

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201891726 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2018.12.28

(22) Дата подачи заявки
2017.02.01

(51) Int. Cl. *A61K 51/04* (2006.01)
C07B 59/00 (2006.01)
C07D 401/14 (2006.01)
A61K 101/02 (2006.01)

(54) ЛИГАНДЫ ДЛЯ ПЕТ-ВИЗУАЛИЗАЦИИ ТАУ-БЕЛКОВ

(31) 16154123.0; 16161466.4; 16183009.6;
16186603.3

(32) 2016.02.03; 2016.03.21; 2016.08.05;
2016.08.31

(33) EP

(86) PCT/EP2017/052143

(87) WO 2017/134098 2017.08.10

(71) Заявитель:
ЯНССЕН ФАРМАЦЕВТИКА НВ (BE)

(72) Изобретатель:
Мухарс Дидерик Виллем Элизабет,
Ромбаутс Фредерик Ян Рита, Ленартс
Йозеф Элизабет (BE), Андрес-Хиль
Хосе Игнасио (ES), Фиренс Катлен,
Чупахин Владимир, Борман Ги
Мориц Р., Деклерк Ливен Денис
Гервиг (BE), Колб Хартмут, Чжан Вэй
(US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к новым селективным, меченным радиоактивным изотопом лигандам тау-белков, которые являются пригодными для визуализации и количественного определения агрегатов тау-белков с применением позитронно-эмиссионной томографии (PET). Настоящее изобретение также направлено на композиции, содержащие такие соединения, на способы получения таких соединений и композиций, на применение таких соединений и композиций для визуализации ткани или субъекта, *in vitro* или *in vivo*, и на предшественники указанных соединений.

A1

201891726

201891726

A1

ЛИГАНДЫ ДЛЯ PET-ВИЗУАЛИЗАЦИИ ТАУ-БЕЛКОВ**ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение относится к новым селективным, меченым радиоактивным изотопом лигандам тау-белков, которые являются пригодными для визуализации и количественного определения агрегатов тау-белков с применением позитронно-эмиссионной томографии (PET). Настоящее изобретение также направлено на композиции, содержащие такие соединения, на способы получения таких соединений и композиций, на применение таких соединений и композиций для визуализации ткани или субъекта, *in vitro* или *in vivo*, и на предшественники указанных соединений.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Болезнь Альцгеймера (AD) представляет собой нейродегенеративное заболевание, связанное со старением. Пациенты с AD страдают от нарушений познавательной способности и потери памяти, а также от поведенческих проблем, таких как тревожность. У более чем 90% пораженных AD выявлена спорадическая форма расстройства, в то время как в менее 10% случаев наблюдается семейный или наследственный характер. В Соединенных Штатах приблизительно один из десяти людей в возрасте 65 лет имеет AD, а в возрасте 85 лет один из каждых двух индивидуумов поражен AD. Ожидаемая средняя продолжительность жизни с момента первоначального диагноза составляет 7-10 лет, и пациенты с AD нуждаются во всестороннем уходе, осуществляемом либо в доме престарелых, либо осуществляемом членами семьи. Учитывая рост количества пожилых людей среди населения, AD представляет собой растущую медицинскую проблему. С помощью доступных в настоящее время видов терапии в отношении AD лечат только симптомы заболевания, но не лежащую в основе патологию, обуславливающую заболевание.

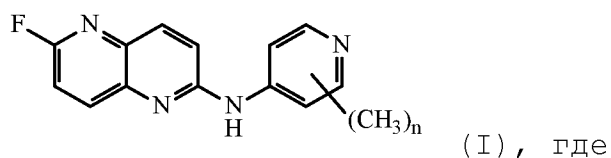
Отличительными патологическими признаками в головном мозге пациентов с AD являются нейрофибриллярные клубки, которые возникают из-за агрегатов гиперфосфорилированного тау-белка и

амилоидных бляшек, которые образуются путем агрегации пептида бета-амилоида. Хотя наиболее распространенное нейродегенеративное расстройство представляет собой AD, агрегированный тау-белок также является характерным для других нейродегенеративных заболеваний, известных как "таупатии", которые также, но не исключительно включают деменцию, характеризующуюся только клубками (TD), заболевание, характеризующееся появлением аргирофильных зерен (AGD), прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кортикобазальную дегенерацию (CBD), болезнь Пика (PiD) и лобно-височную деменцию и паркинсонизм, связанные с хромосомой 17 (FTDP-17). Гетерогенность данных расстройств тесно связана с широким диапазоном изоформ и посттрансляционных модификаций тау у человека. Ультраструктура агрегатов тау-белков может выглядеть как спаренные спиральные филаменты (PHF), прямые филаменты (SF), произвольным образом свернутые филаменты (RCF) или перекрученные филаменты (TF); данная вариабельность преобразовывается в полиморфизм. Была выявлена корреляция нейрофибриллярных клубков с уровнем когнитивного нарушения при AD и/или шансом развития AD. Однако диагноз все еще можно поставить только после вскрытия с помощью биопсии/аутопсии. В исследовании на основании анамнеза и статистического тестирования памяти требуется четкое доказательство нарушения или деменции, и оно часто является неточным или нечувствительным, при этом измерение A β -пептидов и общего количества тау-белков в спинно-мозговой жидкости с помощью люмбальной пункции является инвазивным и подвержено нежелательным эффектам. Помимо собственной сложности AD, разработке средств для лечения препятствует недостаток надежных инструментов для ранней постановки диагноза, определения стадии и точного контроля за прогрессированием заболевания. Следовательно, все еще существует потребность в определении средств для постановки диагноза и/или контроля за прогрессированием заболевания. Визуализация агрегатов тау-белков может обеспечивать такие способы, в частности, при возникновении способов терапии в отношении тау-белков.

Позитронно-эмиссионная томография (PET) представляет собой неинвазивную методику визуализации, которая предлагает наивысшее пространственное и временное разрешение среди всех методик радионуклидной визуализации и обладает дополнительным преимуществом, заключающимся в том, что она может обеспечивать возможность правильного количественного определения концентраций меток в тканях. В ней для обнаружения применяются позитронно-активные радионуклиды. До настоящего времени было заявлено несколько радиоактивных меток для позитронно-эмиссионной томографии для визуализации агрегатов тау-белков (для обзора см., например, Ariza et al. *J. Med. Chem.* 2015, 58, 4365-4382). Все еще существует потребность в обеспечении селективных, улучшенных радиоактивных меток для позитронно-эмиссионной томографии для визуализация агрегатов тау-белков с надлежащим балансом свойств, включающих без ограничения высокую афинность и селективность в отношении агрегатов тау-белков, обратимое связывание, проницаемость, подходящий фармакокинетический профиль в головном мозге, т. е. быстрое распределение в мозге, быстрый клиренс, минимальное неспецифическое связывание и доступность для синтеза.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Следовательно, целью настоящего изобретения является обеспечение соединений, пригодных в качестве радиоактивных меток для PET тау-белков. Следовательно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к соединению, характеризующемуся формулой (I),

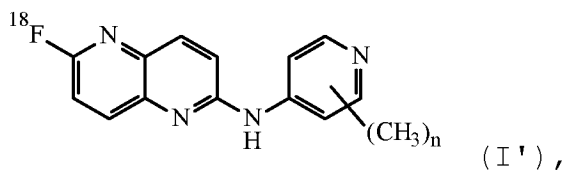


по меньшей мере один атом является радиоактивным, и где метильный заместитель, если он присутствует, соединен с любым доступным атомом углерода в пиридинском кольце, и n равняется 0 или 1,

или к его фармацевтически приемлемой соли или сольвату.

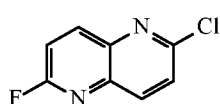
В частности, настоящее изобретение относится к соединению

формулы (I'),

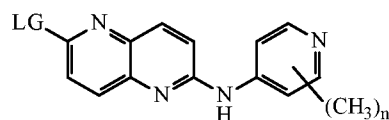


где метильный заместитель, если он присутствует, соединен с любым доступным атомом углерода в пиридинском кольце, и n равняется 0 или 1, или к его фармацевтически приемлемой соли или сольвату.

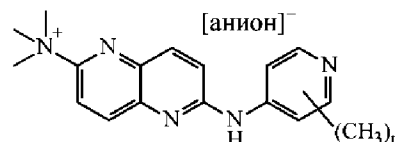
В другом аспекте настоящее изобретение относится к соединениям-предшественникам для синтеза соединений формулы (I) или (I'), определенным ранее. Таким образом, настоящее изобретение также относится к соединению формул (I-3), (I-A) и (P-1),



(I-3)



(I-A)



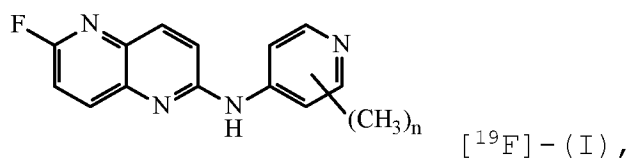
(P-1)

где, если он присутствует, метильный заместитель соединен с любым доступным атомом углерода в пиридинском кольце, LG представляет собой подходящую уходящую группу, и [анион]⁻ представляет собой подходящий анионный противоион, или к его фармацевтически приемлемой соли или сольвату.

Подходящие уходящие группы представляют собой группы, которые можно заменить на ¹⁸F и можно выбрать из группы, состоящей из триметиламмония, хлора, брома, нитро и 4-метилбензолсульфоната (тозилата). Подходящие анионные противоионы включают трифторацетат (⁻[OC(O)CF₃]⁻), органический сульфонат (например, C₁₋₄алкилсульфонат или фенилсульфонат, где фенил может быть необязательно замещен C₁₋₄алкилом, галогеном, или нитрогруппой) и тартрат. Конкретные примеры C₁₋₄алкилсульфоната включают метансульфонат (месилат) и этансульфонат, и конкретные примеры фенилсульфоната включают бензолсульфонат, 4-метилбензолсульфонат (тозилат), 4-бромбензолсульфонат и 4-нитробензолсульфонат. В частности, анионный противоион выбран из трифторацетата (⁻[OC(O)CF₃]⁻),

тозилата и мезилата.

Настоящее изобретение также относится к эталонным материалам соединений формулы (I), соответствующих аналогичным не меченным радиоактивным изотопом соединениям, в данном документе называемым соединениями формулы $[^{19}\text{F}]-(\text{I})$,



где метильный заместитель, если он присутствует, соединен с любым доступным атомом углерода в пиридинском кольце, и n равняется 0 или 1, и к их фармацевтически приемлемым солям и сольватам.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В частности, указанная фармацевтическая композиция представляет собой диагностическую фармацевтическую композицию. Указанная фармацевтическая композиция представляет собой, в частности, стерильный раствор. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением иллюстративным является стерильный раствор, содержащий соединение формулы (I), описанное в данном документе.

Настоящее изобретение дополнительно относится к применению соединения формулы (I) в качестве средства визуализации. В качестве примера настоящего изобретения представлено применение соединения формулы (I), описанного в настоящем документе, для визуализации ткани или субъекта *in vitro* или *in vivo*, или способ такой визуализации.

В частности, настоящее изобретение относится к соединению формулы (I) для применения для связывания и визуализации агрегатов тау-белков у пациентов, страдающих таупатией или предположительно страдающих ей. Конкретные таупатии представляют собой, например, болезнь Альцгеймера, деменцию, характеризующуюся только клубками (TD), заболевание, характеризующееся появлением аргирофильных зерен (AGD),

прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кортикобазальную дегенерацию (CBD), болезнь Пика (PiD) и лобно-височную деменцию и паркинсонизм, связанные с хромосомой 17 (FTDP-17). В частности, таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера.

Настоящее изобретение дополнительно относится к соединению формулы (I) для диагностической визуализации агрегатов тау-белков в головном мозге субъекта и к применению соединения формулы (I) для связывания и визуализации агрегатов тау-белков у пациентов, страдающих таупатией или предположительно страдающих ей. Конкретные таупатии представляют собой, например, болезнь Альцгеймера, деменцию, характеризующуюся только клубками (TD), заболевание, характеризующееся появлением аргирофильных зерен (AGD), прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кортикобазальную дегенерацию (CBD), болезнь Пика (PiD) и лобно-височную деменцию и паркинсонизм, связанные с хромосомой 17 (FTDP-17). В частности, таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера.

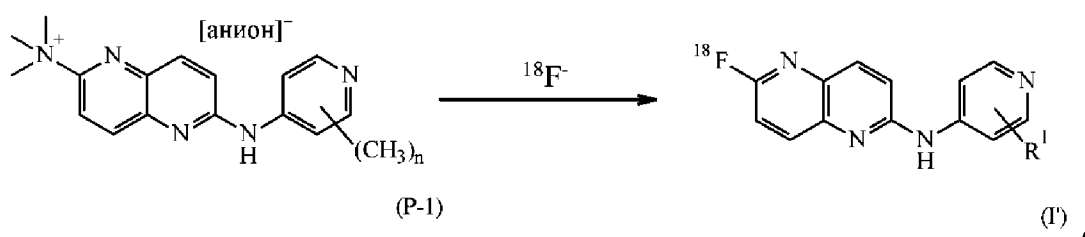
Настоящее изобретение также относится к способу визуализации ткани или субъекта, предусматривающему приведение выявляемого количества меченого соединения формулы (I), описанного в данном документе, в контакт с тканью или субъектом, или его предоставление им, или введение в них, и выявление соединения формулы (I).

Дополнительно в качестве примера настоящего изобретения представлен способ визуализации ткани или субъекта, предусматривающий приведение соединения формулы (I), описанного в данном документе, в контакт с тканью или субъектом или его предоставление им, и визуализацию ткани или субъекта с помощью системы визуализации с применением позитронно-эмиссионной томографии.

Дополнительно настоящее изобретение относится к способу получения соединения формулы (I') или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата, описанных в настоящем документе, предусматривающему (а) стадию осуществления реакции соединения формулы (P-1) или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата, определенных в данном документе, где, в частности,

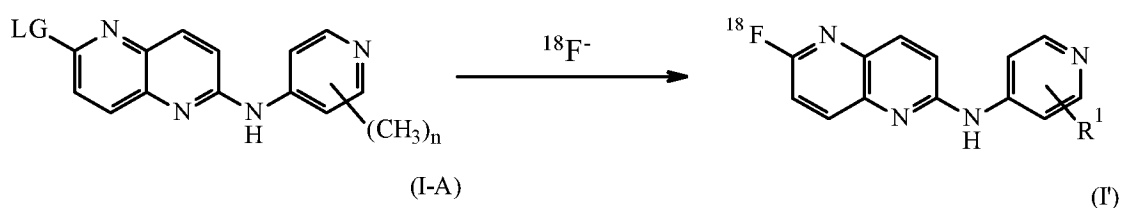
анионный противоион представляет собой трифторацетат, с источником фторида $^{18}\text{F}^-$ в подходящих условиях, или (b) стадию осуществления реакции соединения формулы (I-A) или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата, определенных в данном документе, с источником фторида $^{18}\text{F}^-$ в подходящих условиях. Подходящий источник $^{18}\text{F}^-$ представляет собой, например, 4,7,13,16,21,24-гексаокса-1,10-диазабицикло[8.8.8]гексакозана $[^{18}\text{F}]$ -фторид калия (1:1) (также называемый $[^{18}\text{F}]\text{KF}\cdot\text{K222}$). Подходящие условия включают условия, подходящие для нуклеофильного замещения, известные в уровне техники, например, с применением DMF в качестве растворителя при традиционном нагревании, например, при приблизительно 120°C , в течение периода времени, достаточного для обеспечения осуществления реакции до завершения.

(a)



или

(b)



КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фигуре 1a показаны иммуногистохимические изображения, полученные после инкубирования с антителом AT8 на криосрезе головного мозга человека (AD), смежном со срезом, показанным на фигуре 1b.

На фигуре 1b показаны иммуногистохимические изображения, полученные после инкубирования с антителом 4G8 на криосрезе головного мозга человека (AD).

На фигуре 2 показаны изображения $[^{18}\text{F}]$ соед. № 1, полученные

с помощью авторадииографии, на криосрезе головного мозга человека (AD), смежном со срезом, показанным на фигуре 1b (слева), замещение связанного [^{18}F]соед. № 1 на 1 мкМ [^{19}F]соед. № 1 (в середине), и замещение связанного [^{18}F]соед. № 1 на 1 мкМ [^{19}F]T808 (справа).

На фигуре 3 показаны кривые время-активность, полученные с помощью μPET , для [^{18}F]соед. № 1 (фиг. 3a) и [^{18}F]T807 (фиг. 3b) в целом головном мозге трех самок крыс линии Wistar. Исходное сканирование; эксперимент перед обработкой: холодное соед. № 1 или T807, 10 мг/кг, инъецировали подкожно за 60 мин. до инъекции радиоактивной метки, и исследование слежения за меткой: холодное соед. № 1 или T807, 1 мг/кг, инъецировали внутривенно за 30 мин. до инъекции радиоактивной метки.

На фигуре 4 показано исходное сравнение кривых время-активность, полученных с помощью PET на мелком животном, [^{18}F]соед. № 1 и [^{18}F]T807 в целом головном мозге крысы линии Wistar.

На фигуре 5 показаны кривые время-активность, полученные с помощью PET, для [^{18}F]соед. № 1 (фигура 5a) и [^{18}F]T807 (фигура 5b) в целом головном мозге, в мозолистом теле, в мозжечке и в энторинальной области коры и черепа макака-резуса.

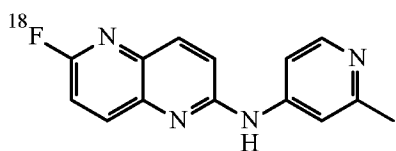
На фигуре 6 показаны кривые средних значений $\% \text{SUV}_{\text{max}}$ в целом головном мозге [^{18}F]соед. № 1 и [^{18}F]T807 у, соответственно, самки и самца макака-резуса.

На фигуре 7 показаны кривые время-активность, полученные с помощью μPET , для [^{18}F]соед. № 1 (фигура 7a) и [^{18}F]T807 (фигура 7b) в целом головном мозге, в мозолистом теле, в мозжечке и в энторинальной области коры и черепа самца макака-резуса.

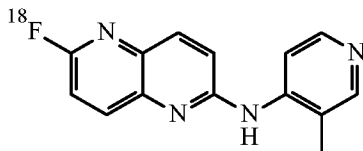
На фигуре 8 показаны кривые средних значений $\% \text{SUV}_{\text{max}}$ в целом головном мозге [^{18}F]соед. № 1 и [^{18}F]T807 у самца макака-резуса.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

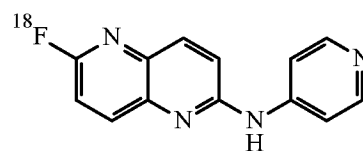
В одном варианте осуществления соединение формулы (I), в частности, формулы (I'), выбрано из соединения 1 (соед. № 1), соединения 2 (соед. № 2) и соединения 3 (соед. № 3):



(соед. № 1),



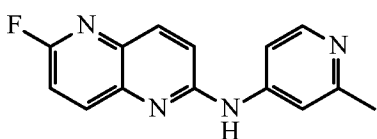
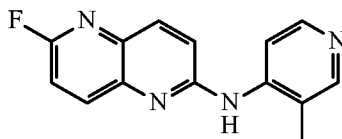
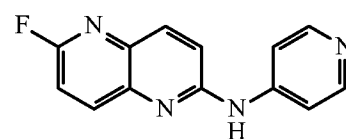
(соед. № 2),



(соед. № 3),

или их фармацевтически приемлемой соли или сольвата.

Настоящее изобретение также относится к эталонным материалам, соответствующим не меченым радиоактивным изотопом соединениям 1, 2 и 3, которые соответствуют [^{19}F]-соединениям

[^{19}F]-соед. № 1),[^{19}F]-соед. № 2),[^{19}F]-соед. № 3),

и их фармацевтически приемлемым солям и сольватам.

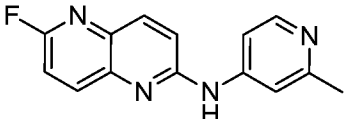
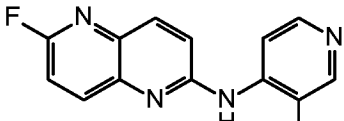
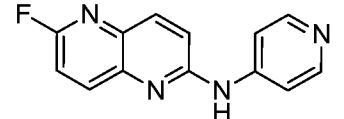
[^{19}F]-соед. № 1 проявило сильное связывание (pIC_{50} 7,7) с выделенным тау-белком человека в анализе замещения радиоактивной меткой с применением тритиевого аналога соединения Т-808 собственного производства (Т-808, также известного как AV-680, CAS [1320211-61-7], 2-[4-(2-фторэтил)-1-пиперидинил]пиримидо[1,2-а]бензимидазол, разработанного Siemens, см. например, *J. Alzheimers Dis.* 2014, 38, 171-184), и который называется в данном документе [^3H]-Т808. К тому же, соед. № 1 не проявило измеряемого связывания с выделенными агрегатами бета-амилоида человека не более 10 мкМ в анализе замещения радиоактивной меткой с применением тритиевого аналога флорбетапира собственного производства (также известного как Amyvid® от Eli Lilly and Co., или AV-45, CAS [956103-76-7], (E)-4-(2-(6-(2-(2-(2-фторэтокси)этокси)этокси)пиридин-3-ил)винил)-N-метилбензоламин, см., например, *J. Nucl. Med.* 2010, 51, 913-920), и который называется в данном документе как [^3H]-AV-45. Описание протоколов представлено далее в данном документе.

[^{19}F]-соед. № 2 проявило сильное связывание (pIC_{50} 7,5) с выделенным тау-белком человека в анализе замещения радиоактивной меткой с применением [^3H]-Т808 и не проявило измеряемого связывания с выделенными агрегатами бета-амилоида человека размером не более 10 мкМ в анализе замещения радиоактивной

меткой с применением [^3H]-AV-45.

[^{19}F]-соед. № 3 проявило сильное связывание (pIC_{50} 7,6) с выделенным тау-белком человека в анализе замещения радиоактивной меткой с применением [^3H]-T808 и не проявило измеряемого связывания с выделенными агрегатами бета-амилоида человека размером не более 10 мкМ в анализе замещения радиоактивной меткой с применением [^3H]-AV-45.

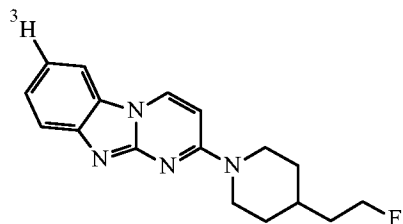
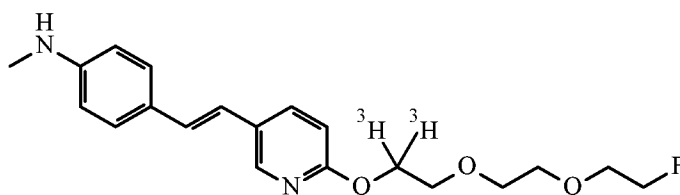
Из значений pIC_{50} можно получить значения K_i с использованием уравнения Ченга-Прусоффа (Cheng Y, Prusoff WH (декабрь 1973 г.) Biochem Pharmacol. 22 (23): 3099-108). Краткое описание результатов связывания для соединений 1 и 2:^{a,b}

№ соед.	Структура	K_i тау- белков (нМ)	K_i А β (нМ)	Селективность (соотношение)
1		$7,9 \pm 2,5$	>4400	>540
2		$13,5 \pm 2,2$	>4400	>325
3		$11,3 \pm 2,8$	>4400	>380

^a Значения K_i представляют собой среднее, полученное из по меньшей мере двух измерений, и приведены со стандартным отклонением. ^b Значения K_i рассчитывали из значений IC_{50} с использованием следующего уравнения: $K_i = \text{IC}_{50} / (1 + (\text{концентрация RL} / K_D \text{ RL}))$, при этом K_D для PHF составляет 6,275 нМ для ^3H -AV680, K_D для А β составляет 7,85 нМ для ^3H -AV45, и концентрация RL составляет 10 нМ в обоих анализах.

[^3H]-T808 получали путем подвергания раствора бромсодержащего предшественника (1 экв.) в метаноле каталитическому тритированию над палладием на углероде (5%) в присутствии диизопропилэтиламина (5 экв.) при комнатной температуре. Бромсодержащий предшественник получали с помощью бромирования T808 с *N*-бромсукцинимидом (1 экв.) в ацетонитриле.

[³H]-AV-45 получали с помощью катализируемого иридием (катализатор Крабтри) тритиевого обмена AV-45, растворенного в дихлорметане.

[³H]-T808[³H]-AV-45

Как уже упоминалось, соединение формулы (I) и композиции, содержащие соединение формулы (I), можно применять для визуализации ткани или субъекта *in vitro* или *in vivo*. В частности, настоящее изобретение относится к способу визуализации или количественного определения агрегатов тау-белков в ткани или у субъекта *in vitro* или *in vivo*.

В частности, способ визуализации тау-белков предусматривает предоставление субъекту, в частности, пациенту, выявляемого количества соединения формулы (I).

Дополнительно настоящее изобретение относится к способу визуализации отложений агрегатов тау-белков, включающему стадии предоставления субъекту выявляемого количества соединения формулы (I), обеспечения времени, достаточного для ассоциации соединения формулы (I) с отложениями агрегатов тау-белков, и выявления соединения, ассоциированного с отложениями агрегатов тау-белков.

Если способ осуществляют *in vivo*, то соединение формулы (I) можно вводить внутривенно, например, путем инъекции с помощью шприца или посредством периферической внутривенной трубки, такой как короткий катетер. Соединение формулы (I) или стерильный раствор, содержащий соединение формулы (I), можно, в частности, вводить путем внутривенного введения в руку в любую различимую вену, в частности, с тыльной стороны кисти руки или в срединную локтевую вену в локтевой области.

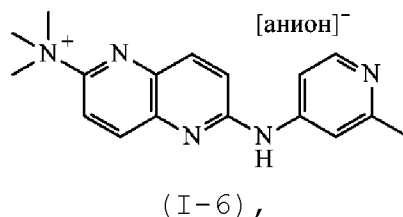
Таким образом, в конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу визуализации субъекта, включающему внутривенное введение соединения формулы (I),

определенного в данном документе, или композиции, в частности, стерильного состава, содержащего соединение формулы (I), субъекту, и визуализацию субъекта с помощью системы визуализации с применением позитронно-эмиссионной томографии.

В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу количественного определения отложений агрегатов тау-белков у субъекта, включающему внутривенное введение соединения формулы (I) или композиции, содержащей соединение формулы (I), субъекту и визуализацию с помощью системы визуализации с применением позитронно-эмиссионной томографии.

Соединение предоставляют субъекту в выявляемом количестве и после истечения времени, достаточного для того, чтобы соединение ассоциировалось с отложениями агрегатов тау-белков, меченое соединение выявляют неинвазивным способом.

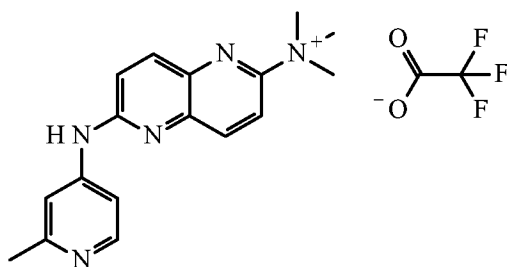
В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению (I-6),



где [анион]⁻ представляет собой подходящий анионный противоион, определенный в данном документе, или к его фармацевтически приемлемой соли или сольвату. В конкретном варианте осуществления анионный противоион выбран из группы, состоящей из трифторацетата

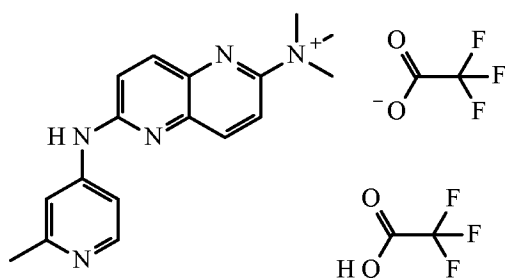
(- [OC(O)CF₃]⁻), органического сульфоната и тартрата, более конкретно, трифторацетата.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению (I-6a),



(I-6a),

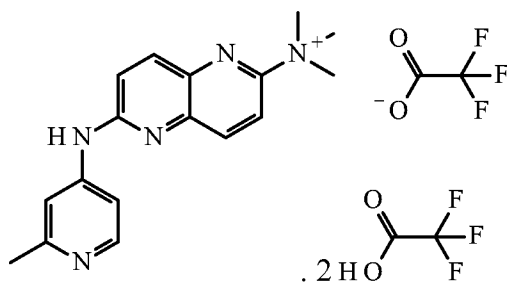
в частности, к его трифторацетатной соли или сольвату, в частности, к его гидрату. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению (I-6b),



(I-6b),

или к его сольвату, в частности, к его гидрату.

В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению формулы (I-6c) или его сольвату, в частности, к его гидрату,



(I-6c).

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Подразумевается, что используемый в данном документе термин "композиция" охватывает продукт, содержащий определенные ингредиенты в определенных количествах, а также любой продукт, который получают прямо или опосредованно из комбинаций определенных ингредиентов в определенных количествах.

Подразумевается, что соли присоединения соединений в

соответствии с настоящим изобретением также охватываются объемом настоящего изобретения.

Приемлемыми солями соединений по настоящему изобретению являются те, в которых противоион является фармацевтически приемлемым. Однако соли кислот и оснований, которые не являются фармацевтически приемлемыми, также могут находить применение, например, при получении или очистке фармацевтически приемлемого соединения. Все соли, независимо от того, являются ли они фармацевтически приемлемыми или нет, включены в объем настоящего изобретения. Фармацевтически приемлемые соли определяют как включающие в себя терапевтически активные нетоксичные формы солей присоединения кислоты, которые могут быть образованы соединениями в соответствии с настоящим изобретением. Указанные соли можно получить путем обработки основной формы соединений в соответствии с настоящим изобретением подходящими кислотами, например, неорганическими кислотами, например, галогенводородной кислотой, в частности, хлористоводородной кислотой, бромистоводородной кислотой, серной кислотой, азотной кислотой и фосфорной кислотой; органическими кислотами, например, уксусной кислотой, гидроксидом уксусной кислоты, пропионовой кислотой, молочной кислотой, пировиноградной кислотой, щавелевой кислотой, малоновой кислотой, янтарной кислотой, малеиновой кислотой, фумаровой кислотой, яблочной кислотой, винной кислотой, лимонной кислотой, метансульфоновой кислотой, этансульфоновой кислотой, бензолсульфоновой кислотой, п-толуолсульфоновой кислотой, цикламовой кислотой, салициловой кислотой, п-аминосалициловой кислотой и памовой кислотой.

И наоборот, упомянутые формы солей можно превратить в форму свободного основания путем обработки соответствующим основанием.

В дополнение, некоторые из соединений по настоящему изобретению могут образовывать сольваты с водой (т. е. гидраты) или обычными органическими растворителями, и подразумевается, что такие сольваты также охватываются объемом настоящего изобретения.

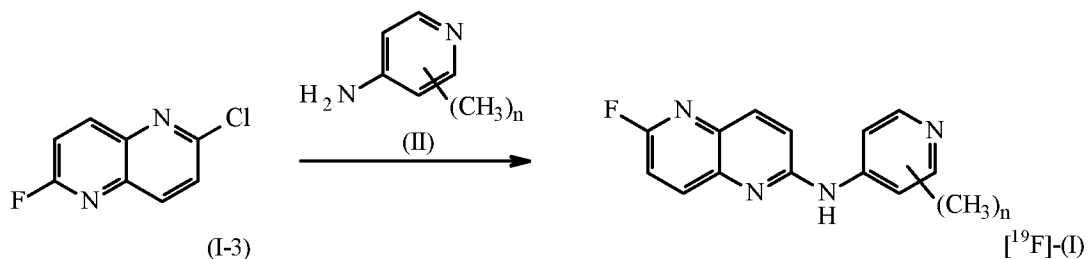
Термин "субъект", используемый в данном документе, относится к человеку, который является или являлся объектом

лечения, наблюдения или эксперимента. Если не указано иное, "субъект" включает людей без симптомов, людей с предсимптомами и пациентов-людей.

ПОЛУЧЕНИЕ

Соединения в соответствии с настоящим изобретением обычно можно получать с помощью последовательности стадий, каждая из которых известна специалисту в данной области техники. В частности, соединения можно получить в соответствии со следующими способами синтеза.

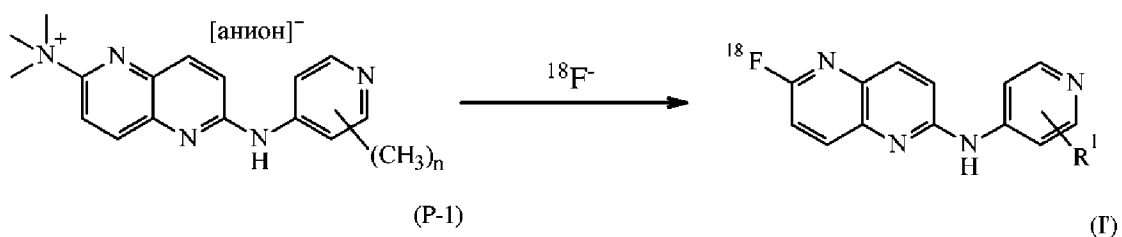
Соединения формулы $[^{19}\text{F}]-(\text{I})$, раскрытые в настоящем документе, можно получать с помощью реакции соединения формулы (I-3), описанного в настоящем документе, с соответствующим соединением формулы (II) на основе 4-аминопиридина, где все переменные представляют собой описанные в данном документе для $[^{19}\text{F}]-(\text{I})$,



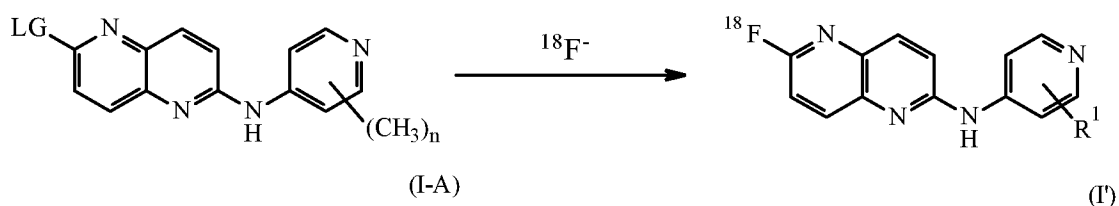
при условиях аминирования по Бухвальду.

Соединения формулы (I'), раскрытые в данном документе, можно получать с помощью реакции соединения формул (P-1) или (I-A), определенных в данном документе, с источником фторида $^{18}\text{F}^-$.

Таким образом, соединение формулы (I') или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, описанные в данном документе, можно получать с помощью реакции соединения формулы (P-1) или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата, определенных в данном документе, где, в частности, анионный противоион представляет собой трифторацетат, с источником фторида $^{18}\text{F}^-$ при подходящих условиях.



В качестве альтернативы, соединение формулы (I') или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, описанные в данном документе, можно получать с помощью реакции соединения формулы (I-A) или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата, определенных в данном документе, с источником фторида $^{18}\text{F}^-$ при подходящих условиях.



Подходящий источник $^{18}\text{F}^-$ представляет собой, например, 4,7,13,16,21,24-гексокса-1,10-диазабицикло[8.8.8]гексакозана $[^{18}\text{F}]$ -фторид калия (1:1) (также называемый $[^{18}\text{F}]\text{KF.K222}$). Подходящие условия включают условия, подходящие для нуклеофильного замещения, известные в уровне техники, например, с применением DMF в качестве растворителя при традиционном нагревании, например, при приблизительно 120°C , в течение периода времени, достаточного для обеспечения осуществления реакции до завершения.

ПУТИ ПРИМЕНЕНИЯ

Соединения в соответствии с настоящим изобретением находят различные пути применения в визуализации тканей или субъекта, как *in vitro*, так и *in vivo*. Таким образом, например, их можно применять для картирования дифференциального распределения отложений агрегатов тау-белков у субъектов разного возраста и пола. Дополнительно они позволяют исследовать дифференциальное распределение отложений агрегатов тау-белков у субъектов, страдающих т различными заболеваниями или расстройствами, в том числе болезнью Альцгеймера, а также другими заболеваниями, обусловленными отложениями агрегатов тау-белков, т. е. другими

таупатиями.

Таким образом, избыточное распределение может быть полезно для постановки диагноза, выявления случаев заболевания, стратификации групп субъектов и при отслеживании прогрессирования заболевания у отдельных субъектов, в частности, если способы терапии в отношении тау-белков, например, антитела, становятся доступными. Поскольку радиоактивный лиганд вводят в следовых количествах, т. е. в выявляемых количествах для PET-визуализации, то терапевтический эффект не может объясняться введением радиоактивных лигандов в соответствии с настоящим изобретением.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

I. ХИМИЯ

Применяемый в данном документе термин "водн." означает водный раствор, "tBuOH" означает трет-бутанол, "DCM" означает дихлорметан, "DIPE" означает диизопропиловый эфир, "DMF" означает *N,N*-диметилформамид, "Et₂O" означает диэтиловый эфир, "EtOAc" означает этилацетат, "ч." означает часы, "HPLC" означает высокоэффективную жидкостную хроматографию, "LCMS" означает жидкостную хроматографию с масс-спектрометрией, "MeOH" означает метанол, "мин." означает минуты, "т. пл." означает температуру плавления, "Pd(OAc)₂" означает ацетат палладия(II), "преп." означает препаративный, "р. см." означает реакционную смесь, "к. т." означает комнатную температуру, "R_t" означает время удерживания (в минутах), "насыщ." означает насыщенный, "раств." означает раствор, "TBAF" означает фторид тетрабутиламмония, "TEA" означает триэтиламин, "TFA" означает трифторуксусную кислоту или трифторацетат в зависимости от контекста, "THF" означает тетрагидрофуран, "XantPhos" означает 4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантен.

Тонкослойную хроматографию (TLC) проводили на пластинах со слоем силикагеля 60 F254 (Merck) с применением химически чистых растворителей. Хроматографию на открытых колонках проводили на силикагеле с размером частиц 230-400 меш и размером пор 60 Å (Merck) в соответствии со стандартными методиками.

Автоматизированную колоночную флеш-хроматографию проводили

с применением готовых к подключению одноразовых картриджей, приобретенных у Grace (картриджи GraceResolv™) или Teledyne ISCO (картриджи RediSep®), на силикагеле с зернами неправильной формы с размером частиц 35–70 мкм на аппарате ISCO CombiFlash или Biotage Isolera™ Spektra.

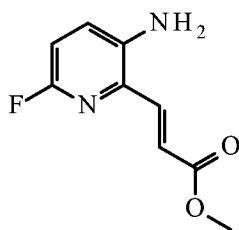
Ядерный магнитный резонанс (ЯМР). Для ряда соединений ^1H -ЯМР-спектры записывали или на спектрометре ЯМР Bruker DPX 360 МГц или на ЯМР Bruker Avance III 400 МГц со стандартными последовательностями импульсов, работающих при 360 МГц и 400 МГц соответственно. Образцы растворяли в $\text{DMSO}-d_6$ или CDCl_3 и переносили в пробирки для ЯМР объемом 5 мм для измерения. Химические сдвиги (δ) указаны в частях на миллион (ppm) для слабопольного сдвига от тетраметилсилана (TMS), который применяли в качестве внутреннего стандарта.

Показатели стехиометрического состава кислоты/основания и/или содержания воды, представленных в данном документе, получены экспериментальным путем и могут отличаться при применении различных аналитических способов. Например, содержание трифторуксусной кислоты (TFA), приведенной в данном документе, определяли с помощью интеграции ^{13}C -ЯМР, элементного анализа и/или ионной хроматографии.

Некоторые способы получения соединений по настоящему изобретению проиллюстрированы в следующих примерах, которые предназначены для иллюстрации, а не ограничения объема настоящего изобретения. Если не указано иное, то все исходные материалы получали от коммерческих поставщиков и применяли без дополнительной очистки.

А. Синтез промежуточных соединений

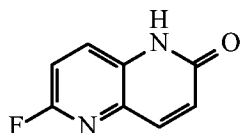
Промежуточное соединение 1



Смесь 2-бром-6-фтор-3-пиридинамина (20 г, 96,33 ммоль),

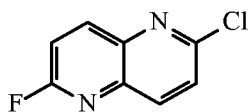
метилакрилата (13,01 мл, 144,50 ммоль), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (2,81 г, 12,52 ммоль), PPh_3 (5,81 г, 22,16 ммоль) и TEA (30,13 мл, 216,75 ммоль) в THF (143 мл) нагревали в закрытой пробирке при 140°C в течение 2 ч. Реакционную смесь охлаждали до к. т. Добавляли NaHCO_3 (насыщ. раств.) и EtOAc и фазы разделяли. Водную фазу экстрагировали еще дважды с помощью EtOAc. Объединенные органические слои высушивали над MgSO_4 , фильтровали и выпаривали. Остаток очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (диоксид кремния; гептан/EtOAc, от 100/0 до 60/40 (сухая загрузка)). Собирали необходимые фракции и растворители выпаривали с получением промежуточного соединения 1 (17,6 г, 93%) в виде оранжевого твердого вещества.

Промежуточное соединение 2

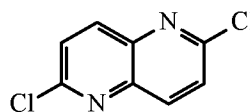


Смесь промежуточного соединения 1 (14,8 г, 75,44 ммоль) и три-*n*-бутилфосфина (18,84 мл, 75,44 ммоль) в AcOH (107,87 мл) нагревали в запечатанной пробирке при 110°C в течение 1 ч. Смесь выпаривали и затем перемешивали в DIPE (500 мл). Твердые вещества отфильтровывали и высушивали под вакуумом при 50°C в течение ночи с получением промежуточного соединения 2 (11,3 г, 91%) в виде желтого твердого вещества.

Промежуточное соединение 3



Промежуточное
соединение 3 (I-3)



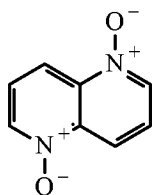
Промежуточное
соединение 3a (I-3a)

Добавляли POCl_3 (1,925 мл, 20,71 ммоль) к суспензии промежуточного соединения 2 (5 г, 20,71 ммоль) в 1,4-диоксане (64,32 мл) и смесь нагревали в пробирке для работы под давлением при 110°C в течение 1 ч. Р. см. выпаривали, поглощали с помощью насыщ. водн. NaHCO_3 , экстрагировали с помощью DCM, высушивали над MgSO_4 и выпаривали. Остаток очищали с помощью колоночной

хроматографии (силикагель; гептан/EtOAc, от 100/0 до 80/20 (сухая загрузка)). Необходимые фракции выпаривали с получением промежуточного соединения 3 (3,36 г, 89%) в виде белого твердого вещества (определено, что образец содержал 13 мол. % промежуточного соединения 3а).

^1H -ЯМР (360 МГц, CDCl_3-d) δ ppm 7,35 (dd, $J=9,1, 2,9$ Гц, 1 Н) 7,65 (d, $J=9,1$ Гц, 1 Н) 8,21 (dd, $J=8,8, 0,7$ Гц, 1 Н) 8,36–8,45 (m, 1 Н).

Промежуточное соединение 4

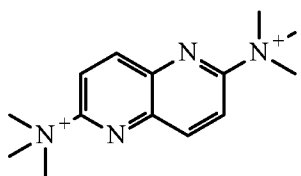


Процедура а. Добавляли 3-хлорпероксибензойную кислоту (70%, 8,33 г, 33,81 ммоль) к раствору 1,5-нафтиридина (2 г, 15,37 ммоль) в DCM (100 мл). Р. см. перемешивали при к. т. в течение 3 ч. Образовывался осадок, но наблюдали только частичное превращение. Добавляли дополнительное количество 3-хлорпероксибензойной кислоты (70%, 4,92 г, 19,98 ммоль) с последующим добавлением метанола (50 мл), в котором растворялись все виды осадка, и продолжали перемешивание в течение ночи. Снова образовывалось твердое вещество, которое фильтровали. Фильтрат концентрировали наполовину, и образовывалось больше осадка, который фильтровали и объединяли с осадком, полученным ранее. Обнаружили, что данное твердое вещество все еще содержит 3-хлорбензойную кислоту, и его растирали с DCM/MeOH (9:1) в течение 1 дня, фильтровали и высушивали *in vacuo* с получением промежуточного соединения 4 (2,18 г, 88%) в виде желтого твердого вещества.

Процедура б. Добавляли 3-хлорпероксибензойную кислоту (164,4 г, 666,9 ммоль) к раствору 1,5-нафтиридина (28,0 г, 215,1 ммоль) в DCM (1,4 л) и MeOH (0,7 л). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 3 ч. Добавляли дополнительное количество 3-хлорпероксибензойной кислоты (53,0 г, 215,1 ммоль) и продолжали перемешивание в течение 72 ч. Образовывалось

твердое вещество, которое фильтровали. Фильтрат концентрировали наполовину, и образовывалось больше осадка, который фильтровали и объединяли с осадком, полученным ранее. Данное твердое вещество растирали с DCM/MeOH (9:1), фильтровали и высушивали *in vacuo* с получением промежуточного соединения 4 (28,0 г, 172,7 ммоль, 80%) в виде желтого твердого вещества.

Промежуточное соединение 5



. 2 TFA⁻

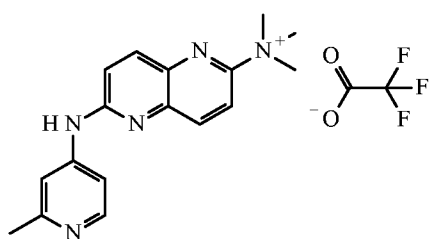
Процедура а. К перемешиваемому раствору промежуточного соединения 4 (1 г, 6,17 ммоль) и триметиламина (1 М в THF, 37,02 мл, 37,02 ммоль) в DCM (50 мл) добавляли трифторуксусный ангидрид (2,57 мл, 18,50 ммоль) при 0°C. Смесь перемешивали при к. т. и после завершения (приблизительно через 30 мин.) добавляли Et₂O (50 мл) и продолжали перемешивание в течение 1 ч. Соли белого цвета выделяли с помощью фильтрования, промывали с помощью Et₂O и высушивали *in vacuo* в течение ночи с получением промежуточного соединения 5: триметиламин.TFA, 40:60 (3,4 г).

Процедура б. К перемешиваемому раствору промежуточного соединения 4 (1 г, 6,17 ммоль) и триметиламина (1 М в THF, 30,84 мл, 30,84 ммоль) в DCM (59,3 мл) добавляли трифторуксусный ангидрид (2,57 мл, 18,50 ммоль) при 0°C. Смесь перемешивали при к. т. в течение 1 ч. Добавляли Et₂O (50 мл) и продолжали перемешивание в течение 1 ч., белое твердое вещество выделяли с помощью фильтрования, промывали с помощью Et₂O и высушивали *in vacuo* в течение ночи с получением промежуточного соединения 5 (1,83 г, чистота 93%, 63%) в виде белого твердого вещества.

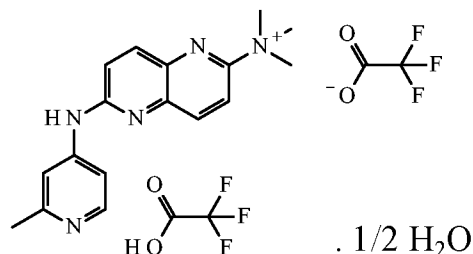
Процедура с. Добавляли трифторуксусный ангидрид (69,5 мл, 499,5 ммоль) к перемешиваемому раствору промежуточного соединения 4 (27,0 г, 166,5 ммоль) и триметиламина (1 М в THF, 0,85 л, 850 ммоль) в DCM (1,35 л) при 0°C. Смесь перемешивали при к. т. После завершения (приблизительно 30 мин.) добавляли Et₂O (1 л) и продолжали перемешивание в течение 1 ч. Соли белого цвета

выделяли с помощью фильтрования, промывали с помощью Et₂O и высушивали in vacuo в течение ночи с получением промежуточного соединения 5 (68 г, 144,0 ммоль, 86%).

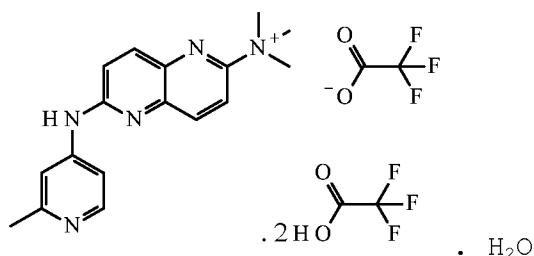
Промежуточное соединение 6a, промежуточное соединение 6b и промежуточное соединение 6c



Промежуточное соединение 6a (I-6a)



Промежуточное соединение 6b (I-6b). 1/2 H₂O



Промежуточное соединение 6c (I-6c). H₂O

Процедура а. Добавляли NaN (60% дисперсия в минеральном масле, 0,614 г, 15,34 ммоль) к смеси промежуточного соединения 5 (полученного при процедуре а: чистота 40%, содержит 60% трифторацетата триметиламмония; 1,58 г, 2,56 ммоль) и 4-амино-2-метилпиридина (0,277 г, 2,56 ммоль) в сухом DMF (на молекулярных ситах, 25,24 мл) при 0°C. Полученную смесь перемешивали в течение 20 мин. (образуется красный цвет) при медленном нагревании до к. т. Добавляли силикагель и воду (5 мл), растворитель выпаривали до сухого состояния и загружали во флэш-колонку (24 г диоксида кремния) и элюировали с помощью 10% MeOH в DCM. Фракции продукта выпаривали с получением 426 мг неочищенного вещества, которое снова очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии на 24 г диоксида кремния и элюировали с помощью 10% MeOH в DCM. Выпаривание фракций продукта приводило к получению промежуточного соединения 6a (трифторацетатная соль, 318 мг, 27%, чистота 90%; 38 мг, чистота 96%) в виде желтого клейкого

твёрдого вещества.

^1H -ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 2,60 (s, 3 H) 3,71 (s, 9 H) 7,66 (d, $J=9,2$ Гц, 1 H) 8,06 (dd, $J=6,2, 1,8$ Гц, 1 H) 8,19 (s, 1 H) 8,37 (d, $J=9,2$ Гц, 1 H) 8,43 (d, $J=9,2$ Гц, 1 H) 8,45 (d, $J=6,4$ Гц, 1 H) 8,71 (d, $J=9,2$ Гц, 1 H) 11,13 (br s, 1 H). ^{13}C -ЯМР (101 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 21,81 (s, 1 C), 38,30 (s, 1 C), 54,68 (s, 1 C), 69,84 (s, 1 C), 111,06 (s, 1 C), 112,30 (s, 1 C), 116,31 (s, 1 C), 120,28 (s, 1 C), 135,80 (s, 1 C), 137,62 (s, 1 C), 138,24 (s, 1 C), 139,64 (s, 1 C), 142,01 (s, 1 C), 144,98 (s, 1 C), 150,39 (s, 1 C), 153,17 (s, 1 C), 154,79 (s, 1 C), 155,52 (s, 1 C), 158,15 (s, 1 C), 161,13 (s, 1 C). Кроме того, квинтет при δ ppm 157,99 ($J=33$ Гц) и 117,44 ($J=301$ Гц) подтвердил присутствие CF_3CO_2^- в качестве противоиона.

Процедура b. Данную реакцию осуществляли в двух отдельных партиях, которые объединяли и обрабатывали вместе:

Партия 1. Добавляли NaN (3,81 г, 356 ммоль, 60% дисперсия в минеральном масле) к смеси промежуточного соединения 5, полученного в соответствии с процедурой с (15,0 г, 31,8 ммоль), и 4-амино-2-метилпиридина (3,43 г, 31,8 ммоль) в DMF (313 мл, высушенный на молекулярных ситах) при 0°C . Полученную смесь перемешивали в течение 20 мин. (образуется красный цвет) при медленном нагревании до к. т. Растворитель выпаривали до сухого состояния и снова растворяли в EtOAc (200 мл) и воде (20 мл).

Партия 2. Добавляли NaN (14,22 г, 356 ммоль, 60% дисперсия в минеральном масле) к смеси промежуточного соединения 5 (56,0 г, 119 ммоль) и 4-амино-2-метилпиридина (12,8 г, 119 ммоль) в DMF (1170 мл, высушенный на молекулярных ситах) при 0°C . Полученную смесь перемешивали в течение 20 мин. (образуется красный цвет) при медленном нагревании до к. т. Растворитель выпаривали до сухого состояния и снова растворяли в EtOAc (600 мл) и воде (60 мл).

Оба раствора объединяли, после чего растворитель снова выпаривали с получением желтого твёрдого вещества, которое очищали с помощью преп. HPLC (неподвижная фаза: Uptisphere C18 ODB - 10 мкм, 200 г, 5 см, подвижная фаза: 0,1% раствор TFA в

воде+5% MeOH). Фракции RP-HPLC выпаривали до сухого состояния. Добавляли эфир к полученному в результате маслу и медленно выпаривали с помощью ротационного выпаривания (повторяли три раза), что приводило к образованию желтых кристаллов. Данные кристаллы растирали с эфиром в течение ночи до получения мелкодисперсного порошка, который фильтровали, снова промывали эфиром и высушивали в течение ночи *in vacuo* при 55°C и затем в течение 24 ч. в лиофилизаторе при к. т. с получением промежуточного соединения 6b (двойная соль TFA и полугидрат в соответствии с элементным анализом, 12,3 г, 23,2 ммоль) в виде желтого твердого вещества.

^1H -ЯМР (600 МГц, DMSO- d_6 +C $_6$ D $_6$, 61°C) δ ppm 2,65 (s, 3 H), 3,71 (s, 9 H), 7,82 (d, $J=9,1$ Гц, 1 H), 8,30 (br d, $J=5,1$ Гц, 1 H), 8,36 (d, $J=9,1$ Гц, 1 H), 8,40 (s, 1 H), 8,45 (d, $J=9,2$ Гц, 1 H), 8,52 (d, $J=6,7$ Гц, 1 H), 8,69 (d, $J=9,2$ Гц, 1 H), 11,68 (br s, 1 H).

Процедура с. Добавляли NaN (60% дисперсия в минеральном масле, 4,92 г, 122,98 ммоль) к смеси промежуточного соединения 5 (полученного при процедуре b: чистота 93%, 9,68 г, 20,50 ммоль) и 4-амино-2-метилпиридина (2,22 г, 20,50 ммоль) в DMF (высушенный на молекулярных ситах,

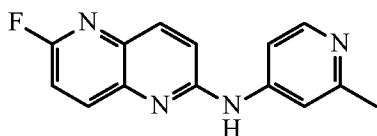
202,3 мл) при 0°C. Полученную смесь перемешивали в течение 20 мин. (образовывался красный цвет) при медленном нагревании до к. т. Растворитель выпаривали до сухого состояния, остаток растворяли в EtOAc, затем добавляли воду и смесь выпаривали с получением промежуточного соединения 6 в виде желтого твердого вещества, которое очищали посредством преп. HPLC (неподвижная фаза: Uptisphere C18 ODB - 10 мкм, 200 г, 5 см, подвижная фаза: 0,1% раствор TFA в воде+5% CH $_3$ CN, MeOH) с получением твердого вещества, которое поглощали с помощью Et $_2$ O, фильтровали и затем высушивали *in vacuo* при 40°C в течение ночи с получением промежуточного соединения 6c (тройная соль TFA и моногидрат в соответствии с элементным анализом, 2,4 г, 29%) в виде желтого твердого вещества.

^1H -ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ ppm 2,71 (s, 3 H) 3,71 (s, 9 H)

7,71 (d, $J=9,2$ Гц, 1 H) 8,19 (br d, $J=5,1$ Гц, 1 H) 8,45–8,52 (m, 3 H) 8,55 (d, $J=7,0$ Гц, 1 H) 8,81 (dd, $J=9,2, 0,7$ Гц, 1 H) 11,56 (s, 1 H).

В. Синтез холодных соединений

Соединение [^{19}F]-1



Процедура а. К раствору 2-метил-4-пиридинамина (1,66 г, 15,34 ммоль) в $t\text{BuOH}$ (61,61 мл) добавляли промежуточное соединение 3 (1,66 г, 15,34 ммоль), XantPhos (177,47 мг, 0,31 ммоль), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (68,86 мг, 0,31 ммоль) и Cs_2CO_3 (13,99 г, 42,94 ммоль). Азот барботировали через смесь в течение 5 мин. и затем флакон закрывали и нагревали при 140°C в течение 18 ч. Затем смесь охлаждали до к. т., разбавляли водой и EtOAc и перемешивали, пока не растворялась большая часть твердых веществ. Двухфазную смесь фильтровали через стеклянный фильтр, который прополаскивали с помощью EtOAc и воды. Затем органический слой отделяли и водный слой экстрагировали (3 х) с помощью EtOAc . Объединенные органические слои промывали с помощью солевого раствора и затем высушивали над MgSO_4 , фильтровали и выпаривали.

Очистку проводили посредством препаративной HPLC (неподвижная фаза: RP XBridge Prep C18 OBD-10 мкм, 50×150 мм, подвижная фаза: 0,25% NH_4HCO_3 раствор в воде, MeOH) с получением соединения 1 (915 мг, 24%).

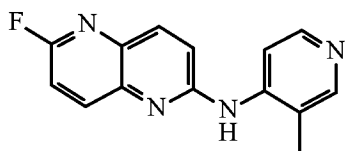
В качестве альтернативы, очистку проводили с помощью колоночной флэш-хроматографии (силикагель; DCM/7 н. NH_3 в MeOH, от 100/0 до 90/10). Фракции продукта собирали и выпаривали до сухого состояния, затем обрабатывали с помощью DIPE и воды и двухфазную смесь перемешивали в течение 2 ч. Полученные в результате кристаллы фильтровали и промывали с помощью DIPE и воды. После высушивания *in vacuo* при 75°C в течение 3 ч. получали соединение [^{19}F]-1 в виде светло-желтых кристаллов.

Процедура б. Добавляли TBAF (1 М в THF, 0,28 мл, 0,28

ммоль) к раствору промежуточного соединения 6a (38 мг, 0,093 ммоль) в DMF (0,93 мл). Полученную смесь перемешивали при 90°C в течение 30 мин. Все летучие вещества выпаривали. Остаток очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии на силикагеле с применением градиента (DCM/7 н. NH₃ в MeOH, от 1:0 до 0:1). Фракции продукта выпаривали с получением соединения [¹⁹F]-1 (15,4 мг, 65%) в виде желтых кристаллов.

¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 2,45 (s, 3 H) 7,39 (d, J=9,2 Гц, 1 H) 7,48 (dd, J=8,9, 2,8 Гц, 1 H) 7,72-7,85 (m, 2 H) 8,10 (d, J=9,0 Гц, 1 H) 8,28 (d, J=5,7 Гц, 1 H) 8,39 (t, J=8,0 Гц, 1 H) 9,97 (s, 1 H).

Соединение [¹⁹F]-2

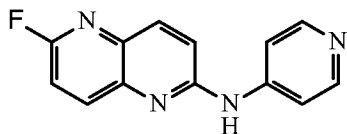


К раствору 3-метилпиридин-4-амин (118,5 мг, 1,1 ммоль) в tBuOH (4,4 мл) добавляли промежуточное соединение 3 (200 мг, 1,1 ммоль), XantPhos (12,68 мг, 0,02 ммоль), Pd(OAc)₂ (4,9 мг, 0,02 ммоль) и трехосновный фосфат калия (651,0 мг, 3,1 ммоль). Азот барботировали через смесь в течение 5 мин. и затем флакон закрывали и нагревали при 140°C в течение 18 ч. Смесь разбавляли водой и EtOAc и перемешивали, пока не растворялась большая часть твердых веществ. Двухфазную смесь фильтровали через стеклянный фильтр, который прополаскивали с помощью EtOAc и воды. Затем органический слой отделяли и водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (3 x). Объединенные органические слои промывали солевым раствором и затем высушивали (MgSO₄), фильтровали и выпаривали. Очистку проводили посредством препаративной HPLC (неподвижная фаза: RP XBridge Prep C18 OBD-10 мкм, 30×150 мм, подвижная фаза: 0,25% раствор NH₄HCO₃ в воде, MeOH), фракции продукта выпаривали с получением твердого вещества, которое повторно растворяли в метаноле и снова выпаривали с получением соединения [¹⁹F]-2 (37 мг (13%).

¹H-ЯМР (360 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 2,32 (s, 3 H) 7,46 (dd,

$J=9,0, 2,7$ Гц, 1 Н) 7,69 (d, $J=9,1$ Гц, 1 Н) 8,12 (d, $J=9,1$ Гц, 1 Н) 8,27-8,34 (m, 3 Н) 8,53 (d, $J=5,9$ Гц, 1 Н) 8,85 (s, 1 Н).

Соединение [^{19}F]-3



К раствору 4-аминопиридина (114,43 мг, 1,22 ммоль) в tBuOH (4,40 мл) добавляли промежуточное соединение 3 (200 мг, 1,10 ммоль), XantPhos (12,68 мг, 0,022 ммоль), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (4,92 мг, 0,022 ммоль) и Cs_2CO_3 (1 г, 3,07 ммоль) и смесь нагревали при 140°C в течение 24 ч. Смесь концентрировали при пониженном давлением, суспендировали в воде, экстрагировали с помощью DCM и EtOAc, высушивали над MgSO_4 , фильтровали и растворители выпаривали. Затем ее очищали с помощью колоночной хроматографии (силикагель, 40 г) с применением градиента DCM/ NH_3 в MeOH (от 1:0 до 95:5) с получением желтого твердого вещества, которое растирали в DIPE и воде, фильтровали и высушивали in vacuo с получением соединения [^{19}F]-3 (46 мг, 17%).

^1H -ЯМР (360 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 7,40 (d, $J=8,9$ Гц, 1 Н) 7,49 (dd, $J=9,0, 2,7$ Гц, 1 Н) 7,94 (d, $J=6,2$ Гц, 2 Н) 8,12 (d, $J=9,1$ Гц, 1 Н) 8,36-8,45 (m, 3 Н) 10,10 (s, 1 Н).

С. Радиохимический синтез

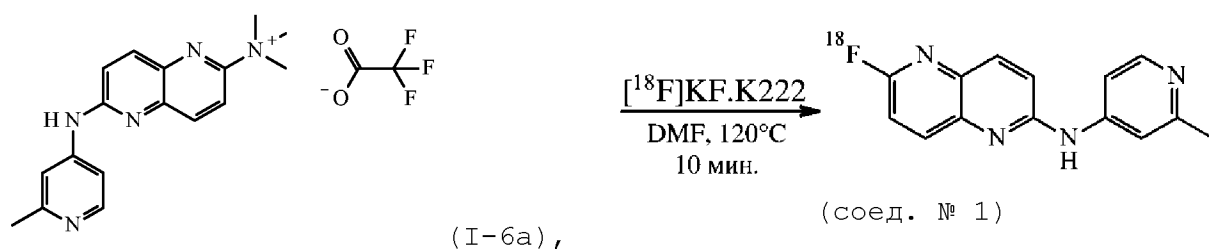
Материалы и способы

Общая информация

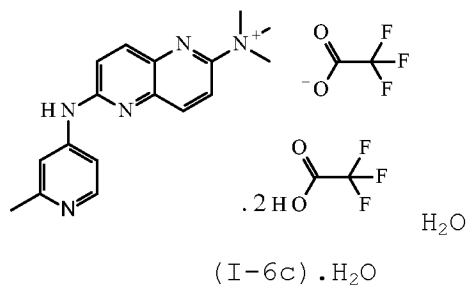
Все химические вещества и реагенты приобретали у коммерческих источников и применяли без дополнительной очистки. Метили [^{18}F]T807 (также известный как AV-1451, CAS [1415379-56-4], 7-(6-фторпиридин-3-ил)-5Н-пиридо[4,3-*b*]индол) радиоактивной меткой в соответствии с ранее описанной процедурой (Declercq, L. et al. *Mol Imaging* **2016**, 14, 1-15). Анализ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) проводили на системе LaChrom Elite HPLC (Hitachi, Дармштадт, Германия), соединенной с детектором УФ-излучения, установленным при 254 нм. Для анализа меченных радиоактивным изотопом соединений элюат

HPLC после пропускания через УФ-детектор проводили через сцинтилляционный детектор с NaI(Tl) размером 3 дюйма, присоединенный к одноканальному анализатору (GABI box; Raytest, Штраубенхардт, Германия). Данные получали и анализировали с применением систем сбора данных GINA Star (Raytest). Количественное определение радиоактивности в образцах для исследований биораспределения (данные не показаны) и радиоактивных метаболитов проводили с применением автоматизированного γ -счетчика, оснащенного кристаллом NaI(Tl) размером 3 дюйма с каналом, соединенным с многоканальным анализатором, помещенного в устройство для смены образцов (Wallac 2480 Wizard 3q, Wallac, Турку, Финляндия). Значения корректировали в отношении фонового излучения, физического затухания и мертвого времени счетчика. Количественные данные выражены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение (SD). Средние значения сравнивали с использованием двустороннего t-критерия Стьюдента. Значения считали статистически значимыми при $P \leq 0,05$. Получали срезы головного мозга человека с AD после вскрытия толщиной 10 мкм (стадии по Брааку V-VI) собственного изготовления (Левенский католический университет, Отделение неврологии, Левен, Бельгия, после одобрения местного комитета по этике). Животных содержали в вентилируемых по отдельности клетках в помещении с регулируемой температурой ($\sim 22^\circ\text{C}$), контролируемой влажностью при цикле свет-темнота 12 ч. - 12 ч., с доступом к пище и воде без ограничений. Все эксперименты на животных проводили в соответствии с Бельгийским сводом правил по уходу и использованию животных после одобрения университетского комитета по этике (Левенский католический университет) в отношении животных.

Введение радиоактивной метки в соедин. № 1 (n=6)



или



Получали фторид-18 ($[^{18}\text{F}]\text{F}^-$) с помощью ядерной реакции $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ на циклотроне Cyclone 18/9 (Ion Beam Applications, Лувэн-ла-Нев, Бельгия) путем облучения 2 мл 97% обогащенного ^{18}O - H_2O (Rotem NYOX18, Rotem Industries, Беэр-Шева, Израиль) протонами 18-MeV. После облучения $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ захватывали в анионообменном картридже SepPak Light Accell plus с четвертичным метиламмонием (QMA) (форма CO_3^{2-} , Waters, Милфорд, Массачусетс, США) и элюировали с помощью смеси Kryptofix 2.2.2 (K-222, 27,86 мг) и K_2CO_3 (2,5 мг) в $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (0,75 мл; 95:5 об./об.). После выпаривания растворителя с помощью потока гелия при 100°C добавляли безводный CH_3CN (1 мл) и дополнительно сушили $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ при тех же условиях.

Раствор 0,5 мг предшественника (I-6a или I-6c, соответственно, моно- или трис-TFA-солей) в 0,3 мл DMF добавляли к высушенному остатку $[^{18}\text{F}]\text{F}^-/\text{K}_2\text{CO}_3/\text{K-222}$ и смесь нагревали при 120°C в течение 10 мин. (традиционное нагревание). Неочищенную смесь для введения радиоактивной метки разбавляли с помощью 0,6 мл препаративного буфера (0,01 М Na_2HPO_4 pH 9,6 и EtOH (65:35 об./об.)) и очищали с применением HPLC с обращенной фазой (RP-HPLC) на колонке XBridge C_{18} (5 мкм, 4,6 мм x 150 мм; Waters, Милфорд, США) с элюированием смесью 0,01 М Na_2HPO_4 pH 9,6 и EtOH (65:35 об./об.) при расходе 0,8 мл/мин. и УФ-детекции при 254 нм. Очищенный раствор с радиоактивной меткой разбавляли физиологическим раствором с получением концентрации этанола, составляющей <10%, подходящей для внутривенной инъекции. Раствор последовательно пропускали через фильтр 0,22 мкм (Millex-GV, Millipore, Биллерика, Массачусетс, США) с получением стерильного продукта. Контроль качества проводили с применением RP-HPLC на

колонке XBridge (C_{18} , 3,5 мкм, 3,0 мм x 100 мм; Waters, Милфорд, США) с элюированием смесью 0,01 М Na_2HPO_4 pH 9,6 и CH_3N (70:30 об./об.) при расходе 0,8 мл/мин. УФ-детекцию проводили при 254 нм.

Получали $[^{18}F]$ соед. № 1 со средним, скорректированным относительно затухания радиохимическим выходом 46% (относительно радиоактивности $[^{18}F]F^-$ на препаративной хроматограмме, $n=6$). Радиохимические выходы были идентичными для бис- и трис-TFA-соли предшественника $[^{18}F]$ соед. № 1. Радиохимическую чистоту исследовали с применением HPLC на аналитической колонке C_{18} , и она составляла более 98%. $[^{18}F]$ соед. № 1 получали на протяжении общего времени синтеза 60 мин. и собирали с конкретной радиоактивностью 65 ± 55 ГБк/мкмоль в конце проведения синтеза (EOS, $n=6$).

$[^{18}F]$ -T807 собирали на протяжении общего времени синтеза 60 мин. со специфической активностью 45 ± 35 ГБк/мкмоль при EOS ($n=4$) и радиохимической чистотой выше 95%.

II. АНАЛИТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

LCMS, общая процедура

Измерения в ходе высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) проводили с применением насоса для LC, детектора на диодной матрице (DAD) или УФ-детектора и колонки, как описано в соответствующих способах. При необходимости включали дополнительные детекторы (см. приведенную ниже таблицу способов).

Поток из колонки направляли в масс-спектрометр (МС), который был оснащен источником ионизации при атмосферном давлении. В компетенции специалиста в данной области находится установка настраиваемых параметров (например, диапазона сканирования, времени выдержки и т. п.) с целью получения ионов, позволяющих определить номинальную моноизотопную молекулярную массу (MW) соединения. Сбор данных проводили с помощью соответствующего программного обеспечения. Соединения описывали по их экспериментальному времени удерживания (R_t) и ионам. Если в таблице данных не указано иное, то указанный молекулярный ион

соответствует $[M+H]^+$ (протонированной молекуле) и/или $[M-H]^-$ (депротонированной молекуле). В случае, если соединение не было непосредственно способно к ионизации, указывают тип аддукта (т. е. $[M+NH_4]^+$, $[M+HCOO]^-$ и пр.). Для молекул со сложными изотопными распределениями (Br, Cl и т. п.) описанное значение является таким значением, которое получено для наименьшей массы изотопа. Все результаты получали с экспериментальными погрешностями, которые обычно связаны с применяемым способом.

Далее в данном документе "SQD" означает одиночный квадрупольный детектор, "MSD" означает масс-селективный детектор, "к. т." означает комнатную температуру, "BEH" означает мостиковый гибрид этилсилексан/диоксид кремния, "DAD" означает детектор на диодной матрице, "HSS" означает диоксид кремния повышенной прочности, "Q-ToF" означает квадрупольные времяпролетные масс-спектрометры, "CLND" означает хемилюминесцентный азотный детектор, "ELSD" означает испарительный детектор светорассеяния.

Таблица 1. Способ LCMS (поток выражен в мл/мин.; температура колонки (Т) в °С; время анализа в минутах)

Прибор	Колонка	Подвижная фаза	Градиент	Расход ----- Т колонки	Время анализа (мин.)
Waters: Acquity® UPLC® - DAD и SQD	Waters: HSS T3 (1,8 мкм, 2,1*100 мм)	A: 10 мМ CH ₃ COONH ₄ в 95% H ₂ O+5% CH ₃ CN B: CH ₃ CN	От 100% А до 5% А за 2,10 мин., до 0% А за 0,90 мин, до 5% А за 0,5 мин.	0,7 ----- 55	3,5

Значения температуры плавления

Значения представляют собой либо максимальные значения, либо диапазоны значений температуры плавления, и их получают с экспериментальными погрешностями, которые обычно связаны с данным аналитическим способом.

Для ряда соединений точки плавления определяли с помощью DSC823e (Mettler-Toledo). Значения температуры плавления

измеряли при градиенте температуры 10°C/минута. Максимальная температура составляла 300°C.

Таблица 2. Аналитические данные

№ соедин.	к. т.	MW (теор.)	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	Т. пл.
I-6a	1,00	294	294		
I-6b	1,06	294	294		
I-3	1,63	182			
1	1,45	254	255	253	246,29
2	1,53	254	255	253	210,65
3	1,42	240	241	239	

III. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Выделение агрегированных тау-белков и амилоидных бляшек из головного мозга человека с AD

Обогащенные фракции агрегированных тау-белков получали в соответствии с немного модифицированной версией протокола, описанного Greenberg and Davies (Greenberg SG, Davies P. A preparation of Alzheimer paired helical filaments that display distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. Proc. Natl. Acad. Sci. 1990; 87: 5827-5831) с использованием ткани головного мозга человека с AD (затылочная кора с высокой загрузкой фибрилл тау-белков). Вкратце, замороженные образцы головного мозга человека с AD (~10 г) гомогенизировали с 10-кратным объемом холодного буфера для гомогенизации (10 mM Триса, 800 mM NaCl, 1 mM EGTA, 10% сахарозы, pH 7,4, содержащего фосфатазу PhosSTOP и ингибитор протеаз cOmplete без EDTA (Roche, Вилворде, Бельгия)) на льду. После центрифугирования при 27000x g в течение 20 мин. при 4°C извлекали надосадочную жидкость и добавляли 1% (вес/об.) N-лауроилсаркозина и 1% (об./об.) 2-меркаптоэтанола. Надосадочную жидкость с N-лауроилсаркозином/2-меркаптоэтанолом инкубировали в течение 2 ч. при 37°C при встряхивании на орбитальном шейкере. Впоследствии путем ультрацентрифугирования при 108000x g в течение 1,5 ч. при комнатной температуре обогащали осадок агрегированными тау-белками. Надосадочную жидкость удаляли и осадок осторожно промывали дважды с помощью небольшого количества TBS (50 mM

Триса, 150 мМ NaCl, pH 7,4). Наконец, осадок агрегированных тау-белков извлекали в TBS и повторно суспендировали с обеспечением однородности образца. Небольшие аликвоты хранили при -80°C .

Обогащенные препараты агрегированных β -амилоидов получали из замороженных образцов головного мозга человека с AD (10 г – затылочная кора с высокой загрузкой фибрилл тау-белков), которые гомогенизировали с 7-кратным объемом холодного буфера для гомогенизации (250 мМ сахарозы, 20 мМ основания Триса, 1 мМ EDTA, 1 мМ EGTA и фосфатаза PhosSTOP и ингибитор протеаз cOmplete без EDTA) на льду. После центрифугирования при $27000\times g$ в течение 20 мин. при 4°C удаляли клеточный дебрис. Надосадочную жидкость, содержащую амилоидные бляшки, разделяли на аликвоты и хранили при -80°C .

Анализ *in vitro* конкурентного связывания радиоактивного лиганда

В анализах конкурентного связывания радиоактивного лиганда измеряют связывание меченного радиоактивным изотопом эталонного лиганда в присутствии диапазона концентраций тестовых соединений в зависимости от дозы.

Вкратце, препараты агрегированных тау-белков разбавляли до 100 мкг белка/мл в PBS-буфере 5% этанолом. В 96-луночном формате ^3H -T808 (специфическая активность; 32,97 Ки/ммоль) добавляли до конечной концентрации 10 нМ к увеличивающимся количествам тестового соединения в присутствии 20 мкг белка препарата агрегированных тау-белков. Неспецифическое связывание определяли как число единиц, остающихся в присутствии 50 мкМ Тиофлавина Т (обычное связывающее вещество для бета-листа). После 2 ч. инкубирования при комнатной температуре несвязавшийся лиганд удаляют с помощью фильтрования связывающих смесей через стеклянные фильтры GF/B с применением прибора для сбора Filtermate 96 (Perkin Elmer, Завентем, Бельгия). Фильтры промывали три раза PBS-буфером, содержащим 20% этанола. После высушивания фильтрационного планшета в течение ночи добавляли жидкость Microscint O (Perkin Elmer) и измеряли количество меченного радиоактивным изотопом лиганда, связавшегося с

фибриллами посредством жидкостно-сцинтилляционной детекции (Packard Instrument Company, Коннектикут, США).

Значения полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC_{50}) определяли из кривых замещения, полученных в по меньшей мере двух независимых экспериментах с применением программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния).

Для определения связывания соединения с агрегированным β -амилоидом осуществляли сходный анализ, но с некоторыми небольшими модификациями. Вкратце, амилоидные препараты разбавляли до 150 мкг белка/мл в 50 мМ Триса с помощью 0,1% BSA и 5% этанола. Добавляли 3H -AV-45 (флорбеттапир – специфическая активность; 45,95 Ки/ммоль) до конечной концентрации 10 нМ к увеличивающимся количествам тестового соединения в присутствии 30 мкг белка препарата амилоидных бляшек. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 500 мкМ Тиофлавина Т. После 150 мин. инкубирования при комнатной температуре связывающие смеси фильтровали через стеклянные фильтры GF/B. Фильтры промывали три раза PBS-буфером, содержащим 20% этанола. Последующие стадии были идентичны стадиям, описанным для препаратов агрегированных тау-белков.

$[^{19}F]$ -Соед. № 2 и $[^{19}F]$ -соед. № 3 проявляли сильное связывание (pIC_{50} 7,5 и 7,6 соответственно) с экстрагированными тау-белками человека с применением $[^3H]$ -T808 и отсутствие измеряемого связывания с экстрагированными агрегатами бета-амилоида человека не более 10 мкМ с применением $[^3H]$ -AV-45 в данном анализе замещения радиоактивной метки.

Иммуногистохимическое исследование. М&М головного мозга человека

Блоки головного мозга человека с AD (стадии по Брааку V-VI) подвергали быстрой заморозке и делали срезы на криостате (20 мкм толщиной), и хранили при $-80^{\circ}C$ до применения в иммуногистохимическом исследовании. Срезы высушивали, фиксировали в формалине и инкубировали в перексиде водорода (DAKO, S2023) в течение 5 минут и в блокирующем реагенте

(PBS1x+0,05% Triton X-100) в течение 1 часа. Антитело к амилоиду или к тау-белку [(4G8, Covance, SIG-38220), разведение 1/500 в разбавителе для антител с фоновыми восстанавливающими компонентами (DAKO, S3022 или AT8 (Bierna et al., EMBO J. 1992, 11(4):1593-7), собственного изготовления, исходная концентрация 1 мг/мл), 0,2 мкг/мл в разбавителе для антител с фоновыми восстанавливающими компонентами (DAKO, S3022)] наносили на срезы в течение 1 часа. После сильного промывания срезы инкубировали с вторичным антителом к антителу мыши, конъюгированном с HRP (Envision, DAKO, K4000) с последующим нанесением хромогенной метки DAB (DAKO, K3468). После контрастного окрашивания гематоксилином срезы обезвоживали и заливали органической заливочной средой (Vectamount, Vector labs, H-5000). На фигуре 1a показана патология, связанная с тау-белками, в головном мозге с AD, определенная с помощью AT8 IHC, и на фигуре 1b показана патология, связанная с β -амилоидами, в головном мозге с AD, определенная с помощью DAKO IHC. Высокое увеличение взято из области на красной вкладке.

Авторадиографические исследования

Замороженные высушиванием на воздухе срезы толщиной 20 мкм пациента с AD (стадии по Брааку V-VI) инкубировали в течение 60 мин. с [^{18}F]соед. № 1 (7,4 кБк/500 мкл на срез) и впоследствии промывали смесями фосфатно-солевого буфера (PBS) и этанола, описанных в других источниках (Xia CF, Arteaga J, Chen G, et al. [(18F)T807, a novel tau positron emission tomography imaging agent for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* **2013**, 1-11, [doi:10.1016/j.jalz.2012.11.008](https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.008)). Для оценки специфичности связывания срезы инкубировали с меткой в присутствии 1 мкМ аутентичного T808 или [^{18}F]соед. № 1. После высушивания срезы подвергали воздействию фосфорного экрана с длительным послесвечением (экран высокого разрешения, Perkin Elmer). Экраны считывали на системе Cyclone Plus (Perkin Elmer, Уолтем, Массачусетс, США) и анализировали с применением программного обеспечения Optiquant. Результаты выражали в виде цифровых световых единиц на квадратный мм (DLU/мм²). Смежные срезы с AD

иммуноокрашивали с помощью антител к тау-белку (AT8) и к Аβ (AG8) для установления отношения со связыванием [^{18}F]соед. № 1. На фигуре 2 показано связывание [^{18}F]соед. № 1 со срезом головного мозга с AD в автордиографическом исследовании (слева). Характер связывания хорошо соотносится с тау-патологией, выявленной на смежных срезах с помощью AT8 IHC (см. фигуру 1). Для оценки специфичности связывания метки с нейрофибриллярными клубками (NFT) проводили исследования блокирования с помощью аутентичных соед. № 1 и T808. Самоблокирование с помощью 1 мкМ холодного соед. № 1 приводило к 99% ингибированию (фигура 2, в центре). Связывание [^{18}F]соед. № 1 сокращалось на 98% в присутствии 1 мкМ T808 (фигура 2, справа). Доли блокирования в процентах рассчитывали как $(\text{DLU}/\text{мм}^2 \text{ в присутствии } 1 \text{ моль/л блокатора}) / (\text{DLU}/\text{мм}^2 \text{ метки в отдельности})$.

Исследования визуализации с помощью MicroPET

Крысы линии Wistar

Динамические сканирования через 120 мин. с помощью microPET проводили на сканере 220 microPET Focus™ (Concorde Microsystems, Ноксвилл, Теннесси, США) на трех самках крыс линии Wistar одновременно, которых выдерживали под газовой анестезией в течение всей процедуры (2,5% изофлурана в O_2 при расходе 1 л/мин.). Голову животных помещали по центру в поле обзора microPET-сканера. Изображения, получаемые с помощью сканирования, собирали в режиме списка, и сбор данных подвергали редискретизации Фурье в 24 временных интервалах (4×15 с, 4×60 с, 5×180 с, 8×300 с, 3×600 с). Данные, которые реконструировали посредством 3D-реконструкции с применением максимальной апостериорной вероятности (3D-MAP), вручную выравнивали с помощью матрицы [^{18}F]FDG головного мозга крысы в координатах Paxinos с применением аффинной трансформации с обеспечением анализа предварительно определенных исследуемых объемных областей (VOI). Кривые время-активность (ТАС) целого головного мозга получали с применением VOI с помощью программного обеспечения PMOD (v 3.2, PMOD Technologies Ltd., Цюрих, Швейцария). Концентрацию радиоактивности в головном мозге

выражали в виде стандартизированной величины поглощения (SUV, рассчитанной как (радиоактивность в Бк в мозге/мл) / (общая инъецированная доза (Бк)/вес тела в г)) в виде функции от времени после инъекции метки. Сканирования начинали немедленно после IV инъекции 50 МБк [^{18}F]соед. № 1 или [^{18}F]T807 ($n=3$ /метка). Для исследований предварительной обработки и замещения холодные эталонные соединения соед. № 1 или T807 растворяли в смеси 5% DMSO, 5% Tween 80 и 40% (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрина (CD) (получена следующим образом: соединения растворяли в DMSO, затем разбавляли 40% водным раствором CD с последующим добавлением 5% водного раствора Tween 80 (для предотвращения осаждения) и затем дополнительно разбавляли 40% водным раствором CD до конечной концентрации DMSO 5%), фильтровали через мембранный фильтр 0,22 мкм (Millex-GV, Millipore) перед инъекцией. Предварительную обработку ($n=1$) выполняли путем подкожной (SC) инъекции 10 мг/кг соед. № 1 или T807 за 60 мин. перед инъекцией радиоактивной метки. Замещение ($n=1$) проводили с помощью IV инъекции 1 мг/кг соед. № 1 или T807 через 30 мин. после инъекции радиоактивной метки. Изображения μPET сравнивали с исходным сканированием ($n=1$), полученным у необработанной крысы.

Результаты 120 мин. исходного исследования и исследований предварительной обработки и слежения за меткой [^{18}F]соед. № 1 и [^{18}F]T807 показаны на фигурах 3а и 3б соответственно (кривые время-активность, ТАС). С помощью ТАС исходных сканирований [^{18}F]соед. № 1 и [^{18}F]T807 показали высокое первоначальное поглощение головным мозгом со сравнительно высокой интенсивностью величины SUV в головном мозге $\sim 1,6$ для обоих соединений (фигуры 3 и 4). [^{18}F]соед. № 1 характеризовалось самой быстрой скоростью выведения (величина SUV 0,2 через 60 мин. p. i.) по сравнению с [^{18}F]T807, как показано на кривых SUV на фигуре 4). Для [^{18}F]соед. № 1 не наблюдали эффектов самопроизвольного блокирования или самопроизвольного слежения, что отмечает отсутствие специфического связывания, не связанного с тау-белками, в головном мозге. Отмечали более низкое поглощение головным мозгом во время исходного сканирования

[^{18}F]T807 по сравнению с исследованием предварительной обработки. Сходный эффект наблюдали через 40 мин. р. i. в исследовании слежения за меткой.

Исследования визуализации с помощью MicroPET

Макак-резус (эксперимент 1)

Динамические сканирования с помощью microPET [^{18}F]соед. № 1 или [^{18}F]T807 длительностью 120 мин. проводили на сканере 220 microPET Focus™ (Concorde Microsystems, Ноксвилл, Теннесси, США) на, соответственно, самках макак-резусов (9-летние *Macaca mulatta*, 5,3 кг) и самцах макак-резусов (6-летние *Macaca mulatta*, 7,6 кг), которых подвергали седативному воздействию кетамина (Ketalar®) и ксилазина (Rompun®) посредством внутримышечной (IM) инъекции. В ходе сканирования обезьяна несколько раз получала дополнительную дозу кетамина/ксилазина посредством IV инъекции. В ходе всего эксперимента отслеживали насыщенность крови O_2 , частоту дыхательных движений и частоту сердечных сокращений. Голову животного помещали по центру в поле обзора microPET-сканера. Изображения, получаемые с помощью сканирования, собирали в режиме списка, и сбор данных подвергали редискретизации Фурье в 24 временных интервалах (4×15 с, 4×60 с, 5×180 с, 8×300 с, 3×600 с). Данные реконструировали посредством итерационной 3D-реконструкции (3D-MAP) с применением максимальной апостериорной вероятности. ТАС для целого головного мозга, мозолистого тела, мозжечка и энторинальной области коры получали с помощью VOI с применением программного обеспечения PMOD. Концентрация радиоактивных веществ в головном мозге выражена в виде SUV в зависимости от времени после инъекции метки (фигуры 5a и 5b). Сканирования начинали немедленно после IV инъекции 185 МБк [^{18}F]соед. № 1 или [^{18}F]T807 в подкожную вену правой ноги. Результаты исходного сканирования [^{18}F]соед. № 1 и [^{18}F]T807 продолжительностью 120 мин. показаны на фигуре 5a и 5b соответственно. Снова с помощью ТАС исходных сканирований [^{18}F]соед. № 1 показали высокое первоначальное поглощение головным мозгом с быстрым выведением (величина SUV ~1,8), и связывания белого вещества не наблюдали (фигура 5a). С помощью

ТАС исходного сканирования [^{18}F]Т807 в головном мозге показали более медленное первоначальное поглощение головным мозгом (величина SUV $\sim 1,3$) и более медленное выведение (фигура 5b). ТАС, полученные на боковой поверхности черепа, не увеличивались в зависимости от времени для обоих соединений. Очаги высокого поглощения [^{18}F]соед. № 1 около черепа являются, вероятно, следствием удержания [^{18}F]соед. № 1 в шраме или воспаленной ткани в результате фиксации акриловой головной стойки на черепе обезьяны.

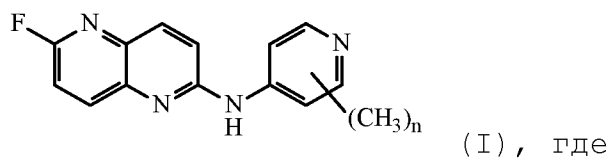
Макак-резус (эксперимент 2)

Динамическое сканирование μPET с использованием [^{18}F]соед. № 1 или [^{18}F]Т807 длительностью 120 мин. проводили с помощью сканера μPET Focus 220 у самца макака-резуса (6-летнего *Macaca mulatta*, 7,6 кг), подвергнутого седативному воздействию кетамина (Ketalar®) и ксилазина (Rompun®) посредством внутримышечной (IM) инъекции. В ходе сканирования обезьяна несколько раз получала дополнительную дозу кетамина/ксилазина посредством i. v. инъекции. В ходе всего эксперимента отслеживали насыщенность крови O_2 , частоту дыхательных движений и частоту сердечных сокращений. Голову животного помещали по центру в поле обзора μPET -сканера. Изображения, получаемые с помощью сканирования, собирали в режиме списка и подвергали редискретизации Фурье в 24 временных интервалах (4×15 с, 4×60 с, 5×180 с, 8×300 с, 3×600 с). Данные реконструировали посредством итерационной 3D-реконструкции (3D-MAP) с применением максимальной апостериорной вероятности. ТАС для головного мозга в целом строили с использованием VOI с помощью программного обеспечения PMOD. Концентрация радиоактивных веществ в головном мозге выражена в виде SUV в зависимости от времени после инъекции метки. Сканирования начинали немедленно после i.v. инъекции 185 МБк [^{18}F]соед. № 1 или [^{18}F]Т807 в подкожную вену правой ноги. Результаты исходного сканирования [^{18}F]соед. № 1 и [^{18}F]Т807 продолжительностью 120 мин. показаны на фигурах 7а и 7б соответственно. С помощью ТАС исходного сканирования с использованием [^{18}F]соед. № 1 в головном мозге показали высокое

первоначальное поглощение головным мозгом с быстрым выведением (величина SUV $\sim 1,9$, время до достижения пика: 1 мин.), и наблюдали низкий уровень связывания с белым веществом. С помощью ТАС исходного сканирования с применением [^{18}F]T807 в головном мозге показали более медленное первоначальное поглощение мозгом (величина SUV $\sim 1,3$, время до достижения пика поглощения: 15 мин.) и выведение (фигура 8). С помощью ТАС черепа показали, что сигнал SUV не увеличивался в зависимости от времени для обоих соединений. Очаги высокого поглощения [^{18}F]соед. № 1 вокруг черепа, наблюдаемые в эксперименте 1, не наблюдали в той же степени в эксперименте 2. С помощью ТАС черепа с применением [^{18}F]соед. № 1 и [^{18}F]T807 показали, что очаговое повышенное поглощение вокруг черепа нельзя отнести к поглощению костной тканью относительно [^{18}F]фторида, поскольку сигнал снижается с течением времени.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

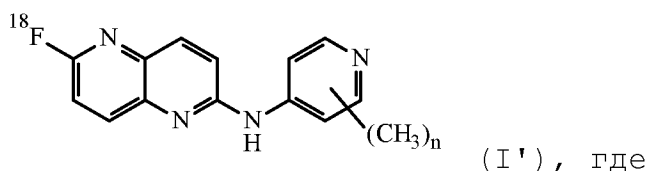
1. Соединение формулы (I),



по меньшей мере один атом является радиоактивным, и где метильный заместитель, если он присутствует, соединен с любым доступным атомом углерода в пиридинском кольце, и n равняется 0 или 1,

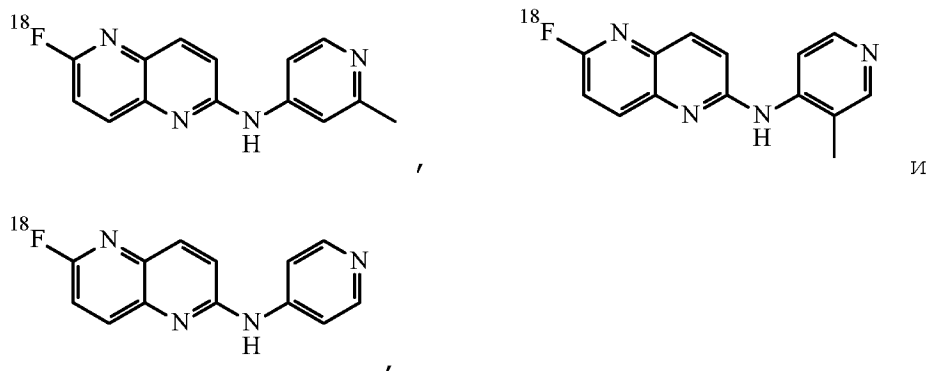
или его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

2. Соединение по п. 1, характеризующееся формулой (I'),



метильный заместитель, если он присутствует, соединен с любым доступным атомом углерода в пиридинском кольце, и n равняется 0 или 1, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

3. Соединение по п. 1 или п. 2, выбранное из группы, состоящей из



или его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

4. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из п.п. 1-3 или его фармацевтически приемлемую соль или сольват и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

5. Фармацевтическая композиция по п. 4, где такая композиция представляет собой стерильный раствор.

6. Применение соединения по любому из п.п. 1-3 или

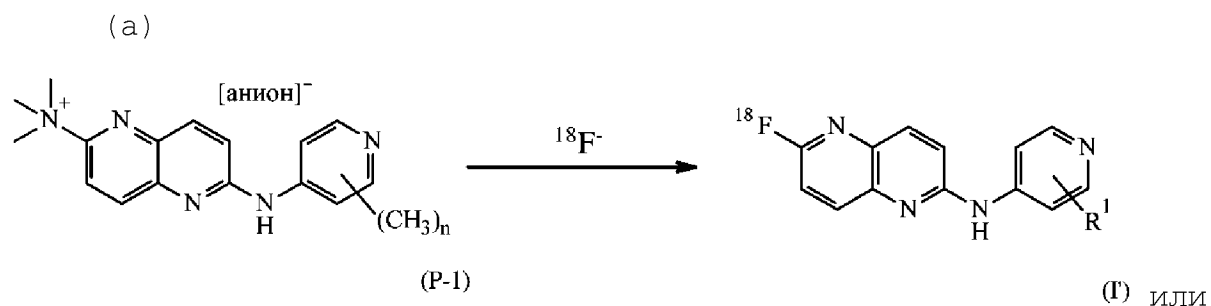
фармацевтической композиции по п. 4 или п. 5 для связывания и визуализации агрегатов тау-белков.

7. Применение соединения по любому из п.п. 1-3 или фармацевтической композиции по п. 4 или п. 5 для диагностической визуализации агрегатов тау-белков в головном мозге субъекта.

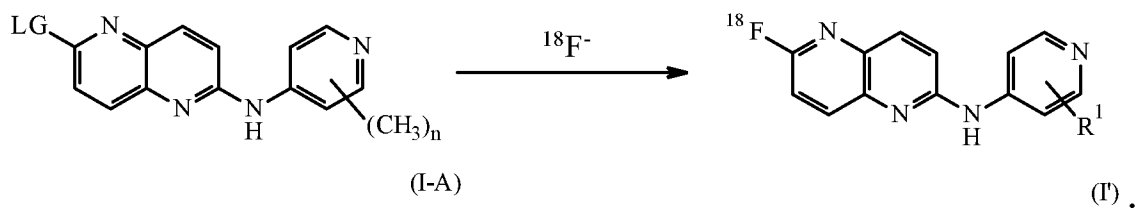
8. Применение соединения по любому из п.п. 1-3 или фармацевтической композиции по п. 4 или п. 5 для связывания и визуализации агрегатов тау-белков у пациента, страдающего или предположительно страдающего таупатией.

9. Применение соединения по любому из п.п. 1-3 или фармацевтической композиции по п. 4 или п. 5 для связывания и визуализации агрегатов тау-белков.

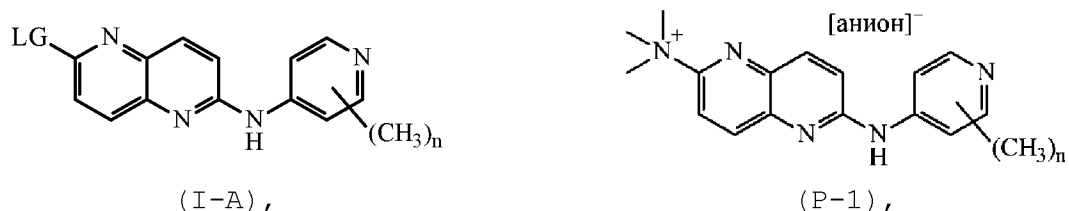
10. Способ получения соединения по любому из п.п. 1-3, включающий (а) стадию осуществления реакции соединения формулы (P-1) или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата, где метильный заместитель, если он присутствует, соединен с любым доступным атомом углерода в пиридинском кольце, n равняется 0 или 1, и $[\text{анион}]^-$ представляет собой подходящий анионный противоион, с источником фторида $^{18}\text{F}^-$ при подходящих условиях, или (b) стадию осуществления реакции соединения формулы (I-A) или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата, где метильный заместитель, если он присутствует, соединен с любым доступным атомом углерода в пиридинском кольце, n равняется 0 или 1, и LG представляет собой подходящую уходящую группу, с источником фторида $^{18}\text{F}^-$ при подходящих условиях:



(b)

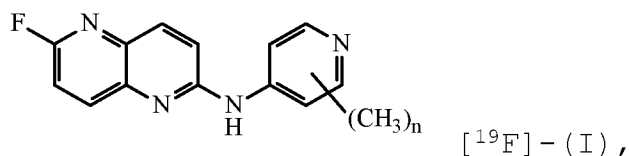


11. Соединение, выбранное из формул (I-A) и (P-1),



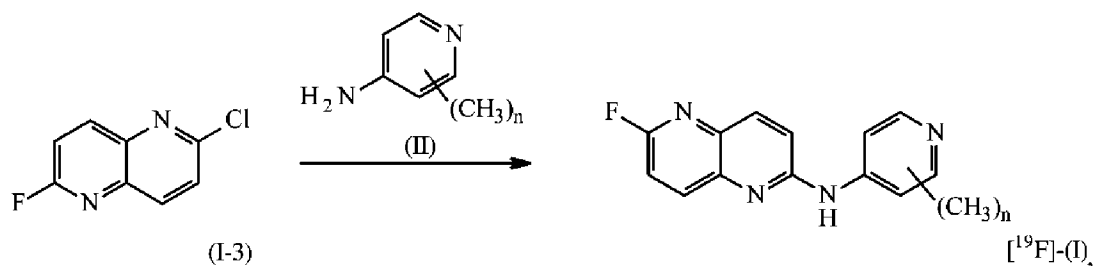
где LG представляет собой подходящую уходящую группу, где [анион]⁻ представляет собой подходящий анионный противоион, и где метильный заместитель, если он присутствует, соединен с любым доступным атомом углерода в пиридильном кольце, и n равняется 0 или 1, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

12. Соединение, характеризующееся формулой [¹⁹F]-(I),



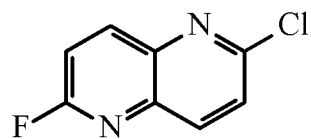
где метильный заместитель, если он присутствует, соединен с любым доступным атомом углерода в пиридильном кольце, и n равняется 0 или 1, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

13. Способ получения соединения по п. 12, включающий стадию осуществления реакции соединения формулы (I-3) с соответствующим соединением формулы (II) на основе 4-аминопиридина, где метильный заместитель, если он присутствует, соединен с любым доступным атомом углерода в пиридильном кольце, и n равняется 0 или 1,



при условиях аминирования по Бухвальду.

14. Соединение формулы (I-3),

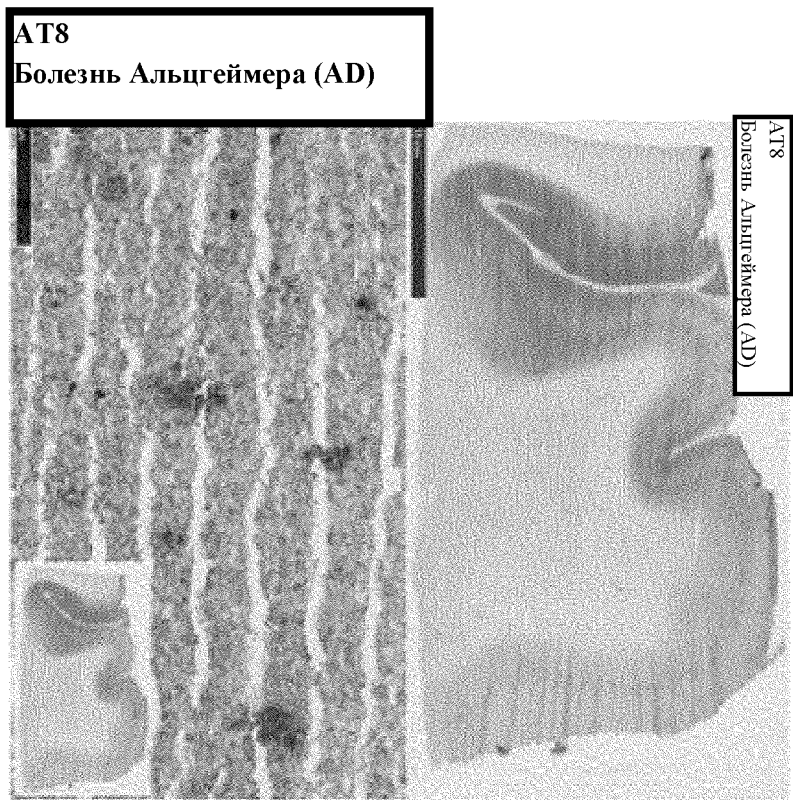


(I-3),

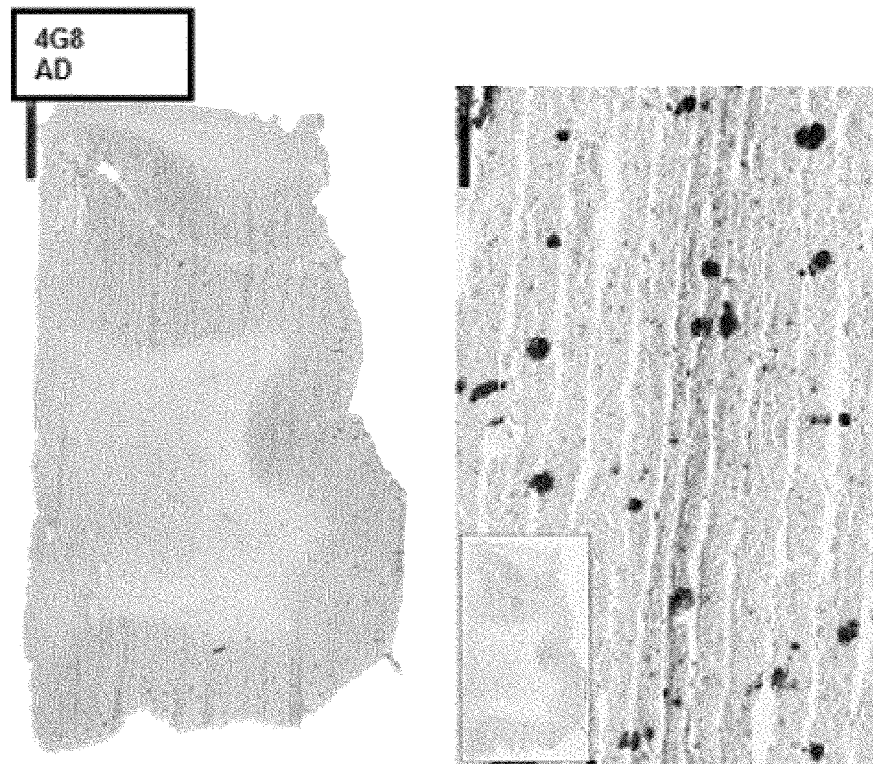
или его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

По доверенности

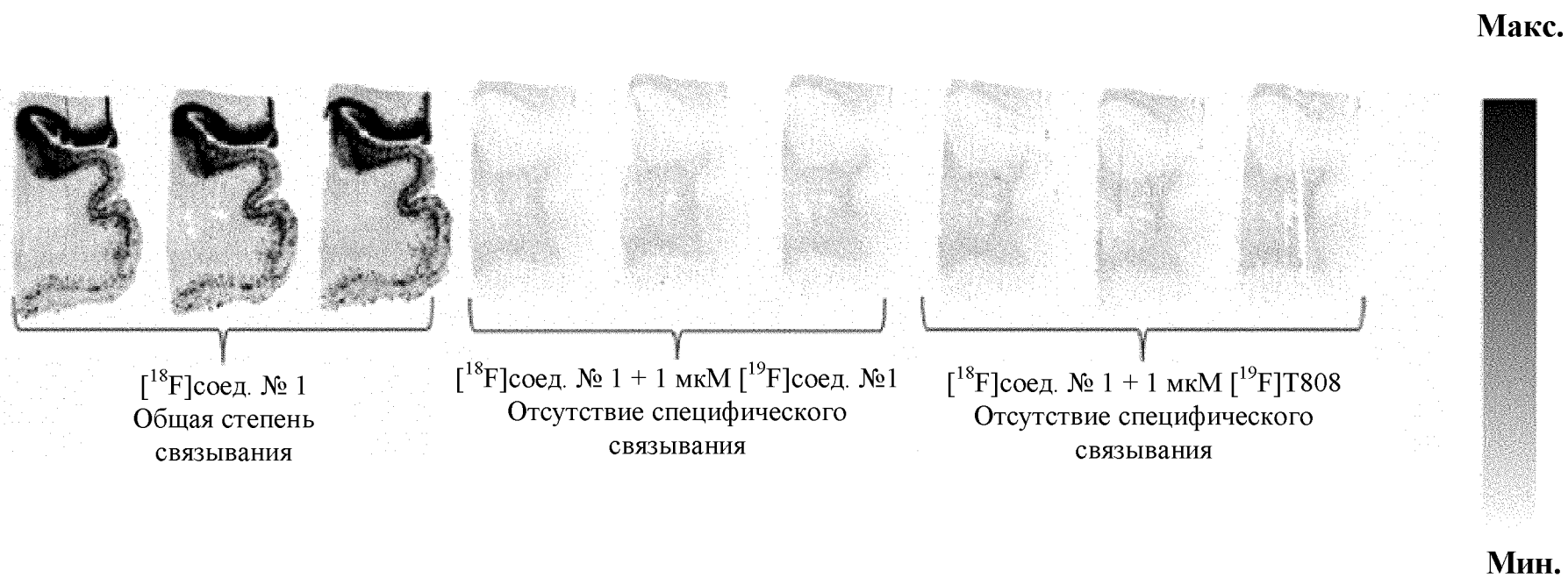
ФИГ. 1a



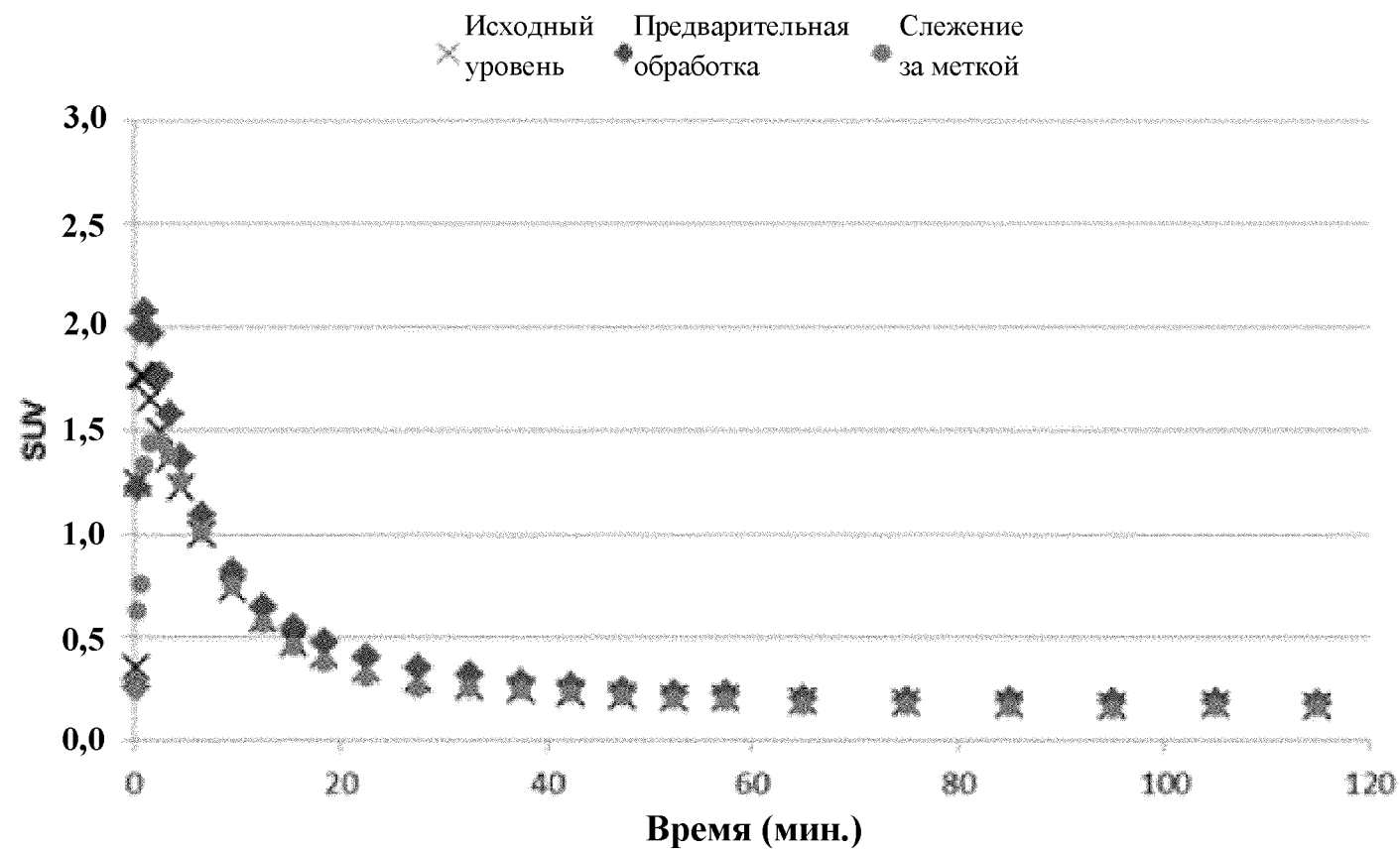
ФИГ. 1b



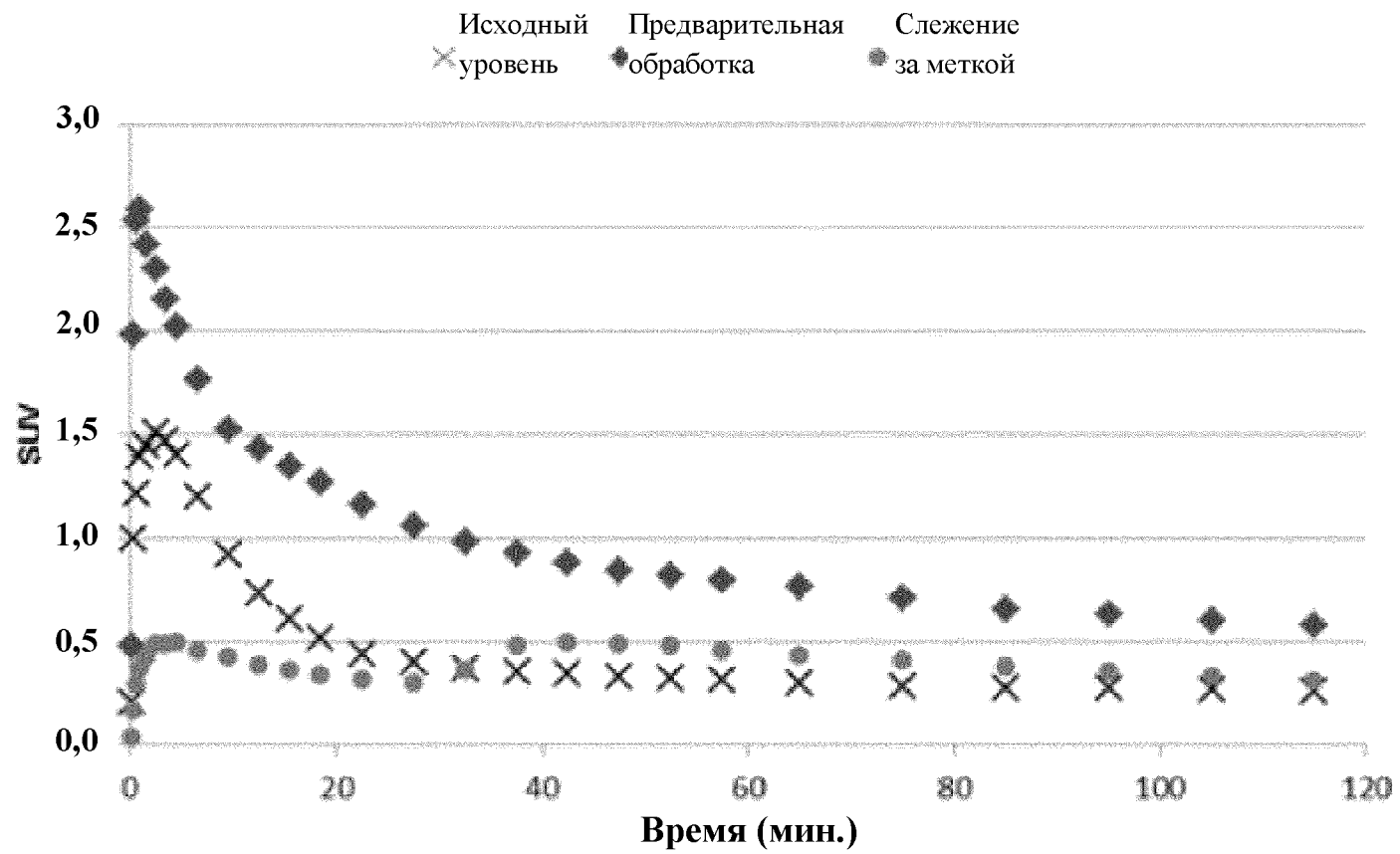
ФИГ. 2



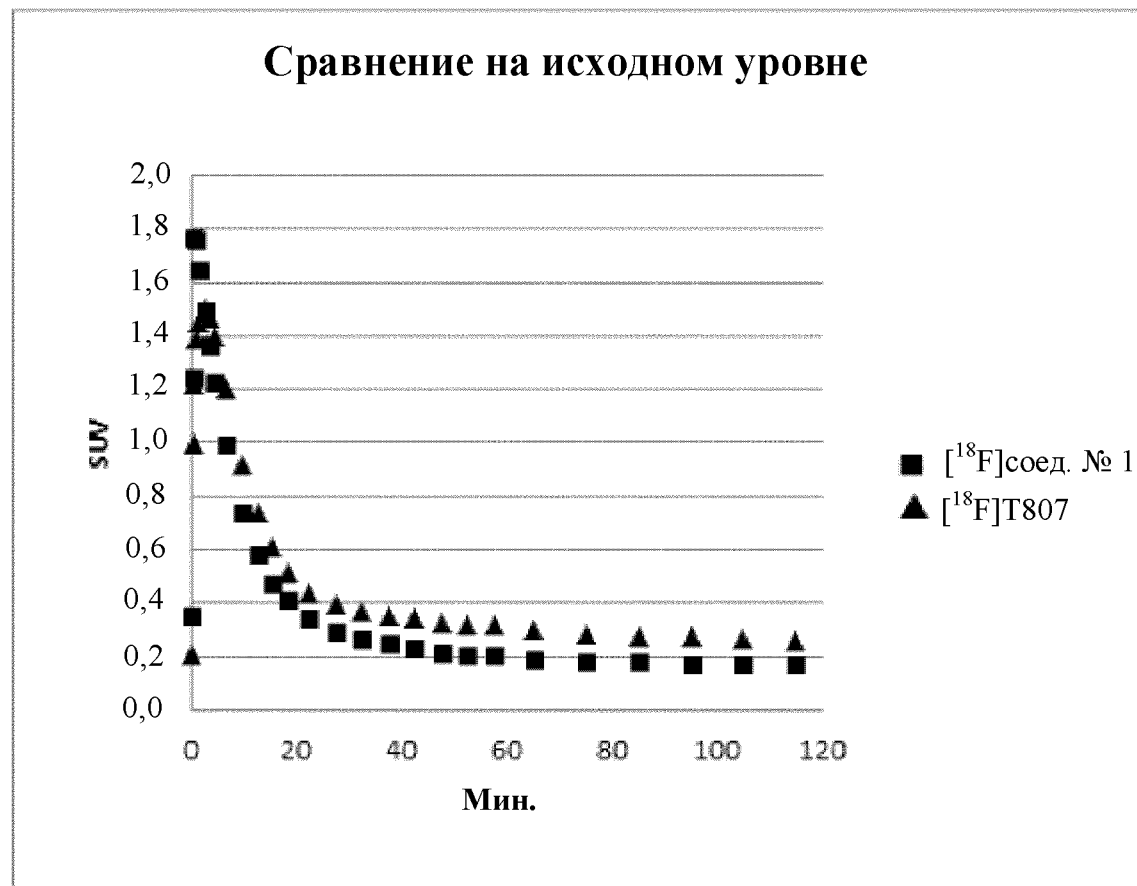
ФИГ. 3а



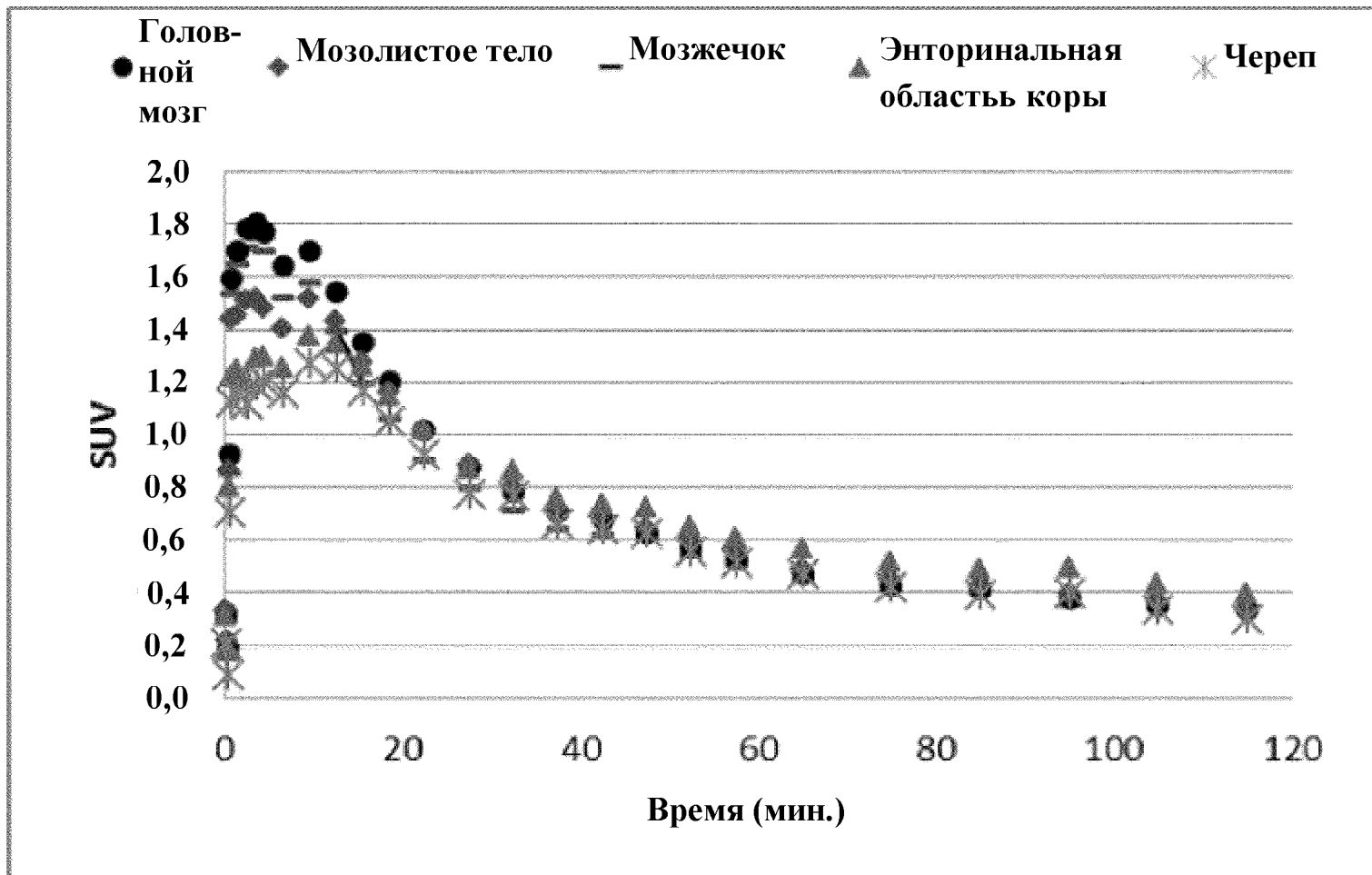
ФИГ. 3б



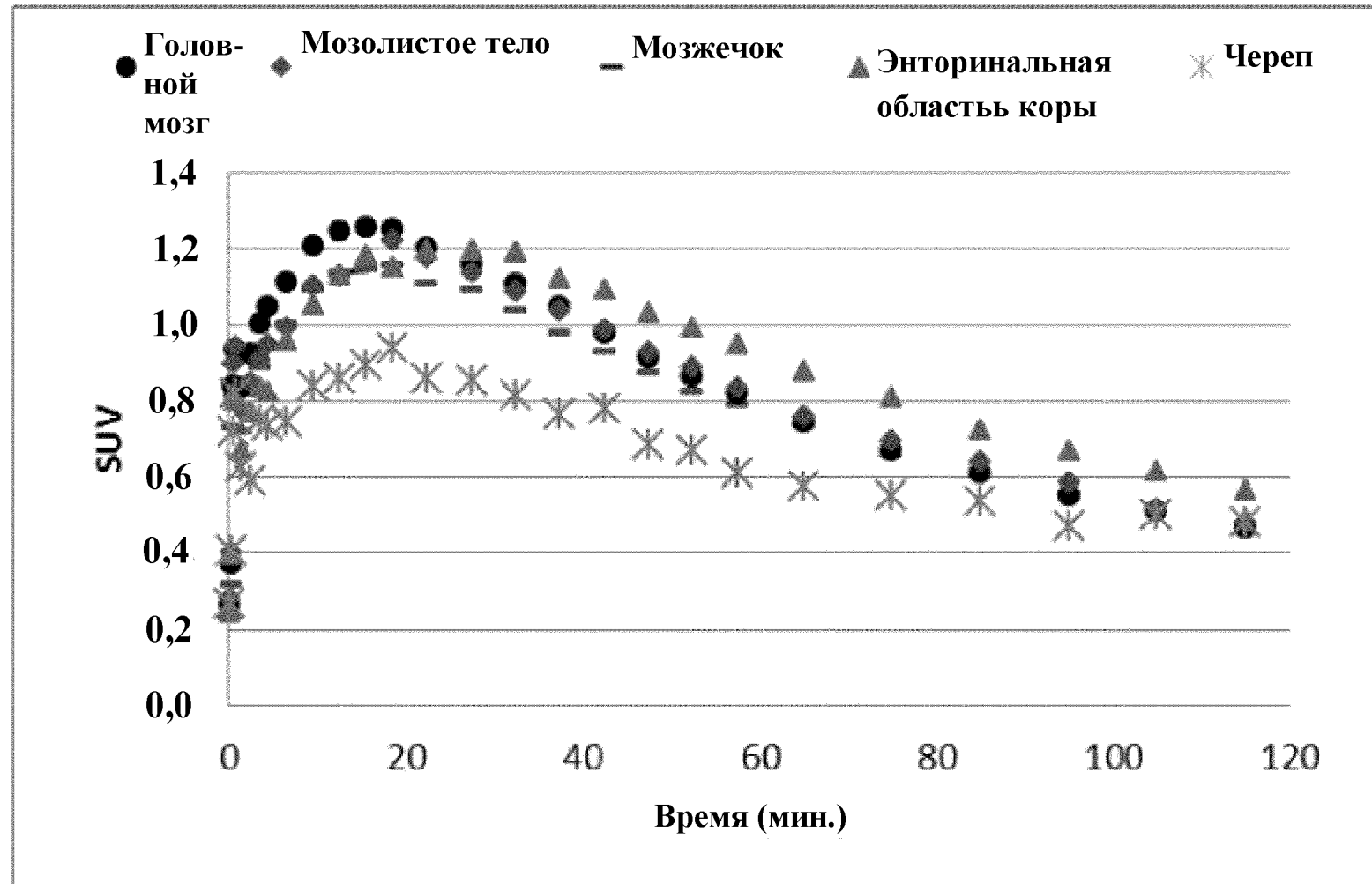
ФИГ. 4



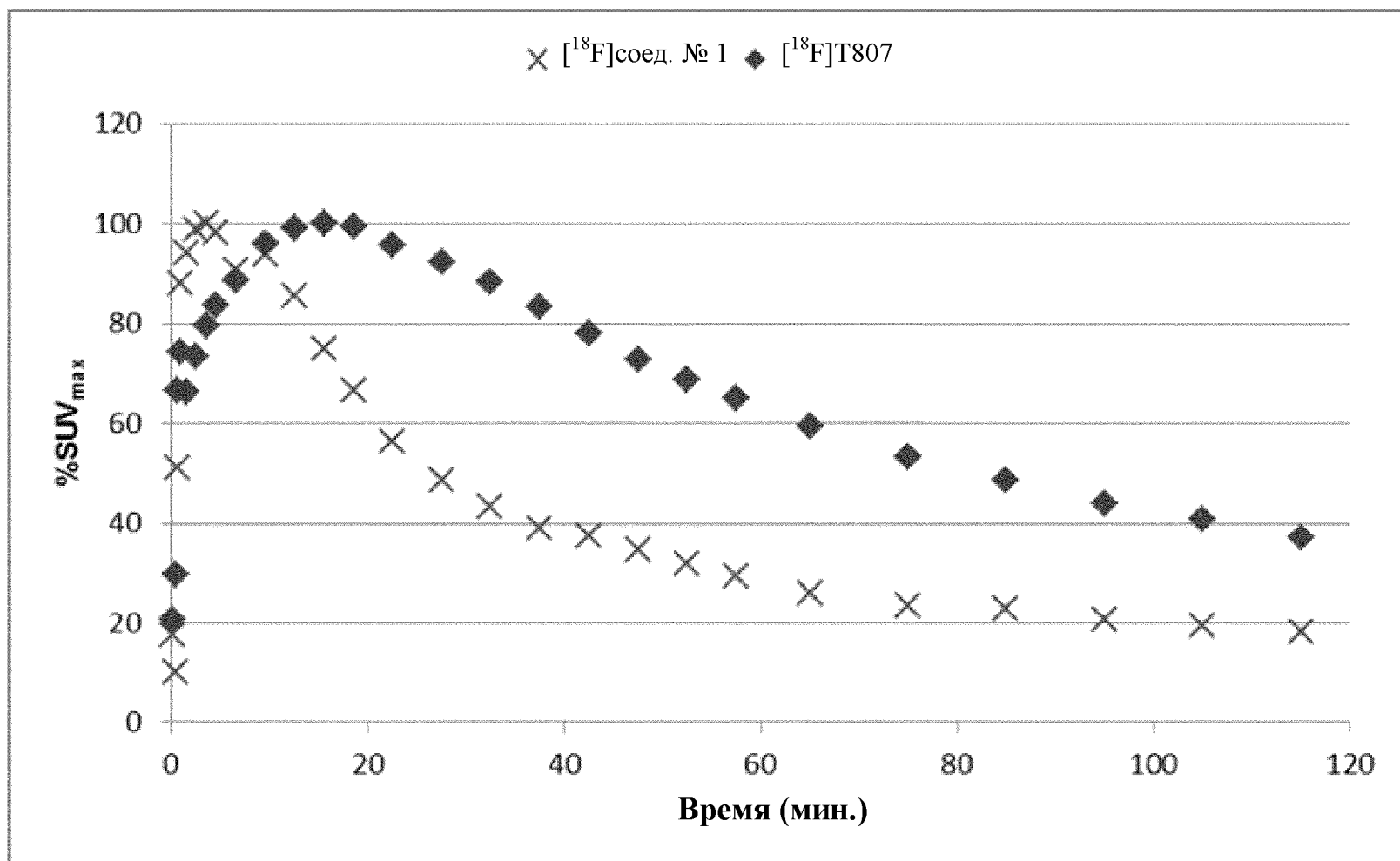
ФИГ. 5а



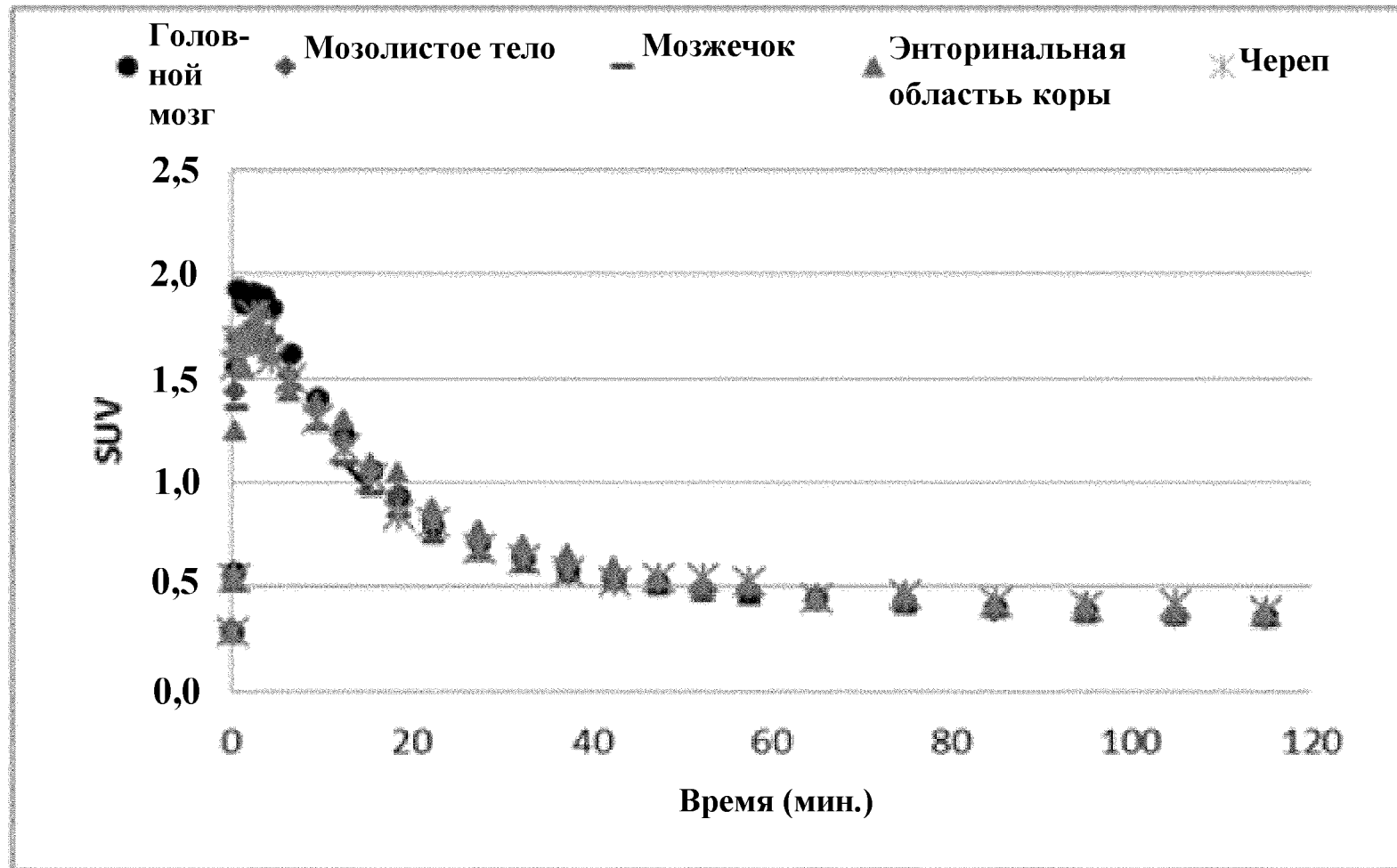
ФИГ. 5b



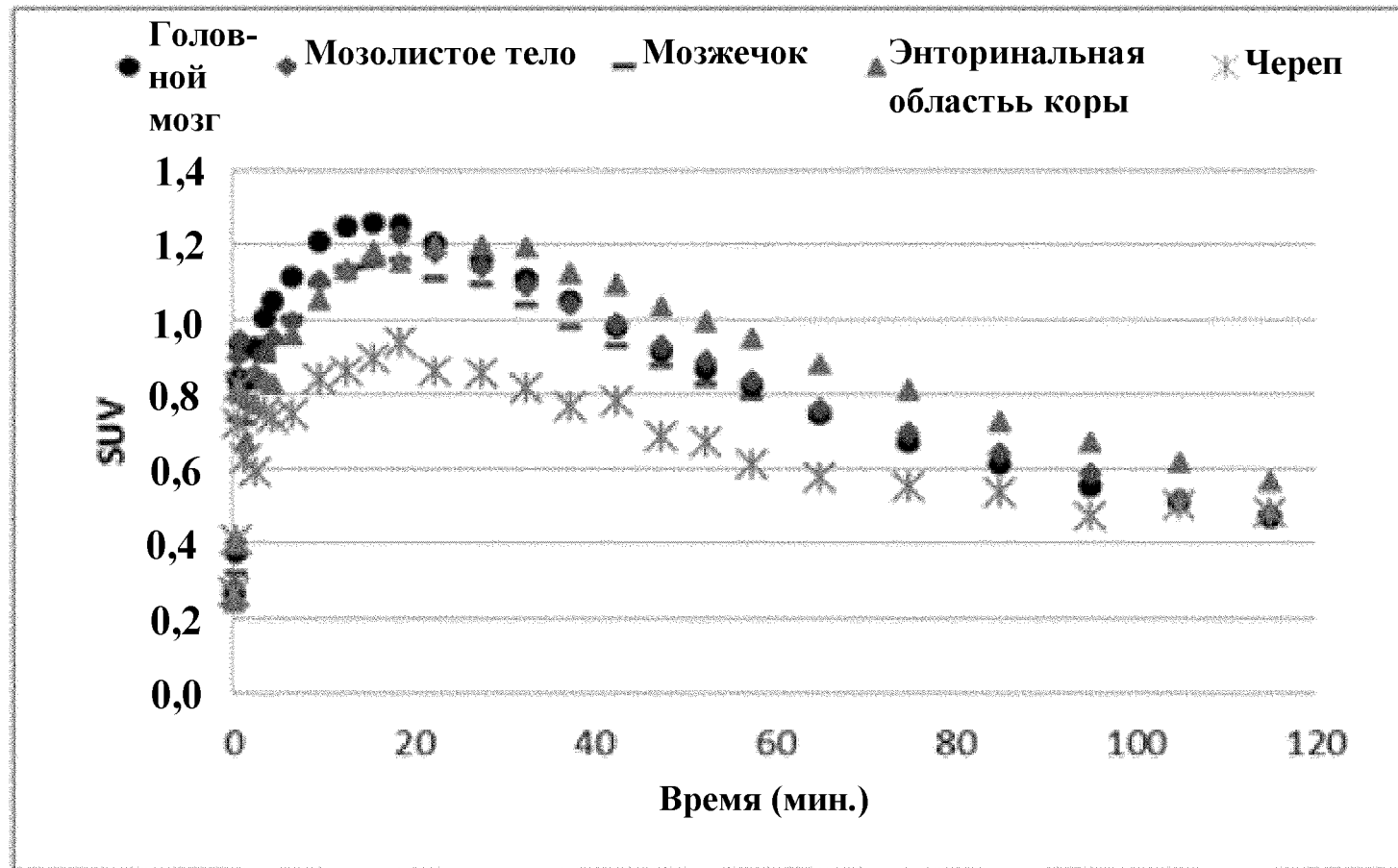
ФИГ. 6



ФИГ. 7а



ФИГ. 7b



ФИГ. 8

