Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 03-46600

54. **TÍTULO** "Productos radiofarmacéuticos para el diagnóstico de la enfermedad Alzheimer"

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** A61K 51/00; C07D 295/18

71. **SOLICITANTE** Schering Aktiengesellschaft

DOMICILIO Berlin, Alemania

74. **APODERADO** Gustavo H. Restrepo

22. **BOGOTÁ, D. C.,** 3 Junio 2003

(FORMA P-10)

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

03 046600 00

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 03046600 00000000 Folios: 251
Fecha (AMD): 2003-06-03 16:20:51
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

① SOLICITUD DE :

[X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[ ] Capítulo I. [X] Capítulo II.

② SOLICITANTE (71)	Nombre: **SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT** Dirección: **Müllestrasse 178 13353 Berlin, Alemania** Nacionalidad o Domicilio: **Berlin,Alemania** Lugar de Constitución: **Alemania** Teléfono: Fax: E-mail:	IDENTIFICACIÓN C.C. [ ] NIT [ ] C.E. [ ] Otro [ ] Cual_____ Número _____
③ REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: **GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO** Dirección: **Cra. 11A No. 94-76-Of. 308** Teléfono: **6161948** Fax: **6163976** E-mail:	IDENTIFICACIÓN C.C. [X] NIT [ ] C.E. [ ] Otro [X] Cual_____ Número **2.878.023** TP **5903**
④ INVENTOR (ES) (72)	Nombre: **HILGER, Christoph-Stephan** Dirección: **Langenauer Weg 24** Nacionalidad o Domicilio **13503 Berlin, Alemania**	

⑤ PCT (86)

Solicitud Internacional No. **PCT/EP01/12607** Fecha **Noviembre 1 de 2001**

Publicación Internacional No. **WO 02/36581 A1** Fecha **Mayo 10 de 2002**

⑥ Título (54) **"PRODUCTOS RADIOFÁRMACEUTICOS PARA EL DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER".**

⑦ Clasificación Internacional (51) **C07D 295/18 ; A61K 51/00 ; A61P 25/28**

⑧ Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI [X] NO [ ]	**Estados Unidos**	**Noviembre 6,2000**	**60/246,299**

⑨ Comprobante de pago No. **37,353** Fecha **Mayo 27 de 2003**

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

(10) ANEXOS

- [X] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [X] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [X] Poderes, si fuere el caso. Se encuentra protocolizado bajo el No. 605.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones
- [X] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones,dibujos)
- [X] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones,dibujos)
- [X] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [X] Traducción del examen preliminar internacional 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.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [X] Otros Reporte de Búsqueda Internacional.

(11) FIGURA CARACTERÍSTICA:

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO

FIRMA:

C.C. 2.878.023 B/ta. T.P. 5903

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

Continuación enumeración del nombre de los Inventores, con
Su correspondiente dirección, código postal y domicilio:

Nombre	Dirección	Domicilio
JOHANNSEN, Bernd	Lausitzer Strasse 5	01324 Dresden, Alemania
STEINBACH, Jörg	Geschwister-Scholl-Strasse 14	01877 Bischofswerda, Alemania
MADING, Peter	Voglerstrasse 19	01277 Dresden, Alemania
HALKS-MILLER, Meredith	799 Glenerag Way	Woodside, CA 94062 Estados Unidos de América
HORUK, Richard	3410 Silver Springs Ct.	Lafayette, CA 94549 Estados Unidos de América
DINTER, Harald	80 De La Guerra	San Rafael, CA 94556 Estados Unidos de América
MOHAN, Raju	161 Selborne Way	Moranga, CA 94556 Estados Unidos de América
HESSELGESSER, Joseph E.	445 Burnett Avenue # 103	San Francisco, CA 94131 Estados Unidos de América

Otros anexos que se acompañan a la solicitud.

Texto de la solicitud tal como fue presentada y su traducción

Copia notificación recepción copia registro (Formato PCT/IB/301)

Copia de la notificación de envío del certificado de prioridad (Formato PCT/IB/304)

Copia del formulario de presentación de la solicitud PCT.

Los dibujos correspondientes.

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 03046680 00000000 Folios: 251
Fecha (AMD): 2003-06-03 16:20:51
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 PAGE MACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 37,353
FECHA : MAYO 27 DE 2003

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
GUSTAVO HOLLMAN	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	11724165	27/05/2003	1,983,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	400,000.00
		TOTAL : $	400,000.

SON: CUATROCIENTOS MIL PESOS

Ref. 54223

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

WO P-CO-74.665
5

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
10 May 2002 (10.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/36581 A1

(51) International Patent Classification[7]: C07D 295/18, C07B 59/00, A61K 51/00, A61P 25/28

(21) International Application Number: PCT/EP01/12607

(22) International Filing Date:
1 November 2001 (01.11.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/246,299 6 November 2000 (06.11.2000) US

(71) Applicant: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, 13342 Berlin (DE).

(72) Inventors: HILGER, Christoph-Stephan; Langenauer Weg 24, 13503 Berlin (DE). JOHANNSEN, Bernd; Lausitzer Strasse 5, 01324 Dresden (DE). STEINBACH, Jörg; Geschwister-Scholl-Str. 14, 01877 Bischofswerda (DE). MÄDING, Peter; Voglerstrasse 19, 01277 Dresden (DE). HALKS-MILLER, Meredith; 799 Glenerag Way, Woodside, CA 94062 (US). HORUK, Richard; 3410 Silver Springs Ct., Lafayette, CA 94549 (US). DINTER, Harald; 80 De La Guerra, San Rafael, CA 94103 (US). MOHAN, Raju; 161 Selborne Way, Moraga, CA 94556 (US). HESSELGESSER, Joseph, E.; 445 Burnett Avenue # 103, San Francisco, CA 94131 (US).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*
— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/36581 A1

(54) Title: RADIOPHARMACEUTICALS FOR DIAGNOSING ALZHEIMER'S DISEASE

(57) Abstract: This invention is directed to the use of radiopharmaceuticals of formula (I) in diagnosing Alzheimer's disease. In particular the radiopharmaceuticals of the invention are able to pass through the blood-brain barrier and bind to the CCR1 receptor present in brain tissue of patients having Alzheimer's disease.

Radiopharmaceuticals for Diagnosing Alzheimer's Disease

Field of the Invention

The present invention relates to novel radiopharmaceuticals useful for the diagnosis of Alzheimer's disease.

Brief description of the background art

Alzheimer's disease is a severe neurodegenerative disorder, and currently about 4 million Americans suffer from this disease. As the aging population continues to grow, this number could reach 14 million by the middle of next century unless a cure or prevention is found. At present, there is no sensitive and specific premortem test for early diagnosis of this disease. Alzheimer's disease is currently diagnosed based on the clinical observation of cognitive decline, coupled with the systematic elimination of other possible causes of those symptoms. The confirmation of the clinical diagnosis of "probable Alzheimer's disease" can only be made by examination of the postmortem brain. The Alzheimer's disease brain is characterized by the appearance of two distinct abnormal proteinaceous deposits in regions of the brain responsible for learning and memory (*e.g.*, cerebral cortex and hippocampus). These deposits are extracellular amyloid plaques, which are characteristic of Alzheimer's disease, and intracellular neurofibillary tangles (NFTs), which can be found in other neurodegenerative disorders as well. Amyloid peptides are typically either 40 or 42 amino acids in length ("$A\beta^{1-40}$" or "$A\beta^{1-42}$", respectively) and are formed from abnormal processing of a larger membrane-associated protein of unknown function, the amyloid precurser protein ("APP"). Oligomeric aggregates of these peptides are thought to be neurotoxic, eventually resulting in synaptic degeneration and neuronal loss. The amount of amyloid deposition roughly correlates with the severity of symptoms at the time of death.

In the past, there have been several attempts for the design of radiopharmaceuticals that could be used as diagnostic agents for a premortem diagnosis of Alzheimer's disease.

Bornebroek *et al.* showed that the amyloid-associated protein serum amyloid P

component (SAP), labeled with ^{123}I, accumulates at low levels in the cerebral cortex, possibly in vessel walls, of patients with cerebral amyloidosis (Bornebroek, M., *et al.*, *Nucl. Med. Commun.* (1996), Vol. 17, pp. 929-933).

Saito *et al.* proposed a vector-mediated delivery of ^{125}I-labeled $A\beta^{1-40}$ through the blood-brain barrier. It is reported that the iodinated $A\beta^{1-40}$ binds Aβ amyloid plaque in tissue sections (Saito, Y., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995*, Vol. 92, pp.10227-10231).

U.S. Patent No. 5,231,000 discloses antibodies with specificity to A4 amyloid polypeptide found in the brain of Alzheimer's disease patients. However, a method to deliver these antibodies across the blood-brain barrier has not been described.

Zhen *et al.* described modifications of the amyloid-binding dye known as "Congo Red™", and complexes of these modified molecules with technetium and rhenium. The complexes with radioactive ions are purported to be potential imaging agents for Alzheimer's disease (Zhen *et al.*, *J. Med. Chem.*(1999), Vol. 42, pp. 2805-2815). However, the potential of the complexes to cross the blood-brain barrier is limited.

A group at the University of Pennsylvania in the U.S.A. (Skovronsky, M., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. 2000*, Vol. 97, pp.7609-7614) has developed a fluorescently labeled derivative of Congo Red that is brain permeable and that non-specifically binds to amyloid materials (that is, peptides in β-pleated sheet conformation). This compound would need to be radiolabeled and then run through pre-clinical screens for pharmacokinetics and toxicity before clinical testing.

Klunk *et al.* reported experiments with a derivative of Congo Red™, Chrysamine G (CG). It is reported that CG binds synthetic β-amyloid well *in vitro*, and crosses the blood-brain barrier in normal mice (Klunk *et al.*, *Neurobiol. Aging* (1994), Vol. 15, No. 6, pp. 691-698).

Bergström *et al.* presented a compound labeled with Iodine-123 as a potential radioligand for visualization of M_1 and M_2 muscarinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease (Bergström *et al.*, *Eur. J. Nucl. Med.* (1999), Vol. 26, pp. 1482-1485).

Recently, it has been discovered that certain specific chemokine receptors are upregulated in the brains of patients with Alzheimer's disease (Horuk, R. *et al.*, *J. Immunol.* (1997), Vol. 158, pp. 2882-2890); Xia *et al.*, *J. NeuroVirol.* (1999), Vol. 5, pp. 32-41). In

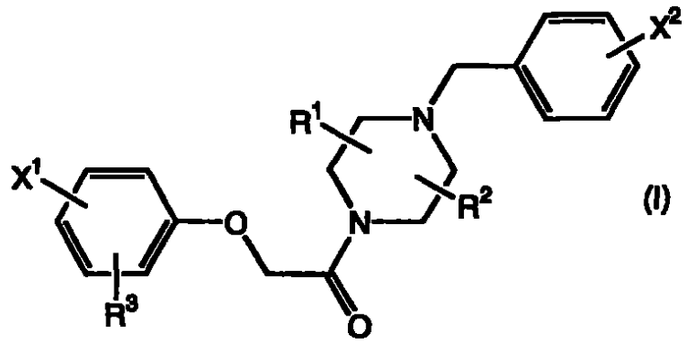
addition, it has been shown recently that the chemokine receptor CCR1 is upregulated in the brains of patients with advanced Alzheimer's disease and absent in normal-aged brains (Halks-Miller *et al, CCR1 Immunoreactivity in Alzheimer's Disease Brains*, Society for Neuroscience Meeting Abstract, #787.6, Volume 24, 1998). Antagonists to the CCR1 receptor and their use as anti-inflammatory agents are described in the PCT Published Patent Application, WO 98/56771.

None of the above described proposals have resulted in a clinical development of an imaging agent for the early diagnosis of Alzheimer's disease. Accordingly, there is still a clinical need for a diagnostic agent that could be used for a reliable and early diagnosis of Alzheimer's disease.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is directed to radiopharmaceuticals that bind to the CCR1 receptor and are able to pass through the blood-brain barrier, and are therefore useful in diagnosing Alzheimer's disease, preferably at an early stage of the disease.

Accordingly, in one aspect, the invention is directed to compounds of formula (I):



(I)

wherein:

X^1 and X^2 are each independently halo;

R^1 and R^2 are each independently hydrogen or alkyl; and

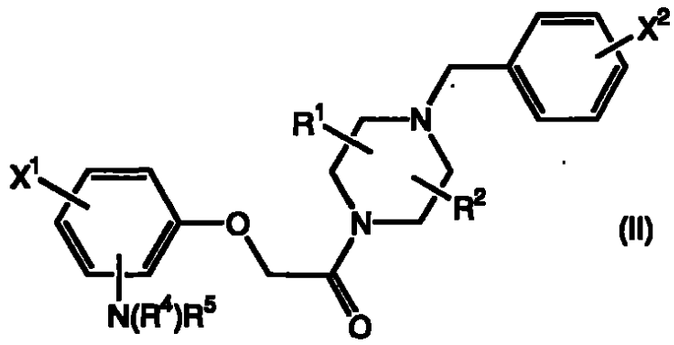
R^3 is hydrogen, amino, monoalkylamino, dialkylamino, monoaralkylamino, alkylcarbonylamino, alkenylcarbonylamino, haloalkylcarbonylamino, arylcarbonylamino, alkoxyalkylcarbonylamino, alkoxycarbonylalkylcarbonylamino,

glycinamido, monoalkylglycinamido, arylcarbonylglycinamido, aminocarbonylglycinamido, (aminocarbonyl)(alkyl)glycinamido, (alkoxyalkylcarbonyl)glycinamido, ureido, monoalkylureido, monoarylureido, monoaralkylureido, or alaninamido;

and wherein either one of X^1 or X^2 is selected from the group of ^{123}I, ^{125}I, ^{128}I, ^{131}I, ^{75}Br, ^{76}Br, ^{80}Br and ^{18}F; or wherein one of the carbon atoms in the compound is ^{11}C;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

In another aspect, the invention is directed to compounds of formula (II):



(II)

wherein

X^1 and X^2 are each independently halo;

R^1 and R^2 are each independently hydrogen or alkyl; and

R^4 is hydrogen; and

R^5 comprises a chelator capable of binding a radioactive metal atom chosen from the group of ^{99m}Tc, ^{186}Re and ^{188}Re;

or as a complex with ^{99m}Tc, ^{186}Re and ^{188}Re;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

In another aspect, this invention is directed to a method of diagnosing Alzheimer's disease in a human which comprises administering to a human in need of such diagnosis a compound of formula (I) or formula (II), as described above and herein, and measuring the radioactivity arising from the administration of the compound to the human either by using a gamma camera or by positron emission tomography (PET).

In another aspect, the invention is directed to a method of using a compound of the

invention for the manufacture of a radiopharmaceutical for the diagnosis of Alzheimer's disease in a human.

In another aspect, the invention is directed to a method of preparing compounds of the invention.

Brief Description of the Figures

Figure 1 shows the expression of CCR1 in Alzheimer's disease brain tissue .

Figure 2 shows CCR1 antibody specificity in Alzheimer's disease brain tissue.

Figure 3 shows CCR1-$A\beta^{1-40}$ double-labeled tissue sections

Figure 4 shows neuritic plaques double-labeled for CCR1 and $A\beta^{1-42}$.

Figure 5 shows diffuse $A\beta^{1-42}$ staining in Alzheimer's disease brain.

Figure 6 is a graph showing the relationship between CCR1 and $A\beta^{1-40}$ by CDR score.

Figure 7 is a graph showing the relationship between CCR1 and $A\beta^{1-42}$ by CDR score.

Figure 8 is a graph demonstrating the decrease in total brain radioactivity over time.

Figure 9 is a graph showing the percent of injected dose in brain and plasma.

Figure 10 are graphs showing CCR1 expression in other neurodegenerative diseases.

Detailed Description of the Invention

Definitions

As used in the specification and appended claims, unless specified to the contrary, the following terms have the meaning indicated:

"Alkyl" refers to a straight or branched chain monovalent or divalent radical consisting solely of carbon and hydrogen, containing no unsaturation and having from one to eight carbon atoms, *e.g.*, methyl, ethyl, *n*-propyl, 1-methylethyl (*iso*-propyl), *n*-butyl, *n*-pentyl, 1,1-dimethylethyl (*t*-butyl), *n*-heptyl, and the like.

"Alkylcarbonylamino" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-R_a where R_a is an alkyl radical as defined above, *e.g.*, acetylamino, ethylcarbonylamino, *n*-propylcarbonylamino, and the like.

"Alkenyl" refers to a straight or branched chain monovalent or divalent radical

consisting solely of carbon and hydrogen, containing at least one double bond and having from two to eight carbon atoms, *e.g.*, ethenyl, prop-1-enyl, but-1-enyl, pent-1-enyl, penta-1,4-dienyl, and the like.

"Alkenylcarbonylamino" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-R_c where R_c is an alkenyl radical as defined above, *e.g.*, ethenylcarbonylamino, prop-2-enylcarbonylamino, but-2-enylcarbonylamino, and the like.

"Alkoxy" refers to a radical of the formula -OR_a where R_a is an alkyl radical as defined above, *e.g.*, methoxy, ethoxy, *n*-propoxy, 1-methylethoxy (*iso*-propoxy), *n*-butoxy, *n*-pentoxy, 1,1-dimethylethoxy (*t*-butoxy), and the like.

"Alkoxycarbonylalkylcarbonylamino" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-R_a-C(O)-OR_a where each R_a is independently an alkyl radical as defined above, *e.g.*, ethoxycarbonylmethylcarbonylamino, methoxycarbonylmethylcarbonylamino, (2-ethoxycarbonylethyl)carbonylamino, (2-methoxycarbonylethyl)carbonylamino, and the like.

"(Alkoxyalkylcarbonyl)glycinamido" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-CH_2-N(H)-C(O)-R_a-O-R_a where each R_a is independently an alkyl radical as defined above, *e.g.*, (methoxyacetyl)glycinamido, (ethoxyacetyl)glycinamido, and the like.

"Amino" refers to the radical -NH_2.

"Aminocarbonylglycinamido" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-CH_2-N(H)-C(O)-NH_2.

"(Aminocarbonyl)(alkyl)glycinamido" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-CH_2-N(R_a)-C(O)-NH_2 where R_a is an alkyl radical as defined above.

"Aryl" refers to a phenyl or naphthyl radical. Unless stated otherwise specifically in the specification, the term "aryl" or the prefix "ar-" (such as in "aralkyl") is meant to include aryl radicals optionally substituted by one or more substituents selected from the group consisting of halo, alkyl, alkoxy, haloalkyl, haloalkoxy, nitro, amino, monoalkylamino, and dialkylamino, as defined herein.

"Arylcarbonylamino" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-R_b where R_b is an aryl radical as defined above, *e.g.*, (4-methoxyphenyl)carbonylamino, (4-fluorophenyl)carbonylamino, (4-chlorophenyl)carbonylamino, and the like.

"Arylcarbonylglycinamido" refers to a radical of the formula

-N(H)-C(O)-CH_2-N(H)-C(O)-R_b where R_b is an aryl radical as defined above, *e.g.*, phenylcarbonylglycinamido, (4-fluoro-3-trifluoromethylphenyl)carbonylglycinamido, (4-fluorophenyl)carbonylglycinamido, and the like.

"Aralkyl" refers to a radical of the formula -R_aR_b where R_a is an alkyl radical as defined above and R_b is an aryl radical as defined above, *e.g.*, benzyl, and the like.

"Alkoxyalkylcarbonylamino" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-R_a-O-R_a where each R_a is an alkyl radical as defined above, *e.g.*, methoxymethylcarbonylamino, ethoxyethylcarbonylamino, methoxyethylcarbonylamino, and the like.

"Alaninamido" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-C(CH_3)H-NH_2.

"Benzyl" refers to a radical of the formula -CH_2-R_h where R_h is a phenyl radical optionally substituted by one or more substituents selected from the group consisting of halo, alkyl, haloalkyl, alkoxy, nitro, amino, monoalkylamino, and dialkylamino.

"Dialkylamino" refers to a radical of the formula -N(R_a)R_a where each R_a is independently an alkyl radical as defined above, *e.g.*, dimethylamino, methylethylamino, diethylamino, dipropylamino, ethylpropylamino, and the like.

"Glycinamido" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-CH_2-NH_2.

"Halo" refers to bromo, chloro, iodo or fluoro.

"Haloalkyl" refers to an alkyl radical, as defined above, that is substituted by one or more halo radicals, as defined above, *e.g.*, trifluoromethyl, difluoromethyl, trichloromethyl, 2-trifluoroethyl, 1-fluoromethyl-2-fluoroethyl, 3-bromo-2-fluoropropyl, 1-bromomethyl-2-bromoethyl, and the like.

"Haloalkylcarbonylamino" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-R_f where R_f is an haloalkyl radical as defined above, *e.g.*, trifluoromethylcarbonylamino, trifluoromethylcarbonylamino, 2-bromoethylcarbonylamino, and the like.

"Monoalkylamino" refers to a radical of the formula -N(H)R_a where R_a is an alkyl radical as defined above, *e.g.*, methylamino, ethylamino, propylamino, and the like.

"Monoaralkylamino" refers to a radical of the formula -N(H)R_d where R_d is an aralkyl radical as defined above, *e.g.*, benzylamino, (3,4,5-trimethoxybenzyl)amino, (4-chlorobenzyl)amino,and the like.

"Monoalkylglycinamido" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-CH_2-N(H)R_a

where R_a is an alkyl radical as defined above.

"Monoalkylureido" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-N(H)R_a or a radical of the formula -N(R_a)-C(O)-NH_2 where R_a is an alkyl radical as defined above.

"Monoarylureido" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-N(H)R_b or a radical of the formula -N(R_b)-C(O)-NH_2 where R_b is an aryl radical as defined above

"Monoaralkylureido" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-N(H)R_d or a radical of the formula -N(R_d)-C(O)-NH_2 where R_d is an aralkyl radical as defined above.

"Optional" or "optionally" means that the subsequently described event of circumstances may or may not occur, and that the description includes instances where said event or circumstance occurs and instances in which it does not. For example, "optionally substituted aryl" means that the aryl radical may or may not be substituted and that the description includes both substituted aryl radicals and aryl radicals having no substitution.

"Pharmaceutically acceptable salt" includes both acid and base addition salts.

"Pharmaceutically acceptable acid addition salt" refers to those salts which retain the biological effectiveness and properties of the free bases, which are not biologically or otherwise undesirable, and which are formed with inorganic acids such as hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid, nitric acid, phosphoric acid and the like, and organic acids such as acetic acid, propionic acid, pyruvic acid, maleic acid, malonic acid, succinic acid, fumaric acid, tartaric acid, citric acid, benzoic acid, mandelic acid, methanesulfonic acid, ethanesulfonic acid, *p*-toluenesulfonic acid, salicylic acid, and the like. Particularly preferred salts of compounds of the invention are the monochloride salts and the dichloride salts.

"Pharmaceutically acceptable base addition salt" refers to those salts which retain the biological effectiveness and properties of the free acids, which are not biologically or otherwise undesirable. These salts are prepared from addition of an inorganic base or an organic base to the free acid. Salts derived from inorganic bases include, but are not limited to, the sodium, potassium, lithium, ammonium, calcium, magnesium, zinc, aluminum salts and the like. Preferred inorganic salts are the ammonium, sodium, potassium, calcium, and magnesium salts. Salts derived from organic bases include, but are not limited to, salts of primary, secondary, and tertiary amines, substituted amines including naturally occurring substituted amines, cyclic amines and basic ion exchange resins, such as isopropylamine,

trimethylamine, diethylamine, triethylamine, tripropylamine, ethanolamine, 2-dimethylaminoethanol, 2-diethylaminoethanol, trimethamine, dicyclohexylamine, lysine, arginine, histidine, caffeine, procaine, hydrabamine, choline, betaine, ethylenediamine, glucosamine, methylglucamine, theobromine, purines, piperazine, piperidine, *N*-ethylpiperidine, polyamine resins and the like. Particularly preferred organic bases are isopropylamine, diethylamine, ethanolamine, trimethylamine, dicyclohexylamine, choline and caffeine.

"Ureido" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-NH_2.

It is understood from the above definitions and examples that for radicals containing a substituted alkyl group any substitution thereon can occur on any carbon of the alkyl group.

The compounds of the invention, or their pharmaceutically acceptable salts, may have asymmetric carbon atoms in their structure. The compounds of the invention and their pharmaceutically acceptable salts may therefore exist as single enantiomers, diastereoisomers, racemates, and mixtures of enantiomers and diastereomers. All such single enantiomers, diastereoisomers, racemates and mixtures thereof are intended to be within the scope of this invention. Absolute configuration of certain carbon atoms within the compounds, if known, are indicated by the appropriate absolute descriptor *R* or *S*.

Utility and Administration

The compounds of the invention as described herein are antagonists to the chemokine receptor known as CCR1 and have the ability to pass the blood-brain barrier. The compounds are therefore suited as *in vivo* diagnostic agents for imaging of Alzheimer's disease. The detection of radioactivity is performed according to well-known procedures in the art, either by using a gamma camera or by positron emission tomography (PET).

Preferably, the free base or a pharmaceutically acceptable salt form, e.g. a monochloride or dichloride salt, of a compound of the invention used in a galenical formulation as diagnostic agent. The galenical formulation containing the compound of the invention optionally contains adjuvants known in the art, e.g. buffers, sodium chloride, lactic acid, surfactants etc. A sterilization by filtration of the galenical formulation under

sterile conditions prior to usage is possible.

The radioactive dose should be in the range of 1 to 100 mCi, preferably 5 to 30 mCi, and most preferably 5 to 20 mCi per application.

Testing

The suitability of the compounds as imaging agents for Alzheimer's disease can be demonstrated by experimental protocols known to those of ordinary skill in the art. For example, the upregulation of CCR1 receptors in Alzheimer's disease brains can be demonstrated in immunohistochemical staining experiments of autopsy brain tissue collected from Alzheimer's disease patients as described in detail below in the Examples. The ability of the compounds of the invention to bind to the CCR1 receptor and their ability to pass through the blood-brain barrier, can also be assessed in known *in vitro* and *in vivo* assays as described below in the Examples. In particular, Example 10 describes a large study that was undertaken to address the degree of CCR1 expression in different stages of Alzheimer's disease. Brain tissue from 50 autopsy cases showed a correlation between degree of clinical severity (dementia) in Alzheimer's disease and CCR1 expression in dystrophic neurites. CCR1 expression in plaque-like structures within the brains of clinically normal individuals is rare. Also, CCR1 expression is not found in the brains of individuals with other neurodegenerative diseases unless there is a concomitant Alzheimer's disease pathology (specifically, $A\beta^{1-42}$ in plaques).

Preferred Embodiments

Of the various aspects of the invention, certain compounds of formula (I) are preferred. In particular, compounds of formula (I) wherein X^1 is a chloro at the 4-position of the phenyl ring and X^2 is a ^{18}F atom at the 4-position of the phenyl ring are preferred. Especially preferred are such compounds for use as diagnostic agents in positron emission tomography (PET).

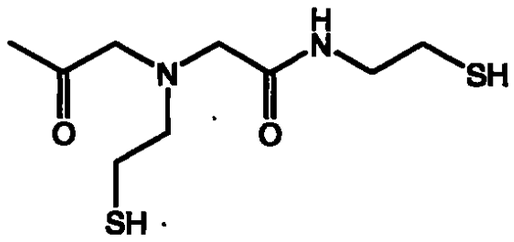
Even more preferred are those compounds of formula (I) wherein R^3 is in the 2-position of the phenyl ring and R^1 is a methyl at the 2-position of the piperazinyl ring and R^2 is a methyl at the 5-position of the piperazinyl ring. Equally preferred are those

compounds of formula (I) wherein R^3 is in the 2-position of the phenyl ring and R^1 is a methyl in the 2-position of the piperazinyl ring and R^2 is hydrogen.

Further preferred are these preferred compounds in their mono- or dichloride salt form.

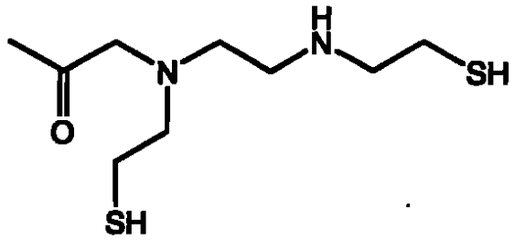
Of the various aspects of the invention, certain compounds of formula (II) are preferred. In particular, compounds of formula (II) wherein $-N(R^4)R^5$ is in the 2-position of the phenyl ring and R^1 is in the 2-position of the piperazinyl ring and R^2 is in the 5-position of the piperazinyl ring. Equally preferred are those compounds of formula (II) wherein $-N(R^4)R^5$ is in the 2-position of the phenyl ring and R^1 is a methyl in the 2-position of the piperazinyl ring and R^2 is hydrogen.

Even more preferred are those compounds of formula (II) wherein R^5 comprises a chelator according to formula (III):



(III)

or formula (IV):



(IV)

as well as their complexes with ^{99m}Tc, ^{186}Re and ^{188}Re. Of these preferred compounds, even more preferred are those compounds of formula (II) wherein R^5 comprises a chelator according to formula (III) or (IV), and wherein the chelator is bound to the nitrogen in the $-N(R^4)R^5$ group of the non-radioactive compound of formula (II) via a linker moiety comprising an alkyl radical having one to ten carbon atoms, wherein the alkyl radical optionally contains one to ten -C(O)-groups, one to ten -C(O)N(R)- groups, one to ten -N(R)C(O)- groups, one to ten -N(R)- groups, one to ten $-N(R)_2$ groups, one to ten hydroxy groups, one to ten -C(O)OR-

groups, one to ten oxygen atoms, one to ten sulfur atoms, one to ten nitrogen atoms, one to ten halogen atoms, one to ten aryl groups, and one to ten saturated or unsaturated heterocyclic rings wherein R is hydrogen or alkyl. A preferred linker moiety is -C(O)-CH_2-N(H)-.

Of the compounds of the invention, the most preferred compounds of formula (I) are those compounds selected from the group consisting of the following:

1-(5-chloro-2-{2-[(2*R*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

N'-(mercaptoeth-1-yl)-*N'*-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycylglycinamide, technetium-99m-complex;

1-(2-{2-[(2*R*)-4-(4-fluorobenzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}-5-iodo-^{123}*I*-phenyl)urea;

N'-(2-mercaptoeth-1-yl)-*N'*-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycinamide, technetium-99m-complex;

N-(2-mercaptoeth-1-yl)-*N'*-(5-mercapto-3-azapent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycinamide, technetium-99m-complex;

2-(2-amino-4-chlorophenoxy)-1-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]ethan-1-one;

2-(2-amino-4-chlorophenoxy)-1-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]ethan-1-one;

2-(2-amino-4-chlorophenoxy)-1-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]ethan-1-one;

2-(2-amino-4-chlorophenoxy)-1-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]ethan-1-one;

2-[4-chloro-2-(diethylamino)phenoxy]-1-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]ethan-1-one;

2-[4-chloro-2-(diethylamino)phenoxy]-1-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]ethan-1-one;

2-[4-chloro-2-(diethylamino)phenoxy]-1-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]ethan-1-one;

2-[4-chloro-2-(diethylamino)phenoxy]-1-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]ethan-1-one;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-(2,4-dichlorophenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-(2,4-dichlorophenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-(2,4-dichlorophenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-(2,4-dichlorophenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5,-dimethylpiperazin-1-yl]-2-(2-isopentylamino-4-chlorophenoxy)ethan-1-one;

1-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5,-dimethylpiperazin-1-yl]-2-(2-isopentylamino-4-chlorophenoxy)ethan-1-one;

1-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5,-dimethylpiperazin-1-yl]-2-(2-isopentylamino-4-chlorophenoxy)ethan-1-one;

1-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5,-dimethylpiperazin-1-yl]-2-(2-isopentylamino-4-chlorophenoxy)ethan-1-one;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-methylpropanamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-methylpropanamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-methylpropanamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-methylpropanamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(methoxy)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(methoxy)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(methoxy)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(methoxy)acetamide;

(*E*)-*N*-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-butenamide;

(*E*)-*N*-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-butenamide;

(*E*)-*N*-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-butenamide;

(*E*)-*N*-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-butenamide;

methyl *N*-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)succinamate;

methyl *N*-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)succinamate;

methyl *N*-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)succinamate;

methyl *N*-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)succinamate;

ethyl *N*-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)succinamate;

ethyl *N*-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)succinamate;

ethyl *N*-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)succinamate;

ethyl *N*-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)succinamate;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)propanamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)propanamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)propanamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)propanamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-fluorobenzamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-fluorobenzamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-fluorobenzamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-fluorobenzamide;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-(p-tolyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-(p-tolyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-(p-tolyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-(p-tolyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-ethylurea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-ethylurea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-ethylurea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-ethylurea;

1-benzyl-3-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-benzyl-3-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-benzyl-3-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-benzyl-3-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-(4-nitrophenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-(4-nitrophenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-(4-nitrophenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-(4-nitrophenyl)urea;

2-(2-benzylamino-4-chlorophenoxy)-1-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]ethan-1-one;

2-(2-benzylamino-4-chlorophenoxy)-1-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]ethan-1-one;

2-(2-benzylamino-4-chlorophenoxy)-1-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]ethan-1-one;

2-(2-benzylamino-4-chlorophenoxy)-1-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]ethan-1-one;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)glycinamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)glycinamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)glycinamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)glycinamide;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*R*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*S*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethyl-piperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(methylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethyl-piperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(methylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethyl-piperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(methylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethyl-piperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(methylamino)acetamide;

2-bromo-*N*-(5-chloro-2-{(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)acetamide;

2-bromo-*N*-(5-chloro-2-{(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)acetamide;

2-bromo-*N*-(5-chloro-2-{(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)acetamide;

2-bromo-*N*-(5-chloro-2-{(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(ureido)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(ureido)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(ureido)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(ureido)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(1-methylureido)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(1-methylureido)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(1-methylureido)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(1-methylureido)acetamide;

(2*RS*)-*N*-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-aminopropanamide;

(2*SR*)-*N*-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-aminopropanamide;

(2*RS*)-*N*-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-aminopropanamide;

(2*SR*)-*N*-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-aminopropanamide;

(2*RS*)-*N*-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-aminopropanamide;

(2*SR*)-*N*-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-aminopropanamide;

(2*RS*)-*N*-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-aminopropanamide;

(2*SR*)-*N*-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-aminopropanamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(2,4-difluorobenzoylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(2,4-difluorobenzoylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(2,4-difluorobenzoylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(2,4-difluorobenzoylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(methoxyacetylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(methoxyacetylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(methoxyacetylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(methoxyacetylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(2-iodobenzoylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(2-iodobenzoylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(2-iodobenzoylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(2-iodobenzoylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*R*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)glycinamide; and

N-(5-chloro-2-{2-[(2*S*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)glycinamide;

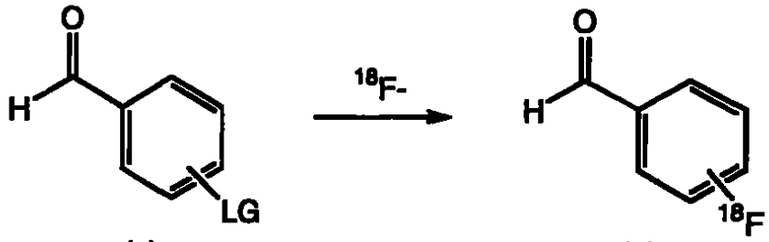
as well as the mono- and dichloride salts thereof.

Preparation of the Compounds of the Invention

A. Preparation of Compounds of Formula (I)

In general, the radioactive imaging agents of formula (I) of the present invention are prepared by reacting radioactive 4-halobenzyl derivatives with piperazine derivatives. Preferred are ^{18}*F*-labeled 4-fluorobenzyl derivatives for PET-imaging. A general method for the preparation of 4-fluoro-^{18}*F*-benzyl halides is described in Iwata *et al.*, *Applied Radiation and Isotopes* (2000), Vol. 52, pp. 87-92.

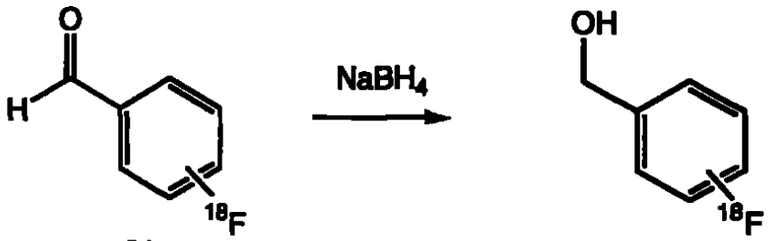
The ^{18}*F*-labeled 4-fluorobenzyl derivatives are prepared by reaction of a benzaldehyde compound of formula (a) with $^{18}F^-$ ions to obtain a benzaldehyde compound of formula (b):



(a) (b)

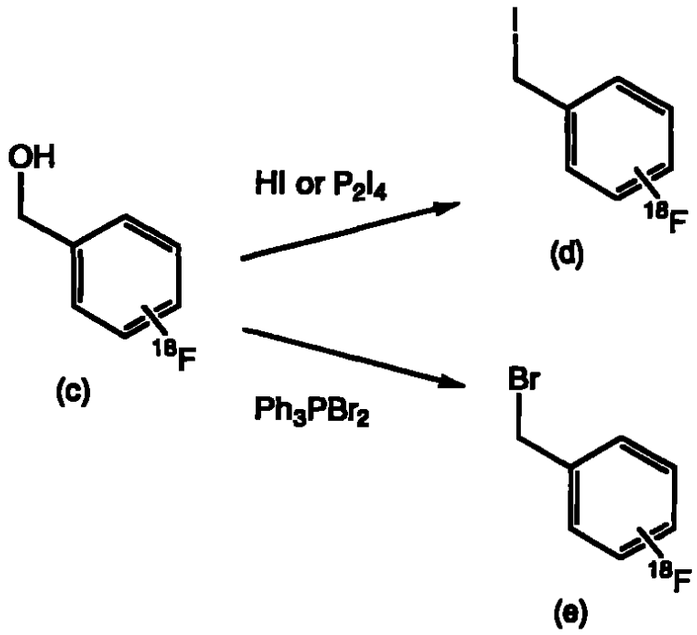
wherein LG is a leaving group, for example, bromo, chloro, iodo, nitro, or $N(R)_3^+ X^-$ (where R is alkyl and X is a halo ion, such as Br^-, Cl^-, or I^-; an ion of a alkanoic acid, such as an acetate ion ($CH_3C(O)O^-$); or an ion of an alkylsulfonic acid or haloalkylsulfonic acid, such as triflat ($CF_3SO_3^-$)). Preferably LG is triflat. Starting from the compound of formula (b), several synthetic pathways are possible in preparing the compounds of formula (I).

In a first synthetic pathway, a compound of formula (b) is reduced with $NaBH_4$ to obtain a compound of formula (c):



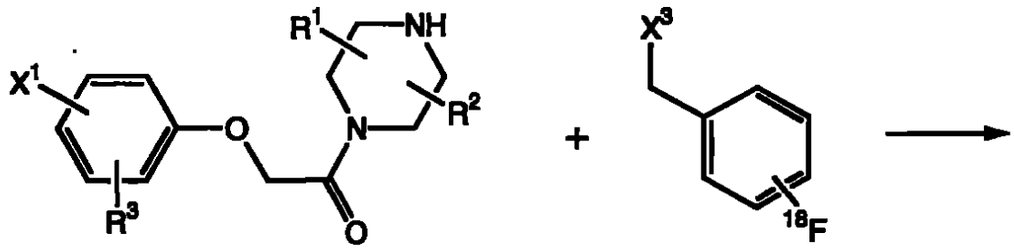
(b) (c)

The compound of formula (c) is then reacted with HI, P_2I_4 or Ph_3PBr_2 to obtain an iodo- or bromo-substituted compound of formulae (d) or (e):

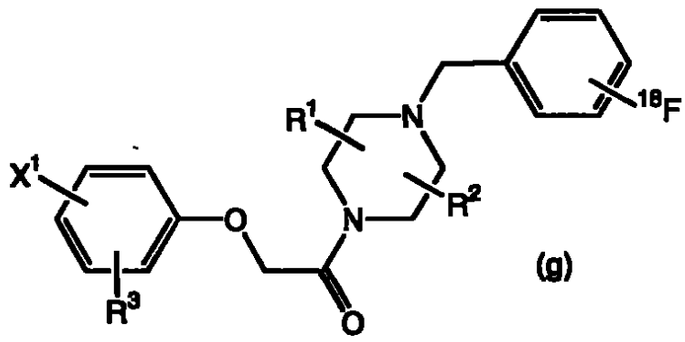


The compounds of formulae (d) and (e) can be obtained with a radiochemical yield of 50 to 60%. The radiochemical purity is greater than 95%. The specific activity of the compounds is 5 mCi per 1 nmol.

A compound of formulae (d) or (e) can then be reacted with a piperazine derivative (f) to obtain a compound of formula (g) (a compound of formula (I)):



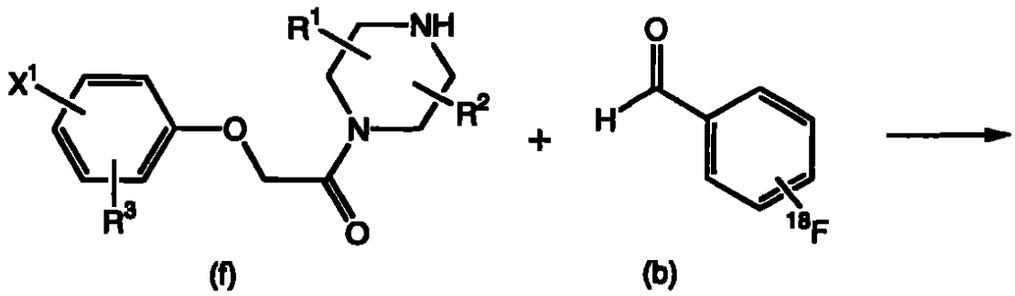
(f) (d) or (e)



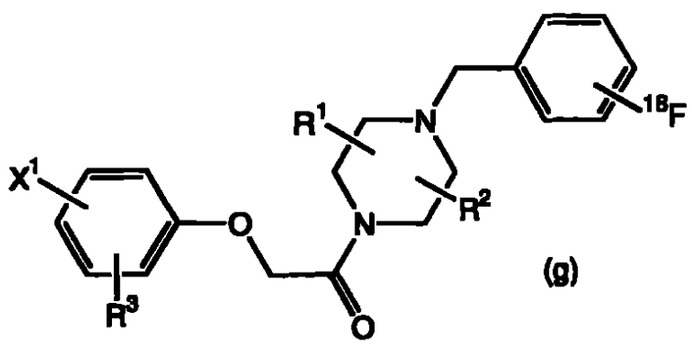
(g)

Compounds of formula (f) may be prepared according to methods known to those of ordinary skill in the art and is described in detail in PCT Published Patent Application, WO 98/56771.

In a second synthetic pathway, a compound of formula (b) is directly reacted with a compound of formula (f) using a reducing agent, for example, formic acid, ammonium formiate, $NaBH_4$, or $NaBH_3CN$, to obtain a compound of formula (g) (a compound of formula (I)):



(f) (b)

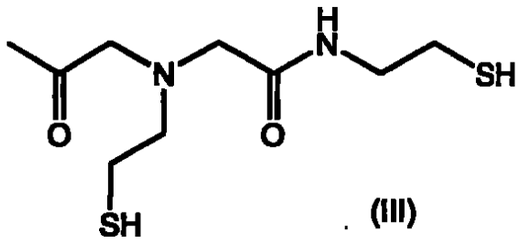


(g)

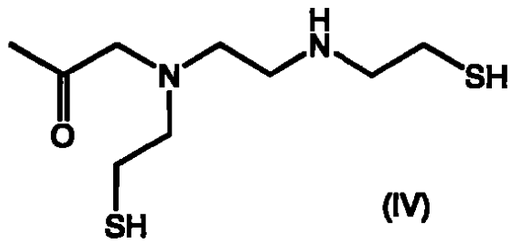
B. Preparation of Compounds of Formula (II)

For Single Photon Emission Computed Tomography ("SPECT"), ^{99m}Tc-labeled compounds are preferred. Those compounds are compounds of formula (II). A general synthetic pathway for these compounds starts with non-radioactive analogues of compounds of formula (II) that are reacted with ^{99m}Tc-binding chelators, e.g. N_2S_2-Chelators. Preparation of the non-radioactive analogs of the compounds of formula (II) is described in detail in PCT Published Patent Application, WO 98/56771. The synthesis of the chelators follows standard procedures, for example, the procedures described in A. Mahmood *et al.*, *A N_2S_2-Tetradentate Chelate for Solid-Phase Synthesis: Technetium, Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine* (1999), Vol. 5, p. 71, or in Z.P. Zhuang *et al.*, *Bioconjugate Chemistry* (1999), Vol. 10, p. 159.

Preferred chelators are chelators of formulae (III) or (IV):



(III)



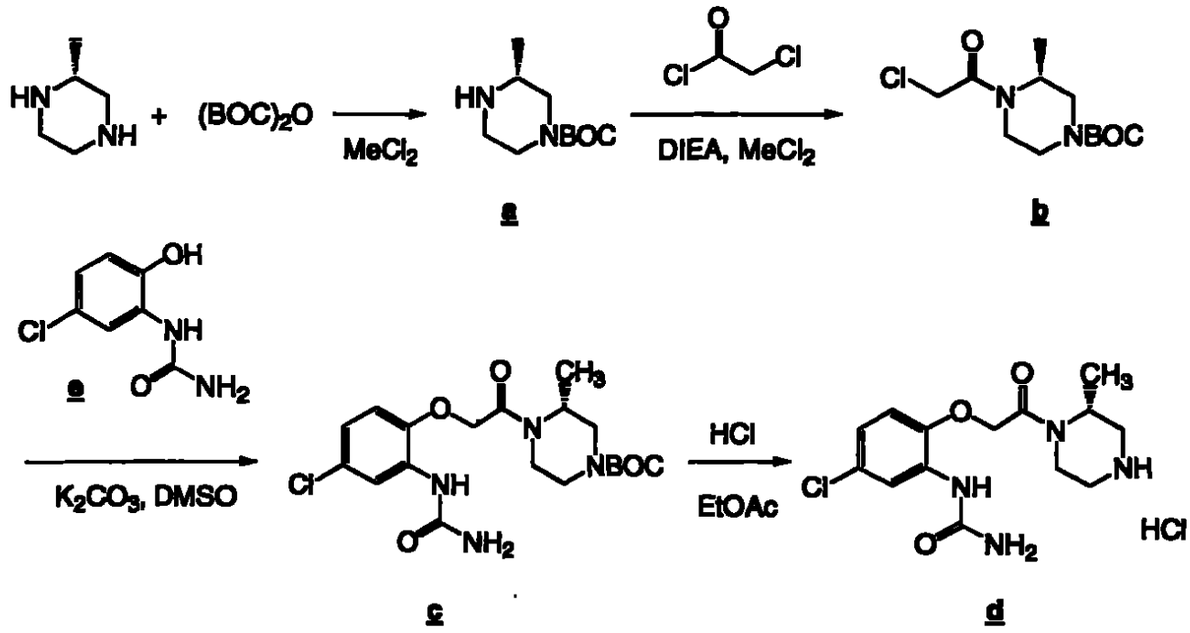
(IV)

One of the chelators is either bound directly to the nitrogen in the -N(R^4)R^5 group of the non-radioactive compound of formula (II), or via a linker moiety comprising an alkyl radical having one to ten carbon atoms, wherein the alkyl radical optionally contains one to ten -C(O)-groups, one to ten -C(O)N(R)- groups, one to ten -N(R)C(O)- groups, one to ten -N(R)- groups, one to ten -$N(R)_2$ groups, one to ten hydroxy groups, one to ten -C(O)OR- groups, one to ten oxygen atoms, one to ten sulfur atoms, one to ten nitrogen atoms, one to ten halogen atoms, one to ten aryl groups, and one to ten saturated or unsaturated heterocyclic rings wherein R is hydrogen or alkyl. A preferred linker moiety is -C(O)-CH_2-N(H)-.

The following specific examples are provided as a guide to assist in the practice of the invention, and are not intended as a limitation on the scope of the invention.

Example 1

Preparation of 1-(5-Chloro-2-[2-[(2*R*)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phenyl)urea



A. DIEA (19.10 mL, 110 mmol) was added to a solution of (*R*)-(-)-2-methylpiperazine (10 g, 100 mmol) in 250 mL of methylene chloride. The solution was cooled to -10°C. The BOC anhydride was dissolved in 250 mL of methylene chloride and this solution was added to the chilled piperazine solution over 1 hour. The reaction was allowed to warm to ambient temperature over 16 hours. The reaction mixture was filtered to remove the solids and the filtrate washed with 500 mL of water, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to an oil. The oil was purified by flash column chromatography to afford 11.0 g of the compound of formula (a).

B. The compound of formula (a) (11.0 g, 55 mmol) and DIEA (10.5 mL, 60.4 mmol) were dissolved in 100 mL of methylene chloride. The resulting solution was chilled to -10°C. Chloroacetyl chloride (4.37 mL, 55 mmol) was added dropwise to the solution maintaining the temperature at -10°C. After stirring for 1 hour the reaction mixture was washed with 100 mL of water, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to an oil. The oil was purified by flash column chromatography to afford 14.8 g of the compound of

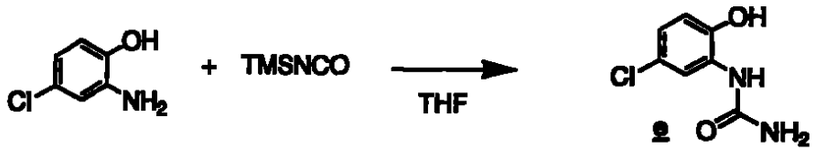
formula (b).

C. To a solution of the compound of formula (b) (14.8 g , 53.5 mmol) and the compound of formula (e) (9.98 g, 53.5 mmol) in 75 mL of DMSO was added potassium carbonate (18.48 g, 133.7 mmol). The resulting mixture was heated to 50°C for 3 hours. The mixture was cooled to 30°C and poured into 700 mL of water. The water was extracted three times with 200 mL of ethyl acetate. The ethyl acetate extracts were combined and washed with 200 mL of 1N KOH followed by brine. The organic layer was the dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to a foam. The foam was purified by flash column chromatography to afford 19.6 g of the compound of formula (c).

D. The compound of formula (c) (7.68 g, 18 mmol) was dissolved in 40 mL of ethyl acetate. The resulting solution was chilled in an ice bath and anhydrous HCl gas was bubbled through the solution for 5 minutes. The product precipitated while the mixture was allowed to sit at ambient temperature for 1 hour. The product was collected by filtration, washed on the filter with fresh ethyl acetate, and dried under vacuum at ambient temperature to constant weight to afford 5.9 g of 1-(5-chloro-2-[2-[(2*R*)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phenyl)urea, the compound of formula (d), as white solid; NMR (2 rotomers); (400 MHz, DMSO) 9.7 (m, 0.5H), 9.2 (m, 0.5H), 8.16 (s, 1H), 8.13 (s, 0.5H), 6.8 (s, 2H), 4.9 (m, 2H), 4.4 (m, 5H), 3.8 (bs, 0.5H), 3.4, (bs, 0.5H), 3.2, (m, 2.5H), 3.0 (m, 2 H) 1.2-1.4 (m, 3H) ppm.

Example 2

Preparation of the Compound of Formula (e)



To a solution of 2-amino-4-chlorophenol (10 g, 69.7 mmol) in 100 mL of anhydrous THF at ambient temperature was added trimethylsilyl isocyanate (18.8 mL, 139.4 mmol) in one portion. The solution was heated to 60°C and remained at this temperature for 22 hours at which time water (1.3 mL, 76.7 mmol) was added. After 30 minutes the solution was

cooled to ambient temperature and concentrated to a brown oil. This oil was dissolved in ethyl acetate, treated with activated carbon, dried over magnesium sulfate and filtered. The filtrate was concentrated to a pink solid which was crystallized from 10:1, toluene/methanol to give 5.4 g of the compound of formula (e) as tan powder.

Example 3

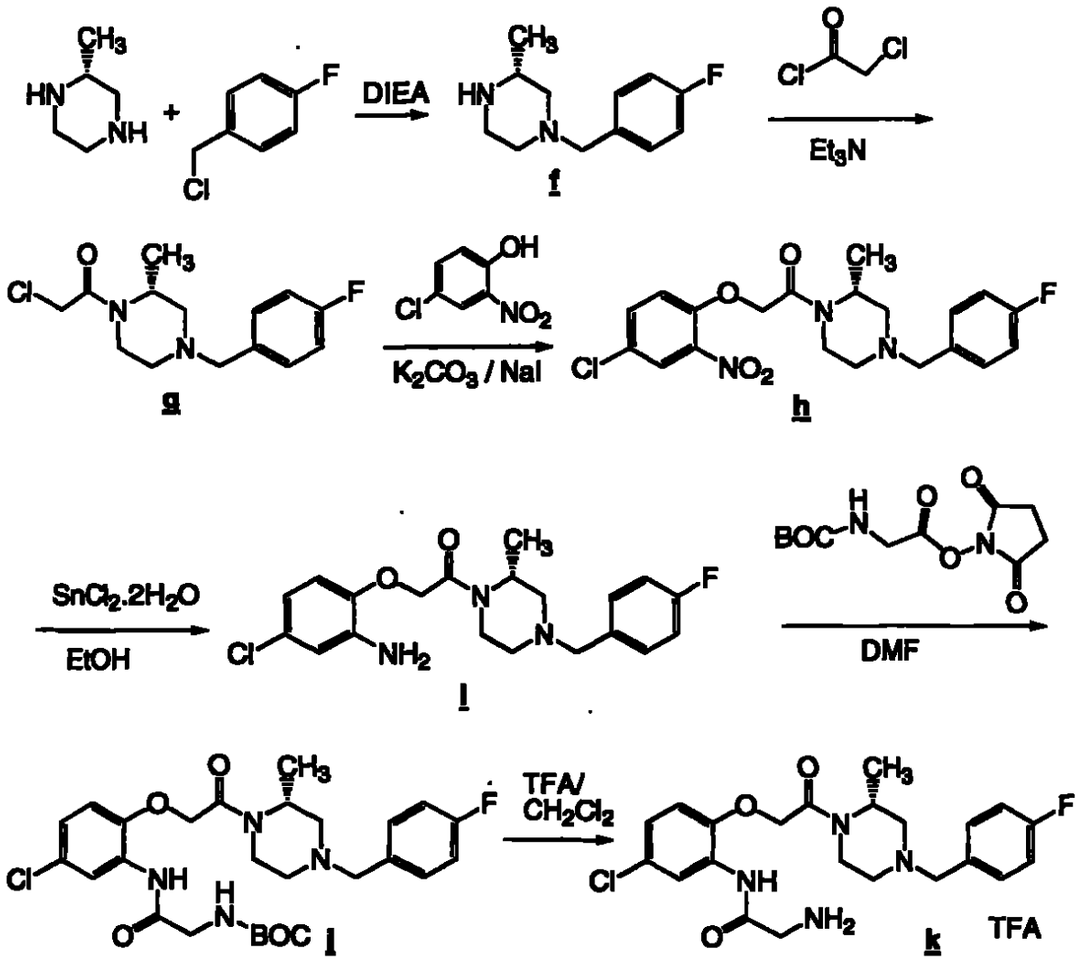
Preparation of 1-(5-Chloro-2-{2-[(2*R*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea

A. Hydrogen fluoride-^{18}*F* was prepared in a cyclotron by bombardment of H_2O-^{18}*O* with protons. The resulting hydrogen fluoride-^{18}*F* was adsorbed on an anion-exchange cartridge. The hydrogen fluoride-^{18}*F* was eluted with a solution of Kryptofix 222 (15 mg, 40 µmol) and K_2CO_3 (2.77 mg, 20 µmol) in aqueous acetonitrile (1.5 mL, 66%). The radioactive fractions were evaporated to dryness in a nitrogen gas stream. This procedure was repeated three times with dry acetonitrile (1 mL). After addition of a solution of 4-trimethylammonium-benzaldehyde-triflate (2 mg, 6.4 µmol) in dry DMF (250 µl) the resulting reaction mixture was heated for 5 minutes to 100°C. After cooling to ambient temperature a solution of 1-(5-chloro-2-{2-[(2*R*)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea, a compound of formula (d), (3 mg, 8.3 µmol) in 50 µl acetic acid and a solution of sodium-cyano-borhydride (4 mg, 63.7 µmol) in 100 µl dry DMF were added. The reaction mixture was heated to 120°C for 10 minutes. After addition of 5 mL of water the mixture was filtered over a polystyrol-cartridge. The adsorbed product was washed with 2 mL of water to afford the title compound, 1-(5-chloro-2-{2-[(2*R*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea, which was eluted with 1.5 mL acetonitrile and purified by HPLC.

B. In a similar manner, other compounds of formula (I) containing a ^{18}F atom are prepared.

Example 4

Preparation of *N*-(5-Chloro-2-{2-[(2*R*)-4-(4-fluorobenzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)glycinamide



A. To a solution of (*R*)-(-)-2-methylpiperazine (2.0 g, 20 mmol) in 20 mL CH_2Cl_2 was added DIEA (5.2 g, 40 mmol) and 4-fluorobenzyl chloride (2.39 mL, 20 mmol). The resulting mixture was stirred at ambient temperature for 15 hours. After the reaction was completed, the reaction mixture was washed with water (3X20 mL) and brine, then dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated in vacuo to afford the compound of formula (f) (2.2 g) as a white solid.

B. To a solution of the compound of formula (f) (2.2 g, 10 mmol) in 50 mL CH_2Cl_2 was added chloroacetyl chloride (0.84 mL, 10 mmol). The resulting mixture was stirred at ambient temperature for 10 minutes and then triethylamine (3 mL, 21 mmol) was added. After 30 minutes, the mixture was washed with water (3x20mL) and brine, then dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated in vacuo to afford an oil. Purification by flash column chromatography afforded the compound of formula (g) (2.5 g).

C. To a solution of the compound of formula (g) (2.4 g, 8.4 mmol) in 50 mL DMF was added K_2CO_3 (2.5 g, 17 mmol), NaI (0.2 g) and 4-chloro-2-nitrophenol (1.3 g, 8.4 mmol). The resulting mixture was heated at 70-80°C. After 1 hour, the mixture was concentrated in vacuo, then taken up in ethyl acetate (150 mL) and washed with water (3X100mL)and then brine. The organic layer was separated, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated in vacuo to afford an oil. Purification by flash column chromatography afforded the compound of formula (h) (3.1 g).

D. To a solution of the compound of formula (h) (1.1 g, 2.6 mmol) in 10 mL ethanol was added a solution of tin(II) chloride dihydrate (3.0 g, 13 mmol) in 5 mL ethanol. The resulting mixture was heated at 75°C. After 1 hour, the reaction was concentrated in vacuo, then taken in ethyl acetate (100 mL), washed with 1N NaOH solution in water (3X100mL) and brine. The organic layer was separated, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated in vacuo to afford an oil. Purification by flash column chromatography afforded the compound of formula (i) (0.75g).

E. To a solution of the compound of formula (i) (0.7 g, 1.78 mmol) in 10 mL DMF was added BOC-Gly-OSU (0.58 g, 2.13 mmol). The resulting mixture was heated at 50-60°C. After 24 hours, the mixture was concentrated in vacuo, then taken up in ethyl acetate (150 mL) and washed with water (3X100mL) and then brine. The organic layer was separated, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated in vacuo to afford an oil. Purification by flash column chromatography afforded the compound of formula (j) (0.7 g).

F. To a solution of the compound of formula (j) (0.6 g, 1.1 mmol) in 10 mL CH_2Cl_2 was added TFA (5 mL). The resulting mixture was heated at ambient temperature. After the reaction was completed in 1 hour, the reaction was concentrated in vacuo, then taken up in ethyl acetate (100 mL), washed with 1N NaOH solution in water (2X100mL) and brine. The

organic layer was separated, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated in vacuo to afford an oil. Purification by flash column chromatography afforded *N*-(5-chloro-2-{2-[(2*R*)-4-(4-fluorobenzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)glycinamide, the compound of formula (k), (0.45 g) as a white solid; NMR ($CDCl_3$) 10.2 (s, 1), 8.5 (s, 1), 7.3 (m, 2), 7.0 (m, 3), 6.8 (d, 1), 4.7 (m, 2), 3.4-3.6 (m, 5), 3.0 (m, 1), 2.8 (m,1), 2.6 (d, 1), 2.2 (m, 1), 2.0 (m, 2), 1.2-1.4 (m, 3) ppm.

Example 5

***N'*-(mercaptoeth-1-yl)-*N'*-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-[5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycylglycinamide, Technetium-99m-complex**

A. To a stirred solution of *N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycinamide (175.5 mg, 0.4 mmol) (the compound of formula (k) as prepared above in Example 4), *N*-(*S*-trityl-2-mercaptoeth-1-yl)-*N*-(*S*-trityl-5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)glycine (291.4 mg, 0.4 mmol) (which can be synthesized according to A. Mahmood *et al.*, *A N_2S_2-Tetradentate Chelate for Solid-Phase Synthesis: Technetium, Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine* (1999), Vol. 71), and *N*-hydroxysuccinimide (45.5 mg, 0.4 mmol) in 5 mL dichloromethane was added dropwise a solution of dicyclohexylcarbodiimide (81.4 mg, 0.4 mmol) in 3 mL dichloromethane. The resulting suspension was stirred over night at ambient temperature. After filtration, the resulting solution was evaporated under reduced pressure. The desired product, *N*-(*S*-trityl-2-sulfanyleth-1-yl)-*N*-(*S*-trityl-5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycylglycinamide (340 mg, 72.8%) was isolated after silica gel chromatography (eluent: dichloromethane/methanol, 98:2) as a white powder.

Elemental Analysis:

Calc.:	C 69.93	H 5.87	N 7.20	O 6.85	S 5.49
Found:	C 69.69	H 6.05	N 7.01	O	S 5.32

B. *N*-(*S*-Trityl-2-sulfanyleth-1-yl)-*N*-(*S*-trityl-5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-

yl]glycylglycinamide (116.8 mg, 0.1 mmol), as prepared above, was dissolved in 5 mL trifluoroacetic acid. After addition of triethyl silane (48 µl, 0.3 mmol) the resulting suspension was stirred for 15 minutes at ambient temperature. The filtrate was evaporated under reduced pressure and the residue was triturated with 7 mL diethyl ether. The precipitate was stirred for 1 hour at ambient temperature and filtered off, yielding the desired product, *N*-(mercaptoeth-1-yl)-*N*'-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycylglycinamide, bis-trifluoracetic acid salt (87 mg, 95.5%), as a white solid.

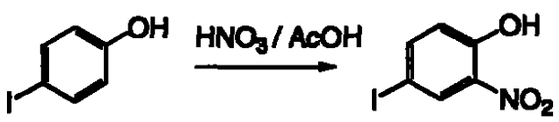
Elemental Analysis:

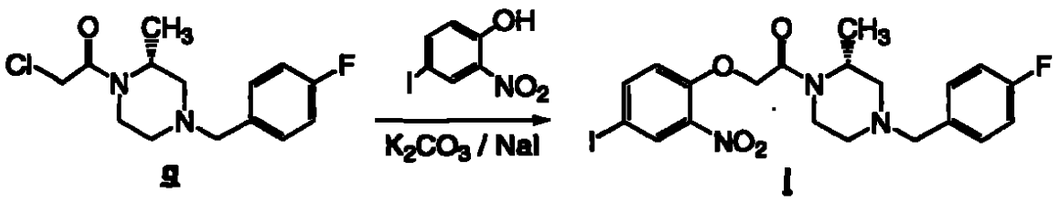
Calc.:	C 44.81	H 4.65	N 9.22	O 15.80	S 7.04
Found:	C 44.54	H 4.91	N 8.99	O	S 6.80

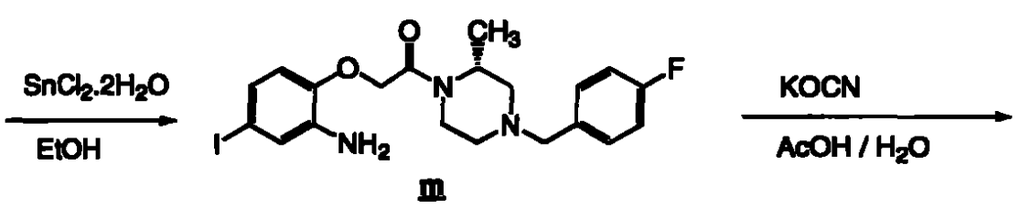
C. Disodium tartrate (1 mg) and *N*-(mercaptoeth-1-yl)-*N*'-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycylglycinamide, bis-trifluoracetic acid salt (100 µg), as prepared above, were dissolved in 500 µl sodium phosphate buffer (0.1M, pH=8.5). After addition of 37MBq ^{99m}Tc-generator eluate, 5 µl tin-(II) chloride solution was added and the mixture was heated for 10 min to 100°C. HPLC analysis showed a major peak indicating that the desired product, *N*-(mercaptoeth-1-yl)-*N*'-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycylglycinamide, Technetium-99m-complex, was synthesized with a RCP > 90%.

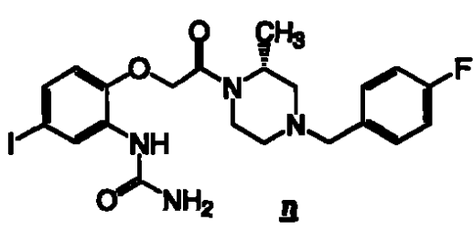
Example 6

Preparation of 1-{2-[2-[(2*R*)-4-(4-Fluorobenzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]-5-iodophenyl)urea

1. 

2. 





A. To a solution of *p*-iodophenol (2.2 g, 10 mmol) in 18 mL acetic acid was added a solution of HNO_3 (0.7 mL, 70%) in 5 mL acetic acid dropwise over 10 minutes. The resulting mixture was stirred at ambient temperature. After 30 minutes, the reaction mixture was diluted by 100 mL ice-water. The precipitate was collected, washed with 100 mL water. Purification by flash column chromatography afforded 1.2 g of 2-nitro-4-iodophenol.

B. To a solution of the compound of formula (g) (0.3 g, 1.05 mmol) (as prepared herein) in 10 mL DMF was added K_2CO_3 (0.45 g, 3.2 mmol), NaI (0.01 g) and 2-nitro-4-

Iodophenol (0.28 g, 1.05 mmol). The resulting mixture was heated at 70-80°C. After 1 hour, the mixture was concentrated in vacuo, then taken up in ethyl acetate (150 mL) and washed with water (3X100mL)and then brine. The organic layer was separated, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated in vacuo to afford an oil. Purification by flash column chromatography afforded 0.28 of the compound of formula (l).

C. To a solution of the compound of formula (l) (0.28 g, 0.55 mmol) in 5 mL ethanol was added a solution of Tin(II) chloride dihydrate (0.616 g, 2.73 mmol) in 5 mL ethanol. The resulting mixture was heated at 75°C. After 1 hour, the reaction was concentrated in vacuo, then taken up in ethyl acetate (100 mL), washed with 1N NaOH solution in water (3X100mL) and brine. The organic layer was separated, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated in vacuo to afford an oil. Purification by flash column chromatography afforded the compound of formula (m) (0.25g).

D. To a solution of the compound of formula (m) (0.25 g, 0.52 mmol) in 3 mL AcOH was added water (6 mL). The resulting mixture was stirred at ambient temperature for 10 minutes, then a solution of KOCN (0.085 g, 1.0 mmol) in 1 mL water was added dropwise. The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 10 minutes, then heated at 55°C for 5 minutes. After the reaction was completed, the reaction mixture was concentrated in vacuo, then taken up in CH_2Cl_2 (50 mL), washed with 2N NaOH solution in water (2x100mL) and brine. The organic layer was separated, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated in vacuo to afford an oil. Purification by flash column chromatography afforded the compound of formula (n) (0.16 g) as a white solid; NMR ($CDCl_3$) 9.0 (s, 1), 8.6 (s, 1), 7.3 (m, 2), 7.0 (t, 3), 6.6 (d, 1), 4.9 (s, 2), 4.7 (m, 2), 4.4 (m, 1), 3.4-3.6 (m, 3), 3.0 (m, 1) 2.8 (m,1), 2.6 (d, 1), 2.2 (m, 1), 2.0 (m, 1), 1.2-1.4 (m, 3) ppm.

Example 7

Preparation of 1-(2-{2-[(2*R*)-4-(4-Fluorobenzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}-5-Iodo-^{123}*I*-phenyl)urea

A. To a solution of the compound of formula (n) (1 mg), as prepared above, and 10 µg copper-(II)-sulfate in 300 µl DMF was added 1 mCi sodium iodine[^{123}I] solution. The resulting reaction mixture was heated over night to 100°C. After adding of 1 mL half-

saturated aqueous $NaHCO_3$ solution the product was extracted with 2 mL CH_2Cl_2. The organic layer was evaporated to dryness in a nitrogen gas stream. The desired product, 1-(2-{2-[(2*R*)-4-(4-fluorobenzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}-5-iodo-^{123}*I*-phenyl)urea, was purified using a RP-cartridge [eluant: EtOH/water (2:1)].

B. In a similar manner as described above, other compounds of formula (I) are prepared.

Example 8

***N'*-(2-Mercaptoeth-1-yl)-*N'*-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-[5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl]glycinamide, Technetium-99m-complex**

A. To a stirred solution of 156.7 mg (0.4 mmol) 5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]aniline (compound of formula (j)) (291.4 mg, 0.4 mmol), *N*-(*S*-trityl-2-mercaptoeth-1-yl)-*N*-(*S*-trityl-5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)glycine (synthesized according to A. Mahmood *et al.*, *A N_2S_2-Tetradentate Chelate for Solid-Phase Synthesis: Technetium, Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine* (1999), Vol. 5, p. 71) and *N*-hydroxysuccinimide (45.5 mg, 0.4 mmol) in 5 mL dichloromethane was added dropwise a solution of dicyclohexylcarbodiimide (81.4 mg, 0.4 mmol) in 3 mL dichloromethane. The resulting suspension was stirred over night at ambient temperature. After filtration, the resulting solution was evaporated under reduced pressure. The desired product, *N'*-(*S*-trityl-2-mercaptoeth-1-yl)-*N'*-(*S*-trityl-5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-[5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl]glycinamide (352 mg, 79.2%), was isolated after silica gel chromatography (eluent: dichloromethane/methanol, 98:2) as a white powder.

Elemental Analysis:

Calc.:	C 71.36	H 5.90	N 6.30	O 5.76	S 5.77
Found:	C 71.08	H 6.13	N 6.05	O	S 5.52

B. *N'*-(*S*-trityl-2-mercaptoeth-1-yl)-*N'*-(*S*-trityl-5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-[5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl]glycinamide (111.1 mg, 0.1 mmol) was dissolved in 5 mL trifluoroacetic acid. After addition

of 48 µl (0.3 mmol) triethyl silane the resulting suspension was stirred for 15 min at ambient temperature. The filtrate was evaporated under reduced pressure and the residue was triturated with 7 mL diethyl ether. The precipitate was stirred for 1 hour at ambient temperature and filtered off, yielding the desired product, *N'*-(2-mercaptoeth-1-yl)-*N*-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycinamide, bis-trifluoracetic acid salt (75 mg, 87.8%) as a white solid.

Elemental Analysis:

Calc.:	C 44.99	H 4.60	N 8.20	O 14.98	S 7.51
Found:	C 44.71	H 4.89	N 8.03	O	S 7.22

C. Disodium tartrate (1 mg) disodium tartrate and *N'*-(2-mercaptoeth-1-yl)-*N*-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycinamide, bis-trifluoracetic acid salt (100 µg) were dissolved in 500 µl sodium phosphate buffer (0.1M, pH=8.5). After addition of 37.5MBq ^{99m}Tc-generator eluate, 5 µl tin-(II) chloride solution was added and the mixture was heated for 10 minutes to 100°C. HPLC-analysis showed a major peak indicating that the desired product, *N'*-(2-mercaptoeth-1-yl)-*N'*-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycinamide, technetium-99m-complex was synthesized with a RCP > 91%.

Example 9

_N'_-(2-Mercaptoeth-1-yl)-_N'_-(5-mercapto-3-azapent-1-yl)-_N_-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2_R_)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycinamide, Technetium-99m-complex

A. To a stirred solution of 5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]aniline (156.7 mg, 0.4 mmol) and triethylamine (40.5 mg, 0.4 mmol) in 5 mL dichloromethane was added dropwise a solution of α-bromoacetyl chloride (63 mg, 0.4 mmol) in 3 mL dichloromethane. The resulting solution was stirred over night at ambient temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure. The desired product, *N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}-2-

bromoacetamide (175 mg, 85.3 %), was isolated after silica gel chromatography (eluent: dichloromethane/methanol, 99:1) as a white powder.

Elemental Analysis:

Calc.:	C 51.53	H 4.72	N 8.19	O 5.76
Found:	C 51.28	H 4.99	N 7.92	O

B. A stirred solution of *N*-[5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl]-2-bromoacetamide (165 mg, 0.42 mmol) and *N,N*-bis-(*S*-(4-methoxybenzyl)-2-mercaptoeth-1-yl)ethylenediamine (841.3 mg, 2 mmol) (synthesized according to Z.P. Zhuang et al., *Bioconjugate Chem.* (1999), Vol. 10, p. 159) in 1,4-dioxane (5 mL) was heated under reflux for 24 hours. The resulting reaction mixture was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in 15 mL dichloromethane and washed with saturated aqueous sodium carbonate solution. After drying over $MgSO_4$ the solvent was evaporated under reduced pressure. The desired product, *N*-(*S*-(4-methoxybenzyl)-2-mercaptoeth-1-yl)-*N*-(*S*-(4'-methoxybenzyl)-5-mercapto-3-azapent-1-yl)-*N*-[5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl]glycinamide (154 mg, 43%), was isolated after silica gel chromatography (eluent: dichloromethane/methanol, 9:1) as a white powder.

Elemental Analysis:

Calc.:	C 61.99	H 6.50	N 8.22	O 9.38	S 7.52
Found:	C 61.71	H 6.58	N 8.03	O	S 7.28

C. *N*-(*S*-(4-methoxybenzyl)-2-mercaptoeth-1-yl)-*N*-(*S*-(4'-methoxybenzyl)-5-mercapto-3-azapent-1-yl)-*N*-[5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl]glycinamide (140 mg, 0.164 mmol) was dissolved at 0°C in 5 mL trifluoroacetic acid. After addition of $Hg(OAc)_2$ (104.5 mg, 0.328 mmol) the resulting mixture was stirred for 30 minutes at 0°C and saturated for 15 min with H_2S. After filtration the solvent was evaporated under reduced pressure. The resulting yellow oil was triturated with 3 mL diethyl ether. The desired product, *N*'-(2-mercaptoeth-1-yl)-*N*'-(5-mercapto-3-azapent-1-yl)-*N*-[5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl]glycinamide, tris-trifluoracetic acid salt (126 mg (80.5%), was isolated after filtration as a white powder.

Elemental Analysis:

Calc.:	C 42.79	H 4.44	N 7.34	O 15.09	S 6.72
Found:	C 42.48	H 4.73	N 7.02	O	S 6.76

D. Disodium tartrate (1 mg) and *N'*-(2-mercaptoeth-1-yl)-*N'*-(5-mercapto-3-azapent-1-yl)-*N*-[5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl]glycinamide, tris-trifluoracetic acid salt (100 µg) were dissolved in 500 µl sodium phosphate buffer (0.1M, pH=8.5). After addition of 37.5MBq ^{99m}Tc-generator eluate, 5 µl tin-(II) chloride solution was added and the mixture was heated for 10 minutes to 100°C. HPLC-analysis showed a major peak indicating that the desired product, *N'*-(2-mercaptoeth-1-yl)-*N'*-(5-mercapto-3-azapent-1-yl)-*N*-[5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl]glycinamide, Technetium-99m-complex, was synthesized with a RCP > 95%.

Example 10

Immunohistochemical Localization of CCR1 in Human Brains

Materials and Methods

A first group of tissue samples from brains that had been obtained at autopsy within 12 hours of death was used for immunohistochemical staining of the chemokine receptor CCR1 in Alzheimer's disease and control brains. Paraffin-embedded, 5-µm-thick, unstained sections from frontal cortex and hippocampus were used for all immunohistochemical and histochemical stains.

Slides were de-paraffinized in xylene and hydrated to phosphate-buffered saline containing 0.005% Triton X100 (PBS-T). For light microscopy (using DAB as chromogen) endogenous peroxidase activity was blocked by incubating the slides with 0.01% H_2O_2 in methanol for 30 minutes. Non-specific binding was reduced by blocking in 10% normal goat serum (NGS) in PBS for 30 minutes. The primary antibodies [Rabbit anti-CCR1, (N-terminal peptide); Mouse anti-Neurofilament; mouse anti-GFAP; mouse anti-Tau (AT8); mouse anti-CD68 (clone KP1); mouse anti-β-amyloid (Boehringer Mannheim, #1 381 431); Rabbit anti-CCR8, (N-terminal peptide)] were diluted in PBS-T and slides were incubated overnight at room temperature. Staining was completed using a Biogenex ABC™ kit. All

washes used PBS-T. After the DAB reaction was completed, slides were lightly counterstained with Gill's Hematoxylin, dehydrated and coverslipped with Permount. Before coverslipping, some slides were re-stained with antibodies against Aβ peptide using identical methods except that the chromogen was True Blue™. For immunofluorescent double-labeling studies the slides were de-paraffinized, blocked with 10% NGS, and incubated with a cocktail of both primary antibodies overnight. The slides were washed with PBS-T and then incubated with a cocktail of goat secondary antibodies, each at 1/50 dilution. To avoid confusion from endogenous (yellow-green) tissue fluorescence, the secondary antibodies were conjugated to either Cy3 (ε_{max} = 565 nm; goat-anti-mouse, Amersham) or Cy5 (ε_{max}=700 nm; goat-anti-rabbit, Amersham). Slides were viewed on a confocal microscope with a krypton-argon laser (model 2010, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Subsequently, a second group of brain tissues composed of 10 cases from cognitively normal elderly and 40 cases from Alzheimer's disease patients who had been assessed for clinical dementia rating (CDR) were obtained and evaluated for immunohistochemical expression of CCR1. The samples were stained for CCR1 and other markers as described above except that monoclonal antibodies (clone #6D5) specific for $A\beta^{1-42}$ (a marker for diffuse, early amyloid deposits as well as for more mature neuritic plaques) were obtained from Dr. Ursula Moenning. These antibodies were visualized with Vector Red™ (Vector Labs). Dr Moenning also provided monoclonal antibodies specific for $A\beta^{1-40}$ (clone #13E9), a marker for plaques found in late-stage disease, that was visualized with True Blue™.

Results

In both sets of brains, areas with Alzheimer's disease pathology showed a characteristic staining pattern. CCR1 immunoreactivity was found in association with neuritic (*i.e.*, senile) plaques in both the hippocampal formation and the cerebral cortex. The immunostained structures were round to ovoid and were not usually associated with cell bodies. They varied in size and appeared to be filled with a punctate granular material. These structures were found to form "coronas" around the amyloid deposits in

senile plaques, but were distinct from the Aβ itself (Figures 1-4). The top panel in Figure 1 shows a neuritic plaque with a corona of CCR1-positive processes. Neuronal cell bodies of some CA1 and CA3 neurons in Alzheimer's disease cases were sometimes stained by CCR1 antibodies. The bottom panel in Figure 1 illustrates this finding. This staining was distinct from neurofibrillary tangles (NFT) or granulovacuolar bodies, although it was comm nly present in the somata of neurons with these degenerative changes.

Pre-incubation of antibodies with a 16-mer polypeptide from the extracellular (*N*-terminus) region of the CCR1 receptor protein completely blocked all tissue staining, as illustrated in Figure 2. In particular, the top image in Figure 2 shows a lack of staining in Alzheimer's disease brain with CCR1 antibodies that were pre-incubated with the polypeptide while the bottom image in Figure 2 shows many CCR1-positive structures in a sister section stained with un-incubated antibodies.

Double-labeling studies showed that nearly all CCR1-positive structures were associated with neuritic plaques containing $A\beta^{1-42}$ as shown in Figure 4. $A\beta^{1-42}$ in diffuse plaques (Figure 5) was not typically associated with CCR1 nor with any significant cellular responses. In more advanced cases of Alzheimer's disease, many more $A\beta^{1-40}$-positive plaques were seen. Some, but not all of these were associated with CCR1 staining as shown in Figure 3. In some cases CCR1-positive plaques were completely free of $A\beta^{1-40}$ staining.

In cases of severe Alzheimer's disease where significant neuronal loss and gliosis were seen, reactive astrocytes in the subiculum and entorhinal cortex were also CCR1 positive. In less severe cases, CCR1-positive reactive astrocytes were uncommon.

Confocal microscopy of double-labeled sections showed that CCR1 immunoreactivity co-localized with neurofilament-positive processes. The macrophage/microglial marker, CD68, was not associated with CCR1 staining, nor was the AT8 antibody against abnormally phosphorylated tau protein. As expected from light microscopic studies, CCR1 immunoreactivity did co-localize with GFAP in areas of astrogliosis.

Leukocytes present within cerebral vessels were strongly CCR1 positive in both Alzheimer's disease and control brain tissues, serving as positive internal controls for staining methods. In Figure 5 note the CCR1-positive staining of two intravascular cells

(arrows). Some CCR1-positive material is also seen at asterisk, but in general, diffuse plaques are not associated with CCR1.

Using hippocampal tissue from the second study (where patients were grouped into known clinical categories by CDR score), a quantitative evaluation of the number of CCR1-positive plaque-like structures in the hippocampus was undertaken. Histologic evaluations of individual sections were performed under blinded conditions with respect to clinical (CDR) status. The volume analyses were conducted using unbiased computerized methods.

Figure 3 demonstrates the histologic relationship between CCR1-positive dystrophic neurites (brown stain) and a neuritic plaque containing $A\beta^{1-40}$ (blue stain). Note in that in Figure 3 the CCR1-positive processes are distinct from the amyloid. Plaques containing $A\beta^{1-40}$ were discrete and easily counted, as were the clusters of CCR1-positive neurites. Slides of hippocampus were evaluated for the number of CCR1-positive coronas, the number of $A\beta^{1-40}$ positive plaques, and the number of plaques containing both markers. The structures were counted by region (*e.g.*, CA3, CA1, and subiculum) within the entire hippocampal formation, including entorhinal cortex and then totaled. The values are relative estimates of the number of structures in the hippocampus as represented by 5-µm thick cross-sections of the hippocampal formation. Figure 6 shows the relationship between CCR1 and $A\beta^{1-40}$ by CDR score.

Quantification of the amount of $A\beta^{1-42}$ required a different technique because $A\beta^{1-42}$ was more abundant and formed "diffuse" plaques that could not be easily enumerated (see Figure 5). For these slides a computer-assisted method (C.A.S.T. stereology system) was used to estimate the area of entorhinal cortex occupied by $A\beta^{1-42}$. This area was expressed as a percent of the total area of cortex on the slide. The areas occupied by neuritic and diffuse plaques were counted separately. The computer-driven microscope stage assured random (unbiased) evaluation of the tissue sections. The volume % of entorhinal cortex occupied by $A\beta^{1-42}$ (both diffuse and neuritic) is compared to the number of CCR1-positive plaques in a sister section of entorhinal cortex in Figure 7.

Figure 6 shows that the average number of CCR1-positive dystrophic neurites in the hippocampus increases as a function of CDR score in Alzheimer's disease. The number

of positive structures in early Alzheimer's disease (CDR 0.5) is increased above control (CDR 0) levels. Although the differences between control and Alzheimer's disease groups did not become statistically significant until group CDR 2, these expression patterns support the conclusion that CCR1 is upregulated in dystrophic neuronal processes even at very early stages of Alzheimer's disease. Note that the number of $A\beta^{1-40}$ plaques do not rise until late in the disease. CCR1 expression in brain tissue may thus be considered a relatively early indicator of Alzheimer's disease.

The correlation between number of CCR1-positive plaques in entorhinal cortex and the amount of $A\beta^{1-42}$ is shown in Figure 7. In general, CCR1 levels in entorhinal cortex rise as the disease state increases; however, the area sampled is much smaller than the area sampled in Figure 6. Note, however, that $A\beta^{1-42}$ levels rise early in the disease.

Example 11

Assessment of brain availability, using a ^{14}C-labeled tracer

A ^{14}C analogue of 1-(5-chloro-2-{2-[(2*R*)-4-(4-fluorobenzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea was prepared and used for pharmacokinetic studies of brain availability. Mice were injected I.v. through cannulated jugular veins with the analogue at 36 mg/kg containing 334,000 dpm per dose. Mice (in groups of four) were sacrificed at 1, 15, 30, 120, and 1440 minutes after injection by CO_2 inhalation followed by intra-cardiac puncture for removal of whole blood. The chest was then opened and mice were perfused through the heart with phosphate buffered saline for five minutes to remove residual radioactive drug from the blood compartment. The brains were then removed, weighed, and sampled for amount of radioactivity in two separate pieces of cerebral cortex. The radioactivity levels per mg of tissue in the two samples were averaged and the data were normalized to total brain weight, as illustrated in Figure 8. The bars represent the standard error (n=4 mice per time point). In particular, the graph in Figure 8 shows that the total number of disintegrations per minute (DPM) for ^{14}C analogue in whole mouse brain decreases to negligible levels by two hours after injection. At the 1-minute time point, calculations show that, on average, about 3% of the injected dose is found in whole mouse brain (average weight of 450 g).

Plasma samples prepared from the whole blood removed from the mice were also analyzed for radioactive content. The amount of radioactivity in equal volumes of brain and plasma was compared over time as a percent of injected dose, as illustrated in Figure 9. The % of injected dose (i.d.) found per mL of plasma also declines over time, reaching negligible levels after two hours. For comparison to brain levels, the total number of DPM per brain were normalized to a gram of brain weight and expressed as a percentage of the i.d. per gram of brain tissue. Note that mouse brains weigh on average about 450 mg so that the % of i.d. in 1 g of mouse brain shown in the graph overestimates the real value by about two-fold. It is clear that the levels of the analogue in the brain fall in concert with plasma levels. Although the analogue is lipophilic, normal mouse brain does not appear to be a depot site for the CCR1 antagonist.

Example 12

CCR1 Expression in Other Neurodegenerative Diseases

Materials and Methods

Histologic samples of autopsy brain tissue from a total of 29 cases from seven different neurodegenerative diseases (other than pure Alzheimer's disease) were obtained and studied for CCR1 content. Slides were immunostained with antibodies against CCR1 as described in Example 10 above and reviewed under blinded conditions with respect to the specific neurodegenerative disease. Subsequently, sister sections were double-labeled with antibodies against CCR1 (DAB as chromogen) and $A\beta^{1-42}$ (Vector Red™ as chromogen). The diseases examined are listed below:

Parkinson's disease (PD)	6 cases
Parkinsonian dementia of Guam	3 cases
Congophilic angiopathy	4 cases
Multi-infarct dementia (MID)	4 cases
Diffuse Lewy body dementia (DLBD)	4 cases
Pick's disease	4 cases
Progressive supranuclear palsy (PSP)	4 cases

The stained slides were graded for CCR1 and $A\beta^{1-42}$ content using a histologic scale

of 0 to 4, with 0 being absence of staining, 0.5 indicating rare expression, and grades 1 through 4 indicating increasing levels of expression with 4 being highly abundant.

Results

All six cases of Parkinson's disease and all three cases of Parkinsonian dementia of Guam were negative for CCR1. CCR1-positive plaque-like structures, similar to those found in Alzheimer's disease, were observed in all 4 cases of congophilic angiopathy, in 3 of the 4 cases of DLBD, in 2 out of the 4 cases of PSP, and in 1 out of the 4 cases of both MID and Pick's disease.

Double-labeling studies confirmed the assumption that these CCR1-positive plaque-like structures were associated with $A\beta^{1-42}$, as was found in pure cases of Alzheimer's disease (Example 10). Figure 10 shows the results of the pathological evaluations in graphic form for all the diseases except for Parkinson's (which was negative for CCR1 in brain). Basically, CCR1 expression was never found in brain tissue samples unless $A\beta^{1-42}$-positive neuritic plaques were also present.

After the code was broken, it was found that the one case of Pick's disease showing CCR1 expression also carried the diagnosis of Alzheimer's disease. The two PSP cases with CCR1 were also diagnosed with concurrent Alzheimer's disease. Congophilic angiopathy and DLBD are diseases that are closely associated with Alzheimer's disease pathology. Therefore, it is not surprising that they would also have high levels of CCR1 expression in association with $A\beta^{1-42}$. In elderly populations it is often the case that Alzheimer's disease pathology will overlay other disease processes. This was found in one of the four MID cases. These results suggests that CCR1 is a marker that is closely associated with Alzheimer's disease pathology (specifically, $A\beta^{1-42}$-positive neuritic plaques) regardless of other concurrent pathological processes that may be present in brain. As such, it is likely to be highly specific for Alzheimer's disease pathology and therefore may be useful as a diagnostic surrogate marker of disease progression.

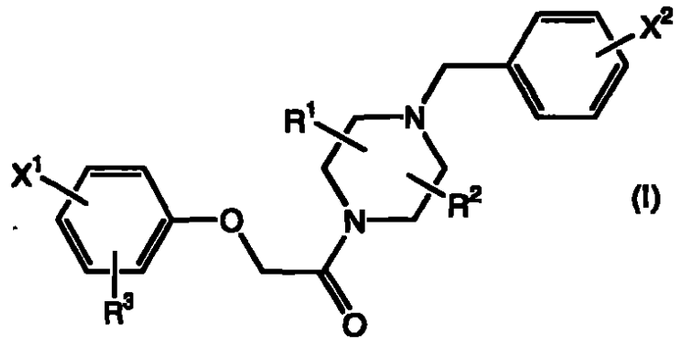
*****

While the present invention has been described with reference to the specific

embodiments thereof, it should be understood by those skilled in the art that various changes may be made and equivalents may be substituted without departing from the true spirit and scope of the invention. In addition, many modifications may be made to adapt a particular situation, material, composition of matter, process, process step or steps, to the objective, spirit and scope of the present invention. All such modifications are intended to be within the scope of the claims appended hereto.

What is claimed is:

1. A compound of formula (I):



(I)

wherein:

X^1 and X^2 are each independently halo;

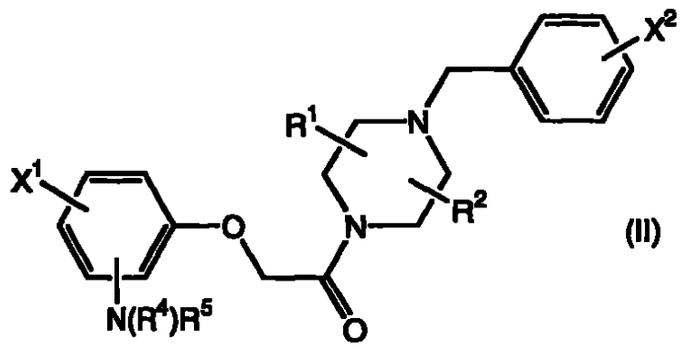
R^1 and R^2 are each independently hydrogen or alkyl; and

R^3 is hydrogen, amino, monoalkylamino, dialkylamino, monoaralkylamino, alkylcarbonylamino, alkenylcarbonylamino, haloalkylcarbonylamino, arylcarbonylamino, alkoxyalkylcarbonylamino, alkoxycarbonylalkylcarbonylamino, glycinamido, monoalkylglycinamido, arylcarbonylglycinamido, aminocarbonylglycinamido, (aminocarbonyl)(alkyl)glycinamido, (alkoxyalkylcarbonyl)glycinamido, ureido, monoalkylureido, monoarylureido, monoaralkylureido, or alaninamido;

and wherein either one of X^1 or X^2 is selected from the group of ^{123}I, ^{125}I, ^{126}I, ^{131}I, ^{75}Br, ^{76}Br, ^{80}Br and ^{18}F; or wherein one of the carbon atoms in the compound is ^{11}C;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

2. A compound of formula (II):



(II)

wherein

X^1 and X^2 are each independently halo;

R^1 and R^2 are each independently hydrogen or alkyl; and

R^4 is hydrogen; and

R^5 comprises a chelator capable of binding a radioactive metal atom chosen from the group of ^{99m}Tc, ^{186}Re and ^{188}Re;

or as a complex with ^{99m}Tc, ^{186}Re and ^{188}Re;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

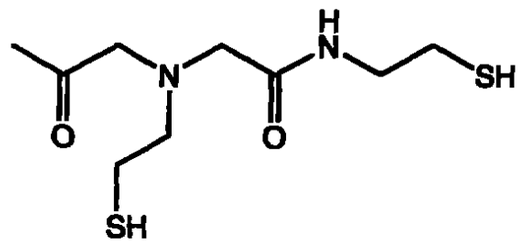
3. The compound of Claim 1 or Claim 2 wherein said compound binds to chemokine receptor CCR1 and passes the blood-brain barrier.

4. The compound of Claim 1 or Claim 2 wherein R^1 is methyl at the 2-position of the piperazinyl radical and R^2 is methyl at the 5-position of the piperazinyl radical.

5. The compound of Claim 1 or Claim 2 wherein R^1 is methyl at the 2-position of the piperazinyl radical and R^2 is hydrogen.

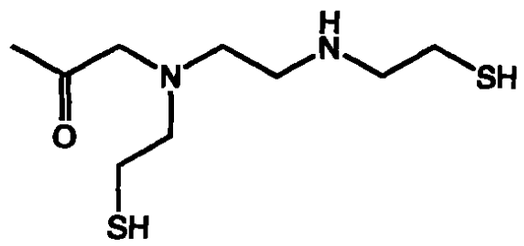
6. The compound of Claim 1 wherein X^1 is chloro at the 4-position of the phenyl radical and X^2 is a ^{18}F atom at the 4-position of the phenyl radical.

7. The compound of Claim 2 wherein R^5 is a chelator of formula (III):



(III)

8. The compound of Claim 2 wherein R^5 is a chelator of formula (IV):



(IV)

9. The compound of Claim 7 or Claim 8 wherein R^5 further comprises a linker moiety comprising an alkyl radical having one to ten carbon atoms, wherein the alkyl radical optionally contains one to ten -C(O)-groups, one to ten -C(O)N(R)- groups, one to ten -N(R)C(O)- groups, one to ten -N(R)- groups, one to ten $-N(R)_2$ groups, one to ten hydroxy groups, one to ten -C(O)OR- groups, one to ten oxygen atoms, one to ten sulfur atoms, one to ten nitrogen atoms, one to ten halogen atoms, one to ten aryl groups, and one to ten saturated or unsaturated heterocyclic rings wherein R is hydrogen or alkyl.

10. The compound of Claim 9 wherein the linker moiety is $-C(O)-CH_2-N(H)$.

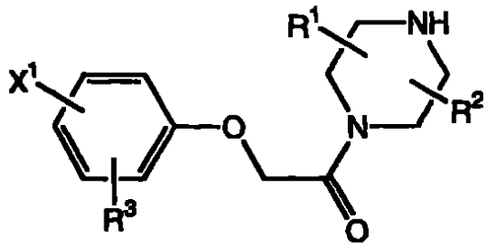
11. The monochloride salt of a compound of Claim 1 to Claim 10.

12. The dichloride salt of a compound of Claim 1 to Claim 10.

13. A method of diagnosing Alzheimer's disease in a human which comprises administering to a human in need of such diagnosis a compound according to Claim 1 to 12 and measuring the radioactivity arising from the administration of the compound to the human either by using a gamma camera or by positron emission tomography (PET).

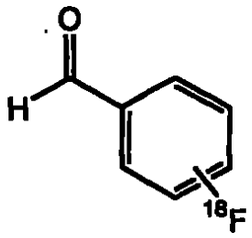
14. A method of using a compound according to Claim 1 to 12 for the manufacture of a radiopharmaceutical for the diagnosis of Alzheimer's disease in a human.

15. A process for the production of a compound of formula (I) according to Claim 1 comprising the reaction of a compound of formula (f):



(f)

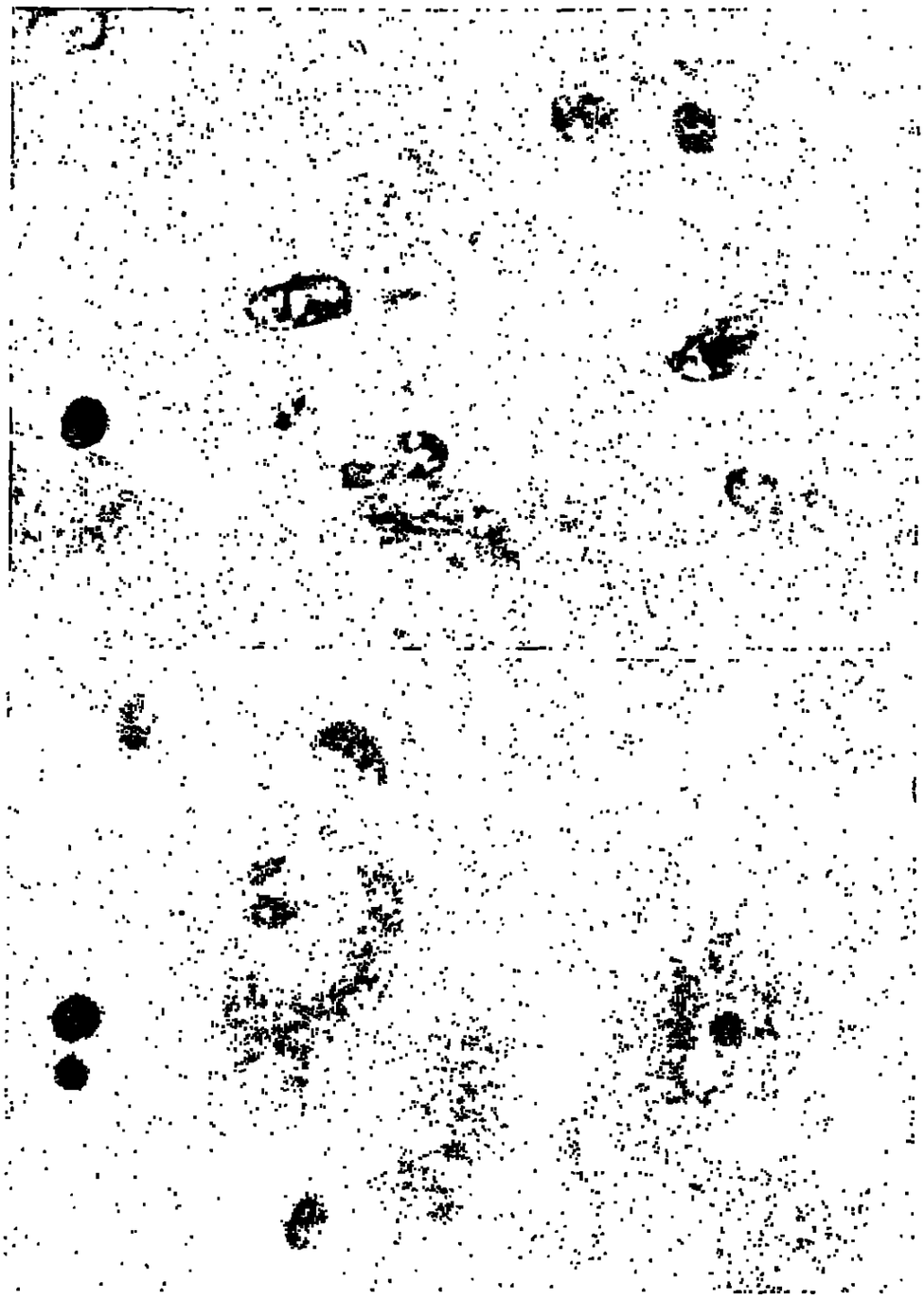
wherein R^1, R^2, R^3, and X^1 are as defined in Claim 1,
with a compound of formula (b):



(b)

in the presence of a reducing agent.

Figure 1



32
32

Figure 2

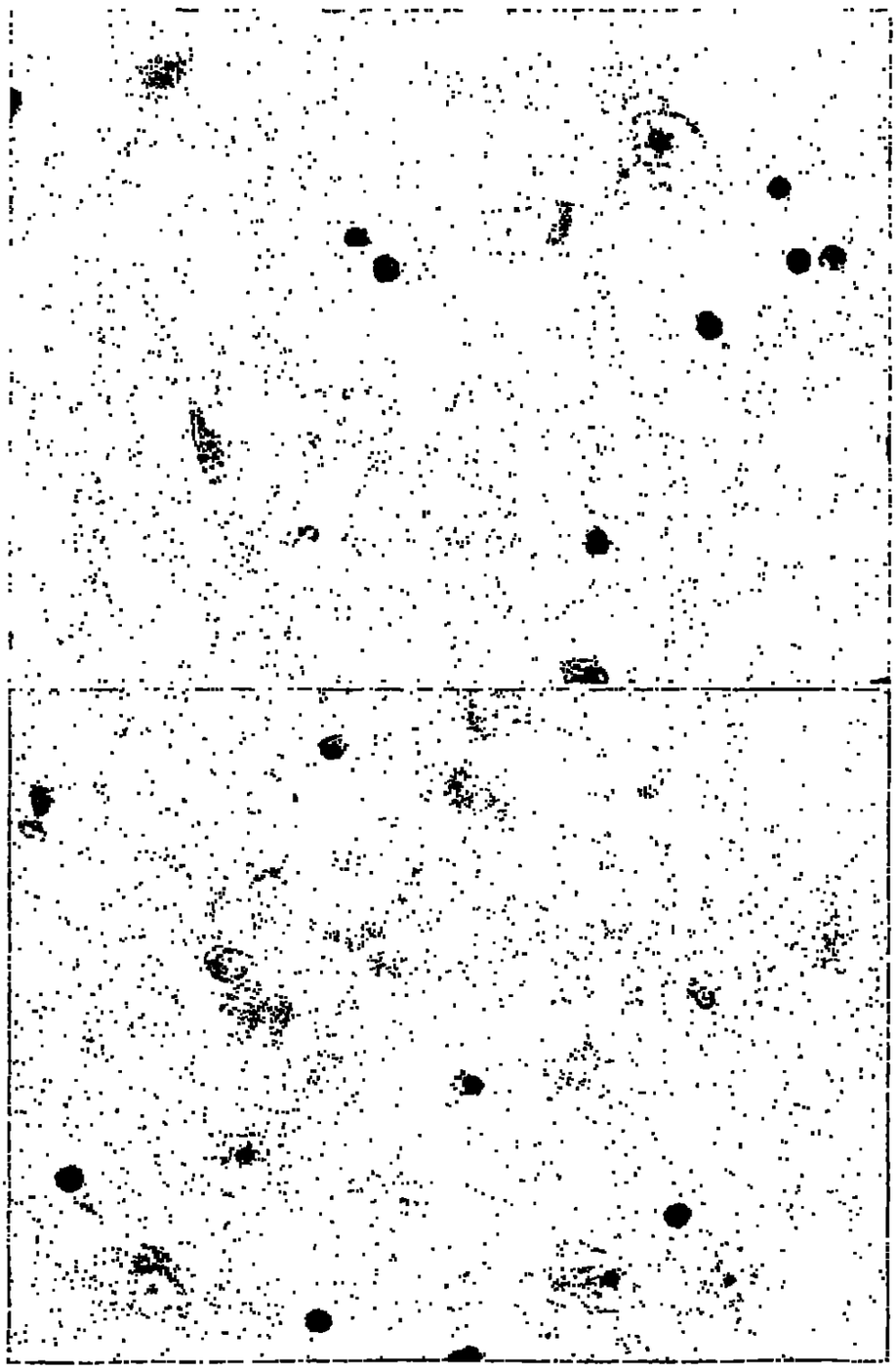


Figure 3

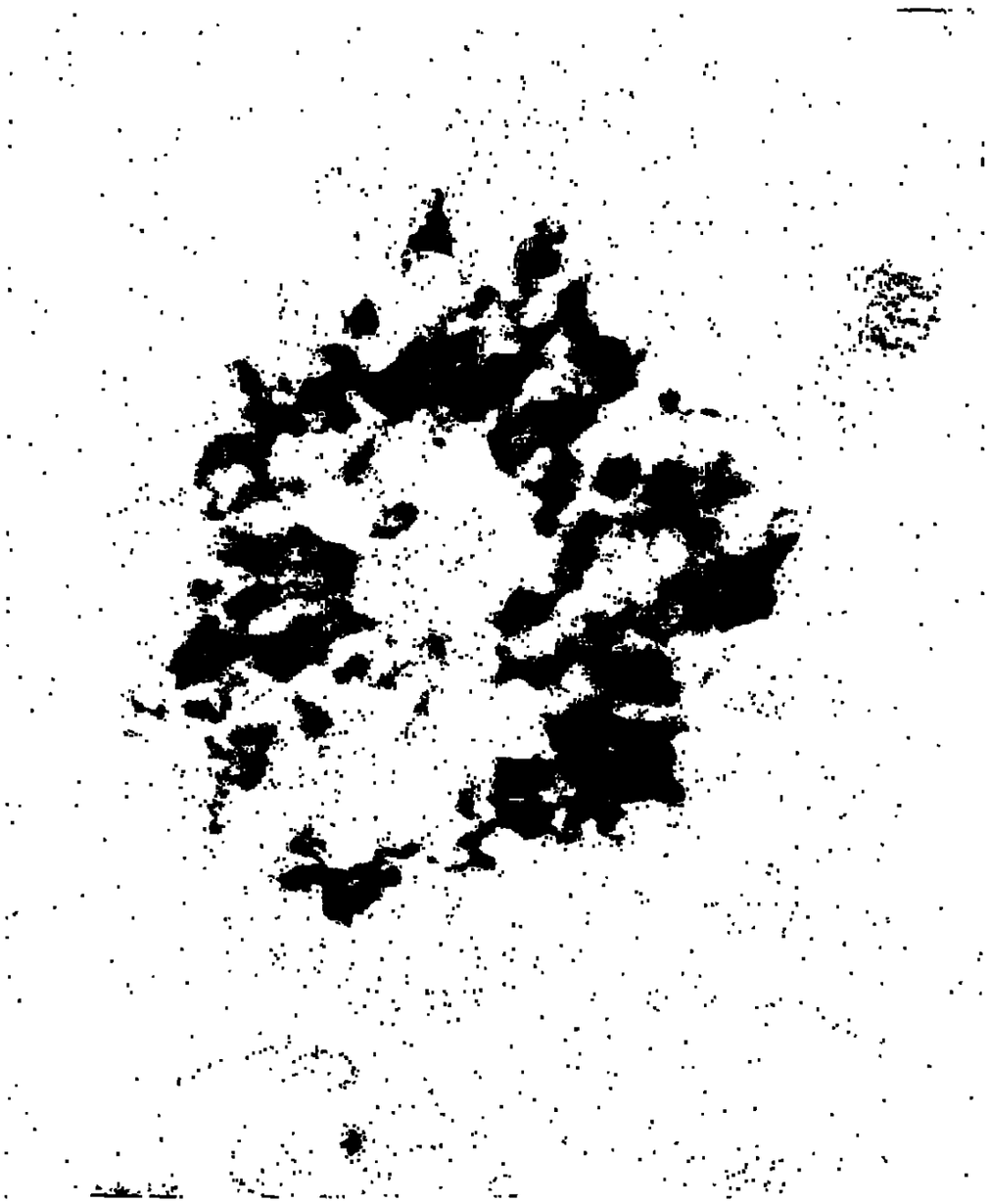


Figure 4

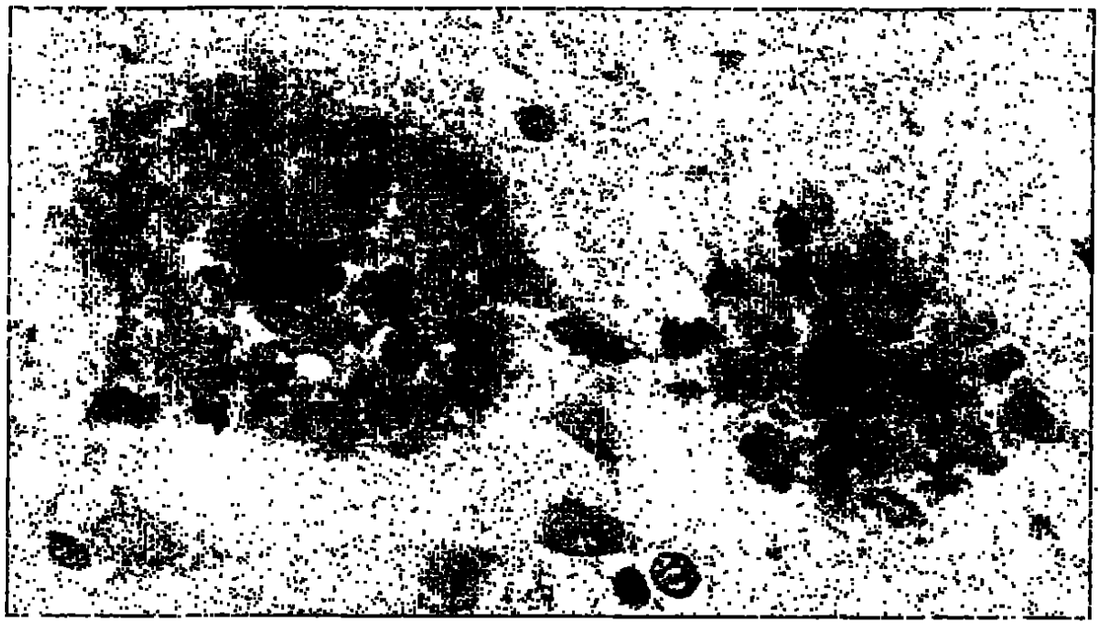


Figure 5

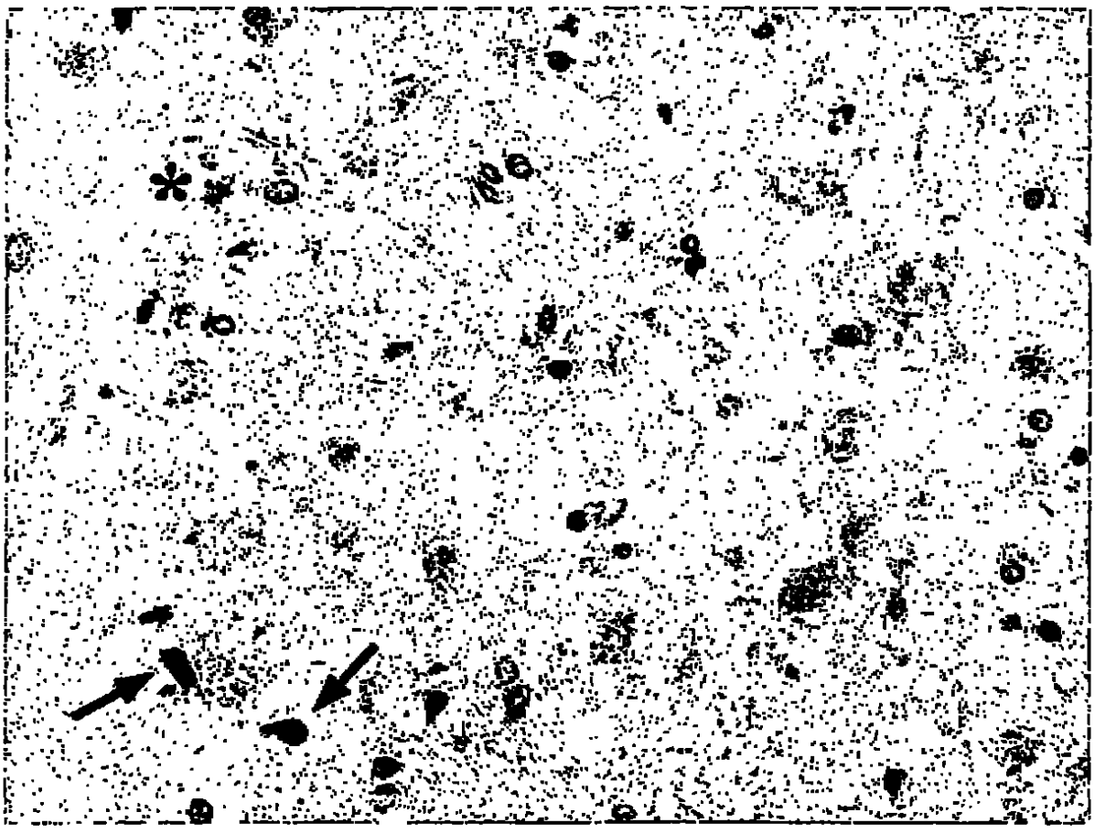


Figure 6

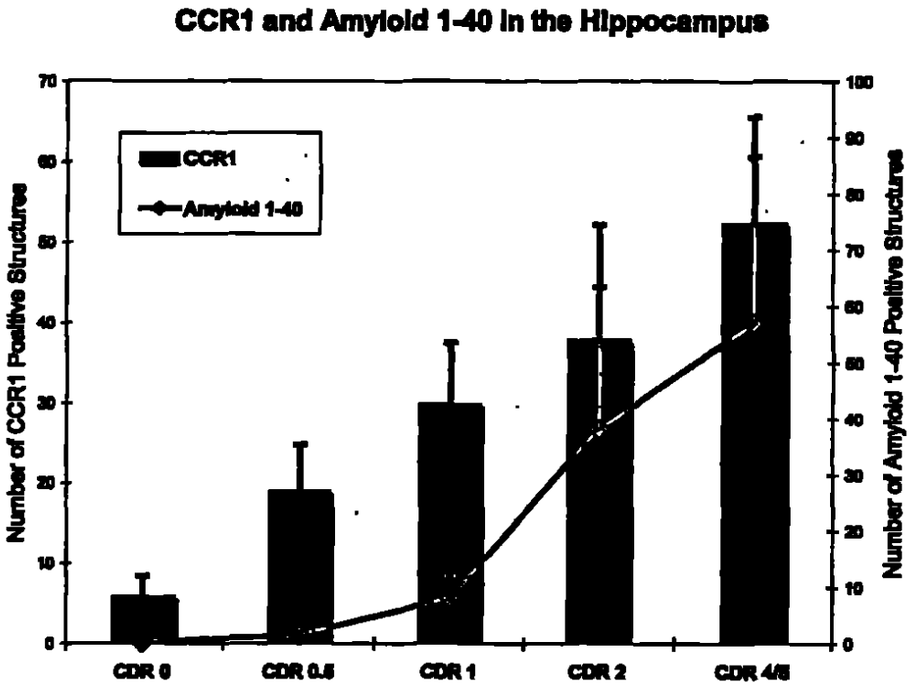
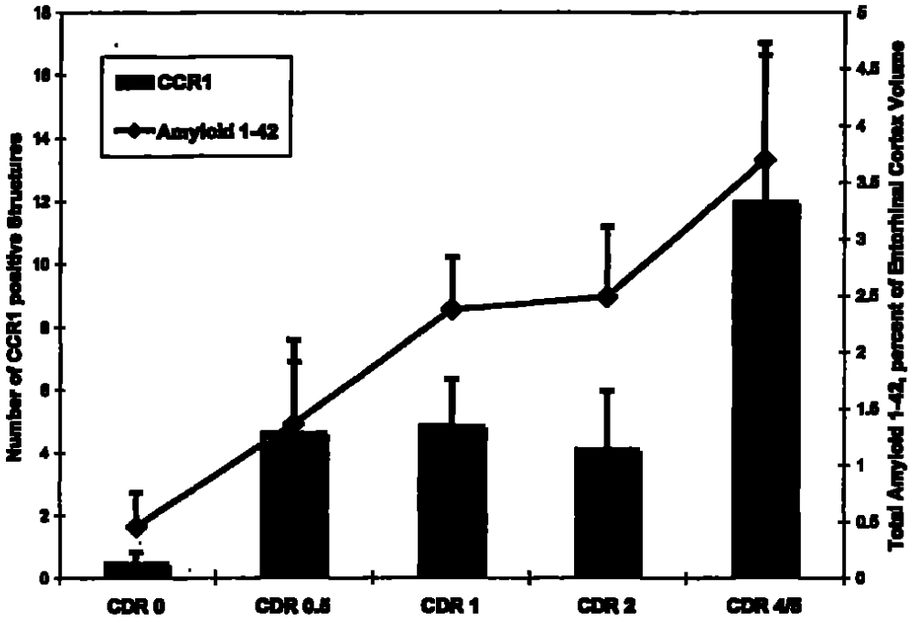

CCR1 and Amyloid 1-40 in the Hippocampus
CCR1
Amyloid 1-40
Number of CCR1 Positive Structures
Number of Amyloid 1-40 Positive Structures
CDR 0
CDR 0.5
CDR 1
CDR 2
CDR 4/5

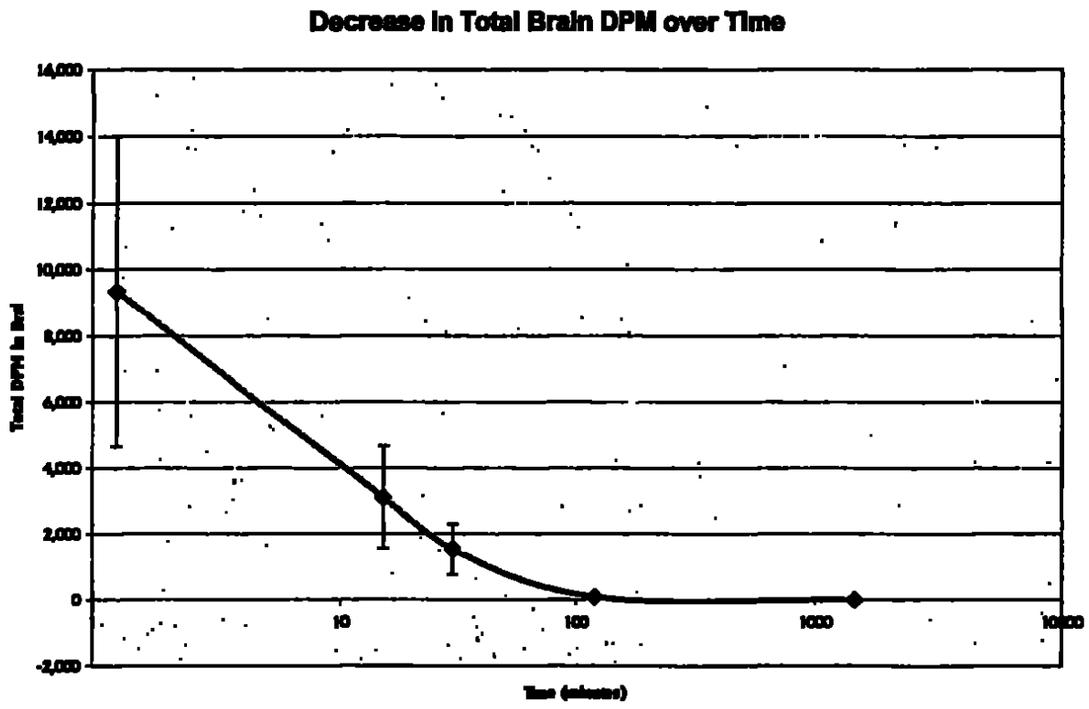
Figure 7.

CCR1 and Amyloid 1-42 in the Entorhinal Cortex



38

Figure 8


Decrease in Total Brain DPM over Time
14,000
12,000
10,000
8,000
6,000
4,000
2,000
0
-2,000
10
100
1000

39

Figure 9

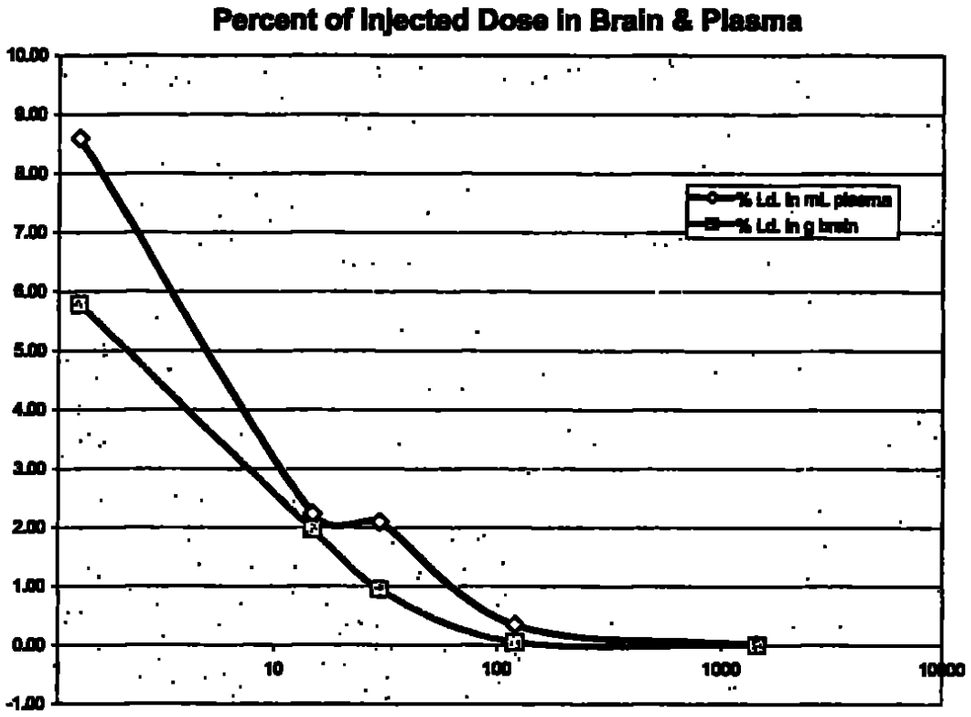
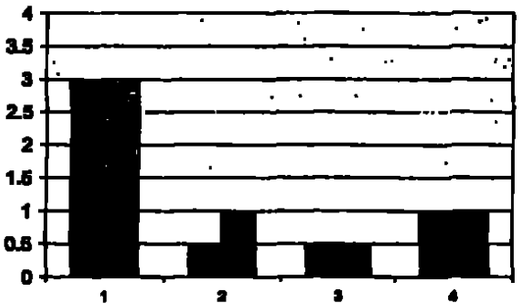
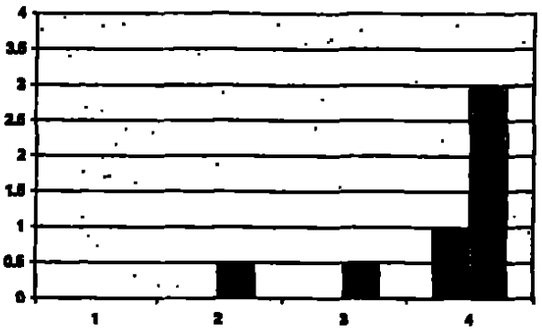

Percent of Injected Dose in Brain & Plasma
10.00
9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
-1.00
10
100
1000
% i.d. in mL plasma
% i.d. in g brain

Figure 10

Congophilic Angiopathy



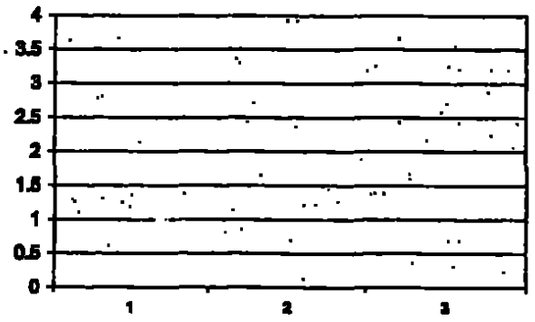
Multi-Infarct Dementia



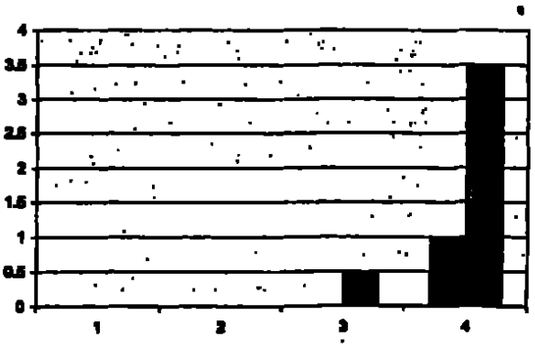
Diffuse Lewy Body Dementia



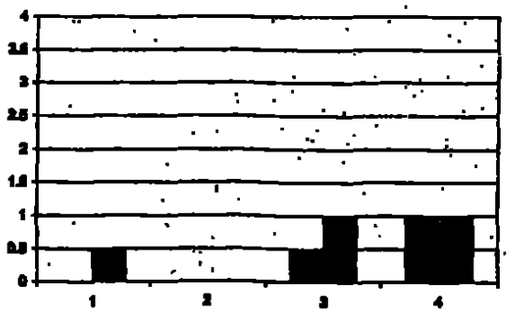
Parkinsonian Dementia of Guam



Pick's Disease



Progressive Supranuclear Palsy



(12) Publicación de la solicitud internacional bajo PCT
(19) Organización mundial de propiedad intelectual
Oficina Internacional
(43) Fecha de publicación internacional : 10 de mayo de 2002 (10.05.2002)
(10) Número de publicación internacional: WO 02/36581 A1

(51) Clasificación internacional de patentes: C07D 295/18 C07B 59/00, A61 K 51/00, A61P 25/28

(21) Número de solicitud internacional: PCT/EP01/12607

(22) Fecha de presentación internacional: 1 de noviembre de 2001 (01.11.2001)

(25) Idioma de la presentación: Inglés

(26) Idioma de la publicación: Inglés

(30) Antecedentes de prioridad: 60/246,299 6 de noviembre de 2000 (06.11.2000) US

(71) Solicitante: (para todos los países designados excepto EEUU): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE], Müllerstrasse 178, 13342 Berlin (DE).

(72) Inventores: HILGER, Chistoph-Stephan; Langenauer Weg 24, 13503 Berlin (DE). JOHANNSEN, Bernd; Lausitzer Strasse 5, 01324 Dresden (DE). STEINBACH, Jörg; Geschwister-Scholl-Str. 14, 01877 Bischofswerda (DE). MÄDING, Peter; Voglerstrasse 19, 01277 Dresden (DE). HALKS-MILLER, Meredith; 799 Glenerag Way, Woodside, CA 94062 (US). HORUK, Richard; 3410 Silver Springs Ct., Lafayette, CA 94549 (US). DINTER, Harald; 80 De La Guerra, San Rafael, CA 94103 (US). MOHAN, Raju; 161 Selborne Way, Moranga, CA 94556 (US). HESSELGESSER, Joseph, E.; 445 Burnett Avenue # 103, San Francisco, CA 94131 (US).

(81) Estados designados(nacionales): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Estados designados(regionales): Patentes ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Patentes euroasiaticas (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patentes europeas (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), Patentes OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GO, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:
- Con informe de búsqueda internacional
- Antes de expirar el plazo para salvar las reinvindicaciones y de ser publicado nuevamente en el caso de haber sido salvado las reinvindicaciones.

(54) Título: Productos radiofarmacéuticos para el diagnostico de la enfermedad de Alzheimer.

(57) Resúmen: Uso de productos radiofarmacéuticos en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. En particular, los productos radiofarmacéuticos de la invención tienen la capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica y unirse al receptor CCR1 presente en el tejido del cerebro de pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer.

PRODUCTOS RADIOFARMACÉUTICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con nuevos productos radiofarmacéuticos que son de utilidad para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

Descripción breve del arte anterior

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo severo y habitualmente existen aproximadamente 4 millones de norteamericanos que padecen esta enfermedad. Dado que la población de mayor edad continúa creciendo, esta cifra podría alcanzar los 14 millones a mediados del próximo siglo a menos que se descubra una cura o prevención para la enfermedad. Actualmente, no existe ninguna prueba premortem sensible y específica para un diagnóstico temprano de la enfermedad. La enfermedad de Alzheimer se diagnostica actualmente sobre la base de la observación clínica del deterioro cognitivo, acoplado con la eliminación sistemática de otras posibles causas de dichos síntomas. La confirmación del diagnóstico clínico de "probable enfermedad de Alzheimer" solamente se puede realizar examinando el cerebro postmortem. El cerebro en la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la aparición de dos depósitos proteináceos anormales distintivos en regiones del cerebro que son responsables del aprendizaje y la memoria (por ejemplo, en la corteza cerebral y el hipocampo). Estos depósitos son placas amiloides extrace-

lulares, que son características de la enfermedad de Alzheimer, y ovillos neurofibrilares intracelulares (NFT), que también se encuentran en otros trastornos neurodegenerativos. Los péptidos amiloides son típicamente de 40 ó 42 aminoácidos de longitud ("$A\beta^{1-40}$" o "$A\beta^{1-42}$", respectivamente) y se forman a partir del procesamiento anormal de una proteína mayor asociada a membrana de función desconocida, la proteína precursora de amiloide ("APP"). Se cree que los agregados oligoméricos de estos péptidos son neurotóxicos,dando eventualmente como resultado la degeneración sináptica y la pérdida neuronal. La cantidad de deposición amiloide se correlaciona aproximadamente con la severidad de los síntomas en el momento de la muerte.

En el pasado, se han realizado varios intentos para diseñar productos radiofarmacéuticos que se pudieran usar como agentes de diagnóstico para un diagnóstico premortem de la enfermedad de Alzheimer.

Bornebroek et al. mostraron que el componente amiloide P sérico (SAP) de la proteína asociada al amiloide, marcado con ^{123}I, se acumula en niveles bajos en la corteza cerebral, posiblemente en las paredes de los vasos, de los pacientes con amiloidosis cerebral (Bornebroek, M., et al., Nucl. Med. Commun. (1996), Vol. 17, págs. 929-933).

Saito et al, propusieron una administración mediada por vectores de $A\beta^{1-40}$ marcados con ^{125}I a través de la barrera hematoencefálica.Se describe que el componente $A\beta^{1-40}$ iodado

se une a placas amiloides Aβ en secciones de tejido(Saito, Y.,et al., Proc.Natl.Acad. Sci. EE.UU. 1995, Vol.92, pg. 10227-10231).

En la Patente de EE.UU. N°: 5.231.000 se describen anticuerpos con especificidad por el polipéptido amiloide A4 presente en el cerebro de los pacientes con enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, aún no se ha descripto un método para administrar estos anticuerpos a través de la barrera hematoencefálica.

Zhen et al. describieron modificaciones del colorante que se une a amiloides conocido como "Congo Red™" y complejos de estas moléculas modificadas con tecnecio y renio. Se prevé que los complejos con iones radioactivos puedan constituir agentes potenciales para el diagnóstico por imágenes de la enfermedad de Alzheimer (Zhen et al.,J.Med.Chem. (1999), Vol. 42, pg. 2805-2815). Sin embargo,el potencial de los complejos para atravesar la barrera hematoencefálica es limitado.

Un grupo en la Universidad de Pennsylvania en EE.UU. (Skovronsky, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 2000, Vol. 97, págs. 7609-7614) ha desarrollado un derivado marcado con fluorescencia del Congo Red que es permeable en el cerebro y que se une de una manera no específica con materiales amiloides (es decir, péptidos en conformación laminar con plegamiento P). Sería necesario marcar este compuesto con un componente radioactivo y luego verificarlo en exámenes pre-

clínicos para evaluar su farmacocinética y toxicidad antes de la evaluación clínica.

Klunk et al. describieron experimentos con un derivado de Congo Red™, la crisamina G (CG). Se describe que CG se une bien al β-amiloide sintético in vitro, y atraviesa la barrera hematoencefálica en ratones normales (Klunk et al., Neurobiol. Aging (1994), Vol. 15, N° 6, págs. 691-698).

Bergstrom et al. presentaron un compuesto marcado con iodo-123 como un radioligando potencial para la visualización de receptores de acetilcolin muscarínicos M1 y M2 en la enfermedad de Alzheimer (Bergstrom et al., Eur. J. Nucl. Med. (1999), Vol. 26, págs. 1482-1485).

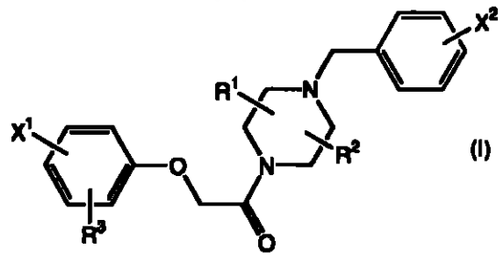
Recientemente, se ha descubierto que ciertos receptores específicos de quimioquinas son sensibilizados en los cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Horuk, R. et al., J. Immunol. (1997), Vol. 158, págs. 2882-2890); Xia et al., J. NeuroVirol. (1999), Vol. 5, págs. 32-41). Además, se ha demostrado recientemente que el receptor de la quimioquina CCR1 es sensibilizado en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer avanzada y está ausente en los cerebros normales (Halks-Miller et al, CCR1 Immunoreactivity in Alzheimer's Disease Brains, Society for Neuroscience Meeting Abstract, N° 787.6, Volumen 24, 1998). Los antagonistas del receptor CCR1 y el uso de los mismos como agentes antiinflamatorios se describen en la publicación de la Solicitud de Patente PCT, WO 98/56771.

Ninguna de las propuestas descriptas previamente han dado como resultado un desarrollo clínico de un agente para el diagnóstico por imágenes para un diagnóstico temprano de la enfermedad de Alzheimer. Por consiguiente, persiste la necesidad de un agente de diagnóstico que pueda ser de utilidad para un diagnóstico confiable y temprano de la enfermedad de Alzheimer.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a productos radiofarmacéuticos que se unen al receptor CCR1 y que tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, y que por ello son de utilidad en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, preferentemente en una etapa temprana de la enfermedad.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención se refiere a compuestos de fórmula (I):



(I)

donde:

X^1 y X^2 son cada uno, independientemente entre sí, halo;

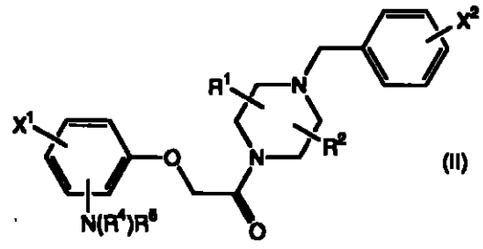
R^1 y R^2 son cada uno, independientemente entre sí, hidrógeno o alquilo; y

R^3 es hidrógeno, amina, monoalquilamina, dialquilamina, mo-

noaralquilamina, alquilcarbonilamina, alquenilcarbonilamina, haloalquilcarbonilamina, arilcarbonilamina, alcoxialquilcarbonilamina, alcoxicarbonilalquilcarbonilamina, glicinamida, monoalquilglicinamida, arilcarbonilglicinamida, aminocarbonilglicinamida, (aminocarbonil)(alquil)glicinamida, (alcoxialquilcarbonil)glicinamida, ureido, monoalquilureido, monoarilureido, monoaralquilureido o alaninamida;

y donde cualquiera de X^1 o X^2 se selecciona del grupo formado por ^{123}I, ^{125}I, ^{128}I, ^{131}I, ^{75}Br, ^{76}Br, ^{80}Br y ^{18F}; o donde uno de los átomos de carbono en el compuesto es ^{11}C; o una sal aceptable para uso farmacéutico de los mismos.

En otro aspecto, la invención se refiere a compuestos de fórmula (II):



(II)

donde

X^1 y X^2 son cada uno, independientemente entre sí, halo;

R^1 y R^2 son cada uno, independientemente entre sí, hidrógeno o alquilo; y

R^4 es hidrógeno; y

R^5 comprende un quelante capaz de ligar un átomo de metal radioactivo seleccionado del grupo formado por

^{99m}Tc, ^{186}Re y ^{188}Re;

o como un complejo con ^{99m}Tc, ^{186}Re y ^{188}Re; o una sal aceptable para uso farmacéutico de los mismos.

En otro aspecto, esta invención se refiere a un método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un ser humano que comprende la administración a un ser humano que necesita dicho diagnóstico de un compuesto de fórmula (I) o fórmula (II), descripto previamente y en este documento, y la medición de la radioactividad que produce dicha administración del compuesto al ser humano ya sea usando una cámara gamma o mediante tomografía de emisión de positrones (PET).

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para usar un compuesto de la invención en la elaboración de un producto radiofarmacéutico destinado al diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un ser humano.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para preparar los compuestos de la invención.

Descripción breve de las figuras

En la figura 1 se muestra la expresión del CCR1 en tejido de cerebro con enfermedad de Alzheimer.

En la figura 2 se muestra la especificidad de anticuerpos del CCR1 en tejido de cerebro con enfermedad de Alzheimer.

En la figura 3 se muestran secciones de tejido con marcación doble para CCR1-$A\beta^{1-40}$.

En la figura 4 se muestran placas neuríticas con marcación

doble para CCR1 y $A\beta^{1-42}$.

En la figura 5 se muestra una coloración difusa de $A\beta^{1-42}$ en cerebro con enfermedad de Alzheimer.

La figura 6 es un gráfico que muestra la relación entre CCR1 y $A\beta^{1-40}$ según la calificación CDR.

La figura 7 es un gráfico que muestra la relación entre CCR1 y $A\beta^{1-42}$ según la calificación CDR.

La figura 8 es un gráfico que demuestra la disminución de radioactividad total en cerebro en el tiempo.

La figura 9 es un gráfico que muestra el porcentaje de dosis inyectada en cerebro y plasma.

En la figura 10 se muestran gráficos de la expresión del CCR1 en otras enfermedades neurodegenerativas.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Tal como se utilizan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, a menos que se indique lo contrario, los siguientes términos tienen el significado que se indica a continuación:

"Alquilo" se refiere a un radical de cadena lineal o ramificada, monovalente o divalente, que solamente consta de carbono e hidrógeno, que no contiene insaturaciones y que tiene uno a ocho átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, 1-metiletil(iso-propilo), n-butilo, n-pentilo, 1,1-dimetiletil(t butilo), n-heptilo y semejantes.

"Alquilcarbonilamina" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-R_a$, donde R_a es un radical alquilo definido previamente, por ejemplo, acetilamina, etilcarbonilamina, n-propilcarbonilamina y semejantes.

"Alquenilo" se refiere a un radical de cadena lineal o ramificada, monovalente o divalente, que solamente consta de carbono e hidrógeno, que contiene por lo menos un enlace doble y que tiene de dos a ocho átomos de carbono, por ejemplo, etenilo, prop-1-enilo, but-1-enilo, pent-1-enilo, penta-1,4-dienilo y semejantes.

"Alquenilcarbonilamina" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-R_c$, donde R_c es un radical alquenilo definido previamente, por ejemplo, etenilcarbonilamina, prop-2-enilcarbonilamina, but-2-enilcarbonilamina y semejantes.

"Alcoxi" se refiere a un radical de fórmula $-OR_a$, donde R_a es un radical alquilo definido previamente, por ejemplo, metoxi, etoxi, n-propoxi, 1-metiletoxi (iso-propoxi), n-butoxi, n-pentoxi, 1,1-dimetiletoxi (t-butoxi) y semejantes.

"Alcoxicarbonilalquilcarbonilamina" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-R_a-C(O)OR_a$, donde cada R_a es, independientemente entre sí, un radical alquilo definido previamente, por ejemplo, etoxicarbonilmetilcarbonilamina, metoxicarbonilmetilcarbonilamina, (2-etoxicarboniletil)carbonilamina, (2-metoxicarboniletil)carbonilamina y semejantes.

"(Alcoxialquilcarbonil)glicinamida" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-CH_2-N(H)-C(O)-R_a-O-R_a$, donde cada

R_a es, independientemente entre sí, un radical alquilo definido previamente, por ejemplo, (metoxiacetil)glicinamida, (etoxiacetil)glicinamida y semejantes.

"Amina" se refiere a un radical $-NH_2$.

"Amincarbonilglicinamida" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-CH_2-N(H)-C(O)-NH_2$.

"(Amincarbonil)(alquil)glicinamida" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-CH_2-N(R_a)=C(O)-NH_2$, donde R_a es un radical alquilo definido previamente.

"Arilo" se refiere a un radical fenilo o naftilo. A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, el término "arilo" o el prefijo "ar-" (tal como en "aralquilo") significa que se incluyen radicales arilo sustituidos optativamente entre uno o varios sustituyentes seleccionados del grupo formado por halo, alquilo, alcoxi, haloalquilo, haloalcoxi, nitro, amina, monoalquilamina y dialquilamina, ya definidos en este documento.

"Arilcarbonilamina" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-R_b$, donde R_b es un radical arilo definido previamente, p.ej., (4-metoxifenil)carbonilamina, (4-fluorofenil)carbonilamina, (4-clorofenil)carbonilamina y semejantes.

"Arilcarbonilglicinamida" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-CH_2-N(H)-C(O)-R_b$, donde R_b es un radical arilo definido previamente, por ejemplo, fenilcarbonilglicinamida, (4-fluoro-3-trifluorometilfenil)carbonilglicinamida, (4-fluorofenil)carbonilglicinamida y semejantes.

"Aralquilo" se refiere a un radical de fórmula $-R_aR_b$, donde R_a es un radical alquilo definido previamente y R_b es un radical arilo definido previamente,p.ej., bencilo y semejantes.

"Alcoxialquilcarbonilamina" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-R_a-O-R_a$, donde cada R_a es un radical alquilo definido previamente,p.ej., metoximetilcarbonilamina, etoxietilcarbonilamina, metoxietilcarbonilamina y semejantes.

"Alaninamida" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-C(CH_3)H-NH_2$.

"Bencilo" se refiere a un radical de fórmula $-CH_2-R_h$, donde R_h es un radical fenilo sustituido optativamente por uno o varios sustituyentes seleccionados del grupo formado por halo, alquilo, haloalquilo, alcoxi, nitro, amina, monoalquilamina, y dialquilamina.

"Dialquilamina" se refiere a un radical de fórmula $-N(R_a)R_a$, donde cada R_a es, independientemente entre sí, un radical alquilo definido previamente, por ejemplo, dimetilamina, metiletilamina, dietilamina, dipropilamina, etilpropilamina y semejantes.

"Glicinamida" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-CH_2-NH_2$.

"Halo" se refiere a bromo, cloro, iodo o flúor.

"Haloalquilo" se refiere a un radical alquilo, definido previamente, es decir sustituido por uno o varios radicales

halo, definido previamente,p.ej., trifluorometilo, difluorometilo, triclorometilo, 2-trifluoroetilo, 1-fluorometil-2-fluoroetilo, 3-bromo-2-fluoropropilo, 1-bromometil-2-bromoetilo y semejantes.

"Haloalquilcarbonilamina" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-R_f$, donde R_f es un radical haloalquilo definido previamente, por ejemplo, trifluorometilcarbonilamina, trifluorometilcarbonilamina, 2-bromoetilcarbonilamina y semejantes.

"Monoalquilamina" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)R_a$, donde R_a es un radical alquilo definido previamente, p.ej., metilamina, etilamina, propilamina y semejantes.

"Monoaralquilamina" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)R_d$, donde R_d es un radical aralquilo definido previamente,p.ej., bencilamina, (3,4,5-trimetoxibencil)amina, (4-clorobencil)amina y semejantes.

"Monoalquilglicinamida" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-CH_2-N(H)R_a$, donde R_a es un radical alquilo definido previamente.

"Monoalquilureido" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-N(H)R_a$ o un radical de fórmula $-N(R_a)-C(O)-NH_2$, donde R_a es un radical alquilo definido previamente.

"Monoarilureido" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-N(H)R_b$ o un radical de fórmula $-N(R_b)-C(O)-NH_2$, donde R_b es un radical arilo definido previamente.

"Monoaralquilureido" se refiere a un radical de fórmula

$-N(H)-C(O)-N(H)R_d$ o un radical de fórmula $-N(R_d)-C(O)-NH_2$, donde R_d es un radical aralquilo definido previamente.

Los términos "optativo" u "optativamente" significan que un suceso o circunstancia descripto puede producirse, o no, y que la descripción incluye casos donde dicho suceso o circunstancia tiene lugar y casos en que no. Por ejemplo, "arilo sustituido optativamente" significa que el radical arilo puede estar sustituido o no y que la descripción incluye tanto los radicales arilo sustituidos como no sustituidos.

Una "sal aceptable para uso farmacéutico" incluye sales de adición tanto ácida como alcalina.

Una "sal de adición ácida aceptable para uso farmacéutico" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia biológica y las propiedades de las bases libres, que no sean biológicamente inconvenientes o indeseadas de otra manera, y que se forman con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y semejantes, y ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido pirúvico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido mandélico, ácido metansulfónico, ácido etansulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y semejantes. Las sales particularmente preferidas de los compuestos de la invención son las sales monoclorhidrato y las sales diclorhidrato.

Una "sal de adición alcalina aceptable para uso farmacéutico" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia biológica y las propiedades de los ácidos libres, que no sean biológicamente inconvenientes o indeseadas de otra manera. Estas sales se preparan a partir de la adición de una base inorgánica o una base orgánica al ácido libre. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen, pero sin limitaciones, las sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, zinc, aluminio y semejantes. Las sales inorgánicas preferidas son las sales de amonio, sodio, potasio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero sin limitaciones, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas sustituidas naturales, aminas cíclicas y resinas de intercambio de iones alcalinos, tal como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamine, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, trimetamina, diciclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliamina y semejantes. Las bases orgánicas particularmente preferidas son isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetilamina, diciclohexilamina, colina y cafeína.

"Ureido" se refiere a un radical de fórmula -N(H)-C(O)-NH_2.

A partir de las definiciones anteriores y los ejemplos se considera que para los radicales que contienen un grupo alquilo sustituido se puede producir cualquier sustitución sobre cualquiera de los carbonos del grupo alquilo.

Los compuestos de la invención, o las sales aceptables para uso farmacéutico de los mismos, pueden tener átomos de carbono asimétricos en su estructura. Los compuestos de la invención y las sales aceptables para uso farmacéutico de los mismos pueden entonces existir como enantiómeros, diastereoisómeros, racematos y mezclas individuales de enantiómeros y diastereisómeros. Todos dichos enantiómeros, diastereisómeros, racematos y mezclas individuales de los mismos se consideran dentro del alcance de esta invención. La configuración absoluta de algunos átomos de carbono dentro de los compuestos, si se conoce, está indicada por el descriptor absoluto apropiado R o S.

Utilidad y administración

Los compuestos de la invención descriptos en este documento son antagonistas del receptor de la quimioquina conocida como CCR1 y tienen capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica. Los compuestos son entonces adecuados como agentes de diagnóstico in vivo para el diagnóstico por imágenes de la enfermedad de Alzheimer. La detección de radioactividad se lleva a cabo de acuerdo con procedimientos bien conocidos en el arte, ya sea usando cámara gamma o tomografía de emisión de positrones (PET).

Preferentemente, la base libre o una forma de sal aceptable para uso farmacéutico, por ejemplo una sal monoclorhidrato o diclorhidrato, de un compuesto de la invención se usa en una formulación galénica como agente de diagnóstico. La formulación galénica que contiene al compuesto de la invención contiene optativamente los adyuvantes conocidos en el arte, por ejemplo reguladores del pH, cloruro de sodio, ácido láctico, agentes tensioactivos, etc. Se puede efectuar también una esterilización por filtración de la formulación galénica bajo condiciones estériles antes de su uso.

La dosis radioactiva se debe encontrar en un rango entre 1 y 100 mCi, preferentemente entre 5 y 30 mCi y más preferentemente entre 5 y 20 mCi por aplicación.

Pruebas

La conveniencia de los compuestos como agentes de diagnóstico por imágenes para la enfermedad de Alzheimer se puede demostrar con los protocolos experimentales conocidos por los especialistas en el arte. Por ejemplo, la sensibilización de los receptores CCR1 en cerebros con enfermedad de Alzheimer se puede demostrar en experimentos de coloración inmunohistoquímica de tejidos de autopsia de cerebro recolectados de pacientes con enfermedad de Alzheimer como se describirá con detalle más adelante en los ejemplos. La capacidad de los compuestos de la invención de unirse al receptor CCR1 y su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, también se puede evaluar mediante los ensayos in vitro e in vivo que se describirán más

in vitro e in vivo que se describirán más adelante en los ejemplos. En particular, en el ejemplo 10 se describe un gran estudio que se llevó a cabo para conocer el grado de expresión CCR1 en las diferentes etapas de la enfermedad de Alzheimer. Los tejidos de cerebro de 50 casos de autopsia mostraron una correlación entre el grado de severidad clínica (demencia) en la enfermedad de Alzheimer y la expresión de CCR1 en los neuritos distróficos. La expresión del CCR1 en las estructuras tipo placa en los cerebros de individuos clínicamente normales es rara. Además, no se ha detectado expresión de CCR1 en los cerebros de individuos con otras enfermedades neurodegenerativas a menos que exista una patología concomitante de enfermedad de Alzheimer (específicamente, $A\beta^{1-42}$ en las placas).

Realizaciones preferidas

Entre los diversos aspectos de la invención, se prefieren algunos compuestos de fórmula (I). En particular, se prefieren los compuestos de fórmula (I) donde X^1 es cloro en la posición 4 del anillo fenilo y X^2 es un átomo de ^{18F} en la posición 4 del anillo fenilo. Se prefieren especialmente dichos compuestos para su uso como agentes de diagnóstico mediante tomografía de emisión de positrones (PET).

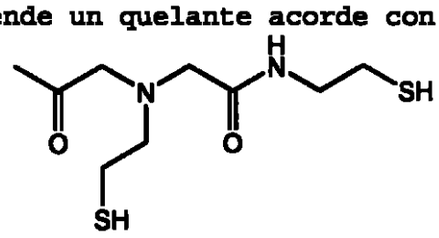
Se prefieren aún más los compuestos de fórmula (I) donde R^3 está en la posición 2 del anillo fenilo y R^1 es un metilo en la posición 2 del anillo piperazinilo y R^2 es un metilo en la posición 5 del anillo piperazinilo. Se prefieren

igualmente los compuestos de fórmula (I) donde R^3 está en la posición 2 del anillo fenilo y R^1 es un metilo en la posición 2 del anillo piperazinilo y R^2 es hidrógeno.

Se prefieren además estos compuestos preferidos en las forma de sus sales mono o diclorhidrato.

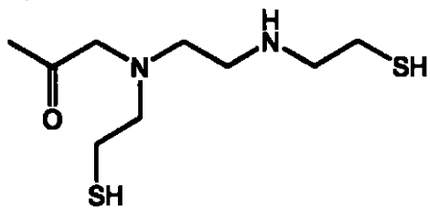
Entre los diversos aspectos de la invención, se prefieren algunos compuestos de fórmula (II). En particular, los compuestos de fórmula (II) donde $-N(R^4)^{R5}$ se encuentra en la posición 2 del anillo fenilo y R^1 se encuentra en la posición 2 del anillo piperazinilo y R^2 se encuentra en la posición 5 del anillo piperazinilo. Se prefieren igualmente los compuestos de fórmula (II) donde $-N(R^4)^{R5}$ se encuentra en la posición 2 del anillo fenilo y R^1 es un metilo en la posición 2 del anillo piperazinilo y R^2 es hidrógeno.

Se prefieren aún más los compuestos de fórmula (II), donde ^{R5} comprende un quelante acorde con la fórmula (III):



(III)

o la fórmula (IV):



(IV)

así como los complejos de los mismos con ^{99m}Tc, ^{186}Re y ^{188}Re. Entre estos compuestos preferidos, se prefieren aún más los

compuestos de fórmula (II) donde R^5 comprende un quelante acorde con la fórmula (III) o (IV), y donde el quelante está unido al nitrógeno en el grupo $-N(R^4)R^5$ del compuesto no radioactivo de fórmula (II) mediante un grupo ligador que comprende un radical alquilo que tiene de uno a diez átomos de carbono, donde el radical alquilo contiene optativamente uno a diez grupos -C(O)-, uno a diez grupos -C(O)N(R)-, uno a diez grupos -N(R)C(O)-, uno a diez grupos -N(R)-, uno a diez grupos $-N(R)_2$, uno a diez grupos hidroxi, uno a diez grupos -C(O)O-, uno a diez átomos de oxígeno, uno a diez átomos de azufre, uno a diez átomos de nitrógeno, uno a diez átomos de halógeno, uno a diez grupos arilo y uno a diez anillos heterocíclicos saturados o insaturados, donde R es hidrógeno o alquilo. Un grupo ligador preferido es $-C(O)-CH_2-N(H)-$. Entre los compuestos de la invención, los compuestos de fórmula (I) más preferidos son los compuestos seleccionados del grupo formado por los siguientes:

1-(5-cloro-2-{2-[(2R)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea;

N'-(mercaptoet-1-il)-N'-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicilglicinamida, complejo con tecnecio-99m;

1-(2-{2-[(2R)-4-(4-fluorobencil)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}-5-iodo-^{123}I-fenil)urea;

N'-(2-mercaptoet-1-il)-N'-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-

1-il)-N'-(5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il]glicinamida, complejo con tecnecio-99m;

N'-(2-mercaptoet-1-il)-N-(5-mercapto-3-azapent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il]glicinamida, complejo con tecnecio-99m;

2-(2-amin-4-clorofenoxi)-1-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18F}-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]etan-1-ona;

2-(2-amin-4-clorofenoxi)-1-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18F}-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]etan-1-ona;

2-(2-amin-4-clorofenoxi)-1-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]etan-1-ona;

2-(2-amin-4-clorofenoxi)-1-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]etan-1-ona;

2-[4-cloro-2-(dietilamin)fenoxi]-1-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]etan-1-ona;

2-[4-cloro-2-(dietilamin)fenoxi]-1-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]etan-1-ona;

2-[4-cloro-2-(dietilamin)fenoxi]-1-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18F}-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]etan-1-ona;

2-[4-cloro-2-(dietilamin)fenoxi]-1-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]etan-1-ona;

1-(5-cloro-2-(2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-3-(2,4-diclorofenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-(2,4-dicloro-fenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-(2,4-dicloro-fenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-(2,4-diclo-rofenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)urea;

1-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5,-dimetilpi-

perazin-1-il]-2-(2-isopentilamin-4-clorofenoxi)etan-1-ona;

1-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5,-dimetilpiperazin-1-il]-2-(2-isopentilamin-4-clorofenoxi)etan-1-ona;

1-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5,-dimetilpiperazin-1-il]-2-(2-isopentilamin-4-clorofenoxi)etan-1-ona;

1-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5,-dimetilpiperazin-1-il]-2-(2-isopentilamin-4-clorofenoxi)etan-1-ona;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-metilpropanamida;

N-(5-cloro-2-(2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-metilpropanamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-metilpropanamida;

N (5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-metilpropanamida;

N (5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-(metoxi)aceta-mida;

N (5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-(metoxi)acetamida;

N (5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-(metoxi)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-

dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(metoxi)acetamida;

(E)-N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-butenamida;

(E)-N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-butenamida;

(E)-N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-butenamida;

(E)-N-(5-cloro-2-(2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-butenamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)succinamato de metilo;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,SRS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)succinamato de metilo;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)succinamato de metilo;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)succinamato de metilo;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)succinamato de etilo;

N-(5-cloro-2-(2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-

dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi)fenil)succinamato de etilo;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)succinamato de etilo;

N-(5-cloro-2-f2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)succinamato de etilo;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)acetamida;

N-(5-cloro-2-(2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)propanamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)propanamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)propanamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)propanamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-3-fluorobenzamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-3-fluorobenzamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-3-fluorobenzamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-3-fluorobenzamida;

1-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-3-(p-tolil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-(p-tolil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-3-(p-tolil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-3-(p-tolil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-3-etilurea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-3-etilurea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-3-etilurea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-3-etilurea;

1-bencil-3-(5-cloro-2-(2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)urea;

1-bencil-3-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)urea;

1-bencil-3-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea;

1-bencil-3-(5-cloro-2-f 2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-(4-nitrofenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-(4-nitrofenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-(4-nitrofenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-(4-nitrofenil)urea;

2-(2-bencilamin-4-clorofenoxi)-1-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]etan-1-ona;

2-(2-bencilamin-4-clorofenoxi)-1-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]etan-1-ona;

2-(2-bencilamin-4-clorofenoxi)-1-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]etan-1-ona;

2-(2-bencilamin-4-clorofenoxi)-1-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]etan-1-ona;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)glicinamida;

N-(5-cloro-2-f2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)glicinamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)glicinamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)glicinamida;

1-(5-cloro-2-{2-[(2R)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2-metil-piperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2S)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2-metil-piperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)urea;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetil-piperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(metilamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetil-piperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(metilamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetil-piperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-(metilamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetil-piperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(metilamin)acetamida;

2-bromo-N-(5-cloro-2-{(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)acetamida;

2-bromo-N-(5-cloro-2-{(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)acetamida;

2-bromo-N-(5-cloro-2-{(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)acetamida;

2-bromo-N-(5-cloro-2-{(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(ureido)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(ureido)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(ureido)acetamida;

N-(5-cloro-2-(2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(ureido)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(1-metilureido)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(1-metilureido)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(1-metilureido)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-

dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi)fenil)-2-(1-metilureido)acetamida;

(2RS)-N-(5-cloro-2-(2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-aminpropa-namida;

(2SR)-N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-aminpropanamida;

(2RS)-N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-aminpropanamida;

(2SR)-N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-aminpropanamida;

(2RS)-N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-aminpropanamida;

(2SR)-N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-aminpropana-mida;

(2RS)-N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-aminpropanamida;

(2SR)-N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-aminpropanamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi)fenil)-2-(2,4-difluoro-benzoílamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(2,4-difluoroben-zoílamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-(2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-(2,4-difluoroben-zoílamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(2,4-difluoroben-zoílamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-(2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(metoxiacetil-amin)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(metoxiacetil-amin)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-(metoxiacetila-min)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(metoxiacetila-min)acetamida;

N-(5-cloro-2-f2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-(2-iodobenzoíla-

min)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-(2-iodobenzoílamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(2-iodobenzoílamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(2-iodobenzoílamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2R)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)glicinamida; y

N-(5-cloro-2-{2-[(2S)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)glicinamida

así como las sales mono y diclorhidrato de los mismos.

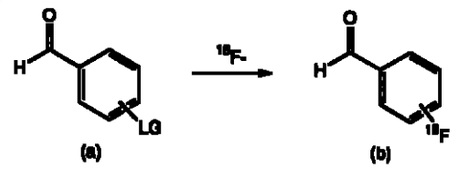
Preparación de los compuestos de la invención

A. Preparación de los compuestos de fórmula (I)

En general, los agentes para diagnóstico por imágenes radioactivos de fórmula (I) de la presente invención se preparan haciendo reaccionar derivados 4-halobencilo radioactivos con derivados piperazina. Se prefieren los derivados 4-fluorobencilo marcados con ^{18}F para el diagnóstico por imágenes mediante PET. Un método general para preparar haluros 4-fluoro-^{18}F-bencilo se describe en Iwata et al., Applied Radiation and Isotopes (2000), Vol. 52, págs. 87-92.

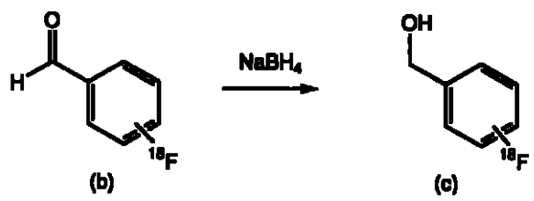
Los derivados 4-fluorobencilo marcados con ^{18}F se pre-

paran haciendo reaccionar un compuesto benzaldehído de fórmula (a) con iones ^{18}F para obtener un compuesto benzaldehído de fórmula (b):

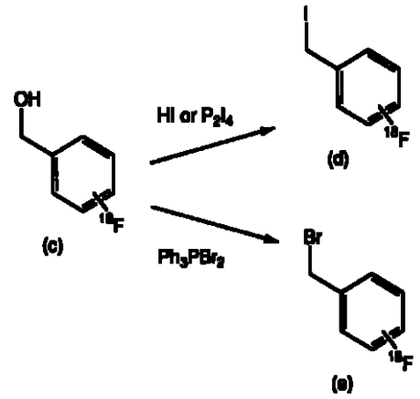


donde LG es un grupo saliente, por ejemplo, bromo, cloro, iodo, nitro o $N(R)_3^+ X^-$ (donde R es alquilo y X es un ión halo, tal como Br, CI^- o I^-;un ion de un ácido alcanoico,tal como un ion acetato ($CH_3C(O)O^-$);o un ion de un ácido alquilsulfónico o un ácido haloalquilsulfónico, tal como triflato ($CF_3SO_3^-$)). Preferentemente,LG es triflato.A partir del compuesto de fórmula (b), existen varías vías de síntesis para preparar los compuestos de fórmula (I).

En una primera vía de síntesis, se reduce un compuesto de fórmula(b) con $NaBH_4$ para obtener un compuesto de fórmula (c):

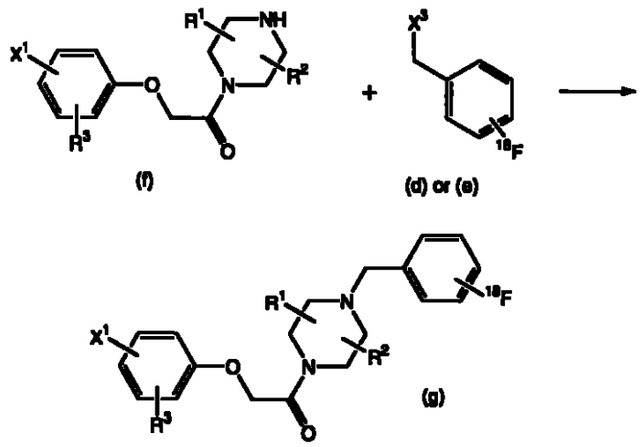


El compuesto de fórmula (c) se hace reaccionar después con HI, P_2I_4 o Ph_3PBr_2 para obtener un compuesto sustituido con iodo o bromo de las fórmulas (d) o (e):



Los compuestos de las fórmulas (d) y (e) se pueden obtener con un rendimiento radioquímico del 50 al 60%. La pureza radioquímica es mayor que un 95%. La actividad específica de los compuestos es de 5 mCi por 1 nmol.

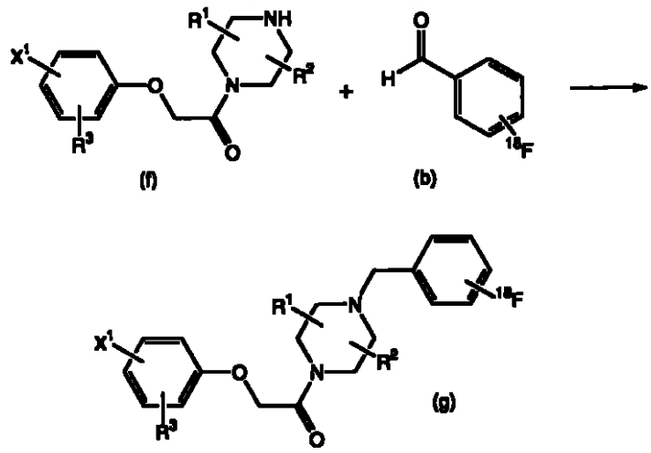
Luego se puede hacer reaccionar un compuesto de las fórmulas (d) o (e) con un derivado piperazina (f) para obtener un compuesto de fórmula (g) (un compuesto de fórmula (I)):



Los compuestos de fórmula (f) se pueden preparar de acuerdo con los métodos conocidos por los especialistas en el arte y se describen con detalle en la publicación de So-

licitud de Patente PCT, WO 98/56771.

En una segunda vía de síntesis, se hace reaccionar directamente un compuesto de fórmula (b) con un compuesto de fórmula (f) usando un agente reductor, por ejemplo, ácido fórmico, formiato de amonio, $NaBH_4$ o $NaBH_3CN$, para obtener un compuesto de fórmula (g) (un compuesto de fórmula (I)):

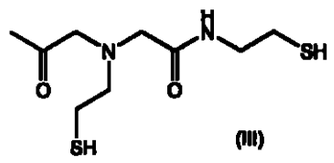


B. Preparación de los compuestos de fórmula (II)

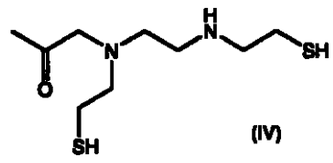
Para la tomografía computada de emisión de fotón único ("SPECT"), se prefieren los compuestos marcados con ^{99m}Tc. Dichos compuestos son compuestos de fórmula (II). La vía de síntesis general para estos compuestos comienza con análogos no radioactivos de los compuestos de fórmula (II) que se hacen reaccionar con quelantes de unión a ^{99m}Tc, por ejemplo quelantes-N_2S_2. La preparación de los análogos no radioactivos de los compuestos de fórmula (II) se describe con detalle en la publicación de la Solicitud de Patente PCT, WO 98/56771. La síntesis de los quelantes emplea procedimientos estándar, por ejemplo, los procedimientos que se describen

en A. Mahmood et al., *A N_2S_2-Tetradentate Chelate for Solid-Phase Synthesis: Technetium, Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine* (1999), Vol. 5, pág. 71, o en Z.P. Zhuang et al., *Bioconjugate Chemistry* (1999), Vol. 10, pág. 159.

Los quelantes preferidos son los quelantes de las fórmulas (III) o (IV):



(III)



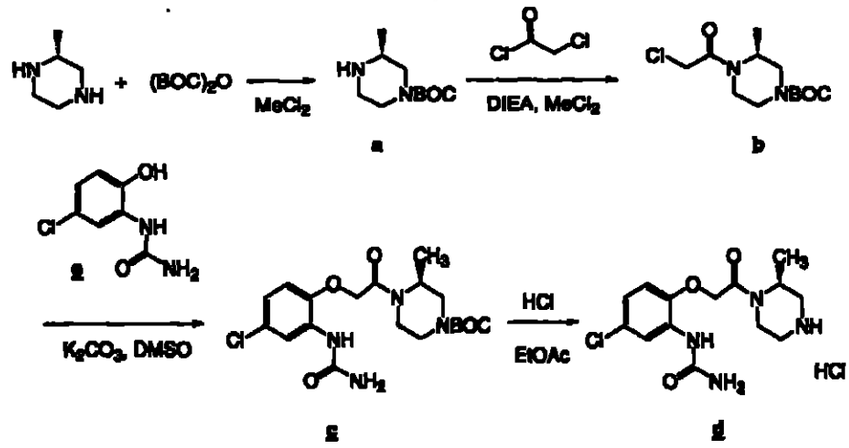
(IV)

Uno de los quelantes se une directamente al nitrógeno en el grupo $-N(R^4)^{R5}$ del compuesto no radioactivo de fórmula (II) o bien, mediante un grupo ligador que comprende un radical alquilo que tiene uno a diez átomos de carbono, donde dicho radical alquilo contiene optativamente uno a diez grupos -C(O)-, uno a diez grupos -C(O)N(R)-, uno a diez grupos -N(R)C(O)-, uno a diez grupos -N(R)-, uno a diez grupos $-N(R)_2$, uno a diez grupos hidroxi, uno a diez grupos -C(O)O-, uno a diez átomos de oxígeno, uno a diez átomos de azufre, uno a diez átomos de nitrógeno, uno a diez átomos de halógeno, uno a diez grupos arilo y uno a diez anillos heterocíclicos saturados o insaturados, donde R es hidrógeno o alquilo. El grupo ligador preferido es $-C(O)-CH_2-N(H)-$.

Los siguientes ejemplos específicos se proveen a modo de guía para asistir en la práctica de la invención y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Preparación de 1-(5-cloro-2-{2-[(2R)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea



A. Se agregó DIEA (19,10 ml, 110 mmol) a una solución de (R)-(-)-2-metilpiperazina (10 g, 100 mmol) en 250 ml de cloruro de metileno. Se enfrió la solución a -10°C. Se disolvió el anhídrido BOC en 250 ml de cloruro de metileno y se agregó dicha solución a la solución fría de piperazina durante el transcurso de 1 hora. Se dejó entibiar la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. Se filtró la mezcla de reacción para eliminar los sólidos y se lavó el filtrado con 500 ml de agua, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó para dar un aceite. Se purificó el aceite utilizando cromatografía en flash en columna para rendir 11,0 g del compuesto de fórmula (a).

B. Se disolvieron el compuesto de fórmula (a) (11,0 g, 55 mmol) y DIEA (10,5 ml, 60,4 mmol) en 100 ml de cloruro de metileno. Se enfrió la solución resultante a 15-10°C. Se agregó a la solución cloruro de cloroacetilo (4,37 ml, 55

mmol) gota a gota manteniendo la temperatura a -10°C. Luego de agitar la mezcla de reacción durante 1 hora se lavó con 100 ml de agua, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó para dar un aceite. El aceite se purificó utilizando cromatografía en flash en columna para rendir 14,8 g del compuesto de fórmula (b).

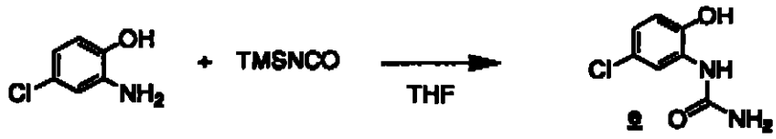
C. Se agregó carbonato de potasio (18,48 g, 133,7 mmol) a una solución del compuesto de fórmula (b) (14,8 g, 53,5 mmol) y del compuesto de fórmula (e) (9,98 g, 53,5 mmol) en 75 ml de DMSO. Se calentó la mezcla resultante a 50°C durante 3 horas. La mezcla se enfrió a 30°C y se vertió en 700 ml de agua. El agua se extrajo tres veces con 200 ml de acetato de etilo. Se combinaron los extractos de acetato de etilo y se lavó con 200 ml de KOH 1N seguidos de salmuera. Se secó la fase orgánica sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó hasta dar una espuma. Se purificó la espuma utilizando cromatografía en flash en columna para rendir 19,6 g del compuesto de fórmula (c).

D. Se disolvió el compuesto de fórmula (c) (7,68 g, 18 mmol) en 40 ml de acetato de etilo. Se enfrió la solución resultante en un baño de hielo y se hizo burbujear gas HCl anhidro a través de la solución durante 5 minutos. El producto precipitó mientras la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. El producto se recolectó por filtración, se lavó sobre el filtro con acetato de etilo fresco, y se secó al vacío a temperatura ambiente hasta peso

constante para rendir 5,9 g de 1-(5-cloro-2-{2-[(2R)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea, el compuesto de fórmula (d), como un sólido blanco; RMN (2 rotómeros); (400 MHz, DMSO) 9,7 (m, 0,5H), 9,2 (m, 0,5H), 8,16 (s, 1H), 8,13 (s, 0,5H), 6,8 (s, 2H), 4,9 (m, 2H), 4,4 (m, 5H), 3,8 (bs, 0,5H), 3,4 (bs, 0,5H), 3,2 (m, 2,5H), 3,0 (m, 2H) 1,2-1,4 (m, 3H) ppm.

Ejemplo 2

Preparación del compuesto de fórmula (e)



A una solución de 2-amino-4-clorofenol (10 g, 69,7 mmol) en 100 ml de THF anhidro a temperatura ambiente se agregó isocianato de trimetilsililo (18,8 ml, 139,4 mmol) de una vez. La solución se calentó a 60 °C y permaneció a dicha temperatura durante 22 horas luego de las cuales se agregó agua (1,3 ml, 76,7 mmol). Luego de 30 minutos se enfrió la solución a temperatura ambiente y se concentró para dar un aceite marrón. Dicho aceite se disolvió en acetato de etilo, se trató con carbón activado, se secó sobre sulfato de magnesio y se filtró. El filtrado se concentró para dar un sólido rosado que se desde tolueno/metanol 10:1, para dar 5,4 g del compuesto de fórmula (e) como un polvo pardo.

Ejemplo 3

Preparación de 1-(5-cloro-2-{2-[(2R)-4-(4-fluoro-^{18}F-

bencil)-2-metilpiperaxin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea

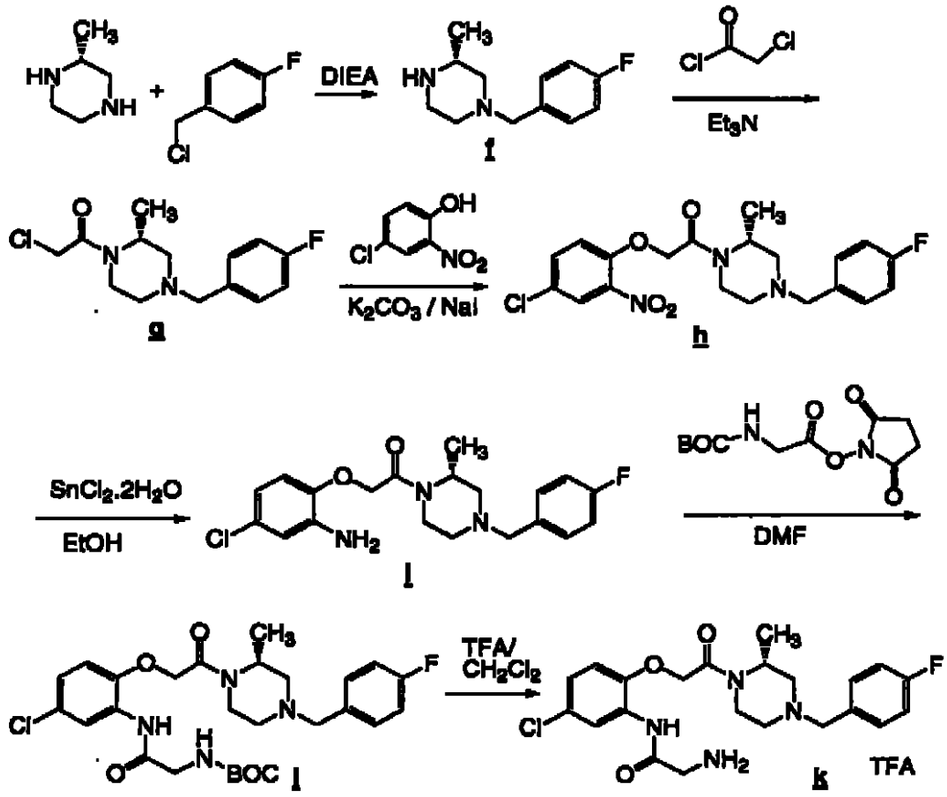
A. Se preparó fluoruro de hidrógeno-^{18}F en un ciclotrón mediante bombardeo de H_2O-^{18}O con protones. El fluoruro de hidrógeno-^{18}F resultante se adsorbió sobre un cartucho de intercambio aniónico. El fluoruro de hidrógeno-^{18}F se eluyó con una solución de Kryptofix 222 (15 mg, 40 µmol) y K_2CO_3 (2,77 mg, 20 µmol) en acetonitrilo acuoso (1,5 ml, 66%). Las fracciones radioactivas se evaporaron a sequedad en una corriente de gas nitrógeno. Se repitió dicho procedimiento tres veces con acetonitrilo seco (1 ml). Luego de agregar una solución de 4-trimetilamonio-benzaldehído-triflato (2 mg, 6,4 µmol) en DMF seco (250 µl) la mezcla de reacción resultante se calentó durante 5 minutos a 100°C. Luego de enfriar una solución de 1-(5-cloro-2-{2-[(2R)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea a temperatura ambiente, se agregaron un compuesto de fórmula (d), (3 mg, 8,3 µmol) en 50 µl de ácido acético y una solución de cianoborhidruro de sodio (4 mg, 63,7 µmol) en 100 µl de DMF seco. La mezcla de reacción se calentó a 120°C durante 10 minutos. Luego de agregar 5 ml de agua, se filtró la mezcla con un cartucho de poliestirol. El producto adsorbido se lavó con 2 ml de agua para rendir el compuesto del título, 1-(5-cloro-2-{2-[(2R)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea, que se eluyó con 1,5 ml de acetonitrilo y se purificó utilizando HPLC.

B. Otros compuestos de fórmula (I) que contienen un

átomo ^{18}F se preparan en una forma similar.

Ejemplo 4

Preparación de N-(5-cloro-2-{2-[(2R)-4-(4-fluorobencil)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)glicinamida



A. A una solución de (R)-(-)-2-metilpiperazina (2,0 g, 20 mmol) en 20 ml de CH_2Cl_2 se agregó DIEA (5,2 g, 40 mmol) y cloruro de 4-fluorobencilo (2,39 ml, 20 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. Luego de completar la reacción, la mezcla de reacción se lavó con agua (3x20 ml) y salmuera, luego se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró al vacío para obtener el

compuesto de fórmula(f)(2,2 g) en forma de un sólido blanco.

B. Se agregó cloruro de cloroacetilo (0,84 ml, 10 mmol) a una solución del compuesto de fórmula (f) (2,2 g, 10 mmol) en 50 ml de CH_2Cl_2. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se agregó trietilamina (3 ml, 21 mmol). Luego de 30 minutos, se lavó la mezcla con agua (3x20 ml) y salmuera, luego se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró al vacío para obtener un aceite. La purificación utilizando cromatografía instantánea en columna permitió obtener el compuesto de fórmula (g) (2,5 g).

C. A una solución del compuesto de fórmula (g) (2,4 g, 8,4 mmol) en 50 ml de DMF se le agregó K_2CO_3 (2,5 g, 17 mmol), NaI (0,2 g) y 4-cloro-2-nitrofenol (1,3 g, 8,4 mmol).

La mezcla resultante se calentó a 70-80 °C. Luego de 1 hora, la mezcla se concentró al vacío, luego se recogió en acetato de etilo (150 ml) y se lavó con agua (3x100 ml) y luego salmuera. Se separó la fase orgánica, se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró al vacío para rendir un aceite. La purificación utilizando cromatografía instantánea en columna rindió el compuesto de fórmula (h) (3,1 g).

D. A una solución del compuesto de fórmula (h) (1,1 g, 2,6 mmol) en 10 ml de etanol se le agregó una solución de dihidrato de cloruro de estaño(II) (3,0 g, 13 mmol) en 5 ml de etanol.La mezcla resultante se calentó a 75°C.Luego de 1 hora,la reacción se concentró al vacío, luego se recogió sobre acetato de etilo (100 ml), se lavó con solución 1N de

NaOH en agua (3x100 ml) y salmuera. Se separó la fase orgánica, se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró al vacío para rendir un aceite. La purificación utilizando cromatografía en flash en columna rindió el compuesto de fórmula (i) (0,75 g).

E. A una solución del compuesto de fórmula (i) (0,7 g, 1,78 mmol) en 10 ml de DMF se le agregó BOC-Gli-OSU (0,58 g, 2,13 mmol). Se calentó a la mezcla resultante 50-60 °C. Luego de 24 horas, la mezcla se concentró al vacío, luego se recogió en acetato de etilo (150 ml) y se lavó con agua (3x100 ml) y luego salmuera. Se separó la fase orgánica, se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró al vacío para rendir un aceite.

La purificación utilizando cromatografía en flash en columna rindió el compuesto de fórmula (j) (0,7 g).

F. A una solución del compuesto de fórmula (j) (0,6 g, 1,1 mmol) en 10 ml de CH_2O_2 se le agregó TFA (5 ml). La mezcla resultante se calentó a temperatura ambiente. Luego de completar la reacción en 1 hora, se concentró dicha reacción al vacío, luego se recogió en acetato de etilo (100 ml), se lavó con solución 1N de NaOH en agua (2x100 ml) y salmuera. Se separó la fase orgánica, se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró al vacío para rendir un aceite. La purificación utilizando cromatografía en flash en columna rindió N-(5-cloro-2-{2-[(2R)-4-(4-fluorobencil)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)glicinamida, el compuesto de fórmula

(k), (0,45 g) en forma de un sólido blanco; RMN ($CDCl_3$) 10,2 (s, 1), 8,5 (s, 1), 7,3 (m, 2), 7,0 (m, 3), 6,8 (d, 1), 4,7 (m, 2), 3,4-3,6 (m, 5), 3,0 (m, 1), 2,8 (m, 1), 2,6 (d, 1), 2,2 (m, 1), 2,0 (m, 2), 1,2-1,4 (m, 3) ppm.

Ejemplo 5

Complejo de tecnecio-99m de N´-(mercaptoet-1-il)-N´-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicilglicinamida

A. A una solución agitada de N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicinamida (175,5 mg, 0,4 mmol) (el compuesto de fórmula (k) que se preparó según se expuso anteriormente en el ejemplo 4), N-(S-tritil-2-mercaptoet-1-il)-N-(S-tritil-5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)glicina (291,4 mg, 0,4 mmol) (que se puede sintetizada de acuerdo con A. Mahmood et al., "Un quelato tetradentado de N_2S_2 para síntesis en fase sólida: Tecnecio, Renio en Química y Medicina Nuclear" (A N_2S_2-Tetradentate Chelate for Solid-Phase Synthesis: Technetium, Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine) (1999), Vol. 71), y N-hidroxisuccinimida (45,5 mg, 0,4 mmol) en 5 ml de diclorometano se le agregó gota a gota una solución de diciclohexilcarbodiimida (81,4 mg, 0,4 mmol) en 3 ml de diclorometano. Se agitó la suspensión resultante durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego de filtrar, se evaporó la solución resultante bajo presión reducida. Se aisló el producto deseado, N-(S-tritil-2-sulfanilet-1-il)-N-(S-

ducto deseado, N-(S-tritil-2-sulfanilet-1-il)-N-(S-tritil-5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)-N-{5-cloro-2[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicilglicinamida (340 mg, 72,8%) luego de una cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano/metanol, 98:2) como un polvo blanco.

Análisis elemental:

Calc.: C 69,93 H 5,87 N 7,20 O 6,85 S 5,49

Encontrado: C 69,69 H 6,05 N 7,01 O S 5,32

B. Se disolvió N-(S-tritil-2-sulfanilet-1-il)-N-(S-tritil-5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicilglicinamida (116,8 mg, 0,1 mmol), que se preparó según se expuso anteriormente, en 5 ml de ácido trifluoroacético. Luego de agregar trietilsilano (48 µl 0,3 mmol) se agitó la suspensión resultante durante 15 minutos a temperatura ambiente. El filtrado se evaporó bajo presión reducida y el residuo se trituró con 7 ml de éter dietílico. El precipitado se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y se eliminó por filtración, rindiendo el producto deseado, sal de ácido bis-trifluoracético de N-(mercaptoet-1-il)-N-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il}-2-oxoetoxi]fen-1-il)glicilglicinamida,(87 mg, 95,5%), en forma de un sólido blanco.

Análisis elemental:

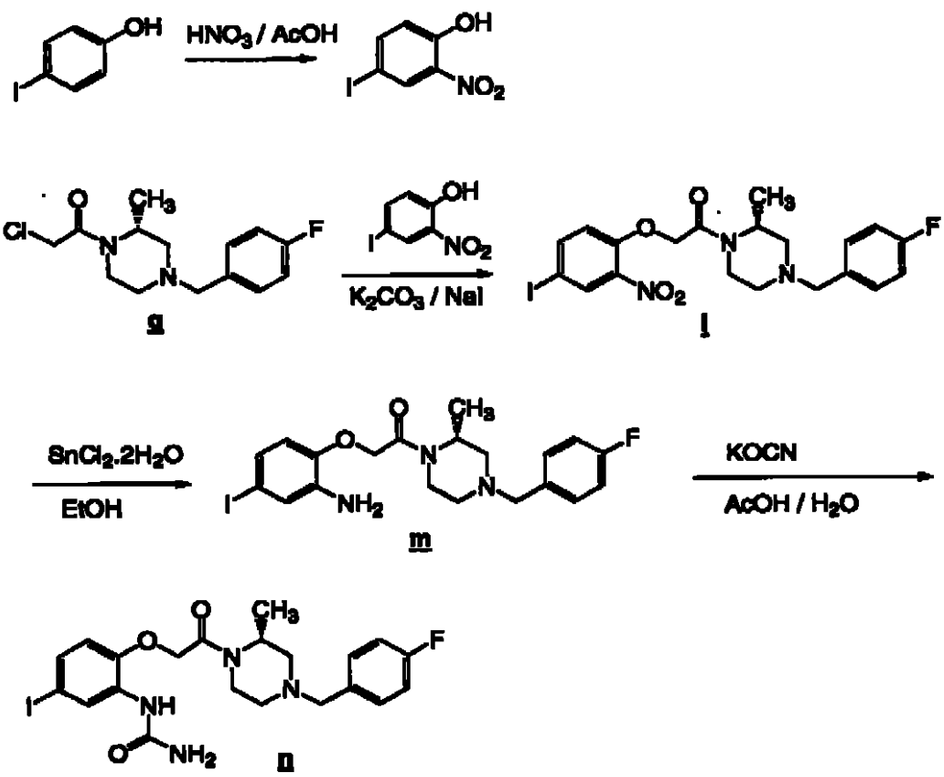
Calc.: C 44,81 H 4,65 N 9,22 O 15,80 S 7,04

Encontrado: C 44,54 H 4,91 N 8,99 O S 6,80

C. Se disolvieron tartrato disódico (1 mg) y sal de ácido bis-trifluoracético de N-(mercaptoet-1-il)-N-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicilglicina-mida, (100 µg), que se preparó según se expuso anteriormente, en 500 µl de buffer fosfato de sodio (0,1 M, pH= 8,5). Luego de agregar 37 MBq de eluato generador de ^{99m}Tc, se agregaron 5 µl de solución de cloruro de estaño(II) y se calentó la mezcla durante 10 min. a 100°C. El análisis HPLC mostró un pico principal indicando que el producto deseado, complejo de tecnecio-99m de N'-(mercaptoet-1-il)-N'-(5-mercapto-3-aza-2-oxo-pent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicilglicinamida, se sintetizó con una RCP> 90%.

Ejemplo 6

Preparación de 1-(2-{2-[(2R)-4-(4-fluorobencil)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}-5-yodofenil)urea



A. A una solución de p-yodofenol (2,2 g, 10 mmol) en 18 ml de ácido acético se le agregó gota a gota una solución de HNO_3 (0,7 ml, 70%) en 5 ml de ácido acético durante el transcurso de 10 minutos. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente. Luego de 30 minutos, se diluyó la mezcla de reacción con 100 ml mezcla de agua-hielo. Se recolectó el precipitado y se lavó con 100 ml de agua.

La purificación utilizando cromatografía instantánea en columna rindió 1,2 g de 2-nitro-4-yodofenol.

B. A una solución del compuesto de fórmula (g) (0,3 g, 1,05 mmol) (según se preparó aquí) en 10 ml de DMF se le agregó K_2CO_3 (0,45 g, 32 mmol), NaI (0,01 g) y 2-nitro-4-

yodofenol (0,28 g, 1,05 mmol).La mezcla resultante se calentó a 70-80°C. Luego de 1 hora,la mezcla se concentró al vacío, luego se recogió en acetato de etilo (150 ml) y se lavó con agua (3x100 ml) y luego salmuera. Se separó la fase orgánica, se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró al vacío para rendir un aceite. La purificación utilizando cromatografía en flash en columna rindió 0,28 del compuesto de fórmula (l).

C. A una solución del compuesto de fórmula (l) (0,28 g, 0,55 mmol) en 5 ml de etanol se le agregó una solución de dihidrato de cloruro de estaño(II) (0,616 g, 2,73 mmol) en 5 ml de etanol. La mezcla resultante se calentó a 75°C. Luego de 1 hora, la reacción se concentró al vacío, luego se recogió en acetato de etilo (100 ml), se lavó con solución 1N de NaOH en agua (3x100 ml) y salmuera. Se separó la fase orgánica, se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró al vacío para rendir un aceite. La purificación utilizando cromatografía instantánea en columna rindió el compuesto de fórmula (m) (0,25 g).

D. A una solución del compuesto de fórmula (m) (0,25 g, 0,52 mmol) en 3 ml de AcOH se le agregó agua (6 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, luego se agregó gota a gota una solución de KOCN (0,085 g, 1,0 mmol) en 1 ml de agua. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, luego se calentó a 55°C durante 5 minutos.Luego de completar la reac-

ción,la mezcla de reacción se concentró al vacío,luego se recogió en CH_2Cl_2 (50 ml), se lavó con solución 2N de NaOH en agua (2x100 ml) y salmuera. Se separó la fase orgánica, se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró al vacío para rendir un aceite. La purificación utilizando cromatografía en flash en columna rindió el compuesto de fórmula (n) (0,16 g) en forma de un sólido blanco; RMN ($CDCI_3$) 9,0 (s, 1), 8,6 (s, 1), 7,3 (m, 2), 7,0 (t, 3), 6,6 (d, 1), 4,9 (s, 2), 4,7 (m, 2), 4,4 (m, 1), 3,4-3,6 (m, 3), 3,0 (m, 1) 2,8 (m,1), 2,6 (d, 1), 2,2 (m, 1), 2,0 (m, 1), 1,2-1,4 (m, 3) ppm.

Ejemplo 7

Preparación de 1-(2-{2-[(2R)-4-(4-fluorobencil)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}-5-yodo-^{123}I-fenil)urea

A. A una solución del compuesto de fórmula (n) (1 mg), que se preparó según se expuso anteriormente, y 10 µg de sulfato de cobre(II) en 300 µl de DMF se le agregó 1 mCi solución de yoduro [^{123}I] de sodio. La mezcla de reacción resultante se calentó durante toda la noche a 100°C. Luego de agregar 1 ml de solución acuosa semi-saturada de $NaHCO_3$ se extrajo el producto con 2 ml de CH_2Cl_2. La fase orgánica se evaporó a sequedad en una corriente de gas nitrógeno. Se purificó el producto deseado, 1-(2-{2-[(2R)-4-(4-fluorobencil)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}-5-yodo-^{123}I-fenil)urea, usando un Cartucho RP [eluyente: EtOH/agua (2:1)].

B. Otros compuestos de fórmula (1) se preparan en una forma similar a la que se describió anteriormente.

Ejemplo 8

Complejo de tecnecio-99m de N´-(2-mercaptoet-1-il)-N´-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluoroben-cil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}gli-cinamida

A. A una solución agitada de 156,7 mg (0,4 mmol) 5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]anilina (compuesto de fórmula (i)) (291,4 mg, 0,4 mmol), N-(S-tritil-2-mercaptoet-1-il)-N-(S-tritil-5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)glicina (sintetizada de acuerdo con A. Mahmood et al., "Un quelato tetradentado de N_2S_2 para síntesis en fase sólida: Tecnecio, Renio en Química y Medicina Nuclear" (A N_2S_2-Tetradentate Chelate for Solid-Phase Synthesis: Technetium, Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine)(1999), Vol. 5, p. 71) y N-hidroxisuccinimida (45,5 mg, 0,4 mmol) en 5 ml de diclorometano se le agregó gota a gota una solución de diciclohexilcarbodiimida (81,4 mg, 0,4 mmol) en 3 ml de diclorometano. Se agitó la suspensión resultante durante toda la noche a temperatura ambiente.

Luego de filtrar, se evaporó la solución resultante bajo presión reducida. El producto deseado, N´-(S-tritil-2-mercaptoet-1-il)-N´-(S-tritil-5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicinamida (352mg, 79,2%), se aisló luego de una cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano/metanol, 98:2) como un polvo blanco.

Análisis elemental:

Calc.:	C 71,36	H 5,90	N 6,30	O 5,76	S 5,77
Encontrado:	C 71,08	H 6,13	N 6,05	O	S 5,52

B. Se disolvió N´-(S-tritil-2-mercaptoet-1-il)-N´-(S-tritil-5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicinamida (111,1 mg, 0,1 mmol) en 5 ml de ácido trifluoroacético. Luego de agregar 48 µl (0,3 mmol) de trietilsilano la suspensión resultante se agitó durante 15 min. a temperatura ambiente. El filtrado se evaporó bajo presión reducida y el residuo se trituró con 7 ml de éter dietílico. El precipitado se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y se eliminó por filtración, rindiendo el producto deseado, sal de ácido bis-trifluoracético de N-(2-mercaptoet-1-il)-N-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicinamida, (75mg, 87,8%) en forma de un sólido blanco.

Análisis elemental:

Calc.:	C 44,99	H 4,60	N 8,20	O 14,98	S 7,51
Encontrado:	C 44,71	H 4,89	N 8,03	O	S 7,22

C. Tartrato disódico (1 mg) tartrato disódico y sal de ácido bis-trifluoracético de N-(2-mercaptoet-1-il)-N-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicinamida, (100 µg) se disolvieron en 500 µl de buffer fosfato de sodio (0,1M, pH= 8,5). Luego de agregar 37,5 mBq de elua-

to generador de ^{99m}Tc, se agregaron 5 µl de solución de cloruro de estaño(II) y se calentó la mezcla durante 10 minutos a 100°C. El análisis por HPLC mostró un pico principal indicando que el producto deseado,Complejo de tecnecio-99m de N´-(2-mercaptoet-1-il)-N´-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)-N-(5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il)glicinamida,se sintetizó con una RCP> 91 %.

Ejemplo 9

Complejo de tecnecio-99m de N-(2-mercaptoet-1-il)-N-(5-mercapto-3-azapent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicinamida

A. A una solución agitada de 5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi] anilina (156,7 mg, 0,4 mmol) y trietilamina (40,5 mg, 0,4 mmol) en 5 ml de diclorometano se le agregó gota a gota una solución de cloruro de α-bromoacetilo (63 mg, 0,4 mmol) en 3 ml de diclorometano. La solución resultante se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. Se evaporó el solvente bajo presión reducida. El producto deseado, N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}-2-bromoacetamida (175 mg, 85,3%), se aisló luego de una cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano/metanol, 99:1) como un polvo blanco.

Análisis elemental:

Calc.: C 51,53 H 4,72 N 8,19 O 5,76

Encontrado: C 51,28 H 4,99 N 7,92 O

B. Una solución agitada de N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}-2-bromoacetamida (165 mg, 0,42 mmol) y N,N-bis-[S-(4-metoxi-bencil)-2-mercaptoet-1-il]etilendiamina (841,3mg, 2 mmol) (sin-tetizada de acuerdo con Z.P. Zhuang et al., *Bio-conjugate Chem.* (1999), Vol. 10, p. 159) en 1,4-dioxano(5 ml) se calentó bajo reflujo durante 24 horas. La mezcla de reacción resultante se evaporó bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 15 ml de diclorometano y se lavó con solución acuosa saturada de carbonato de sodio. Luego de secar sobre $MgSO_4$ se evaporó el solvente bajo presión reducida. El producto deseado, N-(S-(4-metoxibencil)-2-mercaptoet-1-il)-N-(S-(4´-me-toxibencil)-5-mercapto-3-azapent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicinamida (154 mg, 43%), se aisló luego de una cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano/metanol, 9:1) como un polvo blanco.

Análisis elemental:

Calc.: C 61,99 H 6,50 N 8,22 O 9,38 S 7,52

Encontrado: C 61,71 H 6,58 N 8,03 O S 7,28

C. Se disolvió N-(S-(4-metoxibencil)-2-mercaptoet-1-il)-N-(S(4´-metoxibencil)-5-mercapto-3-azapent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicinamida (140 mg, 0,164 mmol) a 0°C en 5 ml de ácido trifluoroacético. Luego de agregar $Hg(OAc)_2$

(104,5 mg, 0,328 mmol) la mezcla resultante se agitó durante 30 minutos a 0°C y se saturó con H_2S durante 15 min. Luego de filtrar se evaporó el solvente bajo presión reducida. Se trituró el aceite amarillo resultante con 3 ml de éter dietílico. Luego de filtrar se aisló el producto deseado, sal de ácido tris-trifluoracético de N´-(2-mercaptoet-1-il)-N´-(5-mercapto-3-azapent1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicinamida, (126 mg (80,5%), como un polvo blanco.

Análisis elemental:

Calc.:	C 42,79	H 4,44	N 7,34	O 15,09	S 6,72
Encontrado:	C 42,48	H 4,73	N 7,02	O	S 6,76

D. Se disolvieron tartrato disódico (1 mg) y sal de ácido tris-trifluoracético de N´-(2-mercaptoet-1-il)-N´-(5-mercapto-3-azapent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicinamida, (100 µg) en 500 µl de buffer fosfato de sodio (0,1M, pH= 8,5). Luego de agregar 37,5 mBq de eluato generador de ^{99m}Tc, se agregaron 5 µl de solución de cloruro de estaño(II) y se calentó la mezcla durante 10 minutos a 100°C. El análisis por HPLC mostró un pico principal indicando que el producto deseado, complejo de tecnecio-99m de N-(2-mercaptoet-1-il)-N-(5-mercapto-3-azapent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}gli-cinamida, se sintetizó con una RCP> 95%.

Ejemplo 10

Localización inmunohistoquímica de CCR1 en cerebros humanos

Materiales y métodos

Un primer grupo de muestras de tejido provenientes de cerebros obtenidos por autopsia dentro de las 12 horas de la muerte se utilizaron para la tinción inmunohistoquímica del receptor CCR1 de quimioquina en la enfermedad de Alzheimer y cerebros para control. Para todas las tiniciones inmunohistoquímicas e histoquímicas se utilizaron secciones de 5 μm de espesor sin teñir provenientes de la corteza frontal y del hipocampo, incluidas en parafina.

Las preparaciones se desparafinaron en xileno y se hidrataron en solución salina al buffer fosfato con Triton X100 al 0,005% (PBS-T). Para la microscopía óptica (usando DAB como cromógeno) se bloqueó la actividad peroxidasa endógena incubando las preparaciones con H_2O_2 al 0,01% en metanol durante 30 minutos. Se redujo la unión no específica bloqueando con suero normal de cabra al 10% (NGS) en PBS durante 30 minutos. Se diluyeron los anticuerpos primarios [Anti-CCR1 de conejo, (péptido N-terminal); anti-neurofilamento de ratón; anti-GFAP de ratón; anti-Tau de ratón (AT8); anti-CD68 de ratón (clon KP1); anti-β-amiloide de ratón (Boehringer Mannheim, #1 381 431); anti-CCR8 de conejo, (péptido N-terminal)] en PBS-T y las preparaciones se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente. Se completó la tinción usando un kit Biogenex ABC^{MR}. Todos los lavados utilizaron PBS-T. Luego de completar la reacción DAB,

las preparaciones se contratiñeron ligeramente con Hematoxilina de Gill, se deshidrataron y se montaron los cubreobjetos con Permount. Antes de montar los cubreobjetos, algunas preparaciones se re-tiñeron con anticuerpos contra péptido Aβ usando métodos idénticos excepto que el cromógeno fue True Blue^{MR}. Para los estudios de inmunofluorescencia de marcado doble se desparafinaron las preparaciones, se bloquearon con NGS al 10%, y se incubaron durante toda la noche con un cóctel de ambos anticuerpos primarios. Las preparaciones se lavaron con PBS-T y luego se incubaron con un cóctel de anticuerpos secundarios de cabra, cada uno a una dilución 1/50. Para evitar la confusión proveniente de la fluorescencia endógena del tejido (amarillo verdosa),se conjugaron los anticuerpos secundarios tanto con Cy3 (ϵ_{max}= 565nm; cabra-anti-ratón, Amersham) como con Cy5 (ϵ_{max}=700 nm; cabra-anti-conejo, Amersham). Se observaron las preparaciones en un microscopio confocal con un láser criptón-argón (modelo 2010, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Subsiguientemente, se obtuvo un segundo grupo de tejidos cerebrales compuesto de 10 casos de edad avanzada cognitivamente normales y 40 casos provenientes de pacientes de enfermedad de Alzheimer para quienes se hizo una estimación de puntaje de demencia clínica (CDR) y se evaluó su expresión inmunohistoquímica de CCR1. Las muestras se tiñeron para CCR1 y otros marcadores según se describió anteriormente excepto que los anticuerpos monoclonales (clon #6D5) especí-

ficos para $A\beta^{1-42}$ (un marcador para depósitos amiloides difusos, tempranos así como para placas neuríticas más maduras) se obtuvieron de la Dra. Ursula Moenning. Dichos anticuerpos se visualizaron con Vector Red^{MR} (Vector Labs). La Dra. Moenning también proporcionó anticuerpos monoclonales específicos para $A\beta^{1-40}$ (clon #13E9),un marcador para placas encontrado en etapas tardías de enfermedad, que se visualizó con True Blue^{MR}.

Resultados

En ambos conjuntos de cerebros, áreas con patología de la enfermedad de Alzheimer mostraron un patrón de tinción característico. Se encontró inmunorreactividad CCR1 asociada con placas neuríticas (es decir, seniles) tanto en la formación del hipocampo como en la corteza cerebral.

Las estructuras inmunoteñidas eran redondas a ovaladas y usualmente no se asociaban con cuerpos celulares. Las mismas variaban de tamaño y parecían estar llenas de un material granulado punteado. Se encontró que dichas estructuras formaban "coronas" alrededor de los depósitos amiloides en placas seniles, pero eran distintos de los Aβ en sí (Figuras 1-4). La parte superior de la figura 1 muestra una placa neurítica con una corona de procesos positivos ante CCR1. Algunas veces los cuerpos celulares neuronales de algunas neuronas CA1 y CA3 en casos de la enfermedad de Alzheimer resultaron teñidas por anticuerpos CCR1. La última parte de la figura 1 ilustra dicho descubrimiento. Dicha tinción era

diferente de las redes neurofibrilares (NFT) o cuerpos granulovacuolares, aunque normalmente estaba presente en las somas de neuronas con dichos cambios degenerativos.

Según se ilustra en la figura 2, la pre-incubación de anticuerpos con un polipéptido 16-mer de la región extracelular (N-terminal) de la proteína receptora de CCR1 bloqueó completamente toda la tinción de tejido. En particular, la imagen superior en la figura 2 muestra una falta de tinción en cerebro con la enfermedad de Alzheimer con anticuerpos CCR1 pre-incubados con el polipéptido mientras que la imagen inferior de la figura 2 muestra muchas estructuras CCR1-positivas en una sección con las mismas características teñida con anticuerpos no incubados.

Los estudios de marcado doble mostraron que casi todas Según se muestra en la figura 4, las estructuras CCR1-positivas se asociaban con placas neuríticas que contenían $A\beta^{1-42}$. En placas difusas (Figura 5) $A\beta^{1-42}$ no se asociaba típicamente con CCR1 ni con ninguna respuesta celular significativa.En casos más avanzados de enfermedad de Alzheimer, se vieron muchas más placas $A\beta^{1-40}$-positivas. Según se muestra en la figura 3,algunas de las mismas,aunque no todas se asociaban con tinción CCR1. En algunos casos las placas CCR1-positivas se hallaban completamente libres de tinción $A\beta^{1-40}$.

En casos severos de enfermedad de Alzheimer donde se vieron pérdida neuronal y gliosis significativas, los astrocitos reactivos en el subículo y la corteza entorrinal tam-

bién resultaron CCR1-positivos. En casos menos severos, no eran comunes los astrocitos reactivos CCR1-positivos.

La microscopía confocal de secciones doblemente marcadas mostró que la inmunorreactividad CCR1 se co-localizaba con procesos positivos ante neurofilamentos. El marcador macrófago/microglial, CD68, no se asoció con la tinción CCR1, ni tampoco el anticuerpo ATS contra proteína Tau fosforilada anormalmente. Según se esperaba de los estudios de microscopía óptica, la inmunorreactividad CCR1 se co-localizó con GFAP en áreas de astrogliosis.

Los leucocitos presentes dentro de los vasos cerebrales fueron fuertemente positivos ante CCR1 tanto en enfermedad de Alzheimer como en tejidos cerebrales de control, sirviendo como controles internos positivos para los métodos de tinción. Nótese la tinción CCR1-positiva de dos células intravasculares en la figura 5 (flechas). Algún material CCR1-positivo también se muestra con un asterisco, pero en general, las placas difusas no se asocian con CCR1.

Se emprendió una evaluación cuantitativa de la cantidad de estructuras similares a placas CCR1-positivas en el hipocampo, usando tejido del hipocampo del segundo estudio (donde se agruparon los pacientes en categorías clínicas conocidas mediante puntaje CDR). Se llevaron a cabo evaluaciones histológicas de secciones individuales bajo condiciones ciegas con respecto al estado clínico (CDR). Los análisis de volumen se llevaron a cabo usando métodos de computación im-

parciales.

La figura 3 muestra la relación histológica entre neuritas distróficas CCR1-positivas (teñidas en marrón) y una placa neurítica que contiene $A\beta^{1-40}$ (teñida en azul). Nótese que en la figura 3 los procesos CCR1-positivos difieren de los amiloides. Las placas con $A\beta^{1-40}$ eran discretas y se contaron fácilmente, así como los grupos de neuritas CCR1-positivas. Se evaluaron las placas de hipocampo para estimar la cantidad de coronas CCR1-positivas,la cantidad de placas $A\beta^{1-40}$-positivas,y la cantidad de placas que contienen ambos marcadores.

Se contaron las estructuras por región (por ejemplo, CA3, CA1, y subículo) dentro de la formación completa del hipocampo, incluyendo la corteza entorrinal y luego se totalizaron. Los valores son estimaciones relativas de la cantidad de estructuras en el hipocampo según lo representado por secciones transversales de la formación del hipocampo de 5βm de espesor. La figura 6 muestra la relación entre CCR1 y $A\beta^{1-40}$ por puntaje CDR.

La cuantificación de la cantidad de $A\beta^{1-42}$ requirió una técnica diferente porque $A\beta^{1-42}$ era más abundante y formaba placas "difusas" que no se podrían enumerar fácilmente (véase la figura 5). Para dichas placas se utilizó un método asistido por computadora (C.A.S.T. sistema de estereología) para estimar el área de corteza entorrinal ocupada por $A\beta^{1-42}$. Se expresó dicha área como un porcentaje del área total

de corteza sobre la placa. Las áreas ocupadas por placas neuríticas y difusas se contaron por separado. La platina de microscopio manejada por computadora aseguró la evaluación al azar (imparcial) de las secciones de tejido. En la figura 7 se compara el volumen % de corteza entorrinal ocupada por $A\beta^{1-42}$ (tanto difusa como neurítica) con la cantidad de placas CCR1-positivas en una sección de corteza entorrinal con las mismas características.

La figura 6 muestra que en la enfermedad de Alzheimer la cantidad promedio de neuritas distróficas CCR1-positivas en el hipocampo aumenta como una función del puntaje CDR. La cantidad de estructuras positivas en la etapa temprana de la enfermedad de Alzheimer (CDR 0,5) aumenta sobre los niveles de control (CDR 0). Aunque las diferencias entre los grupos de control y de enfermedad de Alzheimer no se hizo estadísticamente significativa hasta el grupo CDR 2, dichos patrones de expresión apoyan la conclusión que CCR1 está regulado en forma ascendente en procesos neuronales distróficos aún en etapas muy tempranas de la enfermedad de Alzheimer. Nótese que la cantidad de placas $A\beta^{1-40}$ no aumenta hasta etapas más tardías de la enfermedad. De esa manera, la expresión CCR1 en tejido cerebral se puede considerar un indicador relativamente temprano de la enfermedad de Alzheimer.

En la figura 7 se muestra la correlación entre la cantidad de placas CCR1-positivas en la corteza entorrina y la cantidad de $A\beta^{1-42}$. En general, los niveles de CCR1 en la

corteza entorrina aumentan a medida que aumenta el estado de enfermedad; sin embargo, el área mostrada es mucho más pequeña que el área que se muestra en la figura 6. Sin embargo, nótese que los niveles de $A\beta^{1-42}$ aumentan en las primeras etapas de la enfermedad.

Ejemplo 11

Estimación de la disponibilidad cerebral, usando un trazador marcado con ^{14}C

Se preparó un análogo de ^{14}C de 1-(5-cloro-2-{2-[(2R)-4-(4-fluorobencil)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea y se utilizó para estudios farmacocinéticos de disponibilidad cerebral. Se inyectaron ratones en forma i.v. a través de venas yugulares encanuladas con el análogo a 36 mg/kg conteniendo 334.000 dpm por dosis. Se sacrificaron los ratones (en grupos de cuatro) a 1, 15, 30, 120, y 1440 minutos luego de la inyección mediante inhalación de CO_2 seguido de punción intracardíaca para eliminar la sangre completa. Luego se les abrió el pecho y los ratones se perfundieron a través del corazón con solución salina al buffer fosfato durante cinco minutos para eliminar la droga radioactiva residual del compartimento de la sangre. Luego se extrajeron los cerebros, se pesaron, y se muestreó la cantidad de radioactividad en dos partes separadas de la corteza cerebral. Se promediaron los niveles radioactividad por mg de tejido en las dos muestras y los datos se normalizaron al peso total del cerebro, según se ilustra en la fi-

gura 8. Las barras representan la desviación estándar (n=4 ratones por punto de tiempo). En particular, el gráfico de la figura 8 muestra que dos horas después de la inyección, el total de la cantidad de desintegraciones por minuto (DPM) para el análogo de ^{14}C en cerebro completo de ratón disminuye hasta niveles despreciables. En el punto de tiempo de un minuto, los cálculos muestran que, en promedio, en el cerebro completo de ratón (peso promedio de 450g) se encuentra aproximadamente un 3% de la dosis inyectada.

También se analizó el contenido radioactivo de las muestras de plasma preparadas con la sangre completa extraída de los ratones. Según se ilustra en la figura 9 se comparó a través del tiempo la cantidad de radioactividad en volúmenes iguales de cerebro y plasma como un porcentaje de la dosis inyectada. El % de dosis inyectada (i.d.) que se encontró por ml de plasma también disminuyó a través del tiempo, alcanzando niveles despreciables luego de dos horas. Para una comparación con los niveles cerebrales, se normalizó la cantidad total de DPM por cerebro a un peso cerebral de un gramo y se expresó como un porcentaje de la i.d. por gramo de tejido cerebral. Nótese que los cerebros ratón pesan un promedio de aproximadamente 450 mg de tal manera que el % de la i.d. en 1g de cerebro de ratón que se muestra en el gráfico sobrestima el valor real en aproximadamente el doble. Es claro que los niveles del análogo en el cerebro caen junto con los niveles en plasma. Aunque el análogo es lipo-

fílico, el cerebro de ratón normal no parece ser un sitio de depósito para el antagonista de CCR1.

Ejemplo 12

Expresión de CCR1 en otras Enfermedades Neurodegenerativas

Materiales y Métodos

Se obtuvieron muestras histológicas de tejido cerebral de autopsia de un total de 29 casos provenientes de siete enfermedades neurodegenerativas diferentes (distintas de la enfermedad de Alzheimer pura) y se estudió el contenido de CCR1. Se inmunotiñieron las placas con anticuerpos contra CCR1 según se describe en el ejemplo 10 citado anteriormente y se revisaron con respecto a la enfermedad neurodegenerativa específica bajo condiciones ciegas. Subsiguientemente, secciones con las mismas características se marcaron doblemente con anticuerpos contra CCR1 (DAB como cromógeno) y $A\beta^{4-2}$ (Vector Red^{MR} como cromógeno).

La enfermedades examinadas se mencionan abajo:

Enfermedad de Parkinson (PD)	6 casos
Demencia parkinsoniana de Guam	3 casos
Angiopatía congofílica	4 casos
Demencia multi-infarto (MID)	4 casos
Demencia con cuerpos de Lewy difusos (DLBD)	4 casos
Enfermedad de Pick	4 casos
Parálisis progresiva supranuclear (PSP)	4 casos

Se clasificó el contenido de CCR1 y $A\beta^{4-2}$ de las placas teñidas usando una escala histológica de 0 a 4, con 0 como

ausencia de tinción, 0,5 indicando expresión rara, y grados 1 hasta 4 indicando niveles de expresión en aumento con 4 como muy abundante.

Resultados

Los seis casos de enfermedad de Parkinson y los tres casos de demencia parkinsoniana de Guam fueron negativos para CCR1. En los 4 casos de angiopatía congofílica, en 3 de los 4 casos de DLBD, en 2 de los 4 casos de PSP, y en 1 de los 4 casos tanto de MID como de enfermedad de Pick, se observaron estructuras similares a placas positivas ante CCR1, similares a las encontradas en la enfermedad de Alzheimer. Los estudios de marcado doble confirmaron la suposición que dichas estructuras similares a placas positivas ante CCR1 se asociaban con $A\beta^{4-2}$, según se encontró en casos puros de enfermedad de Alzheimer (Ejemplo 10). La figura 10 muestra los resultados de las evaluaciones patológicas en forma gráfica para todas las enfermedades excepto para la de Parkinson (que es negativa ante CCR1 en cerebro). Básicamente, nunca se encontró expresión CCR1 en muestras de tejido cerebral a no ser que también resultaran presentes placas neuríticas positivas ante $A\beta^{4-2}$.

Después de la ruptura del código, se descubrió que el caso de enfermedad de Pick que mostraba expresión CCR1 también llevaba el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer. Los dos casos de PSP con CCR1 también resultaron diagnosticados con enfermedad de Alzheimer concurrente. La angiopatía con-

gofílica y DLBD son enfermedades que se asocian estrechamente con la patología de la enfermedad de Alzheimer.

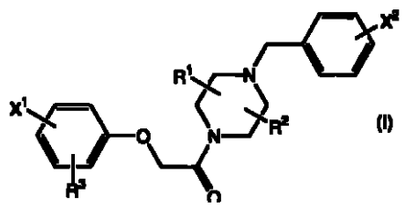
Por lo tanto, no es sorprendente que también podrían tener altos niveles de expresión CCR1 asociados con $A\beta^{4-2}$. En poblaciones de edad avanzada frecuentemente se da el caso que la patología de la enfermedad de Alzheimer enmascara otros procesos de enfermedad. Se encontró que esto sucedía en uno de cada cuatro casos de MID. Dichos resultados sugieren que CCR1 es un marcador que se asocia estrechamente con la patología de la enfermedad de Alzheimer (específicamente, placas neuríticas $A\beta^{4-2}$-positivas) dejando de lado otros procesos patológicos concurrentes que pueden estar presentes en el cerebro. Como tal, es probable que sea altamente específico para la patología de la enfermedad de Alzheimer y por lo tanto puede ser útil como un marcador sustituto para diagnosticar el progreso de la enfermedad.

Como se ha descrito la presente invención con referencia a las formas de realización específicas de las mismas, aquellos experimentados en el arte deberían comprender que se pueden hacer diferentes cambios y se pueden sustituir equivalentes sin apartarse del verdadero espíritu y alcance de la invención. Además, se pueden hacer muchas modificaciones para adaptar una situación en particular, material, composición de materia, proceso, paso o pasos de proceso, al objetivo, espíritu y alcance de la presente invención. Todas dichas modificaciones se encuentran dentro del alcance de

las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto, CARACTERIZADO PORQUE es de fórmula (I):



(I)

donde:

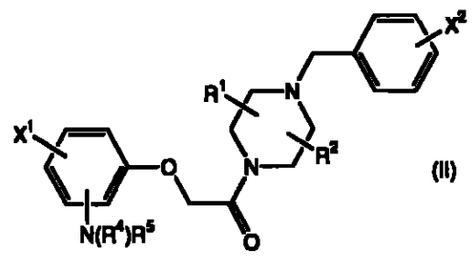
X^1 y X^2 son cada uno, independientemente entre sí, halo;

R^1 y R^2 son cada uno, independientemente entre sí, hidrógeno o alquilo; y

R^3 es hidrógeno, amina, monoalquilamina, dialquilamina, monoaralquilamina, alquilcarbonilamina, alquenilcarbonilamina, haloalquilcarbonilamina, arilcarbonilamina, alcoxialquilcarbonilamina, alcoxicarbonilalquilcarbonilamina, glicinamida, monoalquilglicinamida, arilcarbonilglicinamida, aminocarbonilglicinamida, (aminocarbonil)(alquil)glicinamida, (alcoxialquilcarbonil)glicinamida, ureido, monoalquilureido, monoarilureido, monoaralquilureido o alaninamida;

y donde cualquiera de X^1 o X^2 se selecciona del grupo formado por ^{123}I, ^{125}I, ^{128}I, ^{131}I, ^{75}Br, ^{78}Br, ^{80}Br y ^{18}F; o donde uno de los átomos de carbono en el compuesto es ^{11}C; o una sal aceptable para uso farmacéutico de los mismos.

2. Un compuesto, CARACTERIZADO PORQUE es de fórmula (II):



(II)

donde

X^1 y X^2 son cada uno, independientemente entre sí, halo;

R^1 y R^2 son cada uno, independientemente entre sí, hidrógeno o alquilo; y

R^4 es hidrógeno; y

R^5 comprende un quelante capaz de unirse a un átomo de metal radioactivo seleccionado del grupo formado por ^{99m}Tc, ^{186}Re y ^{188}Re; o como un complejo con ^{99m}Tc, ^{186}Re y ^{188}Re; o una sal aceptable para uso farmacéutico de los mismos.

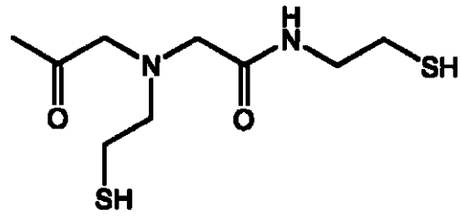
3. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE dicho compuesto se une al receptor de la quimioquina CCR1 y atraviesa la barrera hematoencefálica.

4. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE R^1 es metilo en la posición 2 del radical piperazinilo y R^2 es metilo en la posición 5 del radical piperazinilo.

5. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE R^1 es metilo en la posición 2 del radical piperazinilo y R^2 es hidrógeno.

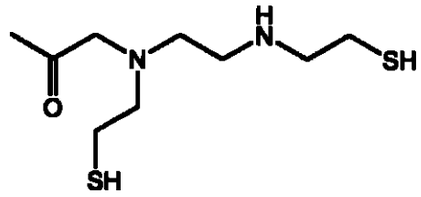
6.El compuesto de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE X^1 es cloro en la posición 4 del radical fenilo y X^2 es un átomo de 18 F en la posición 4 del radical fenilo.

7.El compuesto de la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE R^5 es un quelante de fórmula (III):



(III)

8.El compuesto de la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE R^5 es un quelante de fórmula (IV):



(IV)

9.El compuesto de la reivindicación 7 o de la reivindicación 8, CARACTERIZADO PORQUE R^5 además comprende un grupo ligador que comprende un radical alquilo que tiene uno a diez átomos de carbono, donde el radical alquilo contiene optativamente uno a diez grupos -C(O)-, uno a diez grupos -C(O)N(R)-, uno a diez grupos -N(R)C(O)-, uno a diez grupos -N(R)-, uno a diez grupos $-N(R)_2$, uno a diez grupos hidroxi, uno a diez grupos -C(O)O-, uno a diez átomos de oxígeno, uno a diez átomos de azufre, uno a diez átomos de nitrógeno, uno a diez átomos de halógeno, uno a diez grupos arilo y uno a diez anillos heterocíclicos saturados o insaturados, donde R

es hidrógeno o alquilo.

10. El compuesto de la reivindicación 9, CARACTERIZADO PORQUE el grupo ligador es $-C(O)-CH_2-N(H)$.

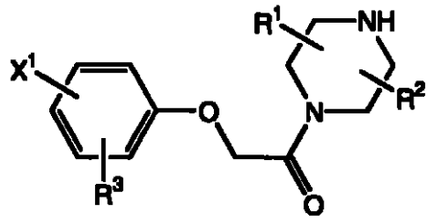
11. Una sal monoclorhidrato, CARACTERIZADA PORQUE es de un compuesto de la reivindicación 1 a la reivindicación 10.

12. Una sal diclorhidrato, CARACTERIZADA PORQUE es de un compuesto de la reivindicación 1 a la reivindicación 10.

13. Un método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un ser humano, CARACTERIZADO PORQUE comprende la administración a un ser humano que necesita dicho diagnóstico de una compuesto acorde con la reivindicación 1 a 12 y la medición de la radioactividad producida por la administración del compuesto a dicho ser humanos, ya sea mediante cámara gamma o tomografía de emisión de positrones (PET).

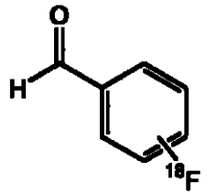
14. Un método para usar un compuesto acorde con la reivindicación 1 a 12, CARACTERIZADO PORQUE es para la elaboración de un producto radiofarmacéutico destinado al diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un ser humano.

15. Un proceso para producir un compuesto de fórmula (I) acorde con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (f):



(f)

donde R^1, R^2, R^3, y X^1 son como se definieron en la reivindicación 1, con un compuesto de fórmula (b):



(b)

en presencia de un agente reductor.

Radiopharmaceuticals for Diagnosing Alzheimer's Disease

Field of the invention

The present invention relates to novel radiopharmaceuticals useful for the diagnosis of Alzheimer's disease.

Brief description of the background art

Alzheimer's disease is a severe neurodegenerative disorder, and currently about 4 million Americans suffer from this disease. As the aging population continues to grow, this number could reach 14 million by the middle of next century unless a cure or prevention is found. At present, there is no sensitive and specific premortem test for early diagnosis of this disease. Alzheimer's disease is currently diagnosed based on the clinical observation of cognitive decline, coupled with the systematic elimination of other possible causes of those symptoms. The confirmation of the clinical diagnosis of "probable Alzheimer's disease" can only be made by examination of the postmortem brain. The Alzheimer's disease brain is characterized by the appearance of two distinct abnormal proteinaceous deposits in regions of the brain responsible for learning and memory (*e.g.*, cerebral cortex and hippocampus). These deposits are extracellular amyloid plaques, which are characteristic of Alzheimer's disease, and intracellular neurofibillary tangles (NFTs), which can be found in other neurodegenerative disorders as well. Amyloid peptides are typically either 40 or 42 amino acids in length ("$A\beta^{1-40}$" or "$A\beta^{1-42}$", respectively) and are formed from abnormal processing of a larger membrane-associated protein of unknown function, the amyloid precurser protein ("APP"). Oligomeric aggregates of these peptides are thought to be neurotoxic, eventually resulting in synaptic degeneration and neuronal loss. The amount of amyloid deposition roughly correlates with the severity of symptoms at the time of death.

In the past, there have been several attempts for the design of radiopharmaceuticals that could be used as diagnostic agents for a premortem diagnosis of Alzheimer's disease.

Bornebroek *et al.* showed that the amyloid-associated protein serum amyloid P

component (SAP), labeled with ^{123}I, accumulates at low levels in the cerebral cortex, possibly in vessel walls, of patients with cerebral amyloidosis (Bomebroek, M., *et al.*, *Nucl. Med. Commun.* (1996), Vol. 17, pp. 929-933).

Saito *et al.* proposed a vector-mediated delivery of ^{125}I-labeled $A\beta^{1-40}$ through the blood-brain barrier. It is reported that the iodinated $A\beta^{1-40}$ binds Aβ amyloid plaque in tissue sections (Saito, Y., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995*, Vol. 92, pp.10227-10231).

U.S. Patent No. 5,231,000 discloses antibodies with specificity to A4 amyloid polypeptide found in the brain of Alzheimer's disease patients. However, a method to deliver these antibodies across the blood-brain barrier has not been described.

Zhen *et al.* described modifications of the amyloid-binding dye known as "Congo Red™", and complexes of these modified molecules with technetium and rhenium. The complexes with radioactive ions are purported to be potential imaging agents for Alzheimer's disease (Zhen *et al.*, *J. Med. Chem.*(1999), Vol. 42, pp. 2805-2815). However, the potential of the complexes to cross the blood-brain barrier is limited.

A group at the University of Pennsylvania in the U.S.A. (Skovronsky, M., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. 2000*, Vol. 97, pp.7609-7614) has developed a fluorescently labeled derivative of Congo Red that is brain permeable and that non-specifically binds to amyloid materials (that is, peptides in β-pleated sheet conformation). This compound would need to be radiolabeled and then run through pre-clinical screens for pharmacokinetics and toxicity before clinical testing.

Klunk *et al.* reported experiments with a derivative of Congo Red™, Chrysamine G (CG). It is reported that CG binds synthetic β-amyloid well *in vitro*, and crosses the blood-brain barrier in normal mice (Klunk *et al.*, *Neurobiol. Aging* (1994), Vol. 15, No. 6, pp. 691-698).

Bergström *et al.* presented a compound labeled with iodine-123 as a potential radioligand for visualization of M_1 and M_2 muscarinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease (Bergström *et al.*, *Eur. J. Nucl. Med.* (1999), Vol. 26, pp. 1482-1485).

Recently, it has been discovered that certain specific chemokine receptors are upregulated in the brains of patients with Alzheimer's disease (Horuk, R. *et al.*, *J. Immunol.* (1997), Vol. 158, pp. 2882-2890); Xia *et al.*, *J. NeuroVirol.* (1999), Vol. 5, pp. 32-41). In

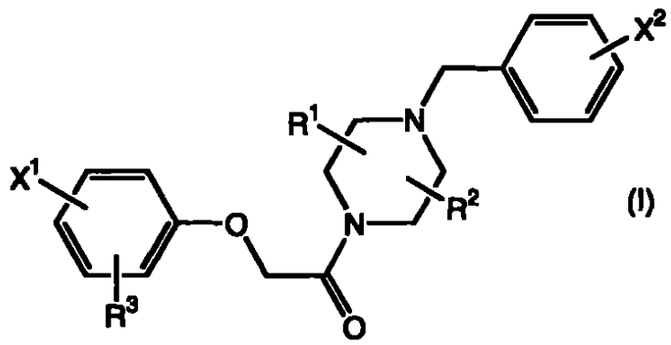
addition, it has been shown recently that the chemokine receptor CCR1 is upregulated in the brains of patients with advanced Alzheimer's disease and absent in normal-aged brains (Halks-Miller *et al, CCR1 Immunoreactivity in Alzheimer's Disease Brains*, Society for Neuroscience Meeting Abstract, #787.6, Volume 24, 1998). Antagonists to the CCR1 receptor and their use as anti-inflammatory agents are described in the PCT Published Patent Application, WO 98/56771.

None of the above described proposals have resulted in a clinical development of an imaging agent for the early diagnosis of Alzheimer's disease. Accordingly, there is still a clinical need for a diagnostic agent that could be used for a reliable and early diagnosis of Alzheimer's disease.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is directed to radiopharmaceuticals that bind to the CCR1 receptor and are able to pass through the blood-brain barrier, and are therefore useful in diagnosing Alzheimer's disease, preferably at an early stage of the disease.

Accordingly, in one aspect, the invention is directed to compounds of formula (I):



(I)

wherein:

X^1 and X^2 are each independently halo;

R^1 and R^2 are each independently hydrogen or alkyl; and

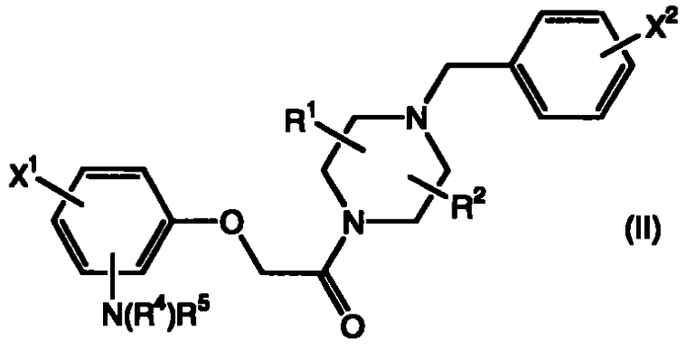
R^3 is hydrogen, amino, monoalkylamino, dialkylamino, monoaralkylamino, alkylcarbonylamino, alkenylcarbonylamino, haloalkylcarbonylamino, arylcarbonylamino, alkoxyalkylcarbonylamino, alkoxycarbonylalkylcarbonylamino,

glycinamido, monoalkylglycinamido, arylcarbonylglycinamido, aminocarbonylglycinamido, (aminocarbonyl)(alkyl)glycinamido, (alkoxyalkylcarbonyl)glycinamido, ureido, monoalkylureido, monoarylureido, monoaralkylureido, or alaninamido;

and wherein either one of X^1 or X^2 is selected from the group of ^{123}I, ^{125}I, ^{128}I, ^{131}I, ^{75}Br, ^{76}Br, ^{80}Br and ^{18}F; or wherein one of the carbon atoms in the compound is ^{11}C;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

In another aspect, the invention is directed to compounds of formula (II):



(II)

wherein

X^1 and X^2 are each independently halo;

R^1 and R^2 are each independently hydrogen or alkyl; and

R^4 is hydrogen; and

R^5 comprises a chelator capable of binding a radioactive metal atom chosen from the group of ^{99m}Tc, ^{186}Re and ^{188}Re;

or as a complex with ^{99m}Tc, ^{186}Re and ^{188}Re;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

In another aspect, this invention is directed to a method of diagnosing Alzheimer's disease in a human which comprises administering to a human in need of such diagnosis a compound of formula (I) or formula (II), as described above and herein, and measuring the radioactivity arising from the administration of the compound to the human either by using a gamma camera or by positron emission tomography (PET).

In another aspect, the invention is directed to a method of using a compound of the

invention for the manufacture of a radiopharmaceutical for the diagnosis of Alzheimer's disease in a human.

In another aspect, the invention is directed to a method of preparing compounds of the invention.

Brief Description of the Figures

Figure 1 shows the expression of CCR1 in Alzheimer's disease brain tissue .

Figure 2 shows CCR1 antibody specificity in Alzheimer's disease brain tissue.

Figure 3 shows CCR1-$A\beta^{1-40}$ double-labeled tissue sections

Figure 4 shows neuritic plaques double-labeled for CCR1 and $A\beta^{1-42}$.

Figure 5 shows diffuse $A\beta^{1-42}$ staining in Alzheimer's disease brain.

Figure 6 is a graph showing the relationship between CCR1 and $A\beta^{1-40}$ by CDR score.

Figure 7 is a graph showing the relationship between CCR1 and $A\beta^{1-42}$ by CDR score.

Figure 8 is a graph demonstrating the decrease in total brain radioactivity over time.

Figure 9 is a graph showing the percent of injected dose in brain and plasma.

Figure 10 are graphs showing CCR1 expression in other neurodegenerative diseases.

Detailed Description of the Invention

Definitions

As used in the specification and appended claims, unless specified to the contrary, the following terms have the meaning indicated:

"Alkyl" refers to a straight or branched chain monovalent or divalent radical consisting solely of carbon and hydrogen, containing no unsaturation and having from one to eight carbon atoms, *e.g.*, methyl, ethyl, *n*-propyl, 1-methylethyl (*iso*-propyl), *n*-butyl, *n*-pentyl, 1,1-dimethylethyl (*t*-butyl), *n*-heptyl, and the like.

"Alkylcarbonylamino" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-R_a where R_a is an alkyl radical as defined above, *e.g.*, acetylamino, ethylcarbonylamino, *n*-propylcarbonylamino, and the like.

"Alkenyl" refers to a straight or branched chain monovalent or divalent radical

consisting solely of carbon and hydrogen, containing at least one double bond and having from two to eight carbon atoms, *e.g.*, ethenyl, prop-1-enyl, but-1-enyl, pent-1-enyl, penta-1,4-dienyl, and the like.

"Alkenylcarbonylamino" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-R_c where R_c is an alkenyl radical as defined above, *e.g.*, ethenylcarbonylamino, prop-2-enylcarbonylamino, but-2-enylcarbonylamino, and the like.

"Alkoxy" refers to a radical of the formula -OR_a where R_a is an alkyl radical as defined above, *e.g.*, methoxy, ethoxy, *n*-propoxy, 1-methylethoxy (*iso*-propoxy), *n*-butoxy, *n*-pentoxy, 1,1-dimethylethoxy (*t*-butoxy), and the like.

"Alkoxycarbonylalkylcarbonylamino" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-R_a-C(O)OR_a where each R_a is independently an alkyl radical as defined above, *e.g.*, ethoxycarbonylmethylcarbonylamino, methoxycarbonylmethylcarbonylamino, (2-ethoxycarbonylethyl)carbonylamino, (2-methoxycarbonylethyl)carbonylamino, and the like.

"(Alkoxyalkylcarbonyl)glycinamido" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-CH_2-N(H)-C(O)-R_a-O-R_a where each R_a is independently an alkyl radical as defined above, *e.g.*, (methoxyacetyl)glycinamido, (ethoxyacetyl)glycinamido, and the like.

"Amino" refers to the radical -NH_2.

"Aminocarbonylglycinamido" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-CH_2-N(H)-C(O)-NH_2.

"(Aminocarbonyl)(alkyl)glycinamido" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-CH_2-N(R_a)-C(O)-NH_2 where R_a is an alkyl radical as defined above.

"Aryl" refers to a phenyl or naphthyl radical. Unless stated otherwise specifically in the specification, the term "aryl" or the prefix "ar-" (such as in "aralkyl") is meant to include aryl radicals optionally substituted by one or more substituents selected from the group consisting of halo, alkyl, alkoxy, haloalkyl, haloalkoxy, nitro, amino, monoalkylamino, and dialkylamino, as defined herein.

"Arylcarbonylamino" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-R_b where R_b is an aryl radical as defined above, *e.g.*, (4-methoxyphenyl)carbonylamino, (4-fluorophenyl)carbonylamino, (4-chlorophenyl)carbonylamino, and the like.

"Arylcarbonylglycinamido" refers to a radical of the formula

-N(H)-C(O)-CH_2-N(H)-C(O)-R_b where R_b is an aryl radical as defined above, *e.g.*, phenylcarbonylglycinamido, (4-fluoro-3-trifluoromethylphenyl)carbonylglycinamido, (4-fluorophenyl)carbonylglycinamido, and the like.

"Aralkyl" refers to a radical of the formula -R_aR_b where R_a is an alkyl radical as defined above and R_b is an aryl radical as defined above, *e.g.*, benzyl, and the like.

"Alkoxyalkylcarbonylamino" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-R_a-O-R_a where each R_a is an alkyl radical as defined above, *e.g.*, methoxymethylcarbonylamino, ethoxyethylcarbonylamino, methoxyethylcarbonylamino, and the like.

"Alaninamido" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-C(CH_3)H-NH_2.

"Benzyl" refers to a radical of the formula -CH_2-R_h where R_h is a phenyl radical optionally substituted by one or more substituents selected from the group consisting of halo, alkyl, haloalkyl, alkoxy, nitro, amino, monoalkylamino, and dialkylamino.

"Dialkylamino" refers to a radical of the formula -N(R_a)R_a where each R_a is independently an alkyl radical as defined above, *e.g.*, dimethylamino, methylethylamino, diethylamino, dipropylamino, ethylpropylamino, and the like.

"Glycinamido" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-CH_2-NH_2.

"Halo" refers to bromo, chloro, iodo or fluoro.

"Haloalkyl" refers to an alkyl radical, as defined above, that is substituted by one or more halo radicals, as defined above, *e.g.*, trifluoromethyl, difluoromethyl, trichloromethyl, 2-trifluoroethyl, 1-fluoromethyl-2-fluoroethyl, 3-bromo-2-fluoropropyl, 1-bromomethyl-2-bromoethyl, and the like.

"Haloalkylcarbonylamino" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-R_f where R_f is an haloalkyl radical as defined above, *e.g.*, trifluoromethylcarbonylamino, trifluoromethylcarbonylamino, 2-bromoethylcarbonylamino, and the like.

"Monoalkylamino" refers to a radical of the formula -N(H)R_a where R_a is an alkyl radical as defined above, *e.g.*, methylamino, ethylamino, propylamino, and the like.

"Monoaralkylamino" refers to a radical of the formula -N(H)R_d where R_d is an aralkyl radical as defined above, *e.g.*, benzylamino, (3,4,5-trimethoxybenzyl)amino, (4-chlorobenzyl)amino,and the like.

"Monoalkylglycinamido" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-CH_2-N(H)R_a

where R_a is an alkyl radical as defined above.

"Monoalkylureido" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-N(H)R_a or a radical of the formula -N(R_a)-C(O)-NH_2 where R_a is an alkyl radical as defined above.

"Monoarylureido" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-N(H)R_b or a radical of the formula -N(R_b)-C(O)-NH_2 where R_b is an aryl radical as defined above

"Monoaralkylureido" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-N(H)R_d or a radical of the formula -N(R_d)-C(O)-NH_2 where R_d is an aralkyl radical as defined above.

"Optional" or "optionally" means that the subsequently described event of circumstances may or may not occur, and that the description includes instances where said event or circumstance occurs and instances in which it does not. For example, "optionally substituted aryl" means that the aryl radical may or may not be substituted and that the description includes both substituted aryl radicals and aryl radicals having no substitution.

"Pharmaceutically acceptable salt" includes both acid and base addition salts.

"Pharmaceutically acceptable acid addition salt" refers to those salts which retain the biological effectiveness and properties of the free bases, which are not biologically or otherwise undesirable, and which are formed with inorganic acids such as hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid, nitric acid, phosphoric acid and the like, and organic acids such as acetic acid, propionic acid, pyruvic acid, maleic acid, malonic acid, succinic acid, fumaric acid, tartaric acid, citric acid, benzoic acid, mandelic acid, methanesulfonic acid, ethanesulfonic acid, *p*-toluenesulfonic acid, salicylic acid, and the like. Particularly preferred salts of compounds of the invention are the monochloride salts and the dichloride salts.

"Pharmaceutically acceptable base addition salt" refers to those salts which retain the biological effectiveness and properties of the free acids, which are not biologically or otherwise undesirable. These salts are prepared from addition of an inorganic base or an organic base to the free acid. Salts derived from inorganic bases include, but are not limited to, the sodium, potassium, lithium, ammonium, calcium, magnesium, zinc, aluminum salts and the like. Preferred inorganic salts are the ammonium, sodium, potassium, calcium, and magnesium salts. Salts derived from organic bases include, but are not limited to, salts of primary, secondary, and tertiary amines, substituted amines including naturally occurring substituted amines, cyclic amines and basic ion exchange resins, such as isopropylamine,

trimethylamine, diethylamine, triethylamine, tripropylamine, ethanolamine, 2-dimethylaminoethanol, 2-diethylaminoethanol, trimethamine, dicyclohexylamine, lysine, arginine, histidine, caffeine, procaine, hydrabamine, choline, betaine, ethylenediamine, glucosamine, methylglucamine, theobromine, purines, piperazine, piperidine, *N*-ethylpiperidine, polyamine resins and the like. Particularly preferred organic bases are isopropylamine, diethylamine, ethanolamine, trimethylamine, dicyclohexylamine, choline and caffeine.

"Ureido" refers to a radical of the formula -N(H)-C(O)-NH_2.

It is understood from the above definitions and examples that for radicals containing a substituted alkyl group any substitution thereon can occur on any carbon of the alkyl group.

The compounds of the invention, or their pharmaceutically acceptable salts, may have asymmetric carbon atoms in their structure. The compounds of the invention and their pharmaceutically acceptable salts may therefore exist as single enantiomers, diastereoisomers, racemates, and mixtures of enantiomers and diastereomers. All such single enantiomers, diastereoisomers, racemates and mixtures thereof are intended to be within the scope of this invention. Absolute configuration of certain carbon atoms within the compounds, if known, are indicated by the appropriate absolute descriptor *R* or *S*.

Utility and Administration

The compounds of the invention as described herein are antagonists to the chemokine receptor known as CCR1 and have the ability to pass the blood-brain barrier. The compounds are therefore suited as *in vivo* diagnostic agents for imaging of Alzheimer's disease. The detection of radioactivity is performed according to well-known procedures in the art, either by using a gamma camera or by positron emission tomography (PET).

Preferably, the free base or a pharmaceutically acceptable salt form, e.g. a monochloride or dichloride salt, of a compound of the invention used in a galenical formulation as diagnostic agent. The galenical formulation containing the compound of the invention optionally contains adjuvants known in the art, e.g. buffers, sodium chloride, lactic acid, surfactants etc. A sterilization by filtration of the galenical formulation under

sterile conditions prior to usage is possible.

The radioactive dose should be in the range of 1 to 100 mCi, preferably 5 to 30 mCi, and most preferably 5 to 20 mCi per application.

Testing

The suitability of the compounds as imaging agents for Alzheimer's disease can be demonstrated by experimental protocols known to those of ordinary skill in the art. For example, the upregulation of CCR1 receptors in Alzheimer's disease brains can be demonstrated in immunohistochemical staining experiments of autopsy brain tissue collected from Alzheimer's disease patients as described in detail below in the Examples. The ability of the compounds of the invention to bind to the CCR1 receptor and their ability to pass through the blood-brain barrier, can also be assessed in known *in vitro* and *in vivo* assays as described below in the Examples. In particular, Example 10 describes a large study that was undertaken to address the degree of CCR1 expression in different stages of Alzheimer's disease. Brain tissue from 50 autopsy cases showed a correlation between degree of clinical severity (dementia) in Alzheimer's disease and CCR1 expression in dystrophic neurites. CCR1 expression in plaque-like structures within the brains of clinically normal individuals is rare. Also, CCR1 expression is not found in the brains of individuals with other neurodegenerative diseases unless there is a concomitant Alzheimer's disease pathology (specifically, $A\beta^{1-42}$ in plaques).

Preferred Embodiments

Of the various aspects of the invention, certain compounds of formula (I) are preferred. In particular, compounds of formula (I) wherein X^1 is a chloro at the 4-position of the phenyl ring and X^2 is a ^{18}F atom at the 4-position of the phenyl ring are preferred. Especially preferred are such compounds for use as diagnostic agents in positron emission tomography (PET).

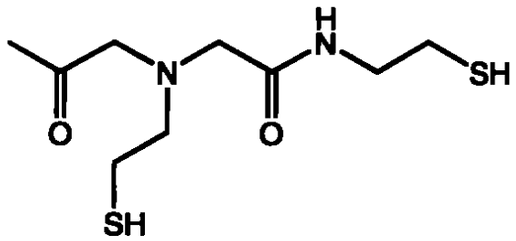
Even more preferred are those compounds of formula (I) wherein R^3 is in the 2-position of the phenyl ring and R^1 is a methyl at the 2-position of the piperazinyl ring and R^2 is a methyl at the 5-position of the piperazinyl ring. Equally preferred are those

compounds of formula (I) wherein R^3 is in the 2-position of the phenyl ring and R^1 is a methyl in the 2-position of the piperazinyl ring and R^2 is hydrogen.

Further preferred are these preferred compounds in their mono- or dichloride salt form.

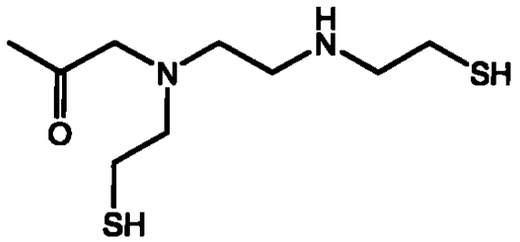
Of the various aspects of the invention, certain compounds of formula (II) are preferred. In particular, compounds of formula (II) wherein $-N(R^4)R^5$ is in the 2-position of the phenyl ring and R^1 is in the 2-position of the piperazinyl ring and R^2 is in the 5-position of the piperazinyl ring. Equally preferred are those compounds of formula (II) wherein $-N(R^4)R^5$ is in the 2-position of the phenyl ring and R^1 is a methyl in the 2-position of the piperazinyl ring and R^2 is hydrogen.

Even more preferred are those compounds of formula (II) wherein R^5 comprises a chelator according to formula (III):



(III)

or formula (IV):



(IV)

as well as their complexes with ^{99m}Tc, ^{186}Re and ^{188}Re. Of these preferred compounds, even more preferred are those compounds of formula (II) wherein R^5 comprises a chelator according to formula (III) or (IV), and wherein the chelator is bound to the nitrogen in the $-N(R^4)R^5$ group of the non-radioactive compound of formula (II) via a linker moiety comprising an alkyl radical having one to ten carbon atoms, wherein the alkyl radical optionally contains one to ten -C(O)-groups, one to ten -C(O)N(R)- groups, one to ten -N(R)C(O)- groups, one to ten -N(R)- groups, one to ten $-N(R)_2$ groups, one to ten hydroxy groups, one to ten -C(O)OR-

groups, one to ten oxygen atoms, one to ten sulfur atoms, one to ten nitrogen atoms, one to ten halogen atoms, one to ten aryl groups, and one to ten saturated or unsaturated heterocyclic rings wherein R is hydrogen or alkyl. A preferred linker moiety is -C(O)-CH_2-N(H)-.

Of the compounds of the invention, the most preferred compounds of formula (I) are those compounds selected from the group consisting of the following:

1-(5-chloro-2-{2-[(2*R*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

N'-(mercaptoeth-1-yl)-*N'*-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycylglycinamide, technetium-99m-complex;

1-(2-{2-[(2*R*)-4-(4-fluorobenzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}-5-iodo-^{123}*I*-phenyl)urea;

N'-(2-mercaptoeth-1-yl)-*N'*-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycinamide, technetium-99m-complex;

N-(2-mercaptoeth-1-yl)-*N*-(5-mercapto-3-azapent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycinamide, technetium-99m-complex;

2-(2-amino-4-chlorophenoxy)-1-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]ethan-1-one;

2-(2-amino-4-chlorophenoxy)-1-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]ethan-1-one;

2-(2-amino-4-chlorophenoxy)-1-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]ethan-1-one;

2-(2-amino-4-chlorophenoxy)-1-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]ethan-1-one;

2-[4-chloro-2-(diethylamino)phenoxy]-1-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]ethan-1-one;

2-[4-chloro-2-(diethylamino)phenoxy]-1-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]ethan-1-one;

2-[4-chloro-2-(diethylamino)phenoxy]-1-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]ethan-1-one;

2-[4-chloro-2-(diethylamino)phenoxy]-1-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]ethan-1-one;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-(2,4-dichlorophenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-(2,4-dichlorophenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-(2,4-dichlorophenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-(2,4-dichlorophenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5,-dimethylpiperazin-1-yl]-2-(2-isopentylamino-4-chlorophenoxy)ethan-1-one;

1-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5,-dimethylpiperazin-1-yl]-2-(2-isopentylamino-4-chlorophenoxy)ethan-1-one;

1-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5,-dimethylpiperazin-1-yl]-2-(2-isopentylamino-4-chlorophenoxy)ethan-1-one;

1-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5,-dimethylpiperazin-1-yl]-2-(2-isopentylamino-4-chlorophenoxy)ethan-1-one;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-methylpropanamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-methylpropanamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-methylpropanamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-methylpropanamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(methoxy)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(methoxy)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(methoxy)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(methoxy)acetamide;

(*E*)-*N*-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-butenamide;

(*E*)-*N*-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-butenamide;

(*E*)-*N*-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-butenamide;

(*E*)-*N*-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-butenamide;

methyl *N*-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)succinamate;

methyl *N*-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)succinamate;

methyl *N*-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)succinamate;

methyl *N*-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)succinamate;

ethyl *N*-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)succinamate;

ethyl *N*-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)succinamate;

ethyl *N*-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)succinamate;

ethyl *N*-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)succinamate;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)propanamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)propanamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)propanamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)propanamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-fluorobenzamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-fluorobenzamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-fluorobenzamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-fluorobenzamide;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-(p-tolyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-(p-tolyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-(p-tolyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-(p-tolyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-ethylurea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-ethylurea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-ethylurea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-ethylurea;

1-benzyl-3-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-benzyl-3-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-benzyl-3-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-benzyl-3-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-(4-nitrophenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-(4-nitrophenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-(4-nitrophenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-3-(4-nitrophenyl)urea;

2-(2-benzylamino-4-chlorophenoxy)-1-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]ethan-1-one;

2-(2-benzylamino-4-chlorophenoxy)-1-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]ethan-1-one;

2-(2-benzylamino-4-chlorophenoxy)-1-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]ethan-1-one;

2-(2-benzylamino-4-chlorophenoxy)-1-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]ethan-1-one;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)glycinamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)glycinamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)glycinamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)glycinamide;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*R*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

1-(5-chloro-2-{2-[(2*S*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethyl-piperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(methylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethyl-piperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(methylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethyl-piperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(methylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethyl-piperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(methylamino)acetamide;

2-bromo-*N*-(5-chloro-2-{(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)acetamide;

2-bromo-*N*-(5-chloro-2-{(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)acetamide;

2-bromo-*N*-(5-chloro-2-{(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)acetamide;

2-bromo-*N*-(5-chloro-2-{(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(ureido)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(ureido)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(ureido)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(ureido)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(1-methylureido)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(1-methylureido)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(1-methylureido)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(1-methylureido)acetamide;

(2*RS*)-*N*-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-aminopropanamide;

(2*SR*)-*N*-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-aminopropanamide;

(2*RS*)-*N*-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-aminopropanamide;

(2*SR*)-*N*-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-aminopropanamide;

(2*RS*)-*N*-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-aminopropanamide;

(2*SR*)-*N*-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-aminopropanamide;

(2*RS*)-*N*-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-aminopropanamide;

(2*SR*)-*N*-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-aminopropanamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(2,4-difluorobenzoylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(2,4-difluorobenzoylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(2,4-difluorobenzoylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(2,4-difluorobenzoylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(methoxyacetylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(methoxyacetylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(methoxyacetylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(methoxyacetylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(2-iodobenzoylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*RS*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(2-iodobenzoylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*SR*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(2-iodobenzoylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*RS*,5*SR*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2,5-dimethylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)-2-(2-iodobenzoylamino)acetamide;

N-(5-chloro-2-{2-[(2*R*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)glycinamide; and

N-(5-chloro-2-{2-[(2*S*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)glycinamide;

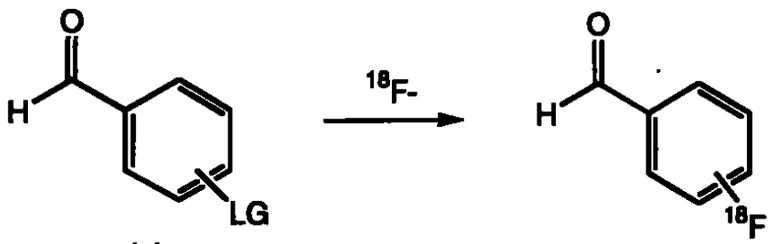
as well as the mono- and dichloride salts thereof.

Preparation of the Compounds of the Invention

A. Preparation of Compounds of Formula (I)

In general, the radioactive imaging agents of formula (I) of the present invention are prepared by reacting radioactive 4-halobenzyl derivatives with piperazine derivatives. Preferred are ^{18}*F*-labeled 4-fluorobenzyl derivatives for PET-imaging. A general method for the preparation of 4-fluoro-^{18}*F*-benzyl halides is described in Iwata *et al.*, *Applied Radiation and Isotopes* (2000), Vol. 52, pp. 87-92.

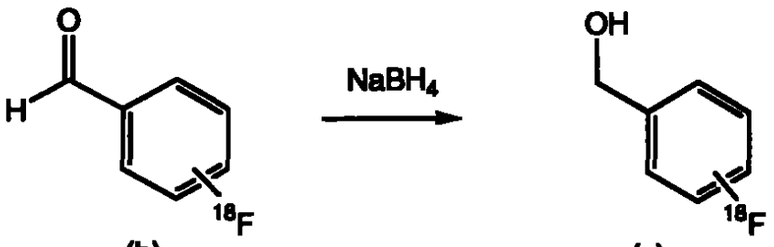
The ^{18}*F*-labeled 4-fluorobenzyl derivatives are prepared by reaction of a benzaldehyde compound of formula (a) with ^{18}F$^-$ ions to obtain a benzaldehyde compound of formula (b):



(a) (b)

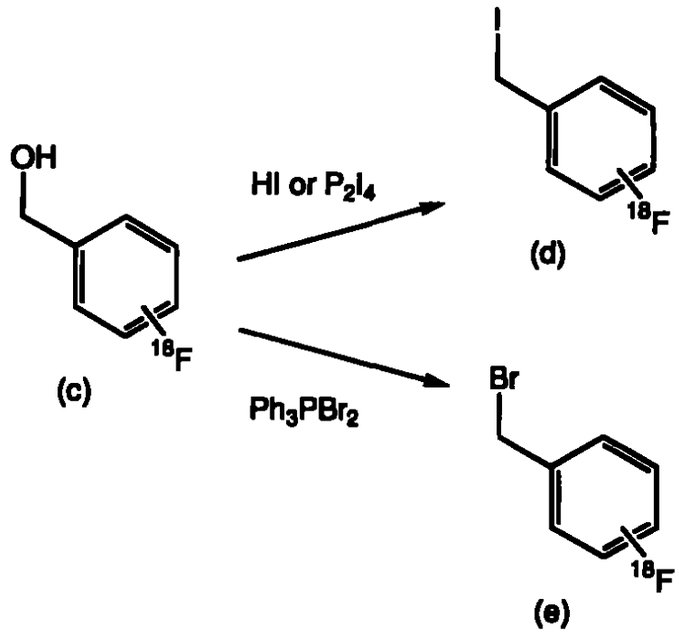
wherein LG is a leaving group, for example, bromo, chloro, iodo, nitro, or $N(R)_3^+ X^-$ (where R is alkyl and X is a halo ion, such as Br^-, Cl^-, or I^-; an ion of a alkanoic acid, such as an acetate ion ($CH_3C(O)O^-$); or an ion of an alkylsulfonic acid or haloalkylsulfonic acid, such as triflat ($CF_3SO_3^-$)). Preferably LG is triflat. Starting from the compound of formula (b), several synthetic pathways are possible in preparing the compounds of formula (I).

In a first synthetic pathway, a compound of formula (b) is reduced with $NaBH_4$ to obtain a compound of formula (c):



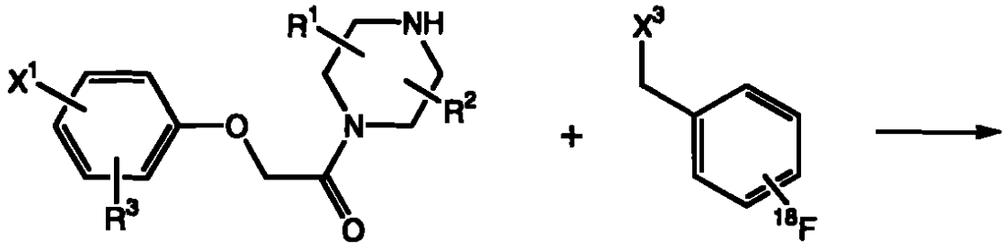
(b) (c)

The compound of formula (c) is then reacted with HI, P_2I_4 or Ph_3PBr_2 to obtain an iodo- or bromo-substituted compound of formulae (d) or (e):

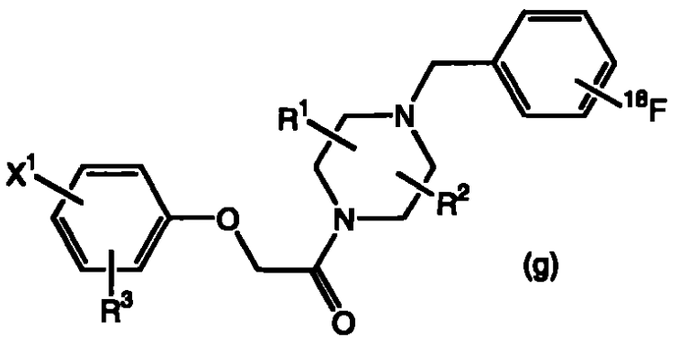


The compounds of formulae (d) and (e) can be obtained with a radiochemical yield of 50 to 60%. The radiochemical purity is greater than 95%. The specific activity of the compounds is 5 mCi per 1 nmol.

A compound of formulae (d) or (e) can then be reacted with a piperazine derivative (f) to obtain a compound of formula (g) (a compound of formula (I)):



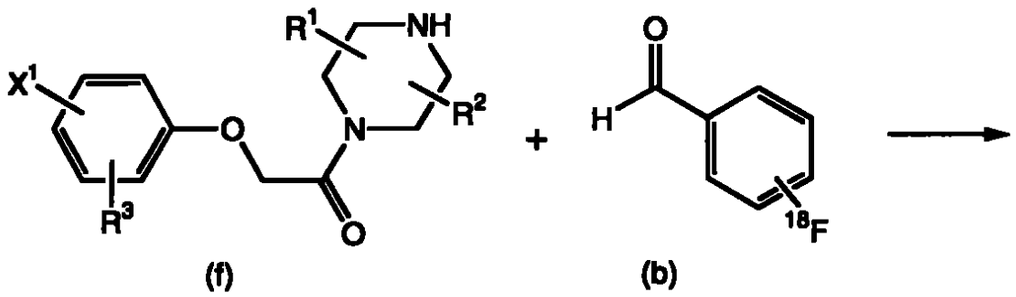
(f) (d) or (e)



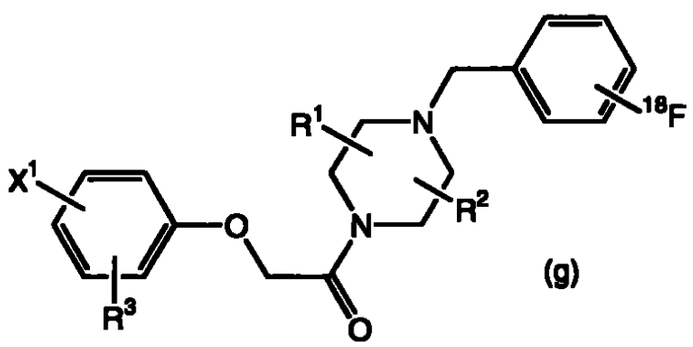
(g)

Compounds of formula (f) may be prepared according to methods known to those of ordinary skill in the art and is described in detail in PCT Published Patent Application, WO 98/56771.

In a second synthetic pathway, a compound of formula (b) is directly reacted with a compound of formula (f) using a reducing agent, for example, formic acid, ammonium formiate, $NaBH_4$, or $NaBH_3CN$, to obtain a compound of formula (g) (a compound of formula (I)):



(f) (b)

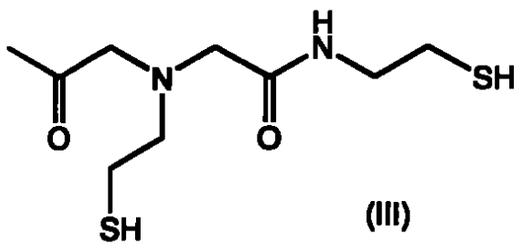


(g)

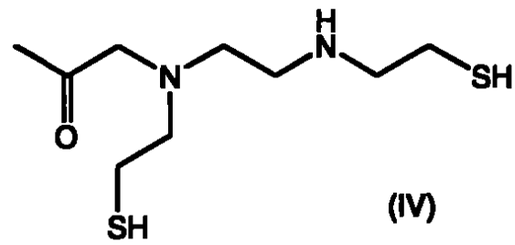
B. Preparation of Compounds of Formula (II)

For Single Photon Emission Computed Tomography ("SPECT"), ^{99m}Tc-labeled compounds are preferred. Those compounds are compounds of formula (II). A general synthetic pathway for these compounds starts with non-radioactive analogues of compounds of formula (II) that are reacted with ^{99m}Tc-binding chelators, e.g. N_2S_2-Chelators. Preparation of the non-radioactive analogs of the compounds of formula (II) is described in detail in PCT Published Patent Application, WO 98/56771. The synthesis of the chelators follows standard procedures, for example, the procedures described in A. Mahmood *et al.*, *A N_2S_2-Tetradentate Chelate for Solid-Phase Synthesis: Technetium, Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine* (1999), Vol. 5, p. 71, or in Z.P. Zhuang *et al.*, *Bioconjugate Chemistry* (1999), Vol. 10, p. 159.

Preferred chelators are chelators of formulae (III) or (IV):



(III)



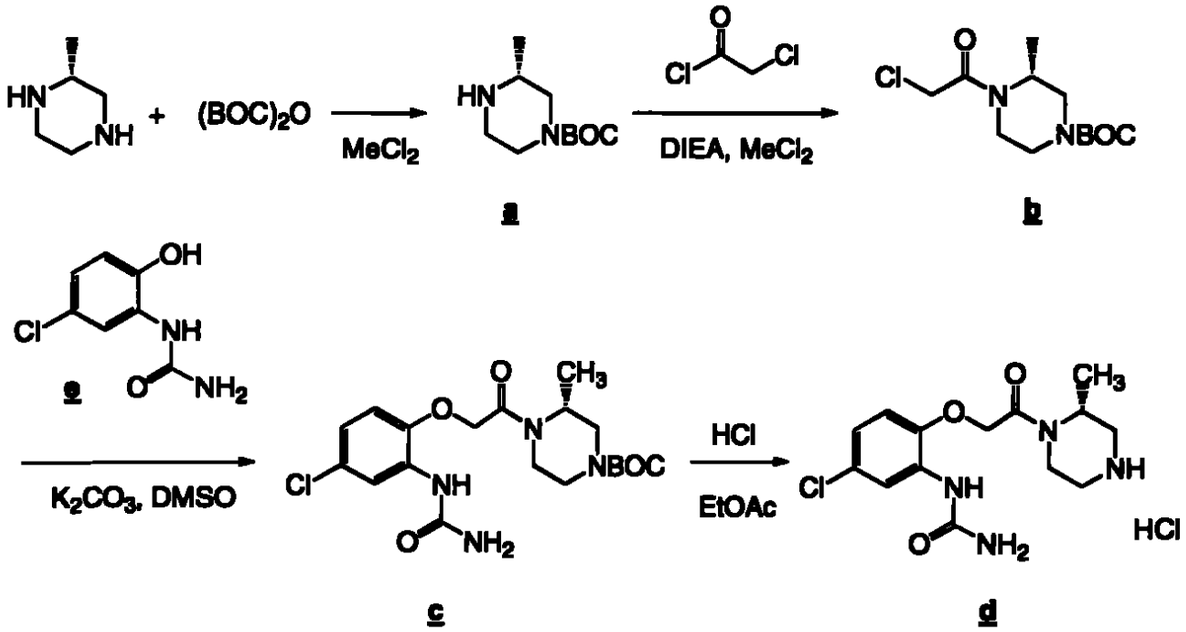
(IV)

One of the chelators is either bound directly to the nitrogen in the -N(R^4)R^5 group of the non-radioactive compound of formula (II), or via a linker moiety comprising an alkyl radical having one to ten carbon atoms, wherein the alkyl radical optionally contains one to ten -C(O)-groups, one to ten -C(O)N(R)- groups, one to ten -N(R)C(O)- groups, one to ten -N(R)- groups, one to ten -$N(R)_2$ groups, one to ten hydroxy groups, one to ten -C(O)OR- groups, one to ten oxygen atoms, one to ten sulfur atoms, one to ten nitrogen atoms, one to ten halogen atoms, one to ten aryl groups, and one to ten saturated or unsaturated heterocyclic rings wherein R is hydrogen or alkyl. A preferred linker moiety is -C(O)-CH_2-N(H)-.

The following specific examples are provided as a guide to assist in the practice of the invention, and are not intended as a limitation on the scope of the invention.

Example 1

Preparation of 1-(5-Chloro-2-{2-[(2*R*)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea



A. DIEA (19.10 mL, 110 mmol) was added to a solution of (*R*)-(-)-2-methylpiperazine (10 g, 100 mmol) in 250 mL of methylene chloride. The solution was cooled to -10°C. The BOC anhydride was dissolved in 250 mL of methylene chloride and this solution was added to the chilled piperazine solution over 1 hour. The reaction was allowed to warm to ambient temperature over 16 hours. The reaction mixture was filtered to remove the solids and the filtrate washed with 500 mL of water, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to an oil. The oil was purified by flash column chromatography to afford 11.0 g of the compound of formula (a).

B. The compound of formula (a) (11.0 g, 55 mmol) and DIEA (10.5 mL, 60.4 mmol) were dissolved in 100 mL of methylene chloride. The resulting solution was chilled to -10°C. Chloroacetyl chloride (4.37 mL, 55 mmol) was added dropwise to the solution maintaining the temperature at -10°C. After stirring for 1 hour the reaction mixture was washed with 100 mL of water, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to an oil. The oil was purified by flash column chromatography to afford 14.8 g of the compound of

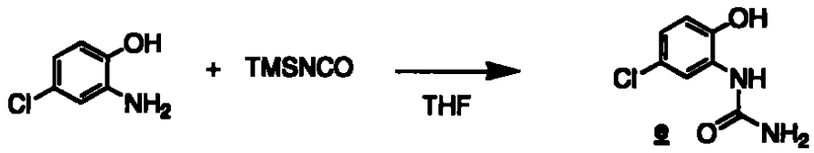
formula (b).

C. To a solution of the compound of formula (b) (14.8 g , 53.5 mmol) and the compound of formula (e) (9.98 g, 53.5 mmol) in 75 mL of DMSO was added potassium carbonate (18.48 g, 133.7 mmol). The resulting mixture was heated to 50°C for 3 hours. The mixture was cooled to 30°C and poured into 700 mL of water. The water was extracted three times with 200 mL of ethyl acetate. The ethyl acetate extracts were combined and washed with 200 mL of 1N KOH followed by brine. The organic layer was the dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to a foam. The foam was purified by flash column chromatography to afford 19.6 g of the compound of formula (c).

D. The compound of formula (c) (7.68 g, 18 mmol) was dissolved in 40 mL of ethyl acetate. The resulting solution was chilled in an ice bath and anhydrous HCl gas was bubbled through the solution for 5 minutes. The product precipitated while the mixture was allowed to sit at ambient temperature for 1 hour. The product was collected by filtration, washed on the filter with fresh ethyl acetate, and dried under vacuum at ambient temperature to constant weight to afford 5.9 g of 1-(5-chloro-2-{2-[(2*R*)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea, the compound of formula (d), as white solid; NMR (2 rotomers); (400 MHz, DMSO) 9.7 (m, 0.5H), 9.2 (m, 0.5H), 8.16 (s, 1H), 8.13 (s, 0.5H), 6.8 (s, 2H), 4.9 (m, 2H), 4.4 (m, 5H), 3.8 (bs, 0.5H), 3.4, (bs, 0.5H), 3.2, (m, 2.5H), 3.0 (m, 2 H) 1.2-1.4 (m, 3H) ppm.

Example 2

Preparation of the Compound of Formula (e)



To a solution of 2-amino-4-chlorophenol (10 g, 69.7 mmol) in 100 mL of anhydrous THF at ambient temperature was added trimethylsilyl isocyanate (18.8 mL, 139.4 mmol) in one portion. The solution was heated to 60°C and remained at this temperature for 22 hours at which time water (1.3 mL, 76.7 mmol) was added. After 30 minutes the solution was

cooled to ambient temperature and concentrated to a brown oil. This oil was dissolved in ethyl acetate, treated with activated carbon, dried over magnesium sulfate and filtered. The filtrate was concentrated to a pink solid which was crystallized from 10:1, toluene/methanol to give 5.4 g of the compound of formula (e) as tan powder.

Example 3

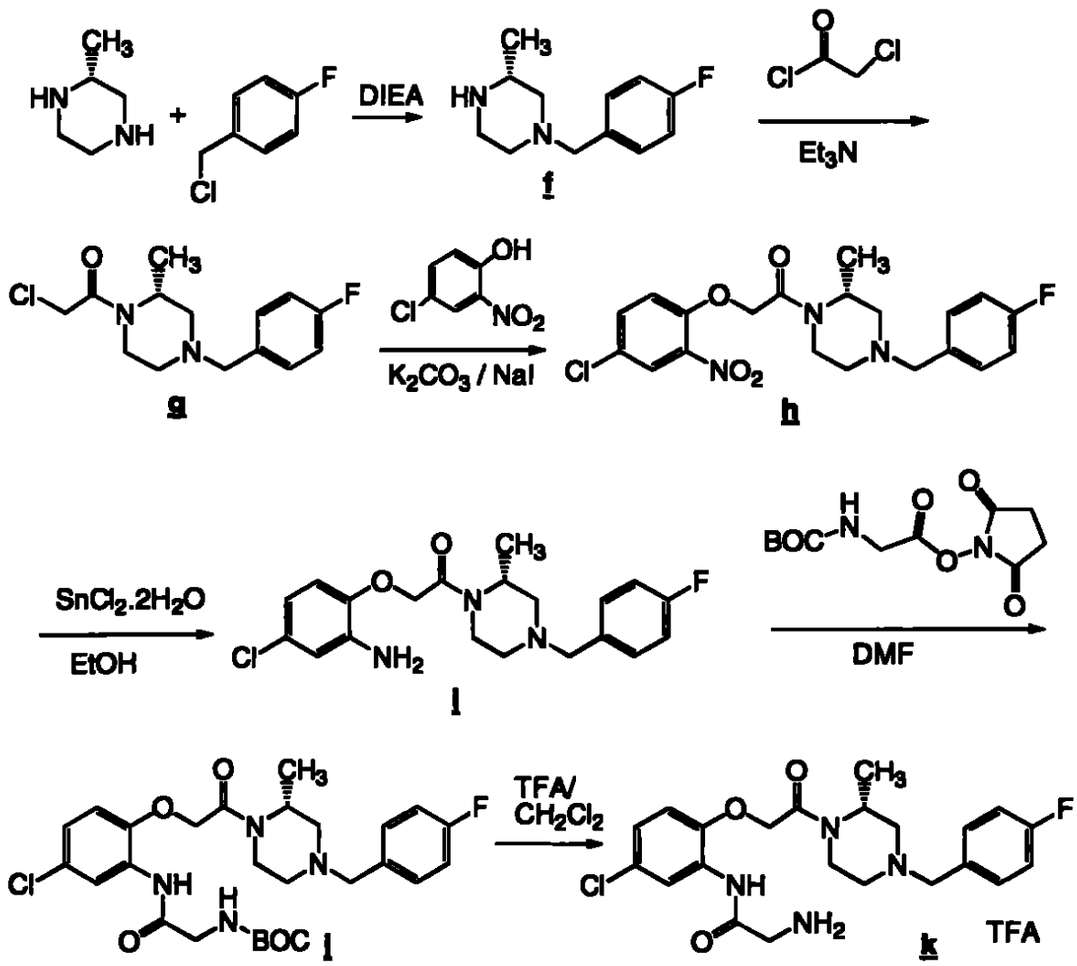
Preparation of 1-(5-Chloro-2-{2-[(2*R*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea

A. Hydrogen fluoride-^{18}F was prepared in a cyclotron by bombardment of H_2O-^{18}O with protons. The resulting hydrogen fluoride-^{18}F was adsorbed on an anion-exchange cartridge. The hydrogen fluoride-^{18}F was eluted with a solution of Kryptofix 222 (15 mg, 40 µmol) and K_2CO_3 (2.77 mg, 20 µmol) in aqueous acetonitrile (1.5 mL, 66%). The radioactive fractions were evaporated to dryness in a nitrogen gas stream. This procedure was repeated three times with dry acetonitrile (1 mL). After addition of a solution of 4-trimethylammonium-benzaldehyde-triflate (2 mg, 6.4 µmol) in dry DMF (250 µl) the resulting reaction mixture was heated for 5 minutes to 100°C. After cooling to ambient temperature a solution of 1-(5-chloro-2-{2-[(2*R*)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea, a compound of formula (d), (3 mg, 8.3 µmol) in 50 µl acetic acid and a solution of sodium-cyano-borhydride (4 mg, 63.7 µmol) in 100 µl dry DMF were added. The reaction mixture was heated to 120°C for 10 minutes. After addition of 5 mL of water the mixture was filtered over a polystyrol-cartridge. The adsorbed product was washed with 2 mL of water to afford the title compound, 1-(5-chloro-2-{2-[(2*R*)-4-(4-fluoro-^{18}*F*-benzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea, which was eluted with 1.5 mL acetonitrile and purified by HPLC.

B. In a similar manner, other compounds of formula (I) containing a ^{18}F atom are prepared.

Example 4

Preparation of *N*-(5-Chloro-2-{2-[(2*R*)-4-(4-fluorobenzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)glycinamide



A. To a solution of (*R*)-(-)-2-methylpiperazine (2.0 g, 20 mmol) in 20 mL CH_2Cl_2 was added DIEA (5.2 g, 40 mmol) and 4-fluorobenzyl chloride (2.39 mL, 20 mmol). The resulting mixture was stirred at ambient temperature for 15 hours. After the reaction was completed, the reaction mixture was washed with water (3X20 mL) and brine, then dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated in vacuo to afford the compound of formula (f) (2.2 g) as a white solid.

B. To a solution of the compound of formula (f) (2.2 g, 10 mmol) in 50 mL CH_2Cl_2 was added chloroacetyl chloride (0.84 mL, 10 mmol). The resulting mixture was stirred at ambient temperature for 10 minutes and then triethylamine (3 mL, 21 mmol) was added. After 30 minutes, the mixture was washed with water (3x20mL) and brine, then dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated in vacuo to afford an oil. Purification by flash column chromatography afforded the compound of formula (g) (2.5 g).

C. To a solution of the compound of formula (g) (2.4 g, 8.4 mmol) in 50 mL DMF was added K_2CO_3 (2.5 g, 17 mmol), NaI (0.2 g) and 4-chloro-2-nitrophenol (1.3 g, 8.4 mmol). The resulting mixture was heated at 70-80°C. After 1 hour, the mixture was concentrated in vacuo, then taken up in ethyl acetate (150 mL) and washed with water (3X100mL)and then brine. The organic layer was separated, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated in vacuo to afford an oil. Purification by flash column chromatography afforded the compound of formula (h) (3.1 g).

D. To a solution of the compound of formula (h) (1.1 g, 2.6 mmol) in 10 mL ethanol was added a solution of tin(II) chloride dihydrate (3.0 g, 13 mmol) in 5 mL ethanol. The resulting mixture was heated at 75°C. After 1 hour, the reaction was concentrated in vacuo, then taken in ethyl acetate (100 mL), washed with 1N NaOH solution in water (3X100mL) and brine. The organic layer was separated, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated in vacuo to afford an oil. Purification by flash column chromatography afforded the compound of formula (i) (0.75g).

E. To a solution of the compound of formula (i) (0.7 g, 1.78 mmol) in 10 mL DMF was added BOC-Gly-OSU (0.58 g, 2.13 mmol). The resulting mixture was heated at 50-60°C. After 24 hours, the mixture was concentrated in vacuo, then taken up in ethyl acetate (150 mL) and washed with water (3X100mL) and then brine. The organic layer was separated, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated in vacuo to afford an oil. Purification by flash column chromatography afforded the compound of formula (j) (0.7 g).

F. To a solution of the compound of formula (j) (0.6 g, 1.1 mmol) in 10 mL CH_2Cl_2 was added TFA (5 mL). The resulting mixture was heated at ambient temperature. After the reaction was completed in 1 hour, the reaction was concentrated in vacuo, then taken up in ethyl acetate (100 mL), washed with 1N NaOH solution in water (2X100mL) and brine. The

organic layer was separated, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated in vacuo to afford an oil. Purification by flash column chromatography afforded *N*-(5-chloro-2-{2-[(2*R*)-4-(4-fluorobenzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)glycinamide, the compound of formula (k), (0.45 g) as a white solid; NMR ($CDCl_3$) 10.2 (s, 1), 8.5 (s, 1), 7.3 (m, 2), 7.0 (m, 3), 6.8 (d, 1), 4.7 (m, 2), 3.4-3.6 (m, 5), 3.0 (m, 1), 2.8 (m,1), 2.6 (d, 1), 2.2 (m, 1), 2.0 (m, 2), 1.2-1.4 (m, 3) ppm.

Example 5

***N'*-(mercaptoeth-1-yl)-*N'*-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-[5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycylglycinamide, Technetium-99m-complex**

A. To a stirred solution of *N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycinamide (175.5 mg, 0.4 mmol) (the compound of formula (k) as prepared above in Example 4), *N*-(*S*-trityl-2-mercaptoeth-1-yl)-*N*-(*S*-trityl-5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)glycine (291.4 mg, 0.4 mmol) (which can be synthesized according to A. Mahmood *et al.*, *A N_2S_2-Tetradentate Chelate for Solid-Phase Synthesis: Technetium, Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine* (1999), Vol. 71), and *N*-hydroxysuccinimide (45.5 mg, 0.4 mmol) in 5 mL dichloromethane was added dropwise a solution of dicyclohexylcarbodiimide (81.4 mg, 0.4 mmol) in 3 mL dichloromethane. The resulting suspension was stirred over night at ambient temperature. After filtration, the resulting solution was evaporated under reduced pressure. The desired product, *N*-(*S*-trityl-2-sulfanyleth-1-yl)-*N*-(*S*-trityl-5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycylglycinamide (340 mg, 72.8%) was isolated after silica gel chromatography (eluent: dichloromethane/methanol, 98:2) as a white powder.

Elemental Analysis:

Calc.:	C 69.93	H 5.87	N 7.20	O 6.85	S 5.49
Found:	C 69.69	H 6.05	N 7.01	O	S 5.32

B. *N*-(*S*-Trityl-2-sulfanyleth-1-yl)-*N*-(*S*-trityl-5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-

yl}glycylglycinamide (116.8 mg, 0.1 mmol), as prepared above, was dissolved in 5 mL trifluoroacetic acid. After addition of triethyl silane (48 µl, 0.3 mmol) the resulting suspension was stirred for 15 minutes at ambient temperature. The filtrate was evaporated under reduced pressure and the residue was triturated with 7 mL diethyl ether. The precipitate was stirred for 1 hour at ambient temperature and filtered off, yielding the desired product, *N*-(mercaptoeth-1-yl)-*N*-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycylglycinamide, bis-trifluoracetic acid salt (87 mg, 95.5%), as a white solid.

Elemental Analysis:

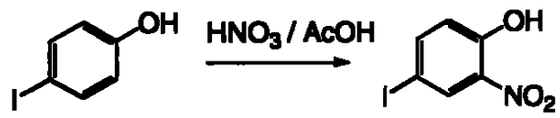
Calc.:	C 44.81	H 4.65	N 9.22	O 15.80	S 7.04
Found:	C 44.54	H 4.91	N 8.99	O	S 6.80

C. Disodium tartrate (1 mg) and *N*-(mercaptoeth-1-yl)-*N*-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycylglycinamide, bis-trifluoracetic acid salt (100 µg), as prepared above, were dissolved in 500 µl sodium phosphate buffer (0.1M, pH=8.5). After addition of 37MBq ^{99m}Tc-generator eluate, 5 µl tin-(II) chloride solution was added and the mixture was heated for 10 min to 100°C. HPLC analysis showed a major peak indicating that the desired product, *N'*-(mercaptoeth-1-yl)-*N'*-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycylglycinamide, Technetium-99m-complex, was synthesized with a RCP > 90%.

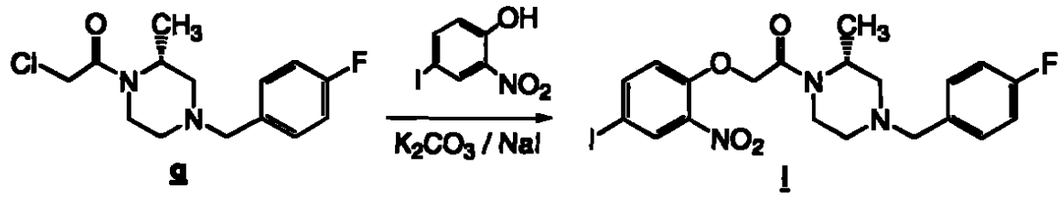
Example 6

Preparation of 1-{2-[2-[(2*R*)-4-(4-Fluorobenzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}-5-iodophenyl)urea

1.

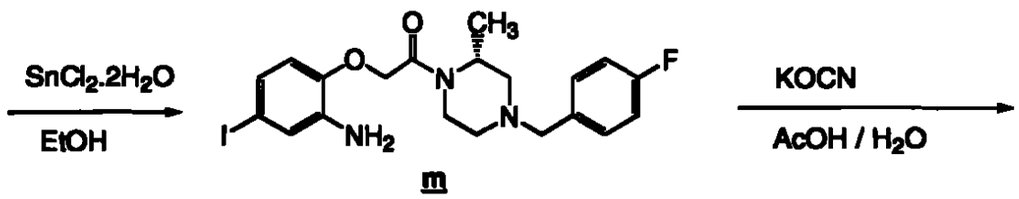


2.

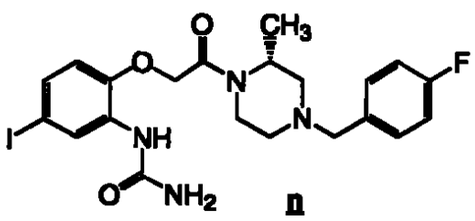


g

l



m



n

A. To a solution of *p*-iodophenol (2.2 g, 10 mmol) in 18 mL acetic acid was added a solution of HNO_3 (0.7 mL, 70%) in 5 mL acetic acid dropwise over 10 minutes. The resulting mixture was stirred at ambient temperature. After 30 minutes, the reaction mixture was diluted by 100 mL ice-water. The precipitate was collected, washed with 100 mL water. Purification by flash column chromatography afforded 1.2 g of 2-nitro-4-iodophenol.

B. To a solution of the compound of formula (g) (0.3 g, 1.05 mmol) (as prepared herein) in 10 mL DMF was added K_2CO_3 (0.45 g, 3.2 mmol), NaI (0.01 g) and 2-nitro-4-

iodophenol (0.28 g, 1.05 mmol). The resulting mixture was heated at 70-80°C. After 1 hour, the mixture was concentrated in vacuo, then taken up in ethyl acetate (150 mL) and washed with water (3X100mL)and then brine. The organic layer was separated, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated in vacuo to afford an oil. Purification by flash column chromatography afforded 0.28 of the compound of formula (l).

C. To a solution of the compound of formula (l) (0.28 g, 0.55 mmol) in 5 mL ethanol was added a solution of Tin(II) chloride dihydrate (0.616 g, 2.73 mmol) in 5 mL ethanol. The resulting mixture was heated at 75°C. After 1 hour, the reaction was concentrated in vacuo, then taken up in ethyl acetate (100 mL), washed with 1N NaOH solution in water (3X100mL) and brine. The organic layer was separated, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated in vacuo to afford an oil. Purification by flash column chromatography afforded the compound of formula (m) (0.25g).

D. To a solution of the compound of formula (m) (0.25 g, 0.52 mmol) in 3 mL AcOH was added water (6 mL). The resulting mixture was stirred at ambient temperature for 10 minutes, then a solution of KOCN (0.085 g, 1.0 mmol) in 1 mL water was added dropwise. The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 10 minutes, then heated at 55°C for 5 minutes. After the reaction was completed, the reaction mixture was concentrated in vacuo, then taken up in CH_2Cl_2 (50 mL), washed with 2N NaOH solution in water (2x100mL) and brine. The organic layer was separated, dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated in vacuo to afford an oil. Purification by flash column chromatography afforded the compound of formula (n) (0.16 g) as a white solid; NMR ($CDCl_3$) 9.0 (s, 1), 8.6 (s, 1), 7.3 (m, 2), 7.0 (t, 3), 6.6 (d, 1), 4.9 (s, 2), 4.7 (m, 2), 4.4 (m, 1), 3.4-3.6 (m, 3), 3.0 (m, 1) 2.8 (m,1), 2.6 (d, 1), 2.2 (m, 1), 2.0 (m, 1), 1.2-1.4 (m, 3) ppm.

Example 7

Preparation of 1-(2-{2-[(2*R*)-4-(4-Fluorobenzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}-5-Iodo-^{123}*I*-phenyl)urea

A. To a solution of the compound of formula (n) (1 mg), as prepared above, and 10 µg copper-(II)-sulfate in 300 µl DMF was added 1 mCi sodium iodine[^{123}I] solution. The resulting reaction mixture was heated over night to 100°C. After adding of 1 mL half-

saturated aqueous $NaHCO_3$ solution the product was extracted with 2 mL CH_2Cl_2. The organic layer was evaporated to dryness in a nitrogen gas stream. The desired product, 1-(2-{2-[(2*R*)-4-(4-fluorobenzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}-5-iodo-^{123}*I*-phenyl)urea, was purified using a RP-cartridge [eluant: EtOH/water (2:1)].

B. In a similar manner as described above, other compounds of formula (I) are prepared.

Example 8

N'-(2-Mercaptoeth-1-yl)-N'-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-N-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycinamide, Technetium-99m-complex

A. To a stirred solution of 156.7 mg (0.4 mmol) 5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]aniline (compound of formula (i)) (291.4 mg, 0.4 mmol), *N*-(*S*-trityl-2-mercaptoeth-1-yl)-*N*-(*S*-trityl-5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)glycine (synthesized according to A. Mahmood *et al.*, *A N_2S_2-Tetradentate Chelate for Solid-Phase Synthesis: Technetium, Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine* (1999), Vol. 5, p. 71) and *N*-hydroxysuccinimide (45.5 mg, 0.4 mmol) in 5 mL dichloromethane was added dropwise a solution of dicyclohexylcarbodiimide (81.4 mg, 0.4 mmol) in 3 mL dichloromethane. The resulting suspension was stirred over night at ambient temperature. After filtration, the resulting solution was evaporated under reduced pressure. The desired product, *N'*-(*S*-trityl-2-mercaptoeth-1-yl)-*N'*-(*S*-trityl-5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycinamide (352 mg, 79.2%), was isolated after silica gel chromatography (eluent: dichloromethane/methanol, 98:2) as a white powder.

Elemental Analysis:

Calc.:	C 71.36	H 5.90	N 6.30	O 5.76	S 5.77
Found:	C 71.08	H 6.13	N 6.05	O	S 5.52

B. *N'*-(*S*-trityl-2-mercaptoeth-1-yl)-*N'*-(*S*-trityl-5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycinamide (111.1 mg, 0.1 mmol) was dissolved in 5 mL trifluoroacetic acid. After addition

of 48 µl (0.3 mmol) triethyl silane the resulting suspension was stirred for 15 min at ambient temperature. The filtrate was evaporated under reduced pressure and the residue was triturated with 7 mL diethyl ether. The precipitate was stirred for 1 hour at ambient temperature and filtered off, yielding the desired product, *N*-(2-mercaptoeth-1-yl)-*N*-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycinamide, bis-trifluoracetic acid salt (75 mg, 87.8%) as a white solid.

Elemental Analysis:

Calc.:	C 44.99	H 4.60	N 8.20	O 14.98	S 7.51
Found:	C 44.71	H 4.89	N 8.03	O	S 7.22

C. Disodium tartrate (1 mg) disodium tartrate and *N*-(2-mercaptoeth-1-yl)-*N*-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycinamide, bis-trifluoracetic acid salt (100 µg) were dissolved in 500 µl sodium phosphate buffer (0.1M, pH=8.5). After addition of 37.5MBq ^{99m}Tc-generator eluate, 5 µl tin-(II) chloride solution was added and the mixture was heated for 10 minutes to 100°C. HPLC-analysis showed a major peak indicating that the desired product, *N*'-(2-mercaptoeth-1-yl)-*N*'-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycinamide, technetium-99m-complex was synthesized with a RCP > 91%.

Example 9

_N_-(2-Mercaptoeth-1-yl)-_N_-(5-mercapto-3-azapent-1-yl)-_N_-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2_R_)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycinamide, Technetium-99m-complex

A. To a stirred solution of 5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]aniline (156.7 mg, 0.4 mmol) and triethylamine (40.5 mg, 0.4 mmol) in 5 mL dichloromethane was added dropwise a solution of α-bromoacetyl chloride (63 mg, 0.4 mmol) in 3 mL dichloromethane. The resulting solution was stirred over night at ambient temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure. The desired product, *N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}-2-

bromoacetamide (175 mg, 85.3 %), was isolated after silica gel chromatography (eluent: dichloromethane/methanol, 99:1) as a white powder.

Elemental Analysis:

Calc.:	C 51.53	H 4.72	N 8.19	O 5.76	
Found:	C 51.28	H 4.99	N 7.92	O	

B. A stirred solution of *N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}-2-bromoacetamide (165 mg, 0.42 mmol) and *N,N*-bis-(*S*-(4-methoxybenzyl)-2-mercaptoeth-1-yl)ethylenediamine (841.3 mg, 2 mmol) (synthesized according to Z.P. Zhuang et al., *Bioconjugate Chem.* (1999), Vol. 10, p. 159) in 1,4-dioxane (5 mL) was heated under reflux for 24 hours. The resulting reaction mixture was evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in 15 mL dichloromethane and washed with saturated aqueous sodium carbonate solution. After drying over $MgSO_4$ the solvent was evaporated under reduced pressure. The desired product, *N*-(*S*-(4-methoxybenzyl)-2-mercaptoeth-1-yl)-*N*-(*S*-(4'-methoxybenzyl)-5-mercapto-3-azapent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycinamide (154 mg, 43%), was isolated after silica gel chromatography (eluent: dichloromethane/methanol, 9:1) as a white powder.

Elemental Analysis:

Calc.:	C 61.99	H 6.50	N 8.22	O 9.38	S 7.52
Found:	C 61.71	H 6.58	N 8.03	O	S 7.28

C. *N*-(*S*-(4-methoxybenzyl)-2-mercaptoeth-1-yl)-*N*-(*S*-(4'-methoxybenzyl)-5-mercapto-3-azapent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycinamide (140 mg, 0.164 mmol) was dissolved at 0°C in 5 mL trifluoroacetic acid. After addition of $Hg(OAc)_2$ (104.5 mg, 0.328 mmol) the resulting mixture was stirred for 30 minutes at 0°C and saturated for 15 min with H_2S. After filtration the solvent was evaporated under reduced pressure. The resulting yellow oil was triturated with 3 mL diethyl ether. The desired product, *N'*-(2-mercaptoeth-1-yl)-*N'*-(5-mercapto-3-azapent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycinamide, tris-trifluoracetic acid salt (126 mg (80.5%), was isolated after filtration as a white powder.

Elemental Analysis:

Calc.:	C 42.79	H 4.44	N 7.34	O 15.09	S 6.72
Found:	C 42.48	H 4.73	N 7.02	O	S 6.76

D. Disodium tartrate (1 mg) and *N'*-(2-mercaptoeth-1-yl)-*N'*-(5-mercapto-3-azapent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycinamide, tris-trifluoracetic acid salt (100 µg) were dissolved in 500 µl sodium phosphate buffer (0.1M, pH=8.5). After addition of 37.5MBq ^{99m}Tc-generator eluate, 5 µl tin-(II) chloride solution was added and the mixture was heated for 10 minutes to 100°C. HPLC-analysis showed a major peak indicating that the desired product, *N*-(2-mercaptoeth-1-yl)-*N*-(5-mercapto-3-azapent-1-yl)-*N*-{5-chloro-2-[2-[4-(4-fluorobenzyl)-2-(2*R*)-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy]phen-1-yl}glycinamide, Technetium-99m-complex, was synthesized with a RCP > 95%.

Example 10

Immunohistochemical Localization of CCR1 in Human Brains

Materials and Methods

A first group of tissue samples from brains that had been obtained at autopsy within 12 hours of death was used for immunohistochemical staining of the chemokine receptor CCR1 in Alzheimer's disease and control brains. Paraffin-embedded, 5-µm-thick, unstained sections from frontal cortex and hippocampus were used for all immunohistochemical and histochemical stains.

Slides were de-paraffinized in xylene and hydrated to phosphate-buffered saline containing 0.005% Triton X100 (PBS-T). For light microscopy (using DAB as chromogen) endogenous peroxidase activity was blocked by incubating the slides with 0.01% H_2O_2 in methanol for 30 minutes. Non-specific binding was reduced by blocking in 10% normal goat serum (NGS) in PBS for 30 minutes. The primary antibodies [Rabbit anti-CCR1, (N-terminal peptide); Mouse anti-Neurofilament; mouse anti-GFAP; mouse anti-Tau (AT8); mouse anti-CD68 (clone KP1); mouse anti-β-amyloid (Boehringer Mannheim, #1 381 431); Rabbit anti-CCR8, (N-terminal peptide)] were diluted in PBS-T and slides were incubated overnight at room temperature. Staining was completed using a Biogenex ABC™ kit. All

washes used PBS-T. After the DAB reaction was completed, slides were lightly counterstained with Gill's Hematoxylin, dehydrated and coverslipped with Permount. Before coverslipping, some slides were re-stained with antibodies against Aβ peptide using identical methods except that the chromogen was True Blue™. For immunofluorescent double-labeling studies the slides were de-paraffinized, blocked with 10% NGS, and incubated with a cocktail of both primary antibodies overnight. The slides were washed with PBS-T and then incubated with a cocktail of goat secondary antibodies, each at 1/50 dilution. To avoid confusion from endogenous (yellow-green) tissue fluorescence, the secondary antibodies were conjugated to either Cy3 (ε_{max} = 565 nm; goat-anti-mouse, Amersham) or Cy5 (ε_{max}=700 nm; goat-anti-rabbit, Amersham). Slides were viewed on a confocal microscope with a krypton-argon laser (model 2010, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Subsequently, a second group of brain tissues composed of 10 cases from cognitively normal elderly and 40 cases from Alzheimer's disease patients who had been assessed for clinical dementia rating (CDR) were obtained and evaluated for immunohistochemical expression of CCR1. The samples were stained for CCR1 and other markers as described above except that monoclonal antibodies (clone #6D5) specific for $A\beta^{1-42}$ (a marker for diffuse, early amyloid deposits as well as for more mature neuritic plaques) were obtained from Dr. Ursula Moenning. These antibodies were visualized with Vector Red™ (Vector Labs). Dr Moenning also provided monoclonal antibodies specific for $A\beta^{1-40}$ (clone #13E9), a marker for plaques found in late-stage disease, that was visualized with True Blue™.

Results

In both sets of brains, areas with Alzheimer's disease pathology showed a characteristic staining pattern. CCR1 immunoreactivity was found in association with neuritic (*i.e.*, senile) plaques in both the hippocampal formation and the cerebral cortex. The immunostained structures were round to ovoid and were not usually associated with cell bodies. They varied in size and appeared to be filled with a punctate granular material. These structures were found to form "coronas" around the amyloid deposits in

senile plaques, but were distinct from the Aβ itself (Figures 1-4). The top panel in Figure 1 shows a neuritic plaque with a corona of CCR1-positive processes. Neuronal cell bodies of some CA1 and CA3 neurons in Alzheimer's disease cases were sometimes stained by CCR1 antibodies. The bottom panel in Figure 1 illustrates this finding. This staining was distinct from neurofibrillary tangles (NFT) or granulovacuolar bodies, although it was commonly present in the somata of neurons with these degenerative changes.

Pre-incubation of antibodies with a 16-mer polypeptide from the extracellular (*N*-terminus) region of the CCR1 receptor protein completely blocked all tissue staining, as illustrated in Figure 2. In particular, the top image in Figure 2 shows a lack of staining in Alzheimer's disease brain with CCR1 antibodies that were pre-incubated with the polypeptide while the bottom image in Figure 2 shows many CCR1-positive structures in a sister section stained with un-incubated antibodies.

Double-labeling studies showed that nearly all CCR1-positive structures were associated with neuritic plaques containing $A\beta^{1-42}$ as shown in Figure 4. $A\beta^{1-42}$ in diffuse plaques (Figure 5) was not typically associated with CCR1 nor with any significant cellular responses. In more advanced cases of Alzheimer's disease, many more $A\beta^{1-40}$-positive plaques were seen. Some, but not all of these were associated with CCR1 staining as shown in Figure 3. In some cases CCR1-positive plaques were completely free of $A\beta^{1-40}$ staining.

In cases of severe Alzheimer's disease where significant neuronal loss and gliosis were seen, reactive astrocytes in the subiculum and entorhinal cortex were also CCR1 positive. In less severe cases, CCR1-positive reactive astrocytes were uncommon.

Confocal microscopy of double-labeled sections showed that CCR1 immunoreactivity co-localized with neurofilament-positive processes. The macrophage/microglial marker, CD68, was not associated with CCR1 staining, nor was the AT8 antibody against abnormally phosphorylated tau protein. As expected from light microscopic studies, CCR1 immunoreactivity did co-localize with GFAP in areas of astrogliosis.

Leukocytes present within cerebral vessels were strongly CCR1 positive in both Alzheimer's disease and control brain tissues, serving as positive internal controls for staining methods. In Figure 5 note the CCR1-positive staining of two intravascular cells

(arrows). Some CCR1-positive material is also seen at asterisk, but in general, diffuse plaques are not associated with CCR1.

Using hippocampal tissue from the second study (where patients were grouped into known clinical categories by CDR score), a quantitative evaluation of the number of CCR1-positive plaque-like structures in the hippocampus was undertaken. Histologic evaluations of individual sections were performed under blinded conditions with respect to clinical (CDR) status. The volume analyses were conducted using unbiased computerized methods.

Figure 3 demonstrates the histologic relationship between CCR1-positive dystrophic neurites (brown stain) and a neuritic plaque containing $A\beta^{1-40}$ (blue stain). Note in that in Figure 3 the CCR1-positive processes are distinct from the amyloid. Plaques containing $A\beta^{1-40}$ were discrete and easily counted, as were the clusters of CCR1-positive neurites. Slides of hippocampus were evaluated for the number of CCR1-positive coronas, the number of $A\beta^{1-40}$ positive plaques, and the number of plaques containing both markers. The structures were counted by region (*e.g.*, CA3, CA1, and subiculum) within the entire hippocampal formation, including entorhinal cortex and then totaled. The values are relative estimates of the number of structures in the hippocampus as represented by 5-µm thick cross-sections of the hippocampal formation. Figure 6 shows the relationship between CCR1 and $A\beta^{1-40}$ by CDR score.

Quantification of the amount of $A\beta^{1-42}$ required a different technique because $A\beta^{1-42}$ was more abundant and formed "diffuse" plaques that could not be easily enumerated (see Figure 5). For these slides a computer-assisted method (C.A.S.T. stereology system) was used to estimate the area of entorhinal cortex occupied by $A\beta^{1-42}$. This area was expressed as a percent of the total area of cortex on the slide. The areas occupied by neuritic and diffuse plaques were counted separately. The computer-driven microscope stage assured random (unbiased) evaluation of the tissue sections. The volume % of entorhinal cortex occupied by $A\beta^{1-42}$ (both diffuse and neuritic) is compared to the number of CCR1-positive plaques in a sister section of entorhinal cortex in Figure 7.

Figure 6 shows that the average number of CCR1-positive dystrophic neurites in the hippocampus increases as a function of CDR score in Alzheimer's disease. The number

of positive structures in early Alzheimer's disease (CDR 0.5) is increased above control (CDR 0) levels. Although the differences between control and Alzheimer's disease groups did not become statistically significant until group CDR 2, these expression patterns support the conclusion that CCR1 is upregulated in dystrophic neuronal processes even at very early stages of Alzheimer's disease. Note that the number of $A\beta^{1-40}$ plaques do not rise until late in the disease. CCR1 expression in brain tissue may thus be considered a relatively early indicator of Alzheimer's disease.

The correlation between number of CCR1-positive plaques in entorhinal cortex and the amount of $A\beta^{1-42}$ is shown in Figure 7. In general, CCR1 levels in entorhinal cortex rise as the disease state increases; however, the area sampled is much smaller than the area sampled in Figure 6. Note, however, that $A\beta^{1-42}$ levels rise early in the disease.

Example 11

Assessment of brain availability, using a ^{14}C-labeled tracer

A ^{14}C analogue of 1-(5-chloro-2-{2-[(2*R*)-4-(4-fluorobenzyl)-2-methylpiperazin-1-yl]-2-oxoethoxy}phenyl)urea was prepared and used for pharmacokinetic studies of brain availability. Mice were injected i.v. through cannulated jugular veins with the analogue at 36 mg/kg containing 334,000 dpm per dose. Mice (in groups of four) were sacrificed at 1, 15, 30, 120, and 1440 minutes after injection by CO_2 inhalation followed by intra-cardiac puncture for removal of whole blood. The chest was then opened and mice were perfused through the heart with phosphate buffered saline for five minutes to remove residual radioactive drug from the blood compartment. The brains were then removed, weighed, and sampled for amount of radioactivity in two separate pieces of cerebral cortex. The radioactivity levels per mg of tissue in the two samples were averaged and the data were normalized to total brain weight, as illustrated in Figure 8. The bars represent the standard error (n=4 mice per time point). In particular, the graph in Figure 8 shows that the total number of disintegrations per minute (DPM) for ^{14}C analogue in whole mouse brain decreases to negligible levels by two hours after injection. At the 1-minute time point, calculations show that, on average, about 3% of the injected dose is found in whole mouse brain (average weight of 450 g).

Plasma samples prepared from the whole blood removed from the mice were also analyzed for radioactive content. The amount of radioactivity in equal volumes of brain and plasma was compared over time as a percent of injected dose, as illustrated in Figure 9. The % of injected dose (i.d.) found per mL of plasma also declines over time, reaching negligible levels after two hours. For comparison to brain levels, the total number of DPM per brain were normalized to a gram of brain weight and expressed as a percentage of the i.d. per gram of brain tissue. Note that mouse brains weigh on average about 450 mg so that the % of i.d. in 1 g of mouse brain shown in the graph overestimates the real value by about two-fold. It is clear that the levels of the analogue in the brain fall in concert with plasma levels. Although the analogue is lipophilic, normal mouse brain does not appear to be a depot site for the CCR1 antagonist.

Example 12

CCR1 Expression in Other Neurodegenerative Diseases

Materials and Methods

Histologic samples of autopsy brain tissue from a total of 29 cases from seven different neurodegenerative diseases (other than pure Alzheimer's disease) were obtained and studied for CCR1 content. Slides were immunostained with antibodies against CCR1 as described in Example 10 above and reviewed under blinded conditions with respect to the specific neurodegenerative disease. Subsequently, sister sections were double-labeled with antibodies against CCR1 (DAB as chromogen) and $A\beta^{1-42}$ (Vector Red™ as chromogen). The diseases examined are listed below:

Parkinson's disease (PD)	6 cases
Parkinsonian dementia of Guam	3 cases
Congophilic angiopathy	4 cases
Multi-infarct dementia (MID)	4 cases
Diffuse Lewy body dementia (DLBD)	4 cases
Pick's disease	4 cases
Progressive supranuclear palsy (PSP)	4 cases

The stained slides were graded for CCR1 and $A\beta^{1-42}$ content using a histologic scale

of 0 to 4, with 0 being absence of staining, 0.5 indicating rare expression, and grades 1 through 4 indicating increasing levels of expression with 4 being highly abundant.

Results

All six cases of Parkinson's disease and all three cases of Parkinsonian dementia of Guam were negative for CCR1. CCR1-positive plaque-like structures, similar to those found in Alzheimer's disease, were observed in all 4 cases of congophilic angiopathy, in 3 of the 4 cases of DLBD, in 2 out of the 4 cases of PSP, and in 1 out of the 4 cases of both MID and Pick's disease.

Double-labeling studies confirmed the assumption that these CCR1-positive plaque-like structures were associated with $A\beta^{1-42}$, as was found in pure cases of Alzheimer's disease (Example 10). Figure 10 shows the results of the pathological evaluations in graphic form for all the diseases except for Parkinson's (which was negative for CCR1 in brain). Basically, CCR1 expression was never found in brain tissue samples unless $A\beta^{1-42}$-positive neuritic plaques were also present.

After the code was broken, it was found that the one case of Pick's disease showing CCR1 expression also carried the diagnosis of Alzheimer's disease. The two PSP cases with CCR1 were also diagnosed with concurrent Alzheimer's disease. Congophilic angiopathy and DLBD are diseases that are closely associated with Alzheimer's disease pathology. Therefore, it is not surprising that they would also have high levels of CCR1 expression in association with $A\beta^{1-42}$. In elderly populations it is often the case that Alzheimer's disease pathology will overlay other disease processes. This was found in one of the four MID cases. These results suggests that CCR1 is a marker that is closely associated with Alzheimer's disease pathology (specifically, $A\beta^{1-42}$-positive neuritic plaques) regardless of other concurrent pathological processes that may be present in brain. As such, it is likely to be highly specific for Alzheimer's disease pathology and therefore may be useful as a diagnostic surrogate marker of disease progression.

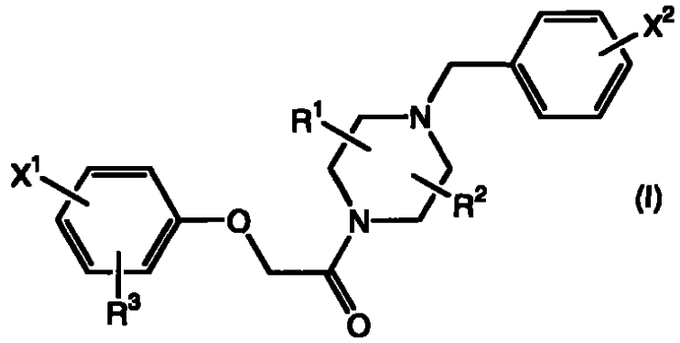
* * * * *

While the present invention has been described with reference to the specific

embodiments thereof, it should be understood by those skilled in the art that various changes may be made and equivalents may be substituted without departing from the true spirit and scope of the invention. In addition, many modifications may be made to adapt a particular situation, material, composition of matter, process, process step or steps, to the objective, spirit and scope of the present invention. All such modifications are intended to be within the scope of the claims appended hereto.

What is claimed is:

1. A compound of formula (I):



(I)

wherein:

X^1 and X^2 are each independently halo;

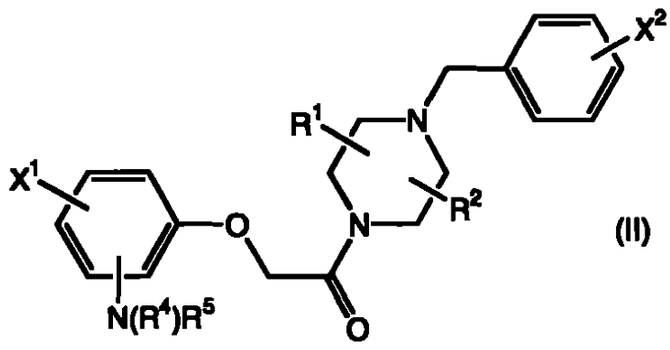
R^1 and R^2 are each independently hydrogen or alkyl; and

R^3 is hydrogen, amino, monoalkylamino, dialkylamino, monoaralkylamino, alkylcarbonylamino, alkenylcarbonylamino, haloalkylcarbonylamino, arylcarbonylamino, alkoxyalkylcarbonylamino, alkoxycarbonylalkylcarbonylamino, glycinamido, monoalkylglycinamido, arylcarbonylglycinamido, aminocarbonylglycinamido, (aminocarbonyl)(alkyl)glycinamido, (alkoxyalkylcarbonyl)glycinamido, ureido, monoalkylureido, monoarylureido, monoaralkylureido, or alaninamido;

and wherein either one of X^1 or X^2 is selected from the group of ^{123}I, ^{125}I, ^{128}I, ^{131}I, ^{75}Br, ^{76}Br, ^{80}Br and ^{18}F; or wherein one of the carbon atoms in the compound is ^{11}C;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

2. A compound of formula (II):



(II)

wherein

X^1 and X^2 are each independently halo;

R^1 and R^2 are each independently hydrogen or alkyl; and

R^4 is hydrogen; and

R^5 comprises a chelator capable of binding a radioactive metal atom chosen from the group of ^{99m}Tc, ^{186}Re and ^{188}Re;

or as a complex with ^{99m}Tc, ^{186}Re and ^{188}Re;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

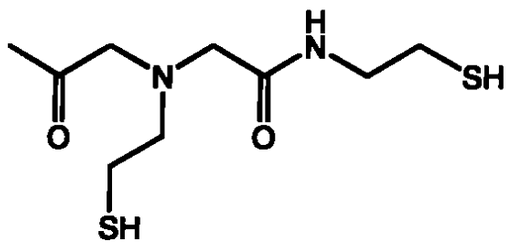
3. The compound of Claim 1 or Claim 2 wherein said compound binds to chemokine receptor CCR1 and passes the blood-brain barrier.

4. The compound of Claim 1 or Claim 2 wherein R^1 is methyl at the 2-position of the piperazinyl radical and R^2 is methyl at the 5-position of the piperazinyl radical.

5. The compound of Claim 1 or Claim 2 wherein R^1 is methyl at the 2-position of the piperazinyl radical and R^2 is hydrogen.

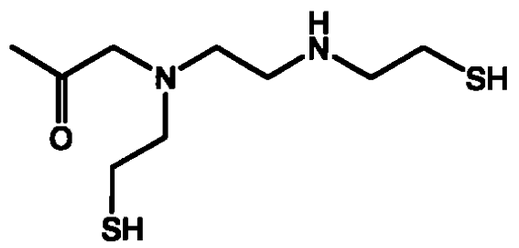
6. The compound of Claim 1 wherein X^1 is chloro at the 4-position of the phenyl radical and X^2 is a ^{18}F atom at the 4-position of the phenyl radical.

7. The compound of Claim 2 wherein R^5 is a chelator of formula (III):



(III)

8. The compound of Claim 2 wherein R^5 is a chelator of formula (IV):



(IV)

9. The compound of Claim 7 or Claim 8 wherein R^5 further comprises a linker moiety comprising an alkyl radical having one to ten carbon atoms, wherein the alkyl radical optionally contains one to ten -C(O)-groups, one to ten -C(O)N(R)- groups, one to ten -N(R)C(O)- groups, one to ten -N(R)- groups, one to ten $-N(R)_2$ groups, one to ten hydroxy groups, one to ten -C(O)OR- groups, one to ten oxygen atoms, one to ten sulfur atoms, one to ten nitrogen atoms, one to ten halogen atoms, one to ten aryl groups, and one to ten saturated or unsaturated heterocyclic rings wherein R is hydrogen or alkyl.

10. The compound of Claim 9 wherein the linker moiety is $-C(O)-CH_2-N(H)$.

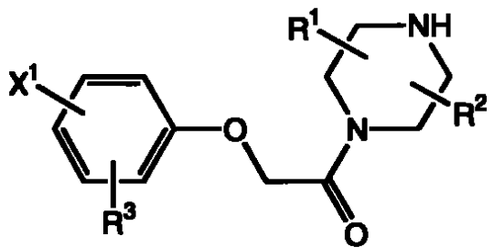
11. The monochloride salt of a compound of Claim 1 to Claim 10.

12. The dichloride salt of a compound of Claim 1 to Claim 10.

13. A method of diagnosing Alzheimer's disease in a human which comprises administering to a human in need of such diagnosis a compound according to Claim 1 to 12 and measuring the radioactivity arising from the administration of the compound to the human either by using a gamma camera or by positron emission tomography (PET).

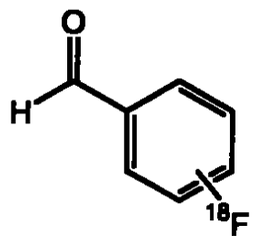
14. A method of using a compound according to Claim 1 to 12 for the manufacture of a radiopharmaceutical for the diagnosis of Alzheimer's disease in a human.

15. A process for the production of a compound of formula (I) according to Claim 1 comprising the reaction of a compound of formula (f):



(f)

wherein R^1, R^2, R^3, and X^1 are as defined in Claim 1,
with a compound of formula (b):



(b)

in the presence of a reducing agent.

Figure 1

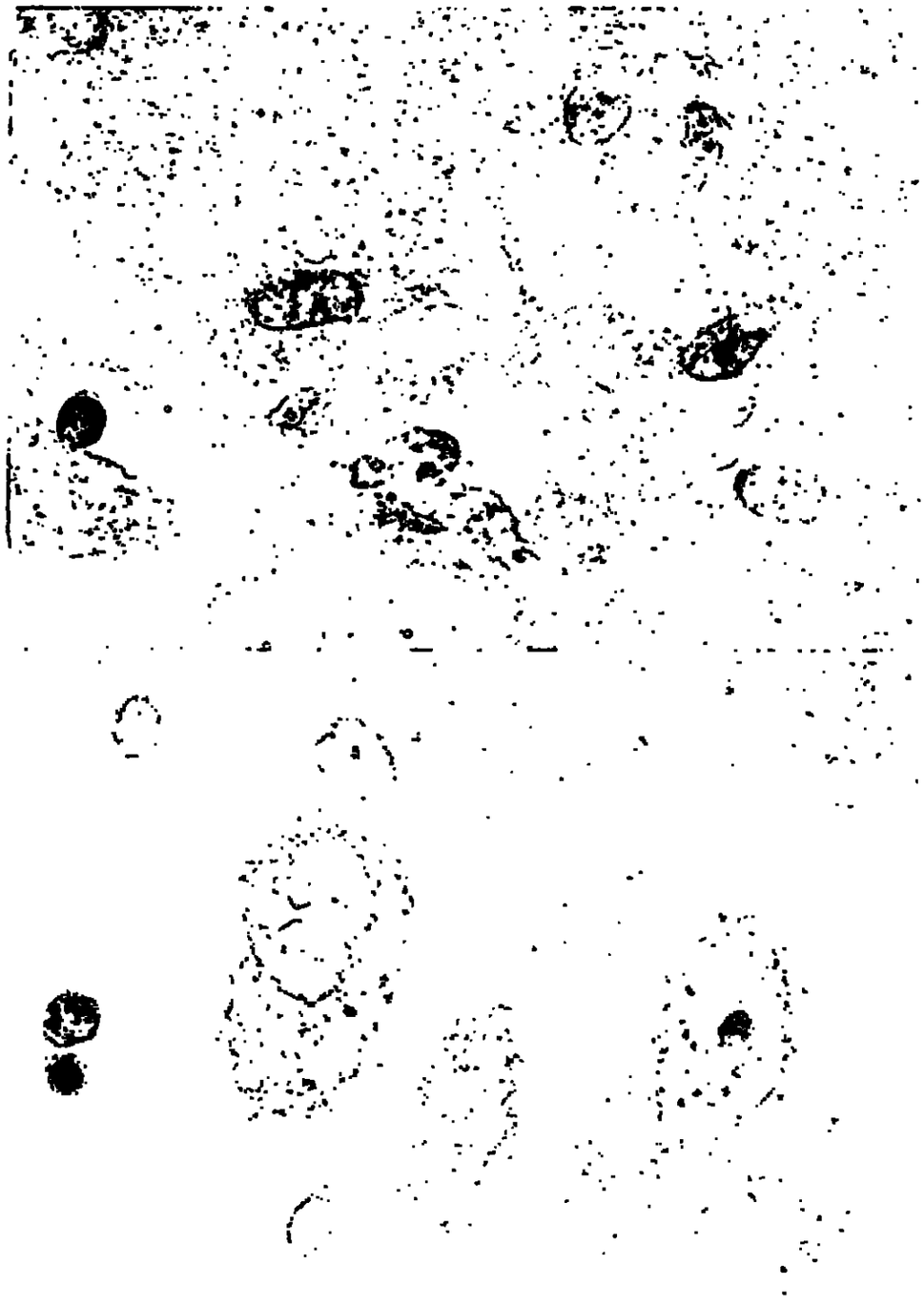


Figure 2

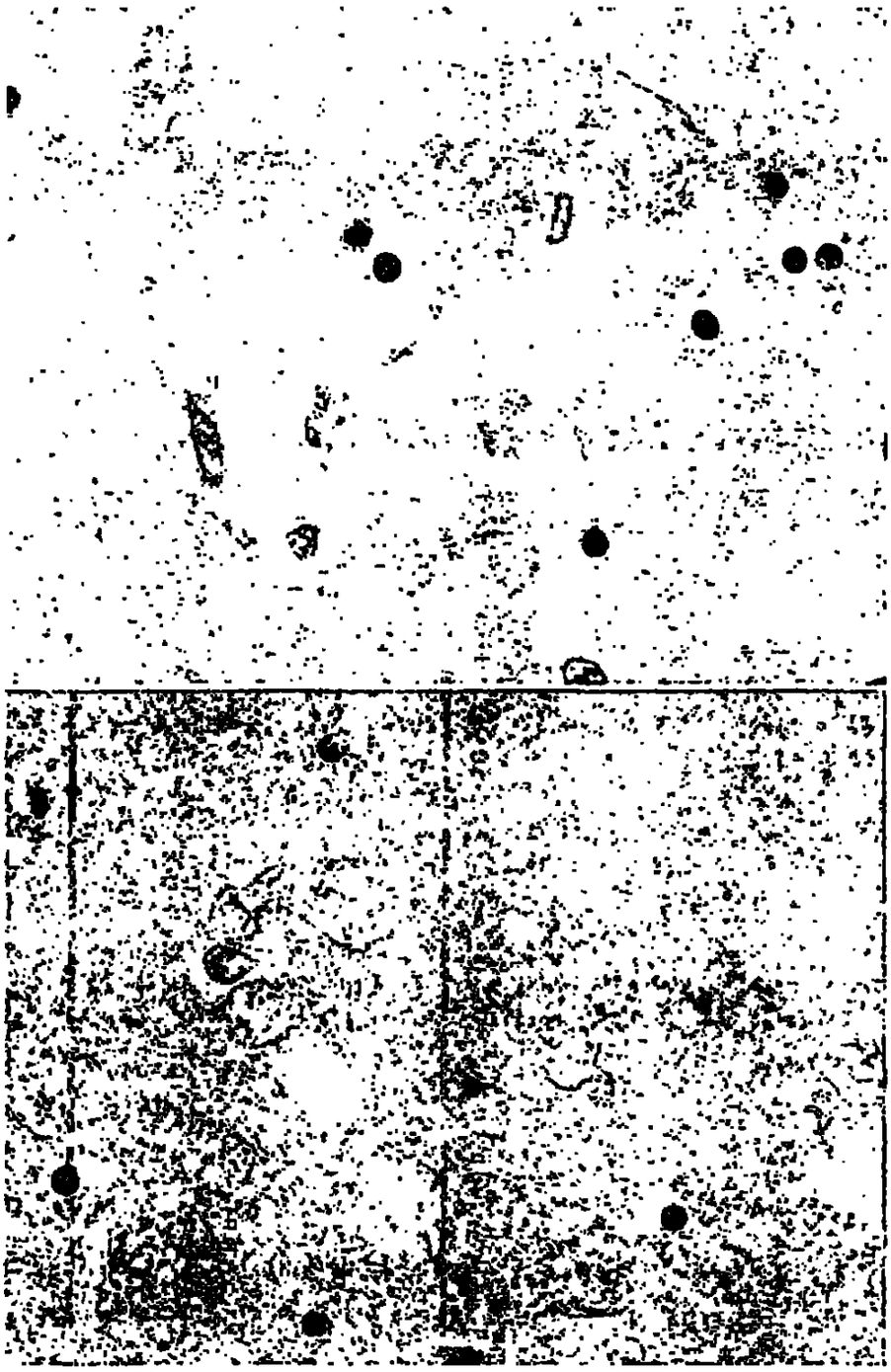


Figure 3



Figure 4

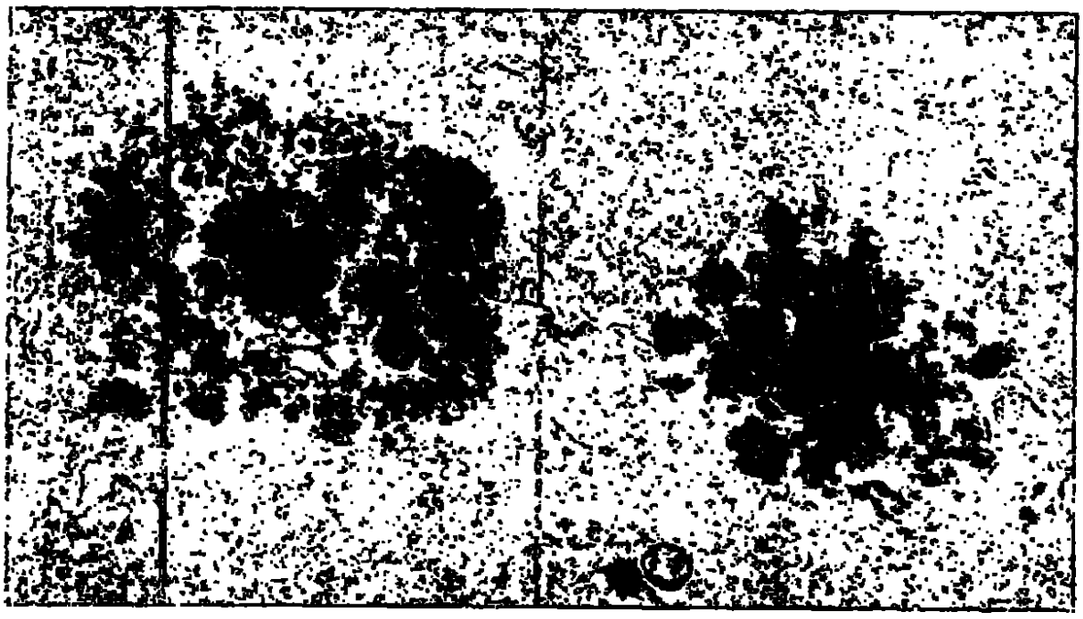


Figure 5

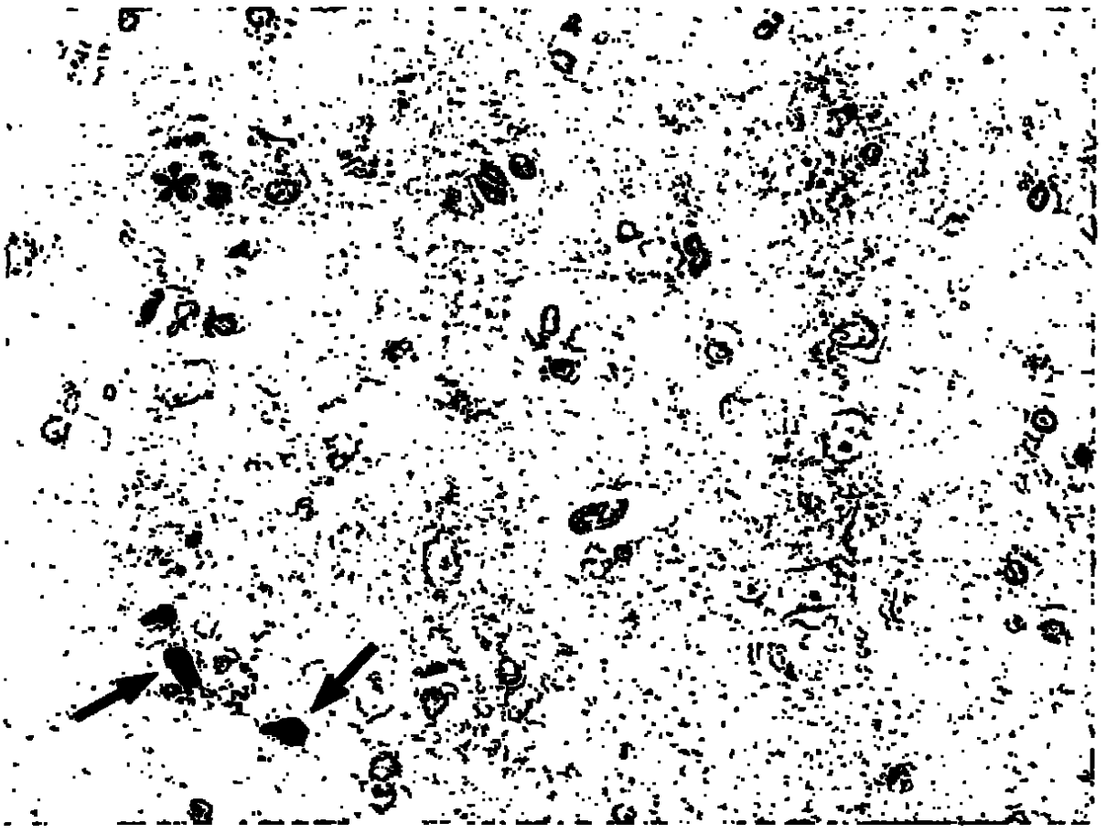


Figure 6

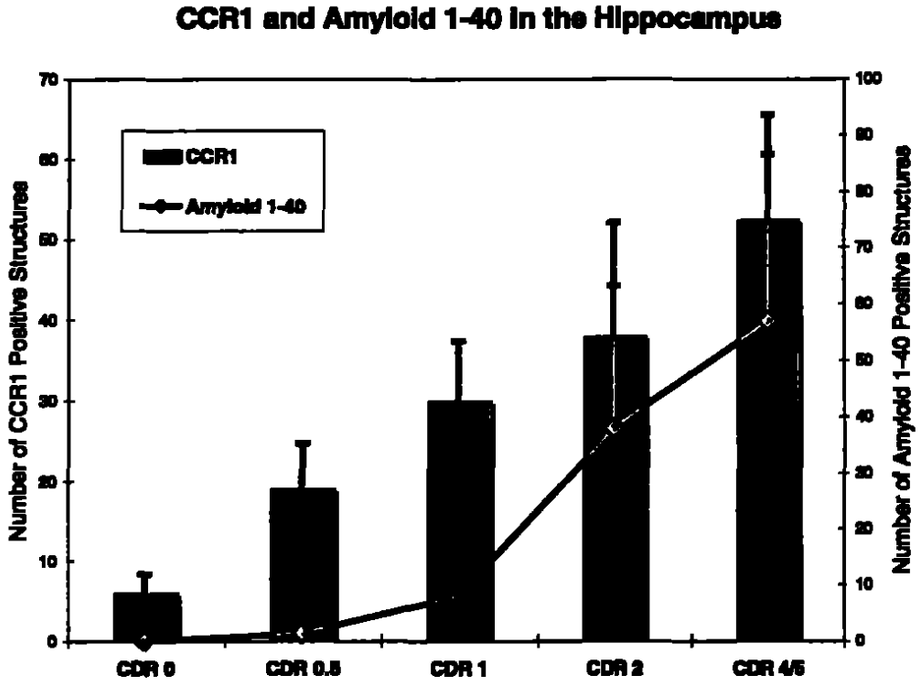

CCR1 and Amyloid 1-40 in the Hippocampus
CCR1
Amyloid 1-40
Number of CCR1 Positive Structures
Number of Amyloid 1-40 Positive Structures
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
CDR 0
CDR 0.5
CDR 1
CDR 2
CDR 4/5

Figure 7

CCR1 and Amyloid 1-42 in the Entorhinal Cortex

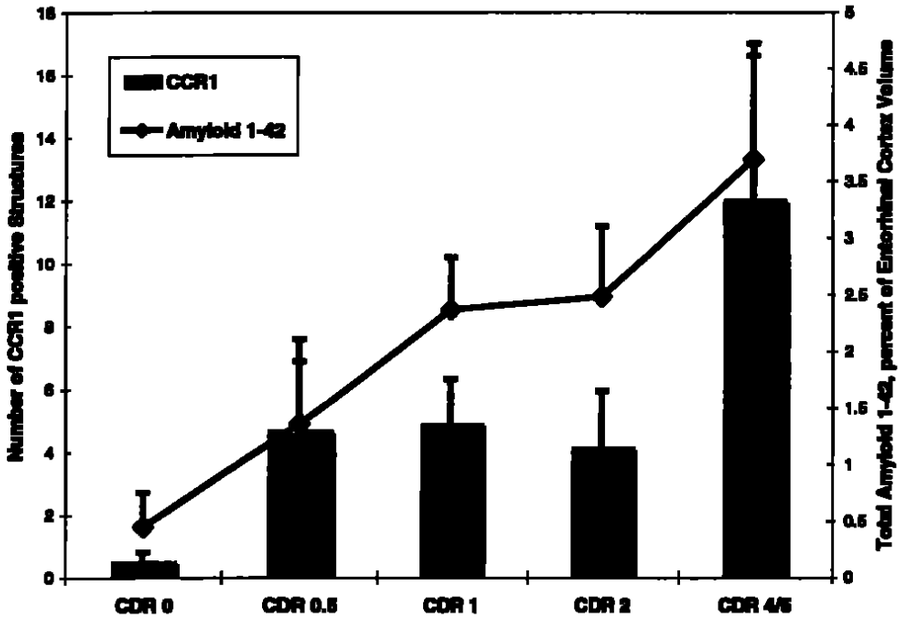


Figure 8

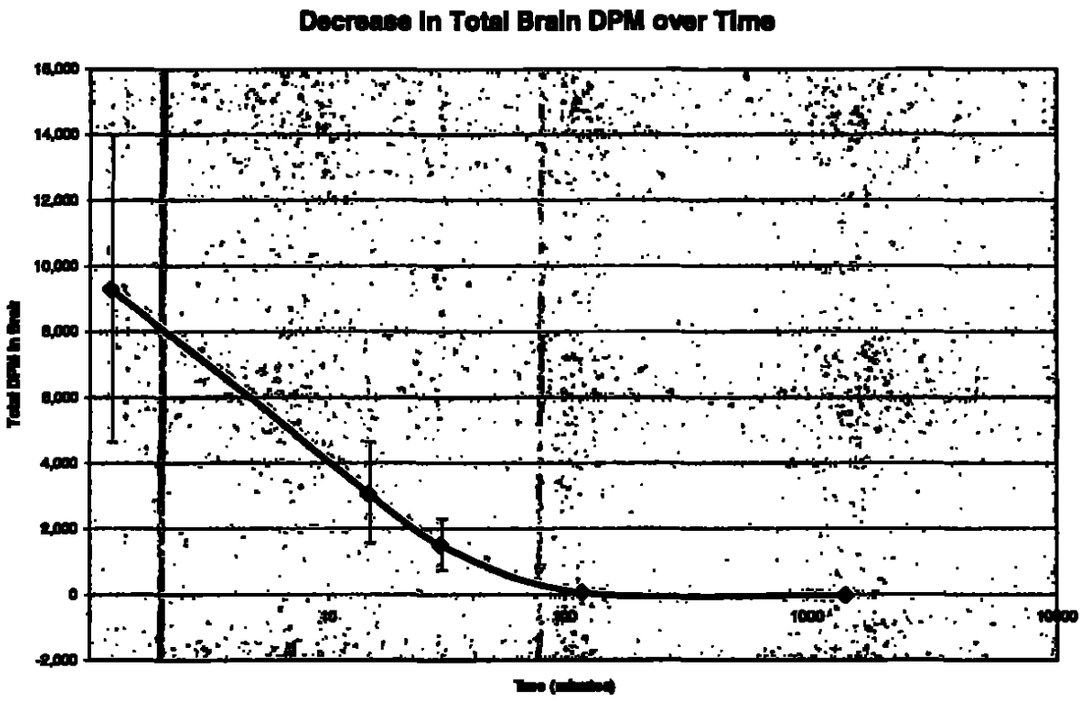

Decrease in Total Brain DPM over Time
16,000
14,000
12,000
10,000
8,000
6,000
4,000
2,000
0
-2,000
Total DPM in Brain
10
100
1000
10000
Time (minutes)

Figure 9

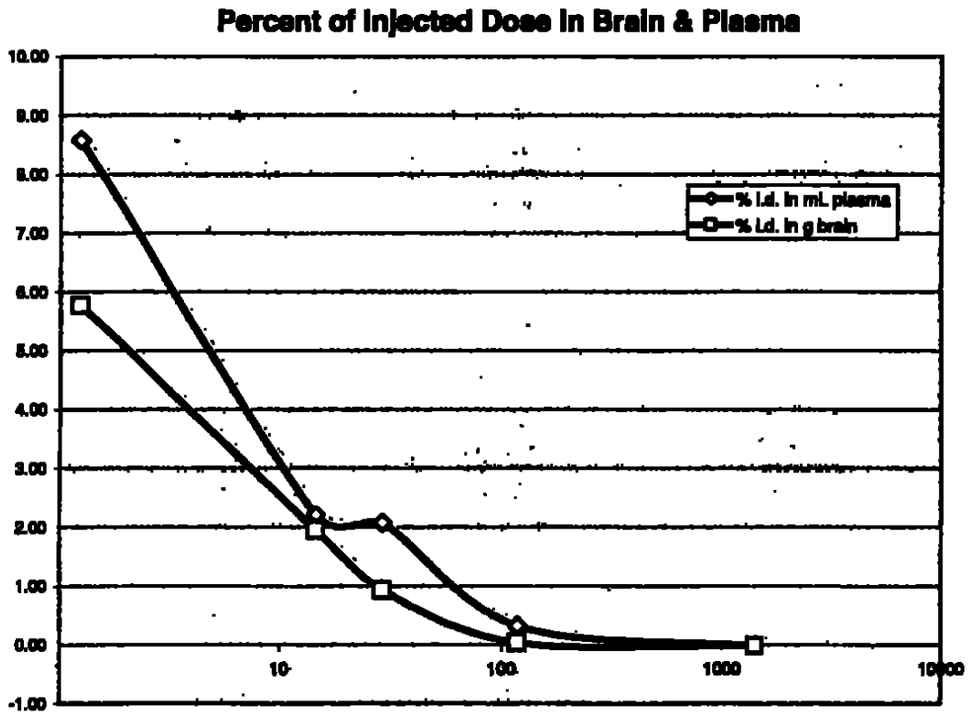
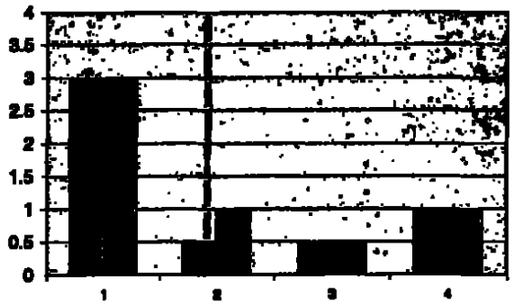
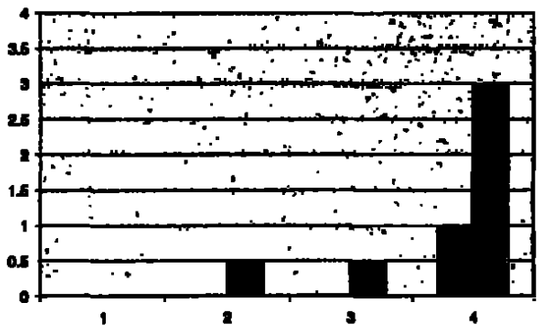

Percent of Injected Dose in Brain & Plasma
10.00
9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
-1.00
10
100
1000
% i.d. in mL plasma
% i.d. in g brain

Figure 10

Congophilic Angiopathy



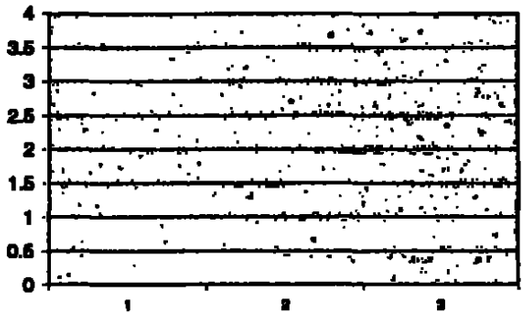
Multi-Infarct Dementia



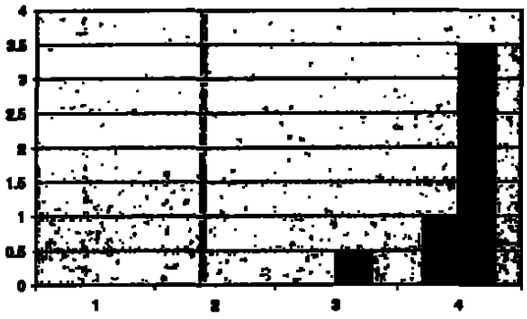
Diffuse Lewy Body Dementia



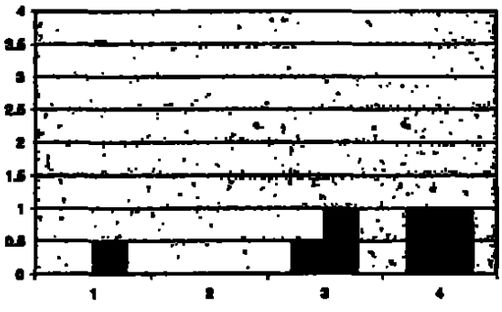
Parkinsonian Dementia of Guam



Pick's Disease



Progressive Supranuclear Palsy



ABSTRACT

This invention is directed to the use of radiopharmaceuticals in diagnosing Alzheimer's disease. In particular the radiopharmaceuticals of the invention are able to pass through the blood-brain barrier and bind to the CCR1 receptor present in brain tissue of patients having Alzheimer's disease.

Case No. 51783AUST1

PROVISIONAL U.S. PATENT APPLICATION

"Radiopharmaceuticals for Diagnosing Alzheimer's Disease"

Inventors: Harald Dinter
Meredith Halks-Miller
Joseph Hesselgesser
Christoph-Stephan Hilger
Richard Horuk
Bernd Johannsen
Peter Mäding
Raju Mohan
Jörg Steinbach

Assignee: Schering AG

Document No. 51783AUST1.doc
Invention Disclosure A-0378

PRODUCTOS RADIOFARMACÉUTICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con nuevos productos radiofarmacéuticos que son de utilidad para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

Descripción breve del arte anterior

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo severo y habitualmente existen aproximadamente 4 millones de norteamericanos que padecen esta enfermedad. Dado que la población de mayor edad continúa creciendo, esta cifra podría alcanzar los 14 millones a mediados del próximo siglo a menos que se descubra una cura o prevención para la enfermedad. Actualmente, no existe ninguna prueba premortem sensible y específica para un diagnóstico temprano de la enfermedad. La enfermedad de Alzheimer se diagnostica actualmente sobre la base de la observación clínica del deterioro cognitivo, acoplado con la eliminación sistemática de otras posibles causas de dichos síntomas. La confirmación del diagnóstico clínico de "probable enfermedad de Alzheimer" solamente se puede realizar examinando el cerebro postmortem. El cerebro en la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la aparición de dos depósitos proteináceos anormales distintivos en regiones del cerebro que son responsables del aprendizaje y la memoria (por ejemplo, en la corteza cerebral y

el hipocampo). Estos depósitos son placas amiloides extracelulares, que son características de la enfermedad de Alzheimer, y ovillos neurofibrilares intracelulares (NFT), que también se encuentran en otros trastornos neurodegenerativos. Los péptidos amiloides son típicamente de 40 ó 42 aminoácidos de longitud ("$A\beta^{1-40}$" o "$A\beta^{1-42}$", respectivamente) y se forman a partir del procesamiento anormal de una proteína mayor asociada a membrana de función desconocida, la proteína precursora de amiloide ("APP"). Se cree que los agregados oligoméricos de estos péptidos son neurotóxicos,dando eventualmente como resultado la degeneración sináptica y la pérdida neuronal. La cantidad de deposición amiloide se correlaciona aproximadamente con la severidad de los síntomas en el momento de la muerte.

En el pasado, se han realizado varios intentos para diseñar productos radiofarmacéuticos que se pudieran usar como agentes de diagnóstico para un diagnóstico premortem de la enfermedad de Alzheimer.

Bornebroek et al. mostraron que el componente amiloide P sérico (SAP) de la proteína asociada al amiloide, marcado con ^{123}I, se acumula en niveles bajos en la corteza cerebral, posiblemente en las paredes de los vasos, de los pacientes con amiloidosis cerebral (Bornebroek, M., et al., Nucl. Med. Commun. (1996), Vol. 17, págs. 929-933).

Saito et al, propusieron una administración mediada por

vectores de $A\beta^{1-40}$ marcados con ^{125}I a través de la barrera hematoencefálica.Se describe que el componente $A\beta^{1-40}$ iodado se une a placas amiloides Aβ en secciones de tejido(Saito, Y.,et al., Proc.Natl.Acad. Sci. EE.UU. 1995, Vol.92, pg. 10227-10231).

En la Patente de EE.UU. N°: 5.231.000 se describen anticuerpos con especificidad por el polipéptido amiloide A4 presente en el cerebro de los pacientes con enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, aún no se ha descripto un método para administrar estos anticuerpos a través de la barrera hematoencefálica.

Zhen et al. describieron modificaciones del colorante que se une a amiloides conocido como "Congo Red™" y complejos de estas moléculas modificadas con tecnecio y renio. Se prevé que los complejos con iones radioactivos puedan constituir agentes potenciales para el diagnóstico por imágenes de la enfermedad de Alzheimer (Zhen et al.,J.Med.Chem. (1999), Vol. 42, pg. 2805-2815). Sin embargo,el potencial de los complejos para atravesar la barrera hematoencefálica es limitado.

Un grupo en la Universidad de Pennsylvania en EE.UU. (Skovronsky, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 2000, Vol. 97, págs. 7609-7614) ha desarrollado un derivado marcado con fluorescencia del Congo Red que es permeable en el cerebro y que se une de una manera no específica con materiales ami-

loides (es decir, péptidos en conformación laminar con plegamiento P). Sería necesario marcar este compuesto con un componente radioactivo y luego verificarlo en exámenes preclínicos para evaluar su farmacocinética y toxicidad antes de la evaluación clínica.

Klunk et al. describieron experimentos con un derivado de Congo Red™, la crisamina G (CG). Se describe que CG se une bien al β-amiloide sintético in vitro, y atraviesa la barrera hematoencefálica en ratones normales (Klunk et al., Neurobiol. Aging (1994), Vol. 15, N° 6, págs. 691-698).

Bergstrom et al. presentaron un compuesto marcado con iodo-123 como un radioligando potencial para la visualización de receptores de acetilcolin muscarínicos M1 y M2 en la enfermedad de Alzheimer (Bergstrom et al., Eur. J. Nucl. Med. (1999), Vol. 26, págs. 1482-1485).

Recientemente, se ha descubierto que ciertos receptores específicos de quimioquinas son sensibilizados en los cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Horuk, R. et al., J. Immunol. (1997), Vol. 158, págs. 2882-2890); Xia et al., J. NeuroVirol. (1999), Vol. 5, págs. 32-41). Además, se ha demostrado recientemente que el receptor de la quimioquina CCR1 es sensibilizado en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer avanzada y está ausente en los cerebros normales (Halks-Miller et al, CCR1 Immunoreactivity in Alzheimer's Disease Brains, Society for Neuroscience Meeting

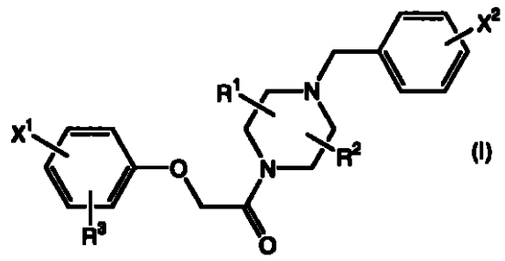
Abstract, N° 787.6, Volumen 24, 1998). Los antagonistas del receptor CCR1 y el uso de los mismos como agentes antiinflamatorios se describen en la publicación de la Solicitud de Patente PCT, WO 98/56771.

Ninguna de las propuestas descriptas previamente han dado como resultado un desarrollo clínico de un agente para el diagnóstico por imágenes para un diagnóstico temprano de la enfermedad de Alzheimer. Por consiguiente, persiste la necesidad de un agente de diagnóstico que pueda ser de utilidad para un diagnóstico confiable y temprano de la enfermedad de Alzheimer.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a productos radiofarmacéuticos que se unen al receptor CCR1 y que tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, y que por ello son de utilidad en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, preferentemente en una etapa temprana de la enfermedad.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención se refiere a compuestos de fórmula (I):



(I)

donde:

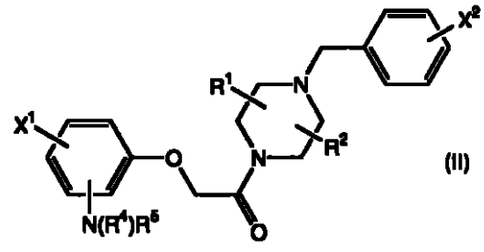
X^1 y X^2 son cada uno, independientemente entre sí, halo;

R^1 y R^2 son cada uno, independientemente entre sí, hidrógeno o alquilo; y

R^3 es hidrógeno, amina, monoalquilamina, dialquilamina, monoaralquilamina, alquilcarbonilamina, alquenilcarbonilamina, haloalquilcarbonilamina, arilcarbonilamina, alcoxialquilcarbonilamina, alcoxicarbonilalquilcarbonilamina, glicinamida, monoalquilglicinamida, arilcarbonilglicinamida, aminocarbonilglicinamida, (aminocarbonil)(alquil)glicinamida, (alcoxialquilcarbonil)glicinamida, ureido, monoalquilureido, monoarilureido, monoaralquilureido o alaninamida;

y donde cualquiera de X^1 o X^2 se selecciona del grupo formado por ^{123}I, ^{125}I, ^{128}I, ^{131}I, ^{75}Br, ^{76}Br, ^{80}Br y ^{18}F; o donde uno de los átomos de carbono en el compuesto es ^{11}C; o una sal aceptable para uso farmacéutico de los mismos.

En otro aspecto, la invención se refiere a compuestos de fórmula (II):



(II)

donde

X^1 y X^2 son cada uno, independientemente entre sí, halo;

R^1 y R^2 son cada uno, independientemente entre sí, hidrógeno o alquilo; y

R^4 es hidrógeno; y

R^5 comprende un quelante capaz de ligar un átomo de metal radioactivo seleccionado del grupo formado por ^{99m}Tc, ^{186}Re y ^{188}Re;

o como un complejo con ^{99m}Tc, ^{186}Re y ^{188}Re; o una sal aceptable para uso farmacéutico de los mismos.

En otro aspecto, esta invención se refiere a un método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un ser humano que comprende la administración a un ser hūmano que necesita dicho diagnóstico de un compuesto de fórmula (I) o fórmula (II), descripto previamente y en este documento, y la medición de la radioactividad que produce dicha administración del compuesto al ser humano ya sea usando una cámara gamma o mediante tomografía de emisión de positrones (PET).

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para usar un compuesto de la invención en la elaboración de un producto radiofarmacéutico destinado al diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un ser humano.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para preparar los compuestos de la invención.

Descripción breve de las figuras

En la figura 1 se muestra la expresión del CCR1 en tejido de cerebro con enfermedad de Alzheimer.

En la figura 2 se muestra la especificidad de anticuerpos del CCR1 en tejido de cerebro con enfermedad de Alzheimer.

En la figura 3 se muestran secciones de tejido con marcación doble para CCR1-$A\beta^{1-40}$.

En la figura 4 se muestran placas neuríticas con marcación doble para CCR1 y $A\beta^{1-42}$.

En la figura 5 se muestra una coloración difusa de $A\beta^{1-42}$ en cerebro con enfermedad de Alzheimer.

La figura 6 es un gráfico que muestra la relación entre CCR1 y $A\beta^{1-40}$ según la calificación CDR.

La figura 7 es un gráfico que muestra la relación entre CCR1 y $A\beta^{1-42}$ según la calificación CDR.

La figura 8 es un gráfico que demuestra la disminución de radioactividad total en cerebro en el tiempo.

La figura 9 es un gráfico que muestra el porcentaje de dosis inyectada en cerebro y plasma.

En la figura 10 se muestran gráficos de la expresión del CCR1 en otras enfermedades neurodegenerativas.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Tal como se utilizan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, a menos que se indique lo contrario, los siguientes términos tienen el significado que se

indica a continuación:

"Alquilo" se refiere a un radical de cadena lineal o ramificada, monovalente o divalente, que solamente consta de carbono e hidrógeno, que no contiene insaturaciones y que tiene uno a ocho átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, 1-metiletil(iso-propilo), n-butilo, n-pentilo, 1,1-dimetiletil(t butilo), n-heptilo y semejantes.

"Alquilcarbonilamina" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-R_a$, donde R_a es un radical alquilo definido previamente, por ejemplo, acetilamina, etilcarbonilamina, n-propilcarbonilamina y semejantes.

"Alquenilo" se refiere a un radical de cadena lineal o ramificada, monovalente o divalente, que solamente consta de carbono e hidrógeno, que contiene por lo menos un enlace doble y que tiene de dos a ocho átomos de carbono, por ejemplo, etenilo, prop-1-enilo, but-1-enilo, pent-1-enilo, penta-1,4-dienilo y semejantes.

"Alquenilcarbonilamina" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-R_c$, donde R_c es un radical alquenilo definido previamente, por ejemplo, etenilcarbonilamina, prop-2-enilcarbonilamina, but-2-enilcarbonilamina y semejantes.

"Alcoxi" se refiere a un radical de fórmula $-OR_a$, donde R_a es un radical alquilo definido previamente, por ejemplo, metoxi, etoxi, n-propoxi, 1-metiletoxi (iso-propoxi), n-butoxi, n-pentoxi, 1,1-dimetiletoxi (t-butoxi) y semejantes.

"Alcoxicarbonilalquilcarbonilamina" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-R_a-C(O)OR_a$, donde cada R_a es, independientemente entre sí, un radical alquilo definido previamente, por ejemplo, etoxicarbonilmetilcarbonilamina, metoxicarbonilmetilcarbonilamina, (2-etoxicarboniletil)carbonilamina, (2-metoxicarboniletil)carbonilamina y semejantes.

"(Alcoxialquilcarbonil)glicinamida" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-CH_2-N(H)-C(O)-R_a-O-R_a$, donde cada R_a es, independientemente entre sí, un radical alquilo definido previamente, por ejemplo, (metoxiacetil)glicinamida, (etoxiacetil)glicinamida y semejantes.

"Amina" se refiere a un radical $-NH_2$.

"Amincarbonilglicinamida" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-CH_2-N(H)-C(O)-NH_2$.

"(Amincarbonil)(alquil)glicinamida" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-CH_2-N(R_a)=C(O)-NH_2$, donde R_a es un radical alquilo definido previamente.

"Arilo" se refiere a un radical fenilo o naftilo. A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, el término "arilo" o el prefijo "ar-" (tal como en "aralquilo") significa que se incluyen radicales arilo sustituidos optativamente entre uno o varios sustituyentes seleccionados del grupo formado por halo, alquilo, alcoxi, haloalquilo, haloalcoxi, nitro, amina, monoalquilamina y dialquilamina, ya definidos en este documento.

"Arilcarbonilamina" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-R_b$, donde R_b es un radical arilo definido previamente, p.ej., (4-metoxifenil)carbonilamina, (4-fluorofenil)carbonilamina, (4-clorofenil)carbonilamina y semejantes.

"Arilcarbonilglicinamida" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-CH_2-N(H)-C(O)-R_b$, donde R_b es un radical arilo definido previamente, por ejemplo, fenilcarbonilglicinamida, (4-fluoro-3-trifluorometilfenil)carbonilglicinamida, (4-fluorofenil)carbonilglicinamida y semejantes.

"Aralquilo" se refiere a un radical de fórmula $-R_aR_b$, donde R_a es un radical alquilo definido previamente y R_b es un radical arilo definido previamente,p.ej., bencilo y semejantes.

"Alcoxialquilcarbonilamina" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-R_a-O-R_a$, donde cada R_a es un radical alquilo definido previamente,p.ej., metoximetilcarbonilamina, etoxietilcarbonilamina, metoxietilcarbonilamina y semejantes.

"Alaninamida" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-C(CH_3)H-NH_2$.

"Bencilo" se refiere a un radical de fórmula $-CH_2-R_h$, donde R_h es un radical fenilo sustituido optativamente por uno o varios sustituyentes seleccionados del grupo formado por halo, alquilo, haloalquilo, alcoxi, nitro, amina, monoalquilamina, y dialquilamina.

"Dialquilamina" se refiere a un radical de fórmula -$N(R_a)R_a$, donde cada R_a es, independientemente entre sí, un radical alquilo definido previamente, por ejemplo, dimetilamina, metiletilamina, dietilamina, dipropilamina, etilpropilamina y semejantes.

"Glicinamida" se refiere a un radical de fórmula -N(H)-C(O)-CH_2-NH_2.

"Halo" se refiere a bromo, cloro, iodo o flúor.

"Haloalquilo" se refiere a un radical alquilo, definido previamente, es decir sustituido por uno o varios radicales halo, definido previamente,p.ej., trifluorometilo, difluorometilo, triclorometilo, 2-trifluoroetilo, 1-fluorometil-2-fluoroetilo, 3-bromo-2-fluoropropilo, 1-bromometil-2-bromoetilo y semejantes.

"Haloalquilcarbonilamina" se refiere a un radical de fórmula -N(H)-C(O)-R_f, donde R_f es un radical haloalquilo definido previamente, por ejemplo, trifluorometilcarbonilamina, trifluorometilcarbonilamina, 2-bromoetilcarbonilamina y semejantes.

"Monoalquilamina" se refiere a un radical de fórmula -$N(H)R_a$, donde R_a es un radical alquilo definido previamente, p.ej., metilamina, etilamina, propilamina y semejantes.

"Monoaralquilamina" se refiere a un radical de fórmula -$N(H)R_d$, donde R_d es un radical aralquilo definido previamente,p.ej., bencilamina, (3,4,5-trimetoxibencil)amina, (4-

clorobencil)amina y semejantes.

"Monoalquilglicinamida" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-CH_2-N(H)R_a$, donde R_a es un radical alquilo definido previamente.

"Monoalquilureido" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-N(H)R_a$ o un radical de fórmula $-N(R_a)-C(O)-NH_2$, donde R_a es un radical alquilo definido previamente.

"Monoarilureido" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-N(H)R_b$ o un radical de fórmula $-N(R_b)-C(O)-NH_2$, donde R_b es un radical arilo definido previamente.

"Monoaralquilureido" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)-C(O)-N(H)R_d$ o un radical de fórmula $-N(R_d)-C(O)-NH_2$, donde R_d es un radical aralquilo definido previamente.

Los términos "optativo" u "optativamente" significan que un suceso o circunstancia descripto puede producirse, o no, y que la descripción incluye casos donde dicho suceso o circunstancia tiene lugar y casos en que no. Por ejemplo, "arilo sustituido optativamente" significa que el radical arilo puede estar sustituido o no y que la descripción incluye tanto los radicales arilo sustituidos como no sustituidos.

Una "sal aceptable para uso farmacéutico" incluye sales de adición tanto ácida como alcalina.

Una "sal de adición ácida aceptable para uso farmacéutico" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia

biológica y las propiedades de las bases libres, que no sean biológicamente inconvenientes o indeseadas de otra manera, y que se forman con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y semejantes, y ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido pirúvico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido mandélico, ácido metansulfónico, ácido etansulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y semejantes. Las sales particularmente preferidas de los compuestos de la invención son las sales monoclorhidrato y las sales diclorhidrato.

Una "sal de adición alcalina aceptable para uso farmacéutico" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia biológica y las propiedades de los ácidos libres, que no sean biológicamente inconvenientes o indeseadas de otra manera. Estas sales se preparan a partir de la adición de una base inorgánica o una base orgánica al ácido libre. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen, pero sin limitaciones, las sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, zinc, aluminio y semejantes. Las sales inorgánicas preferidas son las sales de amonio, sodio, potasio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero sin limitaciones, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluyendo ami-

nas sustituidas naturales, aminas cíclicas y resinas de intercambio de iones alcalinos, tal como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamine, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, trimetamina, diciclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliamina y semejantes. Las bases orgánicas particularmente preferidas son isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetilamina, diciclohexilamina, colina y cafeína.

"Ureido" se refiere a un radical de fórmula -N(H)-C(O)-NH_2.

A partir de las definiciones anteriores y los ejemplos se considera que para los radicales que contienen un grupo alquilo sustituido se puede producir cualquier sustitución sobre cualquiera de los carbonos del grupo alquilo.

Los compuestos de la invención, o las sales aceptables para uso farmacéutico de los mismos, pueden tener átomos de carbono asimétricos en su estructura. Los compuestos de la invención y las sales aceptables para uso farmacéutico de los mismos pueden entonces existir como enantiómeros, diastereoisómeros, racematos y mezclas individuales de enantiómeros y diastereisómeros. Todos dichos enantiómeros, diastereisómeros, racematos y mezclas individuales de los mismos

se consideran dentro del alcance de esta invención. La configuración absoluta de algunos átomos de carbono dentro de los compuestos, si se conoce, está indicada por el descriptor absoluto apropiado R o S.

Utilidad y administración

Los compuestos de la invención descriptos en este documento son antagonistas del receptor de la quimioquina conocida como CCR1 y tienen capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica. Los compuestos son entonces adecuados como agentes de diagnóstico in vivo para el diagnóstico por imágenes de la enfermedad de Alzheimer. La detección de radioactividad se lleva a cabo de acuerdo con procedimientos bien conocidos en el arte, ya sea usando cámara gamma o tomografía de emisión de positrones (PET).

Preferentemente, la base libre o una forma de sal aceptable para uso farmacéutico, por ejemplo una sal monoclorhidrato o diclorhidrato, de un compuesto de la invención se usa en una formulación galénica como agente de diagnóstico. La formulación galénica que contiene al compuesto de la invención contiene optativamente los adyuvantes conocidos en el arte, por ejemplo reguladores del pH, cloruro de sodio, ácido láctico, agentes tensioactivos, etc. Se puede efectuar también una esterilización por filtración de la formulación galénica bajo condiciones estériles antes de su uso.

La dosis radioactiva se debe encontrar en un rango en-

tre 1 y 100 mCi, preferentemente entre 5 y 30 mCi y más preferentemente entre 5 y 20 mCi por aplicación.

Pruebas

La conveniencia de los compuestos como agentes de diagnóstico por imágenes para la enfermedad de Alzheimer se puede demostrar con los protocolos experimentales conocidos por los especialistas en el arte. Por ejemplo, la sensibilización de los receptores CCR1 en cerebros con enfermedad de Alzheimer se puede demostrar en experimentos de coloración inmunohistoquímica de tejidos de autopsia de cerebro recolectados de pacientes con enfermedad de Alzheimer como se describirá con detalle más adelante en los ejemplos. La capacidad de los compuestos de la invención de unirse al receptor CCR1 y su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, también se puede evaluar mediante los ensayos in vitro e in vivo que se describirán más adelante en los ejemplos. En particular, en el ejemplo 10 se describe un gran estudio que se llevó a cabo para conocer el grado de expresión CCR1 en las diferentes etapas de la enfermedad de Alzheimer. Los tejidos de cerebro de 50 casos de autopsia mostraron una correlación entre el grado de severidad clínica (demencia) en la enfermedad de Alzheimer y la expresión de CCR1 en los neuritos distróficos. La expresión del CCR1 en las estructuras tipo placa en los cerebros de individuos clínicamente normales es rara. Además, no se ha detectado

expresión de CCR1 en los cerebros de individuos con otras enfermedades neurodegenerativas a menos que exista una patología concomitante de enfermedad de Alzheimer (específicamente, $A\beta^{1-42}$ en las placas).

Realizaciones preferidas

Entre los diversos aspectos de la invención, se prefieren algunos compuestos de fórmula (I). En particular, se prefieren los compuestos de fórmula (I) donde X^1 es cloro en la posición 4 del anillo fenilo y X^2 es un átomo de ^{18F} en la posición 4 del anillo fenilo. Se prefieren especialmente dichos compuestos para su uso como agentes de diagnóstico mediante tomografía de emisión de positrones (PET).

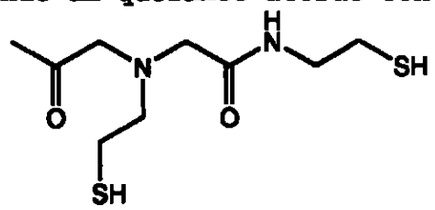
Se prefieren aún más los compuestos de fórmula (I) donde R^3 está en la posición 2 del anillo fenilo y R^1 es un metilo en la posición 2 del anillo piperazinilo y R^2 es un metilo en la posición 5 del anillo piperazinilo. Se prefieren igualmente los compuestos de fórmula (I) donde R^3 está en la posición 2 del anillo fenilo y R^1 es un metilo en la posición 2 del anillo piperazinilo y R^2 es hidrógeno.

Se prefieren además estos compuestos preferidos en las forma de sus sales mono o diclorhidrato.

Entre los diversos aspectos de la invención, se prefieren algunos compuestos de fórmula (II). En particular, los compuestos de fórmula (II) donde $-N(R^4)^{R5}$ se encuentra en la posición 2 del anillo fenilo y R^1 se encuentra en la posi-

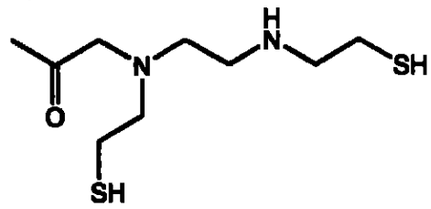
ción 2 del anillo piperazinilo y R^2 se encuentra en la posición 5 del anillo piperazinilo. Se prefieren igualmente los compuestos de fórmula (II) donde $-N(R^4)^{R5}$ se encuentra en la posición 2 del anillo fenilo y R^1 es un metilo en la posición 2 del anillo piperazinilo y R^2 es hidrógeno.

Se prefieren aún más los compuestos de fórmula (II), donde ^{R5} comprende un quelante acorde con la fórmula (III):



(III)

o la fórmula (IV):



(IV)

así como los complejos de los mismos con ^{99m}Tc, ^{186}Re y ^{188}Re. Entre estos compuestos preferidos, se prefieren aún más los compuestos de fórmula (II) donde ^{R5} comprende un quelante acorde con la fórmula (III) o (IV), y donde el quelante está unido al nitrógeno en el grupo $-N(R^4)^{R5}$ del compuesto no radioactivo de fórmula (II) mediante un grupo ligador que comprende un radical alquilo que tiene de uno a diez átomos de carbono, donde el radical alquilo contiene optativamente uno a diez grupos -C(O)-, uno a diez grupos -C(O)N(R)-, uno a diez grupos -N(R)C(O)-, uno a diez grupos -N(R)-, uno a diez

grupos $-N(R)_2$, uno a diez grupos hidroxi, uno a diez grupos -C(O)O-, uno a diez átomos de oxígeno, uno a diez átomos de azufre, uno a diez átomos de nitrógeno, uno a diez átomos de halógeno, uno a diez grupos arilo y uno a diez anillos heterocíclicos saturados o insaturados, donde R es hidrógeno o alquilo. Un grupo ligador preferido es $-C(O)-CH_2-N(H)-$. Entre los compuestos de la invención, los compuestos de fórmula (I) más preferidos son los compuestos seleccionados del grupo formado por los siguientes:

1-(5-cloro-2-{2-[(2R)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea;

N'-(mercaptoet-1-il)-N'-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicilglicinamida, complejo con tecnecio-99m;

1-(2-{2-[(2R)-4-(4-fluorobencil)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}-5-iodo-^{123}I-fenil)urea;

N'-(2-mercaptoet-1-il)-N'-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)-N'-(5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicinamida, complejo con tecnecio-99m;

N'-(2-mercaptoet-1-il)-N-(5-mercapto-3-azapent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicinamida, complejo con tecnecio-99m;

2-(2-amin-4-clorofenoxi)-1-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18F}-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]etan-1-ona;

2-(2-amin-4-clorofenoxi)-1-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18F}-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]etan-1-ona;

2-(2-amin-4-clorofenoxi)-1-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]etan-1-ona;

2-(2-amin-4-clorofenoxi)-1-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]etan-1-ona;

2-[4-cloro-2-(dietilamin)fenoxi]-1-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]etan-1-ona;

2-[4-cloro-2-(dietilamin)fenoxi]-1-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]etan-1-ona;

2-[4-cloro-2-(dietilamin)fenoxi]-1-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18F}-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]etan-1-ona;

2-[4-cloro-2-(dietilamin)fenoxi]-1-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]etan-1-ona;

1-(5-cloro-2-(2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-3-(2,4-diclorofenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-(2,4-dicloro-fenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-(2,4-dicloro-fenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-(2,4-diclorofenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)urea;

1-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5,-dimetilpiperazin-1-il]-2-(2-isopentilamin-4-clorofenoxi)etan-1-ona;

1-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5,-dimetilpiperazin-1-il]-2-(2-isopentilamin-4-clorofenoxi)etan-1-ona;

1-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5,-dimetilpiperazin-1-il]-2-(2-isopentilamin-4-clorofenoxi)etan-1-ona;

1-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5,-dimetilpiperazin-1-il]-2-(2-isopentilamin-4-clorofenoxi)etan-1-ona;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-metilpropanamida;

N-(5-cloro-2-(2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-metilpropanamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-metilpropanamida;

N (5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-metilpropanamida;

N (5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-(metoxi)aceta-mida;

N (5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-(metoxi)acetamida;

N (5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-(metoxi)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-(metoxi)acetamida;

(E)-N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-butenamida;

(E)-N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-butenamida;

(E)-N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-butenamida;

(E)-N-(5-cloro-2-(2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-butenamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)succinamato de metilo;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,SRS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)succinamato de metilo;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)succinamato de metilo;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)succinamato de metilo;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)succinamato de etilo;

N-(5-cloro-2-(2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi)fenil)succinamato de etilo;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-

dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)succinamato de etilo;

N-(5-cloro-2-f2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)succinamato de etilo;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)acetamida;

N-(5-cloro-2-(2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)propanamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)propanamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)propanamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)propanamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-3-fluorobenzamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-3-fluorobenzamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-fluorobenzamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-fluorobenzamida;

1-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-(p-tolil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-(p-tolil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-(p-tolil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-(p-tolil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-etilurea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-etilurea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-etilurea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-etilurea;

1-bencil-3-(5-cloro-2-(2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea;

1-bencil-3-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea;

1-bencil-3-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-

bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea;

1-bencil-3-(5-cloro-2-f 2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-(4-nitrofenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-(4-nitrofenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-(4-nitrofenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-3-(4-nitrofenil)urea;

2-(2-bencilamin-4-clorofenoxi)-1-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]etan-1-ona;

2-(2-bencilamin-4-clorofenoxi)-1-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]etan-1-ona;

2-(2-bencilamin-4-clorofenoxi)-1-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]etan-1-ona;

2-(2-bencilamin-4-clorofenoxi)-1-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]etan-1-ona;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)glicinamida;

N-(5-cloro-2-f2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)glicinamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)glicinamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)glicinamida;

1-(5-cloro-2-{2-[(2R)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2-metil-piperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea;

1-(5-cloro-2-{2-[(2S)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2-metil-piperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)urea;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetil-piperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(metilamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetil-piperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(metilamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetil-piperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-(metilamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetil-piperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(metilamin)acetamida;

2-bromo-N-(5-cloro-2-{(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)acetamida;

2-bromo-N-(5-cloro-2-{(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-ben-

cil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)acetamida;

2-bromo-N-(5-cloro-2-{(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)acetamida;

2-bromo-N-(5-cloro-2-{(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(ureido)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(ureido)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(ureido)acetamida;

N-(5-cloro-2-(2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(ureido)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(1-metilureido)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(1-metilureido)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(1-metilu-

reido)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi)fenil)-2-(1-metilureido)acetamida;

(2RS)-N-(5-cloro-2-(2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-aminpropa-namida;

(2SR)-N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-aminpropanamida;

(2RS)-N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-aminpropanamida;

(2SR)-N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-aminpropanamida;

(2RS)-N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-aminpropanamida;

(2SR)-N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-aminpropana-mida;

(2RS)-N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-aminpropanamida;

(2SR)-N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-aminpropanamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-(2,4-difluorobenzoílamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-(2,4-difluorobenzoílamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-(2,4-difluorobenzoílamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-(2,4-difluorobenzoílamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-(metoxiacetilamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-(metoxiacetilamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-(metoxiacetilamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-

dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(metoxiacetilamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-f2-[(2SR,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-(2-iodobenzoílamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5RS)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)-2-(2-iodobenzoílamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2SR,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(2-iodobenzoílamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2RS,5SR)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)-2-(2-iodobenzoílamin)acetamida;

N-(5-cloro-2-{2-[(2R)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)glicinamida; y

N-(5-cloro-2-{2-[(2S)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fenil)glicinamida

así como las sales mono y diclorhidrato de los mismos.

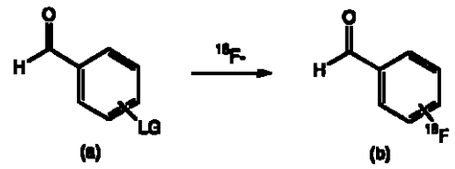
Preparación de los compuestos de la invención

A. Preparación de los compuestos de fórmula (I)

En general, los agentes para diagnóstico por imágenes radioactivos de fórmula (I) de la presente invención se preparan haciendo reaccionar derivados 4-halobencilo radioactivos con derivados piperazina. Se prefieren los derivados 4-

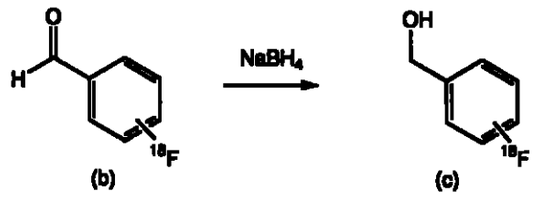
fluorobencilo marcados con ^{18}F para el diagnóstico por imágenes mediante PET. Un método general para preparar haluros 4-fluoro-^{18}F-bencilo se describe en Iwata et al., Applied Radiation and Isotopes (2000), Vol. 52, págs. 87-92.

Los derivados 4-fluorobencilo marcados con ^{18}F se preparan haciendo reaccionar un compuesto benzaldehído de fórmula (a) con iones ^{18}F para obtener un compuesto benzaldehído de fórmula (b):

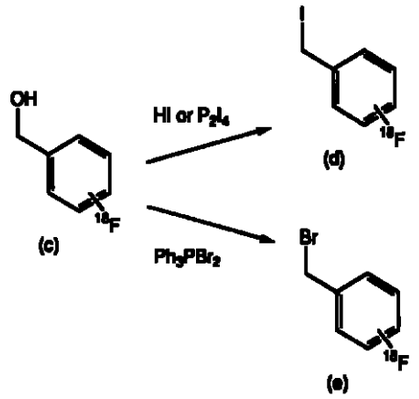


donde LG es un grupo saliente, por ejemplo, bromo, cloro, iodo, nitro o $N(R)_3^+ X^-$ (donde R es alquilo y X es un ión halo, tal como Br, Cl^- o I^-;un ion de un ácido alcanoico,tal como un ion acetato ($CH_3C(O)O^-$);o un ion de un ácido alquilsulfónico o un ácido haloalquilsulfónico, tal como triflato ($CF_3SO_3^-$)). Preferentemente,LG es triflato.A partir del compuesto de fórmula (b), existen varías vías de síntesis para preparar los compuestos de fórmula (I).

En una primera vía de síntesis, se reduce un compuesto de fórmula(b) con $NaBH_4$ para obtener un compuesto de fórmula (c):

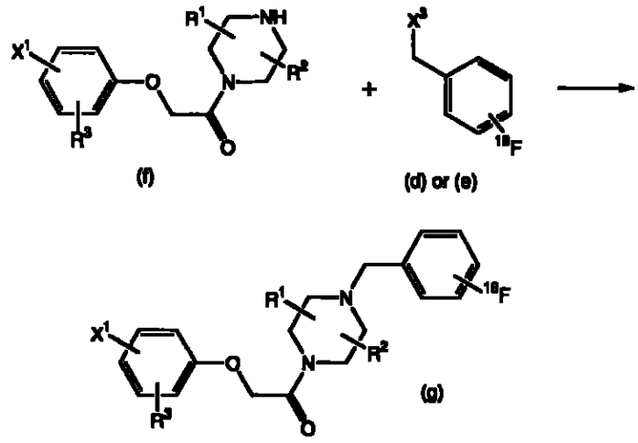


El compuesto de fórmula (c) se hace reaccionar después con HI, P_2I_4 o Ph_3PBr_2 para obtener un compuesto sustituido con iodo o bromo de las fórmulas (d) o (e):



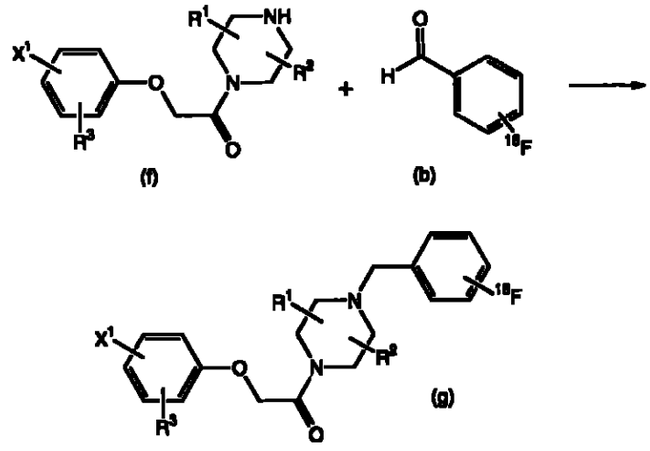
Los compuestos de las fórmulas (d) y (e) se pueden obtener con un rendimiento radioquímico del 50 al 60%. La pureza radioquímica es mayor que un 95%. La actividad específica de los compuestos es de 5 mCi por 1 nmol.

Luego se puede hacer reaccionar un compuesto de las fórmulas (d) o (e) con un derivado piperazina (f) para obtener un compuesto de fórmula (g) (un compuesto de fórmula (I)):



Los compuestos de fórmula (f) se pueden preparar de acuerdo con los métodos conocidos por los especialistas en el arte y se describen con detalle en la publicación de Solicitud de Patente PCT, WO 98/56771.

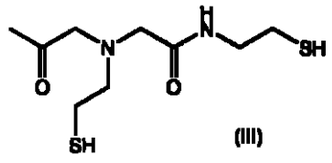
En una segunda vía de síntesis, se hace reaccionar directamente un compuesto de fórmula (b) con un compuesto de fórmula (f) usando un agente reductor, por ejemplo, ácido fórmico, formiato de amonio, $NaBH_4$ o $NaBH_3CN$, para obtener un compuesto de fórmula (g) (un compuesto de fórmula (I)):



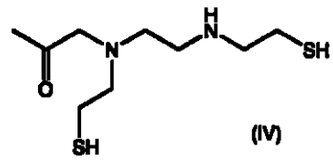
B. Preparación de los compuestos de fórmula (II)

Para la tomografía computada de emisión de fotón único ("SPECT"), se prefieren los compuestos marcados con ^{99m}Tc. Dichos compuestos son compuestos de fórmula (II). La vía de síntesis general para estos compuestos comienza con análogos no radioactivos de los compuestos de fórmula (II) que se hacen reaccionar con quelantes de unión a ^{99m}Tc, por ejemplo quelantes-N_2S_2. La preparación de los análogos no radioactivos de los compuestos de fórmula (II) se describe con detalle en la publicación de la Solicitud de Patente PCT, WO 98/56771. La síntesis de los quelantes emplea procedimientos estándar, por ejemplo, los procedimientos que se describen en A. Mahmood et al., *A N_2S_2-Tetradentate Chelate for Solid-Phase Synthesis: Technetium, Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine* (1999), Vol. 5, pág. 71, o en Z.P. Zhuang et al., *Bioconjugate Chemistry* (1999), Vol. 10, pág. 159.

Los quelantes preferidos son los quelantes de las fórmulas (III) o (IV):



(III)



(IV)

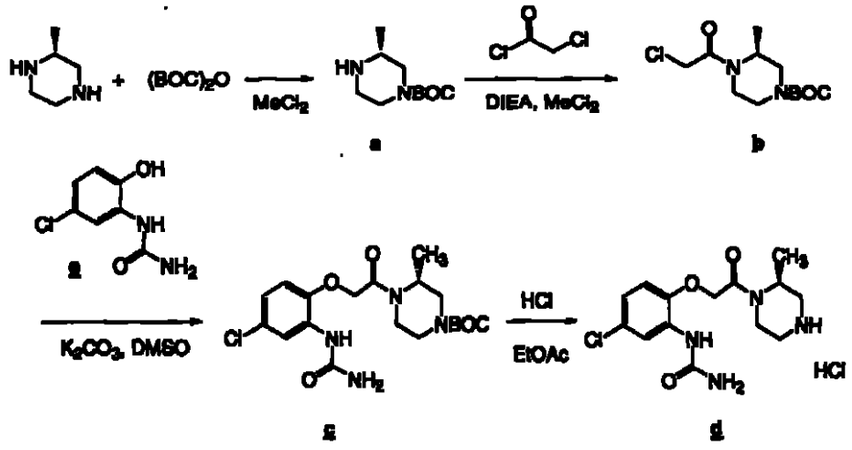
Uno de los quelantes se une directamente al nitrógeno en el grupo $-N(R^4)^{R5}$ del compuesto no radioactivo de fórmula (II) o bien, mediante un grupo ligador que comprende un radical alquilo que tiene uno a diez átomos de carbono, donde

dicho radical alquilo contiene optativamente uno a diez grupos -C(O)-, uno a diez grupos -C(O)N(R)-, uno a diez grupos -N(R)C(O)-, uno a diez grupos -N(R)-, uno a diez grupos -$N(R)_2$, uno a diez grupos hidroxi, uno a diez grupos -C(O)O-, uno a diez átomos de oxígeno, uno a diez átomos de azufre, uno a diez átomos de nitrógeno, uno a diez átomos de halógeno, uno a diez grupos arilo y uno a diez anillos heterocíclicos saturados o insaturados, donde R es hidrógeno o alquilo. El grupo ligador preferido es -C(O)-CH_2-N(H)-.

Los siguientes ejemplos específicos se proveen a modo de guía para asistir en la práctica de la invención y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Preparación de 1-(5-cloro-2-{2-[(2R)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea



A. Se agregó DIEA (19,10 ml, 110 mmol) a una solución de (R)-(-)-2-metilpiperazina (10 g, 100 mmol) en 250 ml de

cloruro de metileno. Se enfrió la solución a -10°C. Se disolvió el anhídrido BOC en 250 ml de cloruro de metileno y se agregó dicha solución a la solución fría de piperazina durante el transcurso de 1 hora. Se dejó entibiar la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. Se filtró la mezcla de reacción para eliminar los sólidos y se lavó el filtrado con 500 ml de agua, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó para dar un aceite. Se purificó el aceite utilizando cromatografía en flash en columna para rendir 11,0 g del compuesto de fórmula (a).

B. Se disolvieron el compuesto de fórmula (a) (11,0 g, 55 mmol) y DIEA (10,5 ml, 60,4 mmol) en 100 ml de cloruro de metileno. Se enfrió la solución resultante a 15-10°C. Se agregó a la solución cloruro de cloroacetilo (4,37 ml, 55 mmol) gota a gota manteniendo la temperatura a -10°C. Luego de agitar la mezcla de reacción durante 1 hora se lavó con 100 ml de agua, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó para dar un aceite. El aceite se purificó utilizando cromatografía en flash en columna para rendir 14,8 g del compuesto de fórmula (b).

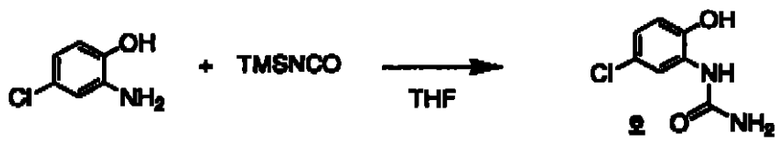
C. Se agregó carbonato de potasio (18,48 g, 133,7 mmol) a una solución del compuesto de fórmula (b) (14,8 g, 53,5 mmol) y del compuesto de fórmula (e) (9,98 g, 53,5 mmol) en 75 ml de DMSO. Se calentó la mezcla resultante a 50°C durante 3 horas. La mezcla se enfrió a 30°C y se vertió en 700 ml

de agua. El agua se extrajo tres veces con 200 ml de acetato de etilo. Se combinaron los extractos de acetato de etilo y se lavó con 200 ml de KOH 1N seguidos de salmuera. Se secó la fase orgánica sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó hasta dar una espuma. Se purificó la espuma utilizando cromatografía en flash en columna para rendir 19,6 g del compuesto de fórmula (c).

D. Se disolvió el compuesto de fórmula (c) (7,68 g, 18 mmol) en 40 ml de acetato de etilo. Se enfrió la solución resultante en un baño de hielo y se hizo burbujear gas HCl anhidro a través de la solución durante 5 minutos. El producto precipitó mientras la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. El producto se recolectó por filtración, se lavó sobre el filtro con acetato de etilo fresco, y se secó al vacío a temperatura ambiente hasta peso constante para rendir 5,9 g de 1-(5-cloro-2-{2-[(2R)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea, el compuesto de fórmula (d), como un sólido blanco; RMN (2 rotómeros); (400 MHz, DMSO) 9,7 (m, 0,5H), 9,2 (m, 0,5H), 8,16 (s, 1H), 8,13 (s, 0,5H), 6,8 (s, 2H), 4,9 (m, 2H), 4,4 (m, 5H), 3,8 (bs, 0,5H), 3,4 (bs, 0,5H), 3,2 (m, 2,5H), 3,0 (m, 2H) 1,2-1,4 (m, 3H) ppm.

Ejemplo 2

Preparación del compuesto de fórmula (e)



A una solución de 2-amino-4-clorofenol (10 g, 69,7 mmol) en 100 ml de THF anhidro a temperatura ambiente se agregó isocianato de trimetilsililo (18,8 ml, 139,4 mmol) de una vez. La solución se calentó a 60 °C y permaneció a dicha temperatura durante 22 horas luego de las cuales se agregó agua (1,3 ml, 76,7 mmol). Luego de 30 minutos se enfrió la solución a temperatura ambiente y se concentró para dar un aceite marrón. Dicho aceite se disolvió en acetato de etilo, se trató con carbón activado, se secó sobre sulfato de magnesio y se filtró. El filtrado se concentró para dar un sólido rosado que se desde tolueno/metanol 10:1, para dar 5,4 g del compuesto de fórmula (e) como un polvo pardo.

Ejemplo 3

Preparación de 1-(5-cloro-2-{2-[(2R)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2-metilpiperaxin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea

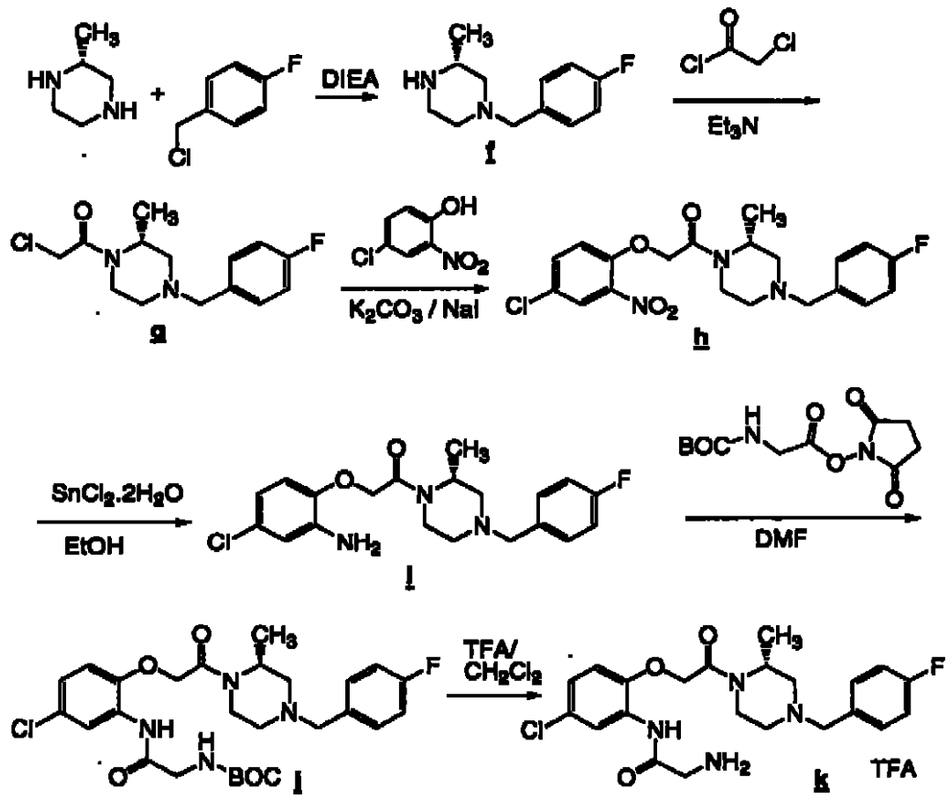
A. Se preparó fluoruro de hidrógeno-^{18}F en un ciclotrón mediante bombardeo de H_2O-^{18}O con protones. El fluoruro de hidrógeno-^{18}F resultante se adsorbió sobre un cartucho de intercambio aniónico. El fluoruro de hidrógeno-^{18}F se eluyó con una solución de Kryptofix 222 (15 mg, 40 µmol) y K_2CO_3 (2,77 mg, 20 µmol) en acetonitrilo acuoso (1,5 ml, 66%). Las fracciones radioactivas se evaporaron a sequedad en una co-

rriente de gas nitrógeno. Se repitió dicho procedimiento tres veces con acetonitrilo seco (1 ml). Luego de agregar una solución de 4-trimetilamonio-benzaldehído-triflato (2 mg, 6,4 µmol) en DMF seco (250 µl) la mezcla de reacción resultante se calentó durante 5 minutos a 100°C. Luego de enfriar una solución de 1-(5-cloro-2-{2-[(2R)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea a temperatura ambiente, se agregaron un compuesto de fórmula (d), (3 mg, 8,3 µmol) en 50 µl de ácido acético y una solución de cianoborhidruro de sodio (4 mg, 63,7 µmol) en 100 µl de DMF seco. La mezcla de reacción se calentó a 120°C durante 10 minutos. Luego de agregar 5 ml de agua, se filtró la mezcla con un cartucho de poliestirol. El producto adsorbido se lavó con 2 ml de agua para rendir el compuesto del título, 1-(5-cloro-2-{2-[(2R)-4-(4-fluoro-^{18}F-bencil)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)urea, que se eluyó con 1,5 ml de acetonitrilo y se purificó utilizando HPLC.

B. Otros compuestos de fórmula (I) que contienen un átomo ^{18}F se preparan en una forma similar.

Ejemplo 4

Preparación de N-(5-cloro-2-{2-[(2R)-4-(4-fluorobencil)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)glicinamida



A. A una solución de (R)-(-)-2-metilpiperazina (2,0 g, 20 mmol) en 20 ml de CH_2Cl_2 se agregó DIEA (5,2 g, 40 mmol) y cloruro de 4-fluorobencilo (2,39 ml, 20 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. Luego de completar la reacción, la mezcla de reacción se lavó con agua (3x20 ml) y salmuera, luego se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró al vacío para obtener el compuesto de fórmula(f)(2,2 g) en forma de un sólido blanco.

B. Se agregó cloruro de cloroacetilo (0,84 ml, 10 mmol) a una solución del compuesto de fórmula (f) (2,2 g, 10 mmol)

en 50 ml de CH_2Cl_2. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se agregó trietilamina (3 ml, 21 mmol). Luego de 30 minutos, se lavó la mezcla con agua (3x20 ml) y salmuera, luego se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró al vacío para obtener un aceite. La purificación utilizando cromatografía instantánea en columna permitió obtener el compuesto de fórmula (g) (2,5 g).

C. A una solución del compuesto de fórmula (g) (2,4 g, 8,4 mmol) en 50 ml de DMF se le agregó K_2CO_3 (2,5 g, 17 mmol), NaI (0,2 g) y 4-cloro-2-nitrofenol (1,3 g, 8,4 mmol).

La mezcla resultante se calentó a 70-80 °C. Luego de 1 hora, la mezcla se concentró al vacío, luego se recogió en acetato de etilo (150 ml) y se lavó con agua (3x100 ml) y luego salmuera. Se separó la fase orgánica, se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró al vacío para rendir un aceite. La purificación utilizando cromatografía instantánea en columna rindió el compuesto de fórmula (h) (3,1 g).

D. A una solución del compuesto de fórmula (h) (1,1 g, 2,6 mmol) en 10 ml de etanol se le agregó una solución de dihidrato de cloruro de estaño(II) (3,0 g, 13 mmol) en 5 ml de etanol.La mezcla resultante se calentó a 75°C.Luego de 1 hora,la reacción se concentró al vacío, luego se recogió sobre acetato de etilo (100 ml), se lavó con solución 1N de NaOH en agua (3x100 ml) y salmuera. Se separó la fase orgánica,se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró al vacío

para rendir un aceite. La purificación utilizando cromatografía en flash en columna rindió el compuesto de fórmula (i) (0,75 g).

E. A una solución del compuesto de fórmula (i) (0,7 g, 1,78 mmol) en 10 ml de DMF se le agregó BOC-Gli-OSU (0,58 g, 2,13 mmol). Se calentó a la mezcla resultante 50-60 °C. Luego de 24 horas,la mezcla se concentró al vacío, luego se recogió en acetato de etilo (150 ml) y se lavó con agua (3x100 ml) y luego salmuera. Se separó la fase orgánica, se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró al vacío para rendir un aceite.

La purificación utilizando cromatografía en flash en columna rindió el compuesto de fórmula (j) (0,7 g).

F. A una solución del compuesto de fórmula (j) (0,6 g, 1,1 mmol) en 10 ml de CH_2O_2 se le agregó TFA (5 ml). La mezcla resultante se calentó a temperatura ambiente. Luego de completar la reacción en 1 hora, se concentró dicha reacción al vacío, luego se recogió en acetato de etilo (100 ml), se lavó con solución 1N de NaOH en agua (2x100 ml) y salmuera. Se separó la fase orgánica, se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró al vacío para rendir un aceite. La purificación utilizando cromatografía en flash en columna rindió N-(5-cloro-2-{2-[(2R)-4-(4-fluorobencil)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}fenil)glicinamida, el compuesto de fórmula (k), (0,45 g) en forma de un sólido blanco; RMN ($CDCl_3$) 10,2

(s, 1), 8,5 (s, 1), 7,3 (m, 2), 7,0 (m, 3), 6,8 (d, 1), 4,7 (m, 2), 3,4-3,6 (m, 5), 3,0 (m, 1), 2,8 (m, 1), 2,6 (d, 1), 2,2 (m, 1), 2,0 (m, 2), 1,2-1,4 (m, 3) ppm.

Ejemplo 5

Complejo de tecnecio-99m de N´-(mercaptoet-1-il)-N´-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicilglicinamida

A. A una solución agitada de N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicinamida (175,5 mg, 0,4 mmol) (el compuesto de fórmula (k) que se preparó según se expuso anteriormente en el ejemplo 4), N-(S-tritil-2-mercaptoet-1-il)-N-(S-tritil-5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)glicina (291,4 mg, 0,4 mmol) (que se puede sintetizada de acuerdo con A. Mahmood et al., "Un quelato tetradentado de N_2S_2 para síntesis en fase sólida: Tecnecio, Renio en Química y Medicina Nuclear" (A N_2S_2-Tetradentate Chelate for Solid-Phase Synthesis: Technetium, Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine) (1999), Vol. 71), y N-hidroxisuccinimida (45,5 mg, 0,4 mmol) en 5 ml de diclorometano se le agregó gota a gota una solución de diciclohexilcarbodiimida (81,4 mg, 0,4 mmol) en 3 ml de diclorometano. Se agitó la suspensión resultante durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego de filtrar, se evaporó la solución resultante bajo presión reducida. Se aisló el producto deseado, N-(S-tritil-2-sulfanilet-1-il)-N-(S-

ducto deseado, N-(S-tritil-2-sulfanilet-1-il)-N-(S-tritil-5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)-N-{5-cloro-2[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicilglicinamida (340 mg, 72,8%) luego de una cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano/metanol, 98:2) como un polvo blanco.

Análisis elemental:

Calc.:	C 69,93	H 5,87	N 7,20	O 6,85	S 5,49
Encontrado:	C 69,69	H 6,05	N 7,01	O	S 5,32

B. Se disolvió N-(S-tritil-2-sulfanilet-1-il)-N-(S-tritil-5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicilglicinamida (116,8 mg, 0,1 mmol), que se preparó según se expuso anteriormente, en 5 ml de ácido trifluoroacético. Luego de agregar trietilsilano (48 µl 0,3 mmol) se agitó la suspensión resultante durante 15 minutos a temperatura ambiente. El filtrado se evaporó bajo presión reducida y el residuo se trituró con 7 ml de éter dietílico. El precipitado se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y se eliminó por filtración, rindiendo el producto deseado, sal de ácido bis-trifluoracético de N-(mercaptoet-1-il)-N-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il}-2-oxoetoxi]fen-1-il)glicilglicinamida, (87 mg, 95,5%), en forma de un sólido blanco.

Análisis elemental:

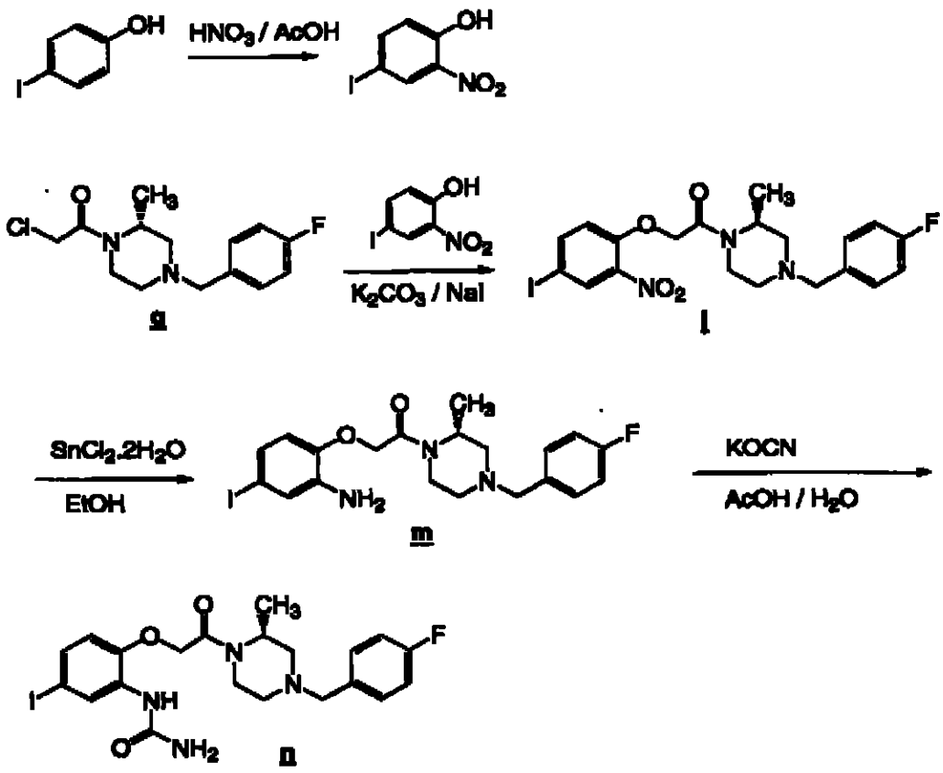
Calc.: C 44,81 H 4,65 N 9,22 O 15,80 S 7,04

Encontrado: C 44,54 H 4,91 N 8,99 O S 6,80

C. Se disolvieron tartrato disódico (1 mg) y sal de ácido bis-trifluoracético de N-(mercaptoet-1-il)-N-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicilglicina-mida, (100 µg), que se preparó según se expuso anteriormente, en 500 µl de buffer fosfato de sodio (0,1 M, pH= 8,5). Luego de agregar 37 MBq de eluato generador de ^{99m}Tc, se agregaron 5 µl de solución de cloruro de estaño(II) y se calentó la mezcla durante 10 min. a 100°C. El análisis HPLC mostró un pico principal indicando que el producto deseado, complejo de tecnecio-99m de N´-(mercaptoet-1-il)-N´-(5-mercapto-3-aza-2-oxo-pent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicilglicinamida, se sintetizó con una RCP> 90%.

Ejemplo 6

Preparación de 1-(2-{2-[(2R)-4-(4-fluorobencil)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}-5-yodofenil)urea



g l m n

A. A una solución de p-yodofenol (2,2 g, 10 mmol) en 18 ml de ácido acético se le agregó gota a gota una solución de HNO_3 (0,7 ml, 70%) en 5 ml de ácido acético durante el transcurso de 10 minutos. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente. Luego de 30 minutos, se diluyó la mezcla de reacción con 100 ml mezcla de agua-hielo. Se recolectó el precipitado y se lavó con 100 ml de agua.

La purificación utilizando cromatografía instantánea en columna rindió 1,2 g de 2-nitro-4-yodofenol.

B. A una solución del compuesto de fórmula (g) (0,3 g, 1,05 mmol) (según se preparó aquí) en 10 ml de DMF se le

agregó K_2CO_3 (0,45 g, 32 mmol), NaI (0,01 g) y 2-nitro-4-yodofenol (0,28 g, 1,05 mmol).La mezcla resultante se calentó a 70-80°C. Luego de 1 hora,la mezcla se concentró al vacío, luego se recogió en acetato de etilo (150 ml) y se lavó con agua (3x100 ml) y luego salmuera. Se separó la fase orgánica, se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró al vacío para rendir un aceite. La purificación utilizando cromatografía en flash en columna rindió 0,28 del compuesto de fórmula (l).

C. A una solución del compuesto de fórmula (l) (0,28 g, 0,55 mmol) en 5 ml de etanol se le agregó una solución de dihidrato de cloruro de estaño(II) (0,616 g, 2,73 mmol) en 5 ml de etanol. La mezcla resultante se calentó a 75°C. Luego de 1 hora, la reacción se concentró al vacío, luego se recogió en acetato de etilo (100 ml), se lavó con solución 1N de NaOH en agua (3x100 ml) y salmuera. Se separó la fase orgánica, se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró al vacío para rendir un aceite. La purificación utilizando cromatografía instantánea en columna rindió el compuesto de fórmula (m) (0,25 g).

D. A una solución del compuesto de fórmula (m) (0,25 g, 0,52 mmol) en 3 ml de AcOH se le agregó agua (6 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, luego se agregó gota a gota una solución de KOCN (0,085 g, 1,0 mmol) en 1 ml de agua. La mezcla de reacción

se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, luego se calentó a 55°C durante 5 minutos.Luego de completar la reacción,la mezcla de reacción se concentró al vacío,luego se recogió en CH_2Cl_2 (50 ml), se lavó con solución 2N de NaOH en agua (2x100 ml) y salmuera. Se separó la fase orgánica, se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró al vacío para rendir un aceite. La purificación utilizando cromatografía en flash en columna rindió el compuesto de fórmula (n) (0,16 g) en forma de un sólido blanco; RMN ($CDCI_3$) 9,0 (s, 1), 8,6 (s, 1), 7,3 (m, 2), 7,0 (t, 3), 6,6 (d, 1), 4,9 (s, 2), 4,7 (m, 2), 4,4 (m, 1), 3,4-3,6 (m, 3), 3,0 (m, 1) 2,8 (m,1), 2,6 (d, 1), 2,2 (m, 1), 2,0 (m, 1), 1,2-1,4 (m, 3) ppm.

Ejemplo 7

Preparación de 1-(2-{2-[(2R)-4-(4-fluorobencil)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}-5-yodo-^{123}I-fenil)urea

A. A una solución del compuesto de fórmula (n) (1 mg), que se preparó según se expuso anteriormente, y 10 µg de sulfato de cobre(II) en 300 µl de DMF se le agregó 1 mCi solución de yoduro [^{123}I] de sodio. La mezcla de reacción resultante se calentó durante toda la noche a 100°C. Luego de agregar 1 ml de solución acuosa semi-saturada de $NaHCO_3$ se extrajo el producto con 2 ml de CH_2Cl_2. La fase orgánica se evaporó a sequedad en una corriente de gas nitrógeno. Se purificó el producto deseado, 1-(2-{2-[(2R)-4-(4-fluorobencil)-2-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi}-5-yodo-^{123}I-fe-

nil)urea, usando un Cartucho RP [eluyente: EtOH/agua (2:1)].

B. Otros compuestos de fórmula (1) se preparan en una forma similar a la que se describió anteriormente.

Ejemplo 8

Complejo de tecnecio-99m de N´-(2-mercaptoet-1-il)-N´-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluoroben-cil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}gli-cinamida

A. A una solución agitada de 156,7 mg (0,4 mmol) 5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]anilina (compuesto de fórmula (i)) (291,4 mg, 0,4 mmol), N-(S-tritil-2-mercaptoet-1-il)-N-(S-tritil-5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)glicina (sintetizada de acuerdo con A. Mahmood et al., "Un quelato tetradentado de N_2S_2 para síntesis en fase sólida: Tecnecio, Renio en Química y Medicina Nuclear" (A N_2S_2-Tetradentate Chelate for Solid-Phase Synthesis: Technetium, Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine)(1999), Vol. 5, p. 71) y N-hidroxisuccinimida (45,5 mg, 0,4 mmol) en 5 ml de diclorometano se le agregó gota a gota una solución de diciclohexilcarbodiimida (81,4 mg, 0,4 mmol) en 3 ml de diclorometano. Se agitó la suspensión resultante durante toda la noche a temperatura ambiente.

Luego de filtrar, se evaporó la solución resultante bajo presión reducida. El producto deseado, N´-(S-tritil-2-mercaptoet-1-il)-N´-(S-tritil-5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-

il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicinamida (352mg, 79,2%), se aisló luego de una cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano/metanol, 98:2) como un polvo blanco.

Análisis elemental:

Calc.:	C 71,36	H 5,90	N 6,30	O 5,76	S 5,77
Encontrado:	C 71,08	H 6,13	N 6,05	O	S 5,52

B. Se disolvió N'-(S-tritil-2-mercaptoet-1-il)-N'-(S-tritil-5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicinamida (111,1 mg, 0,1 mmol) en 5 ml de ácido trifluoroacético. Luego de agregar 48 µl (0,3 mmol) de trietilsilano la suspensión resultante se agitó durante 15 min. a temperatura ambiente. El filtrado se evaporó bajo presión reducida y el residuo se trituró con 7 ml de éter dietílico. El precipitado se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y se eliminó por filtración, rindiendo el producto deseado, sal de ácido bis-trifluoracético de N-(2-mercaptoet-1-il)-N-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicinamida, (75mg, 87,8%) en forma de un sólido blanco.

Análisis elemental:

Calc.:	C 44,99	H 4,60	N 8,20	O 14,98	S 7,51
Encontrado:	C 44,71	H 4,89	N 8,03	O	S 7,22

C. Tartrato disódico (1 mg) tartrato disódico y sal de

ácido bis-trifluoracético de N-(2-mercaptoet-1-il)-N-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicinamida, (100 µg) se disolvieron en 500 µl de buffer fosfato de sodio (0,1M, pH= 8,5). Luego de agregar 37,5 mBq de eluato generador de ^{99m}Tc, se agregaron 5 µl de solución de cloruro de estaño(II) y se calentó la mezcla durante 10 minutos a 100°C. El análisis por HPLC mostró un pico principal indicando que el producto deseado,Complejo de tecnecio-99m de N´-(2-mercaptoet-1-il)-N´-(5-mercapto-3-aza-2-oxopent-1-il)-N-(5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il)glicinamida,se sintetizó con una RCP> 91 %.

Ejemplo 9

Complejo de tecnecio-99m de N-(2-mercaptoet-1-il)-N-(5-mercapto-3-azapent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicinamida

A. A una solución agitada de 5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi] anilina (156,7 mg, 0,4 mmol) y trietilamina (40,5 mg, 0,4 mmol) en 5 ml de diclorometano se le agregó gota a gota una solución de cloruro de α-bromoacetilo (63 mg, 0,4 mmol) en 3 ml de diclorometano. La solución resultante se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. Se evaporó el solvente bajo presión reducida. El producto deseado, N-{5-cloro-2-[2-[4-

(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}-2-bromoacetamida (175 mg, 85,3%), se aisló luego de una cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano/metanol, 99:1) como un polvo blanco.

Análisis elemental:

Calc.: C 51,53 H 4,72 N 8,19 O 5,76

Encontrado: C 51,28 H 4,99 N 7,92 O

B. Una solución agitada de N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}-2-bromoacetamida (165 mg, 0,42 mmol) y N,N-bis-[S-(4-metoxi-bencil)-2-mercaptoet-1-il]etilendiamina (841,3mg, 2 mmol) (sin-tetizada de acuerdo con Z.P. Zhuang et al., *Bioconjugate Chem.* (1999), Vol. 10, p. 159) en 1,4-dioxano(5 ml) se calentó bajo reflujo durante 24 horas. La mezcla de reacción resultante se evaporó bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 15 ml de diclorometano y se lavó con solución acuosa saturada de carbonato de sodio. Luego de secar sobre $MgSO_4$ se evaporó el solvente bajo presión reducida. El producto deseado, N-(S-(4-metoxibencil)-2-mercaptoet-1-il)-N-(S-(4´-me-toxibencil)-5-mercapto-3-azapent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicinamida (154 mg, 43%), se aisló luego de una cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano/metanol, 9:1) como un polvo blanco.

Análisis elemental:

Calc.: C 61,99 H 6,50 N 8,22 O 9,38 S 7,52

Encontrado: C 61,71 H 6,58 N 8,03 O S 7,28

C. Se disolvió N-(S-(4-metoxibencil)-2-mercaptoet-1-il)-N-(S(4´-metoxibencil)-5-mercapto-3-azapent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicinamida (140 mg, 0,164 mmol) a 0°C en 5 ml de ácido trifluoroacético. Luego de agregar $Hg(OAc)_2$ (104,5 mg, 0,328 mmol) la mezcla resultante se agitó durante 30 minutos a 0°C y se saturó con H_2S durante 15 min. Luego de filtrar se evaporó el solvente bajo presión reducida. Se trituró el aceite amarillo resultante con 3 ml de éter dietílico. Luego de filtrar se aisló el producto deseado, sal de ácido tris-trifluoracético de N´-(2-mercaptoet-1-il)-N´-(5-mercapto-3-azapent1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicinamida, (126 mg (80,5%), como un polvo blanco.

Análisis elemental:

Calc.: C 42,79 H 4,44 N 7,34 O 15,09 S 6,72

Encontrado: C 42,48 H 4,73 N 7,02 O S 6,76

D. Se disolvieron tartrato disódico (1 mg) y sal de ácido tris-trifluoracético de N´-(2-mercaptoet-1-il)-N´-(5-mercapto-3-azapent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}glicinamida, (100 µg) en 500 µl de buffer fosfato de sodio (0,1M, pH= 8,5). Luego de agregar 37,5 mBq de eluato generador de

^{99m}Tc, se agregaron 5 µl de solución de cloruro de estaño(II) y se calentó la mezcla durante 10 minutos a 100°C. El análisis por HPLC mostró un pico principal indicando que el producto deseado, complejo de tecnecio-99m de N-(2-mercaptoet-1-il)-N-(5-mercapto-3-azapent-1-il)-N-{5-cloro-2-[2-[4-(4-fluorobencil)-2-(2R)-metilpiperazin-1-il]-2-oxoetoxi]fen-1-il}gli-cinamida, se sintetizó con una RCP> 95%.

Ejemplo 10

Localización inmunohistoquímica de CCR1 en cerebros humanos

Materiales y métodos

Un primer grupo de muestras de tejido provenientes de cerebros obtenidos por autopsia dentro de las 12 horas de la muerte se utilizaron para la tinción inmunohistoquímica del receptor CCR1 de quimioquina en la enfermedad de Alzheimer y cerebros para control. Para todas las tiniciones inmunohistoquímicas e histoquímicas se utilizaron secciones de 5 µm de espesor sin teñir provenientes de la corteza frontal y del hipocampo, incluidas en parafina.

Las preparaciones se desparafinaron en xileno y se hidrataron en solución salina al buffer fosfato con Triton X100 al 0,005% (PBS-T). Para la microscopía óptica (usando DAB como cromógeno) se bloqueó la actividad peroxidasa endógena incubando las preparaciones con H_2O_2 al 0,01% en metanol durante 30 minutos. Se redujo la unión no específica bloqueando con suero normal de cabra al 10% (NGS) en PBS du-

rante 30 minutos. Se diluyeron los anticuerpos primarios [Anti-CCR1 de conejo, (péptido N-terminal); anti-neurofilamento de ratón; anti-GFAP de ratón; anti-Tau de ratón (AT8); anti-CD68 de ratón (clon KP1); anti-β-amiloide de ratón (Boehringer Mannheim, #1 381 431); anti-CCR8 de conejo, (péptido N-terminal)] en PBS-T y las preparaciones se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente. Se completó la tinción usando un kit Biogenex ABC^{MR}. Todos los lavados utilizaron PBS-T. Luego de completar la reacción DAB, las preparaciones se contratiñeron ligeramente con Hematoxilina de Gill, se deshidrataron y se montaron los cubreobjetos con Permount. Antes de montar los cubreobjetos, algunas preparaciones se re-tiñeron con anticuerpos contra péptido Aβ usando métodos idénticos excepto que el cromógeno fue True Blue^{MR}. Para los estudios de inmunofluorescencia de marcado doble se desparafinaron las preparaciones, se bloquearon con NGS al 10%, y se incubaron durante toda la noche con un cóctel de ambos anticuerpos primarios. Las preparaciones se lavaron con PBS-T y luego se incubaron con un cóctel de anticuerpos secundarios de cabra, cada uno a una dilución 1/50. Para evitar la confusión proveniente de la fluorescencia endógena del tejido (amarillo verdosa),se conjugaron los anticuerpos secundarios tanto con Cy3 (ϵ_{max}= 565nm; cabra-anti-ratón, Amersham) como con Cy5 (ϵ_{max}=700 nm; cabra-anti-conejo, Amersham). Se observaron las preparacio-

nes en un microscopio confocal con un láser criptón-argón (modelo 2010, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Subsiguientemente, se obtuvo un segundo grupo de tejidos cerebrales compuesto de 10 casos de edad avanzada cognitivamente normales y 40 casos provenientes de pacientes de enfermedad de Alzheimer para quienes se hizo una estimación de puntaje de demencia clínica (CDR) y se evaluó su expresión inmunohistoquímica de CCR1. Las muestras se tiñeron para CCR1 y otros marcadores según se describió anteriormente excepto que los anticuerpos monoclonales (clon #6D5) específicos para $A\beta^{1-42}$ (un marcador para depósitos amiloides difusos, tempranos así como para placas neuríticas más maduras) se obtuvieron de la Dra. Ursula Moenning. Dichos anticuerpos se visualizaron con Vector Red^{MR} (Vector Labs). La Dra. Moenning también proporcionó anticuerpos monoclonales específicos para $A\beta^{1-40}$ (clon #13E9),un marcador para placas encontrado en etapas tardías de enfermedad, que se visualizó con True Blue^{MR}.

Resultados

En ambos conjuntos de cerebros, áreas con patología de la enfermedad de Alzheimer mostraron un patrón de tinción característico. Se encontró inmunorreactividad CCR1 asociada con placas neuríticas (es decir, seniles) tanto en la formación del hipocampo como en la corteza cerebral.

Las estructuras inmunoteñidas eran redondas a ovaladas

y usualmente no se asociaban con cuerpos celulares. Las mismas variaban de tamaño y parecían estar llenas de un material granulado punteado. Se encontró que dichas estructuras formaban "coronas" alrededor de los depósitos amiloides en placas seniles, pero eran distintos de los Aβ en sí (Figuras 1-4). La parte superior de la figura 1 muestra una placa neurítica con una corona de procesos positivos ante CCR1. Algunas veces los cuerpos celulares neuronales de algunas neuronas CA1 y CA3 en casos de la enfermedad de Alzheimer resultaron teñidas por anticuerpos CCR1. La última parte de la figura 1 ilustra dicho descubrimiento. Dicha tinción era diferente de las redes neurofibrilares (NFT) o cuerpos granulovacuolares, aunque normalmente estaba presente en las somas de neuronas con dichos cambios degenerativos.

Según se ilustra en la figura 2, la pre-incubación de anticuerpos con un polipéptido 16-mer de la región extracelular (N-terminal) de la proteína receptora de CCR1 bloqueó completamente toda la tinción de tejido. En particular, la imagen superior en la figura 2 muestra una falta de tinción en cerebro con la enfermedad de Alzheimer con anticuerpos CCR1 pre-incubados con el polipéptido mientras que la imagen inferior de la figura 2 muestra muchas estructuras CCR1-positivas en una sección con las mismas características teñida con anticuerpos no incubados.

Los estudios de marcado doble mostraron que casi todas

Según se muestra en la figura 4, las estructuras CCR1-positivas se asociaban con placas neuríticas que contenían $A\beta^{1-42}$. En placas difusas (Figura 5) $A\beta^{1-42}$ no se asociaba típicamente con CCR1 ni con ninguna respuesta celular significativa.En casos más avanzados de enfermedad de Alzheimer, se vieron muchas más placas $A\beta^{1-40}$-positivas. Según se muestra en la figura 3,algunas de las mismas,aunque no todas se asociaban con tinción CCR1. En algunos casos las placas CCR1-positivas se hallaban completamente libres de tinción $A\beta^{1-40}$.

En casos severos de enfermedad de Alzheimer donde se vieron pérdida neuronal y gliosis significativas, los astrocitos reactivos en el subículo y la corteza entorrinal también resultaron CCR1-positivos. En casos menos severos, no eran comunes los astrocitos reactivos CCR1-positivos.

La microscopía confocal de secciones doblemente marcadas mostró que la inmunorreactividad CCR1 se co-localizaba con procesos positivos ante neurofilamentos. El marcador macrófago/microglial, CD68, no se asoció con la tinción CCR1, ni tampoco el anticuerpo ATS contra proteína Tau fosforilada anormalmente. Según se esperaba de los estudios de microscopía óptica, la inmunorreactividad CCR1 se co-localizó con GFAP en áreas de astrogliosis.

Los leucocitos presentes dentro de los vasos cerebrales fueron fuertemente positivos ante CCR1 tanto en enfermedad de Alzheimer como en tejidos cerebrales de control, sirvien-

do como controles internos positivos para los métodos de tinción. Nótese la tinción CCR1-positiva de dos células intravasculares en la figura 5 (flechas). Algún material CCR1-positivo también se muestra con un asterisco, pero en general, las placas difusas no se asocian con CCR1.

Se emprendió una evaluación cuantitativa de la cantidad de estructuras similares a placas CCR1-positivas en el hipocampo, usando tejido del hipocampo del segundo estudio (donde se agruparon los pacientes en categorías clínicas conocidas mediante puntaje CDR). Se llevaron a cabo evaluaciones histológicas de secciones individuales bajo condiciones ciegas con respecto al estado clínico (CDR). Los análisis de volumen se llevaron a cabo usando métodos de computación imparciales.

La figura 3 muestra la relación histológica entre neuritas distróficas CCR1-positivas (teñidas en marrón) y una placa neurítica que contiene $A\beta^{1-40}$ (teñida en azul). Nótese que en la figura 3 los procesos CCR1-positivos difieren de los amiloides. Las placas con $A\beta^{1-40}$ eran discretas y se contaron fácilmente, así como los grupos de neuritas CCR1-positivas. Se evaluaron las placas de hipocampo para estimar la cantidad de coronas CCR1-positivas,la cantidad de placas $A\beta^{1-40}$-positivas,y la cantidad de placas que contienen ambos marcadores.

Se contaron las estructuras por región (por ejemplo,

CA3, CA1, y subículo) dentro de la formación completa del hipocampo, incluyendo la corteza entorrinal y luego se totalizaron. Los valores son estimaciones relativas de la cantidad de estructuras en el hipocampo según lo representado por secciones transversales de la formación del hipocampo de 5βm de espesor. La figura 6 muestra la relación entre CCR1 y $A\beta^{1-40}$ por puntaje CDR.

La cuantificación de la cantidad de $A\beta^{1-42}$ requirió una técnica diferente porque $A\beta^{1-42}$ era más abundante y formaba placas "difusas" que no se podrían enumerar fácilmente (véase la figura 5). Para dichas placas se utilizó un método asistido por computadora (C.A.S.T. sistema de estereología) para estimar el área de corteza entorrinal ocupada por $A\beta^{1-42}$. Se expresó dicha área como un porcentaje del área total de corteza sobre la placa. Las áreas ocupadas por placas neuríticas y difusas se contaron por separado. La platina de microscopio manejada por computadora aseguró la evaluación al azar (imparcial) de las secciones de tejido. En la figura 7 se compara el volumen % de corteza entorrinal ocupada por $A\beta^{1-42}$ (tanto difusa como neurítica) con la cantidad de placas CCR1-positivas en una sección de corteza entorrinal con las mismas características.

La figura 6 muestra que en la enfermedad de Alzheimer la cantidad promedio de neuritas distróficas CCR1-positivas en el hipocampo aumenta como una función del puntaje CDR. La

cantidad de estructuras positivas en la etapa temprana de la enfermedad de Alzheimer (CDR 0,5) aumenta sobre los niveles de control (CDR 0). Aunque las diferencias entre los grupos de control y de enfermedad de Alzheimer no se hizo estadísticamente significativa hasta el grupo CDR 2, dichos patrones de expresión apoyan la conclusión que CCR1 está regulado en forma ascendente en procesos neuronales distróficos aún en etapas muy tempranas de la enfermedad de Alzheimer. Nótese que la cantidad de placas $A\beta^{1-40}$ no aumenta hasta etapas más tardías de la enfermedad. De esa manera, la expresión CCR1 en tejido cerebral se puede considerar un indicador relativamente temprano de la enfermedad de Alzheimer.

En la figura 7 se muestra la correlación entre la cantidad de placas CCR1-positivas en la corteza entorrina y la cantidad de $A\beta^{1-42}$. En general, los niveles de CCR1 en la corteza entorrina aumentan a medida que aumenta el estado de enfermedad; sin embargo, el área mostrada es mucho más pequeña que el área que se muestra en la figura 6. Sin embargo, nótese que los niveles de $A\beta^{1-42}$ aumentan en las primeras etapas de la enfermedad.

Ejemplo 11

Estimación de la disponibilidad cerebral, usando un trazador marcado con ^{14}C

Se preparó un análogo de ^{14}C de 1-(5-cloro-2-{2-[(2R)-4-(4-fluorobencil)-2-metilpiperazin-1-il]-2-

oxoetoxi}fenil)urea y se utilizó para estudios farmacocinéticos de disponibilidad cerebral. Se inyectaron ratones en forma i.v. a través de venas yugulares encanuladas con el análogo a 36 mg/kg conteniendo 334.000 dpm por dosis. Se sacrificaron los ratones (en grupos de cuatro) a 1, 15, 30, 120, y 1440 minutos luego de la inyección mediante inhalación de CO_2 seguido de punción intracardíaca para eliminar la sangre completa. Luego se les abrió el pecho y los ratones se perfundieron a través del corazón con solución salina al buffer fosfato durante cinco minutos para eliminar la droga radioactiva residual del compartimento de la sangre. Luego se extrajeron los cerebros, se pesaron, y se muestreó la cantidad de radioactividad en dos partes separadas de la corteza cerebral. Se promediaron los niveles radioactividad por mg de tejido en las dos muestras y los datos se normalizaron al peso total del cerebro, según se ilustra en la figura 8. Las barras representan la desviación estándar (n=4 ratones por punto de tiempo). En particular, el gráfico de la figura 8 muestra que dos horas después de la inyección, el total de la cantidad de desintegraciones por minuto (DPM) para el análogo de ^{14}C en cerebro completo de ratón disminuye hasta niveles despreciables. En el punto de tiempo de un minuto, los cálculos muestran que, en promedio, en el cerebro completo de ratón (peso promedio de 450g) se encuentra aproximadamente un 3% de la dosis inyectada.

También se analizó el contenido radioactivo de las muestras de plasma preparadas con la sangre completa extraída de los ratones. Según se ilustra en la figura 9 se comparó a través del tiempo la cantidad de radioactividad en volúmenes iguales de cerebro y plasma como un porcentaje de la dosis inyectada. El % de dosis inyectada (i.d.) que se encontró por ml de plasma también disminuyó a través del tiempo, alcanzando niveles despreciables luego de dos horas. Para una comparación con los niveles cerebrales, se normalizó la cantidad total de DPM por cerebro a un peso cerebral de un gramo y se expresó como un porcentaje de la i.d. por gramo de tejido cerebral. Nótese que los cerebros ratón pesan un promedio de aproximadamente 450 mg de tal manera que el % de la i.d. en 1g de cerebro de ratón que se muestra en el gráfico sobrestima el valor real en aproximadamente el doble. Es claro que los niveles del análogo en el cerebro caen junto con los niveles en plasma. Aunque el análogo es lipofílico, el cerebro de ratón normal no parece ser un sitio de depósito para el antagonista de CCR1.

Ejemplo 12

Expresión de CCR1 en otras Enfermedades Neurodegenerativas

Materiales y Métodos

Se obtuvieron muestras histológicas de tejido cerebral de autopsia de un total de 29 casos provenientes de siete enfermedades neurodegenerativas diferentes (distintas de la

enfermedad de Alzheimer pura) y se estudió el contenido de CCR1. Se inmunotiñieron las placas con anticuerpos contra CCR1 según se describe en el ejemplo 10 citado anteriormente y se revisaron con respecto a la enfermedad neurodegenerativa específica bajo condiciones ciegas. Subsiguientemente, secciones con las mismas características se marcaron doblemente con anticuerpos contra CCR1 (DAB como cromógeno) y $A\beta^{4-2}$ (Vector Red^{MR} como cromógeno).

La enfermedades examinadas se mencionan abajo:

Enfermedad de Parkinson (PD)	6 casos
Demencia parkinsoniana de Guam	3 casos
Angiopatía congofílica	4 casos
Demencia multi-infarto (MID)	4 casos
Demencia con cuerpos de Lewy difusos (DLBD)	4 casos
Enfermedad de Pick	4 casos
Parálisis progresiva supranuclear (PSP)	4 casos

Se clasificó el contenido de CCR1 y $A\beta^{4-2}$ de las placas teñidas usando una escala histológica de 0 a 4, con 0 como ausencia de tinción, 0,5 indicando expresión rara, y grados 1 hasta 4 indicando niveles de expresión en aumento con 4 como muy abundante.

Resultados

Los seis casos de enfermedad de Parkinson y los tres casos de demencia parkinsoniana de Guam fueron negativos para CCR1. En los 4 casos de angiopatía congofílica, en 3 de

los 4 casos de DLBD, en 2 de los 4 casos de PSP, y en 1 de los 4 casos tanto de MID como de enfermedad de Pick, se observaron estructuras similares a placas positivas ante CCR1, similares a las encontradas en la enfermedad de Alzheimer. Los estudios de marcado doble confirmaron la suposición que dichas estructuras similares a placas positivas ante CCR1 se asociaban con $A\beta^{4-2}$, según se encontró en casos puros de enfermedad de Alzheimer (Ejemplo 10). La figura 10 muestra los resultados de las evaluaciones patológicas en forma gráfica para todas las enfermedades excepto para la de Parkinson (que es negativa ante CCR1 en cerebro). Básicamente, nunca se encontró expresión CCR1 en muestras de tejido cerebral a no ser que también resultaran presentes placas neuríticas positivas ante $A\beta^{4-2}$.

Después de la ruptura del código, se descubrió que el caso de enfermedad de Pick que mostraba expresión CCR1 también llevaba el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer. Los dos casos de PSP con CCR1 también resultaron diagnosticados con enfermedad de Alzheimer concurrente. La angiopatía congofílica y DLBD son enfermedades que se asocian estrechamente con la patología de la enfermedad de Alzheimer.

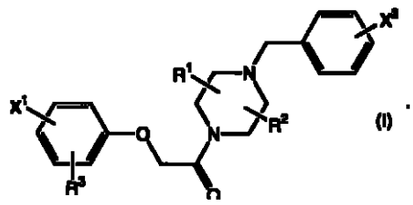
Por lo tanto, no es sorprendente que también podrían tener altos niveles de expresión CCR1 asociados con $A\beta^{4-2}$. En poblaciones de edad avanzada frecuentemente se da el caso que la patología de la enfermedad de Alzheimer enmascara

otros procesos de enfermedad. Se encontró que esto sucedía en uno de cada cuatro casos de MID. Dichos resultados sugieren que CCR1 es un marcador que se asocia estrechamente con la patología de la enfermedad de Alzheimer (específicamente, placas neuríticas $A\beta^{4-2}$-positivas) dejando de lado otros procesos patológicos concurrentes que pueden estar presentes en el cerebro. Como tal, es probable que sea altamente específico para la patología de la enfermedad de Alzheimer y por lo tanto puede ser útil como un marcador sustituto para diagnosticar el progreso de la enfermedad.

Como se ha descrito la presente invención con referencia a las formas de realización específicas de las mismas, aquellos experimentados en el arte deberían comprender que se pueden hacer diferentes cambios y se pueden sustituir equivalentes sin apartarse del verdadero espíritu y alcance de la invención. Además, se pueden hacer muchas modificaciones para adaptar una situación en particular, material, composición de materia, proceso, paso o pasos de proceso, al objetivo, espíritu y alcance de la presente invención. Todas dichas modificaciones se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto, CARACTERIZADO PORQUE es de fórmula (I):



donde:

X^1 y X^2 son cada uno, independientemente entre sí, halo;

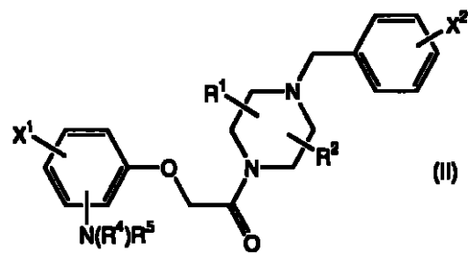
R^1 y R^2 son cada uno, independientemente entre sí, hidrógeno o alquilo; y

R^3 es hidrógeno, amina, monoalquilamina, dialquilamina, monoaralquilamina, alquilcarbonilamina, alquenilcarbonilamina, haloalquilcarbonilamina, arilcarbonilamina, alcoxialquilcarbonilamina, alcoxicarbonilalquilcarbonilamina, glicinamida, monoalquilglicinamida, arilcarbonilglicinamida, aminocarbonilglicinamida, (aminocarbonil)(alquil)glicinamida, (alcoxialquilcarbonil)glicinamida, ureido, monoalquilureido, monoarilureido, monoaralquilureido o alaninamida;

y donde cualquiera de X^1 o X^2 se selecciona del grupo formado por ^{123}I, ^{125}I, ^{128}I, ^{131}I, ^{75}Br, ^{78}Br, ^{80}Br y ^{18}F; o donde uno de los átomos de carbono en el compuesto es ^{11}C; o una sal aceptable para uso farmacéutico de los mismos.

2. Un compuesto, CARACTERIZADO PORQUE es de fórmula

(II):



(II)

donde

X^1 y X^2 son cada uno, independientemente entre sí, halo;

R^1 y R^2 son cada uno, independientemente entre sí, hidrógeno o alquilo; y

R^4 es hidrógeno; y

R^5 comprende un quelante capaz de unirse a un átomo de metal radioactivo seleccionado del grupo formado por ^{99m}Tc, ^{186}Re y ^{188}Re; o como un complejo con ^{99m}Tc, ^{186}Re y ^{188}Re; o una sal aceptable para uso farmacéutico de los mismos.

3. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE dicho compuesto se une al receptor de la quimioquina CCR1 y atraviesa la barrera hematoencefálica.

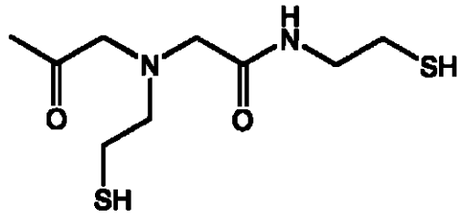
4. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE R^1 es metilo en la posición 2 del radical piperazinilo y R^2 es metilo en la posición 5 del radical piperazinilo.

5. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindi-

cación 2, CARACTERIZADO PORQUE R^1 es metilo en la posición 2 del radical piperazinilo y R^2 es hidrógeno.

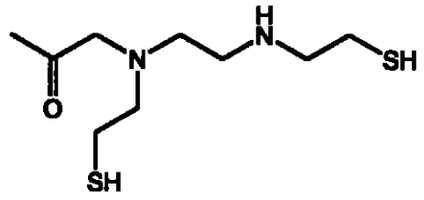
6.El compuesto de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE X^1 es cloro en la posición 4 del radical fenilo y X^2 es un átomo de 18 F en la posición 4 del radical fenilo.

7.El compuesto de la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE R^5 es un quelante de fórmula (III):



(III)

8.El compuesto de la reivindicación 2, CARACTERIZADO PORQUE R^5 es un quelante de fórmula (IV):



(IV)

9.El compuesto de la reivindicación 7 o de la reivindicación 8, CARACTERIZADO PORQUE R^5 además comprende un grupo ligador que comprende un radical alquilo que tiene uno a diez átomos de carbono, donde el radical alquilo contiene optativamente uno a diez grupos -C(O)-, uno a diez grupos -C(O)N(R)-, uno a diez grupos -N(R)C(O)-, uno a diez grupos -N(R)-, uno a diez grupos $-N(R)_2$, uno a diez grupos hidroxi, uno a diez grupos -C(O)O-, uno a diez átomos de oxígeno, uno a diez átomos de azufre, uno a diez átomos de nitrógeno, uno

a diez átomos de halógeno, uno a diez grupos arilo y uno a diez anillos heterocíclicos saturados o insaturados, donde R es hidrógeno o alquilo.

10. El compuesto de la reivindicación 9, CARACTERIZADO PORQUE el grupo ligador es $-C(O)-CH_2-N(H)$.

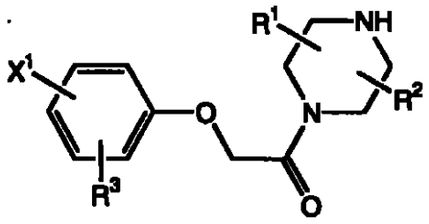
11. Una sal monoclorhidrato, CARACTERIZADA PORQUE es de un compuesto de la reivindicación 1 a la reivindicación 10.

12. Una sal diclorhidrato, CARACTERIZADA PORQUE es de un compuesto de la reivindicación 1 a la reivindicación 10.

13. Un método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un ser humano, CARACTERIZADO PORQUE comprende la administración a un ser humano que necesita dicho diagnóstico de una compuesto acorde con la reivindicación 1 a 12 y la medición de la radioactividad producida por la administración del compuesto a dicho ser humanos, ya sea mediante cámara gamma o tomografía de emisión de positrones (PET).

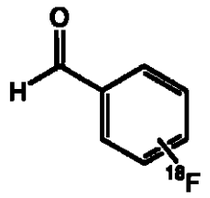
14. Un método para usar un compuesto acorde con la reivindicación 1 a 12, CARACTERIZADO PORQUE es para la elaboración de un producto radiofarmacéutico destinado al diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un ser humano.

15. Un proceso para producir un compuesto de fórmula (I) acorde con la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (f):



(f)

donde R^1, R^2, R^3, y X^1 son como se definieron en la reivindicación 1, con un compuesto de fórmula (b):



(b)

en presencia de un agente reductor.

PRODUCTOS RADIOFARMACÉUTICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

RESUMEN

Uso de productos radiofarmacéuticos en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. En particular, los productos radiofarmacéuticos de la invención tienen la capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica y unirse al receptor CCR1 presente en el tejido del cerebro de pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer.

Figura 1



Figura 2

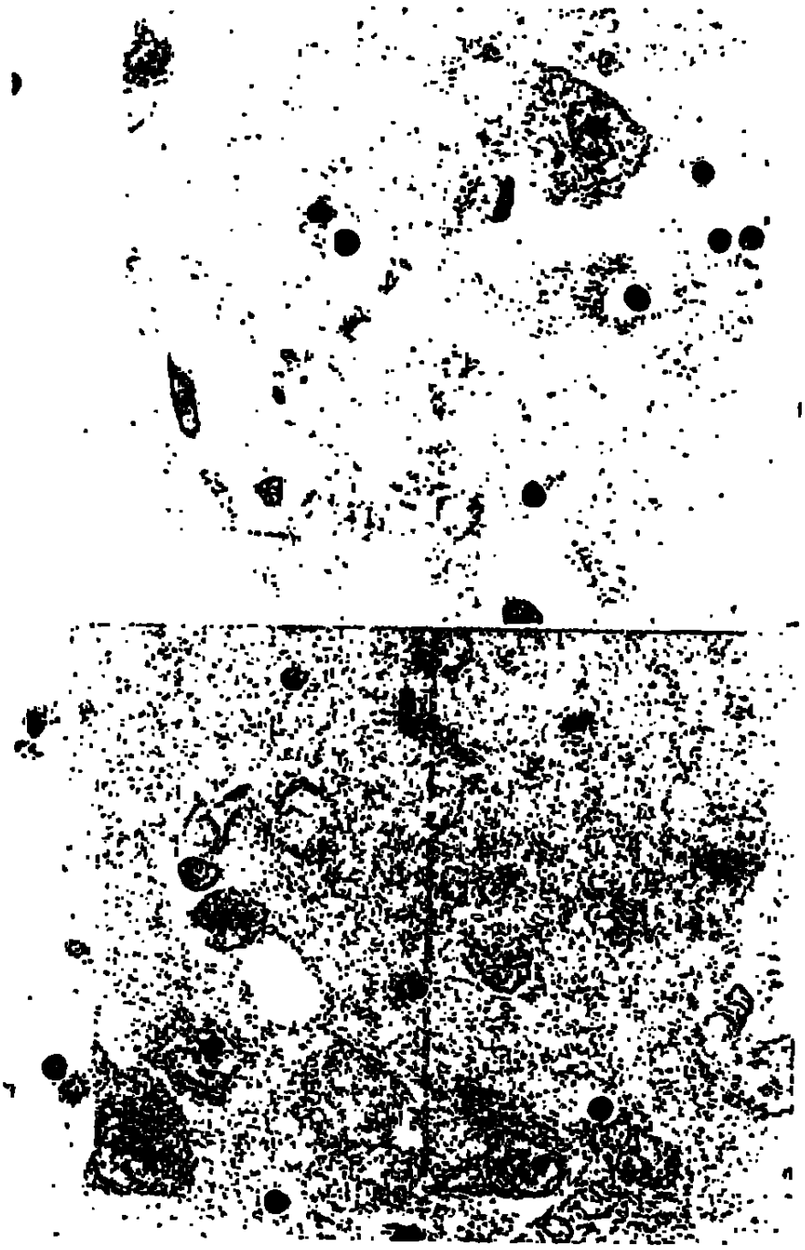


Figura 3



FIGURA 4



Figura 5

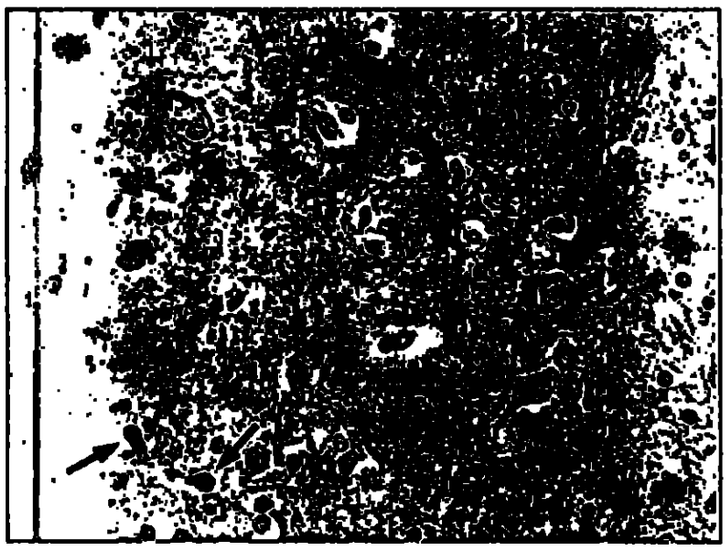


Figura 6

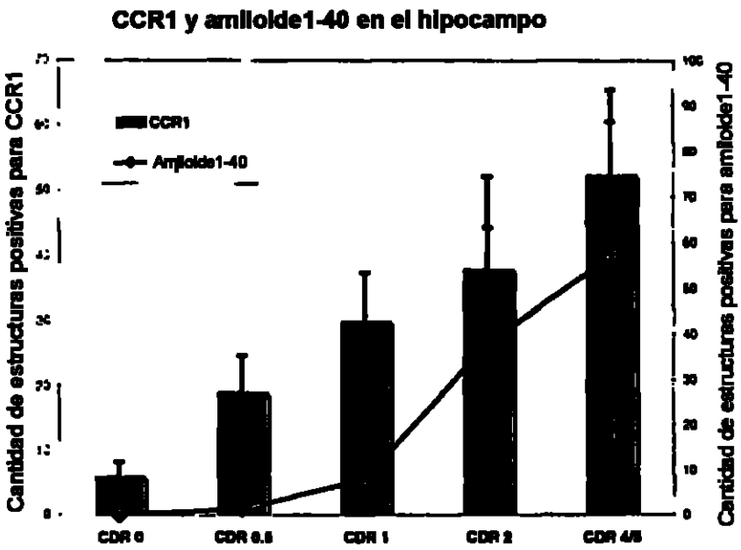

CCR1 y amiloide1-40 en el hipocampo
Cantidad de estructuras positivas para CCR1
Cantidad de estructuras positivas para amiloide1-40
CCR1
Amiloide1-40
CDR 0
CDR 0.5
CDR 1
CDR 2
CDR 4/5

Figura 7

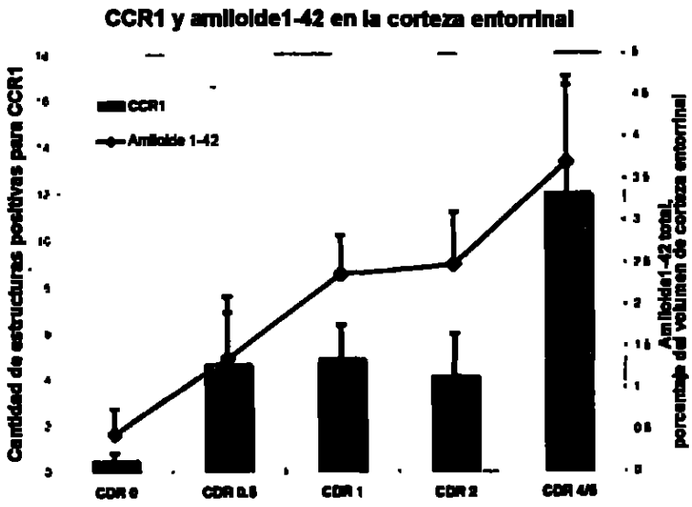

CCR1 y amiloide1-42 en la corteza entorrinal
Cantidad de estructuras positivas para CCR1
CCR1
Amiloide 1-42
Amiloide1-42 total, porcentaje del volumen de corteza entorrinal
CDR 0
CDR 0.5
CDR 1
CDR 2
CDR 4/5

Figura 8

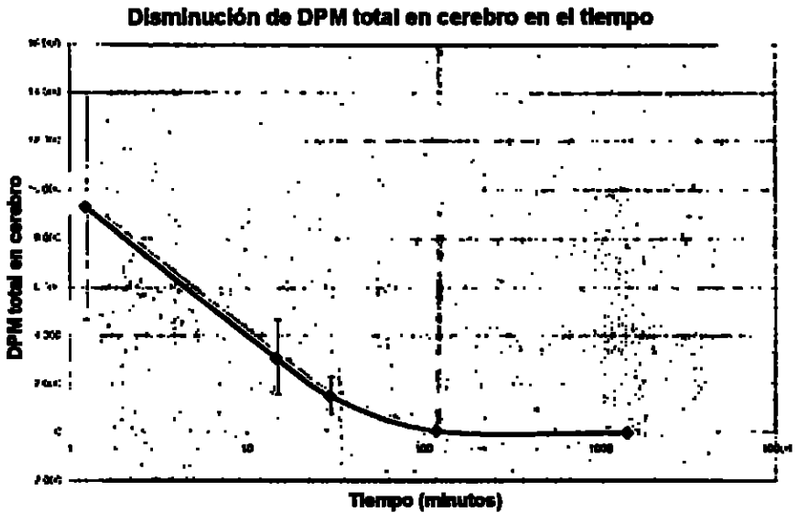

Disminución de DPM total en cerebro en el tiempo
DPM total en cerebro
Tiempo (minutos)

Figura 9

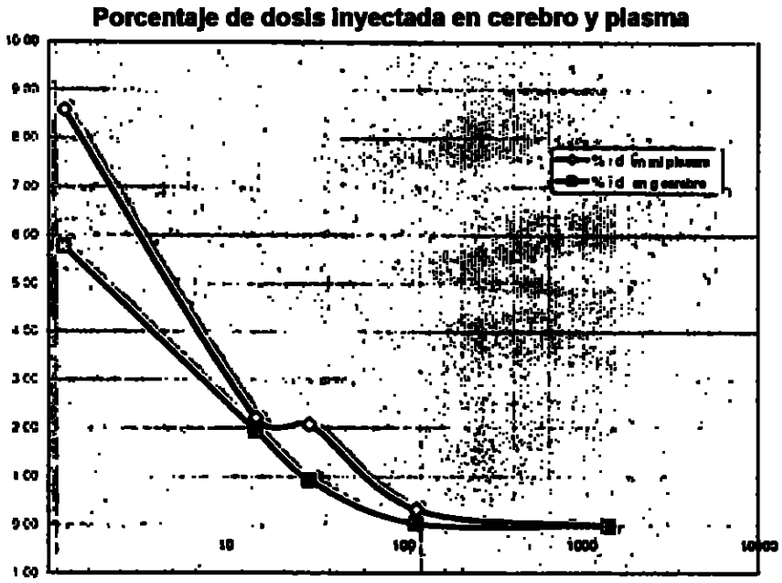
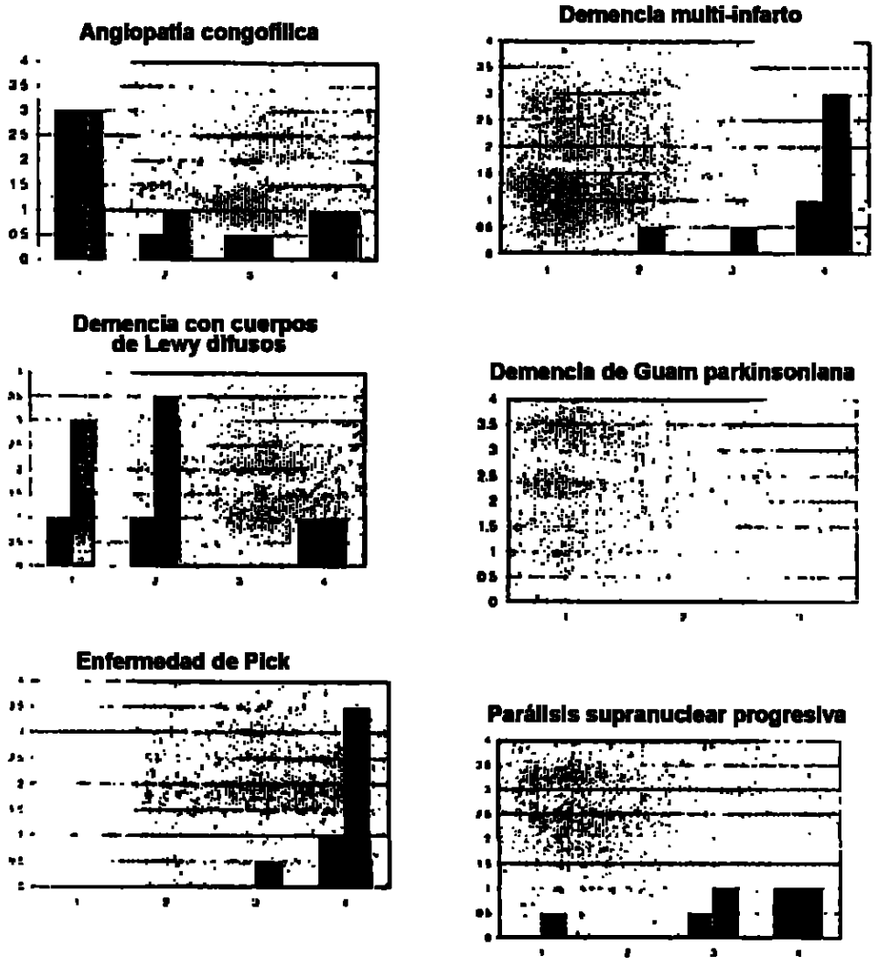

Porcentaje de dosis inyectada en cerebro y plasma
10 00
9 00
8 00
7 00
6 00
5 00
4 00
3 00
2 00
1 00
9 00
1 00
10
100
1000
10000

Figura 10


Angiopatía congofílica
Demencia multi-infarto
Demencia con cuerpos de Lewy difusos
Demencia de Guam parkinsoniana
Enfermedad de Pick
Parálisis supranuclear progresiva

PCT-ANTRAG 51783AWOM1XX

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 01.11.2001 01:22:57 PM

0	Vom Anmeldeamt auszufüllen	
0-1	Internationales Aktenzeichen.	
0-2	Internationales Anmeldedatum	
0-3	Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"	

0-4	Formular - PCT/RO/101 PCT-Antrag	
0-4-1	erstellt durch Benutzung von	PCT-EASY Version 2.92 (aktualisiert 01.03.2001)
0-5	Antragsersuchen Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die Internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird	
0-6	(Vom Anmelder gewähltes) Anmeldeamt	Europäisches Patentamt (EPA) (RO/EP)
0-7	Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	51783AWOM1XX
I	Bezeichnung der Erfindung	RADIOPHARMACEUTICALS FOR DIAGNOSING ALZHEIMER'S DISEASE
II	Anmelder	
II-1	Diese Person ist	nur Anmelder
II-2	Anmelder für	alle Bestimmungsstaaten
II-4	Name	SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT
II-5	Anschrift:	Müllerstraße 178 D-13342 Berlin Deutschland
II-6	Staatsangehörigkeit (Staat)	DE
II-7	Sitz/Wohnsitz (Staat)	DE
II-8	Telefonnr.	+49 30 46812876
II-9	Telefaxnr.	+49 30 46812058
III-1	Anmelder und/oder Erfinder	
III-1-1	Diese Person ist	nur Erfinder
III-1-4	Name (FAMILIENNAME, Vorname)	HILGER, Christoph-Stephan
III-1-5	Anschrift:	Langenauer Weg 24 D-13503 Berlin Deutschland
III-2	Anmelder und/oder Erfinder	
III-2-1	Diese Person ist	nur Erfinder
III-2-4	Name (FAMILIENNAME, Vorname)	JOHANNSEN, Bernd
III-2-5	Anschrift:	Lausitzer Straße 5 D-01324 Dresden Deutschland

III-3	Anmelder und/oder Erfinder	
III-3-1	Diese Person ist	nur Erfinder
III-3-4	Name (FAMILIENNAME, Vorname)	STEINBACH, Jörg
III-3-5	Anschrift:	Geschwister-Scholl-Str. 14 D-01877 Bischofswerda Deutschland
III-4	Anmelder und/oder Erfinder	
III-4-1	Diese Person ist	nur Erfinder
III-4-4	Name (FAMILIENNAME, Vorname)	MÄDING, Peter
III-4-5	Anschrift:	Voglerstraße 19 D-01277 Dresden Deutschland
III-5	Anmelder und/oder Erfinder	
III-5-1	Diese Person ist	nur Erfinder
III-5-4	Name (FAMILIENNAME, Vorname)	HALKS-MILLER, Meredith
III-5-5	Anschrift:	799 Glenerag Way Woodside, CA 94062 Ver. St. von Amerika
III-6	Anmelder und/oder Erfinder	
III-6-1	Diese Person ist	nur Erfinder
III-6-4	Name (FAMILIENNAME, Vorname)	HORUK, Richard
III-6-5	Anschrift:	3410 Silver Springs Ct. Lafayette, CA 94549 Ver. St. von Amerika
III-7	Anmelder und/oder Erfinder	
III-7-1	Diese Person ist	nur Erfinder
III-7-4	Name (FAMILIENNAME, Vorname)	DINTER, Harald
III-7-5	Anschrift:	80 De La Guerra San Rafael, CA 94103 Ver. St. von Amerika
III-8	Anmelder und/oder Erfinder	
III-8-1	Diese Person ist	nur Erfinder
III-8-4	Name (FAMILIENNAME, Vorname)	MOHAN, Raju
III-8-5	Anschrift:	161 Selborne Way Moranga, CA 94556 Ver. St. von Amerika
III-9	Anmelder und/oder Erfinder	
III-9-1	Diese Person ist	nur Erfinder
III-9-4	Name (FAMILIENNAME, Vorname)	HESSELGESSER, Joseph, E.
III-9-5	Anschrift:	445 Burnett Avenue # 103 San Francisco, CA 94131 Ver. St. von Amerika

PCT-ANTRAG

51783AWOM1XX

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 01.11.2001 01:22:57 PM

V	Bestimmung von Staaten	
V-1	Regionales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZW und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat des Harare-Protokolls und Vertragsstaat des PCT ist EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE TR und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat der OAPI und Vertragsstaat des PCT ist
V-2	Nationales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PH PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG UZ VN YU ZA ZW
V-5	Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen Zusätzlich zu den unter Punkten V-1, V-2 und V-3 vorgenommenen Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der nachstehend unter Punkt V-6 angegebenen Staaten. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt.	
V-6	Staaten, die von der Erklärung über vorsorgliche Bestimmungen ausgenommen werden	KEINE
VI-1	Priorität einer früheren nationalen Anmeldung beansprucht	
VI-1-1	Anmeldedatum	06 November 2000 (06.11.2000)
VI-1-2	Nummer	60/246,299
VI-1-3	Staat	US
VII-1	Gewählte Internationale Recherchenbehörde	Europäisches Patentamt (EPA) (ISA/EP)

PCT-ANTRAG 51783AWOM1XX

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 01.11.2001 01:22:57 PM

VIII	Erklärungen	Anzahl der Erklärungen	
VIII-1	Erklärung hinsichtlich der Identität des Erfinders	-	
VIII-2	Erklärung hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, zum Zeitpunkt des Internationalen Anmeldedatums, ein Patent zu beantragen und zu erhalten	-	
VIII-3	Erklärung hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, zum Zeitpunkt des Internationalen Anmeldedatums, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen	-	
VIII-4	Erfindererklärung (nur im Hinblick auf die Bestimmung der Vereinigten Staaten von Amerika)	-	
VIII-5	Erklärung hinsichtlich unschädlicher Offenbarungen oder Ausnahmen von der Neuheitsschädlichkeit	-	

IX	Kontrollliste	Anzahl der Blätter	Elektronische Datei(en) beigefügt
IX-1	Antrag (inklusive Erklärungsblätter)	5	-
IX-2	Beschreibung	45	-
IX-3	Ansprüche	4	-
IX-4	Zusammenfassung	1	EZABST00.TXT
IX-5	Zeichnung(en)	10	-
IX-7	INSGESAMT	65	

	Beigefügte Unterlagen	Unterlage(n) in Papierform beigefügt	Elektronische Datei(en) beigefügt
IX-8	Blatt für die Gebührenberechnung	✓	-
IX-13	Prioritätsbeleg(e)	Unterlage(n) VI-1	-
IX-17	PCT-EASY-Diskette	-	Diskette
IX-19	Nr. der Abb. der Zeichn., die mit der Zusammenf. veröffentlicht werden soll		
IX-20	Sprache der int. Anmeldung	Deutsch	

X-1	Unterschrift des Anmelders, des Anwalts oder des Gemeinsamen Vertreters	
X-1-1	Name	SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT
X-1-2	Name der unterzeichnenden Person	ppa. Dr. Klose
X-2	Unterschrift des Anmelders, des Anwalts oder des Gemeinsamen Vertreters	
X-2-1	Name	SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT
X-2-2	Name der unterzeichnenden Person	i.A. Dr. Dorsch

VOM ANMELDEAMT AUSZUFÜLLEN

10-1	Datum des tatsächlichen Eingangs dieser Internationalen Anmeldung	

10-2	Zeichnung(en):	
10-2-1	Eingegangen	
10-2-2	Nicht eingegangen	
10-3	Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingeg. Unterlage(n) oder Zeichnung(en) zur Vervollständigung dieser int. Anmeldung	
10-4	Datum des fristgerechten Eingangs der Berichtigung nach PCT Artikel 11(2)	
10-5	Internationale Recherchenbehörde	ISA/EP
10-6	Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchengebühr aufgeschoben	

VOM INTERNATIONALEN BÜRO AUSZUFÜLLEN

11-1	Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro	

Europäisches Patentamt
Direktion Kassen- und
Rechnungswesen
D - 80298 München

51783AWOM1XX

PCT (ANHANG - BLATT FÜR DIE GEBÜHRENBERECHNUNG)

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 01.11.2001 01:22:57 PM

(Dieses Blatt zählt nicht als Blatt der internationalen Anmeldung und ist nicht Teil derselben)

0	Vom Anmeldeamt auszufüllen			
0-1	Internationales Aktenzeichen.			
0-2	Eingangsstempel des Anmeldeamts			

0-4	Formular - PCT/RO/101 (Anlage) PCT Blatt für die Gebührenberechnung				
0-4-1	erstellt durch Benutzung von		PCT-EASY Version 2.92 (aktualisiert 01.03.2001)		
0-9	Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts		51783AWOM1XX		
2	Anmelder		SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT		
12	Berechnung der vorgeschriebenen Gebühren		Höhe der Gebühr/Multiplikator	Gesamtbeträge (EUR)	
12-1	Übermittlungsgebühr	T	⇨	102	
12-2	Recherchengebühr	S	⇨	945	
12-3	Internationale Gebühr Grundgebühr (erste 30 Blätter)	b1	409		
12-4	Anzahl der Blätter über 30		35		
12-5	Zusatzblattgebühr	(X)	9		
12-6	Gesamtbetrag der weiteren Gebühren	b2	315		
12-7	b1 + b2 =	B	724		
12-8	Bestimmungsgebühren Anzahl der in der internationalen Anmeldung vorgenommenen Bestimmungen		88		
12-9	Anzahl der zu zahlenden Bestimmungsgebühren (höchstens 6)		6		
12-10	Bestimmungsgebühr	(X)	88		
12-11	Gesamtbetrag der Bestimmungsgebühren	D	528		
12-12	PCT-EASY-Gebührenermäßigung	R	-126		
12-13	Gesamtbetrag der internationalen Gebühr (B+D-R)	I	⇨	1.126	
12-17	Gesamtbetrag der zu zahlenden Gebühren (T+S+I+P)		⇨	2.173	
12-19	Zahlungsart		Abbuchungsauftrag		
12-20	Anweisungen betreffend laufendes Konto Das Anmeldeamt:		Europäisches Patentamt (EPA) (RO/EP)		
12-20-1	Die Bevollmächtigung, den o.g. Gesamtbetrag der Gebühren abzubuchen.		✓		

Zu belastende Kostenstelle
4710 15180
Zur Buchung und
Zahlung angewiesen
1.11.01 Dorsch
Dr. H. Dorsch

PCT (ANHANG - BLATT FÜR DIE GEBÜHRENBERECHNUNG)

51783AWOM1XX

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 01.11.2001 01:22:57 PM

12-20-2	Die Bevollmächtigung, Fehlbeträge oder Überzahlungen des Gesamtbetrags zu belasten bzw. gutzuschreiben.	✓
12-20-3	Die Bevollmächtigung, die Gebühr für Prioritätsbeleg abzubuchen.	✓
12-21	Nummer des laufenden Kontos	28000019
12-22	Datum	01 November 2001 (01.11.2001)
12-23	Name und Unterschrift	SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT ppa. i.A. Dr. Klose Dr. Dorsch

PRÜFPROTOKOLL UND BEMERKUNGEN

13-1-1	Bemerkungen des Anmelders	Die Schering AG erklärt, dass sie als Anmelderin berechtigt ist die Priorität der Voranmeldung in Anspruch zu nehmen. Entsprechende Übertragungserklärungen sind diesem Antrag beigefügt. Eine Abtretungsvereinbarung wird später getroffen.
13-2-2	Prüfergebnisse Staaten	Grün? Es können mehr Bestimmungen vorgenommen werden. Die folgenden Staaten sind nicht bestimmt worden: DE, US. Bitte überprüfen.
13-2-7	Prüfergebnisse Inhalt	Grün? Nr. der Abb. der Zeichnungen, die mit der Zusammenf. veröffentlicht werden soll, nicht angegeben. Bitte überpüfen.
13-2-8	Prüfergebnisse Gebühren	Grün? Bitte bestätigen, daß das Gebührenverzeichnis in der zur Zeit geltenden Fassung benutzt wurde
13-2-9	Prüfergebnisse Zahlung	Grün? Bitte überprüfen Sie, daß bei dem gewählten Anmeldeamt ein gültiges laufendes Konto auf Ihren Namen besteht

PCT (ANHANG - BLATT FÜR DIE GEBÜHRENBERECHNUNG) 51783AWOM1XX

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 01.11.2001 01:22:57 PM

13-2-10	Prüfergebnisse Anmerkun	Grün? Der Name der unterzeichnenden Person oder/und ihre Eigenschaft nicht angegeben. Bitte berücksichtigen Sie, daß einige Anmeldeämter fordern, daß diese Information zusammen mit der Unterschrift vorgeführt wird.
		Grün? Der Name der unterzeichnenden Person oder/und ihre Eigenschaft nicht angegeben. Bitte berücksichtigen Sie, daß einige Anmeldeämter fordern, daß diese Information zusammen mit der Unterschrift vorgeführt wird.
		Grün? Alle im Antragsformular zulässigen Angaben werden durch das Programm vorgegeben. Bitte Richtigkeit von zusätzlichen Angaben bestätigen.

PCT

51753AWOM1XX

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 01.11.2001 01:22:57 PM

PCT-EASY-Informationsblatt

(Vom Anmelder auszufüllen; dieses Blatt NICHT mit der internationalen Anmeldung einreichen)

PRÜFPROTOKOLL

Grün?	**Staaten** Es können mehr Bestimmungen vorgenommen werden. Die folgenden Staaten sind nicht bestimmt worden: DE, US. Bitte überprüfen.
Grün?	**Inhalt** Nr. der Abb. der Zeichnungen, die mit der Zusammenf. veröffentlicht werden soll, nicht angegeben. Bitte überpüfen.
Grün?	**Gebühren** Bitte bestätigen, daß das Gebührenverzeichnis in der zur Zeit geltenden Fassung benutzt wurde
Grün?	**Zahlung** Bitte überprüfen Sie, daß bei dem gewählten Anmeldeamt ein gültiges laufendes Konto auf Ihren Namen besteht
Grün?	**Anmerken** Der Name der unterzeichnenden Person oder/und Ihre Eigenschaft nicht angegeben. Bitte berücksichtigen Sie, daß einige Anmeldeämter fordern, daß diese Information zusammen mit der Unterschrift vorgeführt wird.
Grün?	Der Name der unterzeichnenden Person oder/und Ihre Eigenschaft nicht angegeben. Bitte berücksichtigen Sie, daß einige Anmeldeämter fordern, daß diese Information zusammen mit der Unterschrift vorgeführt wird.
Grün?	Alle im Antragsformular zulässigen Angaben werden durch das Programm vorgegeben. Bitte Richtigkeit von zusätzlichen Angaben bestätigen.

Vor Einreichung der internationalen Anmeldung, bitte sorgfältig prüfen daß:

-die Angaben auf dem ausgedruckten Anmeldeformular richtig sind;
-Feld Nr. X des Anmeldeformulars und Punkte 12-23 der Anlage zum Anmeldeformular unterschrieben sind;
-alle in den Feldern Nr. VIII und IX des Antragsformulars angegebenen Bestandteile der internationalen Anmeldung beigefügt sind; und,
-die Diskette mit der PCT-EASY-Zipdatei der internationalen Anmeldung ist beigefügt und eindeutig mit "PCT-EASY", dem Aktenzeichen des Anmelders/Anwalts und dem Familiennamen des Anmelders beschriftet

ACHTUNG

Ändern Sie keine Angaben auf dem Ausdruck des Anmeldeformulars. Die electronische Version der PCT-EASY Anmeldung wurde schreibgeschützt. Falls zu diesem Zeitpunkt ein Fehler oder eine Auslassung endeckt wird, müssen Sie das zur Einreichung gespeicherte Formular erneut öffnen, die nötigen Änderungen vornehmen und das Formular alsbald erneut einreichen. Zum Schluß muß von Hand durch erneutes Abspeichern des korrigierten gespeicherten Formulars auf Diskette eine NEUE Diskette zur Einreichung erstellt werden. Der vorher angefertigte Ausdruck und die Einreichungsdiskette sollten zerstört werden, um zu vermeiden, daß sie irrtümlicherweise ans Anmeldeamt geschickt werden.

ABSTRACT

This invention is directed to the use of radiopharmaceuticals in diagnosing Alzheimer's disease. In particular the radiopharmaceuticals of the invention are able to pass through the blood-brain barrier and bind to the CCR1 receptor present in brain tissue of patients having Alzheimer's disease.

243
233

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

Bericht am 17.4.02
an Sony Zeichnungen. St

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION	see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.
51783AWOMIXX		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/EP 01/12607	01/11/2001	06/11/2000
Applicant		
SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 4 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

   a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

   [ ] the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

   b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:

   [ ] contained in the international application in written form.

   [ ] filed together with the international application in computer readable form.

   [ ] furnished subsequently to this Authority in written form.

   [ ] furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

   [ ] the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

   [ ] the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

2. [ ] Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. [ ] Unity of invention is lacking (see Box II).

4. With regard to the title,

   [X] the text is approved as submitted by the applicant.

   [ ] the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

   [ ] the text is approved as submitted by the applicant.

   [X] the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No.

   [ ] as suggested by the applicant.

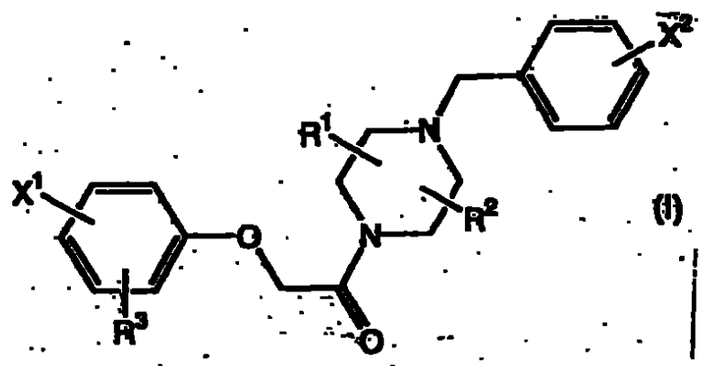
   [ ] because the applicant failed to suggest a figure.

   [ ] because this figure better characterizes the invention.

   [X] None of the figures.

Box III TEXT OF THE ABSTRACT (Continuation of item 5 of the first sheet)

This invention is directed to the use of radiopharmaceuticals of formula (I) in diagnosing Alzheimer's disease. In particular the radiopharmaceuticals of the invention are able to pass through the blood-bain barrier and bind to the CCR1 receptor present in brain tissue of patients having Alzheimer's disease.



(I)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/12607

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07D295/18 C07B59/00 A61K51/00 A61P25/28

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)
IPC 7 C07D C07B

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BERGSTRÖM ET AL.: "Iodine-123 labelled Z-(R,R)-IQNP: a potential radioligand" EUROP. J. NUCL. MED., vol. 26, no. 11, 1999, pages 1482-1485, XP002193046 cited in the application page 1482	1-15
Y	US 6 207 665 B1 (HESSELGESSER JOSEPH E ET AL) 27 March 2001 (2001-03-27) column 25, line 35 -column 26, line 38; claims 1,4-6 & WO 98 56771 A 17 December 1998 (1998-12-17) cited in the application	1-15

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in 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	Date of mailing of the international search report
14 March 2002	28/03/2002

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Grassi, D

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 51594 A (DIKIC BRANKO ;KATSIFIS ANDREW (AU); MARDON KARIN (AU); PAPAZIAN VA) 14 October 1999 (1999-10-14) page 1 -page 2	1-15
Y	WO 92 16239 A (UNIV CALIFORNIA ;UNIV MINNESOTA (US)) 1 October 1992 (1992-10-01) page 1 -page 2	1-15
Y	OYA S ET AL: "Small and Neutral TcO BAT, Bisaminoethanethiol (N2S2) Complexes for Developing New Brain Imaging Agents" NUCLEAR MEDICINE AND BIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NEW YORK, NY, US, vol. 25, no. 2, 1 February 1998 (1998-02-01), pages 135-140, XP004100818 ISSN: 0969-8051 the whole document	1-15
Y	US 5 919 797 A (FARAJ BAHJAT ET AL) 6 July 1999 (1999-07-06) column 1 -column 4	1-15

2

INTERNATIONAL SEARCH REP RT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 01/12607

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6207665 B1	27-03-2001	AU 735462 B2	12-07-2001
		AU 8625898 A	30-12-1998
		EE 9900565 A	15-06-2000
		WO 9856771 A2	17-12-1998
		EP 0988292 A2	29-03-2000
		HU 0003929 A2	28-05-2001
		JP 2002503239 T	29-01-2002
		NO 996068 A	11-02-2000
		PL 337758 A1	11-09-2000
		SK 171399 A3	12-09-2000
		TR 9903034 T2	21-06-2000
WO 9951594 A	14-10-1999	AU 3130999 A	25-10-1999
		WO 9951594 A1	14-10-1999
		EP 1071684 A1	31-01-2001
WO 9216239 A	01-10-1992	AU 654013 B2	20-10-1994
		AU 1767992 A	21-10-1992
		CA 2038781 A1	14-09-1992
		EP 0576611 A1	05-01-1994
		JP 6510021 T	10-11-1994
		WO 9216239 A1	01-10-1992
		US 5358712 A	25-10-1994
		US 5721243 A	24-02-1998
US 5919797 A	06-07-1999	AU 2680797 A	12-11-1997
		WO 9740010 A1	30-10-1997

2446
236

COPY BY FAX ONLY

030/46896039

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

SCHERING AKTIENGESELSCHAFT
Müllerstrasse 178
D-13342 Berlin
ALLEMAGNE

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing (day/month/year)	11.02.2003

Applicant's or agent's file reference	IMPORTANT NOTIFICATION
51783AWOM1XX00-P	

International application No.	International filing date (day/month/year)	Priority date (day/month/year)
PCT/EP01/12607	01/11/2001	06/11/2000

Applicant
SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.

2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.

3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. **REMINDER**

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

For the purpose of deciding whether the claimed invention is patentable or not, the elected Offices may apply criteria additional to or different from the criteria on which the international preliminary examination report is based (see Articles 27(5), 33(5)). Additional criteria may include e.g. exemptions from patentability and the requirements of enabling disclosure and of clarity and support of claims.

Name and mailing address of the IPEA/	Authorized officer
European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Ullrich, J Tel.+49 89 2399-8248

Form PCT/IPEA/416 (July 1992)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
51783AWOM1XX00-P		
International application No.	International filing date (day/month/year)	Priority date (day/month/year)
PCT/EP01/12607	01/11/2001	08/11/2000

International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC
C07D295/18

Applicant
SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.

   ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

   These annexes consist of a total of sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

   - I ☒ Basis of the report
   - II ☐ Priority
   - III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
   - IV ☐ Lack of unity of invention
   - V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
   - VI ☐ Certain documents cited
   - VII ☐ Certain defects in the international application
   - VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand	Date of completion of this report
03/05/2002	11.02.2003
Name and mailing address of the international preliminary examining authority: European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer Grassi, D Telephone No. +49 89 2399 8469

Form PCT/IPEA/409 (cover sheet) (January 1994)

247
237

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/EP01/12607

I. **Basis of the report**

1. With regard to the **elements** of the international application *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17))*:
Description, pages:

1-45 as originally filed

Claims, No.:

1-15 as originally filed

Drawings, sheets:

1-10 as originally filed

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
- ☐ the claims, Nos.:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No: PCT/EP01/12607

☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 13.

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. (with respect to industrial applicability) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):
see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for the said claims Nos. .

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N) Yes: Claims 1-15

248
239

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.: PCT/EP01/12607

	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-15
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-12,14,15
	No:	Claims	

2. Citations and explanations
see separate sheet

Re Item III

Claim 13 relates to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).

Re Item V

1) Reference is made to the following documents:
D1: BERGSTRÖM ET AL.: 'Iodine-123 labelled Z-(R,R)-IQNP: a potential radioligand' EUROP. J. NUCL. MED., vol. 26, no. 11, 1999, pages 1482- 1485, cited in the application
D2: US-A-6207665 (family member of WO-A-9856771)
D3: WO-A-9951594
D4: WO-A-9216239
D5: OYA S ET AL: 'Small and Neutral TcO BAT, Bisaminoethanethiol (N2S2) Complexes for Developing New Brain Imaging Agents' NUCLEAR MEDICINE AND BIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NEW YORK, NY, US, vol. 25, no. 2, 1 February 1998 (1998-02-01), pages 135- 140
D6: US-A-5919797

2) The subject-matter of present claims 1-15 is new (Article 33(2) PCT).
The state of the art does not comprise radiopharmaceuticals according to claim 1 or 2.

3) The subject-matter of claims 1-15 does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT).

D1 discloses radioligands for visualisation of M1 and M2 muscarinic acetylcholine receptors (mAChR) in Alzheimer's disease. Reduced density of mAChR is a marker for the degeneration of the cholinergic system in Alzheimer's disease and therefore radioligands for brain imaging of mAChR with PET and SPET were developed. The presynaptic M2 mAChR subtype is of particular interest with respect to the degeneration of the cholinergic system in Alzheimer's disease (cf. introduction). For the said purpose the known IQNP having a high affinity for the

M1 and M2 mAChR subtype was prepared in a radiolabeled form.
D1 teaches that Alzheimer's disease may be diagnosed by PET or SPET using a radiolabeled compound having a high affinity for a receptor involved in the development of Alzheimer's disease.

The technical problem underlying the present application is seen in the provision of alternative agents for the diagnosis of Alzheimer's disease.

The compounds according to claim 1 appear to solve the problem, because the unlabeled counterparts were shown to be CCR1 receptor antagonists (cf. D2, examples 25 and 26).
The compounds according to claim 2, generically refer to compounds of formula (II) containing an additional chelator capable of binding a radioactive metal. Such a definition of the invention by the result to be achieved cannot be allowed (cf. guidelines III-4.7), because the invention can be defined more precisely (cf. claims 7-10). However, the compounds according to claims 7-10 were not shown to bind to the CCR1 receptor, therefore, it can not be decided whether the said compounds solve the technical problem or not.

The proposed solutions according to claims 1 does not involve inventive activity.
D2 discloses unlabeled compounds corresponding to the formula (I) of claim 1 (cf. D2, claims 1, 4-6). The said compounds inhibit the activity of the chemokines MIP-1α and RANTES by binding to the CCR1 receptor (cf. column 26, lines 31-38) and are useful for the treatment of inflammatory disorders as Alzheimer's disease (cf. column 25, lines 35-47).
The combination of D2 with D1 prompts the skilled person faced with the above mentioned problem to prepare radiolabeled analogues of the compounds of D2 for diagnosing Alzheimer's disease. The present claim 1, encompassing such analogues, does therefore not involve inventive activity.

Additionally, D3 discloses labeled compounds useful in PET and SPECT scanning to detect, non invasively, neurodegenerative disorders. The said compounds bind to peripheral benzodiazepine receptors which are used as markers of neurodegeneration (e.g. Alzheimer's disease, cf. pages 1 and 2). Similar to D1, document D3 teaches that Alzheimer's disease may be diagnosed by PET or

SPECT using a radiolabeled compound having a high affinity for a receptor involved in the development of Alzheimer's disease.
In analogy to the combination of D1 with D2, the combination of D3 with D2 also prompts the skilled person to the present labelled compounds according to claim 1.

Furthermore, D4 discloses radiopharmaceuticals for the detection of Alzheimer's disease. Similar to D1 and D3 a radiolabeled ligand for a receptor involved in Alzheimer's disease is used as indicator of the said (cf. pages 1 and 2). In analogy to the arguments presented with respect to D1-D3, the combination of D4 with D2 renders the present claim 1 obvious.

The document D6 discloses that the ability of analog compounds to bind to localized ligands within the body would make it possible, in principle, to utilize such compounds for in situ imaging of the ligands by PET, SPECT and similar imaging methods. In principle, nothing need be known about the nature of the ligand, as long as binding occurs, and such binding is specific for a class of cells, organs, tissues or receptors of interest. PET imaging is accomplished with the aid of tracer compounds labeled with a positron-emitting isotope (cf. column 1). The isotopes ^{11}C, ^{18}F, ^{123}I, $^{75\text{-}77}Br$ and ^{82}Br are proposed as positron emitters (cf. column 2). The compunds of D6 are useful for emission tomography, especially so where the same chemical entity can be used for both positron emission tomography (PET) and for single photon emission computed tomography (SPECT). The high in vitro binding affinities for the serotonin transporter also provide pharmaceutical utility for the diagnosis, treatment or management of a variety of psychiatric, psychomoter and addictive disorders such as depression, obsessive-compulsive disorder, Parkinson's disease, Alzheimer's disease and alcohol abuse (cf. column 4). In analogy to the arguments presented with respect to D1-D4, the combination of D6 with D2 renders the present claim 1 obvious.

Although the document D5 discloses TcO BAT-complexes for developing receptor-specific brain imaging agents (cf. title). The compounds according to claim 7-10 could be regarded as involving inventive activity, if the applicant showed that the said compounds solve the technical problem (i.e. bind to the CCR1 receptor with high affinity).

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT
Müllerstrasse 178
13342 Berlin
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year)	IMPORTANT NOTIFICATION
06 December 2001 (06.12.01)	
Applicant's or agent's file reference	**International application No.**
51783AWOM1XX00 – P	PCT/EP01/12607

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT (all designated States)

International filing date	:	01 November 2001 (01.11.01)
Priority date(s) claimed	:	06 November 2000 (06.11.00)
Date of receipt of the record copy by the International Bureau	:	27 November 2001 (27.11.01)
List of designated Offices	:	

AP :GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW
EA :AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM
EP :AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR
OA :BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG
National :AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- [X] time limits for entry into the national phase
- [X] confirmation of precautionary designations
- [ ] *requirements regarding priority documents*

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: Gabriele BAEHR
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

Form PCT/IB/301 (April 2000)

004510774

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is 20 MONTHS from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, 30 MONTHS from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1998 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1998 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

To:

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT
Müllerstrasse 178
13342 Berlin
ALLEMAGNE

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 06 December 2001 (06.12.01)	
Applicant's or agent's file reference 51783AWOM1XX	**IMPORTANT NOTIFICATION**
International application No. PCT/EP01/12607	International filing date (day/month/year) 01 November 2001 (01.11.01)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 06 November 2000 (06.11.00)
Applicant SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.

3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
06 Nove 2000 (06.11.00)	60/246,299	US	27 Nove 2001 (27.11.01)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Gabriele BAEHR

Telephone No. (41-22) 338.83.38

252
242

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

		USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCIÓN X	MODELO DE UTILIDAD	( )	( )
- Indicación de que se solicita la concesion de una patente		( )	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud		( )	( )
- Descripcion de la invención		( )	( )
- Dibujos de ser estos pertinentes		( )	( )
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas			
COMPLETA ( )	INCOMPLETA	( )	( )
DISEÑO INDUSTRIAL ( )			
- Indicación de que se solicita el registro de 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 ( )			
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.		( )	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud		( )	( )
Representación gráfica del esquema de trazado		( )	( )
Comprobante de pago de las tasas establecidas		( )	( )
COMPLETA ( )	INCOMPLETA	( )	( )

Firma Responsable

Fecha

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion 03046600 00000000 Folios 251
Fecha (AMD): 2003-06-03 16:20:51
Tramite 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES