

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 464**

51 Int. Cl.:

A61K 51/04 (2006.01)

G01N 33/60 (2006.01)

A61K 101/02 (2006.01)

C07B 59/00 (2006.01)

C07D 471/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2011 E 11791424 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 2637704**

54 Título: **Ligandos basados en el fenilimidazol radiomarcados**

30 Prioridad:

10.11.2010 US 411934 P
10.11.2010 DK 201001023

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.07.2015

73 Titular/es:

H. LUNDBECK A/S (100.0%)
Ottiliavej 9
2500 Valby, DK

72 Inventor/es:

KEHLER, JAN y
BANG-ANDERSEN, BENNY

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 539 464 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ligandos basados en el fenilimidazol radiomarcados

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a compuestos adecuados para el marcaje o ya marcados con isótopos de semivida corta, tales como ^{11}C , ^{15}O o ^{18}F , métodos para preparar dichos compuestos así como el uso de dichos compuestos como ligandos para PET, para la determinación de la ocupación de los sitios de unión de un ligando de la enzima PDE10A en la enzima PDE10A o para el diagnóstico por imagen por tomografía de emisión de positrones (PET).

Antecedentes de la invención

10 Los inhibidores de PDE10A pueden ser utilizados para aumentar los niveles de cAMP y/o cGMP en células que expresan la enzima PDE10A (o solo PDE10A para abreviar), especialmente las neuronas que conforman los ganglios basales, y los inhibidores de PDE10A podrían ser útiles por lo tanto para el tratamiento de varios trastornos neuropsiquiátricos asociados que implican los ganglios basales, tales como trastornos neurológicos y psiquiátricos, esquizofrenia, trastorno bipolar, trastorno obsesivo-compulsivo y similares, y puede tener el beneficio de evitar los efectos secundarios que se asocian con las actuales terapias en el mercado.

15 El documento WO 08/020302 (Pfizer Products Incorporated) describe el uso de compuestos heteroaromáticos con base de quinolina que sirven como inhibidores de PDE10A. El documento WO09/152825 (Lundbeck A/S) proporciona compuestos derivados del fenilimidazol que son inhibidores enzimáticos de PDE10A, y como tales son útiles para tratar trastornos neurodegenerativos y psiquiátricos.

20 Una dificultad en el desarrollo de compuestos útiles para el tratamiento de trastornos neurológicos y psiquiátricos ha sido la falta de modelos animales adecuados, la accesibilidad al cerebro limitada para las medidas farmacocinéticas y la falta de biomarcadores directos adecuados relacionados con la acción en el sistema diana. Por lo tanto, son necesarios modelos más precisos para realizar el modelado farmacocinético y farmacodinámico y que puedan usarse junto con, p. ej., la exposición plasmática. Por lo tanto, es evidente que dichos compuestos que pueden conducir a un mejor modelado farmacocinético y farmacodinámico son valiosos.

25 Las técnicas de imagen nuclear no invasivas pueden utilizarse para obtener información básica y de diagnóstico sobre la fisiología y bioquímica de sujetos vivos. En los procedimientos técnicos de imagen nuclear, los isótopos se combinan con o se hacen reaccionar químicamente con otros compuestos químicos o farmacéuticos para formar compuestos radiomarcados. Estos compuestos, una vez administrados al sujeto vivo, pueden localizar a, p. ej., órganos específicos, receptores celulares o enzimas. Esta propiedad de los radiofármacos confiere a las técnicas de
30 imagen nuclear la capacidad de producir imágenes que revelan la distribución y concentración del compuesto radiomarcado en función del tiempo.

La tomografía de emisión de positrones (PET) es de particular interés para el desarrollo de fármacos debido a su elevada sensibilidad y su capacidad de proporcionar datos cuantitativos y cinéticos. Para llevar a cabo un escaneo PET, se inyecta un isótopo radioactivo de vida corta al sujeto vivo, generalmente en la circulación sanguínea. El
35 isótopo radioactivo se incorpora químicamente a una molécula biológicamente activa, en el caso de la presente invención el isótopo radioactivo se incorpora al inhibidor de PDE10A. El isótopo radioactivo experimenta una desintegración por emisión de positrones que lleva eventualmente a la producción de fotones de aniquilación (gamma) que son detectados cuando alcanzan el centelleador en el dispositivo de barrido. La técnica PET depende por lo tanto de isótopos radioactivos que experimentan la desintegración por emisión de positrones. Estos radioisótopos incluyen el carbono-11 (también simbolizado como ^{11}C o ^{11}C), el nitrógeno-13 (también simbolizado como ^{13}N o ^{13}N), el oxígeno-15 (también simbolizado como ^{15}O o ^{15}O), y el flúor-18 (también simbolizado como ^{18}F o ^{18}F).

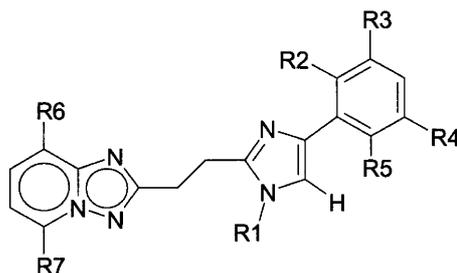
45 Los documentos WO 2006/053785 (Glaxo Group Limited), WO 2006/075226 (Pfizer Products Inc.), WO 2009/033584 (Bayer Schering Pharma AG) y WO 2010/097367 (Janssen Pharmaceutica NV) describen varios compuestos radiomarcados para la tomografía de emisión de positrones.

Los documentos Celen *et al.*, *NeuroImage* 2010, 52, suplemento 1, P. S15, Celen *et al.*, *The Journal of Nuclear Medicine* 2010; 51: 1.584-1.591, y Tu *et al.*, *Nuclear Medicine and Biology* 2010; 37: 509-516 describen compuestos marcados con ^{18}F y ^{11}C para imagen por PET de enzimas PDE10A en el cerebro.

Resumen de la invención

50 La invención se refiere a compuestos radiomarcados que se unen a enzimas PDE10A y a como dichos compuestos son útiles para la tomografía de emisión de positrones. Consecuentemente, la presente invención se refiere a un método para la determinación de la ocupación de los sitios de unión a la enzima PDE10A de un ligando de la enzima PDE10A usando un ligando para PET de la presente invención.

Consecuentemente, en un aspecto la presente invención se refiere a compuestos de fórmula I:



I

y su uso como ligandos de la enzima PDE10A en imagen PET, en los que:

los isótopos se eligen entre el grupo que consiste en ^{11}C , ^{15}O , y ^{18}F ;

el grupo de R1-R7 se elige como sigue:

5 cuando R1 es un grupo radiomarcado que incorpora o consiste en un isótopo elegido entre ^{11}C , ^{15}O y ^{18}F , entonces R2-R7 se eligen entre H, F, metilo o metoxi;

10 cuando uno o más de R2-R7 son grupos radiomarcados que incorporan o consisten en un isótopo elegido entre el grupo que consiste en ^{11}C , ^{15}O y ^{18}F , entonces R1 se elige entre H; alquilo C1-C6 tal como metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo e isobutilo; alquil C1-C6-cicloalquilo C3-C8, tal como ciclopropilmetilo; hidroxialquilo C1-C6, tal como hidroxietilo; fluoropropilo; fluoroetilo; y fluorobutilo.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a sales o hidratos de los compuestos de la presente invención.

En todavía otro aspecto adicional la invención se refiere a métodos de producción y uso de los compuestos de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

15 La figura 1 muestra imágenes de los valores de captación estandarizados (abreviado generalmente como SUV por sus iniciales en inglés: *standardized uptake value*) por PET, suma total de 15 a 90 minutos después de la inyección de $[^{11}\text{C}]\text{Lu AE92686}$.

La figura 2 muestra imágenes de los SUV por PET, de 15 a 90 minutos para dos monos.

20 La figura 3 muestra la cinética de $[^{11}\text{C}]\text{Lu AE92686}$ en el cuerpo estriado, resultados obtenidos a partir de dos monos.

El eje X indica el tiempo (minutos), el eje Y indica SUV.

La figura 4 muestra una curva de dosis-respuesta que representa la unión de $[^{11}\text{C}]\text{Lu AE92686}$ al cuerpo estriado después del estímulo con tres dosis del inhibidor de PDE10A selectivo PF2545920.

El eje X indica los mg/kg de PF2545920, el eje Y indica el % de ocupación.

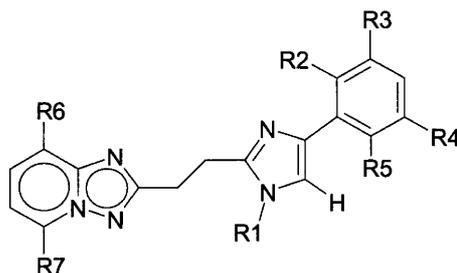
25 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a compuestos radiomarcados, su producción y el uso de dichos compuestos para imagen PET.

Modos de realización según la invención

30 A continuación se describen los modos de realización de la invención. El primer modo de realización se denomina E1, el segundo modo de realización se denomina E2 y así sucesivamente.

E1. Un compuesto según la fórmula I:



I

que comprende al menos un isótopo elegido entre el grupo que consiste en ^{11}C , ^{15}O , y ^{18}F , o una sal o forma hidratada del compuesto.

E2. Un modo de realización según el modo de realización 1 en el que:

5 R1 es un grupo radiomarcado que comprende al menos un isótopo elegido entre el grupo que consiste en ^{11}C , ^{15}O , y ^{18}F , y

R2-R7 se eligen individualmente entre H, F, metilo o metoxi.

E3. Un modo de realización según el modo de realización 1 en el que:

10 uno o más de R2-R7 son un grupo radiomarcado que comprende un isótopo elegido entre el grupo que consiste en ^{11}C , ^{15}O , y ^{18}F , o uno o más de R2-R5 son ^{18}F , y

R1 se elige entre H; alquilo C1-C6, tal como metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo, isobutilo; alquilo (C1-C6)-cicloalquilo C3-C8, tal como ciclopropilmetilo; hidroxialquilo C1-C6, tal como hidroxietilo; fluoropropilo; fluoroetilo; y fluorobutilo.

E4. El compuesto de E1 en el que R3, R4, y R5 son H y R7 es metilo.

15 E5. El compuesto de E2 y E4 en el que R2 es H y R6 es metilo.

E6. El compuesto según E5 en el que R1 se elige entre el grupo que consiste en $^{11}\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2^{11}\text{CH}_3$, $^{-11}\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2^{11}\text{CH}_3$, $^{-11}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $^{-11}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^{11}\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2^{18}\text{F}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^{18}\text{F}$ y $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^{18}\text{F}$.

E7. El compuesto según E3 y E4 en el que R1 y R6 son metilo.

20 E8. El compuesto según E7 en el que R2 es O^{11}CH_3 (^{11}C metoxi).

E9. El compuesto según E3 y E4 en el que R1 y R6 son metilo.

E10. El compuesto según E9 en el que R2 es ^{18}F .

E11. El compuesto según E3 y E4 en el que R1 es CH_3 y R2 es H.

E12. El compuesto según E11 en el que R6 es O^{11}CH_3 (^{11}C metoxi).

25 E13. El compuesto según E1, en el que el compuesto es 5,8-dimetil-2-[2-([^{11}C -1-metil]-4-fenil-1H-imidazol-2-il)-etil]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridina.

E14. El compuesto según E1, en el que el compuesto es 8-[^{11}C]metoxi-5-metil-2[2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)-etil]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridina.

30 E15. El compuesto según E1, en el que el compuesto es 2-{2-[4-(2-[^{18}F]fluoro-fenil)-1-metil-1H-imidazol-2-il]-etil}-5,8-dimetil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridina.

E16. El compuesto según E1 en el que el compuesto es 2-[2-[4-(2-[^{11}C]metoxi-fenil)-1-metil-1H-imidazol-2-il]-etil]-5,8-dimetil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridina.

E17. Uso de un compuesto según cualquiera de E1-E16 como un ligando para PET.

35 E18. El uso según E17 para la determinación de la ocupación de los sitios de unión de un ligando de la enzima PDE10A a la enzima PDE10A.

E19. Un método para la preparación de un compuesto según cualquiera de E1-E16.

Sustituyentes

5 El término "alquilo C1-C6" se refiere a una cadena hidrocarbonada saturada lineal o ramificada que tiene de uno a seis átomos de carbono, inclusive. Ejemplos de dichos grupos incluyen, pero sin limitarse a ellos, metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo, 1-butilo, 2-butilo, 2-metil-2-propilo, 2-metil-1-butilo y n-hexilo. La expresión "hidroxialquil C1-C6" se refiere a un grupo alquilo C1-C6 como se ha definido anteriormente que está sustituido con un grupo hidroxilo.

La expresión "alcoxi C1-C6" se refiere a un grupo alcoxi de cadena saturada lineal o ramificada con uno a seis átomos de carbono, inclusive, con valencia abierta para el oxígeno. Ejemplos de dichos grupos incluyen, pero sin limitarse a ellos, metoxi, etoxi, n-butoxi, 2-metil-pentoxi y n-hexiloxi.

10 El término "cicloalquilo C3-C8" generalmente se refiere a ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo o ciclooctilo. La expresión "alquilo (C1-C6)-cicloalquilo C3-C8" se refiere a un cicloalquilo C3-C8 como se ha definido anteriormente que están sustituidos con un alquilo C1-C6 de cadena lineal o ramificada. Ejemplos de este grupo incluyen, pero sin limitarse a él, ciclopropilmetilo.

Sales farmacéuticamente aceptables

15 La presente invención también se refiere a las sales de estos compuestos, generalmente, sales farmacéuticamente aceptables. Dichas sales incluyen sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables. Las sales de adición ácida incluyen sales de ácidos inorgánicos así como de ácidos orgánicos.

20 Ejemplos representativos de ácidos inorgánicos adecuados incluyen los ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, fosfórico, sulfúrico, sulfámico, nítrico y similares. Ejemplos representativos de ácidos orgánicos adecuados incluyen los ácidos fórmico, acético, tricloroacético, trifluoroacético, propiónico, benzoico, cinámico, cítrico, fumárico, glicólico, itacónico, láctico, metanosulfónico, maleico, málico, malónico, mandélico, oxálico, pícrico, pirúvico, salicílico, succínico, metanosulfónico, etanosulfónico, tartárico, ascórbico, pamóico, salicílico, succínico, bismetilensalicílico, etanodisulfónico, glucónico, citracónico, aspártico, esteárico, palmítico, EDTA, glicólico, p-aminobenzoico, glutámico, bencenosulfónico, p-toluenosulfónico, ácidos teofilina-acéticos, así como las 8-haloteofilinas, por ejemplo la 8-bromoteofilina y similares. Ejemplos adicionales de sales de adición de ácidos orgánicos e inorgánicos farmacéuticamente aceptables incluyen las sales farmacéuticamente aceptables enumeradas en Berge, S. M. *et al.*, *J. Pharm. Sci.* 1977, 66, 2, cuyos contenidos se incorporan como referencia en la presente memoria.

30 Además, los compuestos de esta invención pueden existir en forma no solvatada así como en forma solvatada con disolventes farmacéuticamente aceptables, tales como agua, etanol y similares. En general, las formas solvatadas se consideran equivalentes a las formas no solvatadas para los objetivos de esta invención.

Compuesto radiomarcado

En el contexto de la presente invención, un compuesto radiomarcado es un compuesto que comprende uno o más isótopos elegidos entre el grupo que consiste en ^{11}C , ^{15}O y ^{18}F .

Grupo radiomarcado

35 En el contexto de la presente invención, un grupo radiomarcado es cualquiera de los grupos R1-R7 que comprende al menos un isótopo elegido entre el grupo que consiste en ^{11}C , ^{15}O y ^{18}F .

R1-R7 es la notación abreviada para el grupo que consiste en R1, R2, R3, R4, R5, R6 y R7.

Los sub-grupos de R1-R7 se definen de forma similar, p. ej. R2-R6 significa el grupo que consiste en R2, R3, R4, R5 y R6.

40 [11C]Lu AE92686

El [11]Lu AE92686 es el compuesto radiomarcado 5,8-dimetil-2-[2-([^{11}C -1-metil]-4-fenil-1H-imidazol-2-il)-etil]-[1,2,4]triazol-[1,5-a]piridina

PF2545920

45 El PF2545920 es el compuesto 2-[4-(1-metil-4-piridin-4-il-1H-pirazol-3-il)-fenoximetil]-quinolina como se describe en *J. Med. Chem.*, 2009, 52 (16), págs. 5188-5196.

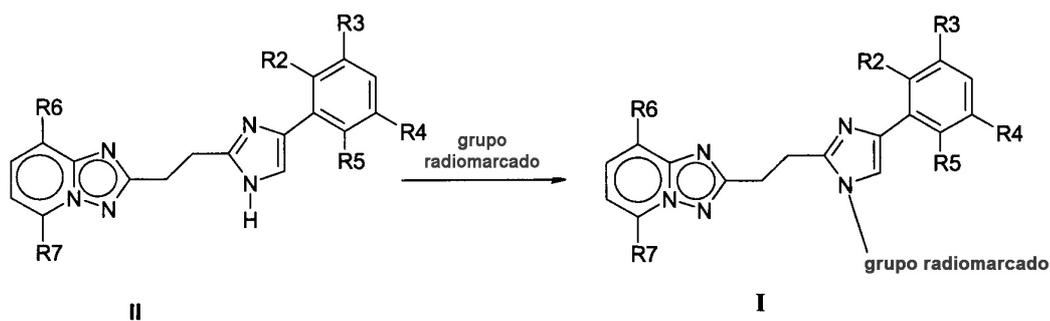
Valor de captación estandarizado (SUV)

50 El valor de captación estandarizado (SUV) que es un cuantificador del PET, se calcula como una relación entre la concentración de radiactividad en el tejido (p. ej., en unidades de kBq/ml) en el tiempo T, CPET(T), y la dosis inyectada (p. ej., en unidades de MBq) en el momento de la inyección dividido por el peso corporal (p. ej. en unidades de kg).

Ejemplos

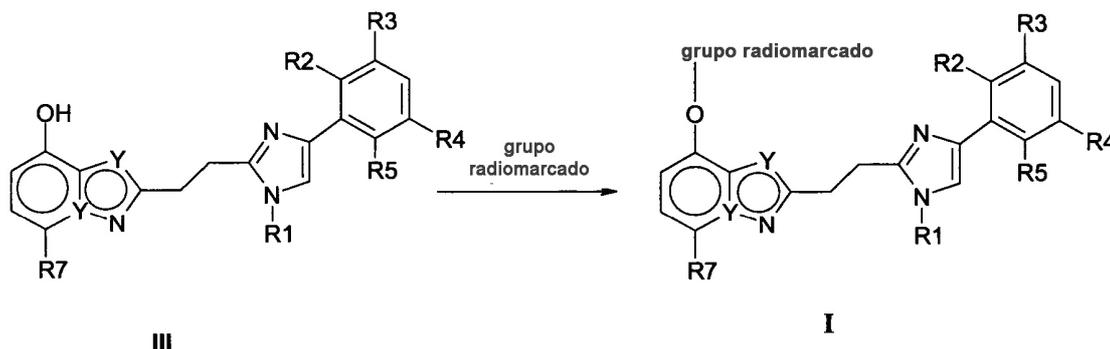
Ejemplo 1: Preparación de los compuestos de la invención

El esquema 1 representa una vía de síntesis hacia los compuestos de fórmula I de la invención, en el que R1 es un grupo radiomarcado. A menos que se indique de otra forma, en los esquemas de reacción y la discusión siguiente, R1-R7 son como se ha definido anteriormente.



Esquema 1

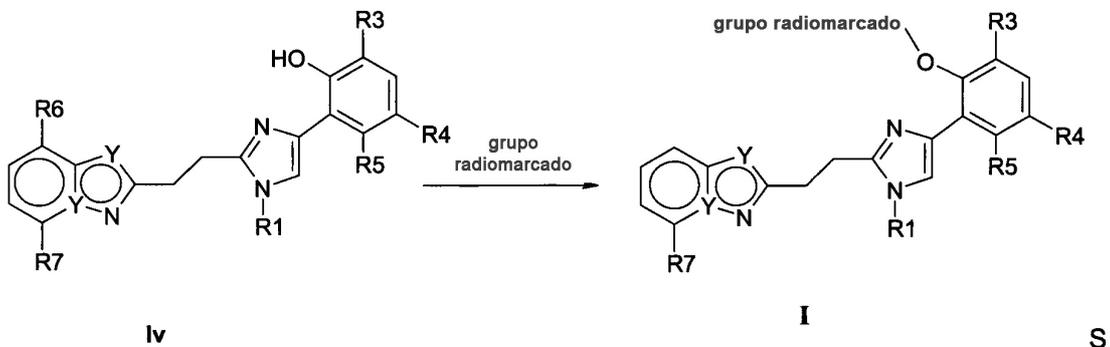
El esquema 2 representa una vía de síntesis hacia los compuestos de fórmula I de la invención en los que R6 es un grupo radiomarcado.



10

Esquema 2

El esquema 3 representa una vía de síntesis hacia los compuestos de fórmula I de la invención en los que R2 es un grupo radiomarcado.

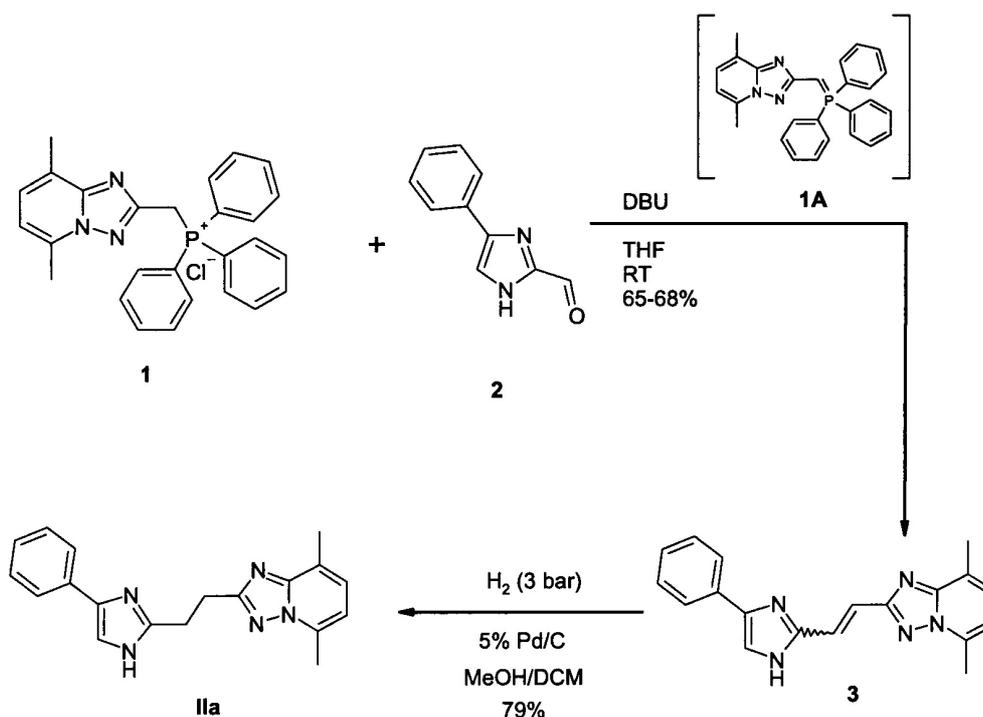


15

Esquema 3

Un ejemplo de una vía de síntesis para la síntesis del compuesto precursor PET de fórmula IIa se muestra en el esquema 4: la sal de (5,8-dimetil-[1,2,4]-triazol-[1,5-a]-piridin-2-ilmetil)-trifenil-fosfonio 1 se acopla en condiciones básicas con el 4-fenil-1H-imidazol-2-carbaldehído 2 disponible comercialmente (Anichem Inc., número de catálogo FH10994) para formar la 5,8-dimetil-2-[2-(4-fenil-1H-imidazol-2-il)-vinil]-[1,2,4]triazol-[1,5-a]piridina, compuesto 3. Las

condiciones básicas son necesarias con el fin de convertir la sal de fosfonio 1 en el compuesto iluro de Wittig 1A, que es el nucleófilo activo que condensa con el compuesto aldehído 2. Se pueden usar diferentes bases y se ha encontrado que el DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno) da los mejores resultados. El producto de la reacción de Wittig es el compuesto alqueno 3, que se aísla convenientemente con rendimiento y pureza elevados por precipitación a partir de etanol acuoso y que puede usarse directamente sin purificación adicional en la etapa siguiente. El compuesto precursor PET II se forma entonces a partir del compuesto alqueno 3 por hidrogenación en atmósfera de hidrógeno usando un catalizador de hidrogenación, p. ej. paladio al 5% sobre carbón.



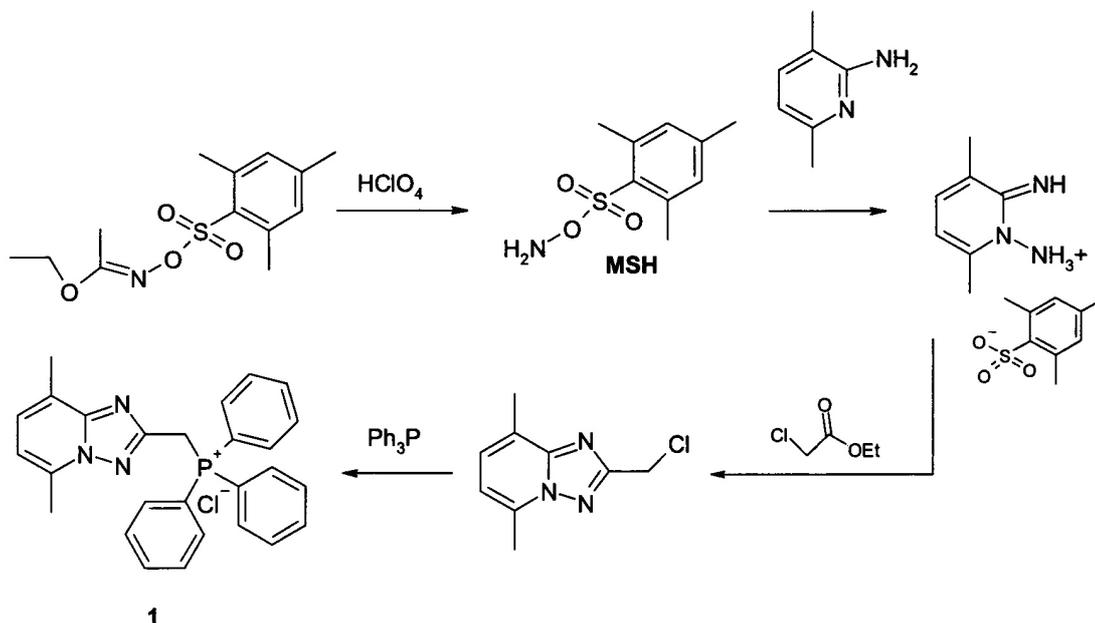
Esquema 4

10 Las síntesis del material inicial constitutivo 1 se describe brevemente en el esquema 5 y las etapas implicadas son:

1) A una disolución de O-mesitilsulfonilacetoni-hidroxamato de etilo (43,50 g, 152,4 mmoles) en 1,4-dioxano (290 ml, 3.700 mmoles) enfriada en un baño de hielo (enfriada a 8-9°C) se le añadió ácido perclórico al 70% (176,3 ml, 2,92 moles) gota a gota durante 15 minutos, manteniendo la temperatura interna por debajo de 15°C. La mezcla se diluyó a continuación con agua helada (120 ml) para precipitar el producto O-(mesitilsulfonil)hidroxilamina que se filtró, se lavó cuidadosamente con agua e inmediatamente se disolvió en (diclorometano, DCM, 50 ml) mientras todavía estaba húmedo. La fase orgánica se secó con MgSO₄ y se filtró.

15 2) La disolución obtenida de O-(mesitilsulfonil)hidroxilamina se añadió gota a gota a una disolución de 3,6-dimetil-2-piridinamina (16,4 g, 117 mmoles) disponible comercialmente en DCM (100 ml) enfriada en un baño de hielo. La mezcla se calentó entonces a temperatura ambiente durante 15 minutos. El análisis por LCMS indicó la conversión casi completa del intermedio aminado.

20 3) Se evaporó el disolvente y el residuo se disolvió en metanol (600 ml, 10.000 mmoles) seguido por la adición de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (31,438 ml, 210,22 mmoles). La disolución se agitó a TA durante 5 minutos y se añadió el éster metílico del ácido cloroacético (10,3 ml, 117 mmoles) y la disolución se agitó a temperatura ambiente, TA, durante 48 horas. Se eliminaron los volátiles a vacío. Se añadió agua y las fases orgánicas se extrajeron con EtOAc. Las fases orgánicas se lavaron con agua, salmuera, se secaron (MgSO₄) se filtraron y los compuestos volátiles se eliminaron a vacío. El residuo se cristalizó en heptano (400 ml), se filtró y se secó para obtener 2-clorometil-5,8-dimetil-[1,2,4]triazol[1,5-a]piridina (7,414 g; rendimiento = 31,5%; pureza =97%).



Esquema 5

Las síntesis de los compuestos precursores PET de fórmula II-V se realizó por métodos análogos a los descritos en el esquema 5. Los materiales iniciales y otros reactivos están disponibles comercialmente o se pueden sintetizar por métodos bien conocidos y convencionales como se describen por ejemplo en el documento WO 2009/152825.

Ejemplo 2: Síntesis del [^{11}C] Lu AE92686: 5,8-dimetil-2-[2([^{11}C -1-metil]-4-fenil-1H-imidazol-2-il)-etil]-[1,2,4]triazol[1,5-a]piridina

Producción de [^{11}C]CO₂ y yoduro de [^{11}C]metilo

Se usó un ciclotrón Scanditronix MC17 para producir ^{11}C mediante la reacción nuclear $^{14}\text{N}(p, \alpha)^{11}\text{C}$. La diana se llenó con una mezcla de oxígeno 0,05% en nitrógeno y se bombardeó con protones de 17 MeV para producir [^{11}C]CO₂. El dióxido de carbono marcado se redujo con hidruro de litio y aluminio 0,2M en tetrahidrofurano. El tratamiento con ácido yodhídrico acuoso al 56% dio [^{11}C]yoduro de metilo que después de secado con pentóxido de fósforo se usó para marcar el precursor.

Síntesis del [^{11}C]Lu AE92686

Se disolvió el precursor (2,5 mg) en 300 μl de dimetilformamida seca y se añadieron aproximadamente 2 mg de hidróxido de sodio triturado. Después de agitar vigorosamente, el líquido claro se transfirió a otro frasco. Se introdujo el yoduro de metilo marcado y la mezcla de reacción se calentó a 70°C durante 90 segundos. A continuación se añadió agua (450 μl) y la mezcla de reacción diluida se inyectó en la columna de HPLC preparativa. El vial de recogida de la fracción del producto contenía 5 mg de ácido ascórbico.

Aislamiento y formulación

El disolvente de la fracción del producto recogido a partir de la cromatografía preparativa se eliminó por medio de un evaporador rotatorio y el residuo se volvió a disolver en 5 ml de una disolución de cloruro de sodio estéril. Cuando fue necesario para los experimentos biológicos, el trazador formulado se filtró a través de un filtro estéril de 0,2 μm .

El producto se identificó por HPLC analítica usando una co-inyección del compuesto de referencia no radiactivo comparando los tiempos de retención del UV y los picos radiactivos. La tiempo de producción total, incluyendo la formulación, fue de aproximadamente 30 minutos. Una identificación más rigurosa del trazador se realizó por LC/MS.

Ejemplo 3: Ensayo farmacológico

Enzima PDE10A

La enzima PDE10A activa se prepara de varias formas para usarla en los ensayos de PDE (Loughney K. *et al.* *Gene* 1.999, 234, 109-117; Fujishige, K. *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 1.999, 266, 1.118-1.127 y Soderling, S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1.999, 96, 7.071-7.076). La PDE10A se puede expresar como proteínas de longitud total o como proteínas truncadas, con tal de que expresen el dominio catalítico. La PDE10A se puede preparar en diferentes tipos

de células, por ejemplo en células de insecto o en E. Coli. Un ejemplo de un método para obtener PDE10A catalíticamente activa es el siguiente: el dominio catalítico de PDE10A humana (aminoácidos 440-779 de la secuencia con número de registro NP 006652) se amplifica a partir de RNA total de cerebro humano por RT-PCR estándar y se clona en los sitios BamH1 y Xho1 del vector pET28a (Novagen). La expresión en Coli se realiza según protocolos estándar. Brevemente, los plásmidos de expresión se transforman en la cepa de E. Coli BL21 (DE3) y 50 ml de cultivo se inoculan con las células permitiendo que crezcan hasta un OD600 de 0,4-0,6. Antes de inducir la expresión de la proteína con IPTG 0,5mM. Después de la inducción, las células se incuban durante la noche a temperatura ambiente, después de lo cual se recogen las células por centrifugación. Las células que expresan la PDE10A se vuelven a poner en suspensión en 12 ml (50 mM TRIS-HCl-pH 8,0, MgCl₂ 1mM e inhibidores de proteasa). Las células se lisan por sonicación y después de que todas las células hayan sido lisadas, se añade Triton X100 según los protocolos de Novagen. LA PDE10A se purifica parcialmente sobre sefarsosa Q y se reúnen las fracciones más activas.

Ensayo de inhibición de la PDE10A

Un ensayo de inhibición de la PDE10A se puede realizar, por ejemplo, como sigue: el ensayo se realiza en muestras de 60 μ l que contienen una cantidad fija de la enzima PDE relevante (suficiente para convertir 20-25% del sustrato de nucleótido cíclico, un tampón (HEPES 50mM 7,6; MgCl₂ 10mM; Tween20 al 0,02%), 0,1 mg/ml de BSA, 225 pCi de sustrato de nucleótido cíclico marcado con 3H, cAMP marcado con tritio hasta una concentración final de 5nM y cantidades variables de inhibidores. Las reacciones se inician por adición del sustrato de nucleótido cíclico, y se deja que las reacciones prosigan durante una hora a temperatura ambiente antes de terminarlas mediante mezcla con 15 μ l de gránulos SPA de silicato de ytrio de 8 mg/ml (Amersham). Se dejó que los gránulos sedimentaran durante una hora en la oscuridad antes del recuento de las placas con un contador Wallac 1450 Microbeta. La señal medida se puede convertir en actividad relativa con respecto a un control no inhibido (100%) y los valores de CI50 se pueden calcular usando la extensión Xlfit de EXCEL.

En el contexto de la presente invención, el ensayo se realizó en un tampón de ensayo de 60 μ l (HEPES 50mM pH 7,6; MgCl₂ 10mM; Tween20 al 0,02%) que contenía suficiente PDE10A para convertir 20-25% de 3H-cAMP 10nM y cantidades variables de inhibidores. Después de una hora de incubación, las reacciones se terminaron por adición de 15 μ l de gránulos SPA de silicato de ytrio de 8 mg/ml (Amersham). Se dejó que los gránulos sedimentaran durante una hora en la oscuridad antes del recuento de las placas con un contador Wallac 1450 Microbeta. Los valores de la CI50 se calcularon por regresión no lineal usando el programa XLfit (IDBS).

Los resultados del ensayo de inhibición de la PDE10A mostraron que Lu AE92686 tiene una elevada afinidad por la enzima PDE10A y un valor de CI50 de 0,46 nM. Además, el Lu AE92686 es selectivo para la enzima PDE10A sobre otros receptores y enzimas cribados según los datos (tabla 1).

Tabla 1

Ensayo	Inhibición @10 μ M %	Ensayo	Inhibición @10 μ M %
A1 (h) (radioligando antagonista)	2	M5 (h) (radioligando antagonista)	17
A1 (h) (radioligando agonista)	4	NK1 (h) (radioligando agonista)	29
A2A (h) (radioligando agonista)	24	NK2 (h) (radioligando agonista)	31
A3 (h) (radioligando agonista)	32	Y1 (h) (radioligando agonista)	9
alfa 1A (h) (radioligando antagonista)	33	N neuronal insensible a alfa-BGTX (alfa 4beta 2) (radioligando agonista)	12
alfa 1B (h) (radioligando antagonista)	26	N de tipo músculo (h) (radioligando antagonista)	0
alfa 1D (h) (radioligando antagonista)	16	delta 2 (DOP) (h) (radioligando agonista)	25
alfa 2A (h) (radioligando antagonista)	13	Kappa (KOP) (radioligando agonista)	62
alfa 2B (h) (radioligando antagonista)	33	Mu (MOP)(h) (radioligando antagonista)	41
beta 1 (h) (radioligando agonista)	-4	PCP (radioligando antagonista)	-2

ES 2 539 464 T3

Ensayo	Inhibición @10µM %	Ensayo	Inhibición @10µM %
beta 2 (h) (radioligando agonista)	-6	rolipram (radioligando antagonista)	31
BZD (central) (h) (radioligando agonista)	3	5-HT1A (h) (radioligando agonista)	89
CB1 (h) (radioligando agonista)	0	5-HT1B (radioligando antagonista)	18
CCK2 (CCKB) (h) (radioligando agonista)	23	5-HT2A (h) (radioligando agonista)	3
D1 (h) (radioligando antagonista)	-3	5-HT2B) (h) (radioligando agonista)	23
D2S (h) (radioligando antagonista)	7	5-HT2C (h)(radioligando agonista)	32
D2S (h) (radioligando agonista)	18	5-HT3 (h) (radioligando antagonista)	1
D3 (h) (radioligando antagonista)	4	5-HT4e (h) (radioligando antagonista)	24
D4,4 (h) (radioligando antagonista)	47	5-HT7 (h) (radioligando agonista)	15
ETA (h) (radioligando agonista)	-3	Sigma (no selectivo) (radioligando agonista)	8
GABAA (radioligando agonista)	-18	GR (h) (radioligando agonista)	0
H1 (h) (radioligando antagonista)	-5	UT (h) (radioligando agonista)	9
H2 (h) (radioligando antagonista)	24	Canal del Ca ²⁺ (L, sitio dihidropiridina) (radioligando antagonista)	15
H3 (h) (radioligando agonista)	1	Canal del Ca ²⁺ (L, sitio ditiagem) (benzotiazepinas) (radioligando antagonista)	25
MC4 (h) (radioligando agonista)	3	Canal del Ca ²⁺ (L, sitio verapamil) (fenilalquilamina) (radioligando antagonista)	4
MT1 (ML1A) (h) (radioligando agonista)	45	Canal del Ca ²⁺ (N) (radioligando antagonista)	-8
MT3 (ML2) (radioligando agonista)	94	Canal del Na ⁺ (sitio 2) (radioligando antagonista)	36
MAO-A (radioligando antagonista)	2	Transportador de norepinefrina (h) (radioligando antagonista)	4
M1 (h) (radioligando antagonista)	-4	Transportador de dopamina (h) (radioligando antagonista)	7
M2 (h) (radioligando antagonista)	20	Transportador de GABA (radioligando antagonista)	-13
M3 (h) (radioligando antagonista)	4	Transportador de colina (CHT1) (h) (radioligando antagonista)	12
M4 (h) (radioligando antagonista)	18	Transportador 5-HT (h) (radioligando antagonista)	6

Ejemplo 4: localización de la enzima PDE10A en el cerebro

Preparación

5 El mono se sedó con cetamina (aproximadamente 10 mg/kg), se pesó y se mantuvo con una infusión constante de cetamina de 15 mg/kg/h durante el transporte. Durante el transporte, el mono se controló por oximetría de pulso y se le suministró oxígeno. Se aplicó un catéter venoso para la administración del trazador y un catéter venoso para el muestro de radiactividad y PK de la sangre. Se administró propofol hasta que el animal estaba suficientemente sedado para intubarlo. Después de la intubación, el animal se mantuvo con anestesia por inhalación de sevoflurano y ventilación artificial.

Muestras sanguíneas

Se tomó una muestra venosa de 115 μ l en el momento de la inducción de la anestesia y a la mitad del experimento para la estimación de electrolitos, glucosa, hematocrito y glucosa.

10 Las muestras sanguíneas (0,2 ml) para la determinación de la radiactividad se tomaron a 0,5, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 y 90 minutos después de la inyección. Las muestras se etiquetaron con el tiempo, la fecha, el tiempo de muestreo con respecto a la inyección y el número de proyecto.

Las muestras sanguíneas (2 ml) para el análisis de metabolitos se obtuvieron a 5, 30 y 90 minutos después de la inyección del trazador.

15 La muestra sanguínea (1,3 ml) para la evaluación de la fracción libre del trazador en el plasma se toma inmediatamente antes de cada inyección de trazador.

20 Para el análisis del PK del fármaco de estudio, se recogieron muestras sanguíneas de 0,5 ml 1 minutos después de la finalización de cada infusión y a los 0,5, 15, 30, 60 y 90 minutos después de la inyección del compuesto radiomarcado. Las muestras se recogieron en tubos que contenían K₃EDTA (Microvette 500 K3E, Sarstedt), que se invirtieron varias veces para asegurar la mezcla del anticoagulante y la sangre, y se almacenaron en hielo. Las muestras sanguíneas se centrifugaron en 30 minutos y el plasma se transfirió a un tubo de polipropileno limpio. Las muestras se almacenaron a -80°C.

La cantidad total de sangre tomada fue de menos de 35 ml (eligiendo pesos de los monos de aproximadamente 5 kg).

25 Anestesia: el mono se intubó y se controló mediante un respirador con una concentración de sevoflurano de aproximadamente 1,4-4%.

Infusión: Ringer-Acetato (Fresenius-Kabi) 0,5-1 ml/kg/h.

Control

30 A lo largo del estudio PET se controlaron la temperatura corporal, velocidad cardiaca, ECG, pCO₂, pO₂, SaO₂ y presión sanguínea.

Despertar

Se administró 1 ml de robinil/neostigmina 2,5 mg cuando el mono mostró signos de respiración espontánea. Se administraron 300 mg/ml de glucosa cuando fue necesario dependiendo del estado de la glucosa en sangre según las medidas realizadas.

35 *Estudios de ¹¹C-PET*

Se usó una inyección en bolo (iv) de aproximadamente 5-20 MBq/kg de [¹¹C]Lu AE92686 en todos los estudios. El escaneo PET y el muestreo de la sangre arterial comenzó al iniciarse la administración del compuesto radiomarcado.

PET: protocolo de emisión

	Número de imágenes	Tiempo acumulado (min)
12 imágenes de 10 segundos	1-12	2
6 imágenes de 30 segundos	13-18	5
5 imágenes de 2 minutos	19-23	15
5 imágenes de 5 minutos	24-28	40
5 imágenes de 10 minutos	29-33	90

40

Tiempo total del examen: 90 minutos, 33 imágenes.

Reconstrucción: filtro Hann 4, matriz 128.

Datos del análisis por PET

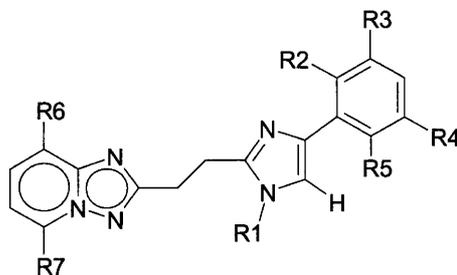
- 5 Los resultados muestran que el [11C]Lu AE92686 entra fácilmente en el cerebro alcanzando picos de concentración en regiones de tejido aproximadamente 10-15 minutos después de la inyección seguido por aclarado de las regiones cerebrales conocidas por ser ricas en PDE10A con mayor captación y retención observada en el cuerpo estriado (figura 1 y figura 3). La concentración de [11C]Lu AE92686 fue baja en el cerebelo (figura 1), una región del cerebro conocida por presentar un nivel muy bajo de PDE10A.

Ejemplo 5: Saturación de los enzima PDE10A en el cerebro

- 10 El PF25545920 inhibidor selectivo de la PDE10A (*J. Med. Chem.* 2009, 52 (16), pág. 5.188-5.196) se administró intravenosamente, como una infusión durante 15 minutos, empezando 30 minutos antes de la inyección del compuesto radiomarcado [11C]Lu AE92686. El PF2545920 se disolvió en HPbetaCD al 10% en NaCl 0,9%, pH 4. Se administraron tres dosis de bloqueo de PF2545920, a concentraciones del fármaco de 0,11 mg/kg (para la dosis baja), 0,6 mg/kg (para la dosis media) y 1,5 mg/kg (para la dosis elevada).
- 15 Se midió la ocupación porcentual de los sitios de unión en la PDE10A en función de la concentración de la sustancia de bloqueo (figura 1 y figura 2) así como la variabilidad entre individuos de la cinética cerebral del [11C]Lu AE92686 (figura 2). El cerebelo ha sido identificado como el tejido de referencia debido a su bajo contenido de PDE10A. En función de estas medidas, se obtuvo una curva de dosis-respuesta (figura 4) que muestra la correlación entre la dosis del PF2545920 inhibidor de la PDE10 y la ocupación de los sitios de unión de la PDE10A del cuerpo estriado.
- 20 También se midió la cinética del ligando PET [11C]Lu AE92686 en el cuerpo estriado a dosis diferentes en dos monos diferentes (figura 3).

REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto según la fórmula I:



I

- 5 que comprende al menos un isótopo elegido entre el grupo que consiste en ^{11}C , ^{15}O y ^{18}F , en el que R1-R7 se eligen como sigue:
- a) cuando R1 es un grupo radiomarcado que comprende al menos un isótopo elegido entre el grupo que consiste en ^{11}C , ^{15}O y ^{18}F , entonces R2-R7 se eligen individualmente entre H, F, metilo o metoxi;
- 10 b) cuando uno o más de R2-R7 es un grupo radiomarcado que comprende un isótopo elegido entre el grupo que consiste en ^{11}C , ^{15}O y ^{18}F , entonces R1 se elige entre el grupo que consiste en H; alquilo C1-C6, tal como metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo, isobutilo; alquil (C1-C6)-cicloalquilo C3-C8, tal como ciclopropilmetilo; hidroxialquilo C1-C6 tal como hidroxietilo, fluoropropilo, fluorometilo; y fluorobutilo.
- o una sal o una forma hidratada del compuesto.
- 2.- El compuesto según la reivindicación 1, en el que R3, R4 y R5 son H y R7 es CH_3 .
- 15 3.- El compuesto según la reivindicación 1a) y 2, en el que R2 es H y R6 es CH_3 .
- 4.- El compuesto según la reivindicación 3, en el que R1 se elige entre el grupo que consiste en $^{11}\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2^{11}\text{CH}_3$, $^{11}\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2^{11}\text{CH}_3$, $^{11}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $^{11}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^{11}\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2^{18}\text{F}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^{18}\text{F}$ y $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^{18}\text{F}$.
- 5.- El compuesto según la reivindicación 4, en el que R1 es $^{11}\text{CH}_3$ ($[^{11}\text{C}]$ metilo).
- 20 6.- El compuesto según la reivindicación 1b) y 2, en el que R1 y R6 son CH_3 .
- 7.- El compuesto según la reivindicación 6, en el que R2 es O^{11}CH_3 ($[^{11}\text{C}]$ metoxi).
- 8.- El compuesto según la reivindicación 1b) y 2, en el que R1 y R6 son CH_3 .
- 9.- El compuesto según la reivindicación 8, en el que R2 es ^{18}F .
- 10.- El compuesto según las reivindicaciones 1b) y 2, en el que R1 es CH_3 y R2 es H.
- 25 11.- El compuesto según la reivindicación 10, en el que R6 es O^{11}CH_3 ($[^{11}\text{C}]$ metoxi).
- 12.- El compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto se elige entre el grupo que consiste en:
- 5,8-dimetil-2-[2-([^{11}C -1-metil]-4-fenil-1H-imidazol-2-il)-etil]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridina,
- 8-[^{11}C]metoxi-5-metil-2-[2-(1-metil-4-fenil-1H-imidazol-2-il)-etil]-[1,2,4]triazolo[1,5-a] piridina,
- 2-[2-[4-(2-[^{11}C]metoxi-fenil)-1-metil-1H-imidazol-2-il)-etil]-5,8-dimetil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]piridina, y
- 30 2-[2-[4-(2-[^{18}F]fluoro-fenil)-1-metil-1H-imidazol-2-il)-etil]-5,8-dimetil-[1,2,4]triazolo[1,5-a] piridina.
- 13.- Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para uso como un ligando para PET.
- 14.- El compuesto para usarlo según la reivindicación 13 para la determinación de la ocupación de los sitios de unión de un ligando de la enzima PDE10A a la enzima PDE10A.
- 15.- Un método para la preparación de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

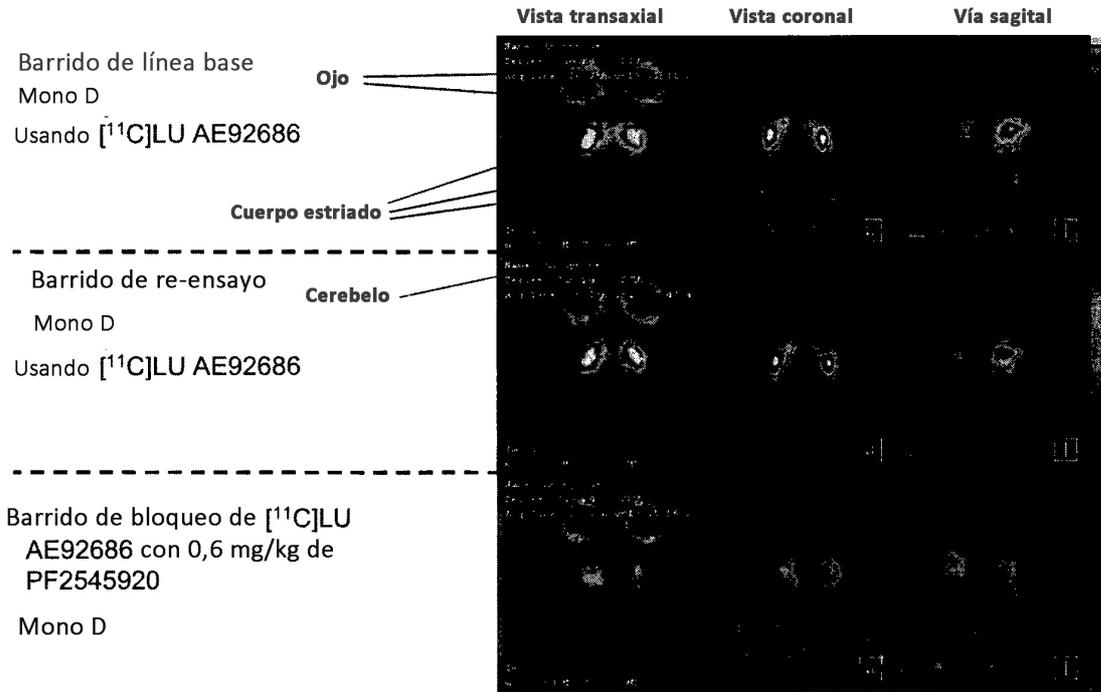


Figura 1

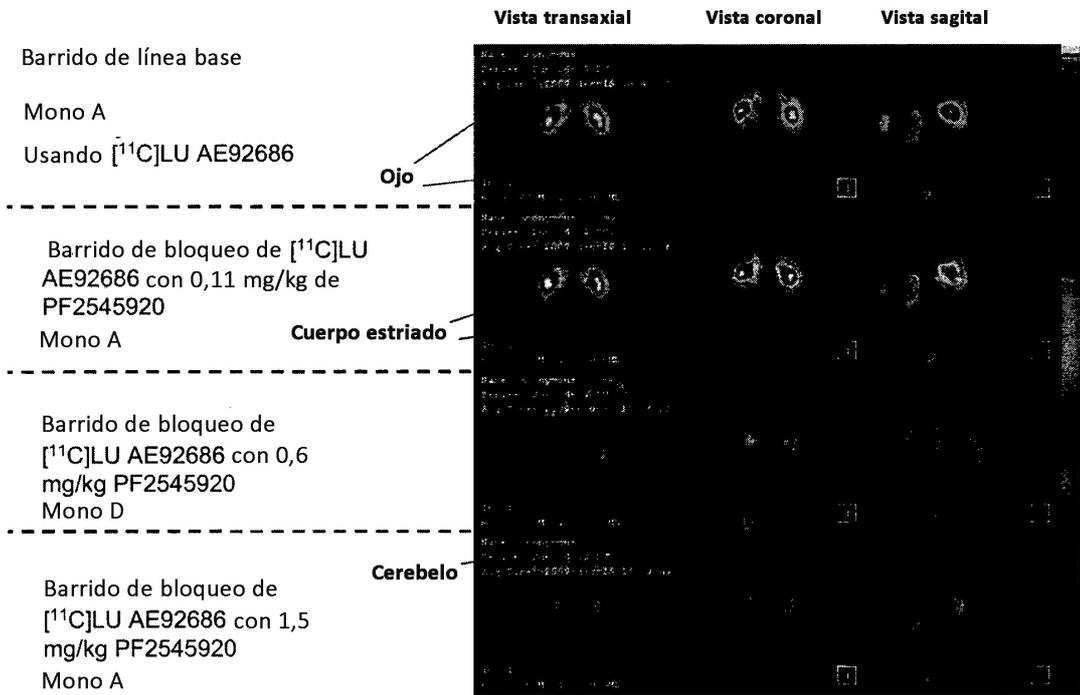


Figura 2

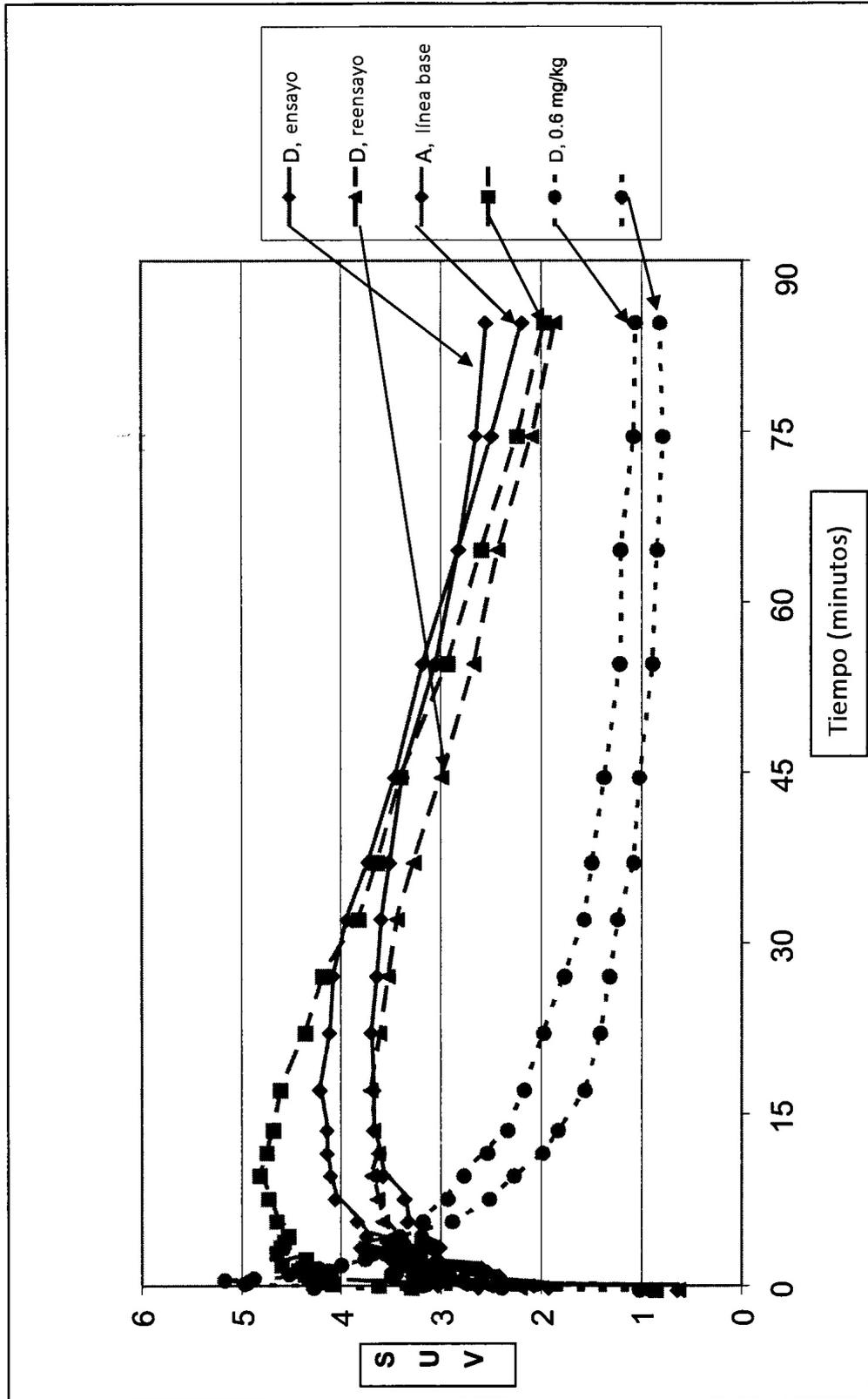


Figura 3

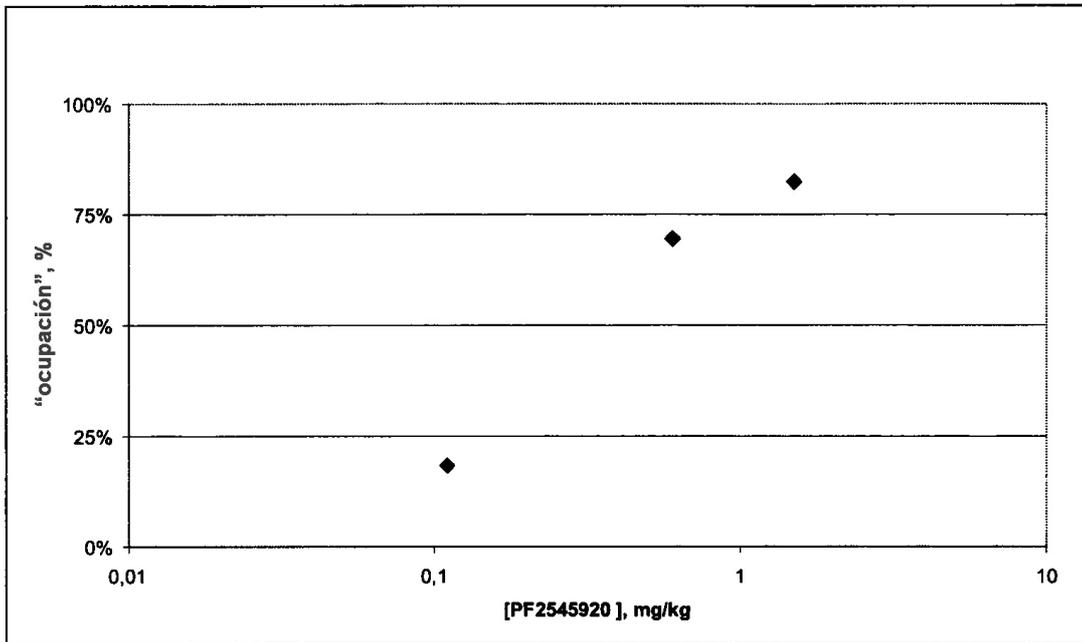


Figura 4