



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 274 973**

51 Int. Cl.:
C07D 471/04 (2006.01)
C07F 7/22 (2006.01)
C07F 13/00 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 51/00 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02728893 .5**
86 Fecha de presentación : **23.04.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1381604**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.01.2004**

54 Título: **Inhibidores de la agregación de placas amiloides y agentes de obtención de imágenes diagnósticas.**

30 Prioridad: **23.04.2001 US 285282 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2007

73 Titular/es:
**The Trustees of the University of Pennsylvania
Center for Technology Transfer
3160 Chestnut Street, Suite 200
Philadelphia, Pennsylvania 19104-6283, US**

72 Inventor/es: **Kung, Hank F.;**
Kung, Mei-Ping y
Zhuang, Zhi-Ping

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 274 973 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

Inhibidores de la agregación de placas amiloides y agentes de obtención de imágenes diagnósticas.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a compuestos bioactivos novedosos, a métodos de obtención de imágenes diagnósticas utilizando compuestos radiomarcados y a métodos para obtener los compuestos radiomarcados.

10 **Técnica anterior**

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo caracterizado por disminución cognitiva, pérdida irreversible de la memoria, desorientación y deterioro del lenguaje. El examen postmortem de cortes de cerebro con EA revela abundantes placas seniles (PS) compuestas de péptidos β -amiloides (β A) y numerosos ovillos neurofibrilares (ONF) formados por filamentos de proteínas tau altamente fosforiladas (para revisiones recientes y menciones adicionales, véase Ginsberg, S. D., *et al.*, "Molecular Pathology of Alzheimer's Disease and Related Disorders", en *Cerebral Cortex: Neurodegenerative and Age-related Changes in Structure and Function of Cerebral Cortex*, Kluwer Academic/Plenum, NY (1999), páginas 603-654; Vogelsberg-Ragaglia, V., *et al.*, "Cell Biology of Tau and Cytoskeletal Pathology in Alzheimer's Disease", *Alzheimer's Disease*, Lippincot, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (1999), páginas 359-372). La EA familiar (EAF) está producida por múltiples mutaciones en los genes de la proteína precursora de amiloide (PPA), la presenilina 1 (PS1) y la presenilina 2 (PS2) (Ginsberg, S. D., *et al.*, "Molecular Pathology of Alzheimer's Disease and Related Disorders", en *Cerebral Cortex: Neurodegenerative and Age-related Changes in Structure and Function of Cerebral Cortex*, Kluwer Academic/Plenum, NY (1999), páginas 603-654; Vogelsberg-Ragaglia, V., *et al.*, "Cell Biology of Tau and Cytoskeletal Pathology in Alzheimer's Disease", *Alzheimer's Disease*, Lippincot, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (1999), páginas 359-372).

Aunque no se comprenden completamente los mecanismos exactos que subyacen a la EA, todas las mutaciones patógenas en la EAF estudiadas aumentan la producción de más forma larga de 42 - 43 aminoácidos amiloidogénicos del péptido β A. Por tanto, al menos en la EAF, la alteración de la producción de β A parece ser suficiente para inducir una cascada de acontecimientos que conducen a la neurodegeneración. De hecho, la hipótesis de la cascada amiloide sugiere que la formación de agregados de β A fibrilar extracelular en el cerebro podría ser un acontecimiento fundamental en la patogénesis de la EA (Selkoe, D. J., "Biology of B-amyloid Precursor Protein and the Mechanism of Alzheimer's Disease", *Alzheimer's Disease*, Lippincot, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (1999), páginas 293-310; Selkoe, D. J., *J. Am. Med. Assoc.* 283: 1615-1617 (2000); Naslund, J., *et al.*, *J. Am. Med. Assoc.* 283: 1571-1577 (2000); Golde, T. E., *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1502: 172-187 (2000)).

En la actualidad se están evaluando diversos enfoques para intentar inhibir la producción y reducir la acumulación de β A fibrilar en el cerebro como posibles tratamientos para la EA (Skovronsky, D. M. y Lee, V. M., *Trends Pharmacol. Sci.* 21: 161-163 (2000); Vassar, R., *et al.*, *Science* 286: 735-741 (1999); Wolfe, M. S., *et al.*, *J. Med. Chem.* 41: 6-9 (1998); Moore, C. L., *et al.*, *J. Med. Chem.* 43: 3434-3442 (2000); Findeis, M. A., *Biochimica et Biophysica Acta* 1502: 76-84 (2000); Kuner, P., Bohmann, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 275: 1673-1678 (2000)). Por tanto, es de gran interés desarrollar ligandos que se unan específicamente a los agregados de β A fibrilar. Dado que las PS extracelulares son dianas accesibles, estos nuevos ligandos podrían utilizarse como herramientas diagnósticas *in vivo* y como sondas para visualizar la deposición progresiva de β A en estudios de amiloidogénesis de la EA en pacientes vivos.

Para este fin, se han notificado varios enfoques interesantes para desarrollar ligandos específicos para los agregados de β A fibrilar (Ashburn, T. T., *et al.*, *Chem. Biol.* 3: 351-358 (1996); Han, G., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 118:4506-4507 (1996); Klunk, W. E., *et al.*, *Biol. Psychiatry* 35: 627 (1994); Klunk, W. E., *et al.*, *Neurobiol. Aging* 16: 541-548 (1995); Klunk, W. E., *et al.*, *Society of Neuroscience Abstract* 23: 1638 (1997); Mathis, C. A., *et al.*, *Proc. XIIth Intl. Symp. Radiopharm. Chem., Uppsala, Suecia*: 94-95 (1997); Lorenzo, A. y Yankner, B. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 12243-12247 (1994); Zhen, W., *et al.*, *J. Med. Chem.* 42: 2805-2815 (1999)). El enfoque más atractivo se basa en crisamina G (CG) altamente conjugada y Congo rojo (CR) y se ha utilizado este último para la tinción fluorescente de las PS y los ONF en cortes de cerebro con EA postmortem (Ashburn, T. T., *et al.*, *Chem. Biol.* 3: 351-358 (1996); Klunk, W. E., *et al.*, *J. Histochem. Cytochem.* 37: 1273-1281 (1989)). Las constantes de inhibición (K_i) para la unión a los agregados de β A fibrilar de CR, CG, y 3'-bromo y 3'-yodo derivados de CG son de 2.800, 370, 300 y 250 nM, respectivamente (Mathis, C. A., *et al.*, *Proc. XIIth Intl. Symp. Radiopharm. Chem., Uppsala, Suecia*: 94-95 (1997)). Se ha demostrado que estos compuestos se unen selectivamente a los agregados peptídicos de β A (1-40) *in vitro* así como a los depósitos de β A fibrilar en cortes de cerebro con EA (Mathis, C. A., *et al.*, *Proc. XIIth Intl. Symp. Radiopharm. Chem., Uppsala, Suecia*: 94-95 (1997)).

La amiloidosis es un estado caracterizado por la acumulación de diversas proteínas fibrilares insolubles en los tejidos de un paciente. Un depósito amiloide se forma por la agregación de proteínas amiloides, seguido por la combinación adicional de agregados y/o proteínas amiloides.

Además del papel de los depósitos amiloides en la enfermedad de Alzheimer, se ha demostrado la presencia de depósitos amiloides en enfermedades tales como la Fiebre mediterránea, síndrome de Muckle-Wells, mieloma idiopático, polineuropatía amiloidótica, cardiomiopatía amiloidótica, amiloidosis senil sistémica, polineuropatía amiloidótica, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis, síndrome de Down, encefalopatía esponjiforme ovina, enfermedad

de Creutzfeldt-Jacob, Kuru, síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker, carcinoma medular de tiroides, depósitos amiloides aislados en la aurícula (Isolate atrial amyloid), amiloide β_2 -microglobulina en pacientes en diálisis, miositis por cuerpos de inclusión, depósitos β_2 -amiloides en enfermedad degenerativa muscular, e insulinoma de los islotes de Langerhans en diabetes tipo II.

Por tanto, se ha buscado con avidez un método simple no invasivo para detectar y cuantificar los depósitos amiloides en un paciente. En la actualidad, la detección de los depósitos amiloides supone análisis histológicos de materiales de biopsia o autopsia. Ambos métodos tienen inconvenientes. Por ejemplo, una autopsia sólo puede utilizarse para un diagnóstico postmortem.

La obtención de imágenes directa de los depósitos amiloides *in vivo* es difícil, ya que los depósitos tienen muchas de las mismas propiedades físicas (por ejemplo, densidad y contenido en agua) que los tejidos normales. Los intentos para obtener imágenes de los depósitos amiloides utilizando resonancia magnética nuclear (RMN) y tomografía computerizada (TC) han sido decepcionantes y han detectado depósitos amiloides sólo en ciertas condiciones favorables. Además, los esfuerzos para marcar los depósitos amiloides con anticuerpos, proteína P amiloide sérica u otras moléculas sonda, han proporcionado cierta selectividad en la periferia de los tejidos, pero han proporcionado escasa obtención de imágenes del interior de los tejidos.

Los posibles ligandos para detectar agregados de βA en el cerebro vivo deben atravesar la barrera hematoencefálica intacta. Por tanto, la captación en el cerebro puede mejorarse utilizando ligandos con tamaño molecular relativamente pequeño (en comparación con Congo rojo) y lipofilicidad aumentada. Las tioflavinas altamente conjugadas (S y T) se utilizan comúnmente como colorantes para teñir los agregados de βA en el cerebro de personas con EA (Elhaddaoui, A., *et al.*, *Biospectroscopy 1*: 351-356 (1995)). Estos compuestos se basan en benzotiazol, que es relativamente pequeño en su tamaño molecular. Sin embargo, las tioflavinas contienen una amina cuaternaria iónica, que está cargada permanentemente y que es desfavorable para la captación por el cerebro.

Por tanto, sería útil tener una técnica no invasiva para la obtención de imágenes y la cuantificación de los depósitos amiloides en un paciente. Además, sería útil tener compuestos que inhiben la agregación de las proteínas amiloides para formar depósitos amiloides y un método para determinar la capacidad de un compuesto para inhibir la agregación de las proteínas amiloides.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona compuestos novedosos de fórmula III o III' que se unen preferentemente a los agregados amiloides.

La presente invención proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula III o III', y un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona composiciones diagnósticas que comprenden un compuesto radiomarcado de fórmula III o III', y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona adicionalmente el uso de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula III o III' y un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable para la fabricación de un medicamento para inhibir la agregación de placas amiloides.

La invención proporciona además el uso de una composición diagnóstica que comprende un compuesto radiomarcado de fórmula III o III' y un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable para la fabricación de un agente para la obtención de imágenes de los depósitos amiloides.

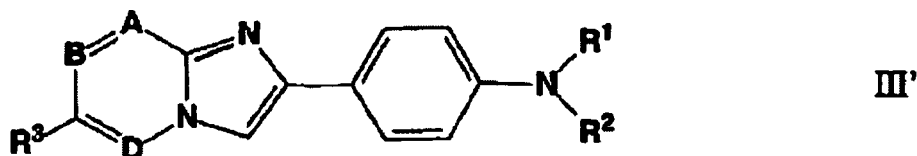
Un aspecto adicional de esta invención se refiere a métodos y productos intermedios útiles para sintetizar amiloide inhibiendo y obteniendo imágenes de los compuestos de fórmula III o III' descritos en el presente documento.

Breve descripción de la figura

La figura 1A y la figura 1B representan compuestos representativos de la presente invención y los datos de unión para estos compuestos.

Descripción detallada de la invención

En una primera realización, la invención se refiere a compuestos de fórmula III':



ES 2 274 973 T3

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

A, B y D son CH o N,

5 siempre que no más de dos de A, B y D sean N;

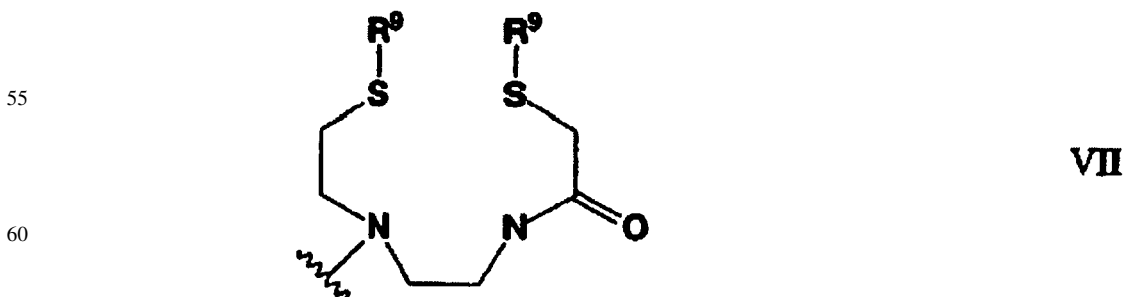
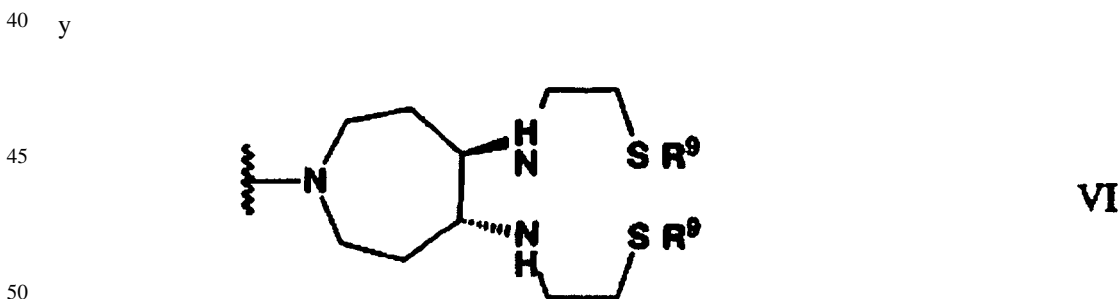
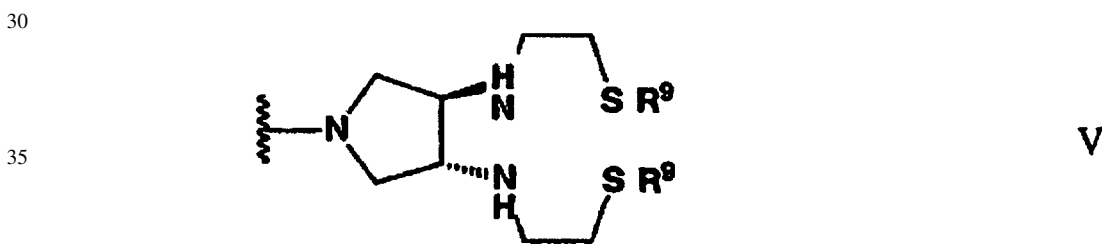
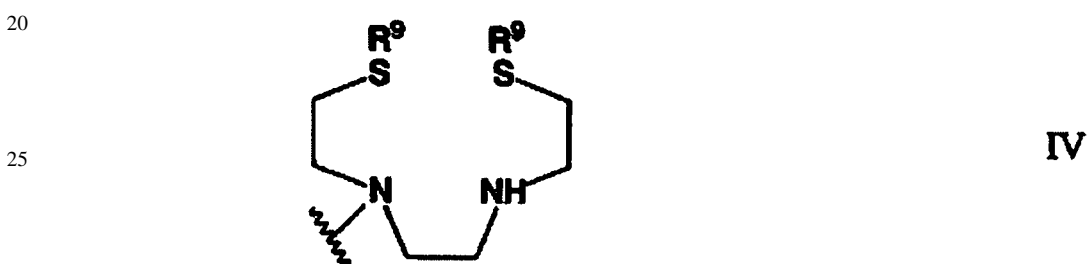
R³ es Br, I, F, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹²³I, ¹⁸F, ⁷⁶Br, ⁷⁷Br, haloalquilo, Sn(alquilo)₃ o -L-Ch;

10 R¹ y R² son independientemente hidrógeno, alquilo C₁₋₄, aminoalquilo C₂₋₄, haloalquilo C₁₋₄, halo(aril C₆₋₁₂) alquilo, -L-Ch, o R¹ y R² se toman junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros que tiene opcionalmente O, S o NR⁵ en dicho anillo, en la que

R⁵ es hidrógeno o alquilo C₁₋₄.

15 L es un enlace covalente, -(CH₂)_n- o -(CH₂)_n-C(O)- en la que n es 1-5; y

Ch es un ligando tetradentado que puede complejarse con un metal, tal como un ligando seleccionado del grupo que consiste en:



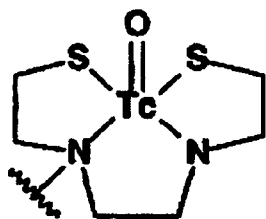
65 en las que R⁹ es hidrógeno o un grupo protector de azufre, tal como metoximetilo, metoxietoximetilo, p-metoxibencilo o bencilo;

con la condición de que sólo uno de R¹, R² y R³ pueda ser -L-Ch.

ES 2 274 973 T3

En esta realización, los compuestos que tienen ligandos Ch, tales como los de fórmulas VIII, IX, X y XI se complejan con ^{99m}Tc-pertecnetato, tal como se describe en el presente documento para formar quelatos metálicos en los que Ch•Tc se selecciona del grupo que consiste en:

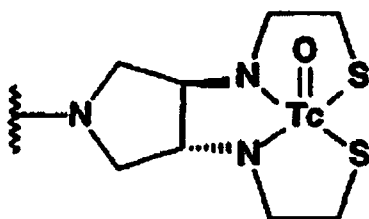
5



VIII

10

15

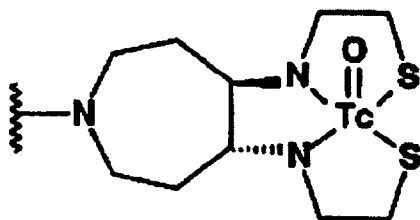


IX

20

25 y

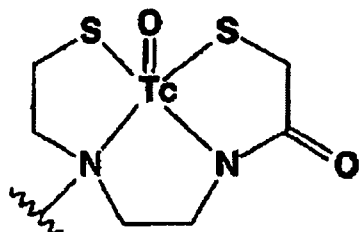
30



X

35

40



XI

45

Adicionalmente, un radioisótopo de renio puede complejarse con el ligando de Ch.

50

Valores útiles de R³ son Br, I, F, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹²³I, ¹⁸F, ⁷⁶Br, ⁷⁷Br o ¹⁸F/fluoroalquilo (C₁₋₅). Valores especialmente adecuados de R³ son ¹⁸F/fluorometilo, ¹⁸F/fluoroetilo, ¹⁸F/fluoropropilo, ¹⁸F/fluorobutilo o ¹⁸F/fluoropentilo. Las realizaciones preferidas también incluyen productos intermedios útiles en la preparación de compuestos de fórmula III' en la que R³ es Sn(alquilo)₃.

55

En un grupo preferidos de compuestos, A y B son CH, y D es N. En otro grupo preferido de compuestos, A y D son CH, y B es N. En otro grupo preferido de compuestos, B y D son CH, y A es N.

60

Compuestos preferidos son los de fórmula III' en la que R¹ y R² son independientemente uno de hidrógeno, alquilo C₁₋₄, haloalquilo C₁₋₄, halofenilalquilo (C₁₋₄), o se toman junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros que tiene opcionalmente O o NR⁶ en dicho anillo, en la que R⁶ es hidrógeno o alquilo C₁₋₄. valores útiles de R¹ y R² incluyen, independientemente, hidrógeno, metilo, etilo, propilo, butilo, *t*-butilo, isobutilo, 3-fluoropropilo, 4-fluorobutilo, o 4-fluorobencilo, o R¹ y R² se toman junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de piperidinilo que tiene NR⁶ en dicho anillo, en la que R⁶ es hidrógeno o metilo. Lo más preferiblemente R¹ y R² son metilo.

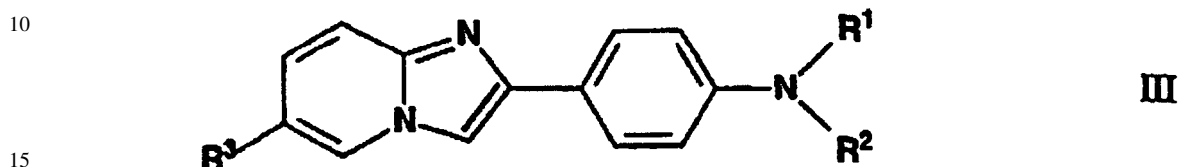
65

Otro grupo preferido de compuestos son compuestos de fórmula III' en la que R¹ es -L-Ch, R² es hidrógeno o metilo, y R³ es I o metilo. Un Ch preferido es de fórmula IV. Un L preferido es -(CH₂)_n- en la que n es 1, 2 ó 3.

ES 2 274 973 T3

En una realización separada, los compuestos de fórmula III' tienen grupos R¹ y R² tal como se definió anteriormente, y R³ es -LCh, en la que L es un enlace covalente, -(CH₂)_n- o -(CH₂)_n-C(O)- en la que n es 0 - 5, y Ch es un ligando tetradentado que puede complejarse con un metal, tal como se definió anteriormente. Lo más preferiblemente, L es -(CH₂)_n-, en la que n es 0, Ch es de fórmula XI, y R¹ y R² son independientemente hidrógeno o alquilo C₁₋₄. En esta realización, lo más preferible es que R¹ y R² sean ambos metilo.

La presente invención también se refiere a compuestos de fórmula III:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

en la que:

R³ es Br, I, F, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹²³I, ¹⁸F, ⁷⁶Br, ⁷⁷Br o Sn(alquilo)₃;

R¹ y R² son independientemente hidrógeno, alquilo C₁₋₄, aminoalquilo C₁₋₄, haloalquilo C₁₋₄, halo(aril C₆₋₁₂)alquilo, o R¹ y R² se toman junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros que tiene opcionalmente O, S o NR⁵ en dicho anillo, en la que

R⁵ es hidrógeno o alquilo C₁₋₄.

Valores útiles de R³ son Br, I, F, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹²³I, ¹⁸F, ⁷⁶Br, o ⁷⁷Br. Valores especialmente adecuados de R³ son ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹²³I, ¹⁸F, ⁷⁶Br, o ⁷⁷Br, más preferiblemente ¹²³I, ¹³¹I, ⁷⁶Br o ⁷⁷Br, y lo más preferiblemente ¹²³I o ¹²⁵I. Las realizaciones preferidas también incluyen productos intermedios útiles en la preparación de compuestos de fórmula III en la que R³ es Sn(alquilo)₃.

Compuestos preferidos son los de fórmula III en la que R¹ y R² son independientemente uno de hidrógeno, alquilo C₁₋₄, haloalquilo C₁₋₄, halofenil(C₁₋₄)alquilo, o se toman junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros que tiene opcionalmente O o NR⁶ en dicho anillo, en la que R⁶ es hidrógeno o alquilo C₁₋₄. Valores útiles de R¹ y R² incluyen, independientemente, hidrógeno, metilo, etilo, propilo, butilo, *t*-butilo, isobutilo, 3-fluoropropilo, 4-fluorobutilo, o 4-fluorobencilo, o R¹ y R² se toman junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de piperidinilo que tiene NR⁶ en dicho anillo, en el que R⁶ es hidrógeno o metilo. Lo más preferiblemente, R¹ y R² son metilo.

También debe entenderse que se considera que la presente invención incluye estereoisómeros así como isómeros ópticos, por ejemplo, mezclas de enantiómeros así como individual enantiómeros y diastereómeros, que surgen como consecuencia de la asimetría estructural en los compuestos seleccionados de las presentes series.

Los compuestos de fórmula III o III' también pueden estar solvatados, especialmente hidratados. La hidratación puede producirse durante la fabricación de los compuestos o de las composiciones que comprenden los compuestos, o la hidratación puede producirse a lo largo del tiempo debido a la naturaleza higroscópica de los compuestos. Además, los compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas, así como solvatadas, 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 fines de la presente invención.

Cuando cualquier variable se da más de una vez en cualquier constituyente o en la fórmula III o III', su definición en cada aparición es independiente de su definición en cualquier otra aparición. Además, las combinaciones de sustituyentes y/o variables sólo son permisibles si tales combinaciones dan como resultado compuestos estables.

Otro aspecto de esta invención se refiere a métodos para preparar los compuestos de fórmula III o III'.

Los complejos de Tc-99m pueden prepararse tal como sigue. Una pequeña cantidad de compuesto no radiomarcado (1 - 2 mg) se disuelve en 100 μL de EtOH y se mezcla con 200 μL de HCl (1 N) y 1 mL de disolución de Sn-glucoheptonato (que contiene 8 - 32 μg de SnCl₂ y 80 - 320 μg de Na-glucoheptonato, pH 6,67) y 50 μL de disolución de EDTA (0,1 N). Entonces se añaden [^{99m}Tc]Pertecnetato (100 - 200 μL; que oscila desde 2-20 mCi) y solución salina. La reacción se calienta durante 30 minutos a 100°C, después se enfría hasta temperatura ambiente. La mezcla de reacción se analiza en CCF (EtOH : NH₃ conc. 9:1) para la determinación de la formación del producto y comprobar la pureza. La mezcla puede neutralizarse con tampón fosfato hasta pH 5,0.

ES 2 274 973 T3

La presente invención se refiere además a un método para preparar un complejo de tecnecio-99m según la presente invención haciendo reaccionar tecnecio-99m en la forma de un pertecnetato en presencia de un agente reductor y opcionalmente un quelante adecuado con un compuesto apropiado que contiene Ch.

5 El agente reductor sirve para reducir el Tc-99m pertecnetato que se eluye de un generador de molibdeno-tecnecio en una solución salina fisiológica. Agentes reductores adecuados son, por ejemplo, ditionita, formamida, ácido sulfínico, disulfinato de diaminoetato o agentes reductores metálicos adecuados tales como Sn(II), Fe(II), Cu(I), Ti(III) o Sb(III). Se ha demostrado que Sn (II) es particularmente adecuado.

10 Para la reacción de formación de complejo mencionada anteriormente; el tecnecio-99m se hace reaccionar con un compuesto apropiado de la invención como una sal o en la forma de tecnecio unido a quelantes relativamente débiles. En este último caso, el complejo deseado de tecnecio-99m se forma mediante intercambio de ligandos. Ejemplos de quelante adecuados para el radionúclido son los ácidos dicarboxílicos, tales como ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido ortoftálico, ácido málico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido salicílico o derivados de estos ácidos; compuestos de fósforo tales como pirofosfatos; o enolatos. 15 El ácido cítrico, ácido tartárico, ácido ascórbico, ácido glucoheptónico o un derivado de los mismos son quelantes particularmente adecuados para este fin, porque un quelato de tecnecio-99m con uno de estos quelantes experimenta el intercambio de ligandos de manera particularmente fácil.

20 El procedimiento utilizado más comúnmente para preparar complejos de $[\text{Tc}^{\text{V}}\text{O}]^{+3}\text{N}_2\text{S}_2$ se basa en la reducción de cloruro de estaño (II) de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ pertecnetato, el material de partida común. El procedimiento de marcaje normalmente se basa en una reacción de intercambio de ligandos de Tc-99m entre Tc-99m (Sn)-glucoheptonato y el ligando de N_2S_2 . La preparación de cloruro de estaño (II) y su conservación en una forma de estaño (II) concordante es fundamentalmente importante para el éxito de la reacción de marcaje. Para estabilizar el ion estannoso sensible al aire, es 25 una práctica común en la medicina nuclear utilizar un kit liofilizado, en el que el ion estannoso está en una forma de polvo liofilizado mezclado con una cantidad en exceso de glucoheptonato en un gas inerte como nitrógeno o argón. La preparación de los kits de cloruro estannoso liofilizado / glucoheptonato de sodio garantiza que la reacción de marcaje es reproducible y predecible. Los ligandos de N_2S_2 normalmente son sensibles al aire (los tioles se oxidan fácilmente por el aire) y hay reacciones posteriores que conducen a la descomposición de los ligandos. El método más 30 conveniente y predecible para conservar los ligandos es producir kits liofilizados que contienen 100 - 500 μg de los ligandos bajo argón o nitrógeno.

Un séptimo método caracterizado por la formación de imidazo[1,2a]piridina de fórmula III haciendo reaccionar 2-amino-5-bromo-piridina con cualquiera de: a) una 4'-halo-1-halo-benzofenona en un disolvente en presencia 35 de bicarbonato de sodio para formar un producto intermedio de imidazo[1,2a]piridina, y recoger el producto de la reacción; seguido por hacer reaccionar dicho producto intermedio con una monoalquilamina, diaquilamina o amina heterocíclica en presencia de óxido de paladio II para formar una imidazo[1,2a]piridina de fórmula III, o b) una 4'-amino-1-halo-acetofenona en un disolvente en presencia de bicarbonato de sodio para formar una imidazo[1,2a] 40 piridina de fórmula III, y recoger el producto de la reacción; y opcionalmente hacer reaccionar una imidazo[1,2a]piridina de fórmula III con (alquil)₃Sn en un disolvente en presencia de óxido de paladio II para formar una trialquilestannil-imidazo[1,2a]piridina de fórmula III, y recoger el producto de esta reacción; y opcionalmente hacer reaccionar una trialquilestannil-imidazo[1,2a]piridina de fórmula III con cualquiera de: a) yodo en un disolvente a temperatura ambiente, y extraer el producto; o b) NaI o Na^{125}I en presencia de peróxido de hidrógeno, y extraer el 45 producto.

El término "alquilo", tal como se emplea en el presente documento por sí mismo o como parte de otro grupo, se refiere tanto a radicales de cadena lineal o ramificada de hasta 8 carbonos, preferiblemente 6 carbonos, más preferiblemente 4 carbonos, tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, t-butilo, e isobutilo.

50 El término "alcoxilo" se utiliza en el presente documento para referirse a un radical de alquilo de cadena lineal o ramificada, tal como se definió anteriormente, a menos que la longitud de la cadena esté limitada a ella, unida a un átomo de oxígeno, incluyendo, pero sin limitarse a, metoxilo, etoxilo, n-propoxilo, isopropoxilo, y similares. Preferiblemente, la cadena de alcoxilo es de 1 a 6 átomos de carbono de longitud, más preferiblemente de 1 - 4 átomos de carbono de longitud.

55 El término "monoalquilamina", tal como se emplea en el presente documento, por sí mismo o como parte de otro grupo, se refiere a un grupo amino que está sustituido con un grupo alquilo, tal como se definió anteriormente.

60 El término "diaquilamina", tal como se emplea en el presente documento, por sí mismo o como parte de otro grupo, se refiere a un grupo amino que está sustituido con dos grupos alquilos, tal como se definió anteriormente.

El término "halo", empleado en el presente documento por sí mismo o como parte de otro grupo, se refiere a cloro, bromo, flúor o yodo.

65 El término "arilo", tal como se emplea en el presente documento por sí mismo o como parte de otro grupo, se refiere a grupos aromáticos monocíclicos o bicíclicos que contienen desde 6 hasta 12 carbonos en la parte del anillo, preferiblemente 6 - 10 carbonos en la parte del anillo, tal como fenilo, naftilo o tetrahidronaftilo.

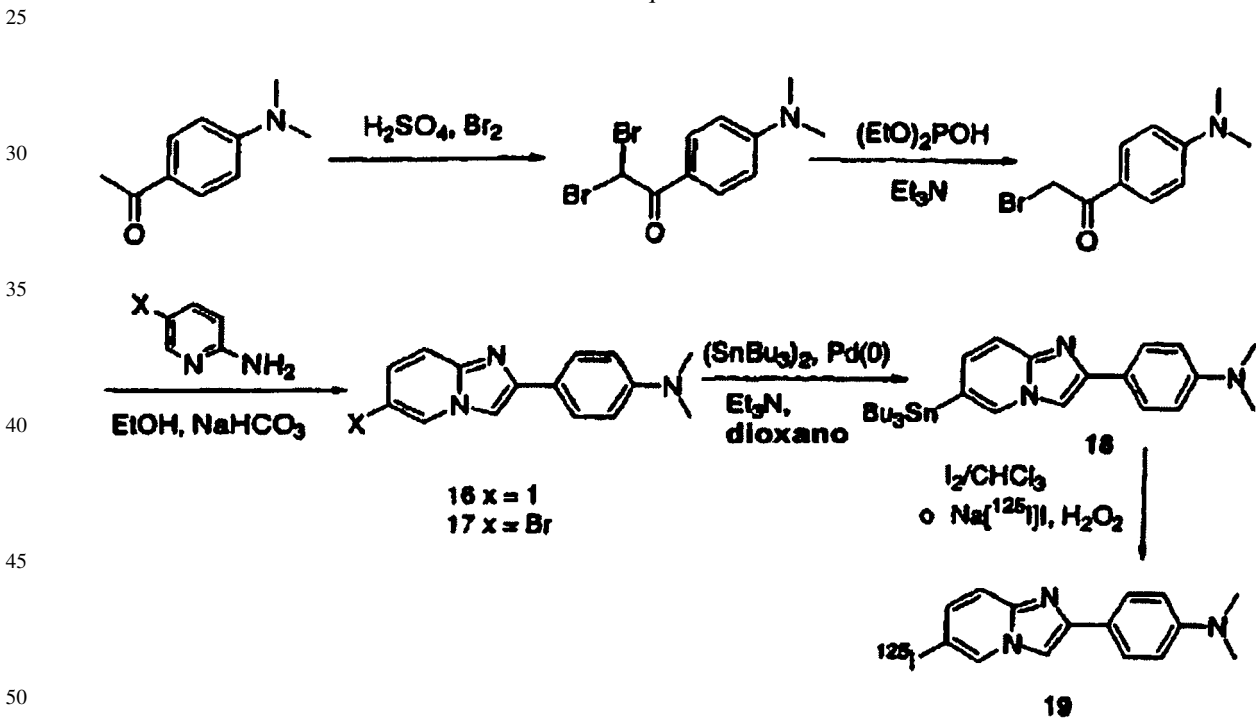
El término “heterociclo” o “anillo heterocíclico”, tal como se utiliza en el presente documento excepto cuando se observe lo contrario, representa un sistema de anillo monoheterocíclico estable de 5 a 7 miembros que puede estar saturado o insaturado, y que consiste en átomos de carbono y desde uno hasta tres heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, O, y S, y en el que el heteroátomo de nitrógeno y de azufre puede estar opcionalmente oxidado. Especialmente útiles son los anillos que contienen un nitrógeno combinado con un oxígeno o azufre, o dos heteroátomos de nitrógeno. Ejemplos de tales grupos heterocíclicos incluyen piperidinilo, pirrolilo, pirrolidinilo, imidazolilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, oxazolilo, oxazolidinilo, isoxazolilo, isoxazolidinilo, tiazolilo, tiazolidinilo, isotiazolilo, homopiperidinilo, homopiperazinilo, piridazinilo, pirazolilo, y pirazolidinilo, lo más preferiblemente tiamorfolinilo, piperazinilo, y morfolinilo.

El término “heteroátomo” se utiliza en el presente documento para referirse a un átomo de oxígeno (“O”), un átomo de azufre (“S”) o un átomo de nitrógeno (“N”). Se reconocerá que cuando el heteroátomo es nitrógeno, puede formar un resto de NR^aR^b, en el que R^a y R^b son, independientemente de uno a otro, hidrógeno o alquilo C₁₋₄, aminoalquilo C₂₋₄, haloalquilo C₁₋₄, halobencilo, o R¹ y R² se toman juntos para formar un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros que tiene opcionalmente O, S o NR^c en dicho anillo, en el que R^c es hidrógeno o alquilo C₁₋₄.

La presente invención se refiere adicionalmente a métodos para preparar los compuestos de la fórmula III ó III' anterior. Los compuestos de esta invención pueden prepararse mediante las reacciones descritas en los esquemas siguientes.

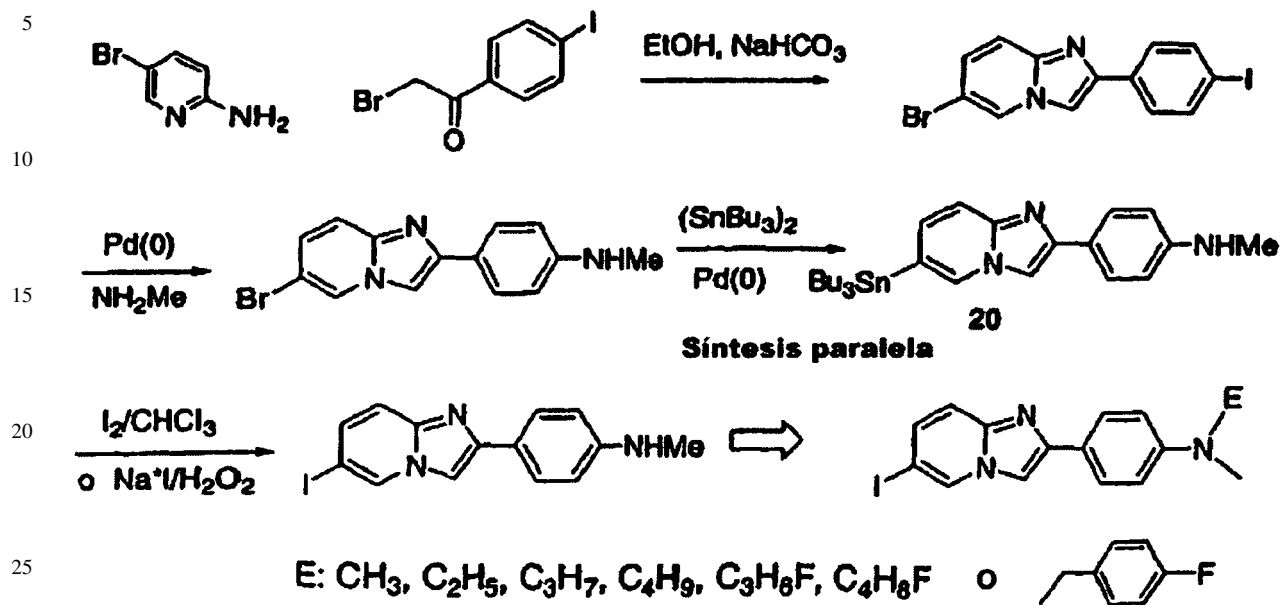
Los esquemas 13 a 17 se refieren a derivados de imidazo[1,2,a]piridina de la presente invención.

Esquema 13

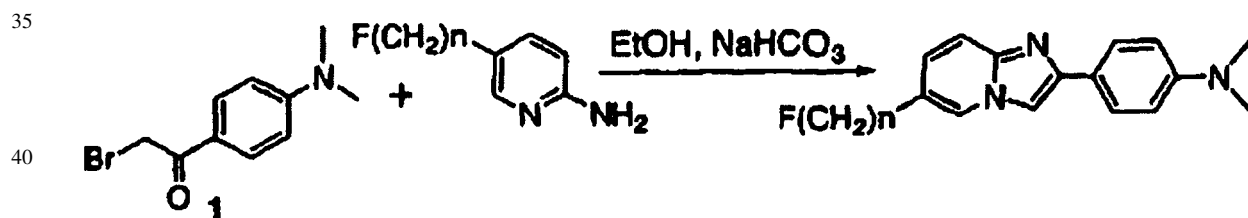


ES 2 274 973 T3

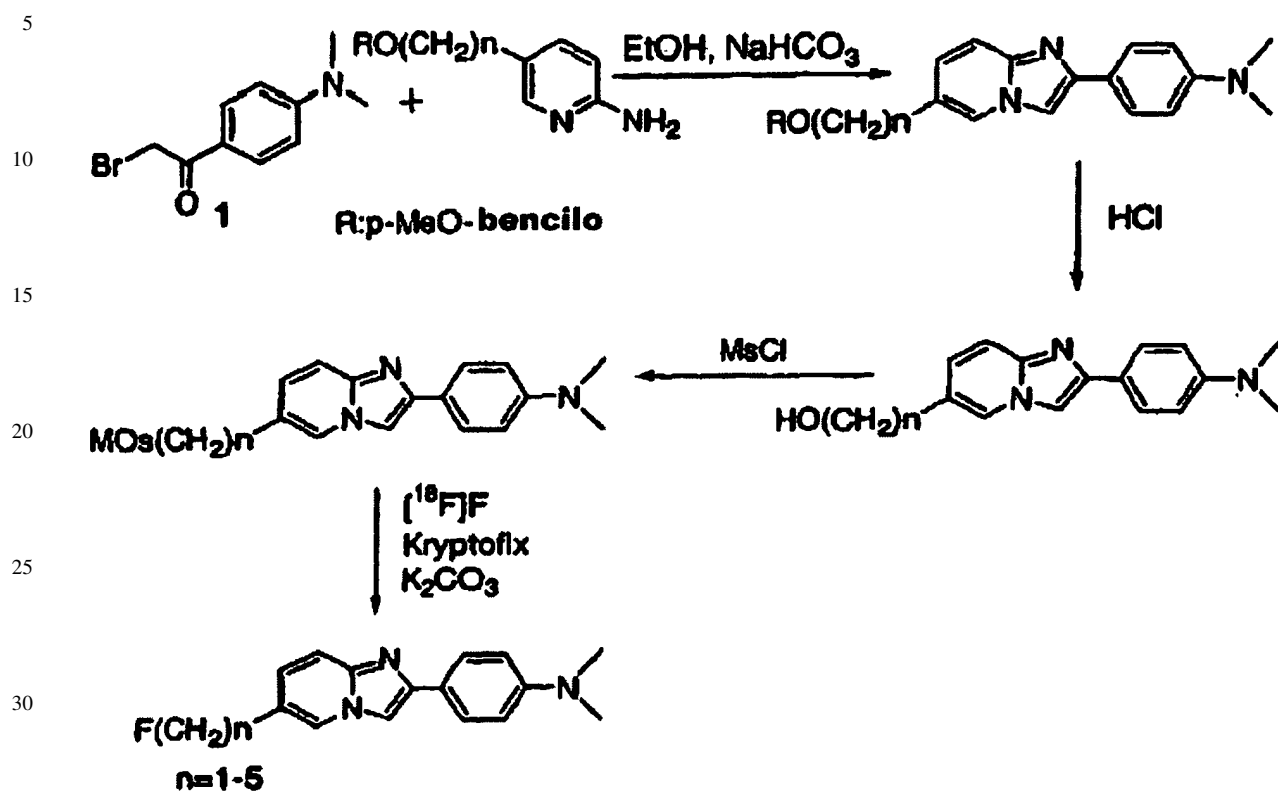
Esquema 14



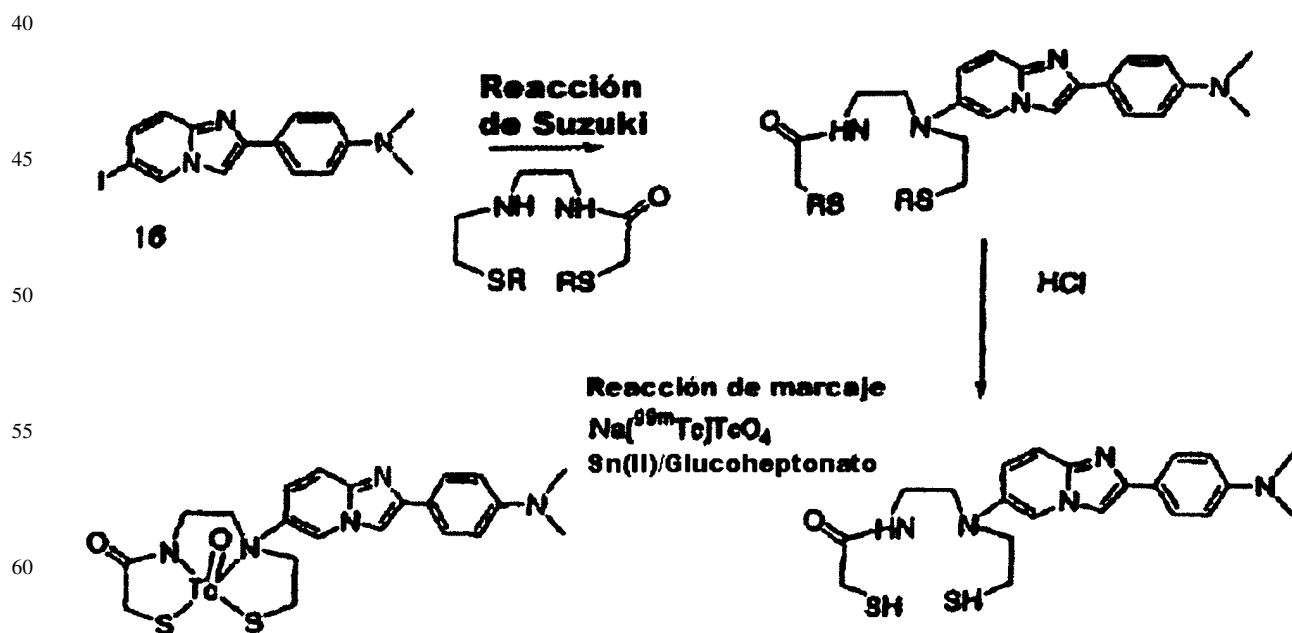
Esquema 15



Esquema 16

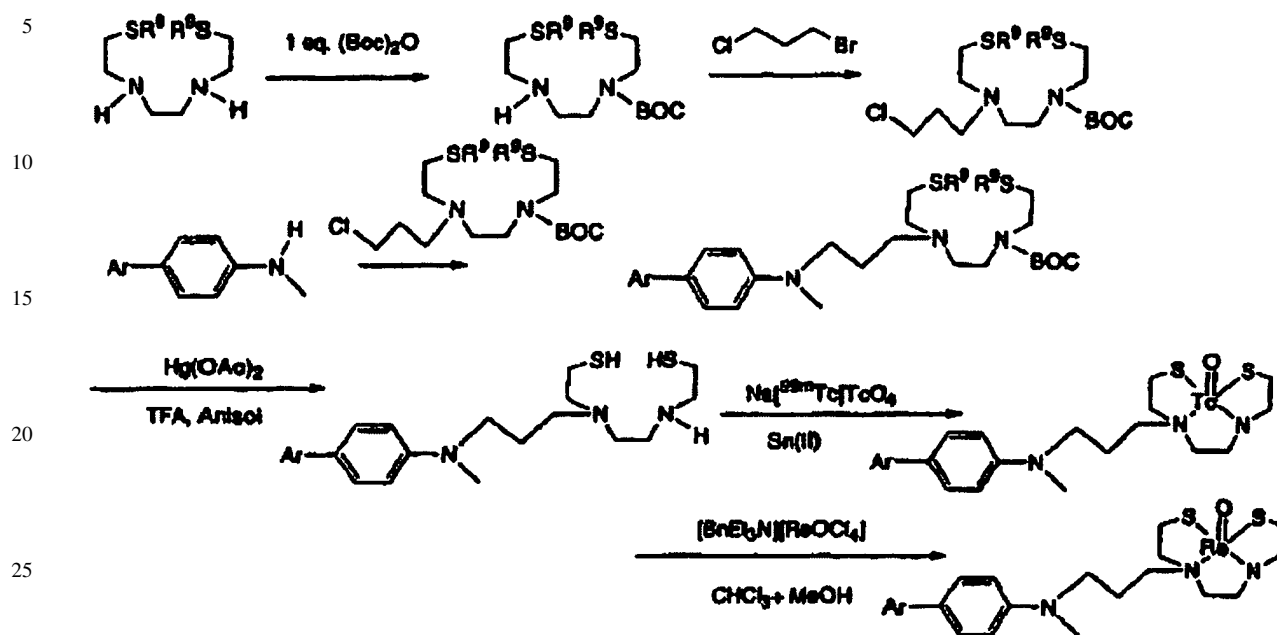


Esquema 17

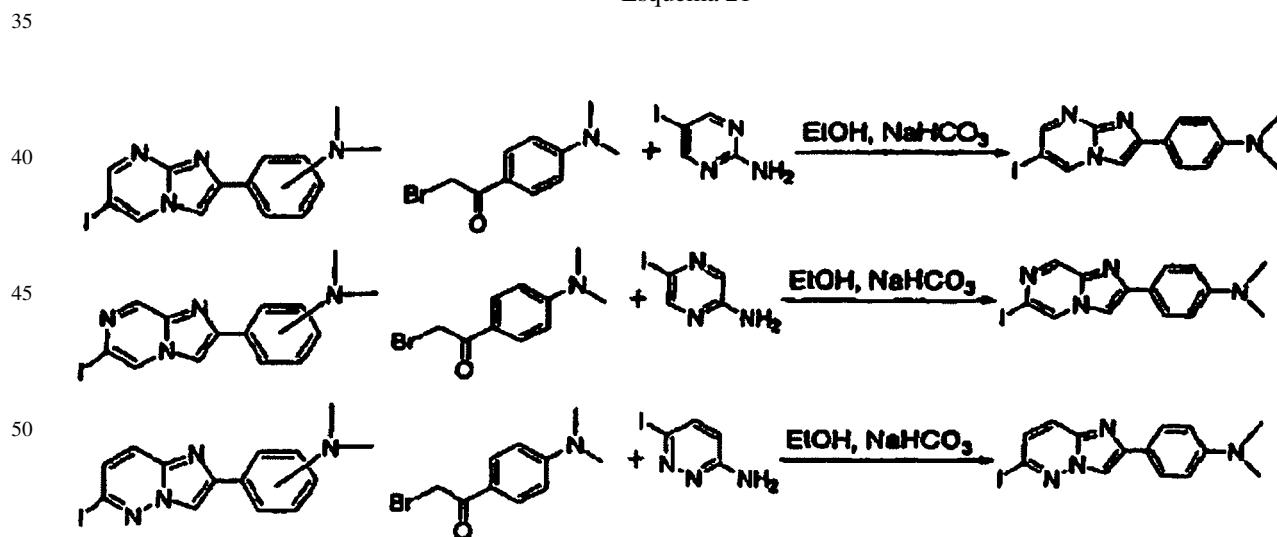


El esquema 20 representa la síntesis de los complejos quelados con metal de la presente invención, en los que R⁹ es tal como se definió anteriormente, y Ar es un sistema bicíclico seleccionado del grupo que comprende: imidazo [1,2a]piridilo

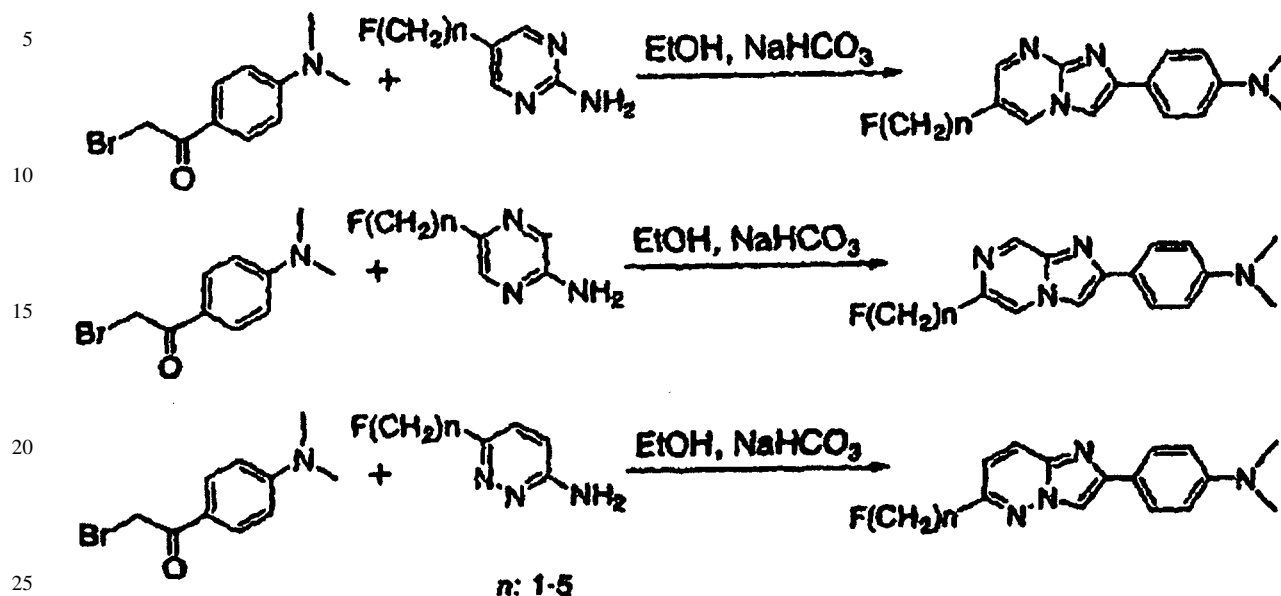
Esquema 20



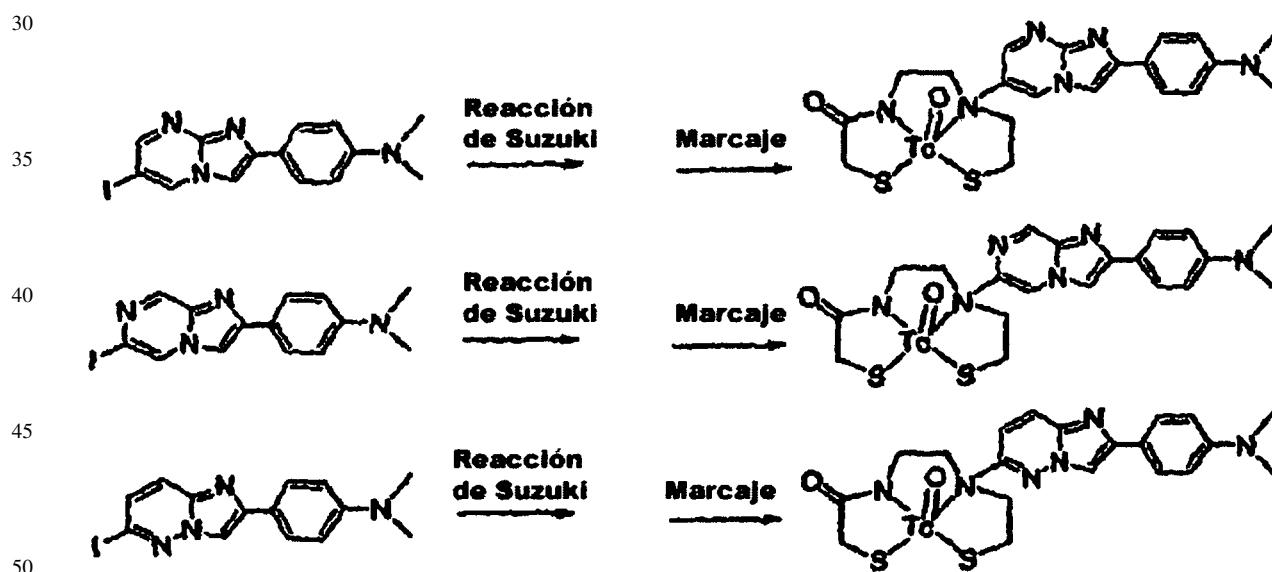
Esquema 21



Esquema 22



Esquema 23



55 Cuando los compuestos de esta invención van a utilizarse como agentes de obtención de imágenes, deben marcarse con isótopos de halógeno radiactivos adecuados. Aunque los isótopos ^{125}I son útiles para las pruebas de laboratorio, generalmente no serán útiles para fines diagnósticos reales debido a la semivida relativamente larga (60 días) y a la baja emisión gamma (30 - 65 KeV) del ^{125}I . El isótopo ^{123}I tiene una semivida de trece horas y una energía gamma de 159 KeV y, por tanto, se espera que el marcaje de los ligandos que van a utilizarse para fines diagnósticos será con este isótopo. Otros isótopos que pueden utilizarse incluyen ^{131}I (semivida de 2 horas). Los isótopos de bromo adecuados incluyen ^{77}Br y ^{76}Br .

60 Los compuestos radiohalogenados de esta invención se prestan por sí mismos fácilmente a la formación de materiales que podrían facilitarse a los usuarios en kits. Los kits para la formación de los agentes de obtención de imágenes pueden contener, por ejemplo, un vial que contiene una disolución fisiológicamente adecuada de un producto intermedio de fórmula III en una concentración y a un pH adecuados para las condiciones de complejación óptimas. El usuario añadiría al vial una cantidad apropiada del radioisótopo, por ejemplo, Na^{123}I , y un oxidante, tal como peróxido de hidrógeno. El ligando marcado resultante puede administrarse entonces por vía intravenosa a un paciente, y pueden obtenerse imágenes de los receptores en el cerebro mediante la medición de los rayos gamma o las fotoemisiones de los mismos.

ES 2 274 973 T3

Dado que la composición radiofarmacéutica según la presente invención puede prepararse de manera fácil y simple, la preparación puede llevarse a cabo fácilmente por el usuario. Por tanto, la presente invención también se refiere a un kit, que comprende:

5 (1) Un compuesto no radiomarcado de la invención, estando el compuesto opcionalmente en un estado seco; y teniendo también opcionalmente un vehículo inerte, farmacéuticamente aceptable, y/o sustancias auxiliares añadidas al mismo; y

(2) un agente reductor y opcionalmente un quelante;

10

en el que los componentes (1) y (2) pueden combinarse opcionalmente; y

además, en el que pueden incluirse instrucciones para el uso con una receta para llevar a cabo el método descrito anteriormente haciendo reaccionar los componentes (1) y (2) con tecnecio-99m en forma de una disolución de pertecnetato.

15

Ejemplos de agentes reductores y quelantes adecuados para el kit anterior se han enumerado anteriormente. La disolución de pertecnetato puede obtenerse por el usuario a partir de un generador de molibdeno-tecnecio. Tales generadores están disponibles de varias instituciones que realizan procedimientos de radiodiagnóstico. Tal como se observó anteriormente, los componentes (1) y (2) pueden combinarse, siempre que sean compatibles. Un kit de monocompuesto de este tipo, en el que los componentes combinados están preferiblemente liofilizados, es adecuado de manera excelente para que el usuario lo haga reaccionar con la disolución de pertecnetato de una manera simple.

20

Cuando se desee, el agente de diagnóstico radiactivo puede contener cualquier aditivo, tales como agentes de control del pH (por ejemplo, ácidos, bases, tampones), estabilizadores (por ejemplo, ácido ascórbico) o agentes isotonzantes (por ejemplo, cloruro de sodio).

25

El término “sal farmacéuticamente aceptable”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a aquellas sales de carboxilato o sales de adición de ácidos de los compuestos de la presente invención que son adecuados, dentro del alcance del criterio médico responsable, para su uso en contacto con los tejidos de pacientes sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica excesivas, y similares, acorde con una razón beneficio / riesgo razonable, y eficaz para su uso deseado, así como las formas zwitteriónicas, cuando sea posible, de los compuestos de la invención. El término “sales” se refiere a las sales de adición de ácidos orgánicos e inorgánicos, relativamente no tóxicas, de los compuestos de la presente invención. También se incluyen aquellas sales derivadas de ácidos orgánicos no tóxicos, tales como los ácidos alifáticos mono y dicarboxílicos, por ejemplo, el ácido acético, los ácidos alcanóicos fenil-sustituidos, los ácidos hidroxialcanóicos y alcanodioicos, los ácidos aromáticos y los ácidos alifáticos y aromáticos sulfónicos. Estas sales pueden prepararse in situ durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos o haciendo reaccionar separadamente el compuesto purificado en su forma base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y aislando la sal así formada. Sales representativas adicionales incluyen las sales de bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, nitrato, acetato, oxalato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato mesilato, glucoheptonato, lactobionato y laurilsulfonato, propionato, pivalato, ciclamato, isetionato y similares. Éstas pueden incluir cationes a base de metales alcalinos y alcalinotérreos, tales como sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, y similares, así como, cationes no tóxicos de amonio, amonio cuaternario y amina incluyendo, pero sin limitarse a amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina y similares. (Véase, por ejemplo, Berge S. M., *et al.*, *Pharmaceutical Salts*, *J. Pharm. Sci.* 66: 1-19 (1977) que se incorpora al presente documento como referencia).

35

40

45

En la primera etapa del presente método de obtención de imágenes, se introduce un compuesto marcado de fórmula III o III' en un tejido o un paciente en una cantidad detectable. El compuesto normalmente forma parte de una composición farmacéutica y se administra al tejido o al paciente mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

50

Por ejemplo, el compuesto puede administrarse o por vía oral, rectal, parenteral (intravenosa, intramuscular o subcutánea), intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, intravesical, local (polvos, pomadas o gotas), o como un pulverizador oral o nasal.

55

En una realización preferida de la invención, el compuesto marcado se introduce en un paciente en una cantidad detectable y una vez que ha transcurrido tiempo suficiente para que el compuesto llegue a asociarse con los depósitos amiloides, el compuesto marcado se detecta de forma no invasiva dentro del paciente. En otra realización de la invención, se introduce un compuesto marcado de fórmula III o III' en un paciente, se deja tiempo suficiente para que el compuesto llegue a asociarse con los depósitos amiloides, y después se extrae una muestra del tejido del paciente y se detecta el compuesto marcado en el tejido fuera del paciente. En una tercera realización de la invención, se extrae una muestra de tejido de un paciente y se introduce un compuesto marcado de fórmula III o III' en la muestra de tejido. Una vez que ha transcurrido una cantidad de tiempo suficiente para que el compuesto llegue a unirse a los depósitos amiloides, se detecta el compuesto.

60

65

La administración del compuesto marcado a un paciente puede realizarse mediante una vía de administración general o local. Por ejemplo, el compuesto marcado puede administrarse al paciente de manera que se reparta por todo

ES 2 274 973 T3

el organismo. Alternativamente, el compuesto marcado puede administrarse a un órgano o tejido específico de interés. Por ejemplo, es deseable ubicar y cuantificar los depósitos amiloides en el cerebro con el fin de diagnosticar o seguir el progreso de la enfermedad de Alzheimer en un paciente.

5 El término “tejido” significa una parte del organismo de un paciente. Ejemplos de tejidos incluyen el cerebro, corazón, hígado, vasos sanguíneos y arterias. Una cantidad detectable es una cantidad de compuesto marcado necesaria para que se detecte por el método de detección escogido. La cantidad de un compuesto marcado, que va a introducirse en un paciente con el fin de proporcionar la detección, puede determinarse fácilmente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden administrarse a un paciente cantidades crecientes del compuesto marcado hasta que el compuesto se detecte mediante el método de detección de elección. Se introduce un marcador en los compuestos para proporcionar la detección de los compuestos.

15 El término “paciente” significa seres humanos u otros animales. Los expertos en la técnica también están familiarizados con la determinación de la cantidad de tiempo suficiente para que un compuesto llegue a asociarse con los depósitos amiloides. La cantidad de tiempo necesaria puede determinarse fácilmente introduciendo una cantidad detectable de un compuesto marcado de fórmulas III-III’ en un paciente y después detectando el compuesto marcado en varias ocasiones tras la administración.

20 El término “asociado” significa una interacción química entre el compuesto marcado y el depósito amiloide. Ejemplos de asociaciones incluyen enlaces covalentes, enlaces iónicos, interacciones hidrófilos - hidrófilos, interacciones hidrófobos - hidrófobos, y complejos.

25 Los expertos en la técnica están familiarizados con las diversas formas de detectar compuestos marcados. Por ejemplo, pueden utilizarse la resonancia magnética nuclear (RMN), la tomografía por emisión de positrones (TEP), o la tomografía computarizada por emisión de un solo fotón (SPECT) para detectar los compuestos radiomarcados. El marcador que se introduce en el compuesto dependerá del método de detección deseado. Por ejemplo, si se selecciona TEP como un método de detección, el compuesto debe poseer un átomo que emita positrones, tal como ^{11}C o ^{18}F .

30 El agente de diagnóstico radiactivo debe tener radiactividad y concentración de radiactividad suficientes que puedan garantizar el diagnóstico fidedigno. Por ejemplo, en el caso de que el metal radiactivo sea el tecnecio-99m, puede incluirse normalmente en una cantidad de 0,1 a 50 mCi en aproximadamente de 0,5 a 5,0 mL en el momento de la administración. La cantidad de un compuesto de las fórmulas III-III’ puede ser suficiente como para formar un compuesto de quelato estable con el metal radiactivo.

35 El compuesto de quelato así formado como un agente de diagnóstico radiactivo es suficientemente estable y, por tanto, puede administrarse inmediatamente como tal o almacenarse hasta su uso. Cuando se desee, el agente de diagnóstico radiactivo puede contener cualquier aditivo, agentes de control del pH (por ejemplo, ácidos, bases, tampones), estabilizadores (por ejemplo, ácido ascórbico) o agentes isotonzantes (por ejemplo, cloruro de sodio).

40 La obtención de imágenes de los depósitos amiloides también puede llevarse a cabo cuantitativamente, de manera que pueda determinarse la cantidad de depósitos amiloides.

45 Los compuestos preferidos para la obtención de imágenes incluyen un radioisótopo tal como ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{18}F , ^{76}Br o ^{77}Br .

50 La presente invención también se refiere a un método para la obtención de imágenes de depósitos amiloides. Uno de los prerequisites clave para un agente de obtención de imágenes *in vivo* del cerebro es la capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica intacta tras una inyección i.v. en bolo. Los compuestos de esta invención poseen un sistema de anillo central comprendido por varios anillos aromáticos sustituidos, condensados y de 5 a 6 miembros. Varios compuestos de esta invención contienen un núcleo de benzotiazol y son derivados de tioflavinas. Estos compuestos no contienen el ion de amonio cuaternario, por lo que son de tamaño relativamente pequeño, neutros y lipófilos (coeficiente de partición = 70 y 312 para 3 y 6a, respectivamente).

55 Para probar la permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica intacta se inyectaron varios compuestos de fórmula I o III en ratones normales. La captación inicial del cerebro de 3 y 6a en ratones tras una inyección i.v. fue del 0,67 y el 1,50% de dosis/órgano, respectivamente (véase la tabla 1). La captación en el cerebro adquiere un pico a los 60 min para ambos compuestos con una captación en el cerebro máxima del 1,57 y el 1,89% de dosis/órgano, respectivamente. Los niveles de sangre son relativamente bajos en todos los tiempos evaluados. Para esta serie de ligandos, la captación específica en el cerebro es relativamente alta y la retención en el cerebro es larga.

60 Otro aspecto de la invención es un método para inhibir la agregación de la placa amiloide. La presente invención también proporciona un método para inhibir la agregación de proteínas amiloides para formar depósitos amiloides, administrando a un paciente una cantidad de inhibición de amiloide de un compuesto de la fórmula III o III’ anterior.

65 Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente una cantidad de inhibición de amiloide administrando simplemente un compuesto de fórmula III o III’ a un paciente en cantidades crecientes hasta que el crecimiento de los depósitos amiloides disminuya o se detenga. La tasa de crecimiento puede evaluarse utilizando obtención de imágenes tal como se describió anteriormente o tomando una muestra de tejido de un paciente y observando los depósitos

ES 2 274 973 T3

amiloides en ella. Los compuestos de la presente invención pueden administrarse a un paciente a niveles de dosis en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1.000 mg por día. Para un ser humano adulto normal que tiene un peso corporal de aproximadamente 70 kg, es suficiente una dosis en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal por día. Sin embargo, la dosis específica utilizada puede variar. Por ejemplo, la dosis puede depender de varios factores, incluyendo las necesidades del paciente, la gravedad del estado que se esté tratando y la actividad farmacológica del compuesto que se esté utilizando. La determinación de las dosis óptimas para un paciente en particular se conoce bien para los expertos en la técnica.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos, pero no limitativos, del método y las composiciones de la presente invención. Otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de la variedad de condiciones y parámetros encontrados normalmente y obvios para los expertos en la técnica están dentro del espíritu y el alcance de la invención.

Ejemplo 3

Preparación de 6-tributilestannil-2-(4'-dimetilamino-)fenil-imidazo[1,2-a]piridina (18)

6-Bromo-2-(4'-dimetilamino-)fenil-imidazo[1,2-a]piridina (17)

Se agitó a reflujo durante 2 h una mezcla de 2-bromo-4'-dimetilaminoacetofenona, (968 mg, 4 mmol) y 2-amino-5-bromo-piridina (692 mg, 4 mmol) en EtOH (25 mL). Se añadió NaHCO₃ (500 mg) una vez que la mezcla se había enfriado. Se agitó a reflujo durante 4,5 h la mezcla resultante. Se enfrió la mezcla y se filtró para dar 655 mg de producto 17 (52%).

¹H RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 3,00 (s, 6H), 6,78 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,17 (d,d, J = 9,5, 1,7 Hz, 1H), 7,49 (d, J = 9,5 Hz, 1H), 7,69 (s, 1H), 7,80 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 8,21 (d,d, J = 1,7, 0,8 Hz, 1H). Anal.3a, (C₁₅H₁₄BrN₃)

6-Tributilestannil-2-(4'-dimetilamino-)fenil-imidazo[1,2-a]piridina (18)

A una disolución de 6-bromo-2-(4'-dimetilamino-)fenil-imidazo[1,2-a]piridina, 17, (80 mg, 0,26 mmol) en 1,4-dioxano (10 mL) y trietilamina (2 mL) se añadió (Bu₃Sn)₂ (0,2 mL) en neto seguido por Pd(Ph₃P)₄ (20 mg). Se agitó la mezcla a 90°C durante la noche. Se eliminó el disolvente y se purificó el residuo mediante CCFP (cromatografía en capa fina preparativa) (Hex : EtOAc = 1 : 1 como disolvente de desarrollo) para dar 23 mg de producto 18 (17%).

¹H RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 0,90 (t, J = 7,2 Hz, 9H), 1,10 (t, J = 8,0 Hz, 6H), 1,33 (hex, J = 7,1 Hz, 6H), 1,54 (pen, J = 7,2 Hz, 6H), 3,00 (s, 6H), 6,78 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,11 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,57 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,84 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,95 (d, J = 0,8 Hz, 1H). EMAR: m/z Calculado para C₂₇H₄₂N₃Sn(M++H): 528,2400; Encontrado: 528,2402. Análisis 4, (C₂₇H₄₁N₃Sn.2H₂O)

6-Yodo-2-(4'-dimetilamino-)fenil-imidazo[1,2-a]piridina, IMPY, (16)

Se agitó a reflujo durante 2 h una mezcla de 2-bromo-4'-dimetilaminoacetofenona, (484 mg, 2 mmol) y 2-amino-5-yodo-piridina (440 mg, 2 mmol) en EtOH (25 mL). Se añadió NaHCO₃ (250 mg) una vez que la mezcla se había enfriado. Se agitó a reflujo durante 4 h la mezcla resultante. Se enfrió la mezcla y se filtró para dar 348 mg de producto 3b (48%).

¹H RMN (200 MHz, CDCl₃, δ): 3,00 (s, 6H), 6,77 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,27 (d,d, J = 9,4, 1,5 Hz, 1H), 7,38 (d, J = 9,5 Hz, 1H), 7,66 (s, 1H), 7,79 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 8,32 (d, J = 0,7 Hz, 1H). Análisis 3b, (C₁₅H₁₄IN₃).

Ejemplo 4

Preparación de ligando radioyodado: [¹²⁵I]IMPY, [¹²⁵I]18

Se preparó el compuesto [¹²⁵I]18 utilizando reacciones de yododesestannilación con el precursor de tributilestaño 17. Se añadió peróxido de hidrógeno (50 μL, 3% p/v) a una mezcla de 50 μL del precursor de tributilestaño correspondiente (1 μg/μL EtOH), 50 μL de HCl 1 N y [¹²⁵/¹²³I]NaI (1-5 mCi) en un vial sellado. Se dejó que la reacción continuara durante 10 min a temperatura ambiente y se terminó mediante la adición de 100 μL de NaHSO₃ saturado. Se extrajo la mezcla de reacción o bien directamente (estirilbencenos) con acetato de etilo (3 x 1 mL) o se extrajo tras la neutralización con disolución saturada de bicarbonato de sodio (tioflavinas). Los extractos combinados se evaporaron hasta la sequedad. Para los estirilbencenos, se disolvieron los residuos en 100 μL de EtOH y se purificaron mediante HPLC utilizando una columna en fase inversa (Waters ubondpad, 3,9 x 300 mm) con un disolvente isocrático del 65% de acetonitrilo - 35% de ácido trifluoroacético (0,1%) con una velocidad de flujo de 0,8 mL/min. Se purificaron las tioflavinas en una columna C4 (Phenomenex Inc., Torrance, CA), se eluyeron con un disolvente isocrático del 80% de acetonitrilo - 20% de ácido 3,3-dimetilglutárico (5 mM, pH 7,0) con una velocidad de flujo de 0,8 mL/min. Se recogieron las fracciones deseadas que contenían el producto, se condensaron y se volvieron a extraer con acetato de etilo. Se evaporaron hasta la sequedad los productos añadidos sin vehículo y se volvieron a disolver en EtOH al 100% (1 μCi/μL). El ¹²⁵I 18 final, con una actividad específica de 2.200 Ci/mmol y una pureza radioquímica superior al 95%, se almacenó a -20°C hasta 6 semanas para los estudios de autorradiografía y unión *in vitro*.

ES 2 274 973 T3

Ejemplo 5

Determinación del coeficiente de partición

Se midieron los coeficientes de partición mezclando el [¹²⁵I]indicador con 3 g de cada uno de 1-octanol y tampón (fosfato 0,1 M, pH 7,4) en un tubo de ensayo. Se agitó el tubo de ensayo con vórtex durante 3 min a temperatura ambiente, seguido por centrifugación durante 5 min. Se contaron dos muestras pesadas (0,5 g cada una) procedentes de las capas de 1-octanol y tampón en un contador de pozo. Se determinó el coeficiente de partición calculando la razón de cpm/g de 1-octanol con respecto a ese tampón. Se volvieron a dividir las muestras procedentes de la capa de 1-octanol hasta que se obtuvieron valores constantes de los coeficientes de partición. Se realizó la medición por triplicado y se repitió tres veces.

Ejemplo 6

Ensayos de unión utilizando péptido βA(1-40) o βA (1-42) agregado en disolución

Las formas sólidas de los péptidos βA(1-40) y βA(1-42) se adquirieron de Bachem (King of Prussia, PA). Se llevó a cabo la agregación de los péptidos disolviendo suavemente el péptido [0,5 mg/mL para βA(1-40) y 0,25 mg/mL para βA(1-42) en una disolución tampón (pH 7,4) que contenía fosfato de sodio 10 mM y EDTA 1 mM. Se incubaron las disoluciones a 37°C durante 36 - 42 h con agitación suave y constante. Se llevaron a cabo los estudios de unión en tubos de vidrio de borosilicato de 12 x 75 mm según el procedimiento descrito con algunas modificaciones (Klunk, W. E., *et al.*, *Biol. Psychiatry* 35:627 (1994)). Se añadieron a la mezcla las fibrillas agregadas (10-50 nM en la mezcla final del ensayo) que contenían 50 mL de radioligandos (0,01 - 0,5 nM) en EtOH al 40% y EtOH al 10% en un volumen final de 1 mL para los estudios de saturación. Se definió la unión no específica en presencia de tioflavina T 2 mM para las tioflavinas. Para los estudios de inhibición, 1 mL de la mezcla de reacción contenía 40 mL de inhibidores (10⁻⁵ - 10⁻¹⁰ M en EtOH al 10%) y 0,05 nM de radioindicador en EtOH al 40%. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 3 h y se separó la radiactividad libre y unida mediante filtración a vacío a través de filtros Whatman GF/B utilizando un colector de células Brandel M-24R, seguido por lavados de 2 x 3 mL de etanol al 10% a temperatura ambiente. Los filtros que contenían el ¹²⁵I-ligando unido se contaron en un contador gamma (Packard 5000) con una eficacia de recuento del 70%. Los resultados de los experimentos de saturación e inhibición se sometieron a análisis de regresión no lineal utilizando el software EBDA52 por el que se calcularon los valores de K_d y K_i. Los valores adicionales de K_i para los compuestos de la invención se facilitan en la figura 1A y la figura 1B.

TABLA 1

Constantes de inhibición (K_i, nM) de los compuestos en la unión del ligando a los agregados de βA(1-40) y βA(1-42) a 25°C

	Agregados de βA(1-40)	Agregados de βA(1-42)
Compuestos	Frente a [¹²⁵ I] 3	Frente a [¹²⁵ I] 3
Crisamina G	>1.000	>2.000
Tioflavina T	116 ± 20	294 ± 40
1	1,9 ± 0,3	0,8 ± 0,3
4	1,6 ± 0,5	5,0 ± 0,8
3	0,9 ± 0,2	2,2 ± 0,4
6a	5,4 ± 0,7	6,4 ± 0,7

Los valores son la media ± EEM de tres experimentos independientes, cada uno por duplicado.

Ejemplo 7

Biodistribución in vivo de nueva sondas en ratones normales

Mientras se les mantenía bajo anestesia con éter, se inyectaron 0,15 mL de una solución salina que contenía agentes marcados (5-10 mCi) directamente en la vena de la cola de ratones ICR (2-3 meses de edad, peso promedio 20-30 g). Los ratones se sacrificaron mediante escisión cardíaca en diversos tiempos tras la inyección. Se extrajeron los

ES 2 274 973 T3

órganos de interés y se pesaron, y se contó la radiactividad con un contador gamma automático (Packard 5000). Se calculó la dosis en porcentaje por órgano mediante una comparación de los recuentos del tejido con alícuotas diluidas adecuadamente del material inyectado. Se calcularon las actividades totales de la sangre y el músculo con la suposición de que constituían el 7% y el 40% del peso corporal total, respectivamente.

TABLA 2

[¹²⁵I]Compuesto 19 (PC=100)

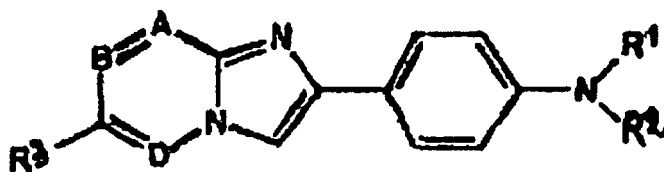
Órgano	2 min	30 min	1 h	2 h	6 h	24 h
SANGRE	6,41 ± 0,77	2,44 ± 0,36	2,50 ± 0,11	1,82 ± 0,21	1,40 ± 0,27	0,18 ± 0,02
CORAZÓN	0,79 ± 0,14	0,16 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,00
MÚSCULO	13,81 ± 3,44	6,08 ± 0,59	5,03 ± 1,03	2,96 ± 0,84	1,46 ± 0,42	0,27 ± 0,11
PULMÓN	1,56 ± 0,33	0,31 ± 0,07	0,34 ± 0,08	0,20 ± 0,05	0,12 ± 0,05	0,05 ± 0,03
RIÑÓN	4,75 ± 0,49	1,51 ± 0,27	1,17 ± 0,29	0,53 ± 0,05	0,25 ± 0,05	0,05 ± 0,01
BAZO	0,40 ± 0,06	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,00
HÍGADO	20,88 ± 2,63	6,32 ± 0,55	5,88 ± 0,85	2,90 ± 0,21	1,54 ± 0,08	0,61 ± 0,11
PIEL	5,72 ± 0,90	4,69 ± 1,06	4,28 ± 0,25	3,14 ± 0,51	2,19 ± 0,63	0,22 ± 0,06
CEREBRO	2,88 ± 0,25	0,26 ± 0,00	0,21 ± 0,03	0,14 ± 0,03	0,06 ± 0,02	0,02 ± 0,00

% de dosis/órgano, promedio de 3 ratones ± DE; Los pesos promedio de los órganos son: sangre, 2 g; músculo, 12 g; hígado, g; cerebro 0,4 g; a partir de los cuales puede calcularse el valor de % de dosis/g para cada órgano o tejido.

*(% de dosis/órgano, promedio de 3 ó 4 ratones ± DE)

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula III':



III'

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

A, B y D son CH o N,

siempre que no más de dos de A, B y D sean N;

R³ es Br, I, F, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹²³I, ¹⁸F, ⁷⁶Br, ⁷⁷Br, haloalquilo, Sn(alquilo)₃ o -L-Ch;

R¹ y R² son independientemente hidrógeno, alquilo C₁₋₄, aminoalquilo C₂₋₄, haloalquilo C₁₋₄, halo(aril C₆₋₁₂) alquilo, -L-Ch, o R¹ y R² se toman junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros que tiene opcionalmente O, S o NR⁵ en dicho anillo, en el que

R⁵ es hidrógeno o alquilo C₁₋₄.

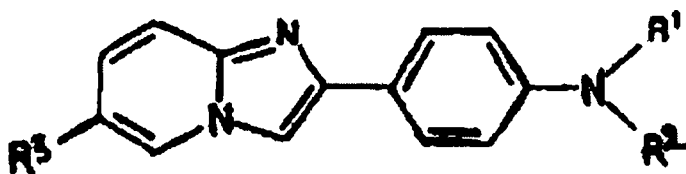
L es un enlace covalente, -(CH₂)_n- o -(CH₂)_n-C(O)- en la que

n es 0-5; y

Ch es un ligando tetradentado que puede complejarse con un metal;

con la condición de que sólo uno de R¹, R² y R³ puede ser -L-Ch.

2. Compuesto según la reivindicación 1, que tiene la fórmula III:



III

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

en el que:

R³ es Br, I, F, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹²³I, ¹⁸F, ⁷⁶Br, ⁷⁷Br o Sn(alquilo)₃; y

R¹ y R² son independientemente hidrógeno, alquilo C₁₋₄, aminoalquilo C₁₋₄, haloalquilo C₁₋₄, halo(aril C₆₋₁₂) alquilo, o R¹ y R² se toman junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros que tiene opcionalmente O, S o NR⁵ en dicho anillo, en el que

R⁵ es hidrógeno o alquilo C₁₋₄.

3. Compuesto según la reivindicación 2, en el que R³ es ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹²³I, ¹⁸F, ⁷⁶Br, o ⁷⁷Br

4. Compuesto según la reivindicación 3, en el que:

R¹ y R² se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C₁₋₄, haloalquilo C₁₋₄, o 4-fluorobencilo.

5. Compuesto según la reivindicación 2, en el que:

R³ es ¹²³I o ¹²⁵I; y

R¹ y R² son ambos metilo.

ES 2 274 973 T3

6. Compuesto según la reivindicación 2, en el que:

R^3 es $Sn(\text{alquilo})_3$; y

5 R^1 y R^2 son independientemente hidrógeno, alquilo C_{1-4} , haloalquilo C_{1-4} , o 4-fluorobencilo.

7. Compuesto según la reivindicación 6, en el que R^1 y R^2 son alquilo C_{1-4} .

8. Compuesto según la reivindicación 7, en el que R^1 y R^2 son metilo.

10

9. Compuesto según la reivindicación 1, en el que A y B son CH; y D es N.

10. Compuesto según la reivindicación 1, en el que A y D son CH; y B es N.

15

11. Compuesto según la reivindicación 1, en el que B y D son CH; y A es N.

12. Compuesto según la reivindicación 9, 10 u 11, en el que R^1 y R^2 son independientemente hidrógeno o alquilo C_{1-4} .

20

13. Compuesto según la reivindicación 12, en el que R^1 y R^2 son ambos metilo.

14. Compuesto según la reivindicación 13, en el que R^3 es Br, I, F, ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{18}F , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{18}F /fluoroalquilo (C_{1-5}) o $Sn(\text{alquilo})_3$.

25

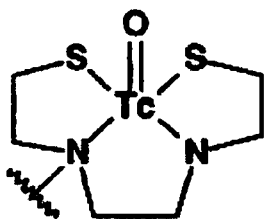
15. Compuesto según la reivindicación 14, en el que R^3 es ^{18}F /fluorometilo, ^{18}F /fluoroetilo, ^{18}F /fluoropropilo, ^{18}F /fluorobutilo, o ^{18}F / fluoropentilo.

16. Compuesto según la reivindicación 9, 10 u 11, en el que R^3 es L-Ch.

30

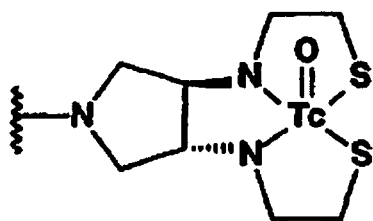
17. Complejo de Tc de un compuesto según la reivindicación 16, en el que Ch•Tc se selecciona del grupo que consiste en:

35



VIII

40

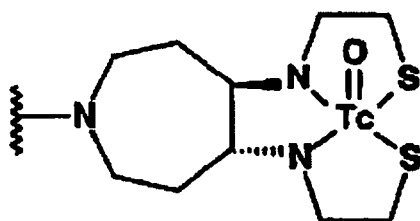


IX

50

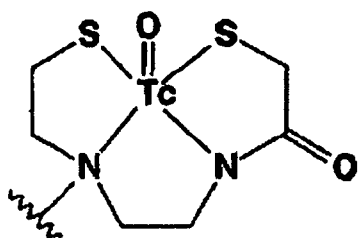
y

55



X

65



XI

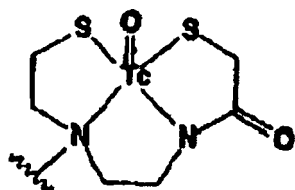
5

10

y n es cero.

18. Complejo según la reivindicación 17, en el que $\text{Ch} \cdot \text{Tc}$ es:

15



XI

20

19. Complejo de Tc según la reivindicación 18, en el que R^1 y R^2 son independientemente hidrógeno o alquilo C_{1-4} .

25

20. Complejo de Tc según la reivindicación 19, en el que R^1 y R^2 son ambos metilo.

30

21. Composición farmacéutica, que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5 ó 9 - 20; y

35

un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

22. Composición diagnóstica para la obtención de imágenes de depósitos amiloides, que comprende un compuesto radiomarcado según una cualquiera de las reivindicaciones 3 - 5 ó 14 - 20; y

40

un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

23. Uso de una composición según la reivindicación 21 para la fabricación de un medicamento para inhibir la agregación de la placa amiloide.

45

24. Uso de una composición según la reivindicación 22 para la fabricación de un agente para la obtención de imágenes de los depósitos amiloides.

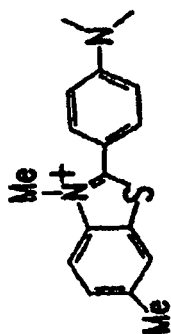
50

55

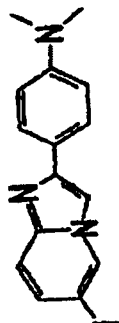
60

65

70



TIOFLAVINA T

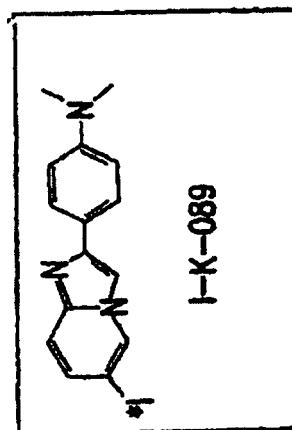


K-01-16

K_i DE LOS COMPUESTOS DE BROMO Y YODO CORRESPONDIENTES (INHIBICIÓN DE LA UNIÓN A AGREGADOS DE β A (1-40) FRENTE A I-TZDM)

Br- 10,3 nM

I- 15,0 nM



I-K-089

FIG. 1A

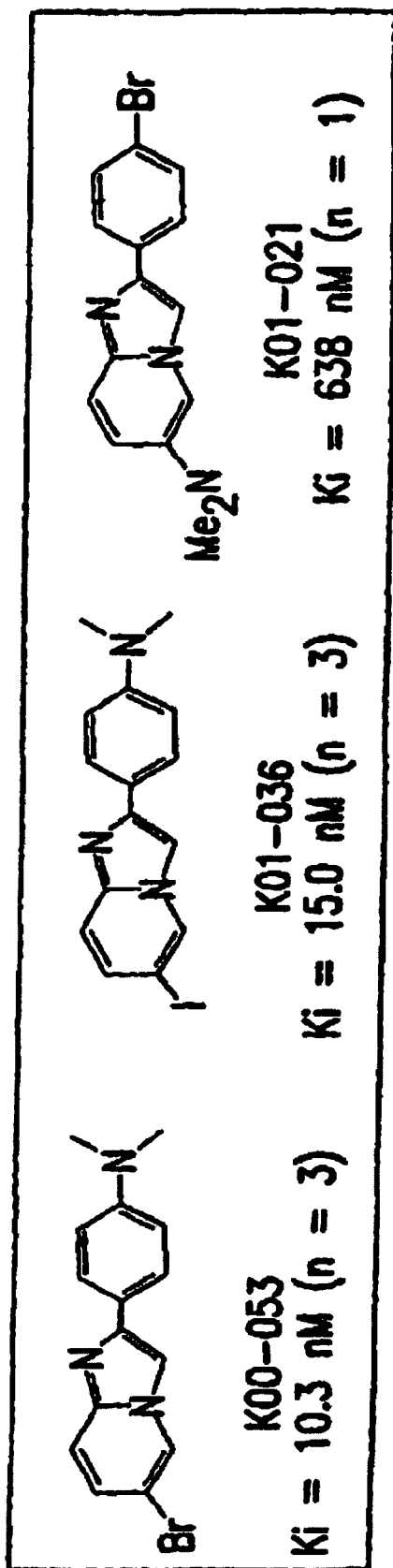


FIG. 1B