



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

**SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION**

21. EXPEDIENTE No.

11-51319

54. TÍTULO

USO DE 7-CLORO-N,N,5-TRIMETIL-4-OXO-3-FENIL-3,5-DIHI-DRO-

4H-PIRIDAZINO 4,5-B INDOL-1-ACETAMIDA COMO BIOMARCADOR

DE LOS NIVELES DEL RECEPTOR PERIFERICO DE BENZODIAZEPINAS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

SANOFY AVENTIS y COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE C.E.A.

DOMICILIO

PARIS, FRANCIA

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C.,

Con, Pedro Gomez
28-05-2011





PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-051319- -00000-0000
Fecha: 2011-04-27 12:07:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100

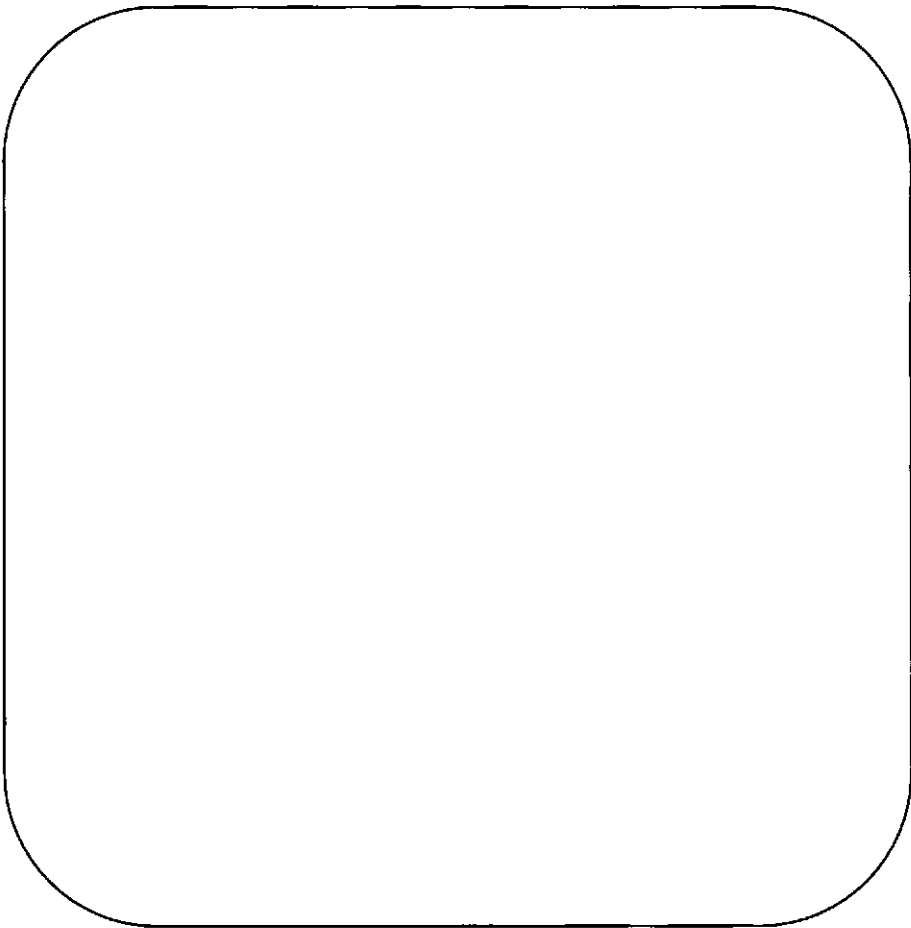
FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:			
1	☒ Patente de Invención. ☒ Capítulo I.	☐ Patente de Modelo de Utilidad. ☐ Capítulo II.	
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: SANOFI AVENTIS y COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE C.E.A. Sociedades constituidas y existentes bajo las leyes de Francia. Dirección: 174 avenue de France, 75013 Paris, Francia y Bâtiment Le Ponant D-25, Rue Leblanc, 75015 Paris, Francia Domicilio: Paris, Francia	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____	
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 211 86 50 E-mail: clientes@cavelier.com Domicilio: Bogotá, Colombia.	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>35.456.344</u> T.P <u>23.555</u>	
4 INVENTOR (ES) (72)	1. Jesús BENAVIDES c/o Sanofi Aventis, Patent Department, 174 Avenue de France, 75013 Paris, Francia 3. Marie-Noëlle CASTEL c/o Sanofi Aventis, Patent Department, 174 Avenue de France, 75013 Paris, Francia 5. Frédéric DOLLE 10 Allée de Vileneuve, 91940 Gometz-le-Châtel, Francia 7. Frank MARGUET c/o Sanofi Aventis, Patent Department, 174 Avenue de France, 75013 Paris, Francia		2. Hervé BOUTIN 8 Hawphorn drive, Manchester M191GX, Reino Unido 4. Annelaure DAMONT 13 rue de la Tour, 78117 Châteaufort, Francia 6. Philippe HANTRAYE 8 Allée Jean François de la Pérouse, 91420 Morangis, Francia 8. Thomas ROONEY c/o Sanofi Aventis, Patent Department, 174 Avenue de France, 75013 Paris, Francia

	9. Luc RYVRON c/o Sanofi Aventis, Patent Department, 174 Avenue de France, 75013 Paris, Francia 11. Cyrille THOMINIAUX 12 rue de la République, 78470 Saint Rémy Les Chevreuses, Francia	10. Bertrand TAVITIAN 186 Rue de Vaugirard, 75015 Paris, Francia	
5	PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/IB2009/007562</u> Fecha: <u>27 de octubre de 2009</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2010/049819 A1</u> Fecha: <u>6 de mayo de 2010</u>		
6	Título (54) <u>USO DE 7-CLORO-N,N,5-TRIMETIL-4-OXO-3-FENIL-3,5-DIHIDRO-4H-PIRIDAZINO[4,5-B]INDOL-1-ACETAMIDA COMO BIOMARCADOR DE LOS NIVELES DEL RECEPTOR PERIFÉRICO DE BENZODIAZEPINAS</u>		
7	Clasificación Internacional (51) <u>A61K 051/004</u>		
8	Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>EP</u>	(32) Fecha <u>28 de octubre de 2008</u>
			(31) Número de Solicitud <u>08291013.4</u>
9	Comprobante de pago No.: 11-35353 Fecha: <u>15 de abril de 2011</u> Comprobante de pago No.: 11-38488 Fecha: <u>25 de abril de 2011</u> Comprobante de pago No.: 11-38489 Fecha: <u>25 de abril de 2011</u> Comprobante de pago No.: 11-38573 Fecha: <u>25 de abril de 2011</u>		
10	Anexos: ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 571.000.00. ☒ Comprobante de pago por 16 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$432.000.00. ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica. ☒ Poder de la Sociedad SANOFI-AVENTIS . ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. ☐ Declaraciones. ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos) ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos) ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA. ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA. ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso. ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas. ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico. ☐ Arte final 12x12 ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud. ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS		

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ

FIRMA : Luz Clemencia De Páez
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

JGG

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2010/049819 A1

Descripción:

Páginas 23 en el idioma original

Páginas 24 en español

Reivindicaciones: Número (s) 26

Figuras: Número (s) 11

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA
FASE INTERNACIONAL**

**Notaría
Sexta**

6

DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.

COPIA NUMERO 32

DE LA ESCRITURA NUMERO: **3870**
FECHA: 26/Julio/2010

ACTO O CONTRATO:
PODER ESPECIAL
OTORGANTES:
CAVELIER ABOGADOS
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ



AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIA SEXTA

CARRERA 9 No. 69-31 - PBX: 317 01 00 - FAX: 314 56 41
Correo Electrónico: notariasexta@etb.net.co



ESCRITURA PUBLICA NUMERO 3.870 - - - -
TRES MIL OCHOCIENTOS SETENTA - - - -
DE FECHA: JULIO VEINTISEIS (26) - - - -
DE DOS MIL DIEZ (2010) - - - -
OTORGADA EN LA NOTARIA SEXTA (6ª.) DEL
CÍRCULO NOTARIAL DE BOGOTÁ, D.C. - - - -

ACTO: PODER - - - -

PODERDANTE: CAVELIER ABOGADOS Nit. 860.041.367-3

APODERADOS: - - - -

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ C.C. 35.456.344

NIDIA OSORIO LOPEZ C.C. 39.787.682

OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA C.C. 79.524.634

EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY C.C. 52.006.265

JORGE CHAVARRO ARISTIZABAL C.C. 16.209.380

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, República de Colombia, ante mí **AMPARO**
QUINTERO ARTURO - Notaria(o) Sexta(o) (6) - - - - de este Círculo
Notarial, se otorgó la escritura pública que se consigna en los siguientes
términos: - - - -

Compareció: con minuta escrita la señora **ADRIANA ZAPATA GIRALDO**, mayor
de edad, vecina de esta ciudad, casada, identificada con la cédula de ciudadanía
No. 51.680.061 de Bogotá, y dijo: - - - -

ESTIPULACIONES - - - -

PRIMERA: Que obra en su calidad de Representante Legal de la sociedad
denominada **CAVELIER ABOGADOS** domiciliada en la Carrera 4 No. 72-35,
Bogotá, Colombia. - - - -

SEGUNDA: Que **SANOFI-AVENTIS**, sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Francia, domiciliada en 174 Avenue de France, 75013 Paris, Francia,
designó a **CAVELIER ABOGADOS** como su representante para la Propiedad
Industrial en Colombia con facultades de nombrar apoderados tal como consta en
la copia auténtica del documento de representación que se protocoliza. - - - -

TERCERA: Que en su carácter de representante legal de **CAVELIER**
ABOGADOS, y en desarrollo de la facultad otorgada por **SANOFI-AVENTIS**,
confiere poder a los abogados **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**, T.P.A. No. 23.555,
identificada con cédula de ciudadanía número **35.456.344** de Usaquen, **NIDIA**



OSORIO LOPEZ, T.P.A. No.73.366, identificada con cédula de ciudadanía número **39.787.682** de Bogotá, **OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA**, T.P.A. No. 71.027 identificado con cédula de ciudadanía número **79.524.634** de Bogotá, **EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY**, T.P.A. 65.794 identificada con cédula de ciudadanía número **52.006.265** de Bogotá y **JORGE CHAVARRO ARISTIZABAL**, T.P.A. No. 40.119, identificado con cédula de ciudadanía número **16.209.380** de Cartago (Valle), mayores de edad, vecinos de Bogotá, para que representen a la sociedad a cuyo nombre actúa, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, incluyendo las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: -----

a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, trazado de circuitos integrados, secretos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales, denominaciones de origen e indicaciones de procedencia, su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos -----

b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, acción por infracción, concesión de licencias, la protección de secretos industriales y de nombres de dominio junto con su administración y pago; acciones populares, de tutela y de cumplimiento; y en general los procesos civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos, de conciliación, arbitramento, tutela relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. -----

CUARTO: Que los apoderados designados están facultados en todos los asuntos arriba determinados para sustituir este mandato, transigir, conciliar, arbitrar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos. -----

QUINTO: Que protocoliza con la presente escritura, un certificado expedido por la Cámara de Comercio de Bogotá, que acredita la constitución y personería de la sociedad **CAVELIER ABOGADOS**, igualmente protocoliza copia autenticada del documento de representación otorgado el día **28 de Mayo de 2010** por **SANOFI-**



01



* 9 4 7 1 9 8 3 7 *

6

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

12 DE JULIO DE 2010 HORA 16:09:43

R028844095

PAGINA: 1 de 3

* * * * *

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O INSCRIPCION DE DOCUMENTOS

CERTIFICA:

NOMBRE : CAVELIER ABOGADOS
N.I.T. : 860041367-3
DOMICILIO : BOGOTA D.C.

CERTIFICA:

NO: 00820237

CERTIFICA:

CONSTITUCION : QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0006233 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE SEPTIEMBRE DE 1974 , INSCRITA EL 26 DE SEPTIEMBRE DE 1974 BAJO EL NUMERO 00021234 DEL LIBRO IX, SE CONSTITUYO LA SOCIEDAD CIVIL DENOMINADA: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER.

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001000 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE MARZO DE 1983 , INSCRITA EL 5 DE ABRIL DE 1983 BAJO EL NUMERO 00130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE : CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER. POR EL DE : CAVELIER ABOGADOS

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NUMERO 1.000 OTORGADA EN LA NOTARIA 6A. DE BOGOTA EL 10 DE MARZO DE 1.983, INSCRITA EN ESTA CAMARA DE COMERCIO EL 5 DE ABRIL DE 1.983 BAJO EL NUMERO 130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER, POR EL DE: CAVELIER ABOGADOS, E INTRODUJO OTRAS REFORMAS.

CERTIFICA:

CERTIFICA

QUE POR E.P.NO. 2.034 DE LA NOTARIA 6 DE SANTAFE DE BOGOTA DEL 18 DE ABRIL DE 1.995, INSCRITA EL 27 DE ABRIL DE 1.995 BAJO EL NO. 5.937 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD TRASLADO SU DOMICILIO DE LA CIUDAD DE SANTAFE DE BOGOTA D.C. AL MUNICIPIO DE TABIO (CUNDINAMARCA) . . .

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 7710 DE LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA DEL 10 DE OCTUBRE DE 1984, INSCRITA EL 15 DE NOVIEMBRE DE 1984 BAJO EL NO. 1559 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NATURALEZA JURIDICA DE SOCIEDAD COMERCIAL A SOCIEDAD CIVIL.

CERTIFICA:

REFORMAS:

ESCRITURAS NO.

FECHA

NOTARIA

INSCRIPCION

842

10-V-1.977

18. BTA.

27-V-1.977-NO. 46.204

3.430

1-VII-1.980

6A. BTA.

3-IX-1.980-NO. 89.582

4.844

10-IX-1.980

6A. BTA.

8-X-1.980-NO. 91.261

432

10-II-1.983

6A. BTA.

1-III-1.983-NO. 129.337

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCORIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

26 JUL. 2010

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA



7.710	10-X-1.984	6A. BTA.	15-XI-1.984-NO.	1.559
7.305	21-X-1.985	6A. BTA.	18-XI-1.985-NO.	1.906
2.567	29-IV-1.987	6A. BTA.	7-V- 1.987-NO.	2.386
4.278	3-VII-1.987	6A. BTA.	23-VII-1987 NO.	215.652
2.657	25- IV-1.988	6A. BTA.	19- V -1988-NO.	2,740
9.033	21-XII-1.990	6A. BTA.	10- I - 1991-NO.	3.786
25	3- I -1.991	6A. BTA.	10- I - 1991-NO.	3.787
1.608	8-III-1.991	6A. BTA.	14-III- 1991-NO.	3.841
2.155	2-IV- 1.991	6A. BTA.	8-IV - 1991-NO.	3.862
797	7-II -1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO.	3.882
1.739	14-III-1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO.	3.881
5.886	21-VIII-1.991	6A. BTA.	27-VIII-1991 NO.	4.019
8.596	4-XII -1.991	6A. BTA.	16-III -1992 NO.	4.430
1.494	10-III -1.992	6A. BTA.	19-III -1992 NO.	4.436
4.205	8 -VII -1.992	6A. BTA.	15-VII -1992 NO.	4.554
8.829	16-XII -1.992	6A. BTA.	24-XII -1992 NO.	4.819
12	5-I -1.993	6 STAFE BTA	13-I -1993 NO.	4.850
4.877	29-VI -1.993	6 STAFE BTA	7-VII -1993 NO.	5.065
5.216	12-VII -1.993	6 STAFE BTA	16-VII -1993 NO.	5.077
ACTA NO.71	2-IX- 1.993	JUNTA DE SOCIOS	29-IX- 1993 NO.	5.174
2.034	18-IV- 1.995	6 STAFE BTA	27- IV -1995 NO.	5.937
2.227	25-IV-1.995	6 STAFE BTA	18-VIII-1.995 NO.	6.092
7.594	12-XII-1.995	6 STAFE BTA	19- XII-1.995 NO.	6.294
676	11- II-1.997	6 STAFE BTA	14- II -1.997 NO.	6.873

CERTIFICA:

REFORMAS:

E.P. NO.	FECHA	NOTARIA	CIUDAD	FECHA	NO. INSC.
0004506	1997/07/28	0006	BOGOTA D.C.	1997/09/02	00007115
0002103	1998/04/08	0006	BOGOTA D.C.	1998/04/21	00007426
0005326	1998/08/06	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/13	00007544
0005538	1998/08/14	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/27	00007564
0007760	1998/11/10	0006	BOGOTA D.C.	1998/11/12	00007644
0006709	1997/11/04	0006	BOGOTA D.C.	2000/12/04	00008481
0003034	2003/05/30	0006	BOGOTA D.C.	2003/06/04	00882729
0003786	2004/07/16	0006	BOGOTA D.C.	2004/07/28	00009703
0001432	2005/03/18	0006	BOGOTA D.C.	2005/04/07	00009917
0004818	2005/08/22	0006	BOGOTA D.C.	2005/08/26	00010008
0005506	2007/07/17	0006	BOGOTA D.C.	2007/07/24	00010841
5453	2009/10/19	0006	BOGOTA D.C.	2009/10/21	00012243
1336	2010/03/16	0006	BOGOTA D.C.	2010/03/24	00012506

CERTIFICA:

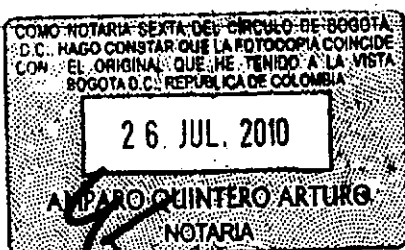
VIGENCIA: QUE LA SOCIEDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL 10 DE SEPTIEMBRE DE 2024 .

CERTIFICA:

OBJETO SOCIAL: LA SOCIEDAD TENDRA POR OBJETO : EL EJERCICIO DE LA ACTIVIDAD PROFESIONAL DE ABOGADOS. EN DESARROLLO DE ESTE OBJETO LA SOCIEDAD PODRA ADQUIRIR, CONTRAER OBLIGACIONES Y CELEBRAR TODA CLASE DE CONTRATOS DIRECTAMENTE RELACIONADOS Y SUBORDINADOS AL MISMO, INCLUSIVE LOS DE ARRENDAMIENTO, HIPOTECA, MUTUO CON O SIN INTERES, MANDATO CIVIL Y COMERCIAL, Y SOCIEDAD, ASI COMO PARTICIPAR EN ASOCIACIONES CIENTIFICAS, GREMIALES O PROFESIONALES SIN ANIMO DE LUCRO.

CERTIFICA:

CAPITAL Y SOCIOS: \$10,000.00 DIVIDIDO EN 10,000.00 CUOTAS CON VALOR NOMINAL DE \$1.00 CADA UNA, DISTRIBUIDO ASI :
- SOCIO CAPITALISTA (S)





01



* 9 4 7 1 7 8 3 8 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

12 DE JULIO DE 2010

HORA 16:09:43

R028844095

PAGINA: 2 de 3

* * * * *

ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO

NO. CUOTAS: 8,800.00

N.I.T. 000008001722568

VALOR: \$8,800.00

GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE

NO. CUOTAS: 1,200.00

C.E. 000000000131100

VALOR: \$1,200.00

- SOCIO INDUSTRIAL (S)

SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA

NO. CUOTAS: 0.00

C.C. 000000035456344

VALOR: \$0.00

CHAVARRO JORGE

NO. CUOTAS: 0.00

C.C. 000000016209380

VALOR: \$0.00

TOTALES

NO. CUOTAS: 10,000.00

VALOR: \$10,000.00

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURAS PUBLICAS NO. 001431 Y 001432 DEL 18 DE MARZO DE 2005 DE LA NOTARIA 06 DE BOGOTA D.C., INSCRITA EL 07 DE ABRIL DE 2005 BAJO EL NO. 0009918 Y 0009917, RESPECTIVAMENTE DEL LIBRO XIII, DE LAS MIL DOSCIENTAS (1200) PARTES DE INTERES SOCIAL RADICADAS EN CABEZA DE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER, SEISCIENTAS (600) PARTES ESTAN GRAVADAS O AFECTADAS EN PROPIEDAD FIDUCIARIA A FAVOR DE LAS SIGUIENTES PERSONAS : GERMAN CAVELIER FRANCO, ERNESTO CAVELIER FRANCO, JORGE CAVELIER FRANCO, INES CAVELIER FRANCO, GUILLERMO CAVELIER FRANCO, ELENA CAVELIER FRANCO, ALEJANDRO CAVELIER FRANCO, BEATRIZ CAVELIER FRANCO, Y LUCIA CAVELIER FRANCO,

CERTIFICA:

REPRESENTACION LEGAL: EL REPRESENTANTE LEGAL ES EL DIRECTOR. EL SOCIO FUNDADOR GERMAN CAVELIER GAVIRIA TENDRA EL CARACTER DE PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO, PARTICIPARA POR DERECHO PROPIO EN EL CONSEJO SUPERIOR Y EN EL CONSEJO DIRECTIVO Y LLEVARA LA REPRESENTACION LEGAL DE LA SOCIEDAD CUANDO LO ESTIME PERTINENTE SIN LIMITACION ALGUNA. IGUAL PARTICIPACION Y ATRIBUCIONES TENDRA SU SUPLENTE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER CUANDO OCUPE EL CARGO, EN CASO DE FALTA ABSOLUTA DE GERMAN CAVELIER GAVIRIA. LOS SOCIOS COLECTIVOS ESTÁN AUTORIZADOS PARA EJERCER LA REPRESENTACIÓN DE LA SOCIEDAD EN CUALQUIER TIEMPO, SIN PERJUICIO DE LAS DELEGACIONES CONFERIDAS A LOS ORGANOS CREADOS POR LOS PRESENTES ESTATUTOS

CERTIFICA:

** NOMBRAMIENTOS **

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0004818 DE NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 22 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 26 DE AGOSTO DE 2005 BAJO EL NUMERO 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE

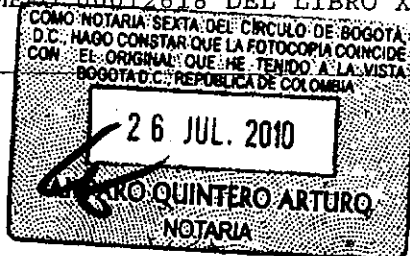
IDENTIFICACION

PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO

CAVELIER GAVIRIA GERMAN

C.C. 000000002877924

QUE POR ACTA NO. 26 DE ASAMBLEA GENERAL DEL 13 DE MAYO DE 2010, INSCRITA EL 24 DE MAYO DE 2010 BAJO EL NUMERO 00012618 DEL LIBRO XIII,



FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
DIRECTORA	
ZAPATA GIRALDO ADRIANA	C.C. 000000051680061
REPRESENTANTE LEGAL	
ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO	N.I.T. 000008001722568
REPRESENTANTE LEGAL	
GALLON GIRALDO CARLOS	C.C. 000000019066425
REPRESENTANTE LEGAL	
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100
SOCIO COLECTIVO	
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100
SOCIO COLECTIVO	
ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO	N.I.T. 000008001722568

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0004818 DE NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 22 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 26 DE AGOSTO DE 2005 BAJO EL NUMERO 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
SUPLENTE DEL PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO	
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100

CERTIFICA:

QUE EL NOMBRAMIENTO DE GALLÓN GIRALDO CARLOS INSCRITO BAJO EL REGISTRO 00012618 DEL LIBRO XIII, SE DA EN SU CONDICIÓN DE REPRESENTANTE LEGAL DE LA ASOCIACIÓN CAVELIER DEL DERECHO.

CERTIFICA:

FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL: APARTE DE LAS FACULTADES Y DEBERES QUE DE TIEMPO EN TIEMPO SE LE ASIGNEN POR EL CONSEJO SUPERIOR, EL DIRECTOR TENDRA LAS SIGUIENTES FUNCIONES : A) LA DE REPRESENTAR LEGALMENTE A LA SOCIEDAD ANTE LAS AUTORIDADES DE CUALQUIER ORDEN O NATURALEZA Y ANTE OTRAS PERSONAS NATURALES O JURIDICAS, CON FACULTADES PARA NOVAR, TRANSIGIR, COMPROMETER Y DESISTIR Y PARA COMPARECER EN JUICIOS INCLUSIVE EN AQUELLOS EN DONDE SE DISPUTE LA PROPIEDAD DE BIENES INMUEBLES; B) CUMPLIR Y HACER CUMPLIR LOS ESTATUTOS Y REGLAMENTOS DE LA SOCIEDAD; Y C) CREAR O SUPRIMIR TODOS LOS EMPLEOS QUE SEAN NECESARIOS DE ACUERDO CON EL CONSEJO SUPERIOR PARA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LA SOCIEDAD, ASIGNARLES FUNCIONES, FIJAR SUS SALARIOS Y NOMBRAR LAS PERSONAS QUE DEBAN DESEMPEÑARLOS, ASI COMO RETIRARLOS Y REEMPLAZARLOS CUANDO HAYA LUGAR. CUANDO CUALQUIERA DE LOS ACTOS INDICADOS EN LA CLAUSULA ANTERIOR SE REFIERA A OPERACIONES CUYO MONTO EXCEDA DE LA SUMA EQUIVALENTE A CIENTO OCHENTA (180) SALARIOS MINIMOS MENSUALES, SU CELEBRACION REQUERIRA LA APROBACION PREVIA DEL CONSEJO SUPERIOR.

CERTIFICA:

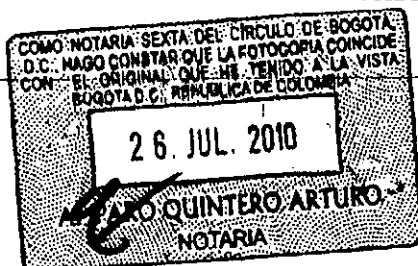
** REVISOR FISCAL **

QUE POR ACTA NO. 0000071 DEL 2 DE SEPTIEMBRE DE 1993, INSCRITA EL 29 DE SEPTIEMBRE DE 1993 BAJO EL NUMERO 00005175 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

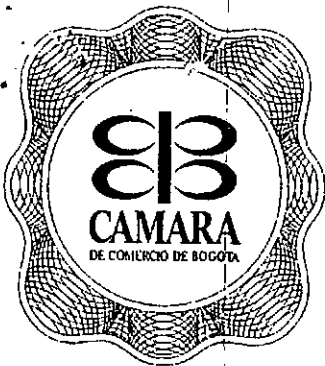
NOMBRE	IDENTIFICACION
REVISOR FISCAL	
RINCON FANDIÑO MIGUEL ALFONSO	C.C. 000000002877024

CERTIFICA:

DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE REGISTRO AQUI CERTIFICADOS QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABILES DESPUES DE LA FECHA DE INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE RECURSOS EN LA VIA GUBERNATIVA.



8



01



* 9 4 7 1 9 8 3 9 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

12 DE JULIO DE 2010

HORA 16:09:43

R028844095

PAGINA: 3 de 3

*** EL PRESENTE CERTIFICADO NO CONSTITUYE PERMISO DE ***
*** FUNCIONAMIENTO EN NINGUN CASO ***

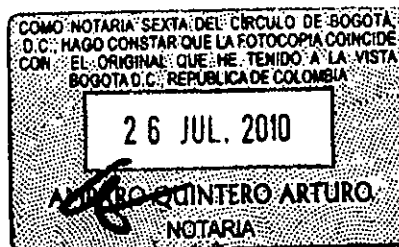
SEÑOR EMPRESARIO, SI SU EMPRESA TIENE ACTIVOS INFERIORES A 30.000 SMLMV Y UNA PLANTA DE PERSONAL DE MENOS DE 200 TRABAJADORES, USTED TIENE DERECHO A RECIBIR UN DESCUENTO EN EL PAGO DE LOS PARAFISCALES DE 75% EN EL PRIMER AÑO DE CONSTITUCION DE SU EMPRESA, DE 50% EN EL SEGUNDO AÑO Y DE 25% EN EL TERCER AÑO. LEY 590 DE 2000 Y DECRETO 525 DE 2009.

RECUERDE INGRESAR A www.supersociedades.gov.co PARA VERIFICAR SI SU EMPRESA ESTA OBLIGADA A REMITIR ESTADOS FINANCIEROS. EVITE SANCIONES.

EL SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO,
VALOR : \$ 3,600

DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO DEL 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES

Esteban Q





Sanofi
Aventis

Co
oco g

REPRESENTACION

REPRÉSENTATION

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/Je (nous) soussigné(s)

SANOFI-AVENTIS

domiciliado (s)

domicilié(s) à 174 Avenue de France, 75013 PARIS, FRANCE

Por el presente nombramos a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Círculo de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

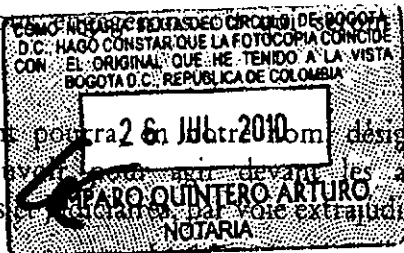
CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y

Par le présent instrument, procède (procédons) à la désignation de CAVELIER ABOGADOS, une société collective constituée conformément aux lois de la République de Colombie selon l'acte No. 6233 déposé le 10 septembre 1974 au rang des minutes à l'étude de notaire six de l'arrondissement notarial de Bogota, sise à Bogota D.C., titulaire de l'immatriculation commerciale No. 00820237 et du matricule fiscal 860041367-3, sise Carrera 4 No. 72 - 35, Bogota, Colombie, comme notre représentant pour toutes les affaires de Propriété Industrielle, ayant la faculté de recevoir des notifications et de nommer les fonds des pouvoirs judiciaires ou extrajudiciaires.

CAVELIER ABOGADOS pourra également nous représenter, avec les mêmes facultés ci-dessus indiquées, devant toute entité ou toute personne, ayant ou non juridiction, toute administration ou toute autorité juridictionnelle, tout tribunal d'arbitrage, dans des affaires de nature civile, commerciale, pénale, constitutionnelle, de concurrence, de concurrence déloyale, administrative, contentieuse-administrative, de protection du consommateur, de variétés végétales, de noms de domaine, d'oppositions ou d'observations, de radiations administratives et judiciaires, de nullité, de mesures conservatoires, de concession de licences, d'actions de protection juridique des droits constitutionnels, de protection de secrets industriels, de droit réglementaire et en général pour qu'il me(nous) représente dans toutes les actions ou dans tous les procès que nous pourrions être engagés contre nous.

Le représentant pourra, en notre nom, désigner des fondés de pouvoir pour agir devant les autorités administratives et judiciales, par voie extrajudiciaire et



demandantes, como demandados, como litisconsortes, como agentes oficiosos, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta autorización, la representante podrá facultar a los apoderados que ella designe para transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así mismo, la representante tendrá la facultad para revocar el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

VO
égatement dans des procès en notre nom, en tant que demandeurs, défendeurs, cointéressés, agents officieux, tiers, pour appel en garantie ou comme intervenants ad excludendum. Dans le cadre de cette autorisation, le représentant pourra autoriser les fondés de pouvoir qu'il désignera à transiger, concilier, admettre les faits du procès, désister, radier, recevoir, renoncer et substituer le pouvoir qui lui sera octroyé. De même, le représentant aura la faculté de révoquer le pouvoir ainsi octroyé au moment où il jugera opportun. Le représentant pourra en tout cas ratifier les actes d'agents officieux.

Dado y firmado hoy/Fait et signé
aujourd'hui le
en/à Paris

28 Mai 2010

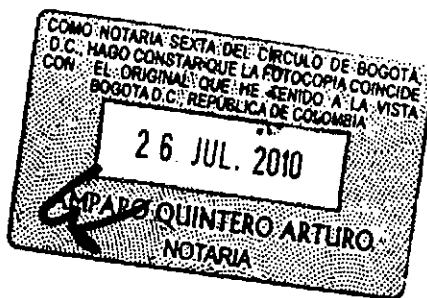
por/par

Firma/Signature

Josiane MERLIER
Directeur, Administration Brevets

Je soussigné Me **Hervé POMMERY**
Notaire à Paris, certifie matériellement
la signature de Madame **Josiane MERLIER**.

apposée sur le présent document.
Cette certification ne comporte aucune
vérification de l'exactitude des faits et
actes mentionnés dans le présent document



APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. République française

Le présent acte public

2. a été signé par. M^e POMHÉRY

3. agissant en qualité de. Notaire

4. est revêtu du sceau/timbre de. Son étude

Attesté

5. à Paris

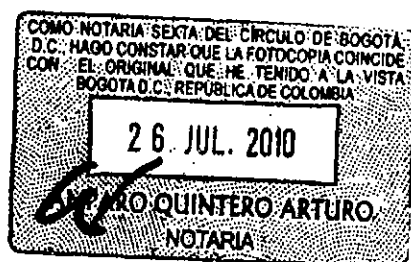
6. le. 08 JUN 2010

7. par le Procureur général près la Cour d'appel de Paris

8. sous n° 40356

9. Sceau : Jean MARTIN
.....
..... Avocat général

"L'Apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, du sceau ou timbre sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est correct ou que la République française approuve son contenu"



11

TRADUCCIÓN OFICIAL NO. 517/2010

EL TEXTO QUE SIGUE ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN FRANCES; LLEVA SELLO Y FIRMA DE HELENA URIBE DE LEMOINE, TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL, SEGÚN RESOLUCION No. 3618 EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA EL 6 DE SEPT. DE 1972.

TRADUCCIÓN DE LOS SELLOS QUE SE ENCUENTRAN EN EL DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN OTORGADO POR **SANOFI-AVENTIS**, DOMICILIADA EN 174 AVENUE DE FRANCE, 75013 PARIS, FRANCE, A **CAVELIER ABOGADOS**

DADO Y FIRMADO EL 28 DE MAYO DE 2010 /

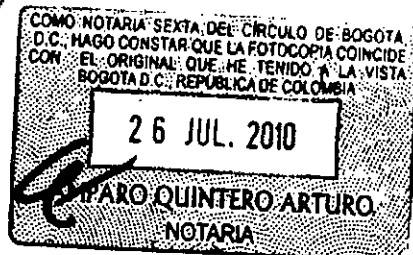
POR: **JOSIANE MERLIER**, DIRECTOR ADMINISTRACIÓN DE PATENTES

EL SUSCRITO ABOGADO **HERVE POMMERY**, NOTARIO DE PARIS, CERTIFICA MATERIALMENTE LA FIRMA DE LA SEÑORA **JOSIANE MERLIER**, PUESTA EN EL PRESENTE DOCUMENTO. ESTA CERTIFICACIÓN NO CONLLEVA NINGUNA VERIFICACIÓN ACERCA DE LA EXACTITUD DE LOS HECHOS Y ACTOS MENCIONADOS EN EL PRESENTE DOCUMENTO.

FIRMADO: **HERVE POMMERY**, NOTARIO ASOCIADO DE PARIS.

HAY SELLO DEL NOTARIO.

Hele L



ESPACIO

EN

BLANCO

APOSTILLA

CONVENIO DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961 /

1. PAÍS: REPÚBLICA FRANCESA

EL PRESENTE DOCUMENTO PÚBLICO

2. HA SIDO FIRMADO POR: EL ABOGADO HERVE POMMERY
3. ACTUANDO EN SU CAPACIDAD DE: NOTARIO
4. LLEVA EL SELLO DE: SU DESPACHO

CERTIFICADO

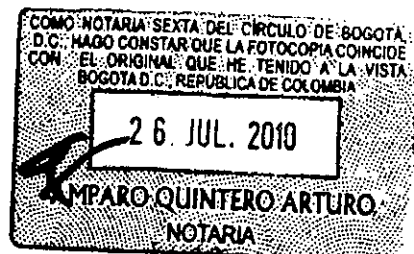
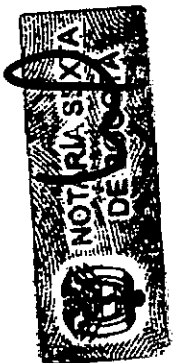
5. EN: PARÍS
6. EL: 8 DE JUNIO DE 2010
7. POR: EL PROCURADOR GENERAL DE LA CORTE DE APELACIONES DE PARIS
8. BAJO EL NO: 40356
9. SELLO: CORTE DE APELACIONES DE PARIS
10. FIRMADO: JEAN MARTIN, ABOGADO GENERAL

La Apostilla confirma únicamente la autenticidad de la firma, del sello o de la estampilla del documento. No implica que el contenido del documento sea verdadero ni que la República Francesa apruebe su contenido.

LA TRADUCTORA OFICIAL

Helena Uribe de Lemoine

HELENA URIBE DE LEMOINE



RESECCION
071114

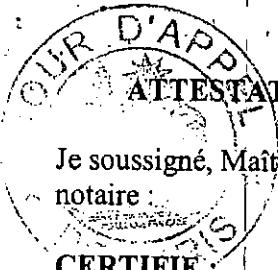
025547
Helena Uribe
CUYA FIRMATA COINCIDE EN EL
DOCUMENTO DE EMERGENCIA
AS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

260 JUL 27 P 1:00
JEFE DE LEGACIONES
BOGOTA D.C.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
26 JUL. 2010
ARTURO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

000 13



ATTESTATION NOTARIEE

Je soussigné, Maître Hervé POMMERY, notaire :

CERTIFIE :

Que la signature qui précède de Mme Josiane MERLIER est authentique

Que la signataire exerce actuellement la fonction de

Directeur, Administration Brevets

de la société

SANOFI AVENTIS

Société légalement constituée et existant selon les lois de France

Domiciliée à

**174 Avenue de France
75013 PARIS, (France)**

Et que la signataire est dûment autorisée à concéder le présent document.

Fait et signé à **PARIS**

Le **7 juin 2010**

Signature : **Hervé POMMERY**
NOTAIRE

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

El infrascrito, Maître Hervé POMMERY, Notario :

CERTIFICA :

Que la Firma que antecede de Sra. Josiane MERLIER es auténtica

Que el signatario desempeña actualmente el cargo de

Directeur, Administration Brevets

de la compañía

SANOFI AVENTIS

Sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a las leyes de FRANCIA

Que la dirección de dicha compañía es

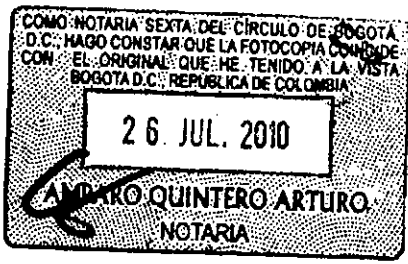
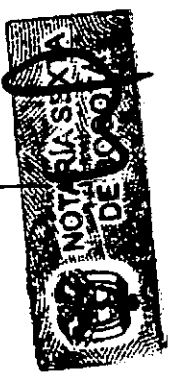
**174 Avenue de France
75013 PARIS, (Francia)**

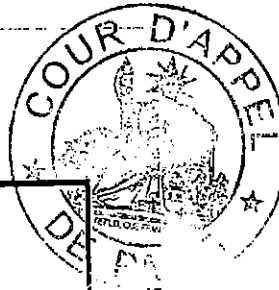
Y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento.

Dado y firmado en **PARIS**

El **7 junio de 2010**

Firma : **Hervé POMMERY**
NOTAIRE





APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. République française

Le présent acte public

2. a été signé par. M. POHMER

3. agissant en qualité de. Notaire

4. est revêtu du sceau/timbre de. Son étude

Attesté

5. A Paris 08 JUIN 2010

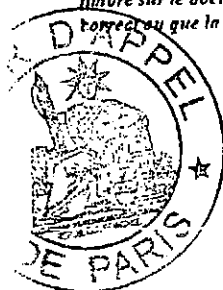
6. le.....

7. par le Procureur général près la Cour d'appel de Paris

8. sous n° 40355 [Signature]

9. Sceau : Jean MARTIN
"AVOUCAT HONORÉ"

"L'Apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, du sceau ou timbre sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est correct ou que la République française approuve son contenu"



COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

26 JUL. 2010

[Signature]
ARTURO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

14

TRADUCCION OFICIAL NO. 517/2010

AUTENTICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

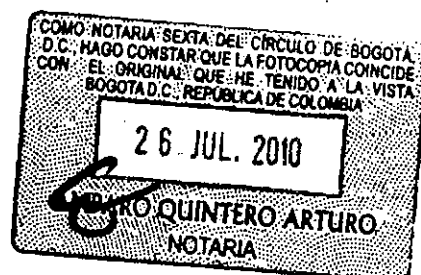
EL INFRASCRITO ABOGADO HERVE POMMERY, NOTARIO:, CERTIFICA QUE LA FIRMA QUE ANTECEDE DE LA SEÑORA JOSIANE MERLIER ES AUTENTICA; QUE EL SIGNATARIO DESEMPEÑA ACTUALMENTE EL CARGO DE **DIRECTOR, ADMINISTRACIÓN DE PATENTES**, DE LA SOCIEDAD **SANOFI AVENTIS**, SOCIEDAD QUE ACTUALMENTE EXISTE Y ESTA ORGANIZADA DE ACUERDO A LAS LEYES DE FRANCIA, QUE LA DIRECCION DE DICHA COMPAÑIA ES 174 AVENUE DE FRANCE, 75013 PARIS, (FRANCIA) Y QUE EL SIGNATARIO TIENE FACULTAD PARA OTORGAR ESTE DOCUMENTO.

DADO Y FIRMADO: EN PARIS EL 7 DE JUNIO DE 2010

FIRMADO: HERVE POMMERY, NOTARIO DE PARIS

HAY SELLO DEL NOTARIO

Handwritten signature



ESPACIO

EN

BLANCO

APOSTILLA

CONVENIO DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961

2. PAÍS: REPÚBLICA FRANCESA

EL PRESENTE DOCUMENTO PÚBLICO

2. HA SIDO FIRMADO POR: EL ABOGADO HERVE POMMERY
3. ACTUANDO EN SU CAPACIDAD DE: NOTARIO
4. LLEVA EL SELLO DE: SU DESPACHO

CERTIFICADO

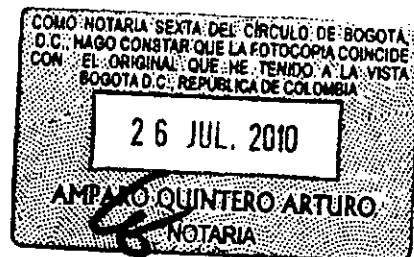
5. EN: PARÍS
6. EL: 8 DE JUNIO DE 2010
7. POR: EL PROCURADOR GENERAL DE LA CORTE DE APELACIONES
DE PARÍS
8. BAJO EL NO: 40355
9. SELLO: CORTE DE APELACIONES DE PARÍS
10. FIRMADO: JEAN MARTIN, ABOGADO GENERAL

La Apostilla confirma únicamente la autenticidad de la firma, del sello o de la estampilla del documento. No implica que el contenido del documento sea verdadero ni que la República Francesa apruebe su contenido.

LA TRADUCTORA OFICIAL

Helena Uribe de Lemoine

HELENA URIBE DE LEMOINE





BOGOTÁ D.C.

025549
Helena Uribe
CUYA FICHA IDENTIFICA EN EL
DOCUMENTO DESEMPERA
AS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2010 JUL 26 P 1:00

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTÁ
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTÁ D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
26 JUL. 2010
AMARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA



8



AVENTIS, documento que está debidamente legalizado. --
Presente la señora **ADRIANA ZAPATA GIRALDO**
domiciliada en Bogotá, identificada como aparece al pie de
su firma y manifestó que está conforme con el contenido
de esta escritura pública. -----

----- **HASTA AQUI LAS DECLARACIONES DEL INTERESADO** -----

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACIÓN. Leído, el presente instrumento público por
el otorgante, dio su asentimiento y en prueba de ello lo firma junto con la suscrita
Notaria quien en esta forma lo autoriza. -----

DERECHOS NOTARIALES: \$ 42.860.00 -----

IVA: \$ 14.732.00 -----

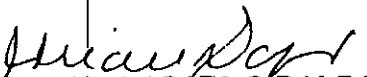
RECAUDO SUPERINTENDENCIA: \$3.570.00 -----

RECAUDO FONDO NACIONAL DE NOTARIADO: \$3.570.00 -----

RESOLUCIÓN 10301 DE DICIEMBRE 17 DE 2009 -----

PAPEL NOTARIAL: El presente instrumento público se extendió y firmó en las
hojas de papel notarial números: 7-700044-126454 7-700044-125990

EN BLANCO... EN BLANCO


ADRIANA ZAPATA GIRALDO

C.C. 51680061

TEL. 2110348

Representante Legal de **CAVELIER ABOGADOS**



AMPARO QUINTERO
NOTARIA(O) SEXTA(O) (6) DE BOGOTÁ, D.C.

T . CAVELIER.Angelica.PE



ES FIEL Y TREINTA Y DOS COPIA (FOTOCOPIA) TOMADA DE LA
ESCRITURA PUBLICA NUMERO 3870 DE FECHA 26 DE JULIO DE 2010.

COPIA QUE EXPIDO EN 12 HOJAS RUBRICADAS EN SUS MARGENES , LA
CUAL CARECE DE NOTAS DE REVOCATORIA, MODIFICACION O
SUSTITUCION, POR TANTO SE PRESUME VIGENTE EL PODER EN ELLA
CONTENIDO.

BOGOTA, D.C. 19 DE ABRIL DE 2011

RESOLUCION 01 DE 2008



MABEL ANDREA RODRIGUEZ D.
NOTARIA SEXTA (E). DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
6 May 2010 (06.05.2010)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2010/049819 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 51/04 (2006.01) *G01N 33/60* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/IB2009/007562

(22) International Filing Date:
27 October 2009 (27.10.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
08291013.4 28 October 2008 (28.10.2008) EP

(71) Applicants (for all designated States except US):
SANOFI-AVENTIS [FR/FR]; 174 avenue de France,
F-75013 Paris (FR). COMMISSARIAT A L'ENERGIE
ATOMIQUE C.E.A. [FR/FR]; Bâtiment Le ponant
D-25, rue Leblanc, F-75015 Paris (FR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BENAVIDES, Je-
sus [ES/FR]; c/o Sanofi-Aventis, Patent Department, 174,
Avenue de France, F-75013 Paris (FR). BOUTIN, Hervé
[FR/GB]; 8 Hawphom drive, Manchester M191GX (GB).
CASTEL, Marie-Noëlle [FR/FR]; c/o Sanofi-Aventis,
Patent Department, 174, Avenue de France, F-75013
Paris (FR). DAMONT, Annelaure [FR/FR]; 13 rue de la
tour, F-78117 Châteaufort (FR). DOLLE, Frédéric [FR/
FR]; 10, allée de Villeneuve, F-91940 Gometz-le-Châtel
(FR). HANTRAYE, Philippe [FR/FR]; 8 Allée Jean
François de la Pérouse, F-91420 Morangis (FR). MAR-
GUET, Frank [FR/FR]; c/o Sanofi-Aventis, Patent De-
partment, 174, Avenue de France, F-75013 Paris (FR).
ROONEY, Thomas [GB/FR]; c/o Sanofi-Aventis, Patent
Department, 174, Avenue de France, F-75013 Paris (FR).
RIVRON, Luc [FR/FR]; c/o Sanofi-Aventis, Patent De-

partment, 174, Avenue de France, F-75013 Paris (FR).
TAVITIAN, Bertrand [FR/FR]; 186 rue de Vaugirard,
F-75015 Paris (FR). THOMINIAUX, Cyrille [FR/FR];
12 rue de la République, F-78470 Saint Rémy les
Chevreuse (FR).

(74) Agent: QUELLARI, Mylène; Sanofi-aventis, Départe-
ment Brevets, 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments (Rule 48.2(h))

(54) Title: USE OF 7-CHLORO-N,N,5-TRIMETHYL-4-OXO-3-PHENYL-3,5-DIHYDRO-4H-PYRIDAZINO[4,5-B]INDOLE-1-ACETAMIDE AS A BIOMARKER OF PERIPHERAL BENZODIAZEPINE RECEPTOR LEVELS

(57) Abstract: Use of a radiolabelled form of 7-chloro-N,N,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4H-pyridazino[4,5-b]in-
dole-1-acetamide as a biomarker for the detection, in an individual, of PBR levels associated with normal and pathological condi-
tions. Method for the detection of PBR levels associated with normal and pathological conditions. Diagnostic kit.

WO 2010/049819 A1

USE OF 7-CHLORO-*N,N*,5-TRIMETHYL-4-OXO-3-PHENYL-3,5-DIHYDRO-4*H*-
PYRIDAZINO[4,5-*B*]INDOLE-1-ACETAMIDE AS A BIOMARKER
OF PERIPHERAL BENZODIAZEPINE RECEPTOR LEVELS

The current invention relates to the use of 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide as a biomarker for the detection, in an individual, of PBR (peripheral benzodiazepine receptor) levels associated with normal and pathological conditions. The current invention also concerns a method of detection of PBR levels for the above purposes.

Under normal physiological conditions, the PBR, also known as translocator protein 18 kDa (TSPO) (Papadopoulos, B. *et al.* (2006) Trends Pharmacol. Sci. **27**: 402-409), is expressed at low levels in the brain, mainly in microglial cells, and is highly expressed in a number of peripheral tissues, such as adrenal glands, pineal gland, salivary glands, gonads, kidney, lung, heart and skeletal muscle (Chen, M-K. and Guilarte, T. (2008) Pharmacology and Therapeutics **118**: 1-17; Venneti, S. *et al.* (2006) Progress in Neurobiol. **80**: 308-322). Subcellular localization studies with the reference PBR ligand, [³H]PK11195, have demonstrated that the PBR is located in the outer mitochondria membrane (Anholt, R.R. *et al.* (1986) J. Biol. Chem. **261**: 576-583; Antkiewicz-Michaluk, L. *et al.* (1988) Mol. Pharmacol. **34**: 272-278). However, immunohistochemical studies have also shown that the PBR is expressed in blood cells (devoid of mitochondria) (Olson, J.M. *et al.* (1988) Eur. J. Pharmacol. **152**: 47-53) and can be localized to the plasma membrane (O'Beirne, G. *et al.* (1990) Eur. J. Biochem. **188**: 131-138; Woods, M.J. *et al.* (1996) Biochem. Pharmacol. **51**: 1283-1292). A nuclear or peri-nuclear localization of the PBR has also been observed in breast cancer (Hardwick, M. *et al.* (1999) Cancer Res. **59**: 831-842), human glioma cells (Brown, R.C. *et al.* (2000) Cancer Lett. **156**: 125-132), hepatic tumor cells (Corsi, L. *et al.* (2005) Life Sci. **76**: 2523-2533) and glial cells (Kuhlmann, A.C. and Guilarte, T.R. (2000) J. Neurochem. **74**: 1694- 1704).

A marked increase in PBR levels is observed after cell injury, inflammation or proliferation and is associated with a number of acute and chronic pathological conditions (Chen, M-K. and Guilarte, T. (2008) Pharmacology and Therapeutics **118**: 1-17; Venneti, S. *et al.* (2006) Progress in Neurobiology **80**: 308-322). These include: brain injuries, such as stroke and ischemia-reperfusion injury (Gerhard, A. *et al.* (2000) Neuroreport **11**: 2957-2960; Gerhard, A. *et al.* (2005) Neuroimage **24**: 404-412), traumatic brain injury (Raghavendra, R. *et al.* (2000) Exp. Neurol. **161**: 102-114); brain infections, such as encephalitis (Banati, R.B. *et al.* (1999) Neurology **53**: 2199-2203; Cagin, A. *et al.* (2001) Brain **124**: 2014-2027); neurological

19

diseases, such as multiple sclerosis (Banati, R.B. *et al.* (2000) *Brain* **123**: 2321-2337), Alzheimer's disease and dementia (Cagnin, A. *et al.* (2001) *Lancet* **358**: 461-467; Versijpt, J.J. *et al.* (2003) *Eur. Neurol.* **50**: 39-47), Parkinson's disease (Ouchi, Y. *et al.* (2005) *Ann. Neurol.* **57**: 168-175; Gerhard, A. *et al.* (2006) *Neurobiol. Dis.* **21**: 404-412), amyotrophic lateral sclerosis (Turner, M.R. *et al.* (2004) *Neurobiol. Dis.* **15**: 601-609), cortico-basal degeneration (Gerhard A. *et al.* (2004) *Mov. Disord.* **19**: 1221-1226; Henkel, K. *et al.* (2004) *Mov. Disord.* **19**: 817-821), Huntington's disease (Messmer, K. and Reynolds, G.P. (1998) *Neurosci. Lett.* **241**: 53-56; Pavese, N. *et al.* (2006) *Neurology* **66**: 1638-1643) and epilepsy (Sauvageau, A. *et al.* (2002) *Metab. Brain Dis.* **17**: 3-11). The increased PBR levels in CNS pathologies are mainly observed in microglial cells (Chen, M-K. and Guilarte, T. (2008) *Pharmacology and Therapeutics* **118**: 1-17; Venneti, S. *et al.* (2006) *Progress in Neurobiology* **80**: 308-322).

Large increases in PBR are also observed in cancer (Cornu, P. *et al.* (1992) *Acta. Neurichir.* **119**: 146-152; Hardwick, M. *et al.* (1999) *Cancer Res.* **59**: 831-842; Maaser, K. *et al.* (2002) *Cancer Res.* **8**: 3205-3209), pulmonary inflammation (Audi, S.H. *et al.* (2002) *Lung.* **180**: 241-250; Hardwick, M.J. *et al.* (2005) *Mol. Imaging.* **4**: 432-438), cardiac ischemia (Mazzone, A. *et al.* (2000) *J. Am. Coll. Cardiol.* **36**: 746-750), renal ischemia (Zhang, K. *et al.* (2006) *J. Am. Coll. Surg.* **203**: 353-364), rheumatism (fibromyalgia) (Faggioli, P. *et al.* (2004) *Rheumatology (Oxford)* **43**: 1224-1225), sciatic nerve regeneration (Mills, C.D. *et al.* (2005) *Mol. Cell. Neurosci.* **30**: 228-237), psoriatic arthritis (Guisti, L. *et al.* (2004) *Clin. Biochem.* **37**: 61-66) and atherosclerosis (Fujimura, Y. *et al.* (2008) *Atherosclerosis*, **201**: 108-111; Laitinen, I. *et al.* (2008) *Eur. J. Nuc. Med. Mol. Imaging* **36**: 73-80).

By contrast, a decrease in PBR levels is observed in the brain of schizophrenia patients (Kurumaji, A. *et al.* (1997) *J. Neural. Transm.* **104**: 1361-1370; Wodarz, N. *et al.* (1998) *Psychiatry Res.* **14**: 363-369) and in rheumatoid arthritis (Bribes, E. *et al.* (2002) *Eur. J. Pharmacol.* **452**: 111-122) and osteoarthritis (Bazzichi, L. *et al.* (2003) *Clin. Biochem.* **36**: 57-60).

The ability to image PBR levels *in vivo* in brain and other tissues could therefore serve as an important biomarker of disease progression, to determine and evaluate the efficacy of a therapeutic treatment and to evaluate PBR receptor occupancy *in vivo*.

The reference PET PBR ligand, [^{11}C]PK11195, has been used extensively for *in vivo* imaging of PBR levels in a number of neuropathological conditions (Chen, M-K and Guilarte, T. (2008) *Pharmacology and Therapeutics* **118**: 1-17; Venneti, S. *et al.* (2006) *Progress in Neurobiology* **80**: 308-322). However, [^{11}C]PK11195 shows relatively low brain uptake, high non-specific binding and a poor signal to noise ratio. These properties limit the sensitivity of [^{11}C]PK11195 for PET imaging of PBR levels and occupancy studies in the CNS. The development of

improved PBR PET ligands with higher specific binding and greater sensitivity than [^{11}C]PK11195 would therefore provide a major advance for the imaging of PBR levels in brain and other tissues.

Among the compounds described and claimed in the documents WO99/06406 and WO00/44384, a pyridazino[4,5-*b*]indole derivative, 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide, was identified as particularly interesting for use as a PET (or SPECT) ligand for the PBR. This compound has high affinity for the PBR *in vitro* and *in vivo* (Ferzaz, B. *et al.* (2002) J. Pharm. Exp. Therap. **301**: 1067-1078).

Summary of Invention

The present invention concerns the use of a radiolabelled form of 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide as a biomarker for the detection of PBR levels associated with normal conditions and PBR levels associated with pathological conditions.

The present invention also concerns a method for the detection of PBR levels associated with normal conditions and PBR levels associated with pathological conditions using a radiolabelled form of 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide.

The present invention also concerns a diagnostic kit for the detection of PBR levels.

Definitions

For convenient reasons and to facilitate reading, the compound 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide has been renamed as "A" in some chapters of the current application.

For the present invention the following words are to be understood accordingly.

-Biomarker: a characteristic that can be objectively measured (ie with acceptable precision and reproducibility) and used as an indicator of a normal physiological or pathological process and to evaluate the action of medical therapies. A biomarker can be a biological, anatomic, physiological, biochemical or molecular parameter that can be detected in tissue or biological fluid.

-Inflammation: response to injury or destruction of tissues. In the periphery, acute inflammation

21

consists of leukocytic infiltrates characterized by polymorphonuclear cells (neutrophils) and chronic inflammation consists of mononuclear cells (macrophages, lymphocytes, plasma cells). In the brain, inflammation incorporates a wide spectrum of cellular responses that include activation of microglia and astrocytes and the participation of cytokines and chemokines, complement proteins, acute phase proteins, oxidative injury, and related molecular processes. These events may have detrimental effects on neuronal function, leading to neuronal injury and further glial activation and ultimately neurodegeneration. In response to brain inflammation, glial cells (mostly microglia) are activated and overexpress the PBR. The levels of PBR in the brain are therefore an indicator of neuroinflammation and can be considered as a biomarker of neuroinflammation for the present invention.

-Pathological conditions: these conditions can include neurological diseases: any injury, disorder or disease that affects the function of the central nervous system. These can include acute brain injuries, such as stroke, ischemia-reperfusion injury and traumatic brain injury; brain infections, such as encephalitis; neurological diseases, such as multiple sclerosis, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, dementia, cortico-basal degeneration, Huntington's disease and epilepsy; pathological conditions can also include psychiatric diseases, such as schizophrenia; peripheral inflammatory processes, such as pulmonary inflammation, atherosclerosis, cardiac ischemia, renal ischemia, rheumatism (fibromyalgia), psoriatic arthritis, rheumatoid arthritis and osteoarthritis; proliferative diseases, such as cancer.

-Receptor occupancy: a measure of the quantity of binding to a biochemical target or receptor. The level of receptor occupancy for a drug can be measured by comparing the time-activity measurements obtained with a radiolabelled PET ligand alone and when the PET ligand is given after administration of the unlabelled drug. The PET ligand must bind to the same receptor as the unlabelled drug. The amount of the radiolabelled PET ligand binding to the receptor decreases in the presence of increasing concentrations of the unlabelled drug. The magnitude of this decrease is defined as the receptor occupancy of the unlabelled drug.

-PET imaging: positron emission tomography is an imaging technique which produces a three-dimensional image or map of functional processes in the body. The system detects pairs of gamma rays emitted indirectly by a positron-emitting radionuclide (tracer), which is introduced into the body on a biologically active molecule. Images of tracer concentration in 3-dimensional space within the body are then reconstructed by computer analysis. The materials used for PET are scintillators like bismuth germanate, lutetium oxy-orthosilicate, or gadolinium-

orthosilicate, because of their high γ -ray stopping power and speed of signal conversion. Micro PET is the application of PET for small animal imaging.

-SPECT imaging: single photon emission computed tomography is another imaging technique which produces a three-dimensional image or map of functional processes in the body. The system directly detects gamma rays emitted by a single photon-emitting radionuclide (tracer), which is introduced into the body on a biologically active molecule. Images of tracer concentration in 3-dimensional space within the body are also then reconstructed by computer analysis.

-Radiolabelled form: any molecule where one or several atoms have been replaced by isotopes enabling its detection. The positron emitting radioisotopes most frequently used for PET imaging are: carbon-11 (or ^{11}C , $t_{1/2}=20$ min), nitrogen-13 (or ^{13}N , $t_{1/2}=10$ min), oxygen-15 (or ^{15}O , $t_{1/2}=2$ min). Also to be considered are molecules where additional atoms have been added in order to label the derivatives with other positron emitting radioisotopes for PET imaging, such as fluorine-18 (or ^{18}F , $t_{1/2}=110$ min), but also gallium-68 (^{68}Ga , $t_{1/2}=68$ min), copper-64 (^{64}Cu , $t_{1/2}=12.7$ hrs), bromine-76 (or ^{76}Br , $t_{1/2}=16.1$ hrs) and iodine-124 (or ^{124}I , $t_{1/2}=4.2$ days). Finally, also to be considered are molecules where other additional atoms have been added in order to label the derivatives with single photon emitting radioisotopes for SPECT imaging, such as iodine-123 (or ^{123}I , $t_{1/2}=13.1$ hrs) or technetium-99m (or $^{99\text{m}}\text{Tc}$, $t_{1/2}=6.0$ hrs).

The synthesis of radiolabelled ligands and the substitution of an atom by an isotope can be performed by several techniques known to persons skilled in the art. For example, for the substitution of a carbon atom by a carbon-11, we can use several derivatives such as [^{11}C]methyl iodide or [^{11}C]methyl triflate (Welch M.J. *et al.* (2003) In *Handbook of Radiopharmaceuticals - Radiochemistry and Applications* (Welch MJ, Redvanly CS Eds.), New York-Chichester-Brisbane-Toronto, Wiley-Interscience Pub., 1-848). In the case of A, several methyl groups can be labelled with carbon-11, such as the *N,N*-dimethylacetamide or the *N*-methylindole functions.

In the case of a labelling with fluorine-18, the radioisotope may be directly attached to the core structure (A) by nucleophilic aliphatic or aromatic (including heteroaromatic (Dollé F. *et al.* (2005) *Curr. Pharm. Design* 11: 3221-3235)) substitutions or electrophilic substitutions or linked through the addition of a spacer group, both techniques known to persons skilled in the art (Kilbourn MR. (1990) In *Fluorine-18 Labeling of Radiopharmaceuticals*, Nuclear Science Series (Kilbourn MR Ed.), National Academy Press, Washington, D.C., 1-149; Lasne M.-C. *et al.* (2002) *Topics in Current Chemistry* 222: 201-258; Cai L. *et al.* (2008) *Eur. J. Org. Chem.* 17:

2853-2873; Dollé F. *et al.* (2008) In *Fluorine and Health: Molecular Imaging, Biomedical Materials and Pharmaceuticals*, Tressaud A, Haufe G (Eds). Elsevier: Amsterdam-Boston-Heidelberg-London-New York-Oxford-Paris-San Diego-San Francisco-Singapore-Sydney-Tokyo, 3-65). Of particular interest is the use of an alkyl, alkenyl or alkynyl linker for the addition of the fluorine-18 atom (Damont A. *et al.* (2008) *J. Label. Compds Radiopharm.* **51**: 286-292; Dollé F. *et al.* (2006) *Bioorg. Med. Chem.* **14**: 1115-1125; Dollé F. *et al.* (2007) *J. Label. Compds Radiopharm.* **50**: 716-723).

In the case of a labelling with another halogen (such as bromine-76, iodine-123 or iodine-124), the radioisotope may also be directly attached by nucleophilic or electrophilic substitutions to the core structure (A) or linked through the addition of a spacer group, both techniques known to persons skilled in the art (Mazière B. *et al.* (2001) *Curr. Pharm. Des.* **7**: 1931-1943; Coenen H.H. *et al.* (2006) In *Radioiodination reactions for pharmaceuticals – Compendium for effective synthesis strategies*, Coenen H.H., Mertens J., Mazière B. (Eds), Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 1-101).

In the case of the labelling with metal radioisotopes (such as gallium-68, copper-64 or technetium-99m), the preferred approach used, which will be considered by a person skilled in the art, is the use of a bifunctional chelating agent based on, for example, the open-chain polyaminocarboxylates ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) and diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA), the polyaminocarboxylic macrocycle 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA), mercaptoacetyldi- and triglycine (MAG2, MAG3), *bis*-(*S*-benzoyl-thioglycolyl)diaminopropanoate ((SBT)₂DAP) and hydrazinonicotinic acid (HYNIC), facilitating the complexation of the radiometal cation at one function and the covalent attachment to the core molecule at another (Brunner U.K. *et al.* (1995) *Radiotracer production – Radiometals and their chelates* In *Principle of Nuclear Medicine*, Wagner H.N. (Ed). Saunders: Philadelphia, 220-228; Weiner R.E. *et al.* (2003) *Chemistry of gallium and indium radiopharmaceuticals* In *Handbook of Radiopharmaceuticals - Radiochemistry and Applications* (Welch MJ, Redvanly CS Eds.), New York-Chichester-Brisbane-Toronto, Wiley-Interscience Pub., 363-400; Anderson C.J. *et al.* (2003) *Chemistry of copper radionuclides and radiopharmaceutical products* In *Handbook of Radiopharmaceuticals - Radiochemistry and Applications* (Welch MJ, Redvanly CS Eds.), New York-Chichester-Brisbane-Toronto, Wiley-Interscience Pub., 401-422; Mahmood A. *et al.* (2003) *Technetium radiopharmaceuticals* In *Handbook of Radiopharmaceuticals - Radiochemistry and Applications* (Welch MJ, Redvanly CS Eds.), New York-Chichester-Brisbane-Toronto, Wiley-Interscience Pub., 323-362).

Direct addition of the fluorine-18 atom (or bromine-76, iodine-123 or iodine-124) may be performed, for example, on the 3-phenyl and/or the pyridazino[4,5-*b*]indole aromatic rings, as well as on any other chemically accessible position (such as the acetamide function). Indirect addition of these radiohalogens (for example through the use a spacer group), or addition of the metal radioactive isotopes mentioned above (gallium-68, copper-64 or technetium-99m, through the use of a chelating agent), may also be performed at any chemically accessible position of the *N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide (A) core (see references above).

-Administration: by preference the administration of a radiolabelled biomarker is by an intraveinuous route of administration.

A first embodiment is the use of 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide as a biomarker for the detection, in an individual, of the PBR (peripheral benzodiazepine receptor) levels and inflammation associated with pathological conditions, wherein said compound is radiolabelled, wherein the radiolabel is chosen among carbon-11, radiohalogens and radiometals. Preferentially said compound is radiolabelled with carbon-11 and more preferentially radiolabelled with carbon-11 on the carbon of the methyl group situated on position 5 of the indole nucleus.

In another embodiment, 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide is radiolabelled with radiometals, preferentially on the 3-phenyl ring at the para position, at the 7-position of the pyridazino[4,5-*b*]indole in replacement of the chlorine atom (with or without a spacer, *vide infra*), or at any *N*-methyl position (*N,N*-dimethylacetamide function or the methyl group situated on position 5 of the indole nucleus).

In another embodiment, 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide is radiolabelled with radiohalogens, preferentially radiolabelled with the radiohalogen fluorine-18, preferentially on the 3-phenyl ring at the para position, at the 7-position of the pyridazino[4,5-*b*]indole in replacement of the chlorine atom (with or without a spacer, *vide infra*), or at any *N*-methyl position (*N,N*-dimethylacetamide function or the methyl group situated on position 5 of the indole nucleus).

In some embodiments, the detection of PBR levels and inflammation is performed by PET imaging (positron emission tomography) or by SPECT imaging (single photon emission computed tomography).

In some embodiments of the invention, a radiolabelled form of 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide is used as a biomarker for the detection of PBR level changes and inflammation associated with pathological conditions,

wherein said pathological conditions are selected from brain injuries, such as stroke, ischemia-reperfusion injury and traumatic brain injury; brain infections, such as encephalitis; neurological diseases, such as multiple sclerosis, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, dementia, cortico-basal degeneration, Huntington's disease and epilepsy; psychiatric diseases, such as schizophrenia; peripheral inflammatory processes, such as pulmonary inflammation, atherosclerosis, cardiac ischemia, renal ischemia, rheumatism (fibromyalgia), psoriatic arthritis, rheumatoid arthritis and osteoarthritis; proliferative diseases, such as cancer.

In some embodiments of the invention a radiolabelled form of 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide is used as a biomarker of PBR levels and inflammation, wherein inflammation is neuroinflammation.

In some embodiments of the invention a radiolabelled form of 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide is used for evaluating the efficacy of a therapeutic treatment.

The present invention also concerns a method for the detection of the PBR and inflammation associated with pathological conditions using a radiolabelled form of 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide.

In some embodiments, the radiolabelled form of 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide contains a radiolabel chosen among carbon-11, radiohalogens and radiometals. In some embodiments, the radiolabelled form of 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide is labelled with carbon-11.

In some embodiments, the radiolabelled form of 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide is radiolabelled on the carbon of the methyl group situated on position 5 of the indole nucleus.

In some embodiments, 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide is radiolabelled with radiometals, preferentially on the 3-phenyl ring at the para position, at the 7-position of the pyridazino[4,5-*b*]indole in replacement of the chlorine atom (with or without a spacer, *vide infra*), or at any *N*-methyl position (*N,N*-dimethylacetamide function or the methyl group situated on position 5 of the indole nucleus).

In some embodiments, 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide is radiolabelled with radiohalogens, preferentially radiolabelled with the radiohalogen fluorine-18, preferentially on the 3-phenyl ring at the para position, at the 7-position of the pyridazino[4,5-*b*]indole in replacement of the chlorine atom (with or without a spacer, *vide infra*), or at any *N*-methyl position (*N,N*-dimethylacetamide function or the methyl

group situated on position 5 of the indole nucleus).

In some embodiments of the invention, the pathological conditions are selected from brain injuries, such as stroke, ischemia-reperfusion injury, traumatic brain injury; brain infections, such as encephalitis; neurological diseases, such as multiple sclerosis, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, dementia, cortico-basal degeneration, Huntington's disease and epilepsy; psychiatric diseases, such as schizophrenia; peripheral inflammatory processes such as pulmonary inflammation, atherosclerosis, cardiac ischemia, renal ischemia, rheumatism (fibromyalgia), psoriatic arthritis, rheumatoid arthritis and osteoarthritis; proliferative diseases, such as cancer.

Another embodiment according to the invention is a method of detection of the PBR and inflammation associated with pathological conditions, wherein inflammation is neuroinflammation.

Another embodiment according to the invention is a method of detection of the PBR and inflammation associated with pathological conditions, which is performed for occupancy studies.

Another embodiment is a method of detection of the PBR and inflammation associated with pathological conditions, said method comprising the following steps:

- a) Administering a radiolabelled form of 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide ;
- b) Acquiring images in a region of interest in the brain or other peripheral tissues using the PET (or SPECT) technique ;
- c) Quantification of the levels of the PBR in a region of interest by quantifying the PET signal associated with a radiolabelled form of 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide in this region of interest ;
- d) Comparing the PET (SPECT) signal obtained in step c) with the signal obtained in a control region of interest ;
- e) Determining the presence of inflammation associated with pathological conditions.

The present invention also relates to a diagnostic kit for the detection of PBR levels associated with normal conditions and changes in PBR levels associated with pathological conditions comprising a radiolabelled form of 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide.

The following examples further illustrate the present invention and are not intended to limit the

invention. For convenient reasons and to facilitate reading, the compound 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide has been renamed as "A" into the figures and the results.

Figure 1: Time-activity-curves of [^{11}C]-A and [^{11}C]PK11195 in lesioned and intact rat striatum. Data are expressed as percentage of injected dose per cubic centimeter as a function of post-injection time (min).

Figure 2: The ratio of [^{11}C]-A and [^{11}C]PK11195 uptake in lesioned vs intact contralateral rat striatum.

Figure 3: Time-activity-curves of [^{11}C]-A in lesioned (ipsi) and intact rat striatum (contro). Arrow indicates addition of an excess of 1mg/kg of PK11195 20 min after injection of [^{11}C]-A in lesioned (ipsi + PK) and intact contralateral (contro + PK) rat striatum. Data are expressed as percentage of injected dose per cubic centimeter as a function of post-injection time (min).

Figure 4: Time-activity-curves of [^{11}C]-A in lesioned (ipsi A) and intact rat striatum (contro A). Arrow indicates addition of an excess of 1mg/kg of A 20 min after injection of [^{11}C]-A in lesioned (ipsi A + A) and intact contralateral (contro A + A) rat striatum. Data are expressed as percentage of injected dose per cubic centimeter as a function of post-injection time (min)

Figure 5: [^{11}C]-A (18 nM) autoradiography in rat brain sections (20 μm) 7-8 days post-lesion. Non-specific binding was assessed using an excess of either unlabelled PK11195 (23 μM) or A (22 μM). Specificity for PBR vs central benzodiazepine binding sites was evaluated using an excess of unlabelled Flumazenil (27 μM). Data are expressed as dpm per arbitrary area unit. * indicates a significant difference relative to the [^{11}C]-A (18 nM) binding in the lesioned striatum.

Figure 6: Time-activity-curves of [^{11}C]-A and [^{11}C]PK11195 in the whole brain (cerebellum excluded) of 11-12 month APP/S1 and wild type PS1 transgenic mice. Data are expressed as percentage of injected dose per cubic centimeter as a function of post-injection time (min).

Figure 7: [^{11}C]-A (18 nM) autoradiography in whole brain sections from 20-23 month old APP/PS1 and wild type PS1 transgenic mice. Non-specific binding was assessed using an excess of either unlabelled PK11195 (23 μM) or A (22 μM). Specificity for PBR vs central benzodiazepine binding sites was evaluated using an excess of unlabelled Flumazenil (27 μM). Data are expressed as dpm per arbitrary area unit.

Figure 8: Time-activity-curves of [^{11}C]-A in 4 different brain regions of a non-human primate (right and left striatum, prefrontal cortex, cerebellum) and corresponding PET summation images of selected coronal brain slices over 120 min at different time-points of the study : baseline (A,B) and 24 hrs post lesion in the right striatum (C,D). The panel (E,F) displays the [^{11}C]-A time activity curves at 48 hrs post lesion in the left striatum and at 7 months post lesion in the right striatum. Data are expressed as percentage of injected dose per 100 mL (%ID/100 mL) as a function of post-injection time (min).

Figure 9: Time-activity-curves of [^{11}C]-A in 4 different brain regions (right and left striatum, prefrontal cortex, cerebellum) and corresponding PET summation images of selected coronal brain slices over 120 min at four different time-points of the study : baseline (A,B), at 48 hrs post lesion (C,D), at 9 days post lesion (E,F) and at 16 days post lesion in the left striatum and at 48 hrs post lesion in the right striatum (G,H). Arrow indicates time of administration of excess unlabelled PK11195 (1 mg/kg). Data are expressed as percentage of injected dose per 100 mL (%ID/100mL) as a function of post-injection time (min).

Figure 10: Analysis of [^{11}C]-A metabolites in plasma and brain.

Figure 11: Selected carbon-11-labelled and fluorine-18-labelled form of A.

Methods

Radiosynthesis of ligands

Labelling with carbon-11

[^{11}C]PK11195 ((R)-N-[^{11}C]Methyl-N-(1-methylpropyl)-1-(2-chlorophenyl)isoquinoline-3-carboxamide, R-enantiomer). Preparation of [^{11}C]PK11195 is based on minor modifications of published processes (Camsonne C. *et al.* (1984) J. Label. Comp. Radiopharm **21**: 985-991; Cremer J.E. *et al.* (1992) Int. J. Rad. Appl. Instrum. B. **19**: 159-66; Boutin, H. *et al.* (2007) Glia **55**: 1459-68; Boutin, H. *et al.* (2007) J. Nucl. Med. **48**: 573-581) and includes the following steps : (1) trapping at -10°C of [^{11}C]methyl iodide in DMF/DMSO (2/1 (v:v), 300 μL) containing 1.5 to 2.0 mg of the precursor for labelling and 15-20 mg of powdered hydroxide (excess) ; (2) heating at 110°C for 3 min ; (3) taking-up the mixture with 0.5 mL of the HPLC mobile phase and (4) purification using semi-preparative HPLC. Quality controls, in particular radiochemical and chemical purity determinations, were performed on an aliquot of the final production batch.

[^{11}C]-A labelling at the N-methylindole function: 7-Chloro-N,N-dimethyl-5-[^{11}C]methyl-4-

29

oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4H-pyridazino[4,5-b]indole-1-acetamide). Preparation of [^{11}C]-A includes the following steps: (1) trapping at -10°C of [^{11}C]methyl triflate in DMF (300 μL) containing 0.2 to 0.3 mg of the precursor for labelling and 4 mg of powdered potassium carbonate (excess); (2) heating at 120°C for 3 min; (3) taking-up the mixture with 0.5 mL of the HPLC mobile phase and (4) purification using semi-preparative HPLC. Quality controls, in particular radiochemical and chemical purity determinations, were performed on an aliquot of the final production batch.

[^{11}C]-A (Labelling at the *N,N*-dimethylacetamide function: 7-Chloro-*N*-[^{11}C]methyl-*N*,5-dimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4H-pyridazino[4,5-b]indole-1-acetamide).

Preparation of [^{11}C]-A also includes the following steps: (1) trapping at -10°C of [^{11}C]methyl iodide in a 1/2 (v:v) mixture of DMF and DMSO (100/200 μL) containing 0.5 to 1.0 mg of the precursor for labelling and 5 μL of an 1M tetrabutylammoniumhydroxide solution in methanol; (2) heating at 120°C for 3 min; (3) taking-up the mixture with 0.5 mL of the HPLC mobile phase and (4) purification using semi-preparative HPLC. Quality controls, in particular radiochemical and chemical purity determinations, were performed on an aliquot of the final production batch.

Labelling with fluorine-18

Preparation of all fluorine-18-labelled derivatives of A includes at least the following steps: (1) fluorination using a [^{18}F]fluoride source at moderate to high temperature in a selected solvent (300 to 900 μL) containing 1 to 10 mg of the appropriate precursor for labelling and (2) purification using for example semi-preparative HPLC. As described above, quality controls, in particular radiochemical and chemical purity determinations, were performed on an aliquot of the final production batch.

There is no particular restriction on the nature of the sources of [^{18}F]fluoride anions to be used in this reaction, and any sources of [^{18}F]fluoride anions conventionally used in reactions of this type may equally be used here, provided that it has no adverse effect on other parts of the molecule. Examples of suitable sources of [^{18}F]fluoride anions include: alkali metal [^{18}F]fluorides, such as sodium [^{18}F]fluoride, potassium [^{18}F]fluoride, cesium [^{18}F]fluoride; ammonium [^{18}F]fluoride, tetraalkylammonium [^{18}F]fluorides, such as tetrabutylammonium [^{18}F]fluoride. Of these, the alkali metal [^{18}F]fluorides, and notably a potassium fluoride, are preferred. The source of [^{18}F]fluoride anions may be activated by the presence of a ligand able to complex the counter cationic species of the source of [^{18}F]fluoride anions. The ligand may be notably a cyclic or polycyclic multidentate ligand. Examples of suitable ligands include notably crown ethers such as 1,4,7,10,13-pentaoxacyclooctadecane (18-C-6) or cryptands such as 4,7,13,16, 21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo-[8,8,8]hexacosane sold under the name K222[®]. Preferably, the source of [^{18}F]fluoride anions is an alkaline metal [^{18}F]fluoride-cryptate complex, notably a potassium [^{18}F]fluoride-cryptate complex, preferably the potassium [^{18}F]fluoride -

4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo-[8,8,8]hexacosane ($K[^{18}F]/K222$). The complex $K[^{18}F]/K222^{\circ}$ may be prepared by any conventional methods (Dollé F. *et al.* (1999) *J. Med. Chem.* **42**: 2251-2259 or Dolci L. *et al.* (1999) *Bioorg. Med. Chem.* **7**: 467-479).

The fluorination reaction can be performed in various solvents and can take place over a wide range of temperatures. In general, it is convenient to carry out the reaction at a temperature from about 50°C to about 200°C and the more often used solvents are dimethylsulfoxide (DMSO), dimethylformamide (DMF) and acetonitrile. The time required for the reaction may also vary widely (from about 5 min to 15 min for example), depending on many factors, notably the reaction temperature, the nature of the reagents and solvents and the amount of the labelling precursor used (Kilbourn MR. (1990) In *Fluorine-18 Labeling of Radiopharmaceuticals*, Nuclear Science Series (Kilbourn MR Ed.), National Academy Press, Washington, D.C., 1-149; Lasne M.-C. *et al.* (2002) *Topics in Current Chemistry*, **222**: 201-258; Dollé F. *et al.* (2005) *Curr. Pharm. Design* **11**: 3221-3235; Cai L. *et al.* (2008) *Eur. J. Org. Chem.* **17**: 2853-2873; Dollé F. *et al.* (2008) In *Fluorine and Health: Molecular Imaging, Biomedical Materials and Pharmaceuticals*, Tressaud A, Haufe G (Eds). Elsevier: Amsterdam-Boston-Heidelberg-London-New York-Oxford-Paris-San Diego-San Francisco-Singapore-Sydney-Tokyo, 3-65). The radiofluorinated compounds thus prepared are usually purified by HPLC as described for the carbone-11-labelled derivatives, but may also be recovered or pre-purified from the reaction mixture by the use of other known chromatography techniques or simply by filtration on a pre-packed separation column.

[^{18}F]Fluoroethoxy-A (7-chloro-N,N,5-trimethyl-4-oxo-3-(4-[^{18}F]fluoroethoxy)-phenyl-3,5-dihydro-4H-pyridazino[4,5-b]indole-1-acetamide)

Preparation of [^{18}F]fluoroethoxy-A includes the following steps : (1) taking up the $K[^{18}F]F$ -Kryptofix[®]222 complex with a DMSO solution (600 μ L) containing the tosyloxy precursor for labelling (2.0-8.0 mg) ; (2) heating at 165°C for 3-10 min ; (3) pre-purification using a C-8 or C-18 PrepSep cartridge and (4) purification using semi-preparative HPLC. Quality controls, in particular radiochemical and chemical purity determinations, were performed on an aliquot of the final production batch.

Labelling with other halogens (bromine-76, iodine-123, iodine-124)

Preparation of all other radiohalogenated derivatives (bromine-76, iodine-123, iodine-124) followed standard techniques and procedures known from skilled man in the art (Mazière B. *et al.* (2001) *Curr. Pharm. Des.* **7**: 1931-1943; Coenen H.H. *et al.* (2006) In *Radioiodination reactions for pharmaceuticals – Compendium for effective synthesis strategies*, Coenen H.H., Mertens J., Mazière B. (Eds), Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 1-101).

Labelling with radiometals (gallium-68, copper-64 and technetium-99m)

Preparation of derivatives labelled with radiometals (gallium-68, copper-64 and technetium-99m) also followed standard techniques and procedures known from skilled man in the art (Brunner U.K. *et al.* (1995) Radiotracer production – Radiometals and their chelates In *Principle of Nuclear Medicine*, Wagner H.N. (Ed). Saunders: Philadelphia, 220-228; Weiner R.E. *et al.* (2003) Chemistry of gallium and indium radiopharmaceuticals In *Handbook of Radiopharmaceuticals - Radiochemistry and Applications* (Welch MJ, Redvanly CS Eds.), New York-Chichester-Brisbane-Toronto, Wiley-Interscience Pub., 363-400; Anderson C.J. *et al.* (2003) Chemistry of copper radionuclides and radiopharmaceuticals products In *Handbook of Radiopharmaceuticals - Radiochemistry and Applications* (Welch MJ, Redvanly CS Eds.), New York-Chichester-Brisbane-Toronto, Wiley-Interscience Pub., 401-422; Mahmood A. *et al.* (2003) Technetium radiopharmaceuticals In *Handbook of Radiopharmaceuticals - Radiochemistry and Applications* (Welch MJ, Redvanly CS Eds.), New York-Chichester-Brisbane-Toronto, Wiley-Interscience Pub., 323-362).

Formulation

Formulation of [^{11}C]PK11195, [^{11}C]-A or any other radiolabelled A derivatives as an i.v. solution for injection often includes a Waters SepPak[®] cartridge-based removal of the HPLC solvents and/or a simple dilution with aq. 0.9% NaCl (physiological saline) to an ethanol concentration below 10%.

Animal Models

All studies were conducted in accordance with the French legislation and European directives.

Rat model of neuroinflammation

Wistar rats (average body weight 300 g, centre d'Élevage René Janvier, France) were kept in thermoregulated, humidity controlled facilities under a 12h/12h light/dark cycle (light on between 7h AM and 7h PM) and were allowed free access to food and water. Neuroinflammation was induced by stereotaxic injection of AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate) (15 mM in PBS buffer, Sigma[®]) using a 1 μL microsyringe and micropump (injection rate: 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$, UltraMicroPump II[®] and Micro4[®] Controller, WPI Inc., USA), as previously described (Boutin, H. *et al.* (2007) *Glia* 55: 1459-68.; Boutin, H. *et al.* (2007) *J. Nucl. Med.* 48: 573-581). AMPA (0.5 μL) was injected into the right striatum (Bregma +0.7 mm, from sagittal suture: 2.7 mm, depth from brain surface: 5.5 mm). Animals were maintained normothermic (body temperature: $36.7 \pm 0.5^\circ\text{C}$, mean $\pm$ SD) during the surgery through the use of a heating blanket (Homeothermic Blanket Control Unit, Harvard Apparatus Limited[®], Edenbridge, Kent, UK).

Primate model of neuroinflammation

Cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) weighing 4-5 kg were housed in thermoregulated, humidity controlled facilities under a 12 h/12 h light/dark cycle (light on between 7 h a.m. and 7 h p.m.) and were allowed free access to food and water. Neuroinflammation was induced by local stereotaxic injections of quinolinic acid (quinolinic acid, Sigma, St. Louis, MO; dissolved in 0.1 M PBS, pH 7.2) into the primate striatum (1 injection site into caudate and 2 injection sites into the putamen) during two different surgical interventions where quinolinic acid was injected into one hemisphere on day 1 and the second hemisphere 2 weeks or 7 months later (Fig. 8 and 9). During each surgical session the animals received 60 nmol of quinolinic acid distributed over three different striatal sites, one 5 μ L site in the caudate and two 10 μ L sites in the putamen using a 10 μ L-Hamilton syringe attached to a 26-gauge needle. The stereotactic coordinates, determined according to the stereotactic atlas of Swabo and Cowan (1984), were as follows: caudate site [AP +19 mm, ML $\pm$ 6 mm, DV -14 mm from sinus] ; putaminal site1 [AP: +19 mm, ML: $\pm$ 12 mm, DV: -17 mm from stereotaxic zero] ; putaminal site 2 [AP: +17 mm, ML: $\pm$ 13 mm, DV: -16 mm from sinus]. The excitotoxin was injected at a rate of 0.1 μ L/min and the injection syringe left in place for an additional 5 min to avoid backflow of the toxin. Throughout the surgery, the primate temperature was maintained normothermic (rectal temperature, 36 $^{\circ}$ C $\pm$ 0.6 $^{\circ}$ C, mean $\pm$ SD). After removing the needle, the skin was sutured and the animals were allowed to recover from anesthesia and returned to their cages when fully awake.

Transgenic mice

Generation and characterization of single PS1M146L (PS1) and double APP751SL $\times$ PS1M146L (APP $\times$ PS1) transgenic mice were achieved, as described previously (Blanchard, V. *et al.* (2003) Exp. Neurol. **184**: 247-263). In these animals APP is expressed at a high level in all cortical neurons under the control of the Thy-1 promoter. Human PS1 with the M146L mutation is expressed under the control of the HMG-CoA reductase promoter. The level of amyloid load was found to be quite reproducible at a given age. Both single PS1 and double APP $\times$ PS1 mice, provided by Sanofi-Aventis, were used for PET imaging at the age of 11-12 months and autoradiography at 20-23 months.

MicroPET scans and data acquisition

Rats and transgenic mice

MicroPET imaging was performed 7 days post-AMPA injection in rats and in 11-12 month old transgenic mice. In both mice and rats, anaesthesia was induced by isoflurane 5%, and

33

thereafter maintained by 2-2.5% of isoflurane in a mixture of 70%/30% NO₂/O₂. For PET scans, the head of the rat was placed in a home-made stereotaxic frame compatible with PET acquisition and the rats were maintained normothermic (rectal temperature: 36.7±0.5°C, mean±SD). Mice were placed on a bed equipped with an anaesthetic mask allowing heating of the air flow and the rectal temperature was monitored using the Homeothermic Blanket Control Unit. All imaging protocols were conducted with a Concorde Focus 220 PET scanner using either [¹¹C]PK11195 or [¹¹C]-A.

In rats, radiolabelled compounds and unlabelled ligands were injected in the caudal vein with the use of 24 gauge catheter. Radiolabelled compounds were injected concomitantly at the start of the PET acquisition and unlabelled compounds were injected 20 min after injection of radiotracers. PET data were acquired for 80 min. In mice, radiolabelled compounds were injected in the caudal vein using 28 gauge needles immediately before the PET scan initiation. PET data were acquired for 60 min.

Primates

Imaging sessions were performed before and at various times after quinolinic acid injection (24 hrs, 48 hrs, 9 days, 16 days and 7 months post lesion). [¹¹C]-A was injected and brain kinetics followed by PET for 90 min.

One hour before PET imaging, animals were anaesthetized by intramuscular injection of a ketamine / xylazine mixture (15 mg/kg / 1.5 mg/kg) and intubated. Catheters were then placed in a saphenous vein for radiotracer injection and in a femoral artery for blood sampling. Animals were maintained anaesthetized by an intravenous injection of propofol (Diprivan® 1%; 0.05 mg.kg⁻¹.min⁻¹).

To ensure correct positioning of the animal in the apparatus, the animal's head was secured in a home-made stereotactic frame. PET scans were performed using the high-resolution Focus micro-PET (CTI-Siemens, Knoxville, TN), which acquires 95 contiguous planes simultaneously. For attenuation correction, a transmission scan was first performed using a ⁶⁸Ge rotating rod source. Macaques were intravenously injected with 192.29 ± 33.67 MBq of [¹¹C]-A and the acquisition performed for 90 min. All PET acquisitions were performed in list mode (3D mode) and images were reconstructed using the following time frame: (4 images of 25 s) + (4 images of 30 s) + (2 images of 1 min) + (5 images of 2 min) + (3 images of 5 min) + (3 images of 10 min) and (1 image of 15 min), for a total time of 90 min for [¹¹C]-A.

Image analysis

PET image analysis was performed using ASIPro VM™ (CTI Concorde Microsystems' Analysis Tools and System Setup/Diagnostics Tool) and Brainvisa/Anatomist (<http://brainvisa.info/>).

34

Metabolite analysis in rat blood and brain

Naive or operated adult male Wistar rats (body weight 300-400 g) were injected i.v in the tail vein with [^{11}C]-A. Animals were sacrificed 10, 20 or 30 min later. A blood sample was collected and plasma isolated by centrifugation (5 min, 3000 rpm). Plasma proteins were precipitated from 400 μL of serum by addition of 400 μL of acetonitrile. After centrifugation (5 min, 3000 rpm), the supernatant was injected onto the HPLC column. Rat brains were removed and hemispheres were separated. Homogenisation by sonication was performed in 1 mL of acetonitrile per hemisphere. After a rapid centrifugation, the supernatant was separated from the pellet and concentrated under reduced pressure before injection onto the HPLC (see radiochemistry section for HPLC conditions).

Autoradiography

[^{11}C]-A autoradiography was performed using 20 μm brain sections from rats (7-8 days post-lesion) or mice (20-23 months). Non-specific binding was assessed using an excess of either unlabelled PK11195 or A. Specificity for PBR vs central benzodiazepine binding sites was evaluated by using an excess of unlabelled Flumazenil. Sections were incubated for 20 min in Tris Buffer (TRIZMA pre-set Crystals, Sigma®, adjusted at pH 7.4 at 4°C, 50 mM with NaCl 120 mM), then rinsed 2 times for 2 min with cold buffer, followed by a quick wash in cold distilled water. Sections were then placed in direct contact with a Phosphor-Imager screen and exposed overnight. Autoradiograms were analysed using ImageQuant™ software.

EXAMPLE 1

[^{11}C]PK11195 radiosynthesis: Final HPLC purification of [^{11}C]PK11195 was performed on a semi-preparative Waters Symmetry® C-18 HPLC column (eluent : water / acetonitrile / TFA : 40 / 60 / 0.1 [v:v:v] ; flow-rate : 7 mL/min) and the peak corresponding to radiochemically pure [^{11}C]PK11195 (R_t : 6.5-7.0 min) was collected. Typically, starting from a 55.5 GBq [^{11}C]CO₂ cyclotron production batch, about 4.5-5.0 GBq of [^{11}C]PK11195 were obtained within 30 min of radiosynthesis (including HPLC purification and formulation). Radiochemical purity (determined by analytical HPLC on Waters Symmetry-M® C-18 column) was greater than 95% and specific radioactivities ranged from 50 to 90 GBq/ μmol (at the end of the radiosynthesis).

EXAMPLE 2

[^{11}C]-A radiosynthesis (Labelling at the *N*-methylindole function): Final HPLC purification of [^{11}C]-A was performed on a semi-preparative Zorbax® SB-C-18 HPLC column (eluent : 0.9% aq. NaCl / EtOH / 1M aq. phosphate buffer (pH 2,3) : 50 / 50 / 0.1 [v:v:v] ; flow-rate : 6 mL/min) and the peak corresponding to radiochemically pure [^{11}C]-A (R_t : 8.0-8.5 min) was collected. Typically, starting from a 55.5 GBq [^{11}C]CO₂ cyclotron production batch, about 4.5-6.0 GBq of

[¹¹C]-A were obtained within 25 min of radiosynthesis (including HPLC purification and formulation). Radiochemical purity (determined by analytical HPLC on Waters Symmetry-M[®] C-18 column) was greater than 95% and specific radioactivities ranged from 50 to 90 GBq/μmol (at the end of the radiosynthesis).

EXAMPLE 3

[¹¹C]-A radiosynthesis (Labelling at the *N,N*-dimethylacetamide function): Final HPLC purification of [¹¹C]-A was performed on a semi-preparative SymmetryPrep[®] C-18 HPLC column (eluent : water / acetonitrile / TFA : 50 / 50 / 0.1 [v:v:v] ; flow-rate : 5 mL/min) and the peak corresponding to radiochemically pure [¹¹C]-A (R_t : 8.0-8.5 min) was collected. Typically, starting from a 55.5 GBq [¹¹C]CO₂ cyclotron production batch, about 3.5-5.0 GBq of [¹¹C]-A were obtained within 25 min of radiosynthesis (including HPLC purification and formulation). Radiochemical purity (determined by analytical HPLC on Waters Symmetry-M[®] C-18 column) was greater than 95% and specific radioactivities ranged from 50 to 90 GBq/μmol (at the end of the radiosynthesis).

EXAMPLE 4

i) 4-hydroxy-A synthesis. 4-Hydroxy-A may be resynthesized according to WO00/44384. R_f : 0.15 (SiO₂-TLC (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5 v:v)). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 9.71 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.86 (d, 1H, J: 8.4 Hz), 7.39 (d, 1H, J: 8.4 Hz), 7.32 (d, 2H, J: 8.8 Hz), 6.84 (d, 2H, J: 8.8 Hz), 4.27 (s, 3H), 4.20 (s, 2H), 3.16 (s, 3H), 2.84 (s, 3H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 168.6 [C], 157.1 [C], 154.8 [C], 141.2 [C], 140.9 [C], 133.6 [C], 132.1 [C], 130.9 [C], 127.8 [2.CH], 124.0 [CH], 122.6 [CH], 118.9 [C], 117.3 [C], 115.3 [2.CH], 111.6 [CH], 40.0 [CH₂], 37.4 [CH₃], 35.4 [CH₃], 32.0 [CH₃].

ii) [¹¹C]Methoxy-A radiosynthesis. Labelling with carbone-11 and final HPLC purification may be performed as described for the preparation of [¹¹C]-A (example 2 / example 3) using the 4-hydroxyderivative of A synthesized just above (example 4i).

EXAMPLE 5

General procedure for the synthesis of (fluoro)alkoxy-A and tosyloxyalkoxy-A. To a suspension of K₂CO₃ (101 mg, 0.73 mmol) in dry DMF (8-12 mL) is added the 4-hydroxyderivative of A (150 mg, 0.36 mmol, see WO00/44384), in solution in dry DMF (2 mL). The reaction mixture is stirred for 30 min at room temperature, followed by the gradual addition of the appropriate alkylating reagent (2 eq.) in solution in DMF (2 mL). The whole mixture was stirred for 2 hrs at 70°C and stirred an additional hour at room temperature. The mixture was then quenched by addition of a saturated aq NH₄Cl solution and extracted with CH₂Cl₂. The organic layers were combined, washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness.

The residue was purified by silica gel column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 98:2 to 95:5 v/v as eluent) to afford the expected (fluoro)alkoxy-A as white powders or white fluffy solids.

EXAMPLE 6

Methoxy-A synthesis. The general procedure above (example 5) was used with methyl iodide to afford the target compound in 40% yield. R_f : 0.35 (SiO₂-TLC (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5 v:v)). ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.94 (d, 1H, J: 8.4 Hz), 7.53 (m, 3H), 7.33 (dd, 1H, J: 8.4, 1.6 Hz), 7.00 (d, 2H, J: 8.8 Hz), 4.32 (s, 3H), 4.18 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.22 (s, 3H), 3.00 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃) δ 168.4 [C], 158.9 [C], 155.3 [C], 141.6 [C], 140.1 [C], 134.6 [C], 133.2 [C], 131.3 [C], 127.3 [2.CH], 123.3 [CH], 123.0 [CH], 119.0 [C], 117.4 [C], 113.9 [2.CH], 110.6 [CH], 55.5 [CH₃], 39.6 [CH₂], 37.6 [CH₃], 35.7 [CH₃], 31.6 [CH₃].

EXAMPLE 7

Fluoroethoxy-A synthesis. The general procedure above (example 5) was used with 2-fluoroethyl-4-methylbenzenesulfonate (synthesized according to Damont A. et al. (2008) J. label. Compds Radiopharm. 51: 286-292) to afford the target compound in 63% yield. R_f : 0.38 (SiO₂-TLC (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5 v:v)). ¹H NMR (CD₂Cl₂) δ 7.89 (d, 1H, J: 8.8 Hz), 7.58 (d, 1H, J: 1.6 Hz), 7.54 (d, 2H, J: 9.2 Hz), 7.34 (dd, 1H, J: 8.8, 1.6 Hz), 7.03 (d, 2H, J: 9.2 Hz), 4.78 (dt, 2H, J²_{H-F}: 47.6, J³_{H-H}: 4.0 Hz), 4.32 (s, 3H), 4.27 (dt, 2H, J³_{H-F}: 28.4 Hz, J³_{H-H}: 4.0 Hz), 4.16 (s, 2H), 3.19 (s, 3H), 2.96 (s, 3H). ¹³C NMR (CD₂Cl₂) δ 168.2 [C], 157.6 [C], 155.1 [C], 141.3 [C], 140.7 [C], 140.3 [C], 135.4 [C], 132.8 [C], 127.4 [2.CH], 123.2 [CH], 122.6 [CH], 118.9 [C], 117.2 [C], 114.3 [2.CH], 110.7 [CH], 82.0 [d, J¹_{C-F}: 169 Hz, CH₂], 67.5 [d, J²_{C-F}: 20 Hz, CH₂], 39.5 [CH₂], 37.4 [CH₃], 35.2 [CH₃], 31.6 [CH₃]. Anal. Calcd for C₂₃H₂₂ClFN₄O₃·0.15 H₂O: C, 60.11, H, 4.89, N, 12.19, found: C, 60.00, H, 4.96, N, 12.18.

EXAMPLE 8

Fluoropropoxy-A synthesis. The general procedure above (example 5) was used with 3-fluoropropyl-4-methylbenzenesulfonate to afford the target compound in 58% yield. R_f : 0.39 (SiO₂-TLC (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5 v:v)). ¹H NMR (CD₂Cl₂) δ 7.89 (d, 1H, J: 8.4 Hz), 7.58 (d, 1H, J: 1.6 Hz), 7.52 (d, 2H, J: 9.2 Hz), 7.34 (dd, 1H, J: 8.4, 1.6 Hz), 7.01 (d, 2H, J: 9.2 Hz), 4.67 (dt, 2H, J²_{H-F}: 46.8 Hz, J³_{H-H}: 6.0 Hz), 4.31 (s, 3H), 4.16 (m, 4H), 3.19 (s, 3H), 2.96 (s, 3H), 2.20 (dq⁵, 2H, J³_{H-F}: 26.0 Hz, J³_{H-H}: 6.0). ¹³C NMR (CD₂Cl₂) δ 168.2 [C], 158.0 [C], 155.1 [C], 141.3 [C], 140.3 [C], 135.0 [C], 132.8 [C], 131.3 [C], 127.3 [2.CH], 123.2 [CH], 122.5 [CH], 119.0 [C], 117.2 [C], 114.2 [2.CH], 110.7 [CH], 80.8 [d, J¹_{C-F}: 163 Hz, CH₂], 63.9 [d, J³_{C-F}: 6.0 Hz, CH₂], 39.5 [CH₂], 37.4 [CH₃], 35.2 [CH₃], 31.5 [CH₃], 30.3 [CH₂, J²_{C-F}: 20.0 Hz].

37

EXAMPLE 9

Fluorobutoxy-A synthesis. The general procedure above (example 5) was used with 4-fluorobutylbromide to afford the target compound in 70% yield. R_f : 0.40 (SiO₂-TLC (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5 v:v)). ¹H NMR (CD₂Cl₂) δ 7.90 (d, 1H, J: 8.8 Hz), 7.58 (d, 1H, J: 1.6 Hz), 7.51 (d, 2H, J: 9.2 Hz), 7.34 (dd, 1H, J: 8.8, 1.6 Hz), 6.99 (d, 2H, J: 9.2 Hz), 4.54 (dt, 2H, J²_{H-F}: 47.2 Hz, J³_{H-H}: 5.6 Hz), 4.33 (s, 3H), 4.16 (s, 2H), 4.08 (t, 2H, J: 5.6 Hz), 3.19 (s, 3H), 2.96 (s, 3H), 1.97-1.85 (m, 4H). ¹³C NMR (CD₂Cl₂) δ 168.2 [C], 158.2 [C], 155.1 [C], 141.3 [C], 140.2 [C], 134.9 [C], 132.8 [C], 131.4 [C], 127.3 [2.CH], 123.2 [CH], 122.5 [CH], 119.0 [C], 117.2 [C], 114.2 [2.CH], 110.7 [CH], 83.8 [d, J¹_{C-F}: 163 Hz, CH₂], 67.6 [CH₂], 39.5 [CH₂], 37.4 [CH₃], 35.2 [CH₃], 31.5 [CH₃], 27.1 [CH₂, J²_{C-F}: 20.0 Hz], 25.1 [CH₂, J³_{C-F}: 5.0 Hz].

EXAMPLE 10

2-(Fluoroethoxy)ethoxy-A synthesis. The general procedure above (example 5) was used with 2-(2-fluoroethoxy)ethyl-4-methylbenzenesulfonate to afford the target compound in 69% yield. R_f : 0.45 (SiO₂-TLC (CH₂Cl₂/acetone: 80/20 v:v)). ¹H NMR (CD₂Cl₂) δ 7.91 (d, 1H, J: 8.4 Hz), 7.60 (d, 1H, J: 1.6 Hz), 7.54 (d, 2H, J: 8.8 Hz), 7.36 (dd, 1H, J: 8.4, 1.6 Hz), 7.04 (d, 2H, J: 8.8 Hz), 4.61 (dt, 2H, J²_{H-F}: 48.0 Hz, J³_{H-H}: 4.0 Hz), 4.34 (s, 3H), 4.22 (t, 2H, J: 4.8 Hz), 4.17 (s, 2H), 3.91 (t, 2H, J: 4.8 Hz), 3.83 (dt, 2H, J³_{H-F}: 30.0, J³_{H-H}: 4.0 Hz), 3.21 (s, 3H), 2.98 (s, 3H). ¹³C NMR (CD₂Cl₂) δ 168.2 [C], 157.9 [C], 155.1 [C], 141.3 [C], 140.3 [C], 135.1 [C], 132.8 [C], 131.4 [C], 127.3 [2.CH], 123.2 [CH], 122.5 [CH], 119.0 [C], 117.2 [C], 114.3 [2.CH], 110.7 [CH], 83.2 [d, J¹_{C-F}: 167 Hz, CH₂], 70.4 [d, J²_{C-F}: 19 Hz, CH₂], 69.7 [CH₂], 67.8 [CH₂], 39.5 [CH₂], 37.4 [CH₃], 35.2 [CH₃], 31.6 [CH₃].

EXAMPLE 11

2-(2-(Fluoroethoxy)ethoxy)ethoxy-A synthesis. The general procedure above (example 5) was used with 2-(2-(2-fluoroethoxy)ethoxy)ethyl-4-methylbenzenesulfonate to afford the target compound in 63% yield. R_f : 0.32 (SiO₂-TLC (CH₂Cl₂/acetone: 80/20 v:v)). ¹H NMR (CD₂Cl₂) δ 7.91 (d, 1H, J: 8.8 Hz), 7.60 (d, 1H, J: 1.6 Hz), 7.54 (d, 2H, J: 8.8 Hz), 7.36 (dd, 1H, J: 8.8, 1.6 Hz), 7.04 (d, 2H, J: 8.8 Hz), 4.57 (dt, 2H, J²_{H-F}: 47.6 Hz, J³_{H-H}: 4.4 Hz), 4.33 (s, 3H), 4.21 (t, 2H, J: 4.4 Hz), 4.17 (s, 2H), 3.88 (t, 2H, J: 4.8 Hz), 3.80-3.65 (m, 6H), 3.21 (s, 3H), 2.98 (s, 3H). ¹³C NMR (CD₂Cl₂) δ 168.2 [C], 158.0 [C], 155.1 [C], 141.3 [C], 140.3 [C], 135.1 [C], 132.8 [C], 131.4 [C], 127.3 [2.CH], 123.2 [CH], 122.5 [CH], 119.0 [C], 117.2 [C], 114.3 [2.CH], 110.7 [CH], 83.2 [d, J¹_{C-F}: 167 Hz, CH₂], 70.7 [CH₂], 70.6 [CH₂], 70.3 [d, J²_{C-F}: 19 Hz, CH₂], 69.6 [CH₂], 67.8 [CH₂], 39.5 [CH₂], 37.4 [CH₃], 35.2 [CH₃], 31.6 [CH₃].

EXAMPLE 12

Tosyloxyethoxy-A synthesis. The general procedure above (example 5) was used with ethane-1,2-diyl bis(4-methylbenzenesulfonate) (synthesized according to Damont A. et al. (2008) J. label. Compds Radiopharm. 51: 286-292) to afford the target compound in 45% yield. R_f : 0.72 (SiO₂-TLC (CH₂Cl₂/MeOH: 95/5 v:v)). ¹H NMR (CD₂Cl₂) δ 7.89 (d, 1H, J: 8.8 Hz), 7.84 (d, 2H, J: 8.4 Hz), 7.60 (d, 1H, J: 1.6 Hz), 7.53 (d, 2H, J: 8.8 Hz), 7.41 (d, 2H, J: 8.4 Hz), 7.36 (dd, 1H, J: 8.8, 1.6 Hz), 6.91 (d, 2H, J: 8.8 Hz), 4.40 (t, 2H, J: 4.4 Hz), 4.32 (s, 3H), 4.22 (t, 2H, J: 4.4 Hz), 4.17 (s, 2H), 3.21 (s, 3H), 2.98 (s, 3H), 2.48 (s, 3H). ¹³C NMR (CD₂Cl₂) δ 168.1 [C], 157.2 [C], 155.0 [C], 145.2 [C], 141.2 [C], 140.3 [C], 135.5 [C], 132.8 [C], 132.7 [C], 131.3 [C], 129.9 [2.CH], 127.9 [2.CH], 127.4 [2.CH], 123.2 [CH], 122.6 [CH], 118.9 [C], 117.2 [C], 114.4 [2.CH], 110.7 [CH], 68.3 [CH₂], 65.8 [CH₂], 39.5 [CH₂], 37.4 [CH₃], 35.2 [CH₃], 31.6 [CH₃], 21.3 [CH₃].

Tosyloxypropoxy-A, tosyloxybutoxy-A, 2-(tosyloxyethoxy)ethoxy-A and 2-(2-(tosyloxyethoxy)ethoxy)ethoxy-A as precursors for the labelling with fluorine-18 of the above described fluoroalkoxy-A derivatives may be prepared as described just above with the appropriate alkylating reagent.

EXAMPLE 13

[¹⁸F]Fluoroethoxy-A radiosynthesis: Final HPLC purification of [¹⁸F]fluoroethoxy-A was performed on a semi-preparative Symmetry® C-18 HPLC colum (eluent : water / acetonitrile / TFA : 60 / 40 / 0.1 [v:v:v] ; flow-rate : 5 mL/min) and the peak corresponding to radiochemically pure [¹⁸F]fluoroethoxy-A (Rt : 11.0-13.0 min) was collected. Starting from a 37 GBq [¹⁸F]fluoride cyclotron production batch, about 3.7 GBq of [¹⁸F]fluoroethoxy-A were obtained within 90 min of radiosynthesis (including HPLC purification and formulation). Radiochemical purity (determined by analytical HPLC on Waters Symmetry-M® C-18 column) was greater than 95% and specific radioactivities greater than 50 GBq/μmol (at the end of the radiosynthesis).

[¹⁸F]Fluoropropoxy-A, [¹⁸F]fluorobutoxy-A, 2-([¹⁸F]fluoroethoxy)ethoxy-A and 2-(2-([¹⁸F]fluoroethoxy)ethoxy)ethoxy-A may be prepared as described just above from the corresponding tosyloxyalkoxy-A derivatives (example 12) as precursors for fluorine-18-labelling.

EXAMPLE 14

The uptake of [¹¹C]-A is significantly higher in the lesioned striatum of AMPA-injected rats (the region in which PBR expression is induced) compared to the intact controlateral striatum which is expected to express no or non-significant amounts of PBR (Figure 1). The uptake of [¹¹C]-A is also significantly higher than the uptake observed with reference PBR PET ligand, [¹¹C]PK11195, in the lesioned striatum (Figure 1). The ratio of the uptake in the lesioned over the intact striatum is also significantly higher for [¹¹C]-A than for [¹¹C]PK11195 (Figure 2). The

binding potential and R1 are significantly higher for [^{11}C]-A than for [^{11}C]PK11195 ($\text{BP} = 1.65 \pm 0.36$ vs 0.66 ± 0.15 ; $\text{R1} = 1.26 \pm 0.08$ vs 1.10 ± 0.05).

Both unlabelled PK11195 (Figure 3) and A (Figure 4) (1 mg/kg i.v.; 20 min post [^{11}C]-A injection) significantly reduced the brain uptake of [^{11}C]-A in the lesioned striatum. Both unlabelled compounds induced a small increase in [^{11}C]-A binding in the contralateral side which is probably due to an increase in the blood concentration of [^{11}C]-A due to the release of [^{11}C]-A from extra-cerebral binding sites.

Analysis of the metabolites present in the blood and the plasma of rats at 10 and 20 min after [^{11}C]-A injection and of the metabolites present in the brain of rats at 10, 20 and 30 min after [^{11}C]-A injection essentially detected the parent compound only (Figure 10).

In addition, autoradiography of [^{11}C]-A binding on brain sections mirrored the imaging results with a high ipsilateral to contralateral ratio (3.8), which is abolished by an excess of unlabelled PK11195 or A (Figure 5). A small, but significant reduction of [^{11}C]-A binding was observed with unlabelled flumazenil, a benzodiazepine antagonist (Figure 5)

EXAMPLE 15

In both APP $\times$ PS1 and wild type PS1 transgenic mice, [^{11}C]-A uptake in the whole brain (cerebellum excluded) is higher than the uptake of [^{11}C]PK11195 (Figure 6). However, the uptake of both [^{11}C]-A and [^{11}C]PK11195 is not significantly higher in APP $\times$ PS1 vs wild type PS1. By contrast, specific of [^3H]-A binding is about 2-fold greater in whole brain sections from APP $\times$ PS1 mice compared to wild type PS1 mice (Figure 7).

These data demonstrate that [^{11}C]-A can specifically detect increased PBR binding and inflammation in an acute model of rat neuroinflammation and in a mouse model of Alzheimer's disease. *In vivo* PET imaging confirms that [^{11}C]-A can be used to image PBR receptor overexpression and neuroinflammation in rodents. Moreover, the PBR receptor binding observed by PET imaging with [^{11}C]-A is greater than that observed with the reference PBR receptor PET ligand, [^{11}C]PK11195.

EXAMPLE 16

The uptake of [^{11}C]-A is significantly higher in the lesioned right striatum of a quinolinic acid-injected primate compared to [^{11}C]-A uptake in the contralateral non-injected striatum and two non-injected control brain regions (cerebellum, prefrontal cortex) 24 hrs after excitotoxin injection (Figure 8). [^{11}C]-A uptake in the contralateral non-injected striatum remained stable and at the same level as [^{11}C]-A uptake in the brain regions of a non-injected primate (Figure 8). The increase in [^{11}C]-A uptake could still be visualized at 48 hrs after excitotoxin injection (in the left hemisphere), whereas [^{11}C]-A uptake at 7 months after excitotoxin injection (kinetics in the right striatum lesioned 7 months earlier) had returned to baseline levels. A more detailed

characterisation of the early phase of neuroinflammation demonstrates that the increased [^{11}C]-A uptake can be visualised from 24 hrs up to 16 days (Figure 9). Systemic administration of a large excess of unlabelled PK11195 30 min after radiotracer injection resulted in a specific displacement of the [^{11}C]-A binding in the lesioned striatum with no noticeable changes observed in the non-lesioned control brain regions (Figure 9).

Applications:

The present invention can be applied as a diagnostic tool and as a tool to follow the evolution and progression of pathologies in which the levels of the PBR are altered and in which inflammation is present. The invention can also be applied to receptor occupancy studies and to evaluate the efficacy of therapeutic treatments in pathological conditions and as a translational biomarker for research from animal models to humans.

CLAIMS

1. Use of radiolabelled 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide as a biomarker for the detection, in an individual, of PBR levels associated with normal and pathological conditions, wherein the radiolabel is chosen among carbon-11, radiohalogens and radiometals.
2. Use according to claim 1 wherein 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide is radiolabelled with carbon-11.
3. Use according to claims 1 and 2 wherein 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide is radiolabelled with carbon-11 on the carbon of the methyl group located on position 5 of the indole nucleus.
4. Use according to claim 1 wherein 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide is radiolabelled with radiohalogens.
5. Use according to claims 1, or 4 wherein 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide is radiolabelled with the radiohalogen fluorine-18.
6. Use according to claims 1 or 5 wherein 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide is radiolabelled with fluorine-18 on the para position of the 3-phenyle ring.
7. Use according to claims 1-6 wherein the detection of PBR levels and inflammation is performed by PET imaging (positron emission tomography) or SPECT imaging (single photon emission computed tomography).
8. Use according to claims 1-7 wherein the detection of PBR levels and inflammation is performed by PET imaging (positron emission tomography).
9. Use according to claims 1-8 wherein pathological conditions related to changes in PBR levels are selected from brain injuries, brain infections and neurological diseases.
10. Use according to claims 1-8 wherein pathological conditions related to changes in PBR levels are selected from psychiatric diseases.

42

11. Use according to claims 1-8 wherein pathological conditions related to changes in PBR levels are selected from proliferative diseases.
12. Use according to claims 1-8 wherein pathological conditions related to changes in PBR levels are selected from peripheral inflammatory processes.
13. Use according to claims 1-8 wherein detection of PBR levels is performed for occupancy studies.
14. Use according to claims 1-8 wherein detection of PBR levels is performed for evaluating the efficacy of a therapeutic treatment.
15. Method for the detection of PBR levels associated with normal conditions and changes in PBR levels associated with pathological conditions wherein the detection is performed using a radiolabelled form of 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide, wherein the radiolabel is chosen among carbon-11, radiohalogens and radiometals.
16. Method according to claim 15 wherein the radiolabelled form of 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide contains carbon-11.
17. Method according to claims 15-16 wherein 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide is radiolabelled with carbon-11 on the carbon of the methyl group located on position 5 of the indole nucleus.
18. Method according to claim 15, wherein 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide is radiolabelled with fluorine-18.
19. Method according to claim 15 wherein 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide is radiolabelled with fluorine-18 on the para position of the 3-phenyle ring.
20. Method according to claims 15-19 wherein pathological conditions related to changes in PBR levels are selected from brain injuries, brain infections, and neurological diseases.
21. Method according to claims 15-19 wherein pathological conditions related to changes in PBR levels are selected from psychiatric diseases.
22. Method according to claims 15-19 wherein pathological conditions related to

changes in PBR levels are selected from proliferative diseases.

23. Method according to claims 15-19 wherein pathological conditions related to changes in PBR levels are selected from peripheral inflammatory processes.

24. Method according to claims 15-19 wherein detection of PBR levels is performed for occupancy studies.

25. Method according to claims 15-19 wherein detection of PBR levels is performed for evaluating the efficacy of a therapeutic treatment.

26. Diagnostic kit for the detection of PBR levels associated with normal conditions and changes in PBR levels associated with pathological conditions comprising a radiolabelled form of 7-chloro-*N,N*,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4*H*-pyridazino[4,5-*b*]indole-1-acetamide.

44

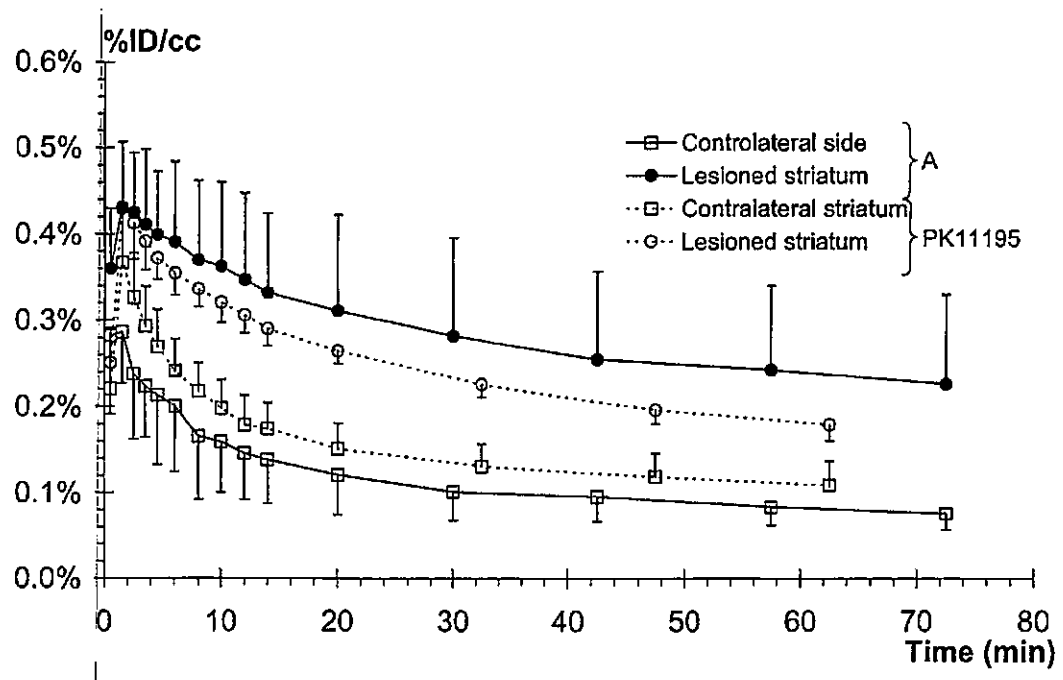


Figure 1

45

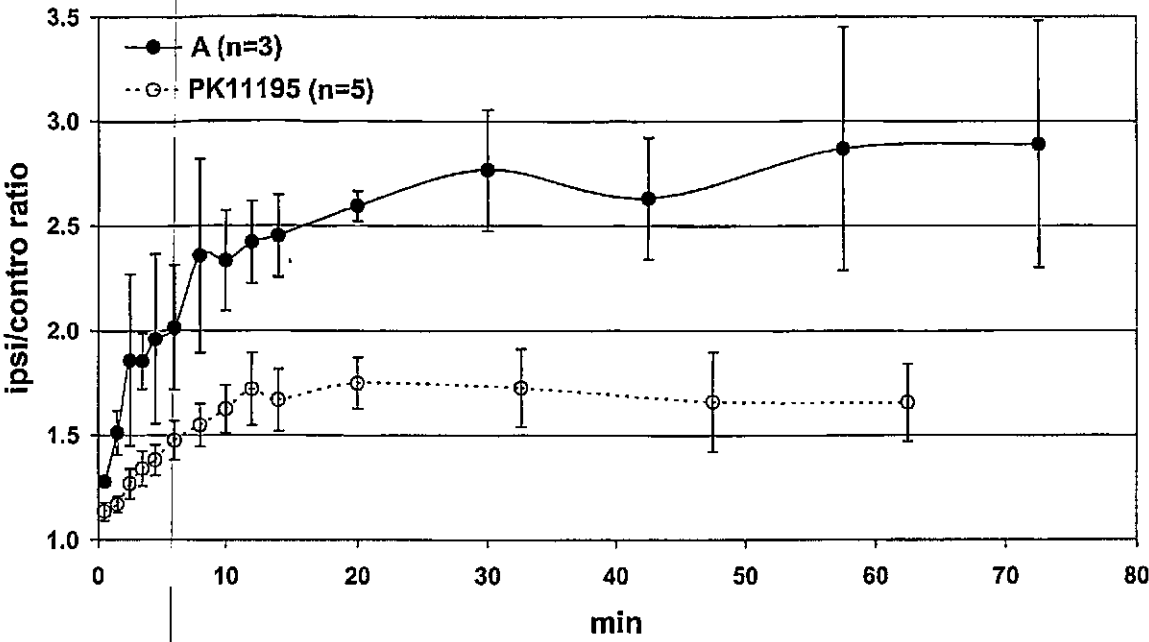


Figure 2

46

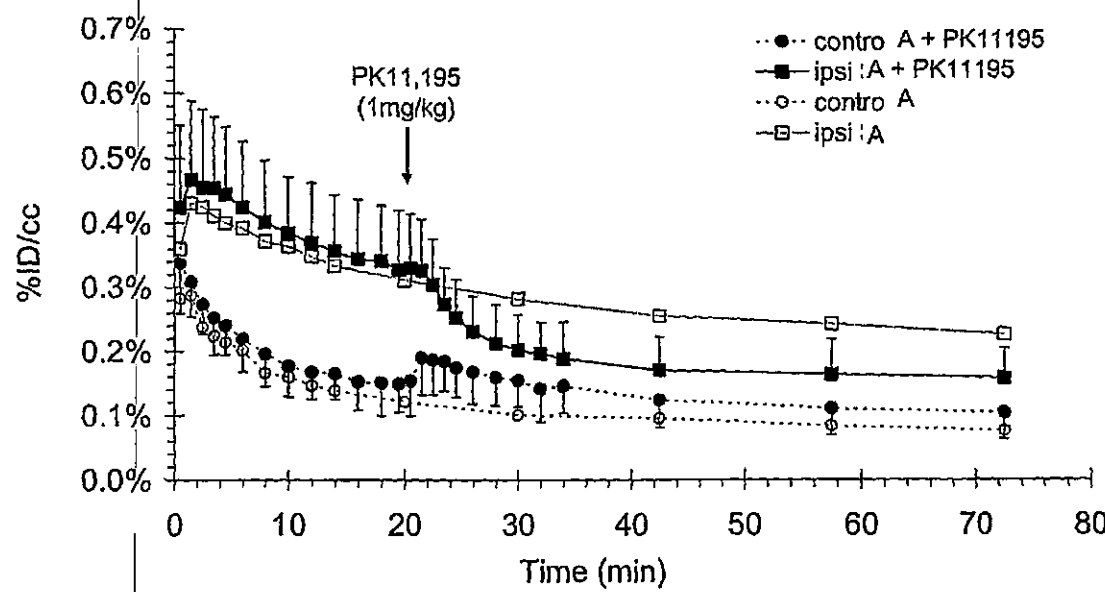


Figure 3

47

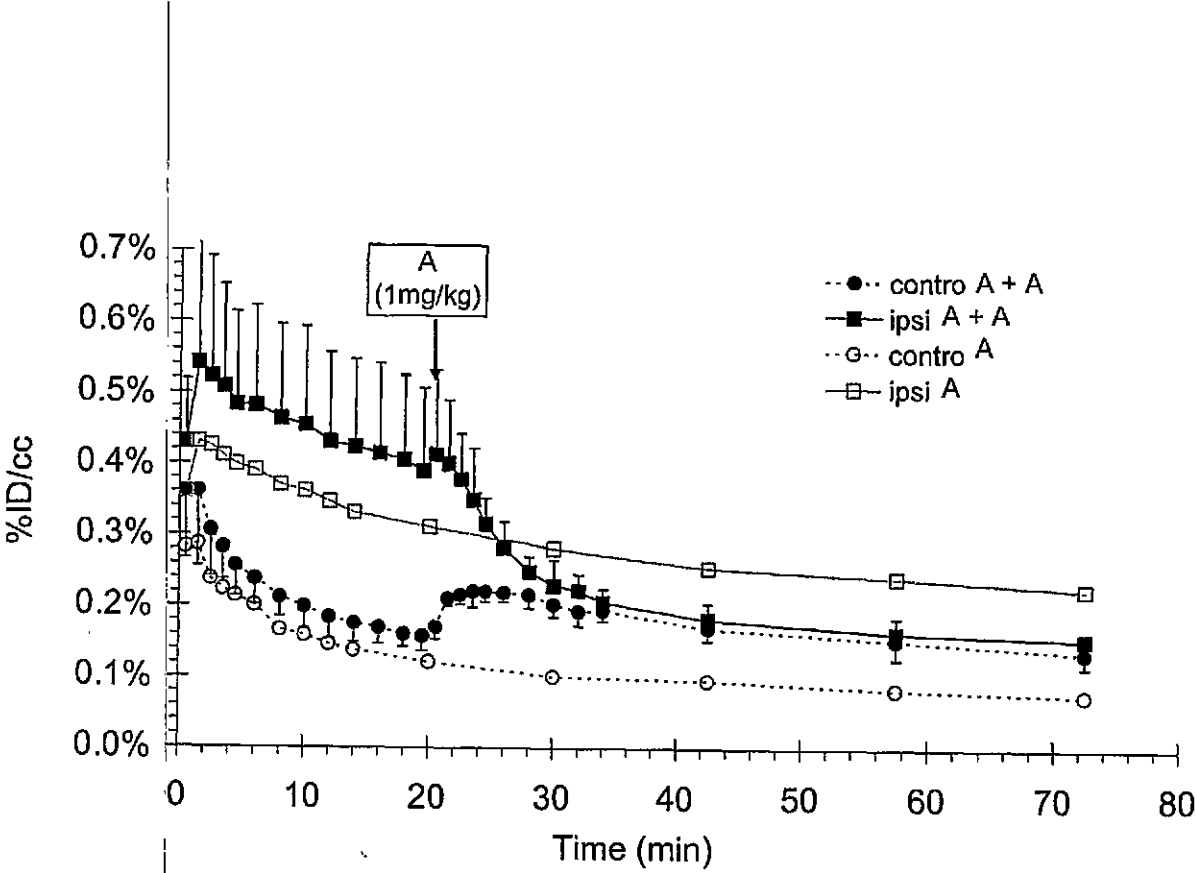


Figure 4

4/8

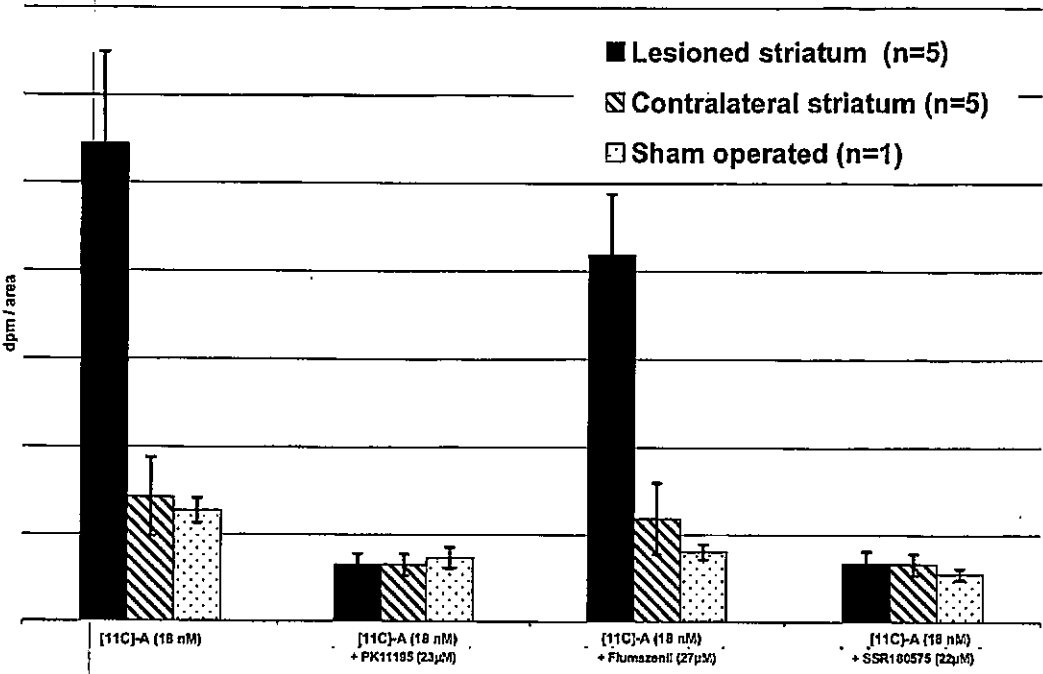


Figure 5

20

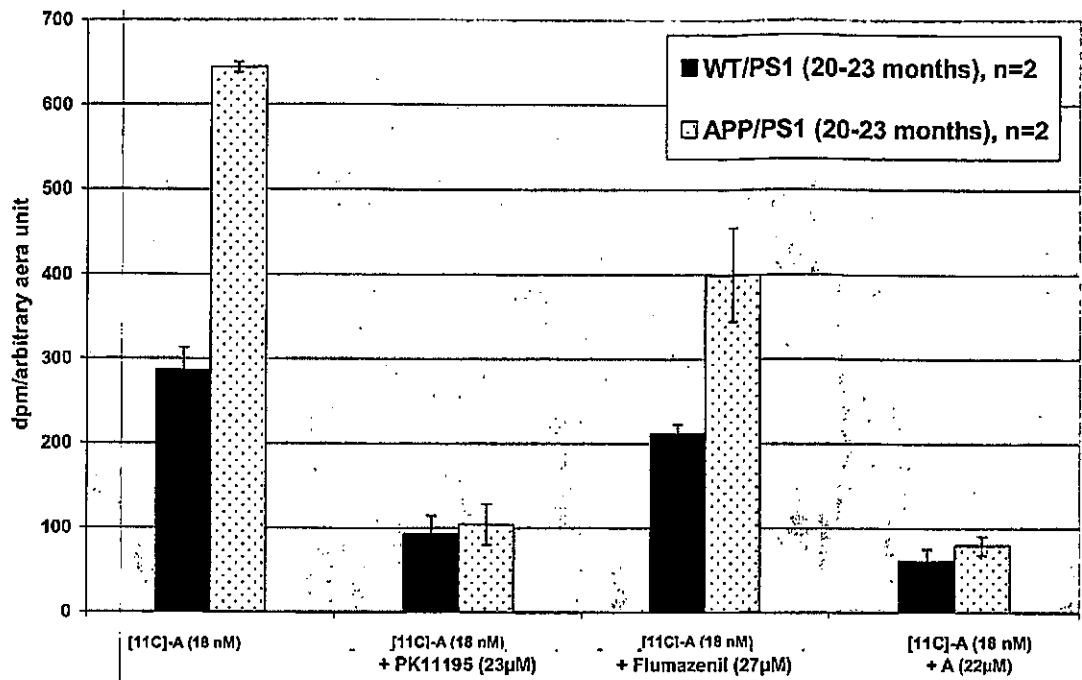


Figure 7

51

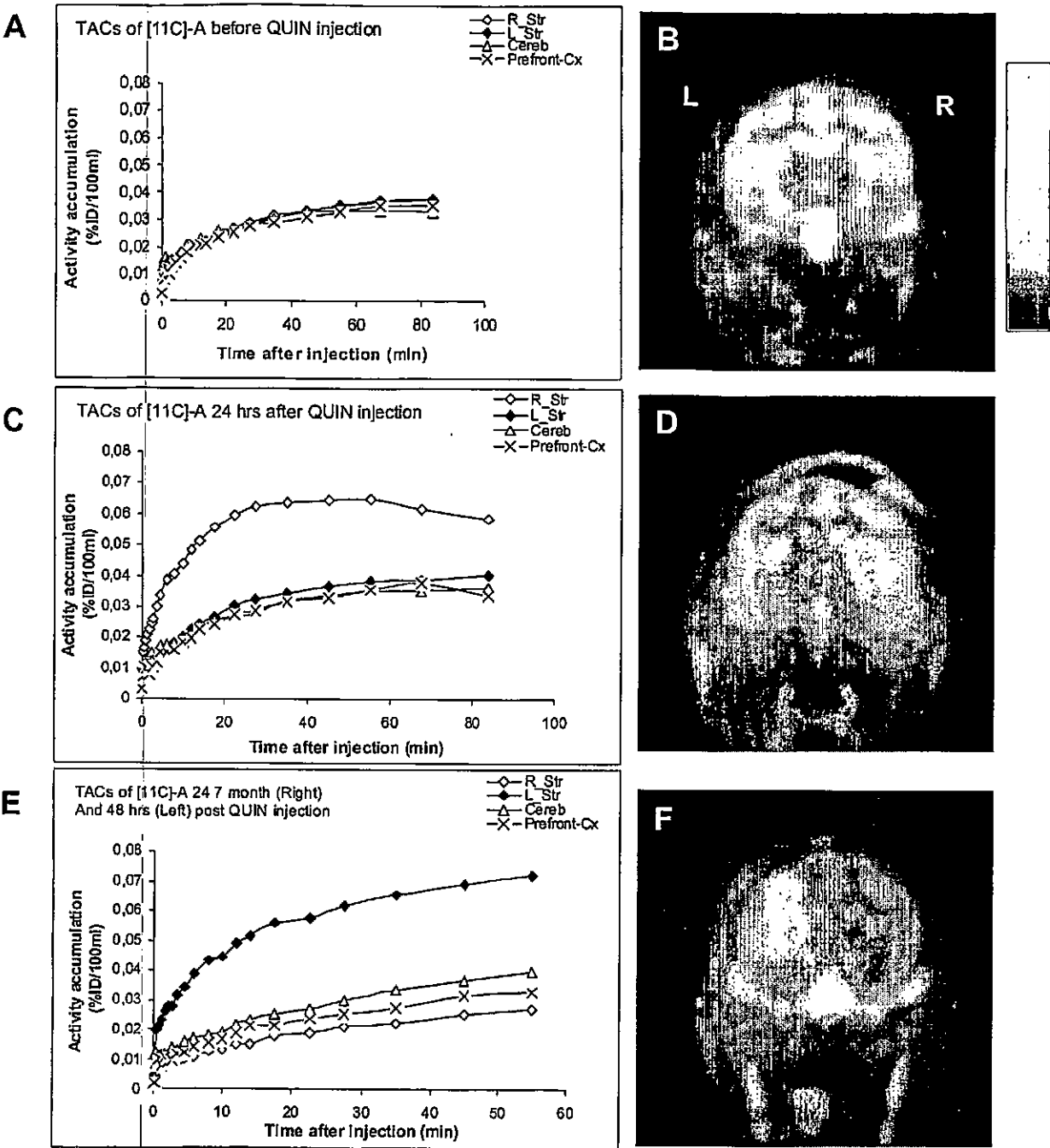


Figure 8

52

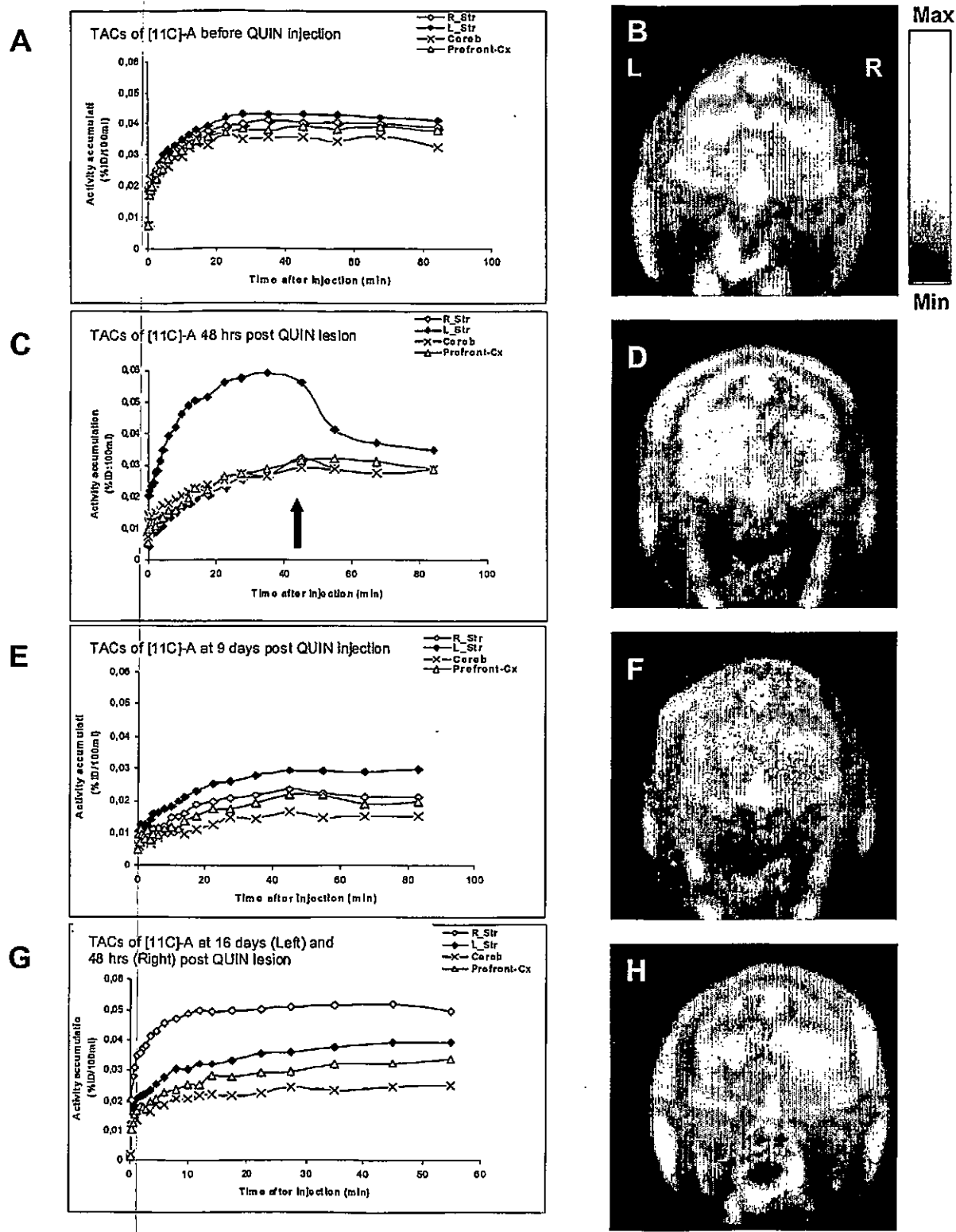


Figure 9

SB

Plasma Brain

Ligand	Sacrifice (min post injection)	plasma/ blood ratio	% HPLC intact form	Number of metabolites	Extraction yield	% HPLC intact form	Number of metabolites	Extraction yield
-A	10	0.1	100	0	89	100	0	99
-A	20	0.1	100	0	n.d.	100/100 *	0	n.d.
-A	30	0.1	Undetectable level			100/100 *	0	n.d.

* lesioned / controlateral side

Figure 10

USO DE 7-CLORO-*N,N*,5-TRIMETIL-4-OXO-3-FENIL-3,5-DIHIDRO-4*H*-PIRIDAZINO[4,5-*B*]INDOL-1-ACETAMIDA COMO BIOMARCADOR
DE LOS NIVELES DEL RECEPTOR PERIFÉRICO DE BENZODIAZEPINAS

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

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

Se observa un notable aumento en los niveles de PBR después de un daño celular, inflamación o proliferación, y está asociado con varios estados patológicos agudos y crónicos (Chen, M-K. y Guilarte, T. (2008) Pharmacology and Therapeutics **118**: 1-17; Venneti, S. *et al.* (2006) Progress in Neurobiology **80**: 308-322). Estos incluyen: lesiones cerebrales, tales como ictus y daño por isquemia-reperfusión (Gerhard, A. *et al.* (2000) Neuroreport **11**: 2957-2960; Gerhard, A. *et al.* (2005) Neuroimage **24**: 404-412), daño cerebral traumático (Raghavendra, R. *et al.* (2000) Exp. Neurol. **161**: 102-114); infecciones cerebrales, tales como encefalitis

(Banati, R.B. *et al.* (1999) *Neurology* **53**: 2199-2203; Cagin, A. *et al.* (2001) *Brain* **124**: 2014-2027); enfermedades neurológicas, tales como esclerosis múltiple (Banati, R.B. *et al.* (2000) *Brain* **123**: 2321-2337), enfermedad de Alzheimer y demencia (Cagnin, A. *et al.* (2001) *Lancet* **358**: 461-467; Versijpt, J.J. *et al.* (2003) *Eur. Neurol.* **50**: 39-47), enfermedad de Parkinson (Ouchi, Y. *et al.* (2005) *Ann. Neurol.* **57**: 168-175; Gerhard, A. *et al.* (2006) *Neurobiol. Dis.* **21**: 404-412), esclerosis lateral amiotrófica (Turner, M.R. *et al.* (2004) *Neurobiol. Dis.* **15**: 601-609), degeneración córtico-basal (Gerhard A. *et al.* (2004) *Mov. Disord.* **19**: 1221-1226; Henkel, K. *et al.* (2004) *Mov. Disord.* **19**: 817-821), enfermedad de Huntington (Messmer, K. y Reynolds, G.P. (1998) *Neurosci. Lett.* **241**: 53-56; Pavese, N. *et al.* (2006) *Neurology* **66**: 1638-1643) y epilepsia (Sauvageau, A. *et al.* (2002) *Metab. Brain Dis.* **17**: 3-11). El aumento de los niveles de PBR en patologías del SNC se observa principalmente en las células microgliales (Chen, M-K. y Guilarte, T. (2008) *Pharmacology and Therapeutics* **118**: 1-17; Venneti, S. *et al.* (2006) *Progress in Neurobiology* **80**: 308-322).

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

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

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

El ligando PET de referencia para PBR, [^{11}C]PK11195, ha sido usado de manera extensa para la toma de imágenes *in vivo* de los niveles de PBR en varios estados neuropatológicos (Chen, M-K y Guilarte, T. (2008) *Pharmacology and Therapeutics* **118**: 1-17; Venneti, S. *et al.*

(2006) Progress in Neurobiology **80**: 308-322). Sin embargo, el [^{11}C]PK11195 muestra una absorción en el cerebro relativamente baja, una alta unión no específica y una pobre relación señal a ruido. Estas propiedades limitan la sensibilidad del [^{11}C]PK11195 para la toma de imágenes PET de los niveles de PBR y estudios de ocupación en el SNC. El desarrollo de ligandos PET para PBR mejorados, con una unión específica más alta y mayor sensibilidad que el [^{11}C]PK11195 proporcionaría, por lo tanto, un importante avance para la toma de imágenes de los niveles de PBR en el cerebro y otros tejidos.

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

Compendio de la invención

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

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

La presente invención también se ocupa de un kit de diagnóstico para la detección de niveles de PBR.

Definiciones

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

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

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

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

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

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

del fármaco sin marcar. La magnitud de esta disminución se define como la ocupación del receptor del fármaco sin marcar.

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

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

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

La síntesis de ligandos radiomarcados y la sustitución de un átomo por un isótopo se pueden realizar mediante varias técnicas conocidas por las personas expertas en la técnica. Por ejemplo, para la sustitución de un átomo de carbono por un carbono-11, se pueden usar varios

derivados, tales como yoduro de [^{11}C]metilo o triflato de [^{11}C]metilo (Welch M.J. *et al.* (2003) en *Handbook of Radiopharmaceuticals - Radiochemistry and Applications* (Welch MJ, Redvanly CS Eds.), New York-Chichester-Brisbane-Toronto, Wiley-Interscience Pub., 1-848). En el caso de A, varios grupos metilo pueden ser marcados con carbono-11, tales como las funciones *N,N*-dimetilacetamida o *N*-metilindol.

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

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

En el caso del marcado con radioisótopos metálicos (tales como galio-68, cobre-64 o tecnecio-99m), el método preferido usado, que será considerado por una persona experta en la técnica, es el uso de un agente quelante bifuncional basado en, por ejemplo, los poliaminocarboxilatos de cadena abierta ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), el macrociclo poliaminocarboxílico ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), mercaptoacetildi- y triglicina (MAG2, MAG3), *bis*-(*S*-benzoil-tioglicolil)diaminopropanoato ((SBT)₂DAP) y ácido hidrazinonicotínico (HYNIC), que facilitan la

complejación del catión radiometálico en una función y la unión covalente a la molécula central en otra (Brunner U.K. *et al.* (1995) Radiotracer production – Radiometals and their chelates en *Principle of Nuclear Medecine*, Wagner H.N. (Ed). Saunders: Philadelphia, 220-228; Weiner R.E. *et al.* (2003) Chemistry of gallium and indium radiopharmaceuticals en *Handbook of Radiopharmaceuticals - Radiochemistry and Applications* (Welch MJ, Redvanly CS Eds.), New York-Chichester-Brisbane-Tórono, Wiley-Interscience Pub., 363-400; Anderson C.J. *et al.* (2003) Chemistry of copper radionucleides and radiopharmaceutical products en *Handbook of Radiopharmaceuticals - Radiochemistry and Applications* (Welch MJ, Redvanly CS Eds.), New York-Chichester-Brisbane-Toronto, Wiley-Interscience Pub., 401-422; Mahmood A. *et al.* (2003) Technetium radiopharmaceuticals In *Handbook of Radiopharmaceuticals - Radiochemistry and Applications* (Welch MJ, Redvanly CS Eds.), New York-Chichester-Brisbane-Toronto, Wiley-Interscience Pub., 323-362).

La adición directa del átomo de flúor-18 (o bromo-76, yodo-123 o yodo-124) se puede realizar, por ejemplo, sobre los anillos aromáticos de 3-fenilo y/o del piridazino[4,5-*b*]indol, así como sobre cualquier otra posición químicamente accesible (tal como la función acetamida). La adición indirecta de estos radiohalógenos (por ejemplo mediante el uso de un grupo espaciador), o la adición de los isótopos radiactivos metálicos mencionados anteriormente (galio-68, cobre-64 o tecnecio-99m, mediante el uso de un agente quelante), también se puede realizar en cualquier posición químicamente accesible del núcleo de la *N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida (A) (véanse las referencias anteriores).

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

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

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

dimetilacetamida o el grupo metilo situado en la posición 5 del núcleo de indol).

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

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

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

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

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

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

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

con carbono-11.

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

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

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

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

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

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

Otra realización acorde con la invención es un método de detección del PBR y la inflamación asociados con estados patológicos, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

- a) Administrar una forma radiomarcada de 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida ;
- b) Adquirir imágenes en una región de interés en el cerebro u otros tejidos periféricos usando la técnica PET (o SPECT);
- c) Cuantificación de los niveles del PBR en una región de interés cuantificando

la señal de PET asociada con una forma radiomarcada de 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida en esta región de interés;

- d) Comparar la señal de PET (SPECT) obtenida en la etapa c) con la señal obtenida en una región de control de interés ;
- e) Determinar la presencia de inflamación asociada con estados patológicos.

La presente invención también se refiere a un kit de diagnóstico para la detección de niveles de PBR asociados con estados normales y cambios en los niveles de PBR asociados con estados patológicos, que comprende una forma radiomarcada de 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la presente invención, y no pretenden limitar la invención. Por razones de conveniencia y para facilitar la lectura, el compuesto 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida se ha renombrado como "A" en las figuras y los resultados.

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

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

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

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

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

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

Figura 7: Autorradiografía de [^{11}C]-A (18 nM) en secciones de cerebro entero de ratones transgénicos APP/PS1 y PS1 de tipo salvaje (WT) de 20-23 meses de edad. La unión no específica fue evaluada usando un exceso de bien PK11195 sin marcar (23 μM) o bien de A (22 μM). La especificidad para el PBR frente a sitios centrales de unión de benzodiazepinas fue evaluada usando un exceso de Flumazenil sin marcar (27 μM). Los datos se expresan como dpm por unidad de área arbitraria.

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

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

(min).

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

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

Métodos

Radiosíntesis de ligandos

Marcado con carbono-11

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

[^{11}C]-A (Marcado en la función N-metilindol: 7-Cloro-N,N-dimetil-5-[^{11}C]metil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida). La preparación del [^{11}C]-A incluye las siguientes etapas: (1) atrapar a -10°C triflato de [^{11}C]metilo en DMF (300 μl) que contiene 0,2 a 0,3 mg del precursor para el marcado y 4 mg de carbonato de potasio en polvo (exceso); (2) calentar a 120°C durante 3 min; (3) recoger la mezcla con 0,5 ml de la fase móvil de HPLC, y (4) purificación usando HPLC semipreparativa. Se realizaron controles de calidad, en particular determinaciones de pureza radioquímica y química, sobre una alícuota del lote de producción final.

[^{11}C]-A (Marcado en la función N,N-dimetilacetamida: 7-Cloro-N-[^{11}C]metil-N,5-dimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4H-piridazino[4,5-b]indol-1-acetamida). La preparación de [^{11}C]-A también incluye las siguientes etapas: (1) atrapar a -10°C yoduro de [^{11}C]metilo en una mezcla 1/2 (v:v) de DMF y DMSO (100/200 μl) que contiene 0,5 a 1,0 mg del precursor para el marcado y 5 μl de una disolución 1M de hidróxido de tetrabutilamonio en metanol; (2) calentar a 120°C durante 3 min; (3) recoger la mezcla con 0,5 ml de la fase móvil de HPLC, y (4) purificación usando HPLC semipreparativa. Se realizaron controles de calidad, en particular

determinaciones de pureza radioquímica y química, sobre una alícuota del lote de producción final.

Marcado con flúor-18

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

No hay restricción particular en la naturaleza de las fuentes de aniones [^{18}F]fluoruro para ser usadas en esta reacción, y se pueden usar igualmente aquí cualesquiera fuentes de aniones [^{18}F]fluoruro usadas convencionalmente en las reacciones de este tipo, a condición de que no tengan un efecto adverso sobre otras partes de la molécula. Los ejemplos de fuentes adecuadas de aniones [^{18}F]fluoruro incluyen: [^{18}F]fluoruros de metales alcalinos, tales como [^{18}F]fluoruro de sodio, [^{18}F]fluoruro de potasio, [^{18}F]fluoruro de cesio; [^{18}F]fluoruro de amonio, [^{18}F]fluoruros de tetraalquilamonio, tales como [^{18}F]fluoruro de tetrabutilamonio. De estos, se prefieren los [^{18}F]fluoruros de metales alcalinos, y notablemente un fluoruro de potasio. La fuente de aniones [^{18}F]fluoruro puede ser activada por la presencia de un ligando capaz de complejar las especies contracatiónicas de la fuente de aniones [^{18}F]fluoruro. El ligando puede ser notablemente un ligando multidentado cíclico o policíclico. Los ejemplos de ligandos adecuados incluyen notablemente éteres corona tales como 1,4,7,10,13-pentaoxaciclooctadecano (18-C-6) o criptandos tales como 4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo-[8,8,8]hexacosano, comercializado bajo el nombre K222[®]. Preferiblemente, la fuente de aniones [^{18}F]fluoruro es un complejo de [^{18}F]fluoruro de metal alcalino-criptato, notablemente un complejo [^{18}F]fluoruro de potasio-criptato, preferiblemente el [^{18}F]fluoruro de potasio-4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo-[8,8,8]hexacosano ($\text{K}[^{18}\text{F}]/\text{K222}$). El complejo $\text{K}[^{18}\text{F}]/\text{K222}^{\text{®}}$ se puede preparar por cualquier método convencional (Dollé F. *et al.* (1999) *J. Med. Chem.* **42**: 2251-2259 o Dolci L. *et al.* (1999) *Bioorg. Med. Chem.* **7**: 467-479).

La reacción de fluoración se puede realizar en diversos disolventes, y puede tener lugar sobre un amplio intervalo de temperaturas. En general, es conveniente llevar a cabo la reacción a una temperatura de aproximadamente 50°C a aproximadamente 200°C, y los disolventes usados más a menudo son el dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) y acetonitrilo. El tiempo requerido para la reacción también puede variar ampliamente (desde aproximadamente 5 min hasta 15 min por ejemplo), dependiendo de muchos factores, notablemente la temperatura de reacción, la naturaleza de los reactivos y disolventes y la

cantidad del precursor de marcado usado (Kilbourn MR. (1990) en *Fluorine-18 Labeling of Radiopharmaceuticals*, Nuclear Science Series (Kilbourn MR Ed.), National Academy Press, Washington, D.C., 1-149; Lasne M.-C. *et al.* (2002) *Topics in Current Chemistry*, **222**: 201-258; Dollé F. *et al.* (2005) *Curr. Pharm. Design* **11**: 3221-3235; Cai L. *et al.* (2008) *Eur. J. Org. Chem.* **17**: 2853-2873; Dollé F. *et al.* (2008) en *Fluorine and Health: Molecular Imaging, Biomedical Materials and Pharmaceuticals*, Tressaud A, Haufe G (Eds). Elsevier: Amsterdam-Boston-Heidelberg-London-New York-Oxford-Paris-San Diego-San Francisco-Singapore-Sydney-Tokyo, 3-65). Los compuestos radiofluorados así preparados se purifican usualmente por HPLC, como se describe para los derivados marcados con carbono-11, pero también pueden ser recuperados o prepurificados de la mezcla de reacción mediante el uso de otras técnicas de cromatografía conocidas o simplemente por filtración sobre una columna de separación rellena previamente.

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

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

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

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

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

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

(2003) Chemistry of copper radionuclides and radiopharmaceuticals products en *Handbook of Radiopharmaceuticals - Radiochemistry and Applications* (Welch MJ, Redvanly CS Eds.), New York-Chichester-Brisbane-Toronto, Wiley-Interscience Pub., 401-422; Mahmood A. *et al.* (2003) Technetium radiopharmaceuticals en *Handbook of Radiopharmaceuticals - Radiochemistry and Applications* (Welch MJ, Redvanly CS Eds.), New York-Chichester-Brisbane-Toronto, Wiley-Interscience Pub., 323-362).

Formulación

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

Modelos animales

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

Modelo de neuroinflamación en ratas

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

Modelo de neuroinflamación en primates

Se alojaron macacos *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) que pesaban 4-5 kg en instalaciones de humedad controlada, termorreguladas, bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h (la luz encendida entre las 7 h a.m. y 7 h p.m.) y se les dejó libre acceso a comida y agua. Se indujo neuroinflamación mediante inyecciones estereotóxicas locales de ácido quinolínico (ácido quinolínico, Sigma, St. Louis, MO; disuelto en PBS 0,1 M, pH 7,2) en el estriado de los

primates (1 sitio de inyección en el caudate y 2 sitios de inyección en el putamen) durante dos intervenciones quirúrgicas diferentes en las que se inyectó el ácido quinolínico en un hemisferio en el día 1 y el segundo hemisferio 2 semanas o 7 meses después (Fig. 8 y 9). Durante cada sesión quirúrgica los animales recibieron 60 nmol de ácido quinolínico distribuido sobre tres diferentes sitios del estriado, un sitio de 5 μ l en el caudate y dos sitios de 10 μ l en el putamen, usando una jeringa Hamilton de 10 μ l unida a una aguja de calibre 26. Las coordenadas estereotácticas, determinadas según el atlas estereotáctico de Swabo y Cowan (1984), fueron como sigue: sitio del caudate [AP +19 mm, ML $\pm$ 6 mm, DV -14 mm desde el seno] ; sitio putaminal 1 [AP: +19 mm, ML: $\pm$ 12 mm, DV: -17 mm desde el cero estereotáctico] ; sitio putaminal 2 [AP: +17 mm, ML: $\pm$ 13 mm, DV: -16 mm desde el seno]. La excitotoxina fue inyectada a una velocidad de 0,1 μ l/min y la jeringa de inyección se dejó en su lugar durante 5 min adicionales para evitar el retroflujo de la toxina. Durante toda la cirugía, la temperatura de los primates fue mantenida normotérmica (temperatura rectal, $36^{\circ}\text{C} \pm 0,6^{\circ}\text{C}$, media $\pm$ SD). Después de retirar la aguja, se suturó la piel y se dejó que los animales se recuperaran de la anestesia, y se devolvieron a sus jaulas cuando estuvieron totalmente despiertos.

Ratones transgénicos

Se obtuvo la generación y caracterización de ratones transgénicos PS1M146L (PS1) simple y APP751SLxPS1M146L (APPxPS1) doble, como se ha descrito previamente (Blanchard, V. *et al.* (2003) Exp. Neurol. **184**: 247-263). En estos animales se expresa APP a un alto nivel en todas las neuronas corticales bajo el control del promotor Thy-1. El PS1 humano con la mutación M146L se expresa bajo el control del promotor de la reductasa HMG-CoA. Se encontró que el nivel de la carga amiloide era muy reproducible a una edad dada. Ambos ratones PS1 simple y APPxPS1 doble, proporcionados por Sanofi-Aventis, se usaron para la toma de imágenes PET a la edad de 11-12 meses y para la autorradiografía a 20-23 meses.

Escaneos microPET y adquisición de datos

Ratas y ratones transgénicos

Se realizó una toma de imágenes de microPET 7 días después de la inyección de AMPA en las ratas y en los ratones transgénicos de 11-12 meses de edad. Tanto en los ratones como en las ratas, la anestesia fue inducida por isoflurano al 5%, y después de esto fue mantenida mediante 2-2,5% de isoflurano en una mezcla de 70%/30% de NO_2/O_2 . Para los escaneos PET, se puso la cabeza de la rata en un armazón estereotáctico casero compatible con la adquisición de PET, y las ratas fueron mantenidas normotérmicas (temperatura rectal: $36,7 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, media $\pm$ DS). Se pusieron los ratones en un lecho equipado con una máscara

31

anestésica que permitía el calentamiento del flujo de aire, y la temperatura rectal fue monitorizada usando la manta calefactora Homeothermic Blanket Control Unit. Todos los protocolos de la toma de imágenes fueron realizados con un escáner Concorde Focus 220 PET usando bien [^{11}C]PK11195 o bien [^{11}C]-A.

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

Primates

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

Una hora antes de la toma de imágenes PET, los animales fueron anestesiados por inyección intramuscular de una mezcla de ketamina/xilazina (15 mg/kg/1,5 mg/kg) y entubados. Después se pusieron catéteres en una vena safenosa para la inyección del radiotrazador y en una arteria femoral para la toma de muestras de sangre. Los animales fueron mantenidos anestesiados mediante una inyección intravenosa de propofol (Diprivan® 1%; 0,05 mg.kg⁻¹.min⁻¹).

Para asegurar el correcto posicionamiento del animal en el aparato, la cabeza del animal fue sujeta en un armazón estereotáctico casero. Se realizaron escaneos PET usando el Focus micro-PET de alta resolución (CTI-Siemens, Knoxville, TN), el cual adquiere 95 planos contiguos simultáneamente. Para la corrección de la atenuación, se realizó primero un escaneo de transmisión usando una varilla rotatoria de ^{68}Ge como fuente. Los macacos fueron inyectados por vía intravenosa con $192,29 \pm 33,67$ MBq de [^{11}C]-A y la adquisición de imágenes se realizó durante 90 min. Todas las adquisiciones PET fueron realizadas en modo lista (modo 3D) y las imágenes fueron reconstruidas usando el siguiente esquema de tiempo: (4 imágenes de 25 s) + (4 imágenes de 30 s) + (2 imágenes de 1 min) + (5 imágenes de 2 min) + (3 imágenes de 5 min) + (3 imágenes de 10 min) y (1 imagen de 15 min), para un tiempo total de 90 min para la [^{11}C]-A.

72

Análisis de imágenes

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

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

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

Autorradiografía

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

EJEMPLO 1

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

50 a 90 GBq/ μ mol (al final de la radiosíntesis).

EJEMPLO 2

Radiosíntesis de [^{11}C]-A (marcado en la función *N*-metilindol): La purificación final por HPLC de [^{11}C]-A se realizó en una columna de HPLC Zorbax[®] SB-C-18 semipreparativa (eluyente: NaCl ac. al 0,9%/EtOH/ tampón fosfato ac. 1M (pH 2,3): 50/50/0,1 [v:v:v]; caudal: 6 ml/min) y se recogió el pico correspondiente a [^{11}C]-A radioquímicamente puro (Rt: 8,0-8,5 min). Por regla general, partiendo de un lote de producción en ciclotrón de [^{11}C]CO₂ de 55,5 GBq, se obtuvieron aproximadamente 4,5-6,0 GBq de [^{11}C]-A a los 25 min de radiosíntesis (incluyendo la purificación por HPLC y la formulación). La pureza radioquímica (determinada por HPLC analítica en una columna Waters Symmetry-M[®] C-18) fue mayor que 95% y las radiactividades específicas oscilaron de 50 a 90 GBq/ μ mol (al final de la radiosíntesis).

EJEMPLO 3

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

EJEMPLO 4

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

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

74

EJEMPLO 5

Procedimiento general para la síntesis de (fluoro)alcoxi-A y tosiloalcoxi-A. A una suspensión de K_2CO_3 (101 mg, 0,73 mmol) en DMF seco (8-12 ml) se le añade el derivado 4-hidroxi de A (150 mg, 0,36 mmol, véase la solicitud de patente internacional WO 00/44384), en disolución en DMF seco (2 ml). La mezcla de reacción se agita durante 30 min a temperatura ambiente, seguido de la adición gradual del reactivo de alquilación apropiado (2 eq.) en disolución en DMF (2 ml). La mezcla entera se agitó durante 2 h a 70°C y se agitó una hora adicional a temperatura ambiente. Después la mezcla se calmó por adición de una disolución de NH_4Cl ac. saturado y se extrajo con CH_2Cl_2 . Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice ($CH_2Cl_2/MeOH$ 98:2 a 95:5 v/v como eluyente) para dar la (fluoro)alcoxi-A esperada como polvos blancos o sólidos esponjosos blancos.

EJEMPLO 6

Síntesis de metoxi-A. Se usó el procedimiento general anterior (ejemplo 5) con yoduro de metilo para dar el compuesto diana en un rendimiento de 40%. R_f : 0,35 (SiO_2 -TLC ($CH_2Cl_2/MeOH$: 95/5 v:v)). ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 7,94 (d, 1H, J: 8,4 Hz), 7,53 (m, 3H), 7,33 (dd, 1H, J: 8,4, 1,6 Hz), 7,00 (d, 2H, J: 8,8 Hz), 4,32 (s, 3H), 4,18 (s, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,22 (s, 3H), 3,00 (s, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 168,4 [C], 158,9 [C], 155,3 [C], 141,6 [C], 140,1 [C], 134,6 [C], 133,2 [C], 131,3 [C], 127,3 [2,CH], 123,3 [CH], 123,0 [CH], 119,0 [C], 117,4 [C], 113,9 [2,CH], 110,6 [CH], 55,5 [CH_3], 39,6 [CH_2], 37,6 [CH_3], 35,7 [CH_3], 31,6 [CH_3].

EJEMPLO 7

Síntesis de fluoroetoxi-A. Se usó el procedimiento general anterior (ejemplo 5) con 4-metilbencenosulfonato de 2-fluoroetilo (sintetizado según Damont A. et al. (2008) J. label. Compds Radiopharm. 51: 286-292) para dar el compuesto diana en un rendimiento de 63%. R_f : 0,38 (SiO_2 -TLC ($CH_2Cl_2/MeOH$: 95/5 v:v)). ^1H NMR (CD_2Cl_2) δ 7,89 (d, 1H, J: 8,8 Hz), 7,58 (d, 1H, J: 1,6 Hz), 7,54 (d, 2H, J: 9,2 Hz), 7,34 (dd, 1H, J: 8,8, 1,6 Hz), 7,03 (d, 2H, J: 9,2 Hz), 4,78 (dt, 2H, J^2_{H-F} : 47,6, J^3_{H-H} : 4,0 Hz), 4,32 (s, 3H), 4,27 (dt, 2H, J^3_{H-F} : 28,4 Hz, J^3_{H-H} : 4,0 Hz), 4,16 (s, 2H), 3,19 (s, 3H), 2,96 (s, 3H). ^{13}C NMR (CD_2Cl_2) δ 168,2 [C], 157,6 [C], 155,1 [C], 141,3 [C], 140,7 [C], 140,3 [C], 135,4 [C], 132,8 [C], 127,4 [2,CH], 123,2 [CH], 122,6 [CH], 118,9 [C], 117,2 [C], 114,3 [2,CH], 110,7 [CH], 82,0 [d, J^1_{C-F} : 169 Hz, CH_2], 67,5 [d, J^2_{C-F} : 20 Hz, CH_2], 39,5 [CH_2], 37,4 [CH_3], 35,2 [CH_3], 31,6 [CH_3]. Anál. Calc. para $C_{23}H_{22}ClFN_4O_3 \cdot 0,15 H_2O$: C, 60,11, H, 4,89, N, 12,19, encontrado : C, 60,00, H, 4,96, N, 12,18.

25

EJEMPLO 8

Síntesis de fluoropropoxi-A. Se usó el procedimiento general anterior (ejemplo 5) con 4-metilbencenosulfonato de 3-fluoropropilo para dar el compuesto diana en un rendimiento de 58%. R_f : 0,39 (SiO_2 -TLC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 95/5 v:v)). ^1H NMR (CD_2Cl_2) δ 7,89 (d, 1H, J: 8,4 Hz), 7,58 (d, 1H, J: 1,6 Hz), 7,52 (d, 2H, J: 9,2 Hz), 7,34 (dd, 1H, J: 8,4, 1,6 Hz), 7,01 (d, 2H, J: 9,2 Hz), 4,67 (dt, 2H, $J^2_{\text{H-F}}$: 46,8 Hz, $J^3_{\text{H-H}}$: 6,0 Hz), 4,31 (s, 3H), 4,16 (m, 4H), 3,19 (s, 3H), 2,96 (s, 3H), 2,20 (dq⁵, 2H, $J^3_{\text{H-F}}$: 26,0 Hz, $J^3_{\text{H-H}}$: 6,0). ^{13}C NMR (CD_2Cl_2) δ 168,2 [C], 158,0 [C], 155,1 [C], 141,3 [C], 140,3 [C], 135,0 [C], 132,8 [C], 131,3 [C], 127,3 [2,CH], 123,2 [CH], 122,5 [CH], 119,0 [C], 117,2 [C], 114,2 [2,CH], 110,7 [CH], 80,8 [d, $J^1_{\text{C-F}}$: 163 Hz, CH_2], 63,9 [d, $J^3_{\text{C-F}}$: 6,0 Hz, CH_2], 39,5 [CH_2], 37,4 [CH_3], 35,2 [CH_3], 31,5 [CH_3], 30,3 [CH_2 , $J^2_{\text{C-F}}$: 20,0 Hz].

EJEMPLO 9

Síntesis de fluorobutoxi-A. Se usó el procedimiento general anterior (ejemplo 5) con bromuro de 4-fluorobutilo para dar el compuesto diana en un rendimiento de 70%. R_f : 0,40 (SiO_2 -TLC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 95/5 v:v)). ^1H NMR (CD_2Cl_2) δ 7,90 (d, 1H, J: 8,8 Hz), 7,58 (d, 1H, J: 1,6 Hz), 7,51 (d, 2H, J: 9,2 Hz), 7,34 (dd, 1H, J: 8,8, 1,6 Hz), 6,99 (d, 2H, J: 9,2 Hz), 4,54 (dt, 2H, $J^2_{\text{H-F}}$: 47,2 Hz, $J^3_{\text{H-H}}$: 5,6 Hz), 4,33 (s, 3H), 4,16 (s, 2H), 4,08 (t, 2H, J: 5,6 Hz), 3,19 (s, 3H), 2,96 (s, 3H), 1,97-1,85 (m, 4H). ^{13}C NMR (CD_2Cl_2) δ 168,2 [C], 158,2 [C], 155,1 [C], 141,3 [C], 140,2 [C], 134,9 [C], 132,8 [C], 131,4 [C], 127,3 [2,CH], 123,2 [CH], 122,5 [CH], 119,0 [C], 117,2 [C], 114,2 [2,CH], 110,7 [CH], 83,8 [d, $J^1_{\text{C-F}}$: 163 Hz, CH_2], 67,6 [CH_2], 39,5 [CH_2], 37,4 [CH_3], 35,2 [CH_3], 31,5 [CH_3], 27,1 [CH_2 , $J^2_{\text{C-F}}$: 20,0 Hz], 25,1 [CH_2 , $J^3_{\text{C-F}}$: 5,0 Hz].

EJEMPLO 10

Síntesis de 2-(fluoroetoxi)etoxi-A. Se usó el procedimiento general anterior (ejemplo 5) con 4-metilbencenosulfonato de 2-(2-fluoroetoxi)etilo para dar el compuesto diana en un rendimiento de 69%. R_f : 0,45 (SiO_2 -TLC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{acetona}$: 80/20 v:v)). ^1H NMR (CD_2Cl_2) δ 7,91 (d, 1H, J: 8,4 Hz), 7,60 (d, 1H, J: 1,6 Hz), 7,54 (d, 2H, J: 8,8 Hz), 7,36 (dd, 1H, J: 8,4, 1,6 Hz), 7,04 (d, 2H, J: 8,8 Hz), 4,61 (dt, 2H, $J^2_{\text{H-F}}$: 48,0 Hz, $J^3_{\text{H-H}}$: 4,0 Hz), 4,34 (s, 3H), 4,22 (t, 2H, J: 4,8 Hz), 4,17 (s, 2H), 3,91 (t, 2H, J: 4,8 Hz), 3,83 (dt, 2H, $J^3_{\text{H-F}}$: 30,0, $J^3_{\text{H-H}}$: 4,0 Hz), 3,21 (s, 3H), 2,98 (s, 3H). ^{13}C NMR (CD_2Cl_2) δ 168,2 [C], 157,9 [C], 155,1 [C], 141,3 [C], 140,3 [C], 135,1 [C], 132,8 [C], 131,4 [C], 127,3 [2,CH], 123,2 [CH], 122,5 [CH], 119,0 [C], 117,2 [C], 114,3 [2,CH], 110,7 [CH], 83,2 [d, $J^1_{\text{C-F}}$: 167 Hz, CH_2], 70,4 [d, $J^2_{\text{C-F}}$: 19 Hz, CH_2], 69,7 [CH_2], 67,8 [CH_2], 39,5 [CH_2], 37,4 [CH_3], 35,2 [CH_3], 31,6 [CH_3].

EJEMPLO 11

Síntesis de 2-(2-(fluoroetoxi)etoxi)etoxi-A. Se usó el procedimiento general anterior (ejemplo 5)

con 4-metilbencenosulfonato de 2-(2-(2-fluoroetoxi)etoxi)etilo para dar el compuesto diana en un rendimiento de 63%. R_f : 0,32 (SiO_2 -TLC (CH_2Cl_2 /acetona: 80/20 v:v)). ^1H NMR (CD_2Cl_2) δ 7,91 (d, 1H, J: 8,8 Hz), 7,60 (d, 1H, J: 1,6 Hz), 7,54 (d, 2H, J: 8,8 Hz), 7,36 (dd, 1H, J: 8,8, 1,6 Hz), 7,04 (d, 2H, J: 8,8 Hz), 4,57 (dt, 2H, $J^2_{\text{H-F}}$: 47,6 Hz, $J^3_{\text{H-H}}$: 4,4 Hz), 4,33 (s, 3H), 4,21 (t, 2H, J: 4,4 Hz), 4,17 (s, 2H), 3,88 (t, 2H, J: 4,8 Hz), 3,80-3,65 (m, 6H), 3,21 (s, 3H), 2,98 (s, 3H). ^{13}C NMR (CD_2Cl_2) δ 168,2 [C], 158,0 [C], 155,1 [C], 141,3 [C], 140,3 [C], 135,1 [C], 132,8 [C], 131,4 [C], 127,3 [2,CH], 123,2 [CH], 122,5 [CH], 119,0 [C], 117,2 [C], 114,3 [2,CH], 110,7 [CH], 83,2 [d, $J^1_{\text{C-F}}$: 167 Hz, CH_2], 70,7 [CH_2], 70,6 [CH_2], 70,3 [d, $J^2_{\text{C-F}}$: 19 Hz, CH_2], 69,6 [CH_2], 67,8 [CH_2], 39,5 [CH_2], 37,4 [CH_3], 35,2 [CH_3], 31,6 [CH_3].

EJEMPLO 12

Síntesis de tosiloxi-etoxi-A. Se usó el procedimiento general anterior (ejemplo 5) con bis(4-metilbencenosulfonato) de etano-1,2-difilo (sintetizado según Damont A. et al. (2008) J. label. Compds Radiopharm. 51: 286-292) para dar el compuesto diana en un rendimiento de 45%. R_f : 0,72 (SiO_2 -TLC (CH_2Cl_2 /MeOH: 95/5 v:v)). ^1H NMR (CD_2Cl_2) δ 7,89 (d, 1H, J: 8,8 Hz), 7,84 (d, 2H, J: 8,4 Hz), 7,60 (d, 1H, J: 1,6 Hz), 7,53 (d, 2H, J: 8,8 Hz), 7,41 (d, 2H, J: 8,4 Hz), 7,36 (dd, 1H, J: 8,8, 1,6 Hz), 6,91 (d, 2H, J: 8,8 Hz), 4,40 (t, 2H, J: 4,4 Hz), 4,32 (s, 3H), 4,22 (t, 2H, J: 4,4 Hz), 4,17 (s, 2H), 3,21 (s, 3H), 2,98 (s, 3H), 2,48 (s, 3H). ^{13}C NMR (CD_2Cl_2) δ 168,1 [C], 157,2 [C], 155,0 [C], 145,2 [C], 141,2 [C], 140,3 [C], 135,5 [C], 132,8 [C], 132,7 [C], 131,3 [C], 129,9 [2,CH], 127,9 [2,CH], 127,4 [2,CH], 123,2 [CH], 122,6 [CH], 118,9 [C], 117,2 [C], 114,4 [2,CH], 110,7 [CH], 68,3 [CH_2], 65,8 [CH_2], 39,5 [CH_2], 37,4 [CH_3], 35,2 [CH_3], 31,6 [CH_3], 21,3 [CH_3].

La tosiloxi-propoxi-A, tosiloxi-butoxi-A, 2-(tosiloxi-etoxi)-etoxi-A y 2-(2-(tosiloxi-etoxi)-etoxi)-etoxi-A como precursores para el marcado con flúor-18 de los derivados de fluoroalcoxi-A descritos anteriormente se pueden preparar como se acaba de describir anteriormente con el reactivo de alquilación apropiado.

EJEMPLO 13

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

GBq/ μ mol (al final de la radiosíntesis).

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

EJEMPLO 14

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

El análisis de los metabolitos presentes en la sangre y el plasma de las ratas a 10 y 20 min después de la inyección de [^{11}C]-A y de los metabolitos presentes en el cerebro de las ratas a 10, 20 y 30 min después de la inyección de [^{11}C]-A detectaron esencialmente el compuesto padre solamente (Figura 10).

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

EJEMPLO 15

Tanto en los ratones transgénicos APPxPS1 como PS1 de tipo salvaje, la absorción de la [^{11}C]-A en el cerebro entero (cerebelo excluido) es más alta que la absorción del [^{11}C]PK11195 (Figura 6). Sin embargo, la absorción tanto de [^{11}C]-A como [^{11}C]PK11195 no es significativamente más alta en los APPxPS1 frente a los PS1 de tipo salvaje. Por contraste, la

unión específica de la [^3H]-A es aproximadamente 2 veces mayor en secciones de cerebro entero de ratones APP $\times$ PS1 comparado con ratones PS1 de tipo salvaje (Figura 7).

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

EJEMPLO 16

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

Aplicaciones:

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

29

REIVINDICACIONES

1. Uso de 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida radiomarcada como biomarcador para la detección, en un individuo, de los niveles de PBR asociados con estados normales y patológicos, en el que la radiomarca se elige entre carbono-11, radiohalógenos y radiometales.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que la 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida está radiomarcada con carbono-11.
3. Uso según las reivindicaciones 1 y 2, en el que la 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida está radiomarcada con carbono-11 sobre el carbono del grupo metilo situado en la posición 5 del núcleo de indol.
4. Uso según la reivindicación 1, en el que la 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida está radiomarcada con radiohalógenos.
5. Uso según las reivindicaciones 1 ó 4, en el que la 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida está radiomarcada con el radiohalógeno flúor-18.
6. Uso según las reivindicaciones 1 ó 5, en el que la 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida está radiomarcada con flúor-18 en la posición para del anillo de 3-fenilo.
7. Uso según las reivindicaciones 1-6, en el que la detección de los niveles de PBR y la inflamación se realiza por adquisición de imágenes PET (tomografía de emisión de positrones) o adquisición de imágenes SPECT (tomografía computerizada de emisión de fotones individuales).
8. Uso según las reivindicaciones 1-7, en el que la detección de los niveles de PBR y la inflamación se realiza por adquisición de imágenes PET (tomografía de emisión de positrones).
9. Uso según las reivindicaciones 1-8, en el que los estados patológicos relacionados con cambios en los niveles de PBR se seleccionan entre daños cerebrales, infecciones cerebrales y enfermedades neurológicas.
10. Uso según las reivindicaciones 1-8, en el que los estados patológicos relacionados con cambios en los niveles de PBR se seleccionan entre enfermedades psiquiátricas.

11. Uso según las reivindicaciones 1-8, en el que los estados patológicos relacionados con cambios en los niveles de PBR se seleccionan entre enfermedades proliferativas.
12. Uso según las reivindicaciones 1-8, en el que los estados patológicos relacionados con cambios en los niveles de PBR se seleccionan entre procesos inflamatorios periféricos.
13. Uso según las reivindicaciones 1-8, en el que la detección de los niveles de PBR se realiza para estudios de ocupación.
14. Uso según las reivindicaciones 1-8, en el que la detección de los niveles de PBR se realiza para evaluar la eficacia de un tratamiento terapéutico.
15. Método para la detección de niveles de PBR asociados con estados normales y cambios en los niveles de PBR asociados con estados patológicos, en los que la detección se realiza usando una forma radiomarcada de 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida, en donde la radiomarca se elige entre carbono-11, radiohalógenos y radiometales.
16. Método según la reivindicación 15, en el que la forma radiomarcada de 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida contiene carbono-11.
17. Método según las reivindicaciones 15-16, en el que la 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida está radiomarcada con carbono-11 sobre el carbono del grupo metilo situado en la posición 5 del núcleo de indol.
18. Método según la reivindicación 15, en el que la 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida está radiomarcada con flúor-18.
19. Método según la reivindicación 15, en el que la 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida está radiomarcada con flúor-18 en la posición para del anillo de 3-fenilo.
20. Método según las reivindicaciones 15-19, en el que los estados patológicos relacionados con cambios en los niveles de PBR se seleccionan entre daños cerebrales, infecciones cerebrales y enfermedades neurológicas.
21. Método según las reivindicaciones 15-19, en el que los estados patológicos relacionados con cambios en los niveles de PBR se seleccionan entre enfermedades psiquiátricas.
22. Método según las reivindicaciones 15-19, en el que los estados patológicos relacionados

con cambios en los niveles de PBR se seleccionan entre enfermedades proliferativas.

23. Método según las reivindicaciones 15-19, en el que los estados patológicos relacionados con cambios en los niveles de PBR se seleccionan entre procesos inflamatorios periféricos.
24. Método según las reivindicaciones 15-19, en el que la detección de los niveles de PBR se realiza para estudios de ocupación.
25. Método según las reivindicaciones 15-19, en el que la detección de los niveles de PBR se realiza para evaluar la eficacia de un tratamiento terapéutico.
26. Kit de diagnóstico para la detección de niveles de PBR asociados con estados normales y cambios en los niveles de PBR asociados con estados patológicos, que comprende una forma radiomarcada de 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida.

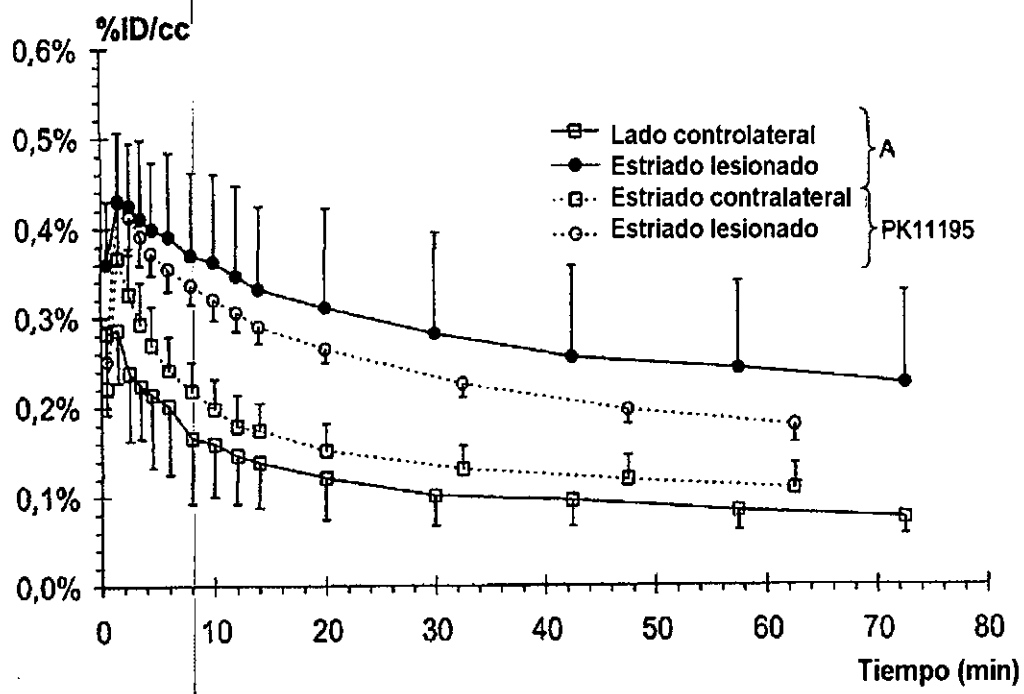


Figura 1

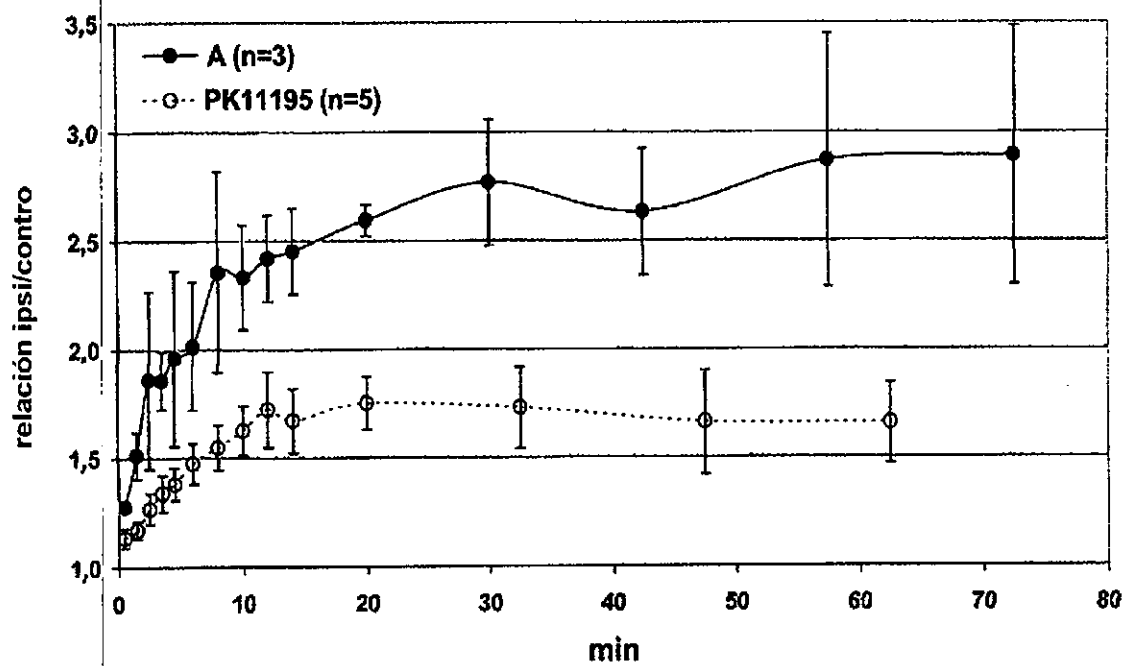


Figura 2

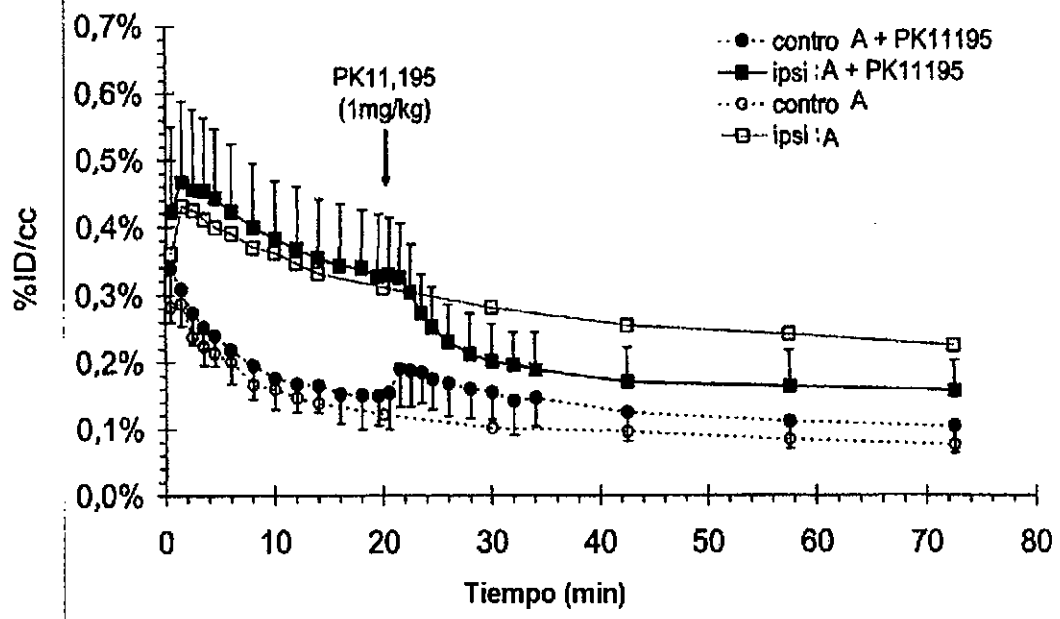


Figura 3

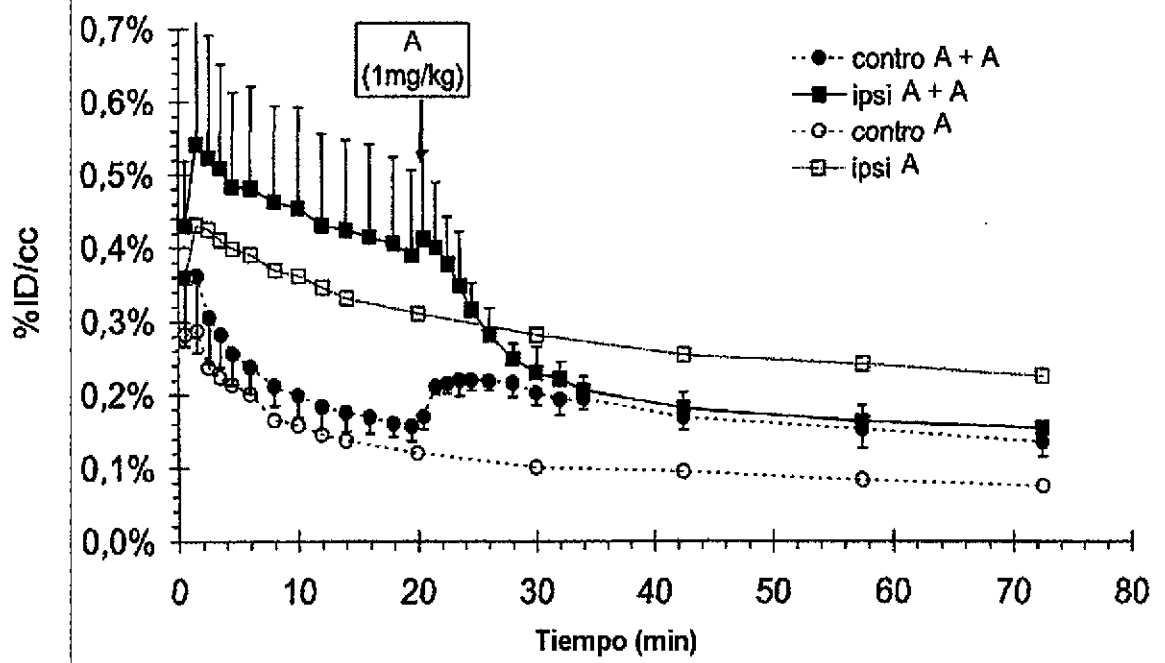


Figura 4

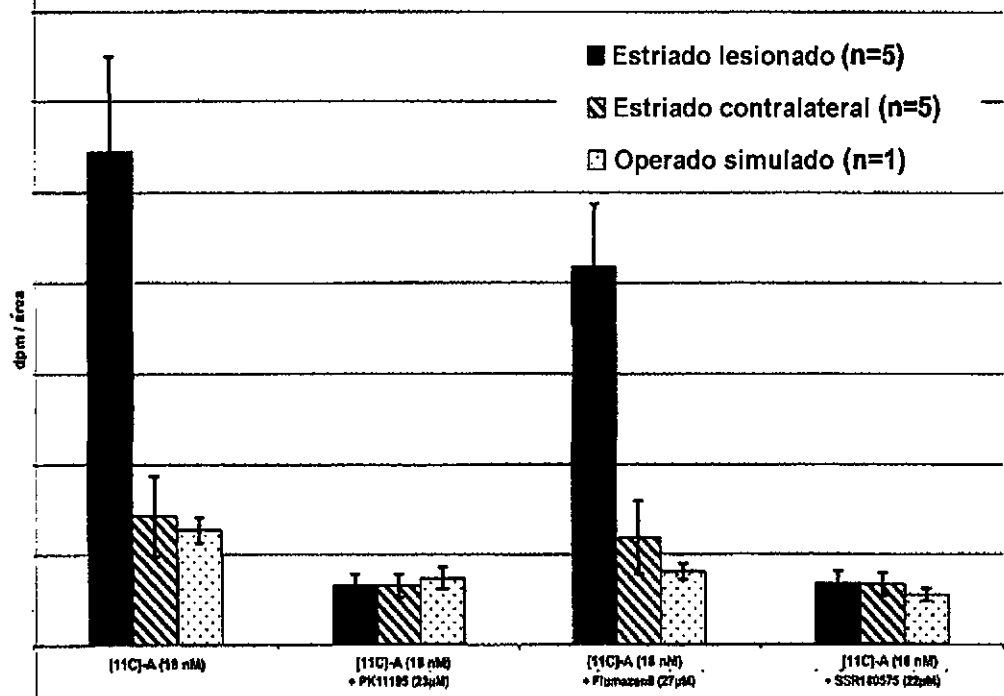


Figura 5

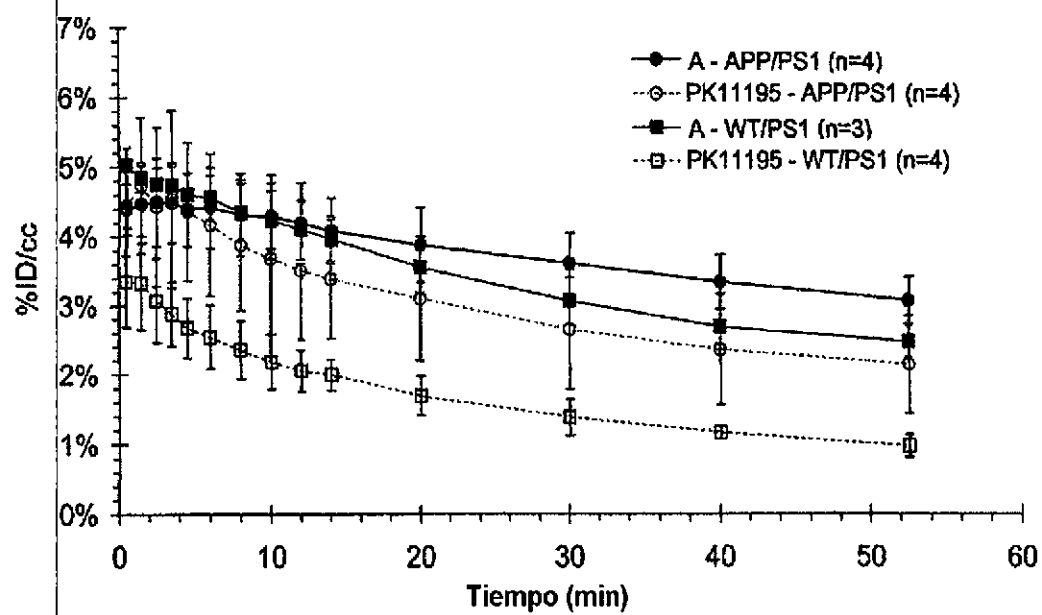


Figura 6

89

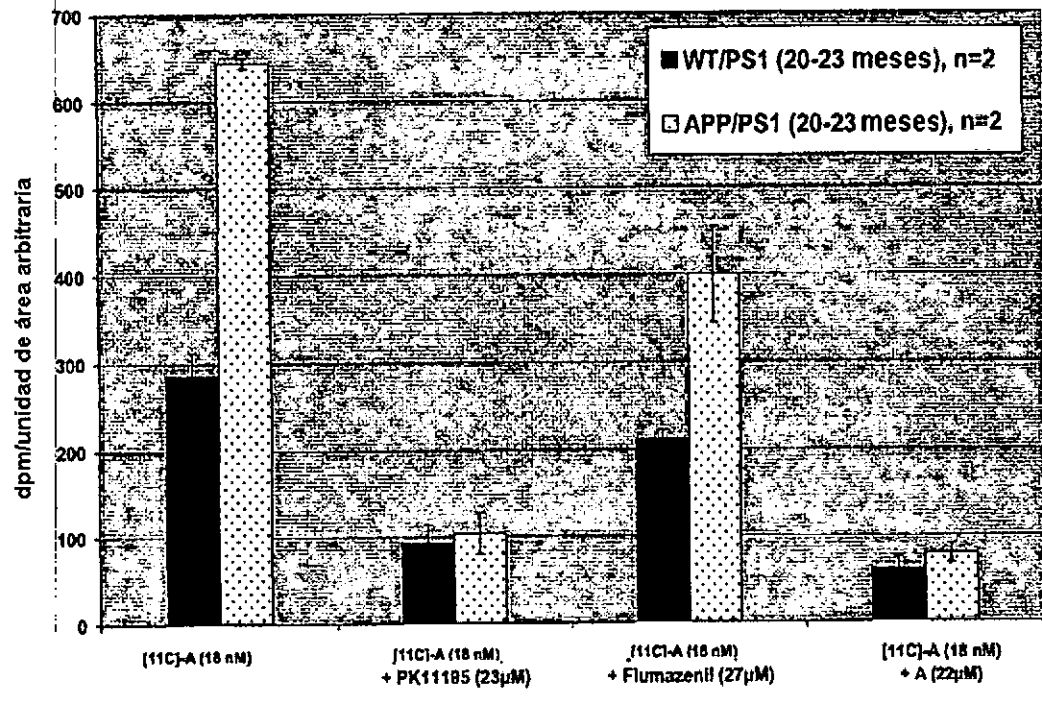


Figura 7

90

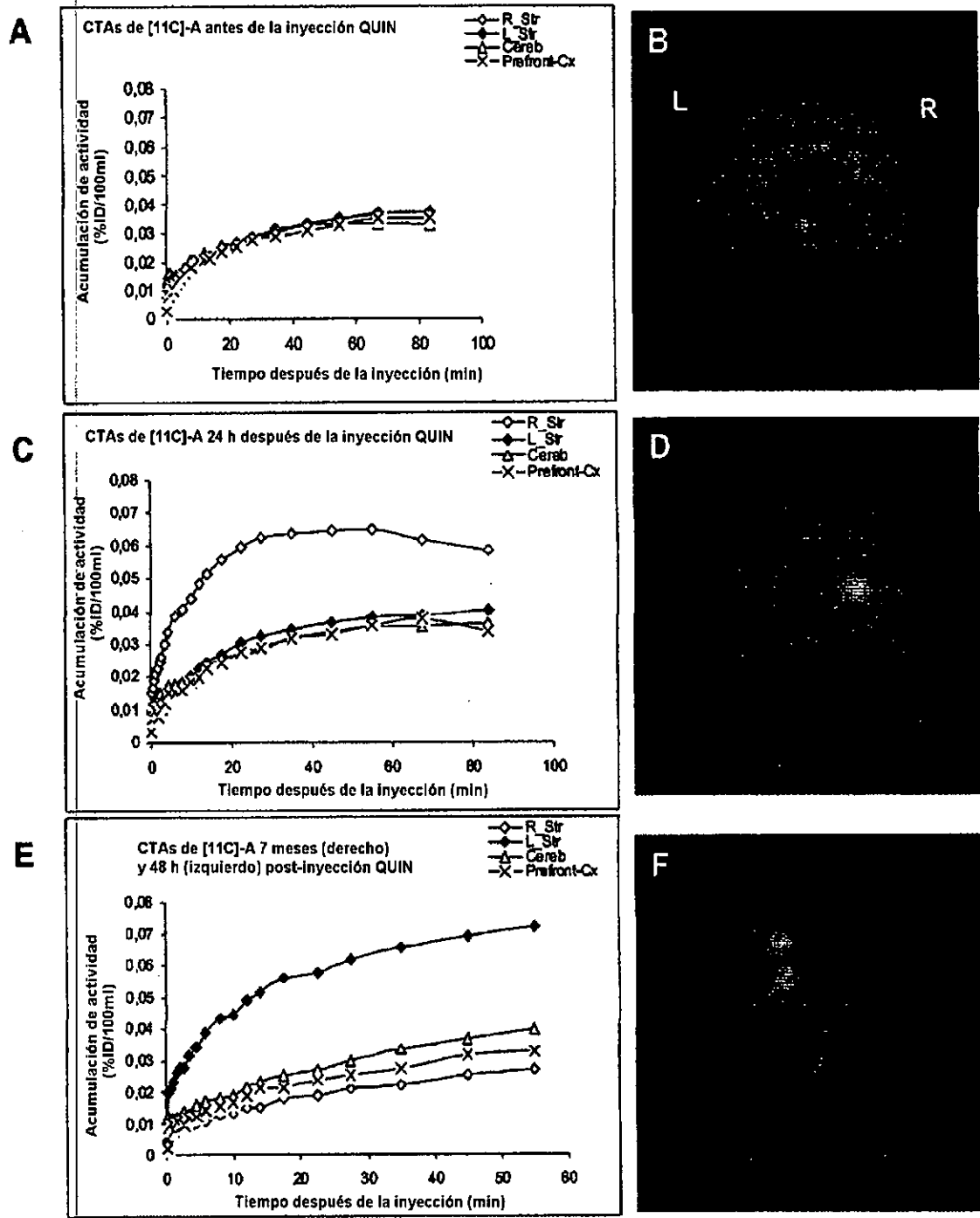


Figura 8

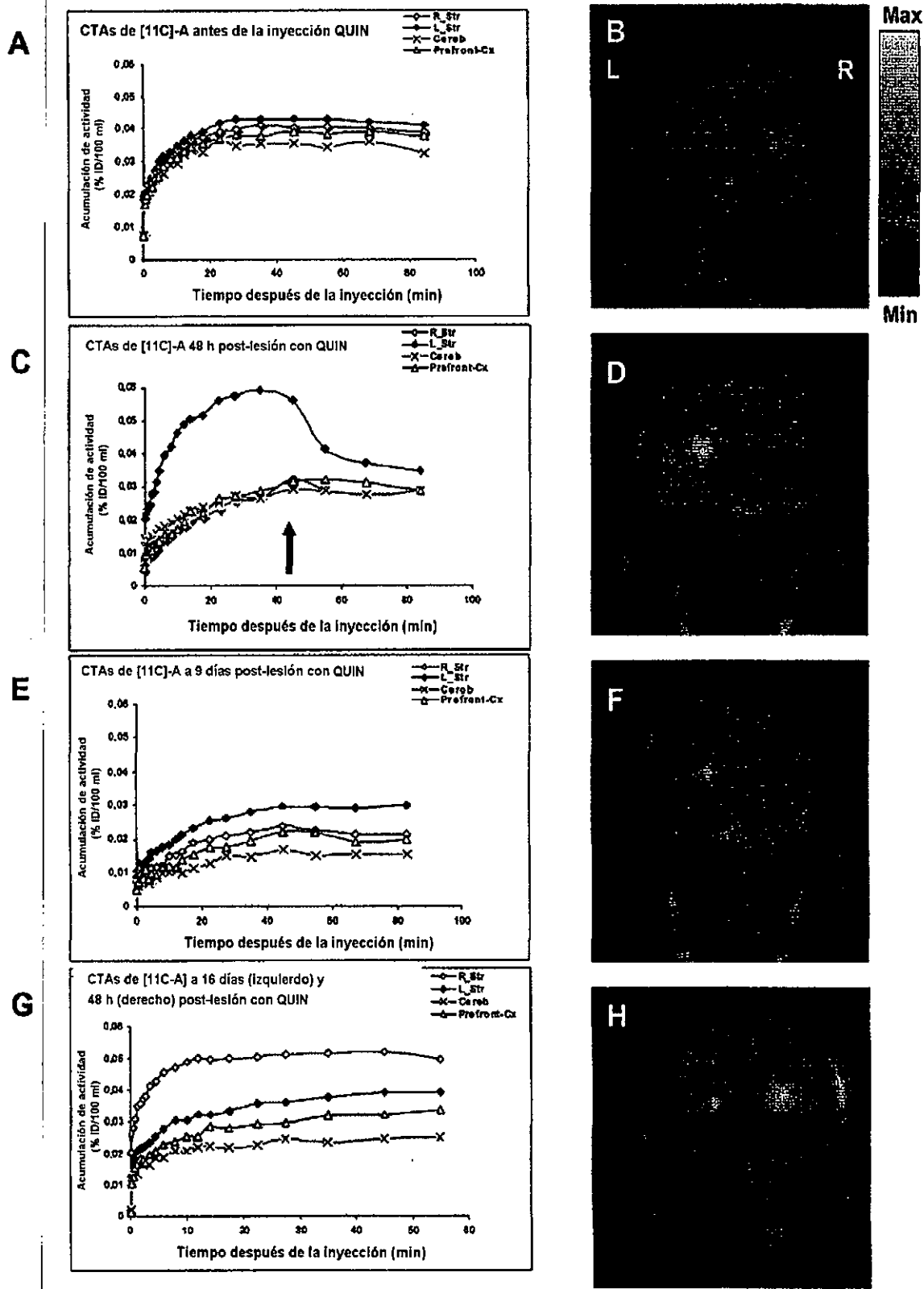


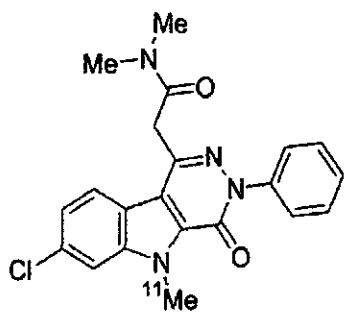
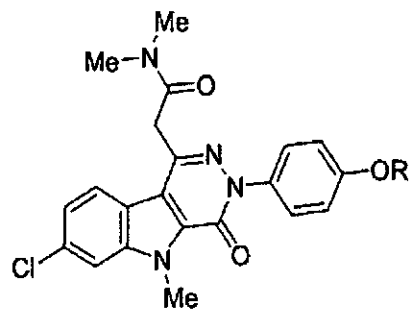
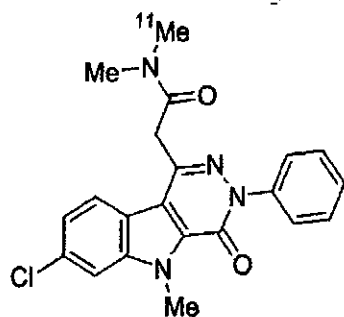
Figura 9

92

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

* lado lesionado / controlateral

Figura 10

[indol-N-metil- ^{11}C]-Aderivados de [$^{18}\text{F}/^{11}\text{C}$]-A[acetamida-N-metil- ^{11}C]-A

$\text{R} =$ $-\text{CH}_2\text{CH}_2^{18}\text{F}$
 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^{18}\text{F}$
 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^{18}\text{F}$
 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2^{18}\text{F}$
 $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2^{18}\text{F}$
 $-\text{CH}_3^{11}\text{C}$

Figura 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2009/007562

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K51/04 G01N33/60

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BEILSTEIN Data, EMBASE, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
-----------	--	-----------------------

X	VIN V ET AL: "Binding characteristics of SSR180575, a potent and selective peripheral benzodiazepine ligand" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 310, no. 3, 24 October 2003 (2003-10-24), pages 785-790, XP004461163 ISSN: 0006-291X	26
A	page 786, section "[3H]SSR180575 binding on HEK293T or rat mitochondria" abstract	1-25

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 February 2010

Date of mailing of the International search report

24/02/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bliem, Barbara

95

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2009/007562

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEN M K ET AL: "Translocator protein 18 kDa (TSPO): Molecular sensor of brain injury and repair" PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, ELSEVIER, GB, vol. 118, no. 1, 1 April 2008 (2008-04-01), pages 1-17, XP022622113 ISSN: 0163-7258 [retrieved on 2008-02-09] cited in the application table 2 page 10-11, section "In vivo assessment of TSPO in human neurological diseases"	1-26
A	FERZAZ BADIA ET AL: "SSR180575 (7-chloro-N,N,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4H-pyridazino(4,5-b)indole-1-acetamide), a peripheral benzodiazepine receptor ligand, promotes neuronal survival and repair" JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, AMERICAN SOCIETY FOR PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, US, vol. 301, no. 3, 1 June 2002 (2002-06-01), pages 1067-1078, XP002432965 ISSN: 0022-3565 cited in the application abstract page 1069, "In Vivo Binding Studies"	1-26

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT

(21) N° de solicitud:				(51) Int Cl: A61K 051/004	
22) Fecha de solicitud:				(71) Solicitante(s) SANOFI-AVENTIS Y COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE C.E.A.	
(30) Prioridad	(31)	Prioridad	(32)	Fecha	(33) País
		08291013.4		28/10/2008	EP
				(72) Inventor(es) JESÚS BENAVIDES Y OTROS	
				(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 28/05/2011				(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT				Fecha: 06/05/2010	
Fecha de presentación de la solicitud: 27/10/2009				N° publicación: WO 2010/049819 A1	
No. de solicitud PCT/IB2009/007562					
(54) Titulo: USO DE 7-CLORO-N,N,5-TRIMETIL-4-OXO-3-FENIL-3,5-DIHIDRO-4H-PIRIDAZINO[4,5-B]INDOL-1-ACETAMIDA COMO BIOMARCADOR DE LOS NIVELES DEL RECEPTOR PERIFÉRICO DE BENZODIAZEPINAS					

Reivindicación(es):

1. Uso de 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida radiomarcada como biomarcador para la detección, en un individuo, de los niveles de PBR asociados con estados normales y patológicos, en el que la radiomarca se elige entre carbono-11, radiohalógenos y radiometales.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que la 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida está radiomarcada con carbono-11.
3. Uso según las reivindicaciones 1 y 2, en el que la 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida está radiomarcada con carbono-11 sobre el carbono del grupo metilo situado en la posición 5 del núcleo de indol.
4. Uso según la reivindicación 1, en el que la 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida está radiomarcada con radiohalógenos.
5. Uso según las reivindicaciones 1 ó 4, en el que la 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida está radiomarcada con el radiohalógeno flúor-18.
6. Uso según las reivindicaciones 1 ó 5, en el que la 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida está radiomarcada con flúor-18 en la posición para del anillo de 3-fenilo.
7. Uso según las reivindicaciones 1-6, en el que la detección de los niveles de PBR y la inflamación se realiza por adquisición de imágenes PET (tomografía de emisión de positrones) o adquisición de imágenes SPECT (tomografía computerizada de emisión de fotones individuales).
8. Uso según las reivindicaciones 1-7, en el que la detección de los niveles de PBR y la inflamación se realiza por adquisición de imágenes PET (tomografía de emisión de positrones).
9. Uso según las reivindicaciones 1-8, en el que los estados patológicos relacionados con cambios en los niveles de PBR se seleccionan entre daños cerebrales, infecciones cerebrales y enfermedades neurológicas.
10. Uso según las reivindicaciones 1-8, en el que los estados patológicos relacionados con cambios en los niveles de PBR se seleccionan entre enfermedades psiquiátricas.

11. Uso según las reivindicaciones 1-8, en el que los estados patológicos relacionados con cambios en los niveles de PBR se seleccionan entre enfermedades proliferativas.
12. Uso según las reivindicaciones 1-8, en el que los estados patológicos relacionados con cambios en los niveles de PBR se seleccionan entre procesos inflamatorios periféricos.
13. Uso según las reivindicaciones 1-8, en el que la detección de los niveles de PBR se realiza para estudios de ocupación.
14. Uso según las reivindicaciones 1-8, en el que la detección de los niveles de PBR se realiza para evaluar la eficacia de un tratamiento terapéutico.
15. Método para la detección de niveles de PBR asociados con estados normales y cambios en los niveles de PBR asociados con estados patológicos, en los que la detección se realiza usando una forma radiomarcada de 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida, en donde la radiomarca se elige entre carbono-11, radiohalógenos y radiometales.
16. Método según la reivindicación 15, en el que la forma radiomarcada de 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida contiene carbono-11.
17. Método según las reivindicaciones 15-16, en el que la 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida está radiomarcada con carbono-11 sobre el carbono del grupo metilo situado en la posición 5 del núcleo de indol.
18. Método según la reivindicación 15, en el que la 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida está radiomarcada con flúor-18.
19. Método según la reivindicación 15, en el que la 7-cloro-*N,N*,5-trimetil-4-oxo-3-fenil-3,5-dihidro-4*H*-piridazino[4,5-*b*]indol-1-acetamida está radiomarcada con flúor-18 en la posición para del anillo de 3-fenilo.
20. Método según las reivindicaciones 15-19, en el que los estados patológicos relacionados con cambios en los niveles de PBR se seleccionan entre daños cerebrales, infecciones cerebrales y enfermedades neurológicas.
21. Método según las reivindicaciones 15-19, en el que los estados patológicos relacionados con cambios en los niveles de PBR se seleccionan entre enfermedades psiquiátricas.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

97



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0035353

Bogotá D.C., Abril 15 de 2011 - 17:09:28

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	430542114	15/04/2011	24.470.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	21 CERTIFICACIONES	14.000.00	14.000.00
				\$14.000.00

SON: **CATORCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Gaja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-051319-00000-0000

Fecha: 2011-04-27 12:07:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100

0020: 18249-841-001-4

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Abril 15 de 2011 - 17:09:34

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

98

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0038488

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C., Abril 25 de 2011 - 16:48:19

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	431626576	25/04/2011	42.533.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	27.000.00	27.000.00
				<u>\$27.000.00</u>
				=====

SON: **VEINTISIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-051319- -00000-0000

Fecha: 2011-04-27 12:07:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100

0020:18249-841-001-4

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Abril 25 de 2011 - 16:48:26

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

99

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0038489

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C., Abril 25 de 2011 - 16:48:19

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	431626576	25/04/2011	42.533.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	27.000.00	27.000.00
				\$27.000.00

SON: **VEINTISIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-051319- -00000-0000

Fecha: 2011-04-27 12:07:35
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR. NUEVAS CR
Eve: 378 FASE NACIONAL I
Folios: 100

Código: 18249-841-001-4

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Abril 25 de 2011 - 16:48:28

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0038573

Bogotá D.C., Abril 25 de 2011 - 16:48:19

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	431626576	25/04/2011	42 533.000.00

*** Conceptos Pagados ***

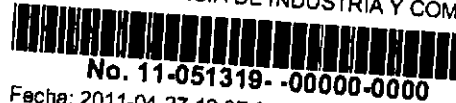
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	1614 TASA ANUAL A#OS 17 a 20 PARA MANTENIMIENTO DE PATENTE D	935.000.00	935.000.00
				\$935.000.00

SON: **NOVECIENTOS TREINTA Y CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-051319- -00000-0000

Fecha: 2011-04-27 12:07:35
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR. NUEVAS CR
Eve: 378 FASE NACIONAL I
Folios: 100

COLO: 18249-841-001-4

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Abril 25 de 2011 - 16:48:29



No. 11-051319- -00000-0000

Fecha: 2011-04-27 12:07:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTIL.

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐ Descripción de la invención
☐ Dibujos de ser estos pertinentes
☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐ Dibujos de ser estos pertinentes
☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
COMMISSARIAT A L ENERGIE ATOMIQUE C.E.A.

REFERENCIA	Radicación No.	11 051319
	Solicitud internacional	PCT/IB2009/7562
	Fecha inicio fase nacional	28/05/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

0 97 31

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado por la sociedad COMMISSARIAT A L' ENERGIE ATOMIQUE C.E.A., con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...



Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.



JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha
adpa11

17 JUN. 2011