

# **TRABAJO FIN DE GRADO**

## **Grado en Biotecnología**

# **SÍNTESIS DE UN RADIOTRAZADOR PARA DIAGNÓSTICO DE TAUOPATÍAS MEDIANTE TOMOGRAFÍA DE EMISIÓN DE POSITRONES (PET)**

**Autor/es: Elena González Redondo**

Villaviciosa de Odón, *Julio 2023*

## **ANEXO IX**

Título del Trabajo: SÍNTESIS DE UN RADIOTRAZADOR PARA DIAGNÓSTICO DE TAUOPATÍAS MEDIANTE TOMOGRAFÍA DE EMISIÓN DE POSITRONES (PET)

Este trabajo ha sido realizado en el Grupo de “Síntesis Orgánica y Bioevaluación” del Instituto Pluridisciplinar de la Universidad Complutense de Madrid.

Tutor/es: Aurelio García Csáky y Silvia Roscales García

## ÍNDICE

### *Tabla de contenido*

<i>Resumen</i> .....	3
<i>Abstract</i> .....	3
<i>Lista de abreviaturas</i> .....	4
<i>Introducción</i> .....	6
<i>Objetivos</i> .....	15
<i>Materiales y métodos</i> .....	16
<b>1.1. Búsqueda bibliográfica</b> .....	<b>16</b>
<b>1.2. Parte Experimental</b> .....	<b>16</b>
Consideraciones generales .....	16
Síntesis de 5-metoxi-1-metil-1 <i>H</i> -indol-2-carboxilato de etilo ( <b>4</b> ) .....	17
Síntesis de (5-metoxi-1-metil-1 <i>H</i> -indol-2-il)metanol ( <b>5</b> ) .....	17
Síntesis de 5-metoxi-1-metil-1 <i>H</i> -indol-2-carbaldehído ( <b>6</b> ) .....	18
Síntesis de <i>N</i> -(2-oxoindolin-5-il)-3-(piperidin-1-il)propanamida ( <b>9</b> ).....	19
Síntesis de (Z/E)- <i>N</i> -(3-((5-metoxi-1-metil-1 <i>H</i> -indol-2-il)metileno)-2-oxoindolin-5-il)-3-(piperidin-1-il)propanamida ( <b>10</b> ).....	19
<i>Resultados y Discusión</i> .....	21
<i>Conclusiones</i> .....	31
<i>Bibliografía</i> .....	32

## *Resumen*

Las tauopatías, incluido el Alzheimer, son enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por la acumulación anormal de la proteína tau en el cerebro. La propagación de tau a través del cerebro es un aspecto importante en la progresión de estas enfermedades. Por esta razón se están desarrollando nuevos biomarcadores para detectar y cuantificar la proteína tau en el cerebro mediante técnicas de imagen, lo que podría permitir una detección temprana y un seguimiento preciso de la enfermedad. Además, se están desarrollando terapias destinadas a modificar la acumulación y propagación de tau en el cerebro. Aunque aún no existe una cura para las tauopatías, la investigación en curso ofrece esperanzas para el desarrollo de tratamientos más efectivos en el futuro, que permitirían un estudio y un seguimiento individualizado a cada paciente. En este trabajo, se presenta la síntesis orgánica de un radiotrazador específico para proteína tau con la finalidad de ser utilizado para el diagnóstico precoz de tauopatías mediante tomografía de emisión de positrones (PET).

## *Abstract*

*Neurodegenerative conditions known as tauopathies, such as Alzheimer's disease, are defined by an abnormal buildup of tau protein in the brain. The spread of tau throughout the brain is an important aspect in the progression of these diseases. For this reason, new biomarkers are being developed to detect and quantify tau protein in the brain using imaging techniques, which could allow early detection and accurate monitoring of the disease. In addition, therapies aimed at modifying the accumulation and spread of tau in the brain are being developed. Although tauopathies are still incurable, ongoing research offers hope for the potential development of more effective future treatments, which would allow individualized study and follow-up for each patient. In this work, we present the organic synthesis of a radiotracer specific for tau protein with the aim of being used for the early diagnosis of tauopathies by positron emission tomography (PET).*

*Lista de abreviaturas*

$^{13}\text{C}$ -RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono-13
$^1\text{H}$ -RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
A $\beta_{1-42}$	Biomarcador de proteína plasmática de $\beta$ -amiloide
Anh.	Anhidro
Ar	Argón
BHE	Barrera Hematoencefálica
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CG	Cromatografía de gases
COMU	Hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminoxi) dimetilamino-morfolinocarbenio
DCC	<i>N,N'</i> -Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMF	Dimetilformamida
DMSO- $d_6$	Dimetilsulfóxido deuterado
E2	Reacción de eliminación (mecanismo concertado)
Ef	Electrófilo
Eq.	Ecuación
Equiv.	Equivalentes
EtOH	Etanol
FDA	Del inglés <i>Food and Drug Administration</i>
h.	Unidad de tiempo (horas)
HPLC	Del inglés: <i>High performance liquid chromatography</i>
<i>h</i> Tau441	Biomarcador de proteína tau humana
MAP	Proteínas asociadas a microtúbulos
MAPT	Gen que codifica para la proteína Tau
Me	Metilo
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol

MS	Espectrometría de masas
Nu	Nucleófilo
°C	Unidad de temperatura (grados centígrados)
PET	Tomografía de emisión de positrones
RMN	Resonancia magnética nuclear
Rto.	Rendimiento
S <sub>N</sub> 2	Sustitución nucleófila bimolecular
S <sub>N</sub> Ar	Sustitución nucleófila aromática
SNC	Sistema nervioso central
t.a.	Temperatura ambiente
t <sub>1/2</sub>	Tiempo de vida media
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
t <sub>r</sub>	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta

## *Introducción*

Las tauopatías, incluida la enfermedad de Alzheimer, son trastornos neurodegenerativos que se producen por la acumulación anormal de agregados de proteína tau en el cerebro. Estos procesos patológicos provocan la degeneración de las células del tejido nervioso, causando desórdenes cognitivos y conductuales y pueden resultar en la muerte del paciente(1).

Las tauopatías abarcan más de 20 entidades clinicopatológicas, incluida la enfermedad de Alzheimer que, de acuerdo con estudios recientes de la OMS, constituye la forma más común de demencia, siendo la causante de entre el 60 y el 70% del total, seguida de la Enfermedad de Huntington, la Esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la Enfermedad de Parkinson y los síndromes parkinsonianos(2,3). Aunque, como ya se ha mencionado, el Alzheimer es la principal causa de demencia y trastornos neurodegenerativos, existen otras tauopatías como la enfermedad de Pick, la parálisis supranuclear progresiva, la degeneración corticobasal o la degeneración ganglionar corticobasal, entre otras. Existen importantes similitudes clínicas, patológicas, bioquímicas y genéticas en el abanico de estas enfermedades y han ayudado a avanzar en nuestra comprensión de los factores etiológicos que inician la neurodegeneración y la acumulación de tau(3). Pese a que cada una de estas enfermedades se distingue por sus particulares características, tanto clínicas como patológicas, todas ellas comparten la presencia de una elevada acumulación de agregados de proteína tau en el tejido cerebral, que será un elemento fundamental en la aparición y desarrollo de la demencia(4).

La proteína tau ejerce un rol crucial en la estabilización de los microtúbulos en las células nerviosas, pero en condiciones patológicas se produce una alteración en su estructura y función. Cuando se produce esta situación, es más factible que derive en la formación de ovillos neurofibrilares y contribuye a la disfunción neuronal característica de enfermedades como el Alzheimer y otras tauopatías(5).

La proteína tau es una de las principales proteínas que se asocian a los microtúbulos (MAP) y juega un papel fundamental en la estabilización y ensamblaje de la estructura de los microtúbulos al interactuar con la tubulina presente en ellos(6). Esta interacción es crucial para preservar la integridad y función adecuada de los microtúbulos en las células(7).

El gen MAPT humano, ubicado en el *locus* 17q21 del cromosoma 17, es el responsable de la expresión de la proteína tau(8,9). Este gen consta de 16 exones, y como resultado de las modificaciones post-transcripcionales del ARNm, se produce un proceso llamado procesamiento de corte alternativo o splicing alternativo, debido a la presencia de estos 16 exones(10). Como resultado de este proceso de splicing alternativo, se generan diferentes isoformas de la proteína tau en el cerebro prenatal y en el cerebro postnatal temprano(8,9).

En el cerebro adulto, sin embargo, solo se observan expresadas seis isoformas de la proteína tau. Estas isoformas difieren en longitud de aminoácidos, abarcando un rango de 352 a 441 aminoácidos, y se distinguen por la presencia o carencia de los exones 2, 3 y 10(8). La inclusión o exclusión de estos exones en el proceso de splicing altera la estructura y función de la proteína tau, lo que puede tener implicaciones en su capacidad para interactuar con los microtúbulos y participar en la constitución de ovillos neurofibrilares característicos de enfermedades como el Alzheimer(11,12).

El entendimiento del splicing alternativo de la proteína tau y la generación de sus diferentes isoformas es de gran importancia para comprender la diversidad y la función de esta proteína en condiciones normales y en enfermedades neurodegenerativas(13).

Las modificaciones post-traduccionales son procesos químicos que ocurren después de la síntesis de una proteína y desempeñan un papel crucial en la regulación y funciones de la proteína tau. Estas modificaciones son fundamentales para el correcto funcionamiento de la proteína, pero si no realizan de manera adecuada, pueden provocar la pérdida de su estructura nativa y funcionalidad. Esto, a su vez, favorece la generación de estructuras anormales llamadas láminas- $\beta$ , lo cual contribuye al proceso patogénico de la formación de agregados de tau(5,14).

La proteína tau anómala o aberrante tiene una propensión a sufrir procesos de agregación inusuales, como la oligomerización (formación de oligómeros, es decir, conjuntos de varias proteínas tau anormales) y la polimerización (formación de polímeros, es decir, cadenas largas de proteínas tau anormales). Estas estructuras patológicas tóxicas, conocidas como ovillos neurofibrilares, se acumulan en el cerebro y están estrechamente asociadas con la enfermedad de Alzheimer(15,16).

Si bien la fosforilación es una modificación post-traducciona que desempeña un papel significativo en el mecanismo disfuncional de la enfermedad de Alzheimer, también se han descrito otras formas de alteraciones post-traduccionales que contribuyen a la patología de la proteína tau. Estas incluyen modificaciones como la glicosilación, la acetilación, la ubiquitinación y la truncación, entre otras(16,17).

Por consiguiente, el proceso patológico de las tauopatías (Figura 1) comienza con un aumento de los niveles de tau anómala en el cuerpo, especialmente en el SNC, como resultado de la expresión errónea de MAPT y la alteración de los mecanismos post-traduccionales(5,18).

A medida que se acumula la proteína tau anormal, se produce una disminución en sus funciones biológicas normales. Esto lleva a la desestabilización y eventual muerte de las neuronas en el cerebro, lo que contribuye a la aparición de síntomas patológicos característicos de las tauopatías. Entre estos síntomas se incluye el deterioro de las habilidades cognitivas y conductuales del paciente(11,19).

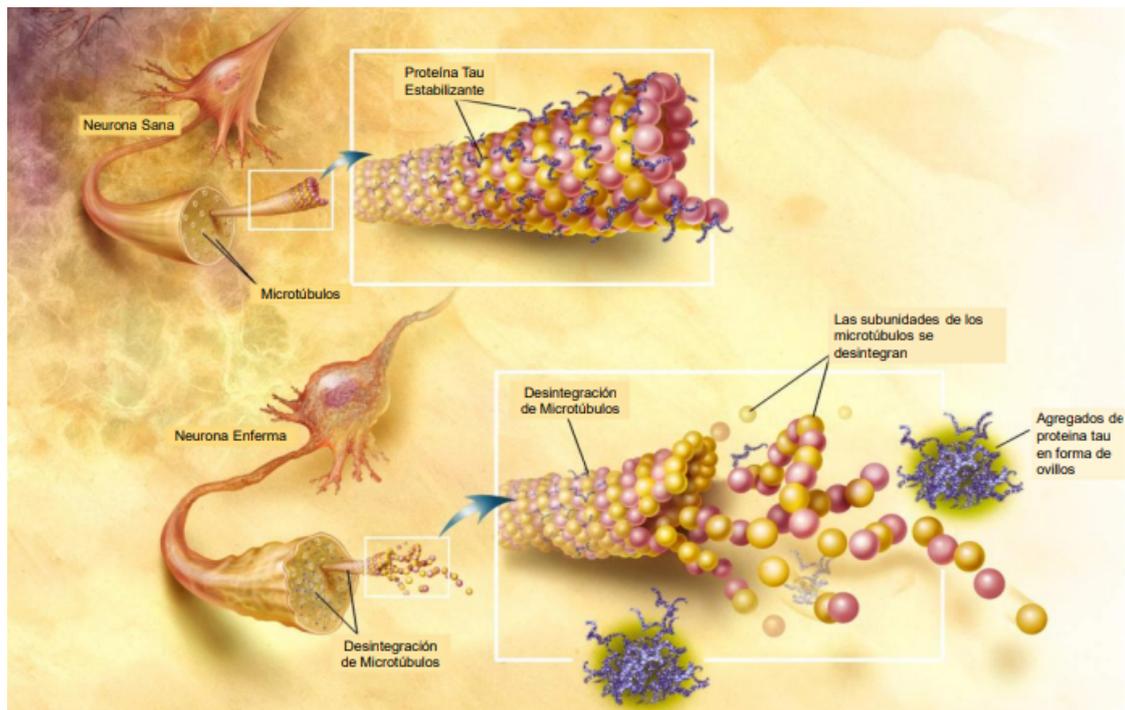


Figura 1. Proceso patológico en enfermedades neurodegenerativas asociadas a proteína tau (tauopatías). Imagen adaptada(20,21).

Actualmente, el diagnóstico precoz de las tauopatías es uno de los mayores desafíos en clínica pues la confirmación de que un paciente tiene una tauopatía sólo es posible en estudios *post-mortem*, basándose los diagnósticos *in vivo* en los síntomas de deterioro cognitivo que presente el paciente. La detección temprana y precisa de las tauopatías es imprescindible para el desarrollo de terapias más eficientes. De esta forma, la proteína tau se ha identificado como un biomarcador prometedor para el diagnóstico y seguimiento de estas enfermedades(22). Su presencia y nivel de fosforilación anormal en el líquido cefalorraquídeo y en imágenes cerebrales pueden proporcionar información importante sobre el estado patológico del paciente, con el objetivo prevenir, o intentar ralentizar, el proceso de demencia y sus consecuencias lo antes posible ya que es conocido que la aglutinación de tau hiperfosforilada en el cerebro comienza bastante antes de que los síntomas de la enfermedad sean evidentes en el paciente(4).

Una técnica de imagen nuclear ampliamente utilizada para el diagnóstico de diferentes enfermedades es la tomografía de emisión de positrones (por sus siglas en inglés, PET). Se trata de una técnica no invasiva de alta resolución que proporciona la capacidad de visualizar procesos moleculares o metabólicos que están teniendo lugar en tiempo real en distintas áreas y tejidos del organismo(23). La aplicación de la PET requiere del diseño y síntesis de radiotrazadores (también llamados radiofármacos o radioligandos) que son moléculas orgánicas que tienen afinidad por la diana terapéutica de interés y en los que uno de sus átomos es un átomo radioactivo que se fragmenta de manera espontánea emitiendo positrones (eq. 1):



Existen diferentes isótopos que emiten positrones como son el  ${}^{15}\text{O}$  ( $t_{1/2} = 2$  min), el  ${}^{13}\text{N}$  ( $t_{1/2} = 10$  min), el  ${}^{11}\text{C}$  ( $t_{1/2} = 20.3$  min) o el  ${}^{18}\text{F}$  ( $t_{1/2} = 110$  min), siendo este último el más utilizado para el desarrollo de radiotrazadores PET porque tiene un tiempo de vida media considerablemente mayor que el resto, una ventaja importante desde el punto de vista de la síntesis y purificación del radiotrazador(24).

Para realizar una imagen mediante tomografía PET, se administra al paciente una dosis mínima de radiotrazador, del orden de trazas ( $10^{-6}$ - $10^{-9}$ g). Una vez que el radiotrazador es absorbido por el organismo, se distribuye y se une a la diana terapéutica para la cual tiene

afinidad. La radiación emitida por el radiotrazador se detecta desde el exterior mediante un tomógrafo PET, lo que permite obtener la imagen(25,26).

La imagen se genera gracias a la capacidad de los tomógrafos PET para captar fotones gamma (Figura 2). Estos fotones gamma, que tienen una energía de 511 keV, se producen como resultado de la aniquilación de un positrón que es emitido por el radiofármaco y un electrón presente en el cuerpo del paciente. La aniquilación produce la emisión de dos fotones gamma principales. Para que estos fotones se integren en la imagen, es necesario que sean detectados de forma simultánea, es decir, en un intervalo de tiempo adecuado, en nanosegundos(27,28).

Es fundamental destacar que los fotones gamma deben tener una dirección coincidente y viajar en sentidos contrarios para que se puedan captar correctamente. Además, su energía debe exceder un umbral mínimo que garantice que no hayan experimentado dispersiones energéticas significativas en su trayectoria hasta llegar a los detectores. Este fenómeno de dispersión o scatter puede afectar la calidad de la imagen(29).

Los fotones generados por cada aniquilación positrón-electrón son detectados por los detectores de tomografía PET, que se encuentran colocados en un anillo en torno al paciente. Estos detectores capturan los fotones gamma y registran su posición y tiempo de detección, lo que permite reconstruir la imagen tridimensional del área de interés en el cuerpo del paciente(28,30).

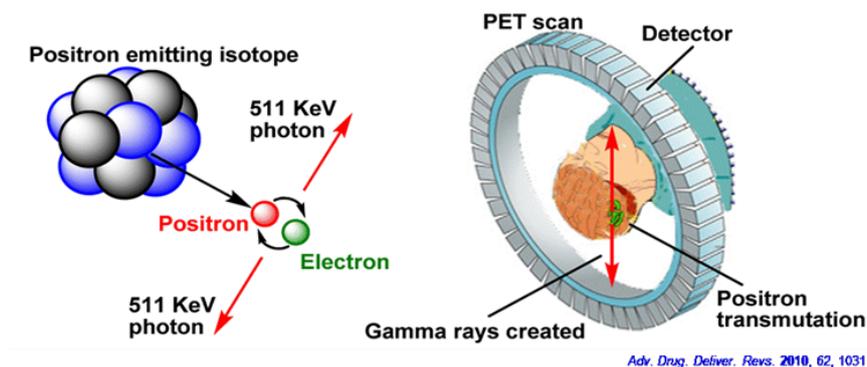


Figura 2. Generación de rayos  $\gamma$  a partir de los positrones y electrones y su detección por el escáner PET. Imagen adaptada (31).

El  $^{18}\text{F}$  tiene que ser generado en un ciclotrón mediante una reacción nuclear a partir de  $^{18}\text{O}$  (eq. 2). Si se utiliza el gas  $^{18}\text{O}_2$  como reactivo se produce la molécula gaseosa  $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$  mientras

que el uso de agua enriquecida,  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ , como reactivo genera  $^{18}\text{F}^-$  en disolución, por lo que se utiliza más habitualmente en radiosíntesis al ser más sencillo de manipular. Los métodos de síntesis de radiofármacos más comunes están basados en reacciones de sustitución nucleófila  $\text{S}_{\text{N}}2$  (en sustratos alifáticos) y  $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$  (en sustratos aromáticos) empleando el  $^{18}\text{F}^-$ (32).



Los radiotrazadores PET no pueden ser sintetizados en las instalaciones habituales de los laboratorios debido a la naturaleza ionizante de la radiación  $\gamma$ . El riesgo radiológico asociado a la síntesis, aislamiento y purificación de estos compuestos implica que sean procesos que deben ser realizados por personal formado para ello, trabajando en celdas completamente plomadas o empleando módulos automáticos de síntesis. La purificación de estos compuestos tiene lugar en el interior de las celdas plomadas mediante HPLC semipreparativo y las técnicas convencionales de caracterización como la RMN o MS no pueden ser empleadas, en su lugar, la caracterización se realiza en el interior de la celda plomada mediante HPLC o CG empleando detectores de radiación, lo que requiere disponer del ligando frío (el radiotrazador pero con  $^{19}\text{F}$  en lugar de  $^{18}\text{F}$ ) como referencia(24,33).

En los últimos años ha habido un aumento en la investigación de compuestos que actúan como ligandos selectivos para la proteína tau y sus agregados, con el objetivo de utilizarlos como posibles radiotrazadores en [ $^{18}\text{F}$ ]-PET. Esto se debe a la relación tan estrecha que existe entre la densidad y ubicación de estos agregados tóxicos de tau y el progreso del deterioro cognitivo en las tauopatías. La mayoría de los compuestos desarrollados hasta la fecha no son suficientemente selectivos, específicos o no logran atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). Hasta el momento, el [ $^{18}\text{F}$ ]-Flortaucipir (Tauvid®) (Figura 3) es el único radiotrazador que cuenta con la aprobación por parte de la FDA para la detección en los cerebros de pacientes adultos con Alzheimer de agregados de proteína tau mediante técnicas de imagen *in vivo* (34). Sin embargo, desarrollar radiotrazadores selectivos de proteína tau es de alta importancia para el diagnóstico precoz de tauopatías. Además, su uso combinado con los radiotrazadores selectivos de  $\beta$ -amiloide sería una estrategia muy potente para diferenciar el diagnóstico, por un lado, de enfermedad de Alzheimer, frente al resto de tauopatías(35,36).



agregados de proteína tau en grandes concentraciones, demostrando una alta selectividad por la proteína tau (37).

Para poder evaluar la viabilidad y toxicidad de este compuesto se realizaron ensayos en distintas líneas celulares, no sólo para corroborar su funcionamiento en los tejidos del sistema nervioso, sino también en los tejidos epiteliales para su administración y los principales tejidos de secreción y metabolismo para su eliminación. Los resultados de los ensayos mostraron unos altos índices de viabilidad (>80%) en las líneas celulares de tejidos renal, epitelial y hepático humanos. Del mismo modo, se observaron unos niveles de toxicidad muy bajos (<20%) en estos últimos y ligeramente superiores en tejido renal (20-50%), siendo unos niveles de nefrotoxicidad moderados y viables. Por último, se realizaron los ensayos en líneas celulares de neuroblastos de ratón, con una viabilidad de 50-80%, sin mostrar niveles de toxicidad relevantes(37).

Muchos medicamentos no funcionan bien en ensayos clínicos posteriores, pese a tener buenos niveles de actividad biológica en ensayos *in vitro*. Las características farmacocinéticas son una de las propiedades que pueden influir en estos resultados. La biodisponibilidad de un fármaco está intrínsecamente ligada a una serie de procesos que ocurren desde su administración hasta su eliminación del organismo. Es por ello por lo que se han evaluado diversos conceptos que ejercen influencia en la capacidad del fármaco para estar disponible en la corriente sanguínea. Entre estos conceptos se destacan la lipofilia y la solubilidad(39,40), que desempeñan un papel crucial en la absorción, metabolismo y penetración de las membranas. Al evaluar estos conceptos en relación con la biodisponibilidad, se obtiene una mejor comprensión de cómo los fármacos interactúan con el organismo y cómo se pueden optimizar para lograr una mayor eficacia terapéutica. Estos estudios proporcionan información valiosa, para el diseño y desarrollo de medicamentos con propiedades farmacocinéticas mejoradas y una mejor capacidad para alcanzar los sitios de acción deseados en el organismo. Además, se examinó la capacidad de atravesar la BHE debido a su naturaleza restrictiva, lo que puede obstaculizar la distribución de medicamentos al sistema nervioso central. El compuesto **1** presentó una lipofilia moderada, lo cual le permite atravesar las bicapas lipídicas al igual que interactuar con los sistemas proteicos. Al mismo tiempo, sus niveles de solubilidad en medio acuoso indican una disponibilidad apropiada en el torrente sanguíneo, esencial para que logre alcanzar el tejido deseado. Aunque estas características no

aseguran que pueda penetrar la BHE, se evaluó siguiendo los criterios de lipofilia relativa y polaridad moderada, obteniendo altas probabilidades de penetrar la BHE y, por ende, lograr alcanzar el SNC(37).

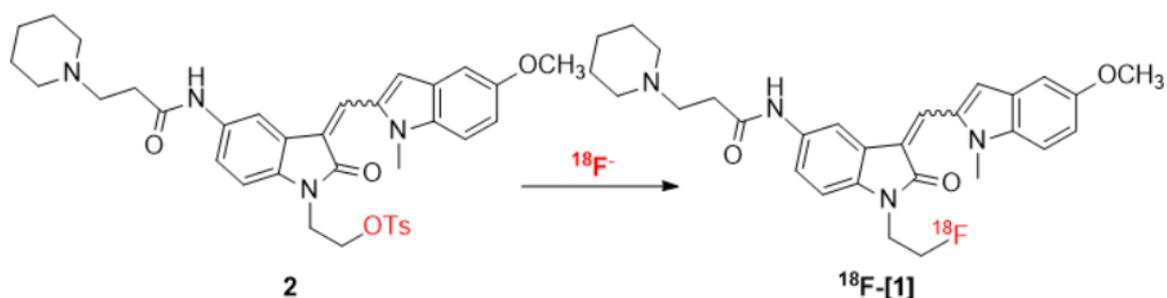
Por tanto, dado los buenos resultados que mostró el compuesto **1** en todos los ensayos realizados, se seleccionó como candidato para sintetizar un radiotrazador PET para el diagnóstico *in vivo* de tauopatías.

## Objetivos

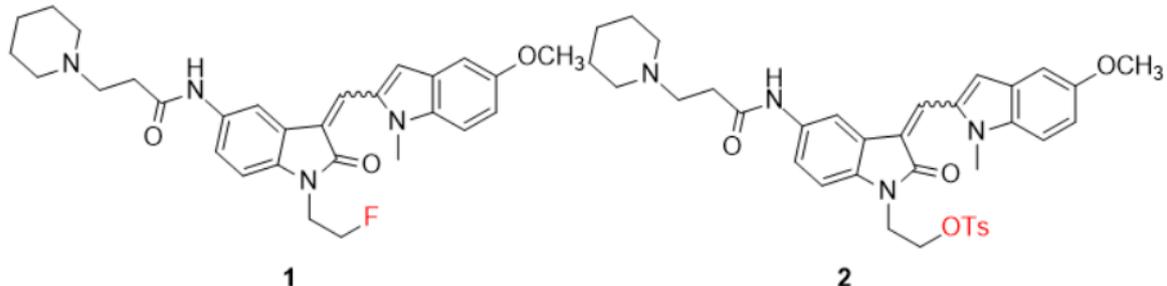
El objetivo del proyecto global en el que se basa este trabajo es el desarrollo de un nuevo radiotrazador selectivo para el diagnóstico de tauopatías. Una vez seleccionado el compuesto **1** como candidato para desarrollar el trazador, es necesario sintetizar el radioligando [ $^{18}\text{F}$ ]-**1** con 18-flúor y estudiar las imágenes que proporcione en PET. La radiosíntesis del compuesto [ $^{18}\text{F}$ ]-**1** se llevará a cabo mediante una reacción de sustitución nucleófila aromática a partir del compuesto precursor **2** (Esquema 1).

Este estudio tiene como principal objetivo la síntesis del precursor **2** y la síntesis del compuesto de referencia **1** que será utilizado con fines de caracterización.

### Radiosíntesis



### Compuestos objetivo



Esquema 1. Radiosíntesis de [ $^{18}\text{F}$ ]-**1** con 18-flúor y moléculas objetivo del presente trabajo

En cada una de las etapas de síntesis se optimizará el procedimiento experimental para la obtención del compuesto de interés de manera eficiente y reproducible. Esto implica seleccionar cuidadosamente los reactivos apropiados, optimizar las condiciones de reacción e identificar las etapas cruciales dentro del proceso global de síntesis.

## *Materiales y métodos*

### **1.1. Búsqueda bibliográfica**

Con el objetivo de encontrar información sobre tauopatías y radiotrazadores PET para contextualizar el presente estudio, se ejecutó una búsqueda bibliográfica de artículos científicos usando diversas bases de datos como Elsevier, SciELO, PubMed y Google Scholar. Para cribar la selección de los artículos se utilizaron distintas palabras clave como “*tauopathy*”, “*Alzheimer*”, “*radiotrazers*”, “*PET radiotracer*”, “*PET biomarker*”, “*PET Alzheimer*”. Dado el gran número de resultados obtenidos, se filtró la búsqueda a aquellos artículos publicados en los últimos 10 años (desde 2013 hasta la actualidad).

### **1.2. Parte Experimental**

#### Consideraciones generales

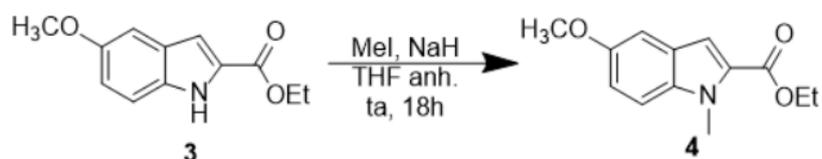
Se utilizaron jeringas con aguja para transferir los reactivos líquidos a través de un septum de goma que estaba ajustado al matraz. Todas las reacciones se llevaron a la práctica en constante agitación. Las reacciones que requerían temperaturas elevadas se realizaron sumergiendo el matraz en un baño de silicona calentado mediante placa calefactora, mientras que las que necesitaban un descenso de la temperatura se realizaron utilizando baños de agua-hielo; en todos los casos se sumergieron termómetros en los baños para controlar la temperatura. En caso de no especificar la temperatura en particular, la reacción se realizó a temperatura ambiente.

Para monitorizar el progreso de las reacciones, se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina (CCF) usando cromatofolios de gel de sílice de 0.2 mm de espesor. Los compuestos fueron detectados mediante el uso de una lámpara de luz UV a 254 nm y 366 nm en conjunción con un revelador químico como es la vainillina y calefacción.

Se llevó a cabo la caracterización estructural de los compuestos sintetizados mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono ( $^{13}\text{C}$  RMN) y protón ( $^1\text{H}$  RMN) fueron registrados utilizando un espectrómetro Bruker de 300 MHz y 75 MHz, respectivamente. Las muestras de los compuestos a analizar

se disolvieron en  $\text{CDCl}_3$  o  $\text{DMSO-d}_6$ , y se usaron el propio disolvente deuterado o tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

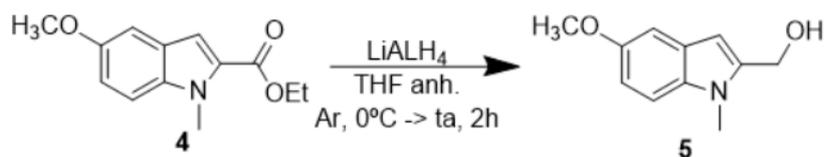
#### Síntesis de 5-metoxi-1-metil-1*H*-indol-2-carboxilato de etilo (**4**)



Esquema 2. Síntesis de 5-metoxi-1-metil-1*H*-indol-2-carboxilato de etilo (**4**).

Se pesó 1.0 g (4.5 mmol, 1 equiv.) de 5-metoxi-1*H*-indol-2-carboxilato de etilo (**3**) y se disolvió en 15.4 mL de THF anhidro en atmósfera de argón y se le añadieron lentamente 456.2 mg (11.4 mmol, 2.5 equiv.) de hidruro sódico a 0°C. Esta mezcla se dejó reaccionar durante 1h. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 2.83 mL (45.6 mmol, 10 equiv.) de yoduro de metilo y se dejó la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante toda la noche (Esquema 2). Se comprobó que la reacción había finalizado mediante CCF. Después, se agregaron 20 mL de una disolución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  saturada y se extrajo el disolvente orgánico a presión reducida. La disolución acuosa resultante se sometió a una extracción con acetato de etilo (3 x 15 mL), se combinaron las fases orgánicas y secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro. La mezcla se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El producto fue purificado mediante cromatografía en columna (CC) con gel de sílice usando como eluyente una mezcla Hexano:Acetato de etilo en proporción 8:2. El producto deseado se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 94% (1.0 g). Los datos espectroscópicos coinciden con los previamente descritos en la bibliografía(37).

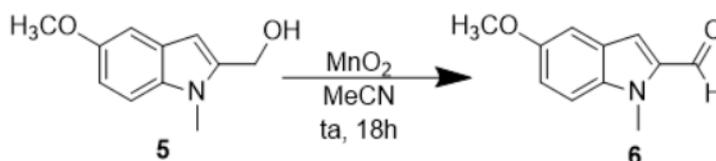
#### Síntesis de (5-metoxi-1-metil-1*H*-indol-2-il)metanol (**5**)



Esquema 3. Síntesis de (5-metoxi-1-metil-1*H*-indol-2-il)metanol (**5**).

Se pesaron 599.1 mg (2.6 mmol, 1 equiv.) del indol **4** y se disolvieron en 5.0 mL de THF anhidro en un matraz de fondo redondo. Seguidamente, se añadieron gradualmente 3.86 mL (3.9 mmol, 1.5 equiv.) de una disolución de LiAlH<sub>4</sub> (1M, en THF) a 0°C en atmósfera de argón. Se dejó agitando la mezcla a temperatura ambiente durante 2 h (Esquema 3). Se comprobó mediante CCF que la reacción había finalizado y se adicionó acetato de etilo y una disolución de Sal de Rochelle (tartrato sódico potásico) 5M en una proporción 1:1 (30 mL) y se dejó en agitación durante 30 min a 0°C. Para la extracción del crudo de reacción se realizaron sucesivos lavados con acetato de etilo (3 x 10 mL), combinándose las fases orgánicas y secando sobre MgSO<sub>4</sub>. La mezcla resultante fue filtrada y se evaporó el disolvente a presión reducida hasta obtener un residuo seco. El producto deseado se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 95% (466.9 mg). Los datos espectroscópicos coinciden con los previamente descritos en la bibliografía(37).

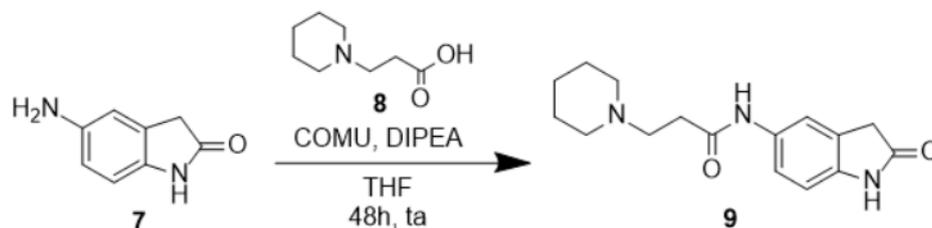
#### Síntesis de 5-metoxi-1-metil-1*H*-indol-2-carbaldehído (**6**)



Esquema 4. Síntesis de (5-metoxi-1-metil-1*H*-indol-2-carbaldehído (**6**))

Se pesaron 678.0 mg (2.9 mmol, 1 equiv.) del derivado de 2-hidroxietilindol **5** y se disolvió en 25 mL de acetonitrilo anhidro bajo atmósfera de argón. A esta solución se añadieron 1.55 g (14.6 mmol, 5 equiv.) de MnO<sub>2</sub>. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche (Esquema 4). Se comprobó que la reacción había finalizado por CCF, se filtró el crudo de reacción a través de celita lavando con 20 mL de acetato de etilo y se evaporó el disolvente a presión reducida hasta sequedad. El crudo de reacción se purificó mediante CC con gel de sílice usando una mezcla Hexano:Acetato de etilo en proporción 9:1 como eluyente. El producto deseado se obtuvo como un sólido marrón con un rendimiento del 59% (325.4 mg). Los datos espectroscópicos coinciden con los previamente descritos en la bibliografía(37).

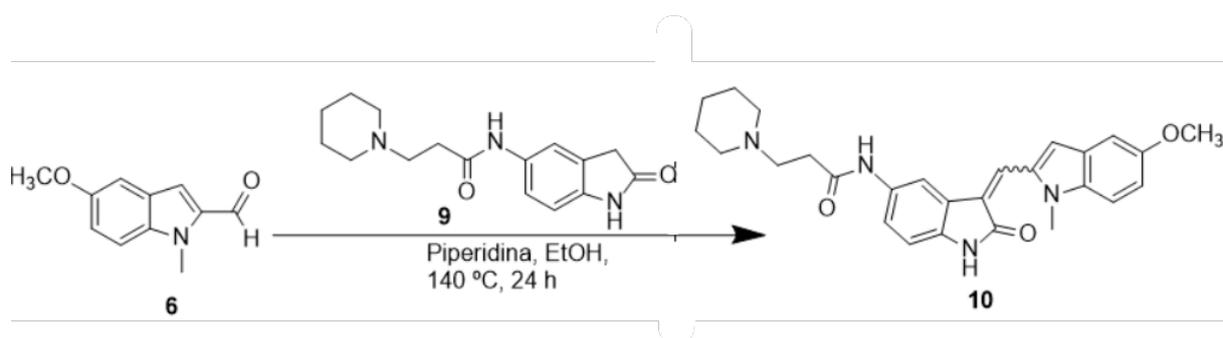
### Síntesis de *N*-(2-oxoindolin-5-il)-3-(piperidin-1-il)propanamida (**9**)



Esquema 5. Síntesis de *N*-(2-oxoindolin-5-il)-3-(piperidin-1-il)propanamida (**9**)

En un matraz de fondo redondo se pesaron 353.3 mg (2.4 mmol, 1 equiv.) del 5-amino oxindol **7** junto con 1.18 g (2.8 mmol, 1.2 equiv.) de COMU y 413.2 mg (2.6 mmol, 1.1 equiv.) del ácido 3-(piperidin-1-il) propanoico **8**. Bajo atmósfera de argón se adicionaron 12 mL de THF anhidro y 0.74 mL (4.2 mmol, 1.8 equiv.) de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA). Se dejó la mezcla en agitación a 25° C durante 48h (Esquema 5). Se comprobó que la reacción había finalizado por CCF, se evaporó el disolvente a presión reducida y se purificó el producto final **9** por CC flash en gel de sílice. Para ello, se usó como eluyente una mezcla DCM:MeOH en gradiente desde 10:1 hasta 5:1 de, obteniendo un sólido de color marrón pálido cuyo rendimiento es del 53% (152.3 mg). Los datos espectroscópicos coinciden con los previamente descritos en la bibliografía(37).

### Síntesis de (*Z/E*)-*N*-(3-((5-metoxi-1-metil-1*H*-indol-2-il)metileno)-2-oxoindolin-5-il)-3-(piperidin-1-il)propanamida (**10**)



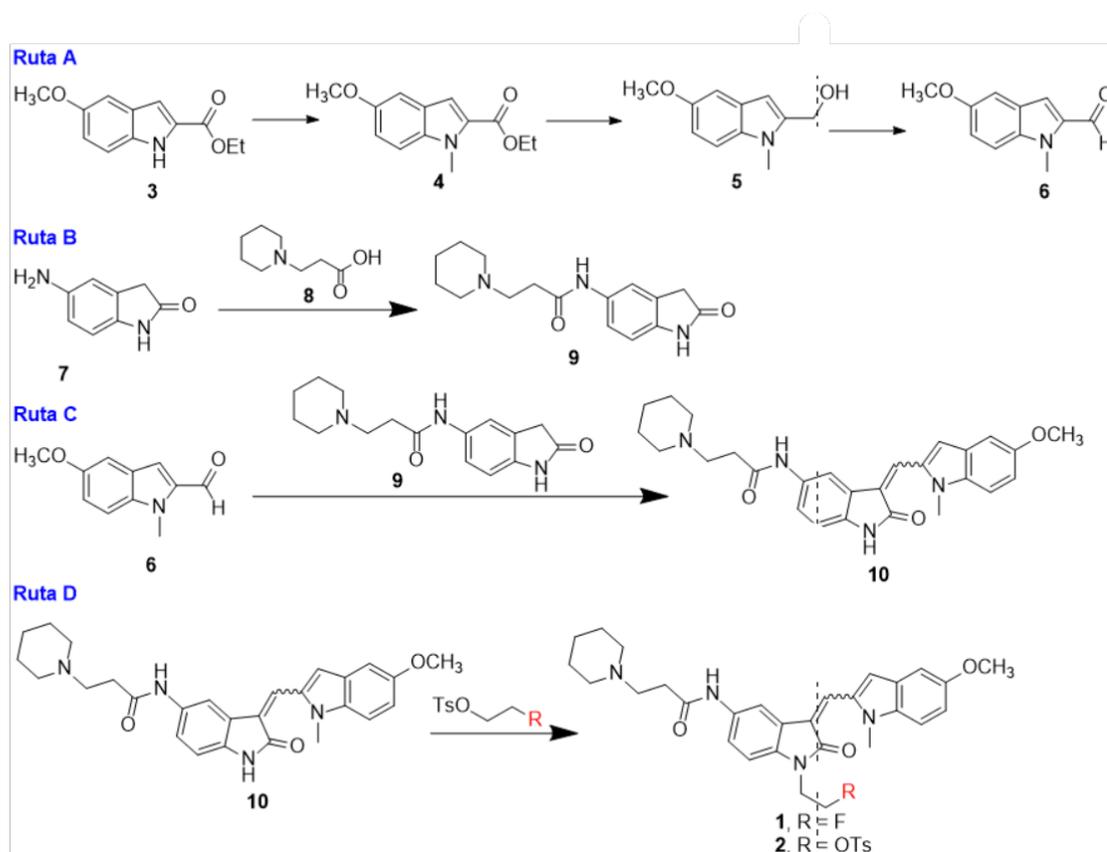
Esquema 6. Síntesis de (*Z/E*)-*N*-(3-((5-metoxi-1-metil-1*H*-indol-2-il)metileno)-2-oxoindolin-5-il)-3-(piperidin-1-il)propanamida (**10**)

Se pesaron en un matraz de fondo redondo 39.5 mg (0.21 mmol, 1 equiv.) del compuesto **6** junto con 72.2 mg (0.25 mmol, 1.2 equiv.) del derivado de 5-amido indolin-2-ona **9** y se disolvieron en 5.5 mL de EtOH absoluto. A la mezcla se adicionaron 6  $\mu$ L (0.06 mmol, 0.3 equiv.) de piperidina y se agitó a 200°C durante una noche (Esquema 6). La finalización de la reacción se comprobó por CCF. A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida y el crudo de reacción se purificó mediante CC flash en gel de sílice empleando como eluyente una mezcla DCM:MeOH en proporción 90:10. Se obtuvo una mezcla de los isómeros *Z/E* (40/60) del compuesto **10**, que no pudo separarse por CC flash, con aspecto de un sólido de color naranja cuyo rendimiento es del 68% (65.3 mg). Los datos espectroscópicos coinciden con los previamente descritos en la bibliografía(37).

## Resultados y Discusión

### 1.1. Plan de síntesis

Con el objetivo de preparar los compuestos objetivo **1** y **2** se diseñó el plan de síntesis mostrado en el esquema 7 basado en la síntesis descrita por la Dra. Ana María González Fuentes en su tesis doctoral.



Esquema 7. Plan de síntesis

En primer lugar, se sintetizará el aldehído **6** a partir del indol **3** que se encuentra disponible comercialmente mediante una reacción de metilación del nitrógeno y la transformación del grupo éster a aldehído (Ruta A).

En segundo lugar, empleando como material de partida el amino oxindol comercial **7** se sintetizará el oxindol **9** mediante la formación de un enlace amida con él ácido 3-(piperidin-1-il)propanoico **8** (Ruta B).

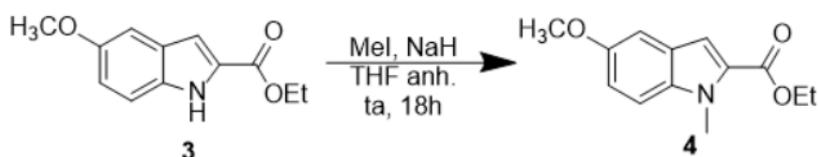
Una vez sintetizados el aldehído **6** y el oxindol **9** se realizará una reacción de condensación entre ambos para obtener el compuesto **10** (Ruta C).

Finalmente, el nitrógeno del oxindol del compuesto **10** se alquilará con la cadena alquímica correspondiente para poder obtener los compuestos objetivo **1** y **2** (Ruta D).

## 1.2. Resultado de síntesis

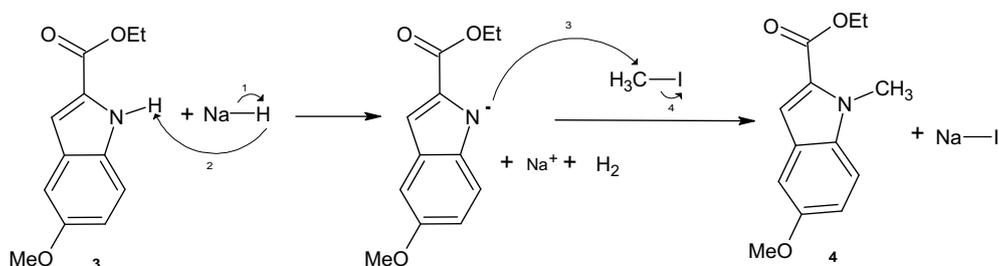
### Ruta A

Siguiendo el plan de síntesis descrito previamente, se comenzó con la transformación del material de partida **3** en el aldehído **6**. Para ello, se realizó en primer lugar una reacción de metilación del compuesto **3** para obtener el compuesto **4** empleando yoduro de metilo como agente alquilante e hidruro sódico como base en THF como disolvente (Esquema 8). Tras agitación durante 18h a temperatura ambiente, se obtuvo el compuesto **4** como un sólido de color blanco con un rendimiento excelente (94%) después de aislamiento y purificación usando una columna cromatográfica de gel de sílice.



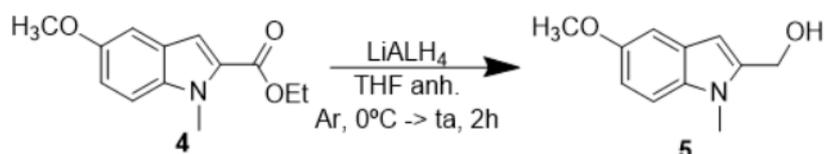
Esquema 8. Metilación del compuesto **3**

Esta transformación es una sustitución nucleófila que comienza con la desprotonación del nitrógeno del indol por acción del hidruro sódico (Esquema 9). La carga negativa sobre el átomo de nitrógeno actúa entonces como nucleófilo atacando al carbono del yoduro de metilo, siendo el yoduro un buen grupo saliente.



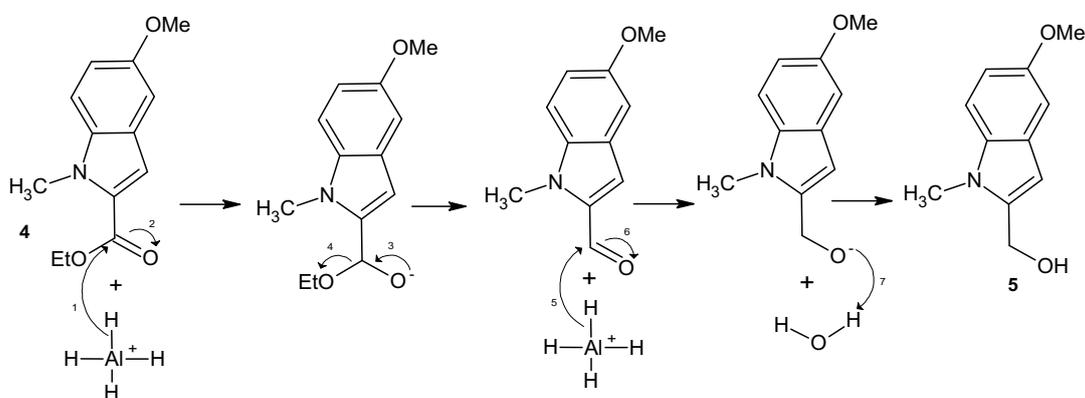
Esquema 9. Mecanismo de la reacción de metilación del compuesto **3**

A continuación, la transformación del grupo éster al grupo aldehído se realizó en dos etapas. En primer lugar, el compuesto **4** se redujo al correspondiente alcohol **5** empleando  $\text{LiAlH}_4$  como agente reductor (Esquema 10). La reacción se llevó a cabo bajo atmósfera de argón empleando THF anhidro como disolvente y tras dos horas agitando a temperatura ambiente, el alcohol **5** fue aislado como un sólido de color blanco cuyo rendimiento es del 94%.



Esquema 10. Reducción del compuesto **4**

El empleo de  $\text{LiAlH}_4$  como agente reductor de grupos ésteres para obtener alcoholes es muy frecuente (Esquema 11). La reacción comienza con el ataque nucleófilo de un hidruro del  $\text{LiAlH}_4$  al carbonilo del grupo éster. Se forma un intermedio tetraédrico que permite la regeneración del grupo carbonilo al ser el ion etóxido un buen grupo saliente. El aldehído intermedio generado es atacado de nuevo por un hidruro, generando un alcóxido que se protona en medio acuoso.



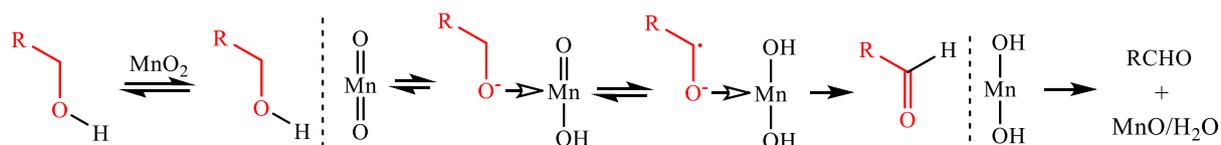
Esquema 11. Mecanismo de reducción empleando  $\text{LiAlH}_4$

Finalmente, el alcohol **5** se oxidó al aldehído **6** empleando  $\text{MnO}_2$  como agente oxidante en acetonitrilo obteniendo el compuesto **6** como un sólido de color marrón con un rendimiento moderado (59%) (Esquema 12).



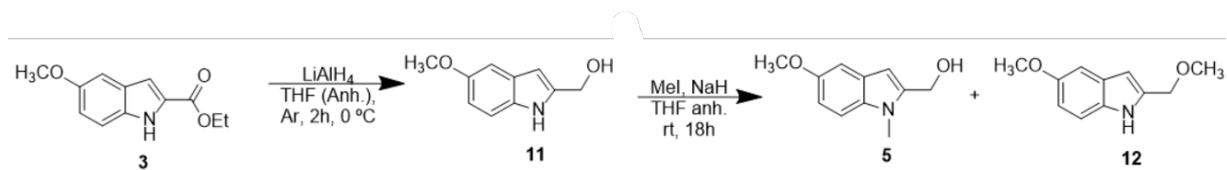
Esquema 12. Oxidación del alcohol **5**

El mecanismo de oxidación de alcoholes empleando  $\text{MnO}_2$  (Esquema 13) comienza con una primera adsorción del alcohol en el óxido de manganeso (IV), seguida de la coordinación del oxígeno del alcohol al manganeso. Esta coordinación permite la transferencia de electrones, generando un radical y, consecuentemente, la reducción de  $\text{Mn(IV)}$  a  $\text{Mn(III)}$ . Se produce una segunda transferencia electrónica que provoca la formación del compuesto carbonílico adsorbido al  $\text{Mn(OH)}_2$ . Finalmente, se produce la desorción del aldehído, liberando también agua y el óxido de manganeso(II).



Esquema 13. Mecanismo de la oxidación empleando  $\text{MnO}_2$

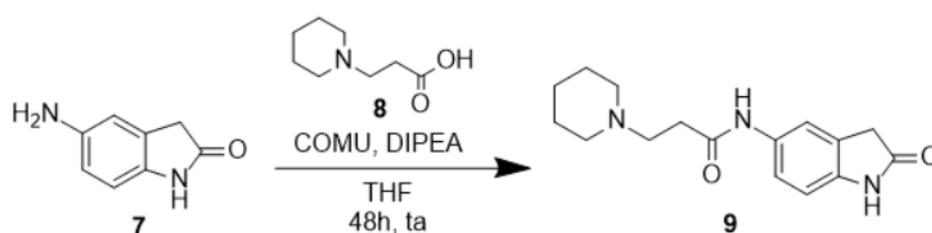
Con el objetivo de encontrar la mejor ruta sintética que dé acceso al radiotrazador final, se exploró otra vía alternativa para la transformación de compuesto **3** en el aldehído **6** alterando el orden de las reacciones, de manera que en primer lugar se redujo del grupo éster del compuesto **3** con  $\text{LiAlH}_4$  obteniendo el alcohol **11** con un 90% de rendimiento, que posteriormente fue metilado para obtener el compuesto **4** (Esquema 14). Sin embargo, en este caso la reacción no fue específica y además de la formación del compuesto deseado **4**, se logró obtener el compuesto **12** como consecuencia de la metilación del grupo alcohol en proporción 6:4 por lo que se descarta alterar el orden de las reacciones y se decide proseguir con la metilación seguida de la reducción para futuros ensayos.



Esquema 14. Transformación del compuesto **3** en el alcohol **5** vía reducción-metilación

### Ruta B

De acuerdo con el plan de síntesis, el siguiente objetivo fue la síntesis del oxindol **9** generando un enlace amida entre el grupo amino del oxindol comercial **7** y el ácido 3-(piperidin-1-il)propanoico **8** (Esquema 15). Las reacciones entre ácidos y aminas normalmente requieren del empleo de un agente de acoplamiento; resultados previos del grupo de investigación(37) mostraron que la reacción de acoplamiento entre los compuestos **7** y **8** empleando DCC (diciclohexilcarbodiimida) como agente de acoplamiento transcurría con rendimientos moderados, quedando material de partida sin reaccionar. Es por eso que en el presente trabajo se decidió emplear un agente de acoplamiento diferente como es el COMU (hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenamino) dimetilaminomorfolino-carbenio) para llevar a cabo esta reacción ya que presenta ciertas ventajas frente a otros agentes de acoplamiento como son una mayor solubilidad y estabilidad a la hidrólisis debido a la presencia del esqueleto carbonado del morfolino y al oxígeno unido al ion iminio, respectivamente(41–43).

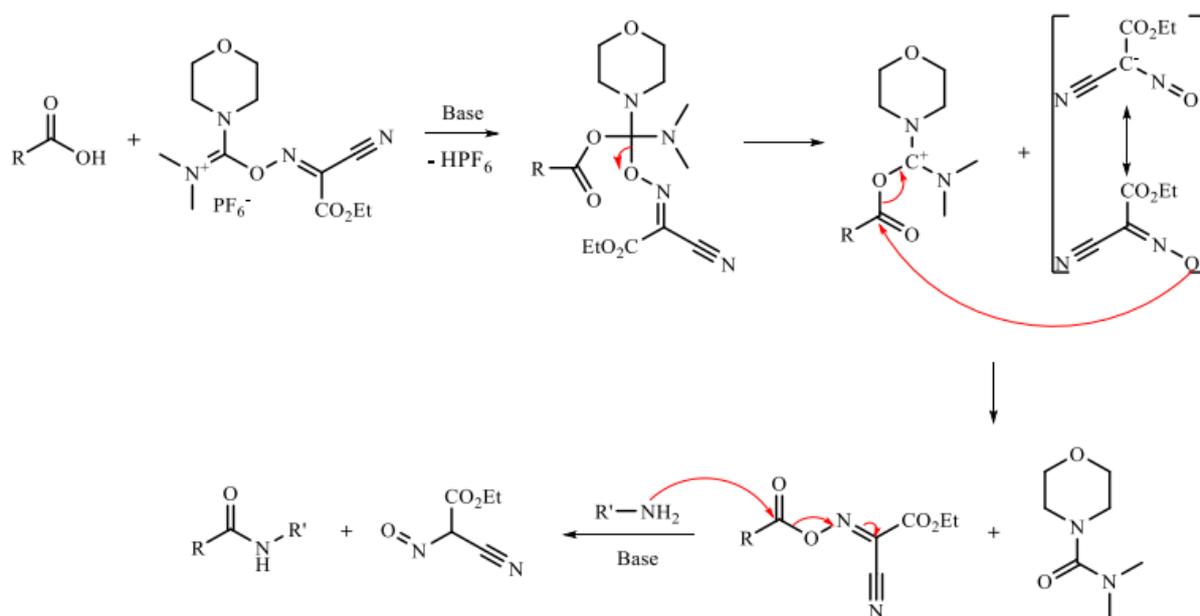


Esquema 15. Síntesis del compuesto **9**

El empleo de COMU como agente acoplante en presencia de DIPEA como base y THF como disolvente, permitió el acoplamiento de los compuestos **7** y **8** en condiciones suaves (agitación durante 24 h a temperatura ambiente), logrando obtener el compuesto **9** como un

sólido marrón cuyo rendimiento es de 53% tras de ser purificado por cromatografía en columna.

El mecanismo de la reacción de acoplamiento empleando (Esquema 16) comienza con la desprotonación del ácido **8** con una base como es la DIPEA; el oxígeno con carga negativa ataca entonces al carbono de la estructura del uronio del COMU, formándose un compuesto tetraédrico con un buen grupo saliente. El oxígeno con carga negativa del grupo saliente produce un segundo ataque nucleófilo al carbono carbonílico del éster, generando como intermedio de reacción un nuevo éster el cual es mucho más electrófilo que el ácido carboxílico **8** de partida, por lo que es atacado por el nitrógeno del grupo amino del compuesto **7** y se genera el enlace amida correspondiente dando lugar al compuesto **9** y los subproductos *N,N*-dimetil-4-morfolincarboxamida y 2-ciano-2-nitrosoacetato de etilo.

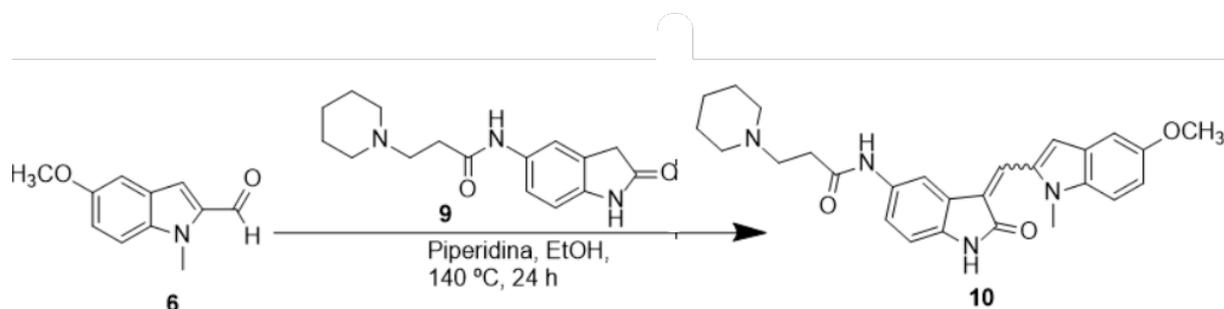


Esquema 16. Mecanismo de la reacción de acoplamiento con COMU

### Ruta C

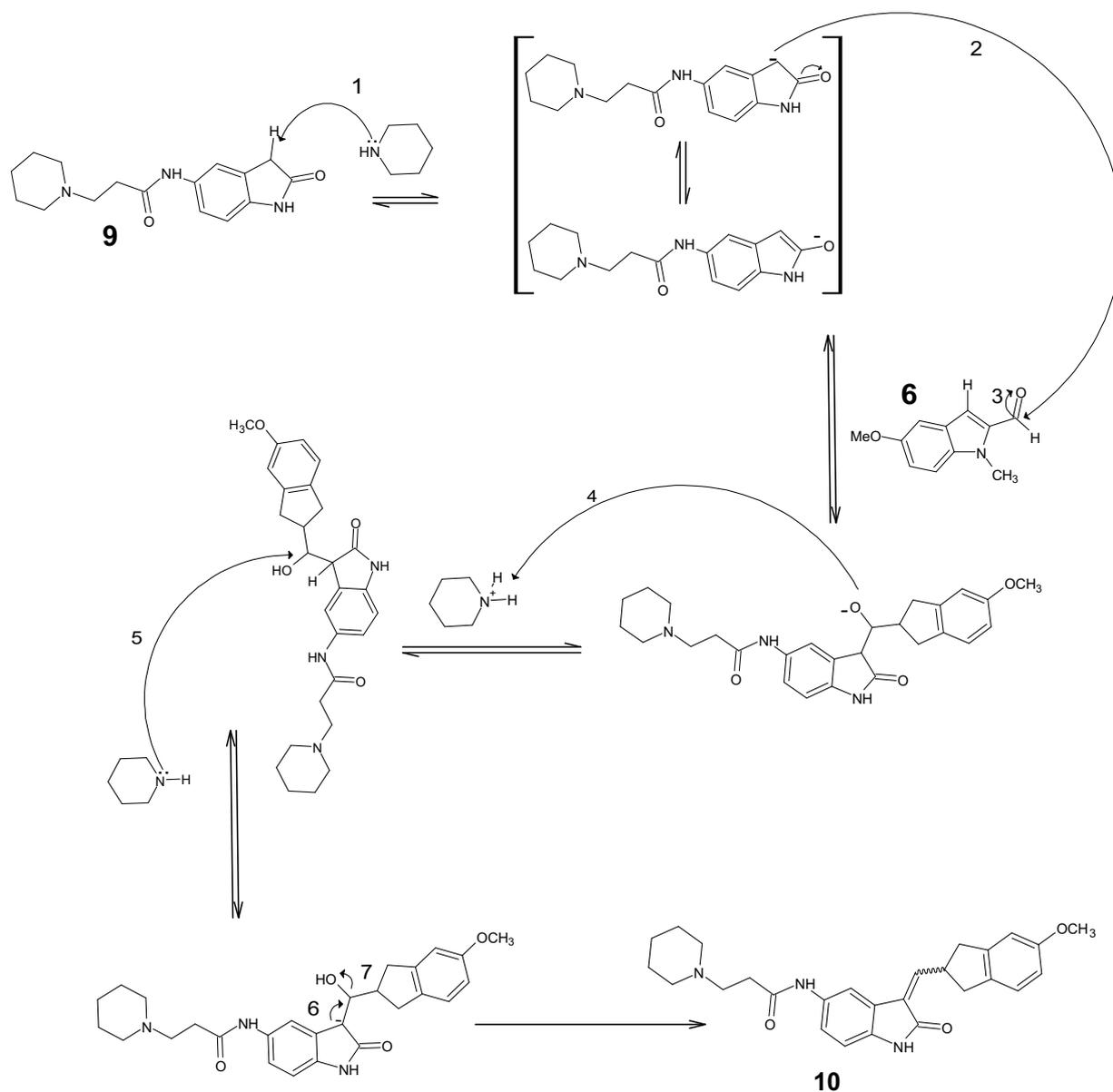
Una vez sintetizados el aldehído **6** y el oxindol **9** se realizó una reacción de condensación tipo aldólica entre dichos compuestos para formar un doble enlace y obtener el compuesto **10** (Esquema 17). Para ello se emplearon cantidades catalíticas de piperidina como base y etanol como disolvente calentando a 140 °C durante 24 horas, lo que permitió obtener el compuesto

**10** como mezcla de isómeros *Z/E* en proporción 4/6 con un 68% de rendimiento como un sólido naranja. Desafortunadamente los isómeros no fueron separables en columna cromatográfica.



Esquema 17. Síntesis del compuesto **10**

El mecanismo de esta variación de la condensación aldólica (Esquema 18) comienza con la acción de la piperidina que desprotona el carbono alfa del compuesto **9**, generando un enolato estabilizado por resonancia. A continuación, el enolato actúa como nucleófilo atacando al carbono carbonílico del compuesto **6**, formando un alcohol, que tiende a deshidratar por la formación de un compuesto conjugado **10**.

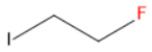
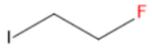
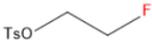
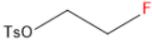


Esquema 18. Mecanismo de la reacción de condensación

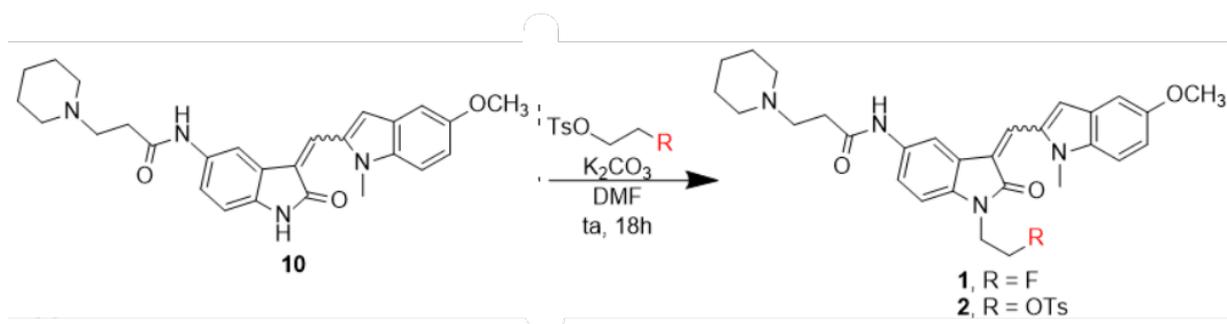
#### 2.4. Ruta D

Finalmente, se llevaron a cabo las reacciones para sintetizar el compuesto de referencia **1** y el precursor **2** ambos a partir del compuesto **10** previamente sintetizado. Se comenzó con la búsqueda de las condiciones que permitiesen obtener el compuesto **1** mediante reacciones de sustitución nucleófila, ensayando diferentes bases, disolventes, tiempos y temperaturas de reacción que están resumidas en la Tabla 1.

Tabla 1. Optimización de las condiciones de síntesis del compuesto **1**

Entrada	Reactivo	Base (Equiv.)	Disolvente	Tiempo (h)	T <sup>a</sup> (°C)	Rto (%) <b>1</b>
1		NaH (2)	DMF	18	90	0
2		Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3)	MeCN	6	60	0
3		Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3)	MeCN	6	60	0
4		K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3)	MeCN	18	ta	22

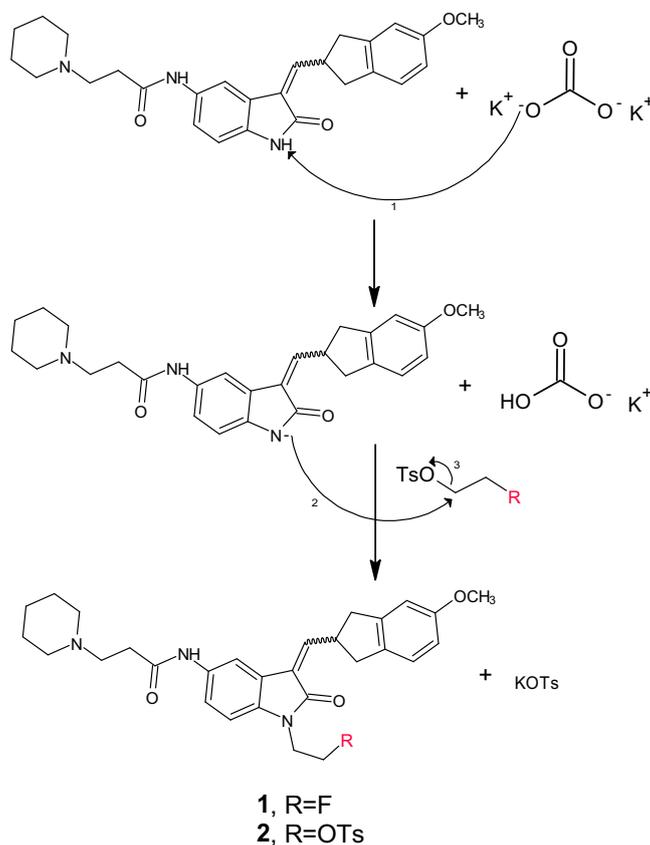
Al emplear 1-fluoro-2-iodoetano como reactivo no se observó la formación del compuesto **1**, quedando el material de partida inalterado (Tabla 1, entradas 1 y 2). Se decidió probar entonces el 2-fluoroetil 4-metilbenzenosulfonato como reactivo, y aunque al emplear carbonato de cesio como base no se observó la formación del producto deseado (Tabla 1, entrada 3), al emplear carbonato potásico en MeCN se formó el compuesto **1** con un 22% de rendimiento (Tabla 1, entrada 4). Finalmente, tanto el compuesto **1** como el compuesto **2** fueron sintetizados mediante la alquilación del nitrógeno del oxindol **10** con una cadena carbonada sustituida con un grupo tosilo como grupo saliente en presencia de carbonato potásico como base y DMF como disolvente (Esquema 19).


 Esquema 19. Síntesis del compuesto de referencia **1** y del precursor **2**

Para la síntesis del compuesto de referencia **1** se utilizó el 2-fluoroetil 4-metilbenzenosulfonato. Tras agitación durante toda la noche a temperatura ambiente, el compuesto **1** fue aislado y purificado y se obtuvo como un sólido rojo como mezcla de isómeros *Z/E* en proporción 4/6 con un 45% de rendimiento.

Por último, la síntesis del precursor **2** requiere la adición de una cadena carbonada con un buen grupo saliente como el tosilo, ya que será posteriormente sustituido por el isótopo  $^{18}\text{F}$  radioactivo para llevar a cabo los ensayos *in-vivo* mediante PET. Por ello se empleó etano-1,2-diil bis(4-metilbenzenosulfonato) como reactivo. Siguiendo el mismo procedimiento que para el compuesto **1**, el compuesto **2** fue se obtuvo como un sólido rojo como mezcla de isómeros *Z/E* en proporción 4/6 con un 33% de rendimiento.

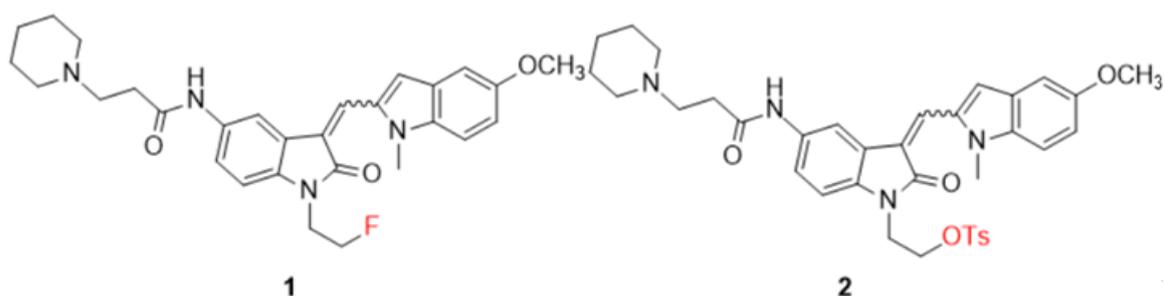
El mecanismo de esta transformación (Esquema 20) es similar al descrito anteriormente en el Esquema 9. El  $\text{K}_2\text{CO}_3$  es la base que desprotona el nitrógeno del oxindol, que actúa entonces como nucleófilo atacando al carbono en posición alfa al grupo tosilo, actuando éste como buen grupo saliente.



Esquema 20. Mecanismo de la reacción de *N*-alquilación del oxindol **10**

## Conclusiones

En el presente trabajo, se han sintetizado los compuestos de referencia **1** y precursor **2**, necesarios para llevar a cabo la radiosíntesis posterior de un nuevo radiotrazador PET para diagnóstico *in vivo* de tauopatías basado en la estructura del compuesto **1**.



Durante el trabajo se ha realizado la optimización de las diferentes reacciones químicas implicadas para obtener los compuestos **1** y **2** con rendimientos óptimos.

En las reacciones de la ruta A, se logró sintetizar el aldehído **6** después de tres etapas sintéticas con un rendimiento global del 52%.

En la reacción de acoplamiento de la ruta B, se consiguió incrementar el rendimiento de la obtención del compuesto **9** hasta el 53% empleando COMU como agente de acoplamiento en lugar de DCC.

La reacción de condensación entre los compuestos **6** y **9** de la ruta C, permitió obtener el compuesto **10** con un rendimiento del 68%.

Por último, el compuesto de referencia **1** y el precursor **2** se obtuvieron con rendimientos moderados del 45% y 33%, respectivamente. Estos rendimientos aún pueden ser mejorados y para ello se continúan ensayando nuevas condiciones de reacción.

Las radiosíntesis para preparar el compuesto [<sup>18</sup>F]-**1** y evaluar su potencial como agente de imagen PET están siendo realizadas en este momento.

## *Bibliografía*

1. Purves D, editor. Neuroscience. 5th ed. Sunderland, Mass: Sinauer Associates; 2012. 1 p.
2. World Health Organization. Dementia. 15/03/2023 [Internet]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
3. Williams DR. Tauopathies: classification and clinical update on neurodegenerative diseases associated with microtubule-associated protein tau. Intern Med J. octubre de 2006;36(10):652-60.
4. Holtzman DM, Morris JC, Goate AM. Alzheimer's Disease: The Challenge of the Second Century. Sci Transl Med [Internet]. 6 de abril de 2011 [citado 16 de julio de 2023];3(77). Disponible en: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3002369>
5. Ballatore C, Lee VMY, Trojanowski JQ. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. Nat Rev Neurosci. septiembre de 2007;8(9):663-72.
6. Braak H, Del Tredici K. The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. Acta Neuropathol (Berl). febrero de 2011;121(2):171-81.
7. Goedert M, Spillantini MG. Tau gene mutations and neurodegeneration. O'Neill C, Anderton B, editores. Biochem Soc Symp. 1 de febrero de 2001;67:59-71.
8. Mandelkow EM, Mandelkow E. Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. Cold Spring Harb Perspect Med. julio de 2012;2(7):a006247.
9. Gao YL, Wang N, Sun FR, Cao XP, Zhang W, Yu JT. Tau in neurodegenerative disease. Ann Transl Med. mayo de 2018;6(10):175-175.
10. Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. Nature. junio de 1998;393(6686):702-5.
11. Medina M, Hernández F, Avila J. New Features about Tau Function and Dysfunction. Biomolecules. 19 de abril de 2016;6(2):21.

12. Iqbal K, Liu F, Gong CX, Grundke-Iqbal I. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr Alzheimer Res.* diciembre de 2010;7(8):656-64.
13. Andreadis A. Tau splicing and the intricacies of dementia. *J Cell Physiol.* marzo de 2012;227(3):1220-5.
14. Martin L, Latypova X, Terro F. Post-translational modifications of tau protein: Implications for Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* marzo de 2011;58(4):458-71.
15. Guerrero-Muñoz MJ, Gerson J, Castillo-Carranza DL. Tau Oligomers: The Toxic Player at Synapses in Alzheimer's Disease. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:464.
16. Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev.* abril de 2004;84(2):361-84.
17. Wang Y, Mandelkow E. Tau in physiology and pathology. *Nat Rev Neurosci.* enero de 2016;17(1):5-21.
18. Lee VMY, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative Tauopathies. *Annu Rev Neurosci.* marzo de 2001;24(1):1121-59.
19. Zilka N, Kazmerova Z, Jadhav S, Neradil P, Madari A, Obetkova D, et al. Who fans the flames of Alzheimer's disease brains? Misfolded tau on the crossroad of neurodegenerative and inflammatory pathways. *J Neuroinflammation.* 7 de marzo de 2012;9:47.
20. Hanger DP, Anderton BH, Noble W. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med.* marzo de 2009;15(3):112-9.
21. Hb A, Rm A, Ca C, Sg J. Alzheimer's Disease: Intracellular Beta Amyloid Completes the Irreversible Pathway from Spirochetes to Biofilms to Beta Amyloid to Hyperphosphorylated Tau Protein. *J Neuroinfectious Dis* [Internet]. 2018 [citado 15 de julio de 2023];09(02). Disponible en: <https://www.omicsonline.org/open-access/alzheimer8217s-diseaseintracellular-beta-amyloid-completes-the-irreversible-pathway-from-spirochetes-to-biofilms-to-beta-amyloid-t-2314-7326-1000276-100984.html>

22. Ittner LM, Götz J. Amyloid- $\beta$  and tau — a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* febrero de 2011;12(2):67-72.
23. Meyer JH, Cervenka S, Kim MJ, Kreisl WC, Henter ID, Innis RB. Neuroinflammation in psychiatric disorders: PET imaging and promising new targets. *Lancet Psychiatry.* diciembre de 2020;7(12):1064-74.
24. Jacobson O, Kiesewetter DO, Chen X. Fluorine-18 Radiochemistry, Labeling Strategies and Synthetic Routes. *Bioconjug Chem.* 21 de enero de 2015;26(1):1-18.
25. Czernin J, Allen-Auerbach M, Nathanson D, Herrmann K. PET/CT in Oncology: Current Status and Perspectives. *Curr Radiol Rep.* 2013;1(3):177-90.
26. Townsend DW, Beyer T. A combined PET/CT scanner: the path to true image fusion. *Br J Radiol.* noviembre de 2002;75 Spec No:S24-30.
27. Roscales García S. Nuevos aspectos de las reacciones de los ácidos borónicos: de la catálisis metálica a la catálisis orgánica [Internet]. [Madrid, Spain]: Universidad Complutense de Madrid; 2015. Disponible en: <https://docta.ucm.es/handle/20.500.14352/25922>
28. Pichler BJ, Kolb A, Nägele T, Schlemmer HP. PET/MRI: paving the way for the next generation of clinical multimodality imaging applications. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* marzo de 2010;51(3):333-6.
29. Zaidi H, Del Guerra A. An outlook on future design of hybrid PET/MRI systems. *Med Phys.* octubre de 2011;38(10):5667-89.
30. Cherry SR, Sorenson JA, Phelps ME. *Physics in nuclear medicine.* 4th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2012. 523 p.
31. Li Z, Conti PS. Radiopharmaceutical chemistry for positron emission tomography. *Adv Drug Deliv Rev.* 30 de agosto de 2010;62(11):1031-51.
32. Deng X, Rong J, Wang L, Vasdev N, Zhang L, Josephson L, et al. Chemistry for Positron Emission Tomography: Recent Advances in  $^{11}\text{C}$ -,  $^{18}\text{F}$ -,  $^{13}\text{N}$ -, and  $^{15}\text{O}$ -Labeling Reactions. *Angew Chem Int Ed.* 25 de febrero de 2019;58(9):2580-605.

33. Chien DT, Szardenings AK, Bahri S, Walsh JC, Mu F, Xia C, et al. Early Clinical PET Imaging Results with the Novel PHF-Tau Radioligand [F18]-T808. *J Alzheimers Dis.* 29 de octubre de 2013;38(1):171-84.
34. GANLEY CJ. CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH: TAUVID™ (flortaucipir F 18 injection), for intravenous use [Internet]. 2020. Disponible en: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2020/212123Orig1s000lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2020/212123Orig1s000lbl.pdf)
35. Zhang W, Arteaga J, Cashion DK, Chen G, Gangadharmath U, Gomez LF, et al. A Highly Selective and Specific PET Tracer for Imaging of Tau Pathologies. *J Alzheimers Dis.* 22 de agosto de 2012;31(3):601-12.
36. Okamura N, Harada R, Ishiki A, Kikuchi A, Nakamura T, Kudo Y. The development and validation of tau PET tracers: current status and future directions. *Clin Transl Imaging.* agosto de 2018;6(4):305-16.
37. González Fuente AM. Síntesis y evaluación de ligandos tau-selectivos basados en estructuras de oxindol como potenciales agentes de imagen PET para diagnóstico in vivo de la Enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías [Internet]. [Madrid, Spain]: Universidad Complutense de Madrid; 2021. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/73065/>
38. Petukh M, Stefl S, Alexov E. The Role of Protonation States in Ligand-Receptor Recognition and Binding. *Curr Pharm Des.* 1 de mayo de 2013;19(23):4182-90.
39. Larsen J, Martin D, Byrne M. Recent Advances in Delivery Through the Blood-Brain Barrier. *Curr Top Med Chem.* 29 de marzo de 2014;14(9):1148-60.
40. Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease. *Ann Neurol.* noviembre de 2012;72(5):648-72.
41. Wehrstedt KD, Wandrey PA, Heitkamp D. Explosive properties of 1-hydroxybenzotriazoles. *J Hazard Mater.* 11 de noviembre de 2005;126(1-3):1-7.
42. El-Faham A, Subirós Funosas R, Prohens R, Albericio F. COMU: a safer and more effective replacement for benzotriazole-based uronium coupling reagents. *Chem Weinh Bergstr Ger.* 21 de septiembre de 2009;15(37):9404-16.

43. El-Faham A, Albericio F. COMU: a third generation of uronium-type coupling reagents. *J Pept Sci Off Publ Eur Pept Soc.* enero de 2010;16(1):6-9.