio 19 mg (97%) del producto **6** como un sólido amarillo.

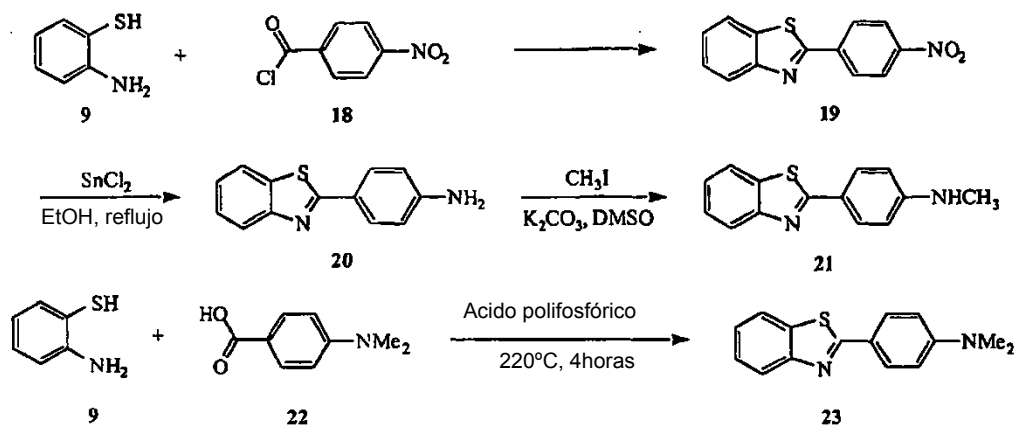
(e) 6-Metoxi-2-(4-metilaminofenil)benzotiazol (**7**) y 6-metoxi-2-(4-dimetilaminofenil)benzotiazol (**8**)

Una mezcla de 6-metoxi-2-(4-aminofenil)benzotiazol **6** (15 mg, 0,059 mmoles), MeI (8,3 mg, 0,060 mmoles) y K₂CO₃ (100 mg, 0,72 mmoles) en DMSO (anhidro, 0,5 ml) se calentó a 100°C durante 16 horas. La mezcla de reacción se purificó por TLC en fase inversa (MeOH:H₂O = 7:1) para dar 2,0 mg (13,3%) de 6-metoxi-2-4-metilaminofenilbenzotiazol **7** y 6 mg (40% de 6-metoxi-2-(4-dimetilaminofenil)benzotiazol **8**. ¹HNMR de **7** (300MHz, acetona-d₆) δ: 7,85(d, J=8,7Hz, 2H, H-2' 6'), 7,75(dd, J = 8,8Hz, J = 1,3Hz, 1H, H-4), 7,49(d, J = 2,4Hz, 1H, H-7), 7,01 (dd, J = 8,8Hz, J = 2,4Hz, H-5), 6,78(d, J = 7,6Hz, 2H, H-3' 5'), 3,84(s, 3H, MeO), 2,91 (s, 3H, NMe), ¹HNMR de **8** (300MHz, acetona-d₆) δ: 7,85(d, J = 8,7Hz, 2H, H-2' 6'), 7,75(dd, J = 8,8Hz, J=1,3Hz, 1 H, H-4), 7,49 (d, J = 2,4Hz, 1H, H-7), 7,01 (dd, J = 8,8Hz, J = 2,4Hz, H-5), 6,78(d, J = 7,6Hz, 2H, H-3' 5'), 3,84(s, 3H, MeO), 3,01 (s, 6H, NMe₂).

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

Ejemplo 4: Síntesis de derivados de BTA sin sustitución R⁷-R¹⁰

25 Ruta 2: Ejemplo de la síntesis de compuestos BTA-0, -1, -2, que son representativos del grupo de compuestos BTA sin R⁷-R¹⁰ (Garmaise et al., "Anthelmintic Quaternary Salts. III. Benzothiazolium Salts" J. Med. Chem. 12: 30-36, 1969):



(a) 2-(4-Nitrofenil)benzotiazol (**19**)

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

(b) 2-(4-Aminofenil)benzotiazol (**20**)

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

(c) 2-(4-Metilaminofenil)benzotiazol (21) y 2-(4-dimetilaminofenil)benzotiazol (23)

Una mezcla de 2-(4-aminofenil)benzotiazol **20** (15 mg, 0,66 mmoles), MeI (9,4 mg, 0,066 mg) y K₂CO₃ (135 mg, 0,81 mmoles) en DMSO (anhidro, 0,5 ml) se calentó a 100°C durante 16 horas. La mezcla de reacción se purificó por TLC en fase inversa (MeOH:H₂O = 6:1) para dar 1,5 mg (10%) de 2-(4-metilaminofenil)benzotiazol **21** y 2,5 mg (16,7%) de 2-(4-dimetilaminofenil)benzotiazol **23**.

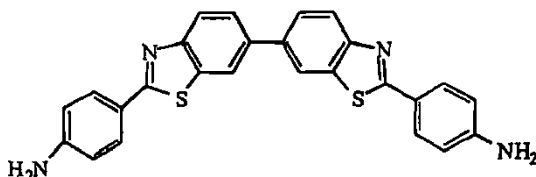
(d) 2-(4-Dimetilaminofenil)benzotiazol (23)

La mezcla de 2-aminotiofenol **9** (0,5 g, 4,0 mmoles), ácido 4-dimetilaminobenzoico **22** (0,66 g, 4,0 mmoles) y PPA (10 g) se calentó a 220°C durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfrió a la temperatura ambiente y se vertió en una solución de carbonato de potasio al 10% (~ 400 ml). El residuo se recogió por filtración a vacío para dar 964 mg del producto **23**, que tenía una pureza aproximada de 90% basada en el análisis ¹H NMR. La recristalización de 100 mg de **23** en MeOH dio 80 mg del producto puro. ¹H NMR(300MHz, acetona-d₆) δ: 7,12(d, J=7,7Hz, 1H, H-7), 7,01 (d, J=9,0Hz, 1H, H-4), 6,98(d, J = 9,1Hz, 2H, H-2',6'), 6,56(t, J = 7,8Hz, J=7,3Hz, 1H, H-5 o H-6), 5,92(d, J=8,9Hz, 1H, H-3',5'), 2,50(s, 6H, NMe₂).

Siguiendo la misma estrategia arriba indicada, pueden sintetizarse los otros derivados reivindicados de 2-(4'-aminofenil)-benzotiazol empleando en su lugar el derivado apropiado de cloruro de 4-nitro-benzoílo (v.g. cloruro de 2- o 3-metil-4-nitro-benzoílo) o el derivado apropiado del ácido 4-dimetilamino-benzoico (v.g. ácido 2- o 3-metil-4-dimetilamino-benzoico).

Ejemplo 5. Síntesis de derivados de bis-2,2'-(4'-aminofenil)-dibenzotiazol

Ruta 1: Siguiendo el procedimiento general para los compuestos 6-MeO-BTA arriba descritos, pero empleando bencidina en lugar de p-anisidina y utilizando 16 equivalentes de cloruro de 4-nitrobenzoílo se obtiene como resultado el compuesto siguiente:



Siguiendo la misma estrategia arriba indicada, pueden sintetizarse los otros derivados bis-2,2'-(4'-aminofenil)-dibenzotiazol por la vía del derivado apropiado de bencidina sustituida (v.g. 2,2'- 3,3'-dimetilbencidina) y el derivado apropiado de cloruro de 4-nitro-benzoílo (v.g. cloruro de 2-, o 3-metil-4-nitro-benzoílo).

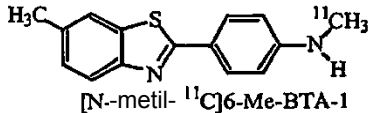
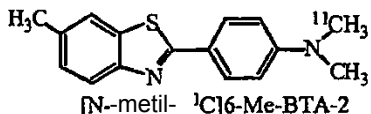
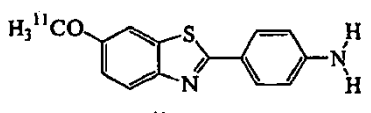
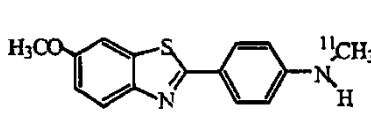
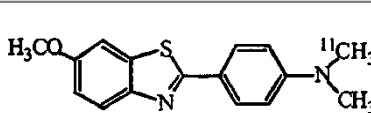
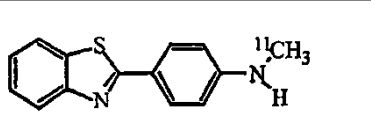
Ruta 2: Los derivados asimétricos de bis-2,2'-(4'-aminofenil)-dibenzotiazol se sintetizan por el acoplamiento de Suzuki catalizado con paladio de los 6-yodo-(2-p-nitrofenil)benzotiazoles sustituidos apropiados, que pueden prepararse siguiendo la misma estrategia que los compuestos 6-MeO-BTA y reducción subsiguiente de los grupos nitro (Ishiyama et al., "Palladium (0)-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Alkoxydiboron with Haloarenes: A Direct Procedure for Arylboronic Esters" Tetrahedron Lett., 38, 3447, 1997).

Ejemplos Biológicos**Ejemplo 6: Determinación de Afinidad para Aβ y Absorción de los Derivados de Tioflavina en el Cerebro**

Se condujeron estudios iniciales de fijación competitiva utilizando [³H]CG y a Aβ(1-40) sintético para determinar si CG, ThS y ThT se fijan al mismo o los mismos sitios. Se ha determinado que ThS competía con [³H]CG para los sitios de fijación en Aβ(1-40), pero ThT no lo hacía (véase, v.g., Fig. 5). Se sintetizó luego [N-metil-(¹¹C)]BTA-1 de actividad específica alta (véase la Tabla 1) por metilación de BTA-0. Se realizaron estudios de fijación con [N-metil-¹¹C]BTA-1 y fibrillas de Aβ(1-40) 200 nM. La fijación específica de [N-metil-¹¹C]BTA-1 era ~ 70%. Fig. 5 (véase el panel de la derecha) muestra curvas de competición para sitios Aβ por ThT, BTA-0, BTA-1 y BTA-2 utilizando el ensayo de fijación de [N-metil-¹¹C]BTA-1. Los valores K_i's eran 3,0 ± 0,8 nM para BTA-2, 9,6 ± 1,8 nM para BTA-1; 100 ± 16 nM para BTA-0; y 1900 ± 510 nM para ThT. No sólo la amina cuaternaria de ThT es innecesaria para la fijación a las fibrillas Aβ, sino que parece reducir también la afinidad de fijación.

En la Tabla 1 siguiente se presentan cinco derivados diferentes de BTA marcados con ¹¹C para los cuales se han determinado las propiedades de fijación *in vitro*, los valores log P, y las propiedades de absorción y retención en el cerebro *in vivo* en los ratones.

Tabla 1. Propiedades in vitro e in vivo de varios derivados de Tioflavina T marcados con ^{11}C prometedores

Estructura del Compuesto BTA Marcado con ^{11}C	K_i (nM) para las fibrillas $\text{A}\beta$	logP	Absorción en el cerebro del Ratón a los 2 min (%ID/g*kg)	Absorción en el cerebro del Ratón a los 30 min (%ID/g*kg)	Ratio de los Valores de Absorción de 2 min/30 min
 [N-metil- ^{11}C]6-Me-BTA-1	21	3.3 (est.)	$0,32 \pm 0,07$	$0,17 \pm 0,05$	1,9
 [N-metil- ^{11}C]6-Me-BTA-2	No testado	3.9 (est.)	$0,15 \pm 0,06$	$0,16 \pm 0,02$	0,9
 6- ^{11}C CH ₃ O-BTA-0	30	1.9 (est.)	$0,60 \pm 0,04$	$0,39 \pm 0,05$	1,5
 [N-metil- ^{11}C]6-MeO-BTA-1	5,7	2,7	$0,43 \pm 0,11$	$0,094 \pm 0,038$	4,6
 [N-metil- ^{11}C]6-MeO-BTA-2	2,3	3,3 (est.)	$0,32 \pm 0,09$	$0,42 \pm 0,10$	0,8
 [N-metil- ^{11}C]BTA-1	9,6	2,7	$0,44 \pm 0,14$	$0,057 \pm 0,010$	7,7

Los datos que se muestran en la Tabla 1 son notables, particularmente para los derivados 6-MeO-BTA-1 marcados con ^{11}C y BTA-1. Estos compuestos exhibían una afinidad relativamente alta para $\text{A}\beta$, con valores $K_i < 10$ nM, y penetraban fácilmente en el cerebro de ratón con valores de absorción $> 0,4\%$ ID/g*kg (o $> 13\%$ ID/g para animales de 30 g). Además, los valores de concentración de radiactividad en el cerebro a los 30 minutos eran menores que $0,1\%$ ID/g*kg, dando como resultado ratios de concentración de 2 min a 30 min > 4 . Los dos compuestos N,N-dimetilados se aclaraban con menor rapidez del tejido cerebral del ratón que los derivados N-metilados. Análogamente, la única amina primaria actualmente testable, 6-MeO-BTA-0, exhibía un aclaramiento pobre del cerebro. Este resultado sorprendente e inesperado respalda el uso específico de la amina secundaria (v.g. $-\text{NHCH}_3$) como agente de producción de imágenes in vivo.

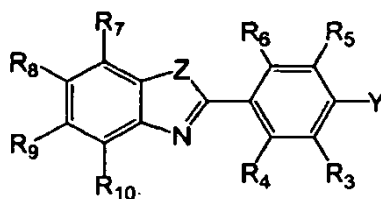
Ejemplo 7: Experimentos de Producción de Imágenes PET in vivo en Babuinos

Se prepararon grandes cantidades de BTA-1, 6-Me-BTA-1, y 6-MeO-BTA-1 marcados con ^{11}C de actividad específica alta (> 2000 Ci/mmol) para estudios de producción de imágenes del cerebro en babuinos anestesiados de 20-30 kg utilizando el tomógrafo Siemens/CTI HR+ en modo de recogida de datos 3D (resolución nominal FWHM 4,5 mm). Se realizaron estudios de producción de imágenes del cerebro después de la inyección intravenosa de 3-5 mCi de radiotrazador. Las curvas típicas tiempo-actividad corregidas por atenuación y desintegración para una región de interés del córtex frontal para cada uno de los tres compuestos se muestran en Fig. 6. Debe observarse que la absorción absoluta en el cerebro de estos 3 compuestos en los babuinos es muy similar a la encontrada en los ratones (es decir, aproximadamente $0,47$ a $0,39\%$ ID/g*kg). Sin embargo, la velocidad normal de aclaramiento del cerebro de los tres radiotrazadores es considerablemente más lenta en los babuinos comparados con los ratones, con ratios de pico-a-60 min comprendidas en el intervalo de 2,4 a 1,6 comparadas con ratios tan altas como 7,7 a los

- 30 min en los ratones. El orden de rango de absorción máxima en el cerebro y velocidad de aclaramiento de los tres compuestos era también el mismo en ratones y babuinos. La absorción de los radiotrazadores en el cerebro no parecía estar limitada por el flujo sanguíneo (Fig. 6, recuadro insertado). Se obtuvieron muestras de sangre arterial en los babuinos después de la inyección de los tres compuestos, y se demostró que sus perfiles metabólicos eran muy similares. Solamente metabolitos altamente polares que se eluían cerca del volumen vacío (4 ml) de la columna HPLC analítica de fase inversa se observaban en el plasma en todos los momentos después de la inyección, mientras que el trazador no metabolizado se eluía aproximadamente a los 20 ml. Las cantidades típicas de inyectado no metabolizado en plasma para los tres compuestos eran aproximadamente: 90% a los 2 min; 35% a los 30 min; y 20% a los 60 min.
- 10 Las imágenes PET transversales para dos niveles de cerebro de babuino después de la inyección i.v. de 3 mCi de [N-metil-¹¹C]BTA-1 se muestran en Fig. 7. Los archivos de emisión recogidos 5-15 min después de la inyección se sumaron para proporcionar las imágenes. Las regiones cerebrales incluyen: Ctx (córtex); Thl (tálamo); Occ (córtex occipital); y Cer (cerebelo). Obsérvese la distribución uniforme de la radiactividad en todo el cerebro, que indica la ausencia de especificidad de fijación regional en el cerebro normal.
- 15 **Ejemplo 8: Tinción de Depósitos de Amiloide en el Cerebro de Ratón AD y Tg tejido post-mortem**
- Secciones de tejido cerebral tejido post-mortem de cerebro AD y un ratón transgénico PS1/APP de 8 meses [explíquese para qué se suele utilizar este modelo] se tiñeron con BTA-1 sin marcar. El modelo del ratón PS1/APP combina dos mutaciones génicas humanas que se saben causan enfermedad de Alzheimer en un ratón doblemente transgénico que deposita fibrillas de A β en placas de amiloide en el cerebro, comenzando tan precozmente como a los 3 meses de edad. En la Figura 8 se muestran micrografías típicas de fluorescencia, y la tinción de las placas de amiloide por BTA-1 en tejido cerebral AD y PS1/APP, ambos post-mortem, es claramente visible. El amiloide cerebrovascular se teñía también brillantemente (Fig. 8, lado derecho). El otro sello neuropatológico característico del cerebro AD, las madejas neurofibrilares (NFT), se tiñen más débilmente por BTA-1 en el cerebro AD (Fig. 8, lado izquierdo). No se han observado NFT en los modelos de ratón transgénico de deposición de amiloide.
- 25 **Ejemplo 9: Marcación y detección in vivo de depósitos de amiloide en ratones transgénicos**
- Se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) tres ratones transgénicos PS1/APP de 17 meses con una sola dosis de 10 mg/kg de BTA-1 en una solución de DMSO, propilenglicol, y PBS de pH 7,5 (v/v/v 10/45/45). Veinticuatro horas más tarde, se empleó microscopía de fluorescencia multifotónica para obtener imágenes de alta resolución en los cerebros de ratones vivos utilizando una técnica de ventana craneal. Imágenes típicas in vivo de BTA-1 en un ratón PS1/APP vivo se muestran en la Figura 9, siendo claramente distinguibles las placas y el amiloide cerebrovascular. Los estudios de microscopía multifotónica demuestran la especificidad in vivo de BTA-1 para A β en los ratones transgénicos PS1-APP vivos.
- Como se utilizan en esta memoria y en las reivindicaciones adjuntas, debe entenderse que los artículos singulares tales como "un/una", y "uno/una" se refieren tanto al singular como al plural.

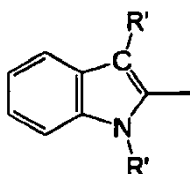
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto fijador de amiloide de la fórmula siguiente o una sal no tóxica soluble en agua del mismo:

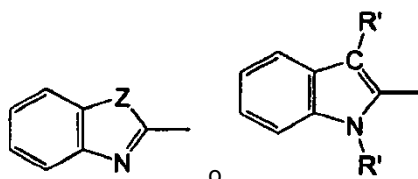


(I)

5 en donde Z es S, NR', O o CR', en cuyo caso la forma tautómera correcta del anillo heterocíclico resulta ser un indol en el cual R' es H o un grupo C₁-C₈ alquilo:



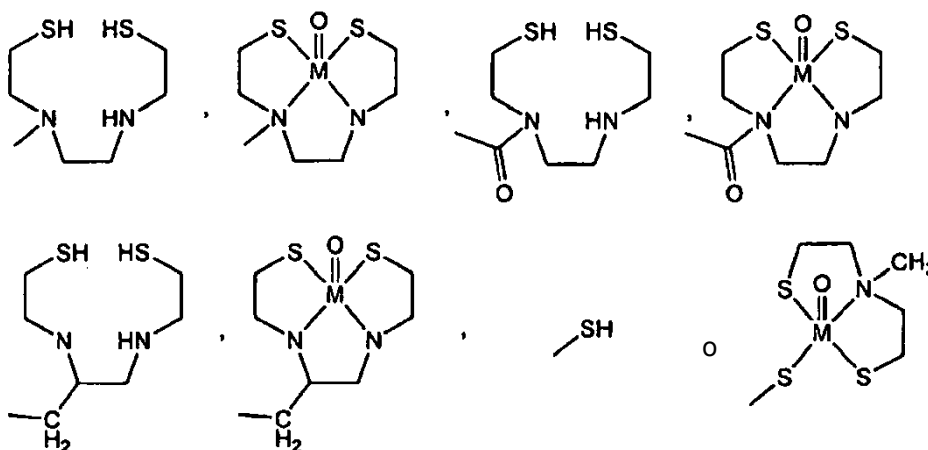
Y es NR¹R², OR² o SR²;
en donde el nitrógeno de



10 no es una amina cuaternaria;

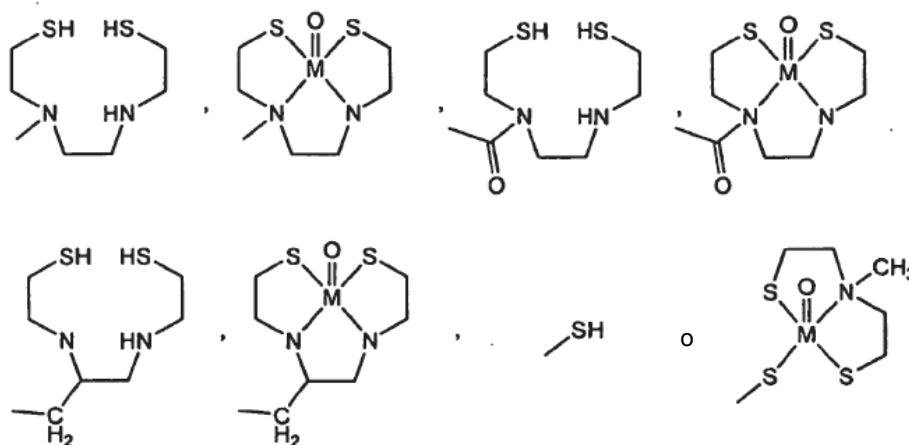
15 cada uno de R¹ y R² se selecciona independientemente del grupo constituido por H, un grupo C₁-C₈ alquilo, (CH₂)_nOR' (en donde n = 1, 2, ó 3), CF₃, CH₂-CH₂X, CH₂-CH₂-CH₂X (en donde X = F, Cl, Br o I), (C=O)-R', R_{ph}, (CH₂)_nR_{ph} (en donde n = 1, 2, 3 ó 4 y R_{ph} representa un grupo fenilo insustituido o sustituido, en donde los sustituyentes de R_{ph} se seleccionan del grupo constituido por F, Cl, Br, I, un grupo C₁-C₈ alquilo, (CH₂)_nOR' (en donde n = 1, 2, ó 3), CF₃, CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂X, CH₂-CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂-CH₂X (en donde X = F, Cl, Br o I), CN, (C=O)-R', N(R')₂, NO₂, (C=O)N(R')₂, O(CO)R', OR', SR', COOR' (en donde R' es H o un grupo C₁-C₈ alquilo), un trialkil-estaño y un grupo quelante (con o sin un grupo metálico quelado) de la forma W-L o V-W-L, en donde V se selecciona del grupo constituido por -COO-, -CO-, -CH₂O- y -CH₂NH-; W es -(CH₂)_n en donde n = 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; y L es:

20

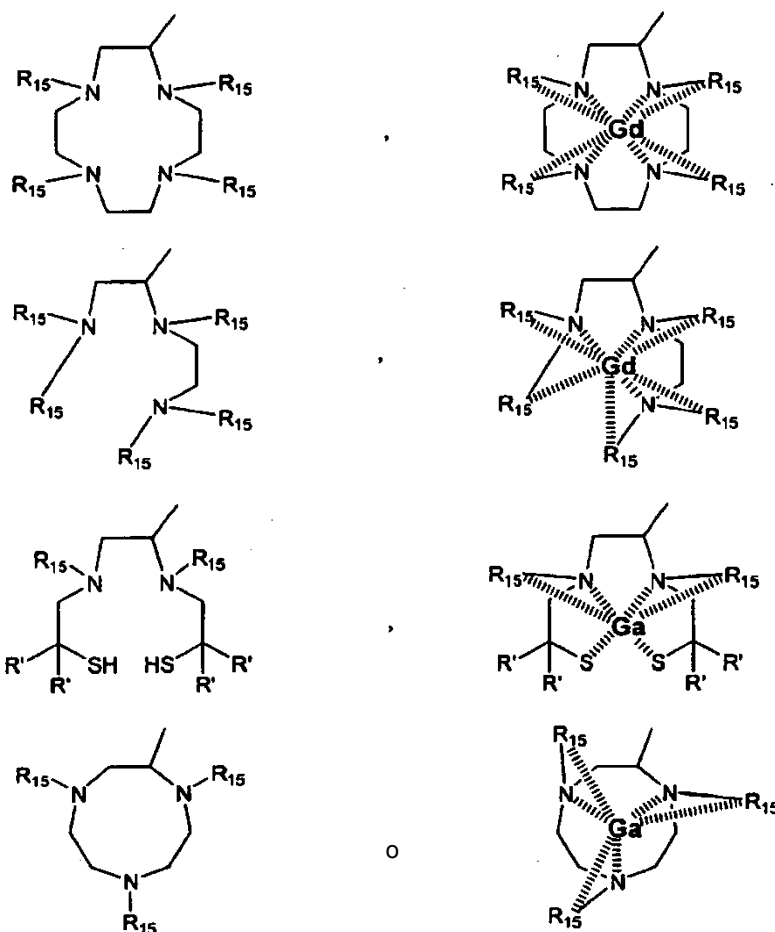


25 en donde M se selecciona del grupo constituido por Tc y Re;
y R' es H o un grupo C₁-C₈ alquilo);

5 cada uno de R^3-R^{10} se selecciona independientemente del grupo constituido por H, F, Cl, Br, un grupo C_1-C_8 alquilo, $(CH_2)_nOR'$ (en donde $n = 1, 2, \text{ ó } 3$), CF_3 , CH_2-CH_2X , $O-CH_2-CH_2X$, $CH_2-CH_2-CH_2X$, $O-CH_2-CH_2-CH_2X$ (en donde $X = F, Cl, Br \text{ ó } I$), CN , $(C=O)-R'$, $N(R')_2$, NO_2 , $(C=O)N(R')_2$, $O(CO)R'$, OR' , SR' , $COOR'$, R_{ph} , $CR'=CR'-R_{ph}$, $CR_2'=CR_2'-R_{ph}$, un trialquil-estaño y un grupo quelante (con o sin un grupo metálico quelado) de la forma W-L o V-W-L, en donde V se selecciona del grupo constituido por $-COO-$, $-CO-$, $-CH_2O-$ y $-CH_2NH-$; W es $-(CH_2)_n$ en donde $n = 0, 1, 2, 3, 4 \text{ ó } 5$; y L es:

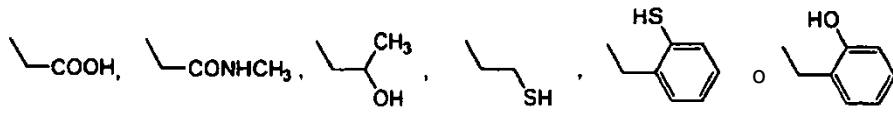


10 en donde M se selecciona del grupo constituido por Tc y Re;
o en donde cada uno de R^1-R^{10} se selecciona independientemente del grupo constituido por un grupo quelante (con o sin un ion metálico quelado) de la forma W-L y V-W-L, en donde V se selecciona del grupo constituido por $-COO-$ y $-CO-$; W es $-(CH_2)_n$ donde $n = 0, 1, 2, 3, 4, \text{ ó } 5$; L es:

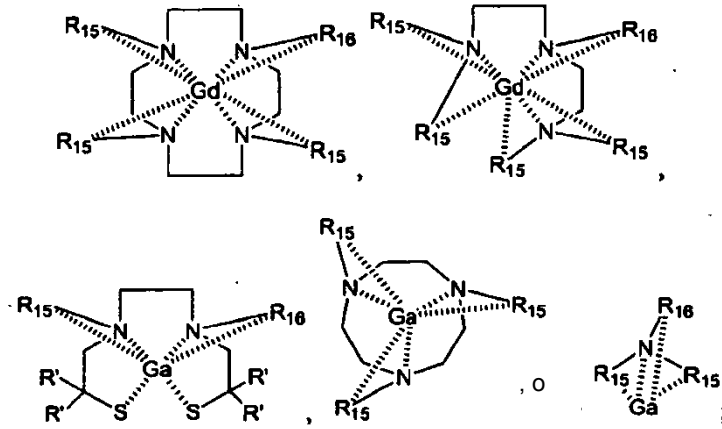


20 y en donde R^{15} se selecciona independientemente de lo siguiente:

H,



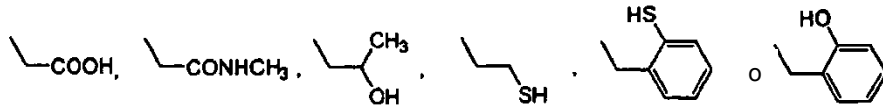
5 o un grupo quelante fijador de amiloide (con un grupo metálico quelado) o una sal del mismo no tóxica soluble en agua de la forma:



10

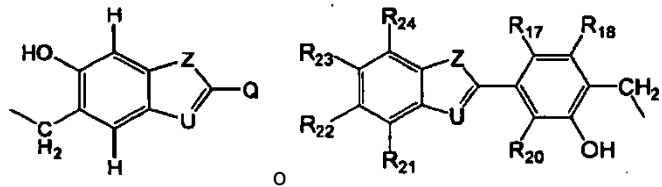
en donde R¹⁵ se selecciona independientemente de lo siguiente:

H,



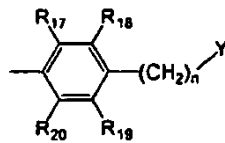
15

y R¹⁶ es

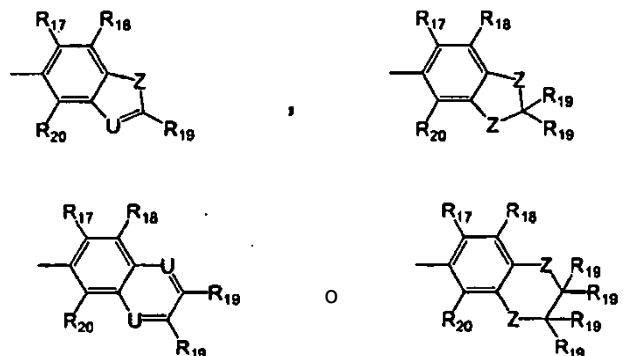


20

en donde Q se selecciona independientemente de una de las estructuras siguientes:



en donde n = 0, 1, 2, 3 ó 4,



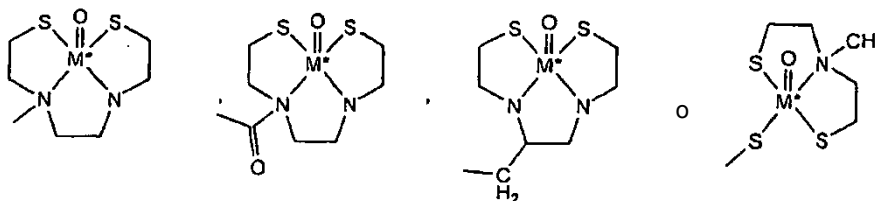
25

Z es S, NR', O, o C(R')₂ en donde R' es H o un grupo C₁-C₈ alquilo;

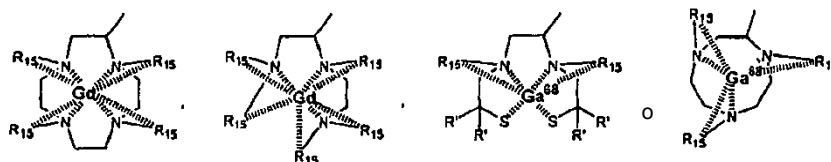
U es N o CR';

Y es NR¹R², OR² o SR²;

- 5 cada R¹⁷-R²⁴ se selecciona independientemente del grupo constituido por H, F, Cl, Br, I, un grupo C₁-C₈ alquilo, (CH₂)_nOR' (en donde n = 1, 2 ó 3), CF₃, CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂X, CH₂CH₂CH₂X, O-CH₂-CH₂-CH₂X (en donde X = F, Cl, Br o I), CN, (C=O)-R', N(R')₂, NO₂, (C=O)N(R')₂, O(CO)R', OR', SR', COOR', R_{ph}, CR'=CR'-R_{ph} y CR₂'-CR₂'-R_{ph}; en donde al menos uno de los sustituyentes R₁-R₁₀ se selecciona del grupo constituido por ³H, ¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ⁷⁶Br, ⁷⁵Br, CH₂-CH₂-X*, O-CH₂-CH₂-X*, CH₂-CH₂-CH₂X* (en donde X* = ¹³¹I, ¹²³I, ⁷⁶Br o ⁷⁵Br), ¹⁹F, un sustituyente que contiene carbono seleccionado del grupo constituido por C₁-C₈ alquilo, (CH₂)_nOR', CF₃, CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂X, CH₂-CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂-CH₂X (en donde X=F, Cl, Br o I), CN, (C=O)-R', (C=O)N(R')₂, O(CO)R', COOR', CR'=CR'-R_{ph} y CR₂'-CR₂'-R_{ph} en donde al menos un carbono es ¹¹C, ¹³C o ¹⁴C y un grupo quelante (con grupo metálico quelado) de la forma W-L* o V-W-L*, en donde V se selecciona del grupo constituido por -COO-, -CO-, -CH₂O- y -CH₂NH-; W es -(CH₂)_n donde n = 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; y L* es:

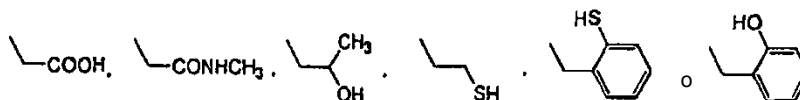


- 15 en donde M* es ^{99m}Tc; o L* es:



y en donde R¹⁵ se selecciona independientemente de lo siguiente:

- 20 H,



2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el radiomarcador de uno de los sustituyentes R³-R¹⁰ se selecciona del grupo constituido por ¹³¹I, ¹²³I, ¹¹C, ⁷⁵Br y ⁷⁶Br.

3. El compuesto de la reivindicación 2, en donde el radiomarcador de uno de los sustituyentes R³-R¹⁰ es ¹¹C.

- 25 4. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z = S, Y = NR¹R², R¹ = H; y R² se selecciona del grupo constituido por (CH₂)_nOR' (en donde n=1, 2, o 3), CF₃, CH₂-CH₂X, CH₂-CH₂-CH₂X (en donde X=F, Cl, B, o I), (C=O)-R', R_{ph}, y (CH₂)_nR_{ph} (en donde n= 1, 2, 3, o 4) en donde cuando R² es CH₂R_{ph}, R⁸ no es CH₃.

5. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z=S, Y=NR¹R², R¹=H, R¹=H, R²=CH₃ y R³-R¹⁰ son H.

- 30 6. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z=S, Y=O, R¹=H, R²=CH₃ y R³-R¹⁰ son H.

7. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z=S, Y=NR¹R², R¹=H, R¹⁻⁴=H, R⁵=I, y R⁶-R¹⁰ son H.

8. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z=S, Y=NR², R¹=H, R¹⁻⁴=H, R⁵=I, R⁸=OH y R⁶-R⁷ y R⁹-R¹⁰ son H.

9. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z=S, Y=NR¹R², R¹=H, R¹=H, R²= CH₂-CH₂-CH₂-F y R³-R¹⁰ son H.

10. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z=S, Y=O, R¹=H, R²= CH₂-CH₂-F y R³-R¹⁰ son H.

- 35 11. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z=S, Y=NR¹R², R¹=H, R¹⁻⁷=H, R⁸=O-CH₂-CH₂-F y R⁹-R¹⁰ son H.

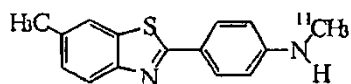
12. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Z=S, Y=NR¹R², R¹=H, R¹=CH₃, R²⁻⁷=H, R⁸=O-CH₂-CH₂-F y R⁹-R¹⁰ son H.

13. El compuesto de la reivindicación 4, en donde al menos uno de los sustituyentes R³-R¹⁰ se selecciona del grupo constituido por CN, OCH₃, OH y NH₂.

14. El compuesto de la reivindicación 1, en donde $R^1 = H$, $R^2 = CH_3$ y R^8 se selecciona del grupo constituido por CN, OCH₃, OH, OCH₃ y NH₂.

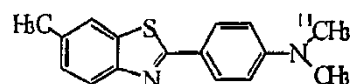
15. El compuesto de la reivindicación 14, en donde R^3 - R^7 y R^9 - R^{10} son H.

16. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene la estructura:

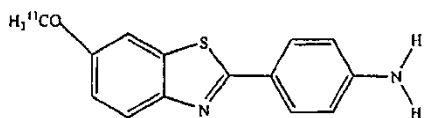


5

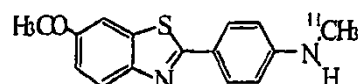
17. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene la estructura:



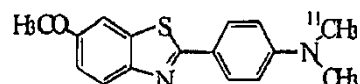
18. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene la estructura:



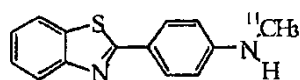
10 19. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene la estructura:



20. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene la estructura:

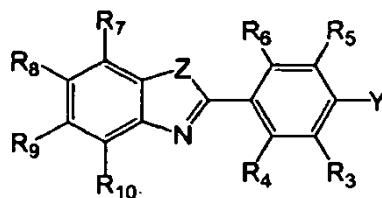


21. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene la estructura:



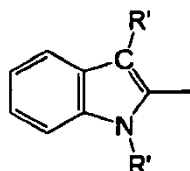
15

22. Un método para sintetizar un compuesto de la fórmula siguiente o una sal no tóxica soluble en agua del mismo:



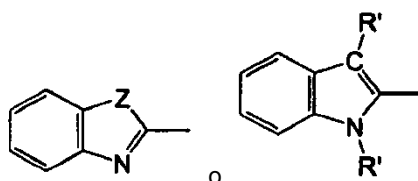
(I)

en donde Z es S, NR', O o CR', en cuyo caso la forma tautómera correcta del anillo heterocíclico resulta ser un indol en el cual R' es H o un grupo C₁-C₈ alquilo:



20

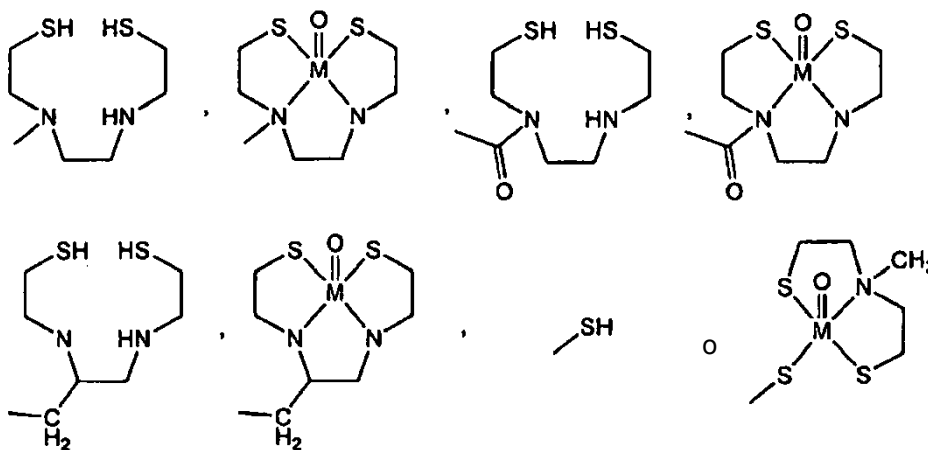
Y es NR^1R^2 , OR^2 o SR^2 ;
 en donde el nitrógeno de



no es una amina cuaternaria;

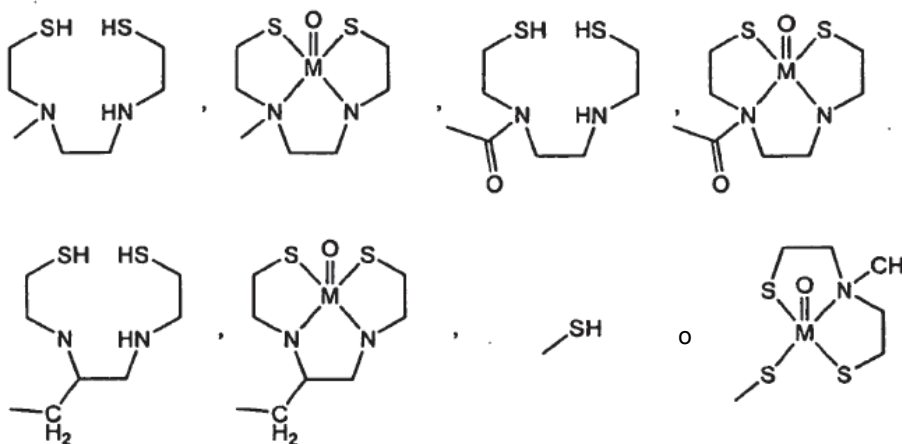
- 5 cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente del grupo constituido por H, un grupo C_1-C_8 alquilo, $(CH_2)_nOR'$ (en donde $n = 1, 2, \text{ ó } 3$), CF_3 , CH_2-CH_2X , $CH_2-CH_2-CH_2X$ (en donde $X = F, Cl, Br \text{ o } I$), $(C=O)-R'$, R_{ph} , $(CH_2)_nR_{ph}$ (en donde $n = 1, 2, 3 \text{ ó } 4$ y R_{ph} representa un grupo fenilo insustituido o sustituido, en donde los sustituyentes de R_{ph} se seleccionan del grupo constituido por F, Cl, Br, I, un grupo C_1-C_8 alquilo, $(CH_2)_nOR'$ (en donde $n = 1, 2, \text{ ó } 3$), CF_3 , CH_2-CH_2X , $O-CH_2-CH_2X$, $CH_2-CH_2-CH_2X$, $O-CH_2-CH_2-CH_2X$ (en donde $X = F, Cl, Br \text{ o } I$),
- 10 CN , $(C=O)-R'$, $N(R')_2$, NO_2 , $(C=O)N(R')_2$, $O(CO)R'$, OR' , SR' , $COOR'$ (en donde R' es H o un grupo C_1-C_8 alquilo), un trialquil-estaño y un grupo quelante (con o sin un grupo metálico quelado) de la forma W-L o V-W-L, en donde V se selecciona del grupo constituido por $-COO-$, $-CO-$, $-CH_2O-$ y $-CH_2NH-$; W es $-(CH_2)_n$ en donde $n = 0, 1, 2, 3, 4 \text{ ó } 5$; y L es:

15



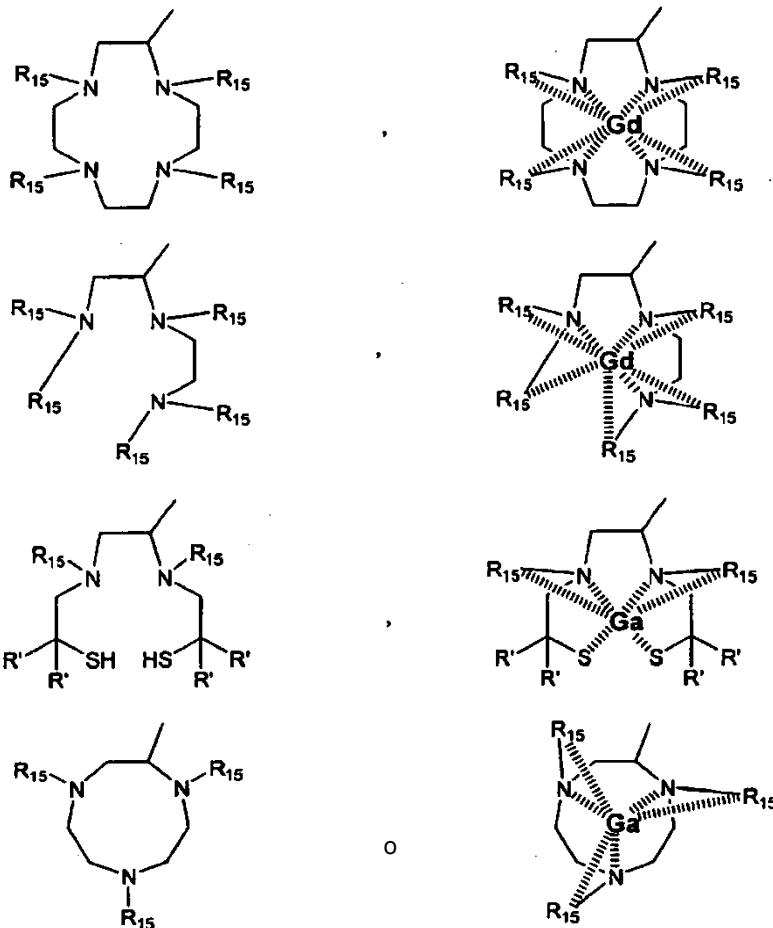
en donde M se selecciona del grupo constituido por Tc y Re;
 y R' es H o un grupo C_1-C_8 alquilo);

- 20 cada uno de R^3-R^{10} se selecciona independientemente del grupo constituido por H, F, Cl, Br, un grupo C_1-C_8 alquilo, $(CH_2)_nOR'$ (en donde $n = 1, 2, \text{ ó } 3$), CF_3 , CH_2-CH_2X , $O-CH_2-CH_2X$, $CH_2-CH_2-CH_2X$, $O-CH_2-CH_2-CH_2X$ (en donde $X = F, Cl, Br \text{ o } I$), CN , $(C=O)-R'$, $N(R')_2$, NO_2 , $(C=O)N(R')_2$, $O(CO)R'$, OR' , SR' , $COOR'$, R_{ph} , $CR'=CR'-R_{ph}$, $CR_2'=CR_2'-R_{ph}$, un trialquil-estaño y un grupo quelante (con o sin un grupo metálico quelado) de la forma W-L o V-W-L, en donde V se selecciona del grupo constituido por $-COO-$, $-CO-$, $-CH_2O-$ y $-CH_2NH-$;
- 25 y L es:



en donde M se selecciona del grupo constituido por Tc y Re;
 o en donde cada uno de R^1-R^{10} se selecciona independientemente del grupo constituido por un grupo quelante (con o sin un ion metálico quelado) de la forma W-L y V-W-L, en donde V se selecciona del grupo constituido por -COO- y -CO-; W es $-(CH_2)_n$ donde $n = 0, 1, 2, 3, 4, \text{ ó } 5$; L es:

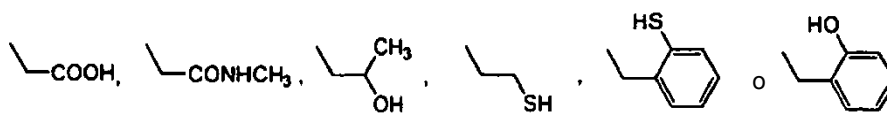
5



10

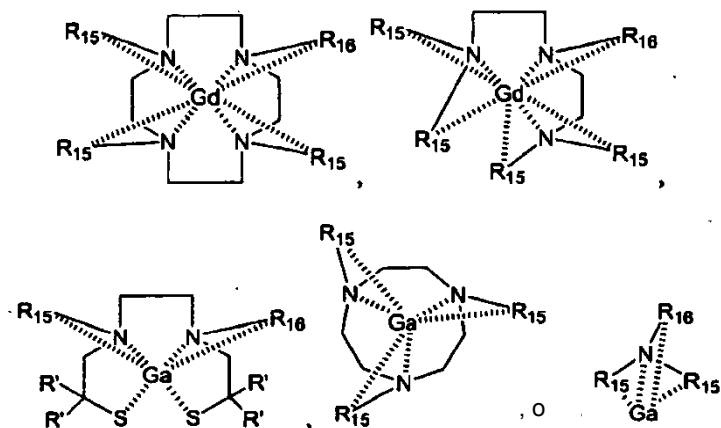
y en donde R^{15} se selecciona independientemente de lo siguiente:
 H,

15

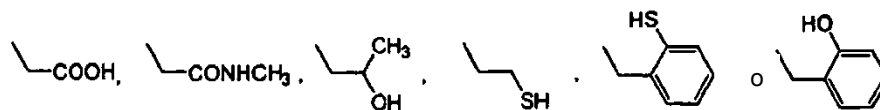


o un grupo quelante fijador de amiloide (con un grupo metálico quelado) o una sal del mismo no tóxica soluble en agua de la forma:

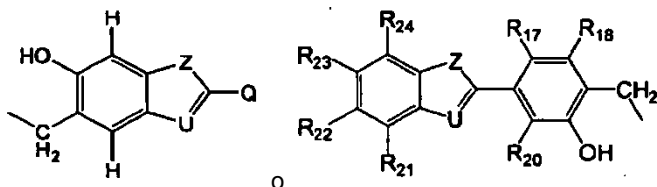
20



en donde R¹⁵ se selecciona independientemente de lo siguiente:
H,

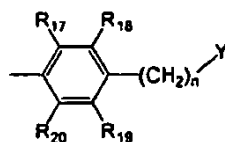


5 y R¹⁶ es



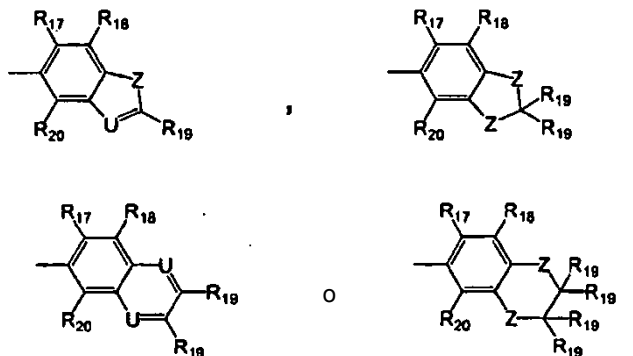
en donde Q se selecciona independientemente de una de las estructuras siguientes:

10



en donde n = 0, 1, 2, 3 ó 4,

15



20 Z es S, NR', O, o C(R')₂ en donde R' es H o un grupo C₁-C₈ alquilo;

U es N o CR';

Y es NR¹R², OR² o SR²;

cada R¹⁷-R²⁴ se selecciona independientemente del grupo constituido por H, F, Cl, Br, I, un grupo C₁-C₈ alquilo, (CH₂)_nOR' (en donde n = 1, 2 ó 3), CF₃, CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂X, CH₂CH₂CH₂X, O-CH₂-CH₂-CH₂X (en donde X = F,

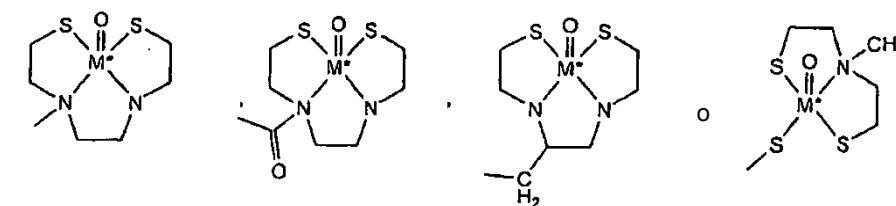
25

Cl, Br o I), CN, (C=O)-R', N(R')₂, NO₂, (C=O)N(R')₂, O(CO)R', OR', SR', COOR', R_{ph}, CR'=CR'-R_{ph} y CR₂'-CR₂'-R_{ph};

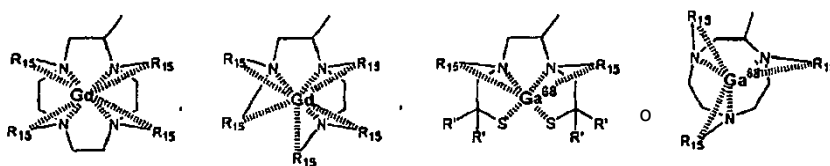
en donde al menos uno de los sustituyentes R₁-R₁₀ se selecciona del grupo constituido por ³H, ¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ⁷⁶Br, ⁷⁵Br, CH₂-CH₂-X*, O-CH₂-CH₂-X*, CH₂-CH₂-CH₂X*, O-CH₂-CH₂-CH₂X* (en donde X* = ¹³¹I, ¹²³I, ⁷⁶Br, ⁷⁵Br o ¹⁸F), ¹⁹F,

un sustituyente que contiene carbono seleccionado del grupo constituido por C₁-C₈ alquilo, (CH₂)_nOR', CF₃, CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂X, CH₂-CH₂-CH₂X, O-CH₂-CH₂-CH₂X (en donde X=F, Cl, Br o I), CN, (C=O)-R', (C=O)N(R')₂, O(CO)R', COOR', CR'=CR'-R_{ph} y CR₂'-CR₂'-R_{ph} en donde al menos un carbono es ¹¹C, ¹³C o ¹⁴C y un grupo quelante (con grupo metálico quelado) de la forma W-L* o V-W-L*, en donde V se selecciona del grupo constituido por -COO-, -CO-, -CH₂O- y -CH₂NH-; W es -(CH₂)_n donde n = 0, 1, 2, 3, 4 ó 5; y L* es:

30

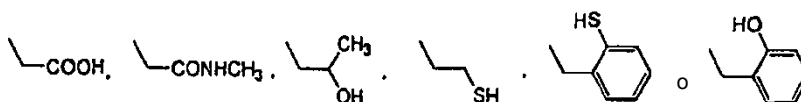


35 en donde M* es ^{99m}Tc;
o L* es:



y en donde R^{15} se selecciona independientemente de lo siguiente:

H,



- 5 que tiene al menos uno de los sustituyentes R^3 - R^{10} se seleccionados del grupo constituido por ^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{76}Br , ^{75}Br , ^{18}F y ^{19}F , que comprende el paso de marcar un compuesto de la reivindicación 1, en donde al menos uno de los sustituyentes R^3 - R^{10} es un trialkil-estaño, por reacción del compuesto con una sustancia que contiene ^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{76}Br , ^{75}Br , ^{18}F o ^{19}F .

23. Un método in vivo para detectar depósitos de amiloide en un individuo, que comprende los pasos de:

- 10 (a) administrar una cantidad detectable de una composición farmacéutica que comprende (a) un compuesto fijador de amiloide o una sal no tóxica soluble en agua del mismo como se ha definido en la reivindicación 22 y (b) un portador farmacéuticamente aceptable, y

(b) detectar la fijación del compuesto al depósito amiloide en el individuo.

- 15 24. El método de la reivindicación 23, en donde el depósito de amiloide está localizado en el cerebro de un individuo.

25. El método de la reivindicación 23, en donde se sospecha que el individuo padece una enfermedad o síndrome seleccionado del grupo constituido por Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Alzheimer familiar, Síndrome de Down y homocigosis para el alelo de la apolipoproteína E4.

- 20 26. El método de la reivindicación 23, en donde la detección se selecciona del grupo constituido por representación de imágenes gamma, representación de imágenes de resonancia magnética y espectroscopía de resonancia magnética.

27. El método de la reivindicación 26, en donde la detección se realiza por representación de imágenes gamma, y la representación por imágenes gamma es PET o SPECT.

- 25 28. El método de la reivindicación 23, en donde la composición farmacéutica se administra por inyección intravenosa.

29. El método de la reivindicación 23, en donde la ratio de (i) fijación del compuesto a un área del cerebro distinta del cerebelo a (ii) fijación del compuesto al cerebelo, en el individuo, se compara con la ratio en individuos normales.

30. Un método para detectar depósitos de amiloide en tejido de biopsia o tejido humano o animal tejido post-mortem, que comprende los pasos de:

- 30 (a) incubar tejido fijado en formalina o recién congelado con una solución de un compuesto fijador de amiloide o una sal no tóxica soluble en agua del mismo como se ha definido en la reivindicación 22 para formar un depósito marcado y a continuación,
(b) detectar los depósitos marcados.

- 35 31. El método de la reivindicación 30 en donde la solución se compone de 25-100% etanol, siendo el resto de la solución agua, en donde la solución está saturada con un compuesto fijador de amiloide de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal no tóxica soluble en agua del mismo.

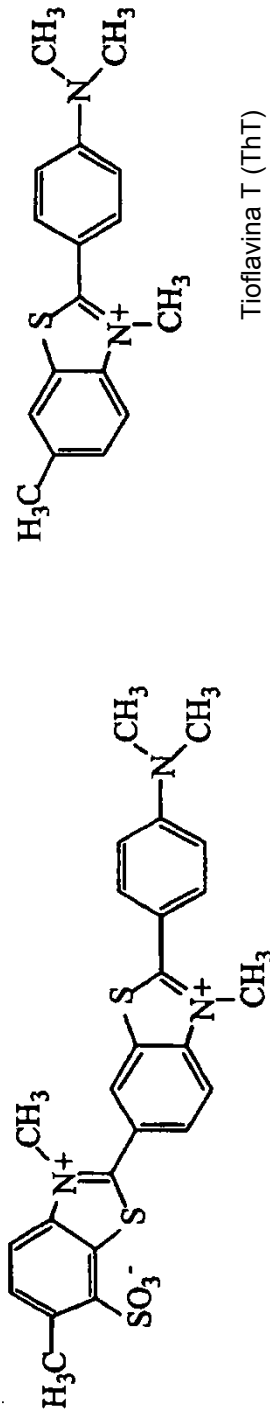
32. El método de la reivindicación 30 en donde la solución está compuesta de un tampón acuoso que contiene 0-50% etanol, en donde la solución contiene 0,0001 a 100 μM del compuesto fijador de amiloide.

- 40 33. El método de la reivindicación 30 en donde la detección se efectúa por técnicas microscópicas seleccionadas del grupo constituido por microscopía de campo brillante, de fluorescencia, confocal láser y de polarización cruzada.

34. Un método de cuantificación de la cantidad de amiloide en tejido de biopsia o tejido post-mortem que comprende los pasos de:

- a) incubar un derivado radiomarcado de un compuesto fijador de amiloide o una sal no tóxica soluble en agua del mismo como se ha definido en la reivindicación 22, con un homogeneizado de tejido de biopsia o tejido post-mortem,
- 5 b) separar el derivado radiomarcado del compuesto fijado al tejido del compuesto no fijado al tejido,
- c) cuantificar el derivado radiomarcado del compuesto fijado al tejido, y
- d) convertir las unidades de derivado radiomarcado de un compuesto fijado al tejido de la reivindicación 1 en unidades de microgramos de amiloide por 100 mg de tejido por comparación con un estándar.
35. Un método de diferenciación de un cerebro con enfermedad de Alzheimer de un cerebro normal que comprende los pasos de:
- 10 a) incubar tejidos de (i) el cerebelo y (ii) otra área del mismo cerebro distinta del cerebelo, de individuos normales y de individuos sospechosos de padecer enfermedad de Alzheimer, con un compuesto fijador de amiloide o una sal no tóxica soluble en agua del mismo como se define en la reivindicación 22 a fin de que el amiloide en el tejido se fije con el compuesto;
- 15 b) cuantificar la cantidad de amiloide fijada al compuesto y detectar la fijación del compuesto al depósito de amiloide en el individuo;
- c) calcular la ratio de cantidad de amiloide en el área del cerebro distinta del cerebelo a la cantidad de amiloide en el cerebelo;
- d) comparar la ratio para la cantidad de amiloide el tejido de individuos normales con la ratio para la cantidad de amiloide en el tejido de individuos sospechosos de padecer la enfermedad de Alzheimer; y
- 20 e) determinar la presencia de enfermedad de Alzheimer si la ratio del cerebro de un individuo sospechoso de padecer la enfermedad de Alzheimer es superior al 90% de las ratios obtenidas de los cerebros de individuos normales.

FIG. 1



Estructura propuesta de un Componente Principal de Tioflavina S (ThS)

FIG. 2

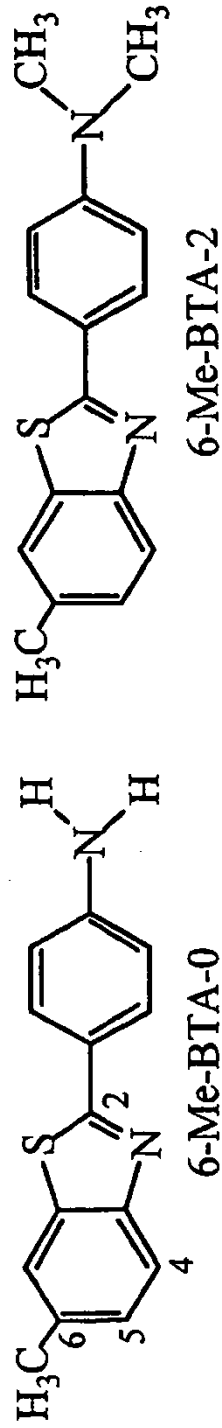


FIG. 3

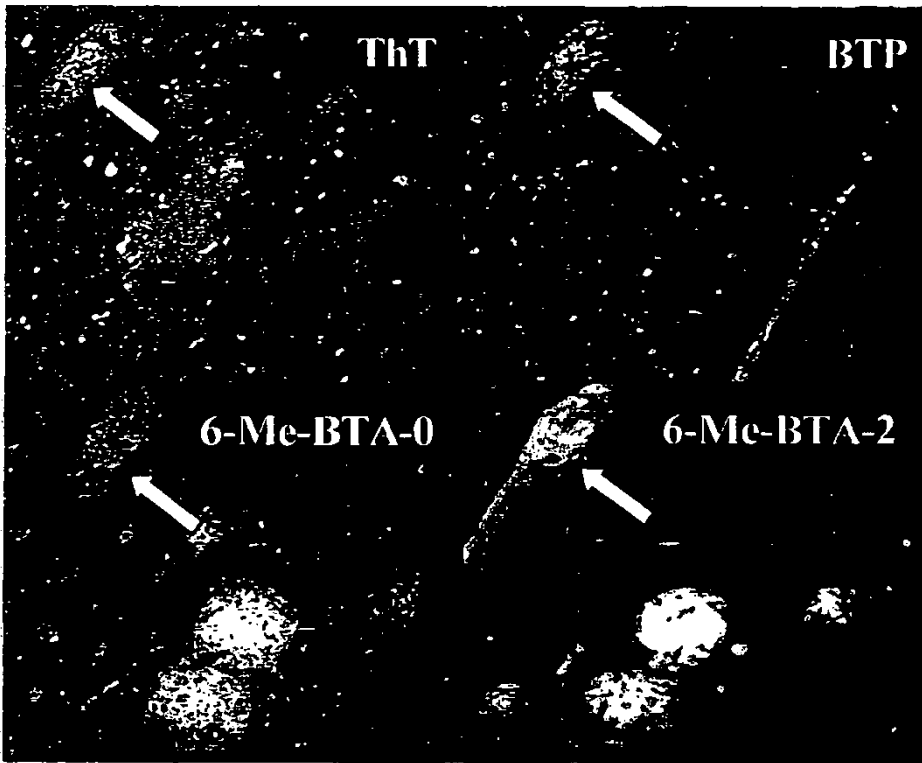


FIG. 4

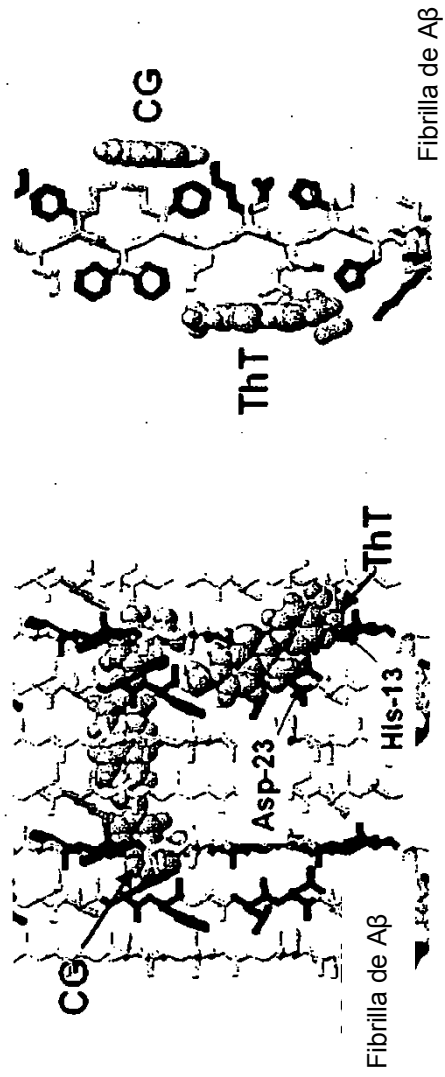
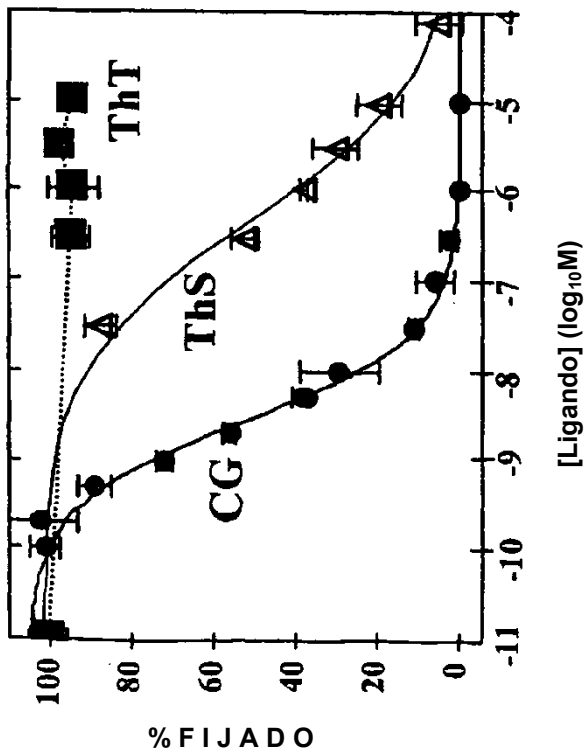
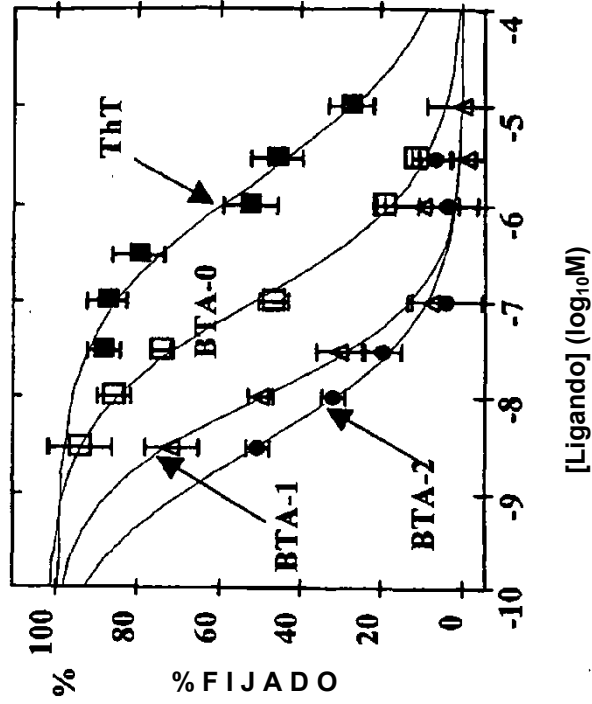


FIG. 5



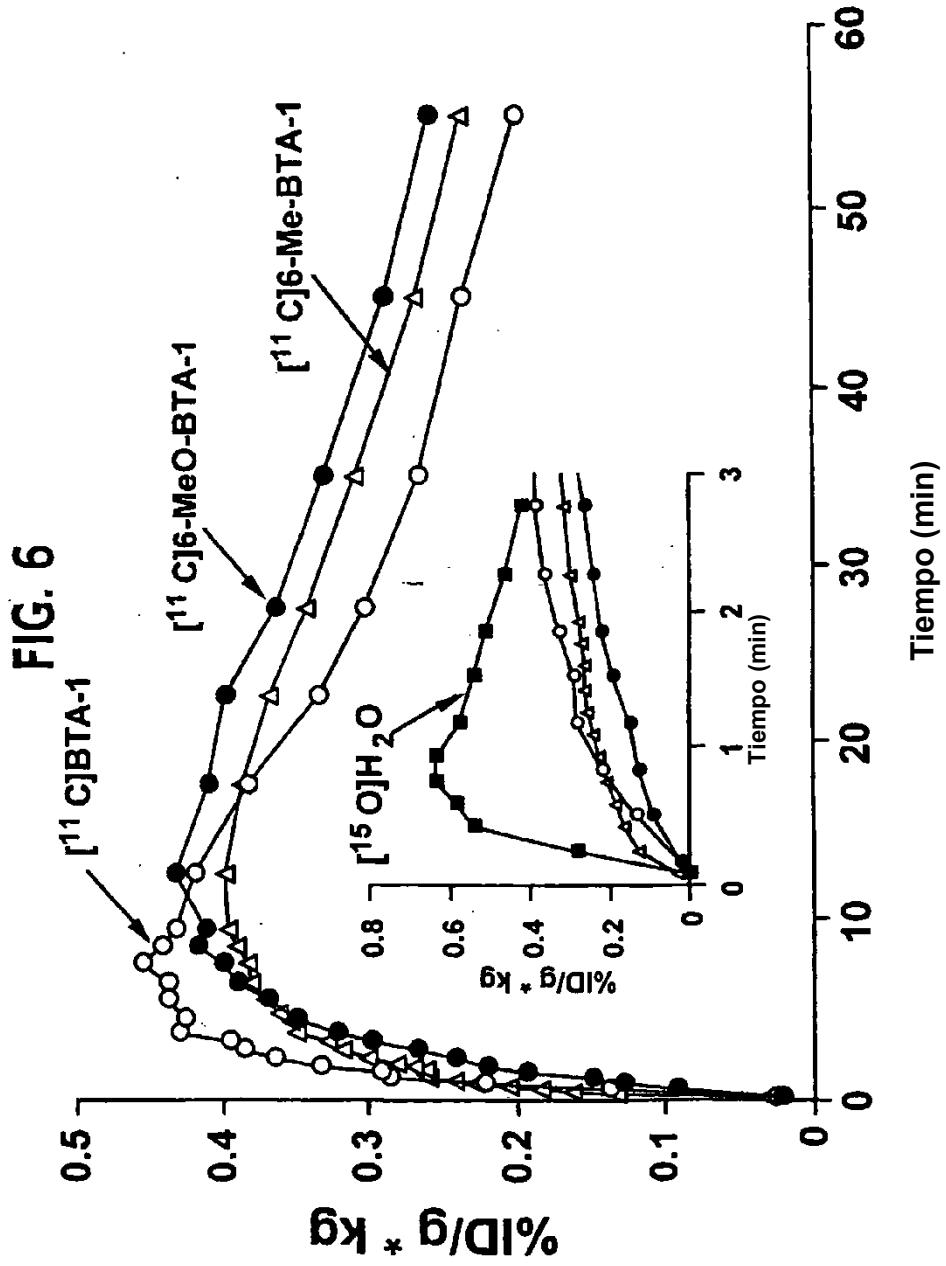


FIG. 7

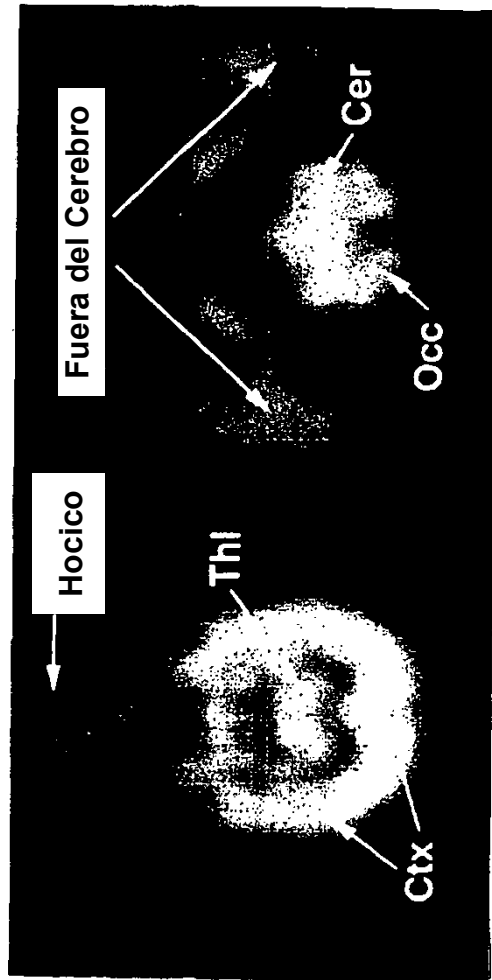


FIG. 8

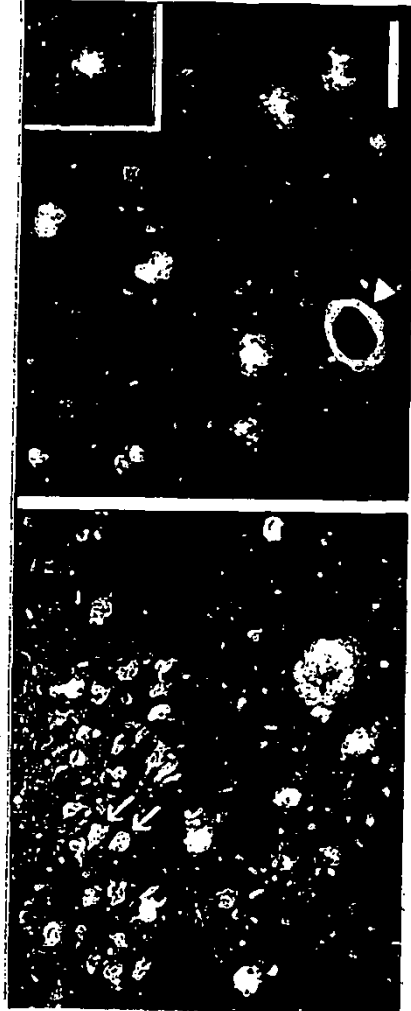


FIG. 9

