

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034018**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.12.19

(51) Int. Cl. **C07D 471/04** (2006.01)
A61K 51/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201890799

(22) Дата подачи заявки
2016.11.04

(54) ПРОИЗВОДНЫЕ АЗЕТИДИНА ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ТАУ-БЕЛКА

(31) **62/254,906**

(32) **2015.11.13**

(33) **US**

(43) **2018.10.31**

(86) **PCT/US2016/060621**

(87) **WO 2017/083198 2017.05.18**

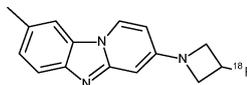
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(56) SRIMANTA MANNA ET AL.: "Metal-Free Annulation of Arenes with 2-Aminopyridine Derivatives: The Methyl Group as a Traceless Non-Chelating Directing Group", ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION, vol. 53, no. 31, 18 June 2014 (2014-06-18), pages 8163-8166, XP055333333, DE ISSN: 1433-7851, DOI: 10.1002/anie.201403712 compound 3i
US-A1-2011182812

(72) Изобретатель:
**Атгардо Джорджио (US), Гхош
Шьямали (умер), Хорчлер Карей, Сюн
Хуй (US)**

(74) Представитель:
**Угрюмов В.М., Карпенко О.Ю.,
Строкова О.В., Христофоров А.А.,
Гизатуллина Е.М., Глухарёва А.О.
(RU)**

(57) В данном изобретении предложено новое соединение формулы



способы получения данного соединения, способы применения данного соединения для визуализации тау-белка и приготовление составов для визуализации тау-белка.

B1

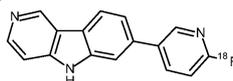
034018

**034018
B1**

Данное изобретение относится к новому соединению 3-(3-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридину и ^{18}F -меченому варианту 3-(3-[^{18}F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридину, и промежуточным соединениям для получения этих соединений, и к способам использования этих соединений для визуализации тау-белка, и к композициям и составам на основе этих соединений для диагностической визуализации, и к способам применения этих соединений, композиций и составов при визуализации.

Болезнь Альцгеймера (БА), основная причина деменции, развивается у одного процента населения в возрасте между 65 и 69 годами, и частота ее появления увеличивается до 40-50% у тех, кто достиг 95-летнего возраста и старше. Пациенты с БА демонстрируют указывающие на заболевание клинические симптомы, которые включают в себя нарушение когнитивных функций и нарушения функции памяти. У этих пациентов наличие БА подтверждается возникновением крупных сенильных бляшек и нейрофибриллярных клубков (НФК), наблюдаемых в коре головного мозга при гистопатологическом исследовании после смерти. Зрелые сенильные бляшки состоят из внеклеточных F-амилоидных пептидов, образующихся при воздействии ферментов на белок-предшественник амилоида, и внутриклеточных нейрофибриллярных клубков (НФК), которые образуются из волокон гиперфосфорилированных тау-белков. Скопления гиперфосфорилированных тау-белков, такие как нейрофибриллярные клубки, связаны со степенью нарушения когнитивных функций при болезни Альцгеймера. При БА и различных других таупатиях скопления тау-белков появляются в конкретных областях мозга и с конкретной структурой, которые связаны с вероятностью возникновения, началом и/или прогрессированием заболевания, и эти области и структуры известны специалистам в данной области техники. У пациентов с БА клубки, содержащие тау-белки, вначале появляются в областях мозга, которые очень тесно связаны с памятью, и исследования патологии демонстрируют, что клубки могут даже сильнее коррелировать с когнитивной деятельностью, чем бляшки. Сигналы, возникающие от агента для визуализации тау-белка в этих областях и структурах, могут быть использованы специалистами в данной области техники для того, чтобы улучшить наблюдение и диагностику вероятности возникновения, начала и прогрессирования конкретного болезненного состояния (см. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. Nelson PT, et al, J Neuropathol Exp Neurol. 2012 May; 71(5):362-81). Таким образом, востребованы простые неинвазивные способы обнаружения и/или количественного определения отложений тау-белка у пациентов (см. M. Maruyama et al, "Imaging of tau pathology in a tauopathy mouse model and in Alzheimer patients compared to normal controls", Neuron, 79: 1094-1108, 2013, C. Mathis and W. Klunk, "Imaging Tau Deposits In Vivo: Progress in Viewing More of The Proteopathy Picture", Neuron, 79: 1035-10-37, 2013).

Существующие агенты для ПЭТ-визуализации тау-белка известны в данной области техники, например, такие агенты перечислены в WO 2009/102498, а соединение, для которого недавно проведена клиническая оценка, [^{18}F]T807 (также известный как AV-1451), представлен в WO 2013/176698 (см. также [(18)F]T807, a novel tau positron emission tomography imaging agent for Alzheimer's disease. Xia CF, et al., Alzheimer's Dement. 2013 Nov; 9(6):666-76)



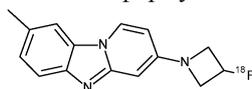
[^{18}F]T807

Однако существующие соединения для визуализации тау-белков имеют технические характеристики, которые можно улучшить путем разработки инновационных агентов, которые могут обеспечивать улучшенные изображения тау-белка с увеличенным сигналом, обусловленным тау-белком, и минимальным сигналом, не обусловленным тау-белком. Таким образом, востребованы усовершенствованные способы обнаружения и/или количественного определения тау-белка у пациентов.

Есть несколько возможных преимуществ визуализации тау-белка в мозге с использованием улучшенных визуализирующих агентов. Усовершенствованная визуализация тау-белка улучшит постановку диагноза путем идентификации возможных пациентов, обладающих высокими уровнями тау-белка в мозге, которые могут иметь повышенную вероятность развития БА. Визуализация с усовершенствованным агентом для ПЭТ также будет полезна для наблюдения за накоплением и расположением тау-белка, и/или прогрессированием БА, и/или других таупатий, и когда станет доступным лекарственное лечение, направленное против тау-белка, визуализация тау-белка может обеспечивать незаменимое средство для наблюдения за лечением.

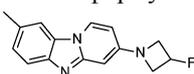
В данном изобретении предложены новые соединения, композиции, составы и способы для визуализации тау-белка. Таким образом, усовершенствованная технология, улучшающая качество визуализации тау-белка у пациентов, также необходима для расширения клинической эффективности и влияния на диагностическую визуализацию тау-белка. Усовершенствованный визуализирующий агент будет обеспечивать улучшенную визуализацию тау-белка по сравнению с известными агентами, давая изображения с повышенной четкостью вследствие устойчивых сигналов от тау-белка и сниженных сигналов, не обусловленных тау-белком.

В данном изобретении предложено соединение 3-(3-[^{18}F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин, также именуемое в данном документе как "Соединение 8", которое можно структурно представить как соединение формулы I



I

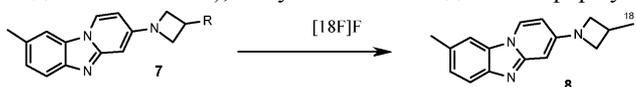
Также в данном изобретении предложено соединение 3-(3-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин, также именуемое в данном документе как "Соединение 4", которое можно структурно представить как соединение формулы II



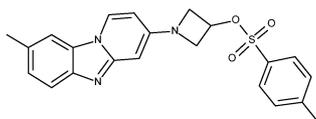
II

В данном изобретении дополнительно предложено применение соединения формулы I, и/или соединения формулы II, и/или их смесей для получения агентов для визуализации тау-белка и для ПЭТ-визуализации тау-белка.

В данном изобретении дополнительно предложены промежуточные соединения для получения соединения формулы I или соединения формулы II. В данном изобретении предложено соединение формулы 7 (обозначенное как соединение 8 ниже), полученное из соединения формулы 7

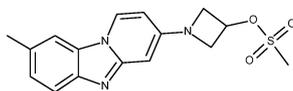


В изобретении дополнительно предложено соединение формулы I, полученное из соединения формулы Ia или формулы Ib. Предпочтительное соединение по данному изобретению представляет собой соединение формулы Ia



Ia

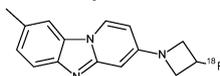
Другое предпочтительное соединение по данному изобретению представляет собой соединение формулы Ib



Ib

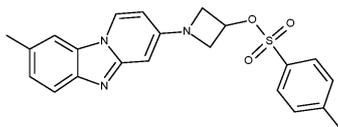
В данном изобретении предложено использование соединений формул I, Ia, Ib или II для производства радиофармацевтического агента для визуализации тау-белка у людей. В другом аспекте в изобретении предложены способы получения соединений формул I, Ia, Ib или II. В другом аспекте в изобретении предложены способы получения соединения 8 из соединений формул Ia или Ib. Особенно предпочтительным является способ получения соединения 8 или его фармацевтически приемлемой соли из соединения формулы Ia. В другом аспекте в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение 8 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. В другом аспекте в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение 8 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. В другом аспекте в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение 8 или его фармацевтически приемлемую соль, которая имеет в составе 10% EtOH (об./об.), 0,45% (мас./об.) аскорбата натрия в 0,9%-ном хлориде натрия, предпочтительно для применения у людей. В другом аспекте в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение 8 или его фармацевтически приемлемую соль, полученное из соединения формул Ia или Ib, которая имеет в составе 10% EtOH (об./об.), 0,45% (мас./об.) аскорбата натрия в 0,9%-ном хлориде натрия, предпочтительно для применения у людей. В данном изобретении также предложены способы визуализации тау-белка, включающие в себя введение пациенту обнаружимого количества соединения 8, или его фармацевтически приемлемой соли, или композиции на его основе, предпочтительно полученного из соединения формул Ia или Ib.

В данном изобретении предложен способ получения соединения формулы I



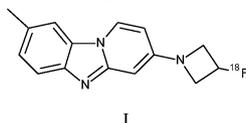
I

включающий в себя введение в реакцию 1-(8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин-3-ил)азетидин-3-ил-4-метилбензолсульфоната, представленного формулой

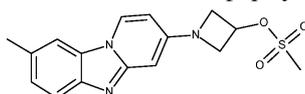


с источником [^{18}F]фторида.

В данном изобретении предложен способ получения соединения формулы I

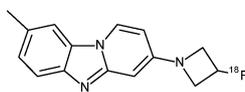


включающий в себя введение в реакцию соединения формулы Ib



с источником [^{18}F]фторида.

В данном изобретении предложен способ визуализации тау-белка, включающий в себя введение млекопитающему обнаружимого количества соединения



выдерживание в течение периода времени, достаточного для того, чтобы указанное соединение связалось с тау-белком, и детектирование указанного соединения.

Следующие схемы, синтезы и примеры представлены для лучшего пояснения практического осуществления данного изобретения. Пригодные условия реакций для стадий этих схем, синтезов и примеров хорошо известны в данной области техники, и уместные изменения условий реакций, в том числе замена растворителей и реагентов, находятся в рамках возможностей специалиста в данной области техники.

Кроме того, специалист в данной области техники должен понимать, что при некоторых обстоятельствах порядок, в котором вводят агенты, не является критичным. Конкретный порядок стадий, необходимых для получения соединений формулы I или формулы II, зависит от конкретного синтезируемого соединения, исходного соединения и относительной лабильности замещенных фрагментов, что хорошо понятно квалифицированному химику. Специалист в данной области техники должен понимать, что не все заместители совместимы с любыми условиями реакций. Эти соединения могут быть защищены или модифицированы в целесообразный момент синтеза с помощью способов, хорошо известных в данной области техники. Промежуточные соединения и готовые продукты по данному изобретению могут быть дополнительно очищены, если необходимо, с помощью общеизвестных способов, таких как перекристаллизация или хроматография на твердых носителях, таких как силикагель или оксид алюминия.

Соединения по данному изобретению предпочтительно входят в состав радиофармацевтических композиций, которые вводят различными путями. Такие композиции предпочтительно предназначены для внутривенного применения, предпочтительно для людей. Такие фармацевтические композиции и способы их получения хорошо известны в данной области техники (см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (P.P. Gerbino, 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2006). Способы применения агентов для визуализации тау-белка для ПЭТ-визуализации тау-белка известны специалистам в данной области техники (см., например, [(18F)T807, a novel tau positron emission tomography imaging agent for Alzheimer's disease. Xia CF, et al., Alzheimer's Dement. 2013 Nov; 9(6):666-76.). [(18F)T807 также известен как [18F]AV-1451.

Предпочтительные составы по данному изобретению представляют собой препараты соединения 8, полученные из соединения формулы Ia. Особенно предпочтительным является соединение 8, полученное из соединения формулы Ia в соответствии с методиками, описанными в данном документе, согласно схеме 2. Особенно предпочтительным является соединение 8, полученное из соединения формулы Ia в соответствии с методиками, описанными в данном документе, согласно примеру 2. Предпочтительный состав на основе соединения 8 содержит 10% EtOH (об./об.), 0,45% (мас./об.) аскорбата натрия в 0,9%-ном хлориде натрия, предпочтительно для применения у людей. Другой вариант осуществления изобретения представляет собой состав на основе соединения 8, полученного из соединения формулы Ia и введенного в состав вместе с 10% EtOH (об./об.), 0,45% (мас./об.) аскорбата натрия в 0,9%-ном хлориде натрия. Особенно предпочтительным является соединение 4, полученное в соответствии с методиками, описанными в данном документе, согласно схеме 1. Особенно предпочтительным является соединение 8, полученное из соединения формулы Ia в соответствии с методиками, описанными в данном документе,

согласно примеру 2 и введенное в состав вместе с 10% EtOH (об./об.), 0,45% (мас./об.) аскорбата натрия в 0,9%-ном хлориде натрия. В данном изобретении предложен способ визуализации тау-белка, включающий в себя введение млекопитающему обнаружимого количества диагностической композиции, как описано в соответствии с вариантами осуществления в данном документе, и выдерживание в течение периода времени, достаточного для того, чтобы указанная диагностическая композиция связалась с тау-белком; и детектирование диагностической композиции. Особенно предпочтительным является способ визуализации тау-белка, включающий в себя введение млекопитающему обнаружимого количества диагностической композиции на основе соединения 8, полученного из соединения формулы Ia в соответствии с методиками, описанными в данном документе, согласно примеру 2 и введенного в состав вместе с 10% EtOH (об./об.), 0,45% (мас./об.) аскорбата натрия в 0,9%-ном хлориде натрия.

Обнаружено, что новые соединения формул I и II удивительно и неожиданно являются полезными для визуализации тау-белка, предпочтительно включая клиническую визуализацию у людей. Предпочтительное соединение, соединение формулы I, также именуемое в данном документе как соединение 8, обладает комбинацией особенно полезных свойств для визуализации тау-белка, в том числе высоким сродством к тау-белку, селективностью, накоплением, вымыванием и метаболическим профилем. *In vivo* соединение 8 демонстрирует предпочтительное распределение в тканях, фармакокинетику и метаболическую стабильность. *Ex vivo* и/или *in vitro* соединение 8 демонстрирует высокое сродство к связыванию с тау-белком и метит образцы ткани пораженного БА мозга, содержащие тау-белок, с высокой селективностью по отношению к A β и/или не связывающимися с тау-белком агентами. Соединение 8 демонстрирует высокое сродство и селективность к тау-белку, показывая радиографические сигналы, которые характерны для стадии заболевания, расположения тканей и клеток. Радиографические сигналы, полученные с использованием соединения 8, демонстрируют улучшенное детектирование тау-белка по сравнению с нежелательными сигналами, не обусловленными тау-белком, и *in vivo* распределение в тканях и метаболический профиль, которые подходят для клинического радиофармацевтического визуализирующего агента. Соединение 8, обладающее этой комбинацией особенно полезных свойств, обеспечивает улучшенную визуализацию тау-белка по сравнению с известными агентами, давая изображения с повышенной четкостью вследствие устойчивых сигналов от тау-белка и сниженных сигналов, не связанных с тау-белком. Такая удивительно полезная комбинация свойств обеспечивает эффективный клинический агент для визуализации тау-белка, который облегчает визуализацию тау-белка у пациентов. Применение соединения 8 в клинической ПЭТ-визуализации тау-белка имело бы существенное положительное влияние на оценку и/или диагностику БА и улучшило бы детектирование, обработку, контроль и оценку тау-белка и диагностику заболеваний, в которые вовлечен тау-белок.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - иллюстративная хроматограмма, полученная с помощью полупрепаративной ВЭЖХ, для радиосинтеза 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (соединение 8). Верхняя часть изображает хроматограмму ВЭЖХ с детектированием гамма-излучения. Нижняя часть изображает хроматограмму ВЭЖХ с УФ-детектированием. Сегмент, обозначенный как "Пик фракции", указывает на соответствующие фракции, собранные для получения продукта 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (соединение 8).

Фиг. 2 - иллюстративная хроматограмма, полученная с помощью аналитической ВЭЖХ (контроль качества, QC), для 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (соединение 8). Верхняя часть, обозначенная ВЭЖХ с детектором гамма-излучения, изображает радиохроматограмму 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (соединение 8). Нижняя часть, обозначенная ВЭЖХ с УФ-детектором, изображает УФ-хроматограмму для 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (соединение 8). В верхней части для основного пика указано время удерживания пика 6,589 мин, а в нижней части для основного пика указано время удерживания пика 6,607 мин.

Фиг. 3 - автордиография на срезах мозга, пораженного БА, с использованием 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α] пиридина (соединение 8) для определения K_d (см. в примере анализа 4 объяснение экспериментальной модели и исследования).

Фиг. 4 - автордиография на срезах мозга, пораженного БА, с использованием 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина для определения селективности (см. в примере анализа 5 объяснение экспериментальной модели и исследования).

Фиг. 5 - автордиография на срезах мозга, пораженного БА, с использованием 3-(4-(2-[18F]-фторэтил)пиперидин-1-ил)-8-метоксибензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина для определения селективности. (см. в примере анализа 5 объяснение экспериментальной модели и исследования).

Фиг. 6 - автордиография на срезах мозга, пораженного БА, с использованием 3-(4-[18F]-фторпиперидин-1-ил)-8-метоксибензо[4,5]имидазо[1,2- α] пиридина для определения селективности (см. в примере анализа 5 объяснение экспериментальной модели и исследования).

Фиг. 7 - автордиография с использованием 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина, соединения 8 на срезах нормального мозга в сравнении с моз-

гом, пораженным БА (см. в примере анализа 6 объяснение экспериментальной модели и исследования).

Фиг. 8 - автордиография с использованием 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (соединение 8) и [18F]AV-1451 (также известного как [18F]T807) на срезах нормального мозга в сравнении с мозгом, пораженным БА, с использованием промыточных растворов, не содержащих спирт (см. в примере анализа 6 объяснение экспериментальной модели и исследования).

Фиг. 9 - кривые "активность-время" при ПЭТ/КТ для 3-(4-(2-[18F]-фторэтил)пиперидин-1-ил)-8-метоксибензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (также известного как T821) в сравнении с 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридином (соединение 8) у мышей.

Фиг. 10 - кривые "активность-время" при ПЭТ/КТ для 3-(4-[18F]-фторпиперидин-1-ил)-8-метоксибензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (также известного как T798) в сравнении с 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридином (соединение 8) у мышей.

Примеры и получение

Общие методики.

Все реакции проводят в атмосфере азота, если не указано иное. Продукты очищают с использованием автоматической хроматографической системы Teledyne Isco Flash®. Спектры ^1H , ^{19}F и ^{13}C ЯМР записывают на спектрометре Bruker® HD Avance III 400 в CDCl_3 (Cambridge Isotope Laboratories, № в каталоге DLM-7-100) или DMCO-d_6 (Cambridge Isotope Laboratories, № в каталоге DLM-10-25). Данные МСВР получают на масс-спектрометре Waters® QToF с использованием электрораспылительной ионизации в режиме регистрации положительных ионов. Элементный анализ выполняют в Galbraith Laboratories с использованием методики GLI ME-14 (Galbraith Inc., 2323 Sycamore Drive, Ноксвилл, Теннесси, 37921). Реагенты, растворители и поставщики известны специалистам-химикам. Названия соединений по данному изобретению можно получить, например, с использованием Symyx версии 3.2.NET, при этом функциональные группы называют в соответствии с IUPAC.

Сокращения представляют общеизвестное и стандартное использование, известное специалисту в данной области техники, и конкретные сокращения, используемые в данном документе, имеют приведенные ниже значения.

Условные сокращения.

BPV	флакон с нерасфасованным продуктом
ш. с.	широкий синглет
CDCl_3	дейтерированный хлороформ
CH_2Cl_2	метилхлорид
д	дублет
ДМД	детектор на диодной матрице
дд	дублет дублетов
дт	дублет триплетов
DMPAO	[(2,6-диметилфенил)амино](оксо)уксусная кислота
DMCO	диметилсульфоксид
DMCO-d_6	гексадейтеродиметилсульфоксид
EtOH	этанол
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
МСВР	масс-спектрометрия высокого разрешения
ИГХ	иммуногистохимия
K_2CO_3	карбонат калия
ЖХМС	жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием
н	нормальный
ЯМР	ядерный магнитный резонанс
PHF	спаренные спиральные волокна
млн^{-1}	части на миллион
QToF	квадрупольно-времяпролетный
с	синглет
SUV	стандартизованный уровень накопления
SUVr	отношение стандартизованных уровней накопления
т	триплет
СВЭЖХ	сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография
ФСБ	фосфатно-солевой буферный раствор
ВДИ	вода для инъекций

Схемы

Схема 1 представляет синтез 3-(3-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина. Синтез начинается с образования ядра бензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина посредством катализируемого медью сочетания коммерчески доступных 2-бром-4-метиланилина и 2,4-дибромпиридина с последующей внутримолекулярной циклизацией. Требуемый продукт 3-(3-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин получают посредством второго катализируемого медью сочетания 3-бром-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (3) и 3-фторазетидина гидрохлорида. После проведения колоночной хроматографии на силикагеле, удаления металла с помощью смолы Quadrasil MP и растирания в порошок 3-(3-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин (соединение 4) получают в виде желтого твердого вещества (4,44 г, общий выход 21%).

Схема 1

Синтез 3-(3-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина

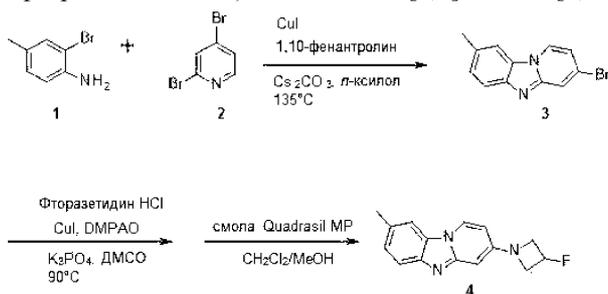
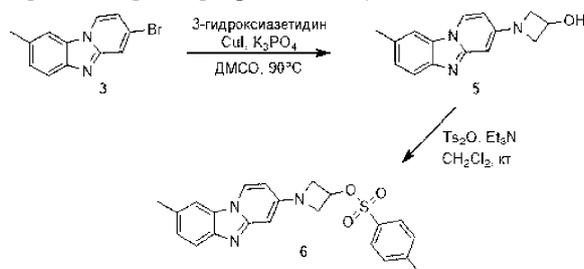


Схема 2 представляет синтез 1-(8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин-3-ил)азетидин-3-ил-4-метилбензолсульфоната, который представляет собой прекурсор для 3-(3-[18 F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина. Катализируемое медью сочетание 3-бром-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (3) и 3-гидроксиазетидина дает промежуточное гидроксисоединение 1-(8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин-3-ил)азетидин-3-ол (5), который также очищают с использованием колоночной хроматографии на силикагеле. Очищенное промежуточное соединение затем приводят в контакт с ангидридом *p*-толуолсульфоновой кислоты и триэтиламином с последующей очисткой с использованием колоночной хроматографии на силикагеле, что дает требуемый продукт 1-(8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин-3-ил)азетидин-3-ил-4-метилбензолсульфонат (6), в виде бежевого твердого вещества (3,21 г, общий выход 31%).

Схема 2

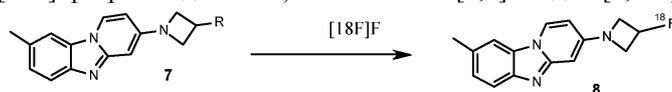
Синтез 1-(8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин-3-ил)азетидин-3-ил-4-метилбензолсульфоната (6)



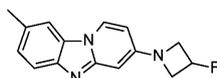
В соответствии со схемой 3 3-(3-[18 F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин, соединение 8, получают из соединения формулы 7, где R представляет собой пригодную уходящую группу. Конкретнее, соединение формулы 7, где R представляет собой уходящую группу, такую как метансульфонил (мезил) или 4-метилбензолсульфонил (тозил), можно приводить в контакт с пригодным источником 18 F-фторида ($[^{18}\text{F}]\text{F}^-$) в присутствии пригодного основания, такого как карбонат калия. Источники 18 F-фторида ($[^{18}\text{F}]\text{F}^-$) включают в себя $[^{18}\text{F}]\text{F}^- \text{K}_{222}$. Пригодные растворители включают в себя диметилсульфоксид.

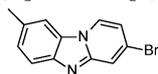
Схема 3

Синтез 3-(3-[18 F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (8)



Пример 1. Синтез 3-(3-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (соединение 4)



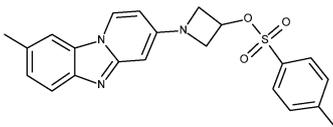
Стадия 1. Синтез 3-бром-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (соединение 3)

В круглодонной колбе вместимостью 1 л объединяют 2,4-дибромпиридин (20,0 г, 84,6 ммоль), иодид меди (3,22 г, 16,9 ммоль), 1,10-фенантролин (6,10 г, 33,8 ммоль), карбонат цезия (110 г, 338 ммоль), Celite® (16 г) и *n*-ксилол (170 мл). К полученной взвеси добавляют 2-бром-4-метиланилин (10,6 мл, 84,6 ммоль), и через энергично перемешиваемую смесь в течение 10 мин продувают азот. К колбе подсоединяют обратный холодильник, и систему нагревают при 135°C в течение 24 ч. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и фильтруют. Осадок на фильтре промывают метиленхлоридом и этилацетатом, и объединенные органическое фильтраты концентрируют при пониженном давлении на силикагеле. Неочищенный продукт реакции очищают с использованием хроматографии на силикагеле с использованием градиента от 0 до 10% этилацетата в метиленхлориде. Полученное коричневое твердое вещество суспендируют в метиленхлориде и растирают с использованием смеси изомеров гексана, затем отделяют фильтрованием, чтобы получить целевое соединение (6,52 г, 25,0 ммоль, выход 30%) в виде ярко-желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО-d₆ с ТФУ-d) δ м. д.: 9,40 (дд J=0,9, 7,2 Гц 1H), 8,45 (дд J=0,7, 1,8 Гц 1H), 8,42 (ш. с, 1H), 7,86 (дд, J=2,1, 7,3 Гц, 1H), 7,83 (д, J=8,4 Гц, 1H), 7,64 (дд, J=0,9, 8,4 Гц, 1H), 2,57 (с, 3H); ¹³C ЯМР (100,62 МГц, ДМСО-d₆ с ТФУ-d) δ м. д.: 142,6, 134,6, 131,9, 130,8, 129,9, 129,4, 127,0, 119,7, 115,0, 113,8, 113,4, 21,1; МСВР (m/z): найденное: 261,0013 (M+H), рассчит. для C₁₂H₁₀N₂Br: 261,0027, ошибка=-5,4 млн⁻¹.

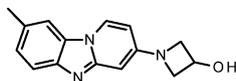
Стадия 2. Синтез 3-(3-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (соединение 4).

К твердой смеси 3-бром-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (6,52 г, 25,0 ммоль), 3-фторазетидина гидрохлорида (3,90 г, 35,0 ммоль), иодида меди (I) (475 мг, 2,50 ммоль), [(2,6-диметилфенил)амино](оксо)уксусной кислоты (ДМРАО, 963 мг, 4,99 ммоль) и фосфата калия (15,9 г, 74,9 ммоль) добавляют диметилсульфоксид (110 мл). Начинают перемешивать и через взвесь продувают азот в течение 15 мин. К системе подключают обратный холодильник, свободное пространство над смесью наполняют азотом, и смесь нагревают при 90°C в течение 48 ч. Добавляют дополнительные количества 3-фторазетидина гидрохлорида (1,39 г, 12,5 ммоль), иодида меди (I) (166 мг, 0,871 ммоль), ДМРАО (344 мг, 1,78 ммоль) и фосфата калия (5,56 г, 26,2 ммоль), и перемешивание продолжают при 90°C в течение дополнительных 24 ч. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и медленно добавляют к воде (1000 мл) при энергичном перемешивании. Осажденные твердые вещества отделяют с помощью вакуумного фильтрования, и водный фильтрат экстрагируют 10% метанола в метиленхлориде (3×250 мл). Органические экстракты объединяют с отделенными твердыми веществами, полученными при фильтровании исходной водной фазы, сушат над сульфатом натрия и концентрируют при пониженном давлении. Отделенные неочищенные твердые вещества (6,46 г) предварительно поглощают силикагелем (40 г) и очищают с помощью хроматографии на силикагеле с использованием градиента от 0 до 20% этилацетата в метиленхлориде, а затем градиента от 0 до 10% метанола в метиленхлориде. Смешанные фракции концентрируют, и полученные темно-желтые твердые вещества (5,43 г) суспендируют и обрабатывают ультразвуком в метиленхлориде (40 мл). Добавляют диэтиловый эфир (800 мл), и ярко-желтое твердое вещество отделяют путем фильтрования, промывают дополнительным количеством диэтилового эфира (400 мл) и сушат под высоким вакуумом. Раствор выделенного продукта (4,62 г) в смеси 10% метанола/метиленхлорид (200 мл) обрабатывают смолой Quadrasil MP (1,60 г), и суспензию перемешивают в течение 2 ч при комнатной температуре. Суспензию фильтруют, и твердые вещества промывают метанолом/метиленхлоридом (100 мл). Объединенные органические фазы концентрируют при пониженном давлении, и полученное твердое вещество суспендируют в метиленхлориде, обрабатывают ультразвуком и растирают с использованием диэтилового эфира (750 мл). Осажденные твердые вещества собирают с помощью вакуумного фильтрования, промывают диэтиловым эфиром и сушат под вакуумом, что дает целевое соединение в виде желтого порошка (4,44 г, 17,4 ммоль, выход 70% за 2 стадии). ¹H ЯМР (400,13 МГц, CDCl₃) δ м. д.: 8,11 (дд, J=0,7, 7,5 Гц, 1H), 7,63 (д, J=8,3 Гц, 1H), 7,47-7,48 (м, 1H), 7,23 (дд, J=0,5, 1,5, 8,3 Гц, 1H), 6,26 (д, 2,1 Гц, 1H), 6,13 (дд, J=2,5, 7,3 Гц, 1H), 5,35-5,54 (м, 1H), 4,24-4,34 (м, 2H), 4,07-4,17 (м, 2H), 2,53 (с, 3H); ¹³C ЯМР (100,62 МГц, CDCl₃) δ м. д.: 150,7, 150,3 (д, J=1,5 Гц), 143,7, 129,5, 129,0, 126,5, 125,5, 118,1, 109,4, 101,0, 91,6, 82,2 (д, J=206,9 Гц), 59,1 (д, J=24,9 Гц), 21,8; ¹⁹F ЯМР (376,44 МГц, CDCl₃) δ м. д.: -180,4; МСВР (m/z): найденное: 256,1244 (M+H), рассчит. для C₁₅H₁₅N₃F: 256,1250, ошибка=-2,3 млн⁻¹; элементный анализ (методика GLI ME-14): рассчит. для C₁₅H₁₄FN₃ C 70,57 H 5,53 N 16,46, найденное C 70,17 H 5,68 N 16,43, макс. различие=0,41.

Получение 1. Синтез 1-(8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин-3-ил)азетидин-3-ил-4-метилбензолсульфоната (соединение 6)



Стадия 1. Синтез 1-(8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин-3-ил)азетидин-3-ола (соединение 5)

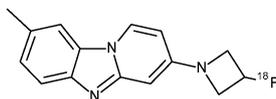


К твердой смеси 3-бром-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (6,57 г, 25,2 ммоль), азетидин-3-ола гидрохлорида (5,52 г, 50,4 ммоль), иодида меди (I) (480 мг, 2,52 ммоль), [(2,6-диметилфенил)амино](оксо)уксусной кислоты (DMPAO, 972 мг, 5,04 ммоль) и фосфата калия (21,4 г, 101 ммоль) добавляют диметилсульфоксид (110 мл). Начинают перемешивать и через взвесь продувают азот в течение 15 мин. К системе подключают обратный холодильник, свободное пространство над смесью наполняют азотом, и смесь нагревают при 90°C в течение 24 ч. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и медленно добавляют к воде (1000 мл) при энергичном перемешивании. Осажденные твердые вещества отделяют с помощью вакуумного фильтрования и растворяют в 10% метанола в метиленхлориде (500 мл). Водный фильтрат экстрагируют 10% метанола в метиленхлориде (3×250 мл). Органические экстракты объединяют с раствором отделенных твердых веществ, полученных при фильтровании исходной водной фазы, и смесь сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют при пониженном давлении. Полученное твердое вещество растворяют в метиленхлориде, предварительно поглощают силикагелем и очищают с помощью хроматографии на силикагеле с использованием градиента от 0 до 30% метанола в метиленхлориде, что дает целевой продукт в виде серо-зеленого твердого вещества (3,18 г, 50%). ¹H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО-d₆ с ТФУ-d) δ м. д.: 8,95 (д, J=7,6 Гц, 1H), 8,06 (с, 1H), 7,51 (д, J=8,2 Гц, 1H), 7,36 (дд, J=0,9, 8,3 Гц, 1H), 6,76 (дд, J=2,3, 7,5 Гц, 1H), 6,27 (д, J=2,1 Гц, 1H), 4,66-4,71 (м, 1H), 4,38-4,41 (м, 2H), 3,92-3,95 (м, 2H), 2,48 (с, 3H); ¹³C ЯМР (100,62 МГц, ДМСО-d₆ с ТФУ-d) δ м. д.: 153,6, 144,6, 132,4, 129,5, 128,6, 128,1, 126,9, 112,0, 111,9, 104,3, 83,3, 61,0, 60,16, 21,0; МСВР (m/z): найденное: 254,1296 (M+H), расчит. для C₁₅H₁₆N₃O: 254,1293, ошибка=1,2 млн⁻¹.

Стадия 2. 1-(8-Метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин-3-ил)азетидин-3-ил-4-метилбензолсульфонат (соединение 6).

Суспензию 1-(8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин-3-ил)азетидин-3-ола (соединение 5) (3,18 г, 12,6 ммоль) в дихлорметане (135 мл) обрабатывают триэтиламин (17,5 мл, 126 ммоль), перемешивают в течение 10 мин, а затем добавляют ангидрид п-толуолсульфоновой кислоты (12,31 г, 37,7 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 22 ч. Добавляют дополнительное количество ангидрида п-толуолсульфоновой кислоты (1,84 г, 5,6 ммоль), и реакцию перемешивают в течение 6 ч. Реакционную смесь концентрируют, повторно суспендируют в метиленхлориде (175 мл) и обрабатывают 1 н. водным раствором гидроксида натрия (150 мл). Смесь энергично перемешивают в течение 1,5 ч, переносят в делительную воронку, и слои разделяют. Органический слой энергично встряхивают с 1 н. водным раствором гидроксида натрия (2×100 мл, 1×150 мл). Органический слой сушат над сульфатом магния, фильтруют, концентрируют и сушат под высоким вакуумом. Раствор отделенного коричневого твердого вещества в 10% метанола в метиленхлориде концентрируют на силикагеле (24 г) при пониженном давлении. Целевое соединение очищают с помощью хроматографии на силикагеле с использованием градиента от 0 до 10% метанола в метиленхлориде. Полученное твердое вещество суспендируют в метиленхлориде (приблизительно 50 мл), обрабатывают ультразвуком и растирают с диэтиловым эфиром (750 мл). Осажденные твердые вещества собирают с помощью фильтрования, промывают диэтиловым эфиром и сушат под вакуумом, чтобы получить 1-(8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин-3-ил)азетидин-3-ил-4-метилбензолсульфонат в виде бежевого твердого вещества (3,21 г, 7,89 ммоль, выход 63%). ¹H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО-d₆ с ТФУ-d) δ м. д.: 9,01 (д, J=7,7 Гц, 1H), 8,11 (ш. с, 1H), 7,85-7,88 (м, 2H), 7,52-7,55 (м, 3H), 7,39 (дд, J=1,0, 8,3 Гц, 1H), 6,82 (дд, J=2,2, 7,5 Гц, 1H), 6,38 (д, J=2,3 Гц, 1H), 5,32-5,37 (м, 1H), 4,94-4,54 (м, 2H), 4,21-4,25 (м, 2H), 2,46 (с, 3H); ¹³C ЯМР (100,62 МГц, ДМСО-d₆ с ТФУ-d) δ м. д.: 153,3, 145,6, 144,3, 132,6, 132,2, 130,4, 129,5, 128,7, 128,3, 127,7, 126,9, 112,2, 112,0, 104,4, 84,4, 68,5, 58,4, 21,1, 21,0; МСВР (m/z): найденное: 408,1401 (M+H), расчит. для C₁₅H₁₆N₃O: 408,1382, ошибка=4,7 млн⁻¹; элементный анализ (методика GLIME-14): расчит. для C₂₂H₂₁N₃O₃S C 64,85 H 5,19 N 10,31, найденное C 64,38 H 5,27 N 10,27, макс. различие=0,48.

Пример 2. Синтез 3-(3-[¹⁸F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (соединение 8)



Синтез 3-(3-[¹⁸F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α] пиридина осуществляют с использованием автоматического радиосинтезатора GE TRACERlab FX_{F-N} с исходной активностью, составляющей 1-2 Ки. Типичное время синтеза составляет ~60±5 мин, а диапазон выхода, скорректированного на распад, составляет 22-44%. Радиоактивный [¹⁸F]фторид удерживают на картридже Sep-Pak Accell Plus QMA Carbonate Plus Light (46 мг сорбента на картридж, размер частиц 40 мкм, Waters, номер по каталогу 186004540) и элюируют в реакционный сосуд с использованием 0,8 мл водного раствора криптана 2.2.2-K₂CO₃ [криптан 2.2.2 (7 мг) и карбонат калия (0,75 мг) в ацетонитриле (0,4 мл) и ВДИ (воде для инъекций, 0,4 мл) соответственно]. Элюированное радиоактивное вещество высушивают путем нагревания при 70°C под потоком азота и вакуумом в течение 4,5 мин. Затем температуру поднимают до 100°C под вакуумом в течение 5 мин, чтобы получить безводный криптан 2.2.2-K₂CO₃ [¹⁸F]фторид.

Раствор 1-(8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин-3-ил)азетидин-3-ил-4-метилбензолсульфоната [1 мг в безводном диметилсульфоксиде (2 мл)] добавляют в реакционный сосуд, содержащий безводный криптан 2.2.2-K₂CO₃ [¹⁸F]фторид, и полученную смесь выдерживают при 140°C в течение 10 мин с последующим гидролизом 1 мл 1 н. гидроксида натрия при 65°C в течение 3 мин. После охлаждения до 60°C неочищенную реакционную смесь нейтрализуют 2 мл 0,5 н. соляной кислоты (HCl) (1 мл 1 н. HCl+1 мл ВДИ). Неочищенную реакционную смесь затем загружают в полупрепаративную колонку ВЭЖХ для очистки с использованием изократического элюирования (см. на фиг. 1 иллюстративную хроматограмму). Полупрепаративная колонка Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl, номер по каталогу: сделана на заказ, 5 мкм, 9,4×250 мм, скорость потока=4 мл/мин; 280 нм; время удерживания ~12-13 мин. Состав подвижной фазы 76% 9 мМ HCl в ВДИ (3 мл 3 н. HCl в 1 л ВДИ), 24% ацетонитрила (квалификации для ВЭЖХ).

Фракцию, полученную при ВЭЖХ, содержащую очищенный 3-(3-[¹⁸F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин, разбавляют 0,5%-ным (мас./об.) раствором аскорбата натрия в ВДИ (40 мл). Затем разбавленный раствор пропускают через картридж Sep-Pak® C18 Plus Light (130 мг сорбента на картридж, размер частиц 55-105 мкм, Waters, номер по каталогу WAT023501; кондиционируют этанолом (5 мл), затем ВДИ (5 мл) до использования), и удерживаемый 3-(3-[¹⁸F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин промывают 0,5%-м (мас./об.) раствором аскорбата натрия в воде для инъекций (10 мл). 3-(3-[¹⁸F]-Фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α] пиридин элюируют из картриджа C18 с использованием абсолютного спирта в соответствии с фармакопеей США (USP) (1 мл) в колбу, содержащую 7 мл 0,5%-го (мас./об.) раствора аскорбата натрия в 0,9%-ном хлориде натрия для инъекций, в соответствии с USP. Картридж C18 затем промывают еще 2 мл 0,5%-го (мас./об.) раствора аскорбата натрия в 0,9%-м хлориде натрия для инъекций, в соответствии с USP. Полученный раствор (всего 10 мл) фильтруют с использованием стерилизующего фильтрования через фильтр из ПВДФ Millex GV с размером пор 0,22 мкм (Millipore SLGV013SL) во флакон для нерасфасованного продукта (BPV; стерильный пустой флакон вместимостью 30 мл производства Allergy Laboratories с пробкой из хлорбутилкаучука размером 20 мм). Из BPV отбирают образец для контроля качества (см. на фиг. 2 иллюстративную хроматограмму) с помощью ВЭЖХ с использованием градиентной методики, подробно описанной в табл. 1 ниже.

Таблица 1
Аналитическая методика ВЭЖХ^А для 3-(3-[¹⁸F]-фторазетидин-1-ил)-
8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина

Минута	0,1 % (объем/объем) ТФУ в Н ₂ О	Ацетонитрил
0	75 %	25 %
12	50 %	50 %
13	0 %	100 %
16	0 %	100 %
17	75 %	25 %
20	75 %	25 %

А. Аналитические условия для колонки следующие: Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4,6×150 мм, номер по каталогу 993967-902, скорость потока=1 мл/мин; УФ=320 нм.

Оценивают предварительную стабильность составов на основе 3-(3-[¹⁸F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (соединение 8). Отбирают образцы из партий (размер в диапазоне от 235 и до 471 мКи) и анализируют с помощью ВЭЖХ на радиохимическую чистоту в течение периода времени, составляющего 6 ч. Партии, которые содержат в составе аскорбат натрия, характеризуются чистотой 96-97% до 6 ч, тогда как партии, не содержащие аскорбат натрия, разлагаются со временем и деградируют за 5 ч (см. подробности в табл. 2).

Таблица 2

Результаты стабильности
3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2-α]пиридина

Размер партии (DCY)	Состав	Концентрация (мКи/мл)	Результаты стабильности (% RCP)			
			T ₀	T _{0-2ч}	T _{0-4ч}	T _{0-6ч}
235 мКи (23%)	10 % EtOH (объем/объем), 0,45 % (масса/объем), аскорбат натрия в 0,9 %-ном	23,5	98	97	97	97
337 мКи (24%)	хлориде натрия для инъекций, в соответствии с USP	33,7	98	97	96	96
295 мКи (22%)	10 % EtOH (объем/объем) в 0,9 %-ном хлориде натрия для инъекций, в соответствии с USP	14,8	97	96	96	96
471 мКи (44%)		47,1	89	89	80	0 (5 ч)

Пример анализа 3. Определение K_i 3-(3-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2-α]пиридина относительно [18F]AV-1451 и K_d 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2-α]пиридина с использованием тау-белка от доноров с болезнью Альцгеймера.

Приготовление PHF.

Очищенные растворимые PHF выделяют из ткани головного мозга, пораженной БА, с использованием протокола, который представляет собой видоизмененный протокол, описанный Jicha, et al. (G.A. Jicha, A. O'Donnell, C. Weaver (1999) "Hierarchical phosphorylation of recombinant tau by the paired-helical filament-associated protein kinase is dependent on cyclic AMP-dependent protein kinase" J Neurochem. 72(1):214). Вкратце, кору головного мозга, пораженную БА, гомогенизируют с использованием портативного гомогенизатора Kinematica Polytron с последующим воздействием высокого давления - расширением газов с использованием автоклава для разрушения клеток Part. Неочищенный гомогенат центрифугируют при 28000 g для осаждения клеточного детрита. Растворимый PHF отделяют от надосадочной жидкости с помощью аффинной хроматографии с использованием колонки Affigel-10, на которой иммобилизовано антитело MC1 к тау-белку, которое распознает патологическую конформацию тау-белка (G.A. Jicha, R. Bowser, I.G. Kazam (1997), "Alz-50 and MC-1, a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau" J Neurosci Res. 48(2): 12.)

Определение K_i для 3-(3-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2-α] пиридина.

IC₅₀ (т. е. молярная концентрация конкурирующего лиганда, при которой специфическое связывание радиолиганда уменьшается на 50%) для немеченого соединения определяют по конкуренции со связыванием радиолиганда, когда связывание [18F]AV-1451 с PHF конкурирует с немеченым соединением при различных концентрациях. Реакционная смесь (200 мкл) содержит PHF (0,12 мкг), [18F]AV-1451 в концентрации 0,1-0,5 нМ, и охлажденное соединение, последовательно разбавленное от 316 до 0,01 нМ; анализы выполняют в ФСБ, pH 7,4, содержащем 0,0 % бычьего сывороточного альбумина в 96-луночных полипропиленовых микропланшетах. Неспецифическое связывание определяют как связывание радиолиганда в присутствии T808/AV-680 (5 мкМ), известного лиганда для PHF (Zhang, J. (2012), "A highly selective and specific PET tracer for imaging of tau pathologies" J Alzheimers Dis., 31(3):601). После инкубации в течение 1,5 ч при 37°C связанную радиоактивность переносят на 96-луночные фильтрующие планшеты из стекловолна FB Millipore MultiScreen^{HTS} с использованием вакуумного коллектора Millipore MultiScreen^{HTS} с последующим пятикратным промыванием ФСБ, pH 7,4. В фильтрах, содержащих связанный [18F]AV-1451, определяют уровень радиоактивности с использованием автоматического счетчика гамма-излучения Wizard 2480 [Perkin Elmer]. С использованием этих условий анализа общая связанная доля составляет, как правило, менее 10% от добавленного радиолиганда. IC₅₀ определяют с использованием ActivityBase или XLfit, модели 205 (или сопоставимой модели), в которой

$$Y=A+(B-A)/(1+((C/x)^D))$$

Y - ингибирование, %;

X - концентрация охлажденного конкурирующего лиганда (нМ);

A - минимальное значение Y (0%);

B - максимальное значение Y (100%);

C - IC₅₀;

D - угловой коэффициент.

K_i (т.е. равновесную константу диссоциации для связывания немеченого соединения) рассчитывают из значения IC₅₀ с использованием уравнения Ченга-Прусоффа (Cheng Y., Prusoff W.H. (1973), "Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibi-

tion (I50) of an enzymatic reaction" *Biochem Pharmacol* 22 (23):3099-3108):

$$K_i = IC_{50} / (1 + [L] / K_d)$$

[L] - концентрация [18F]AV-1451 (как правило, ~0,5 нМ);

K_d - константа диссоциации для [18F]AV-1451 (0,57 нМ).

K_i относительно [18F]AV-1451 для 3-(3-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина составляет 0,6 нМ для тау-белка, который получен от доноров с болезнью Альцгеймера, указывая на то, что это соединение связывается с тау-белком. Следовательно, ПЭТ-визуализация с соединением 8 и изучение изображений будут пригодными для обнаружения присутствия тау-белка у пациентов и могут подтвердить диагноз БА или других таупатий.

Определение K_d 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина.

Константу диссоциации [K_d] для радиомеченого соединения 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина определяют по связыванию при насыщении, когда общее и неспецифическое связывание радиолиганда измеряют при различных концентрациях радиолиганда. Реакционная смесь (250 мкл) содержит РНФ (150 0,15 мкг) и 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин, последовательно разбавленный от 25 до 0,3 нМ в ФСБ; анализы выполняют в ФСБ, содержащем 0,01% бычьего сывороточного альбумина в 96-луночных полипропиленовых микропланшетах. Неспецифическое связывание определяют как связывание радиолиганда в присутствии T808/AV-680 (10 мкМ). После инкубации в течение 1,5 ч при 37°C связанную радиоактивность переносят с помощью вакуумного фильтрования на 96-луночные фильтрующие планшеты из стекловолокна FB Millipore MultiScreenHTS с использованием вакуумного коллектора Millipore MultiScreenHTS с последующим пятикратным промыванием ФСБ. В фильтрах, содержащих связанный 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин, определяют уровень радиоактивности на автоматическом счетчике гамма-излучения Wizard 2480 [Perkin Elmer]. С использованием этих условий анализа общая связанная доля составляет, как правило, менее 10% от добавленного радиолиганда. Данные по общему связыванию и неспецифическому связыванию анализируют с помощью нелинейного регрессионного анализа с использованием Graphpad Prism для определения K_d радиолиганда.

K_d 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина составляет 0,85±0,02 нМ для тау-белка, который получен от доноров с болезнью Альцгеймера, указывая на то, что это соединение связывает тау-белок с высокой аффинностью. Следовательно, ПЭТ-визуализация с соединением 8 и изучение изображений будут пригодными для обнаружения присутствия тау-белка у пациентов и могут подтвердить диагноз БА или других таупатий.

Пример анализа 4.

Определение K_d для связывания 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина с нативными скоплениями тау-белка в ткани головного мозга человека с БА.

Для определения K_d для связывания 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина с нативными скоплениями тау-белка на срезах мозга человека, пораженного БА, которые характеризовали с использованием иммунного окрашивания к тау-белку и амилоидному белку в соответствии со способами, известными специалисту в данной области техники, используют автордиографию (см., например, [(18F)T807, a novel tau positron emission tomography imaging agent for Alzheimer's disease. Xia CF, et al, *Alzheimer's Dement.* 2013 Nov; 9(6): 666-7 6), (Zhang, J. (2012), "A highly selective and specific PET tracer for imaging of tau pathologies" *J Alzheimers Dis.*, 31(3):601). В эксперименте используют 15 соседних срезов лобной доли от каждого из двух типов мозга, пораженного БА: мозг с большим содержанием тау-белка и амилоидного белка ($Tau^+A\beta^+$), а также мозг с низким содержанием тау-белка и большим содержанием амилоидного белка ($Tau^-A\beta^+$) для определения неспецифического связывания. На срезы наносят 0,5 мл 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина, последовательно разбавленного от ~250 нМ в связывающем буферном растворе (2,5% диметилсульфоксид+2,5% этанола в ФСБ, pH 7,4). Через 60 мин инкубации при комнатной температуре несвязанный лиганд удаляют при помощи последовательных циклов промывания (2 мин в ФСБ, 2 мин в 30% этаноле/ФСБ, 2 мин в 70% этаноле/ФСБ, 2 мин в ФСБ). После высушивания под вытяжным колпаком срезы оставляют на ночь для воздействия на экран фосфоимиджера. Автордиографический сигнал, полученный на экране фосфоимиджера, считывают с использованием устройства Turphoon FLA 7000 Phosphorimager производства GE Healthcare Life Sciences. Интенсивность сигнала на сером веществе измеряют с использованием программного обеспечения Fujifilm Multi Gauge. K_d соединения определяют с помощью нелинейного регрессионного анализа концентрации связанного 3-(3-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина в зависимости от концентрации свободного соединения.

Автордиография для 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина на срезах мозга, пораженного БА, для определения K_d изображена на фиг. 3. K_d для нативных скоплений тау-белка на ткани головного мозга, пораженной БА, и 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина, определенная с помощью нелинейного регрессионного анализа, составляет 2,4 нМ, указывая на то, что это соединение связывается с тау-белком. Следовательно, ПЭТ-визуализация с соединением 8 и изучение изображений будут пригодными для обнаружения присутствия

тау-белка у пациентов и могут подтвердить диагноз БА или других таупатий.

Пример анализа 5. Селективность 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина к тау-белку по сравнению с β -амилоидным белком в ткани головного мозга человека, пораженной БА.

Методики.

На основании результатов об иммунном окрашивании на тау-белок и амилоидный белок срезов головного мозга выбирают три группы срезов головного мозга человека для авторыдиографических экспериментов для определения нативной селективности связывания тау-белка 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридином. Группа А представляет собой срезы головного мозга, пораженного БА, с большим содержанием тау-белка (обозначенные как $\text{Tau}^+\text{A}\beta^+$), группа В представляет собой срезы головного мозга, пораженного БА, с низким содержанием тау-белка (обозначенные как $\text{Tau}^-\text{A}\beta^+$), и группа С представляет собой срезы нормального головного мозга ($\text{Tau}^-\text{A}\beta^-$). Как изображено на Фиг. 4, используемые срезы головного мозга человека, пораженного БА, из группы А представляют собой № 0185, № 28770, № 30121, № 30311 и № 30461. Срезы головного мозга человека, пораженного БА, в группе В представляют собой № 33562, № 32656, № 33998, № 35682 и № 33563. Срезы нормального головного мозга человека в группе С представляют собой № 29092 и № 32566. Срезы тканей от одних и тех же доноров используют для расчета селективности для всех трех соединений для исследования в соответствии с примером анализа 5. Авторыдиографию выполняют для каждой из этих трех групп срезов головного мозга на соседних срезах толщиной 10 мкм с использованием меченого вещества для амилоидного белка [18F]W372 для количественного определения содержания β -амилоидов. [18F]W372 представляет собой меченое вещество, селективно связывающееся с амилоидными белками, открытое Siemens и оцененное в соответствии с IND 105173. На срезы наносят 0,5 мл 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (в 2,5:2,5:95 ДМСО:EtOH:1 \times ФСБ, около 20 мКи/срез) и инкубируют в течение 1,5 ч. Затем применяют последовательные циклы промывания (1 мин ФСБ, 2 мин 30% EtOH/ФСБ, 2 мин 70% EtOH/ФСБ, 1 мин ФСБ) для удаления несвязанного меченого вещества. Срезы сушат на воздухе, помещают на пластину фосфоимиджера (пластина Fuji IP) и выдерживают в течение ночи. Пластины IP считывают с использованием устройства Turphoon FLA 7000 Phosphorimager производства GE Healthcare Life Sciences. Интенсивность сигнала серого вещества измеряют с использованием программного обеспечения Fujifilm Multi Gauge. После вычитания фонового сигнала (сигнал в области коры в группе С) сигнал от каждого среза групп А и В нормализуют на соответствующий сигнал, полученный при авторыдиографии соответствующих соседних срезов с [18F]W372. Расчеты основаны на срезах головного мозга группы В № 32656 и № 33998, на которых с помощью иммуногистохимии не обнаружена патология тау-белка. Нормализованный сигнал 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина для срезов головного мозга в группе В представляет собой уровень сигнала 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин по отношению к [18F]W372, возникающему в результате связывания с нативными скоплениями β -амилоидов. Уровень связывания 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина с нативными скоплениями тау-белка в срезах группы А оценивают путем вычитания общего сигнала, который относится к связыванию с β -амилоидом (рассчитанный путем умножения общего сигнала от связывания [18F]W372 с β -амилоидом в соседнем срезе на сигнал 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина по отношению к [18F]W372, определенный из срезов группы В). Полученную разницу затем делят на сигнал, который относится к связыванию с β -амилоидом для оценки селективности 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина.

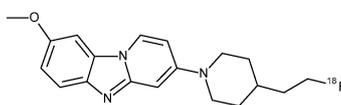
Авторыдиография с 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридином в этих трех группах срезов головного мозга человека изображена на фиг. 4. Наблюдается сильный сигнал на сером веществе (область коры головного мозга) срезов в группе А ($\text{Tau}^+\text{A}\beta^+$), тогда как в группе В ($\text{Tau}^-\text{A}\beta^+$) в областях коры на срезах обнаружен слабый сигнал или наблюдается отсутствие сигнала. Авторыдиографический сигнал не наблюдается на срезах нормального мозга в группе С ($\text{Tau}^-\text{A}\beta^-$). Эти результаты указывают на то, что 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин связывается с нативными скоплениями тау-белка в мозге человека, пораженном БА, специфически, и слабо взаимодействует или не взаимодействует с нативными скоплениями β -амилоидов.

Поскольку результаты ИГХ показывают, что срезы мозга группы В № 32656 и № 33998 лишены скоплений тау-белка, нормализованный авторыдиографический сигнал в области коры на этих срезах головного мозга, пораженного БА, получают из связывания 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина с нативными скоплениями β -амилоидов. Селективность связывания 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина с нативными скоплениями тау-белков в сравнении со связыванием с нативными скоплениями β -амилоидов отражена отношением сигнала группы А ($\text{Tau}^+\text{A}\beta^+$) к сигналу срезов головного мозга № 32656 и № 33998.

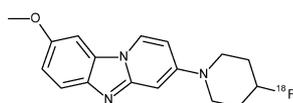
В экспериментах, изложенных в примере анализа 5 и представленных на фиг. 4, соединение 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин (соединение 8) демонстрирует от-

ношение селективности Тау:Аβ, составляющее приблизительно 26,6±4,5, на основании 5 образцов мозга Тау⁺ Аβ⁺ и 2 образцов мозга Тау⁻Аβ⁺. При использовании в этом разделе образец относится к образцам ткани от различных доноров. Как изложено в примере анализа 5 и изображено на фиг. 4, соединение 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2-α]пиридин (соединение 8) демонстрирует отношение сигнала серого вещества к сигналу белого вещества (GM/WM), составляющее приблизительно 17,3±1,7. Авторадиографический сигнал 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2-α]пиридина (соединение 8), полученный на нормальных срезах головного мозга, является слабым и, демонстрируя небольшую разницу между серым веществом и белым веществом, указывает на низкое неспецифическое связывание. В экспериментах в соответствии с примером анализа 5 наблюдают отношение селективности связывания 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2-α]пиридина (соединения 8) с нативными скоплениями тау-белка по сравнению со связыванием с нативными скоплениями β-амилоидов в области серого вещества мозга человека, пораженного БА, составляющее приблизительно 27.

Результаты селективности, полученные с помощью авторадиографии, для 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2-α]пиридина (соединение 8) демонстрируют неожиданно выигрышную селективность в этих экспериментах, если рассматривать в сравнении с 3-(4-(2-[18F]-фторэтил)пиперидин-1-ил)-8-метоксибензо[4,5]имидазо[1,2-α]пиридином (также известен как Т821 и показан ниже) и 3-(4-[18F]-фторпиперидин-1-ил)-8-метоксибензо[4,5]имидазо[1,2-α]пиридином (также известен как Т798 и показан ниже), которые перечислены в качестве агентов для ПЭТ-визуализации тау-белка в US 2011/0182812.



Т821



Т798

В экспериментах, изложенных в примере анализа 5 и представленных на фиг. 5, соединение 3-(4-(2-[18F]-фторэтил)пиперидин-1-ил)-8-метоксибензо[4,5]имидазо[1,2-α]пиридин (Т821) демонстрирует отношение селективности для Тау:Аβ, составляющее приблизительно 2,22±0,45, на основании 5 образцов мозга Тау⁺ Аβ⁺ и 2 образцов мозга Тау⁻Аβ⁺. Как изложено в примере анализа 5 и изображено на фиг. 5, соединение 3-(4-(2-[18F]-фторэтил)пиперидин-1-ил)-8-метоксибензо[4,5]имидазо[1,2-α]пиридин (Т821) демонстрирует отношение сигнала серого вещества к сигналу белого вещества (GM/WM), составляющее приблизительно 11,7±1,2. Таким образом, соединение 3-(4-(2-[18F]-фторэтил)пиперидин-1-ил)-8-метоксибензо[4,5]имидазо[1,2-α]пиридин (Т821) связывается с тау-белком, амилоидным белком и неустановленными сайтами связывания в нормальном мозге человека. Это отсутствие селективности представляет недостаток Т821 для использования при визуализации тау-белка.

В экспериментах, изложенных в примере анализа 5 и представленных на фиг. 6, соединение 3-(4-[18F]-фторпиперидин-1-ил)-8-метоксибензо[4,5]имидазо[1,2-α]пиридин (Т798) демонстрирует отношение селективности для Тау:Аβ, составляющее приблизительно 8,4±1,7, на основании 5 образцов мозга Тау⁺ Аβ⁺ и 2 образцов мозга Тау⁻Аβ⁺. Как изложено в примере анализа 5 и изображено на фиг. 6, соединение 3-(4-[18F]-фторпиперидин-1-ил)-8-метоксибензо[4,5]имидазо[1,2-α]пиридин (Т798) демонстрирует отношение сигнала серого вещества к сигналу белого вещества (GM/WM), составляющее приблизительно 18,0±3,2 на основании 5 образцов мозга Тау⁺Аβ⁺. Таким образом, соединение 3-(4-[18F]-фторпиперидин-1-ил)-8-метоксибензо[4,5]имидазо[1,2-α]пиридин (Т798) связывается с тау-белком, амилоидным белком и неустановленными сайтами связывания в нормальном мозге человека. Такое отсутствие селективности представляет недостаток Т798 для использования при визуализации тау-белка.

Таким образом, Т821 и Т798 демонстрируют худшую селективность по сравнению с соединением 8 не только между тау-белком и бета-амилоидом, но также и между тау-белком и неустановленными сайтами связывания, наблюдаемыми в нормальной ткани головного мозга человека, в общем и целом лишенной тау-белка и бета-амилоидного белка (см. фиг. 4 для соединения 8, фиг. 5 для Т821 и фиг. 6 для Т798). 3-(4-(2-[18F]-фторэтил)пиперидин-1-ил)-8-метоксибензо[4,5]имидазо[1,2-α]пиридин и 3-(4-[18F]-фторпиперидин-1-ил)-8-метоксибензо[4,5]имидазо[1,2-α]пиридин не являлись бы эффективными агентами для ПЭТ-визуализации тау-белка вследствие отсутствия селективности. В отличие от этого наблюдаемая селективность связывания 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2-α]пиридина (соединения 8) с нативными скоплениями тау-белка по сравнению со связыванием с натив-

ными скоплениями β -амилоида в области серого вещества мозга человека, пораженного БА, составляет приблизительно 27. Это неожиданное свойство соединения 8, заключающееся в селективном связывании, было бы особенно полезным для визуализации тау-белка и может обеспечивать улучшенные изображения тау-белка по сравнению с известными агентами, давая изображения с лучшей четкостью вследствие сильных сигналов тау-белка и сниженных сигналов, не обусловленных тау-белком. Специалисты в данной области техники поймут, как использовать радиофармацевтические препараты 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (соединение 8), или отдельно, или сопоставляя с существующими агентами для визуализации бета-амилоидов, для оценки накопления и распределения тау-белка при клинической визуализации у пациентов.

Пример анализа 6. Отсутствие связывания 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина со срезами нормального мозга человека.

Для того чтобы показать отсутствие связывания, не обусловленного тау-белками, получают авторыдиограммы с использованием 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина на нормальной ткани головного мозга человека. Экспериментальная методика является такой же, как представлена в примере 5, за исключением того, что наносят только 20 мКи 18F-лиганда на срезы ткани, и условия промывания менее жесткие. Фиг. 7 демонстрирует, что радиоактивный сигнал в нормальной ткани значительно ниже, чем в ткани мозга, пораженной БА, когда используют последовательные циклы промывки (2 мин в ФСБ, 2 мин в 10% этаноле/ФСБ, 2 мин в 30% этаноле/ФСБ, 2 мин в ФСБ). Сигнал в ткани мозга, пораженной БА (AD 30121, лобный отдел коры), можно блокировать с помощью меченого радиоактивным изотопом соединения или известного меченого соединения для ПЭТ-визуализации тау-белка T807 (также известен как AV-1451), что и следует ожидать в случае блокирования связывания, специфичного к тау-белку. Авторыдиографию дополнительно проводят без этанола в промывочных растворах. Фиг. 8 показывает, что по сравнению с [18F]T807 (также известен как AV-1451) меченое соединение для визуализации тау-белка 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин обладает значительно более низким авторыдиографическим сигналом в нормальной ткани коры или белого вещества. Такое значительное уменьшение связывания, не обусловленного тау-белками, для соединения 8 на нормальной ткани представляет неожиданно полезное улучшение по сравнению с [18F]T807/AV-1451.

Пример анализа 7. ПЭТ/КТ-изображение, полученное с использованием 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина, у мышей.

Изображения с использованием динамической позитронно-эмиссионной микротомографии (микроПЭТ) получают для мышей CD-1 дикого типа с использованием 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина. Компьютерную микротомографию (микроКТ) каждого субъекта используют как анатомический эталон при анализе изображений. Распределение меченого соединения в головном мозге, мышцах, костях, печени и почках оценивают путем построения кривых "активность-время" (ТАС) с использованием смешанных изображений микроПЭТ/микроКТ. Для микроПЭТ/микроКТ используют многорежимное сканирующее устройство INVEON (Siemens, Германия). Все эксперименты с животными выполняют в соответствии с утвержденными методиками Институционального комитета по уходу за животными и их использованию (Institutional Animal Care & Use Committee, University of Sciences).

Животным дают анестезию с помощью 3% изофлурана/97% кислорода и помещают на стол сканирующего устройства. Сначала осуществляют короткий цикл сканирования КТ с высокой разрешающей способностью для регистрации анатомии, а затем 120-минутный цикл сканирования ПЭТ. Во время сканирования ПЭТ под стол помещают водяную нагревательную систему, чтобы облегчить поддержание температуры тела. Через 3 мин после начала исследования ПЭТ животным посредством инъекции в хвостовую вену вводят [18F]-меченое соединение 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин (250 мКи в общем объеме 200 мкл раствора хлорида натрия). ПЭТ-изображение получают для каждой минуты периода исследования. Накопление меченого соединения определяют при визуальном отборе изучаемых областей исходя из смешанных изображений ПЭТ/КТ, и соответствующие значения активности определяют с использованием программного обеспечения INVEON Research Workplace (Siemens, Германия). Все значения представлены как процент введенной дозы на грамм (%ID/г).

Кривые "активность-время", полученные для 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина, сравнивают с полученными для известного меченого соединения для ПЭТ-визуализации тау-белка T807/AV-1451. 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин проникает в мозг с более высокими значениями %ID/г, чем [18F]AV-1451, быстро выводится и не характеризуется значительным накоплением радиоактивности в костной ткани. Эти свойства являются выигрышными для улучшенного агента для визуализации мозга.

Пример анализа 8. Кривые "активность-время" при ПЭТ/КТ для 3-(4-(2-[18F]-фторэтил)пиперидин-1-ил)-8-метоксибензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (T821) и 3-(4-[18F]-фторпиперидин-1-ил)-8-метоксибензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (T798) в сравнении с 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-

метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридином (соединение 8) у мышей.

Кривые "активность-время" при ПЭТ/КТ для 3-(4-(2-[18F]-фторэтил)пиперидин-1-ил)-8-метоксибензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (Т821) (см. фиг. 9) и 3-(4-[18F]-фторпиперидин-1-ил)-8-метоксибензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (Т798) (см. фиг. 10) у мышей получают, как описано в примере анализа 7 (Т821 и Т798 представлены в US 2011/0182812). Фиг. 9 и 10 иллюстрируют то, что накопление радиоактивности в костях увеличивается со временем для Т821 и Т798, указывая на вероятное высвобождение радиоактивного фторид-иона, который может метить кость. Следовательно, при визуализации с использованием Т821 и/или Т798 нежелательные сигналы ПЭТ, не обусловленные тау-белками, от костей черепа могут служить помехой необходимым сигналам, обусловленным тау-белками, от коры головного мозга. Таким образом, в дополнение к отсутствию селективности у Т821 и Т798 эти соединения будут дополнительно являться плохими кандидатами в меченые соединения для ПЭТ-визуализации тау-белков в мозге человека вследствие мешающего радиоактивного сигнала от кости. В сравнении с ними 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин (соединение 8) вызывает пренебрежимо малый радиоактивный сигнал в кости и обладает значительно большим и неожиданным накоплением в мозге по сравнению с наблюдаемым для Т821 и Т798. 3-(3-[18F]-Фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин обладает неожиданно выигрышными свойствами, которые необходимы для улучшенного агента для ПЭТ-визуализации тау-белка, включая подходящее распределение в тканях, подходящие ФК свойства и устойчивый профиль селективности к тау-белку. Выигрышные свойства соединения 8 пригодны для обеспечения улучшенной ПЭТ-визуализации тау-белка у людей. Эта комбинация критических свойств не была известна и не может быть предсказана из существующих соединений для визуализации тау-белка.

Пример анализа 9. Биораспределение 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (соединение 8) у здоровых мышей.

Для того чтобы определить распределение в органах, проникновение в мозг и выведение у здоровых мышей, 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин вводят здоровым мышам с последующим умерщвлением и расчленением через 2, 60, 120 и 180 мин после введения. Пока мыши находятся под анестезией 0,2 мл раствора хлорида натрия, содержащего 20 мКи 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина, вводят непосредственно в хвостовую вену. Для каждого момента времени используют три мыши, и их умерщвляют поэтапно. Собирают следующие органы и жидкости: кровь, селезенку, щитовидную железу, яички, сердце, печень, поджелудочную железу, почки, мышцы, кожу, желудок, кости, легкие, головной мозг, кишечник, мочеполовую систему. Органы взвешивают, и определяют радиоактивность каждого органа с использованием автоматического счетчика гамма-излучения (Perkin Elmer). Для кожи, костей, мышц и крови образец измеряют, и оценивают общую массу органа или жидкости. Образец вводимой дозы измеряют в качестве стандарта. Для каждого органа рассчитывают процент вводимой дозы на грамм ткани (%ID/г).

Уровень 9,53% дозы/г для 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина получен в мозге в момент времени, составляющий 2 мин. Выведение из мозга до менее 10% от максимального значения происходило до 30 мин и продолжалось в течение 2 ч. Радиоактивность распространялась главным образом в печень, кишечник и почки в первые две минуты и оставалась в кишечнике в течение периода исследования, составляющего два часа (табл. 4 и 5).

Уровни радиоактивности в печени и кишечнике вместе со средним содержанием в мочеполовой системе, которая включает в себя мочевой пузырь, свидетельствуют о том, что соединение и его метаболиты выводятся через печень и пищеварительную систему. Отсутствие увеличения радиоактивности в костной ткани указывает на то, что соединение и его метаболиты не подвергается дефторированию в первые два часа. Накопление в мышцах остается ниже 2% ID/г, что является предпочтительным для предполагаемых отношений сигнала к шуму для ПЭТ-визуализации у людей. Эти результаты указывают на то, что соединение 8 демонстрирует неожиданно выигрышное распределение в тканях, фармакокинетику и метаболическую стабильность *in vivo*. Эти свойства являются особенно выигрышными для улучшенного агента для визуализации мозга.

Таблица 4
Биораспределение 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо
[1,2- α]пиридина у здоровых мышей на грамм

Соединение 8	2		30		60		120	
	минуты		минут		минут		минут	
% дозы/г	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО
Кровь	2,52	0,84	1,14	0,32	0,87	0,46	0,50	0,03
Легкие	26,50	9,25	5,11	0,84	4,01	1,42	2,02	0,53
Сердце	4,79	0,65	0,76	0,12	0,49	0,20	0,27	0,02
Печень	7,32	2,61	2,76	0,73	3,10	0,88	1,35	0,14
Селезенка	10,89	9,64	1,98	0,52	1,15	0,59	0,57	0,05
Поджелудочная железа	8,74	4,50	1,15	0,47	0,60	0,30	0,23	0,01
Желудок	4,14	4,58	3,10	2,14	2,78	0,74	0,81	0,63
Кишечник	5,77	1,83	10,09	3,63	15,40	7,58	11,88	2,99
Почка	39,08	19,02	5,98	2,01	4,32	4,96	1,19	0,48
Яички	1,78	0,71	1,56	0,58	0,88	0,57	0,31	0,04
Жировая ткань	1,09	0,61	0,63	0,26	0,27	0,17	0,11	0,03
Хвост	14,93	8,01	2,77	1,83	2,10	1,77	0,84	0,20
Мочеполовая система	4,33	2,10	22,15	11,37	13,95	13,18	30,39	40,67
Мозг	9,53	3,41	0,39	0,13	0,26	0,07	0,23	0,08
Щитовидная железа	6,01	0,80	0,81	0,10	0,68	0,09	0,60	0,19
Мышцы	1,81	1,35	0,46	0,13	0,31	0,11	0,25	0,12
Кожа	0,96	0,63	0,55	0,03	0,36	0,15	0,39	0,23
Кости	1,89	1,08	0,93	0,19	0,97	0,28	0,72	0,66
Оставшаяся часть тела	2,43	0,55	0,71	0,12	0,54	0,32	0,29	0,03

Таблица 5
Биораспределение [18F] 3-(3-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]
пиридин у здоровых мышей на орган

Соединение 8	2		30		60		120	
	минуты		минут		минут		минут	
% дозы/орган	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО
Кровь	4,54	1,47	2,03	0,53	1,63	0,91	0,89	0,09
Легкие	5,18	1,97	0,99	0,20	0,74	0,22	0,37	0,12
Сердце	0,72	0,07	0,11	0,02	0,08	0,04	0,04	0,00
Печень	11,56	4,33	4,22	1,10	4,73	1,67	1,86	0,37
Селезенка	1,00	0,88	0,19	0,04	0,12	0,05	0,05	0,00
Поджелудочная железа	1,31	0,56	0,15	0,03	0,13	0,07	0,03	0,00
Желудок	1,52	1,23	1,80	1,22	3,25	3,31	0,45	0,36
Кишечник	15,39	4,25	28,28	9,63	32,10	31,56	32,80	10,45
Почка	15,93	7,93	2,56	0,96	1,73	2,26	0,44	0,15
Яички	0,30	0,14	0,23	0,07	0,20	0,10	0,05	0,01
Жировая ткань	0,27	0,14	0,21	0,15	0,12	0,07	0,03	0,01
Хвост	10,85	5,28	1,93	1,26	1,35	1,57	0,61	0,15
Мочеполовая система	0,75	0,25	3,92	2,67	3,23	2,34	6,52	9,82
Мозг	4,42	1,57	0,17	0,06	0,09	0,08	0,11	0,04
Щитовидная железа	0,10	0,02	0,01	0,01	0,11	0,17	0,06	0,09
Мышцы	19,01	14,26	4,68	1,16	3,30	1,29	2,51	1,16
Кожа	3,74	2,48	2,10	0,06	1,44	0,64	1,46	0,78
Кости	6,87	4,00	3,31	0,57	3,62	1,17	2,50	2,31
Оставшаяся часть тела	38,48	9,59	10,62	1,69	8,64	5,23	4,42	0,21

Пример анализа 10. ПЭТ-визуализация тау-белка в мозге пациентов болезнью Альцгеймера с использованием 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (соединение 8).

Клиническую оценку 3-(3-[18F]-фторазетидин-1-ил)-8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридина (соединение 8) в качестве радиолиганда для ПЭТ-визуализации накопления тау-белка у пациентов с БА или другими нейродегенеративными расстройствами проводят у здоровых добровольцев, пациентов с БА или субъектов с хронической травматической энцефалопатией (ХТЭ) путем выполнения одного или более циклов сканирования ПЭТ с соединением 8. Динамическую ПЭТ-визуализацию осуществляют на Siemens ECAT EXACT HR+ в течение 150 мин после введения соединения 8 или [18F]AV-1451 (участки визуализации 0-60 и 90-150 мин). Изображения с использованием соединения 8 или [18F]AV-1451 получают подобным образом за два сеанса визуализации. Также выполняют МРТ головного мозга. Изображения ПЭТ и МРТ центрируют и нормализуют, и ряд, полученный с использованием динамической ПЭТ, сравнивают с известными (ATLAS) исследуемыми объемными областями (VOI). Соединение 8 или [18F]AV-1451 оценивают касательно кинетического профиля, а также отношения стандартизированных уровней накопления в целевой области и мозжечке (SUV_T между 100-120 мин.) для здоровых добровольцев и субъектов с БА и ХТЭ.

Распределение у здоровых контрольных субъектов и субъектов с БА аналогично для одного и того же субъекта для соединения 8 и [18F]AV-1451. Соединение 8 и [18F]AV-1451 демонстрируют похожее распределение у одного и того же субъекта в отношении накопления тау-белка по всему мозгу субъектов с БА. Для субъектов с БА наблюдается более высокое накопление в областях коры головного мозга по сравнению со здоровыми контрольными субъектами как для соединения 8, так и для [18F]AV-1451. Соединение 8 демонстрирует более высокое максимальное накопление в мозге, составляющее ~8 SUV по сравнению с ~6 SUV для [18F]AV-1451. Соединение 8 и [18F]AV-1451 демонстрируют похожее выведение из мозга. Метаболизм соединения 8 быстрый, при этом через 60 мин после инъекции остается 5 \pm 3% (n=7) неизмененного исходного соединения.

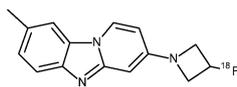
Кривые SUV_T для соединения 8 быстро приходят в равновесие у здоровых добровольцев в областях коры головного мозга при значениях около 1,0-1,1, тогда как в подкорковых областях (путамен, таламус) накопление, по-видимому, снижено по сравнению с [18F]AV-1451. У субъектов с БА, аналогично [18F]AV-1451, кривые SUV_T для соединения 8 не приходят в равновесие за время исследования (150 мин), хотя соединение 8 демонстрирует немного более высокие значения SUV_T по сравнению с [18F]AV-1451. Изображения, полученные с соединением 8, четче и характеризуются более низким неспецифическим фоновым сигналом. Графики SUV_T для соединения 8 демонстрируют хорошее разделение между здоровыми добровольцами и субъектами с БА, причем среднее SUV_T для здоровых добровольцев составляет ~1,1, а для субъектов с БА - ~1,6, усредненное для всех областей. Соединение 8 демонстрирует более высокое накопление в мозге по сравнению с [18F]AV-1451, как у здоровых добровольцев, так и у субъектов с БА, при этом максимальное значение SUV соединения 8 на ~50 % выше, чем [18F]AV-1451.

Распределение соединения 8 у субъектов с ХТЭ характеризуется небольшими фокальными областями с повышенным накоплением. Для субъектов с ХТЭ меньшие исследуемые объемные области вручную очерчивают в фокальных областях с высоким накоплением (подобласти ниже боковой теменной коры, выше теменной коры и сзади от височной коры). Кривые SUV_T для соединения 8 в этих под областях характеризуются повышенным сигналом, достигающим ~1.5, при этом для других областей коры значения остаются близкими к 1,0, подобно здоровым добровольцам.

Такие результаты, как описаны в примере анализа 10 и в других примерах анализов, поддерживают применение соединения 8 в качестве улучшенного и обладающего преимуществами зонда для ПЭТ-визуализации для определения уровней агрегированного тау-белка у пациентов с БА и/или другими нейродегенеративными расстройствами, такими как ХТЭ.

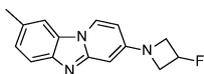
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы



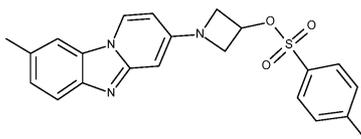
или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение формулы

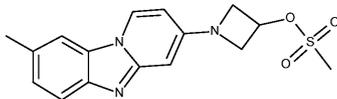


или его фармацевтически приемлемая соль.

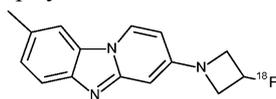
3. Соединение формулы



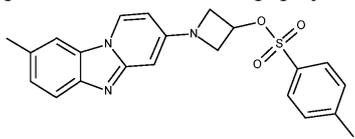
4. Соединение формулы



5. Способ получения соединения формулы

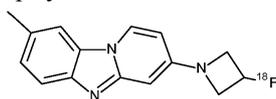


включающий в себя введение в реакцию соединения формулы

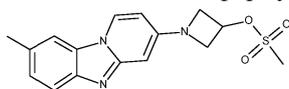


с источником [^{18}F]фторида.

6. Способ получения соединения формулы

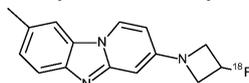


включающий в себя введение в реакцию соединения формулы



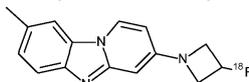
с источником [^{18}F]фторида.

7. Фармацевтическая композиция для визуализации тау-белка, содержащая



или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

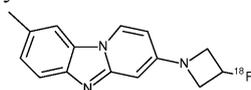
8. Фармацевтическая композиция для визуализации тау-белка, содержащая



и 10% EtOH (об./об.), 0,45% (мас./об.) аскорбата натрия в 0,9%-м хлориде натрия.

9. Способ визуализации агрегированного тау-белка, включающий в себя:

а) введение млекопитающему обнаруживаемого количества соединения



или его фармацевтически приемлемой соли,

б) выдерживание в течение периода времени, достаточного для того, чтобы указанное соединение связалось с тау-белком, и

с) детектирование указанного соединения, связанного с тау-белком.

10. Способ визуализации агрегированного тау-белка, включающий в себя:

а) введение млекопитающему обнаруживаемого количества композиции по п.7 или 8;

б) выдерживание в течение периода времени, достаточного для того, чтобы указанная композиция связалась с тау-белком; и

с) детектирование композиции.

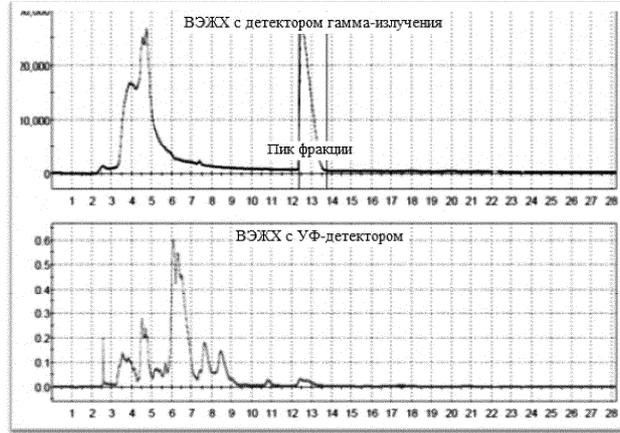
11. Способ по п.9, отличающийся тем, что млекопитающее представляет собой человека с подозрением на болезнь Альцгеймера.

12. Способ по п.10, отличающийся тем, что млекопитающее представляет собой человека с подозрением на болезнь Альцгеймера.

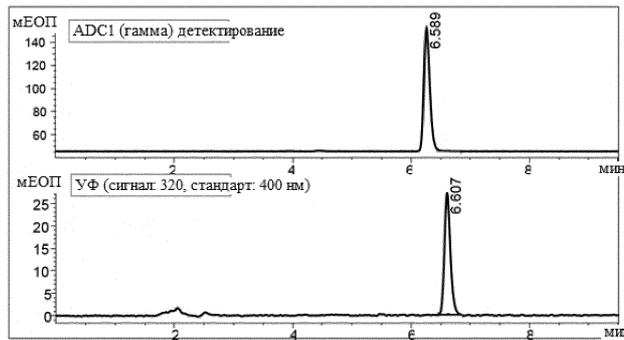
13. Способ по п.9, отличающийся тем, что млекопитающее представляет собой человека с подозрением на хроническую травматическую энцефалопатию (ХТЭ).

14. Способ по п.10, отличающийся тем, что млекопитающее представляет собой человека с подозрением на хроническую травматическую энцефалопатию (ХТЭ).

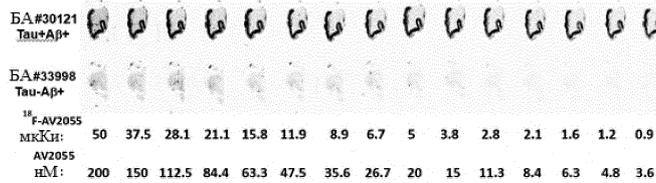
15. Промежуточное соединение для получения соединения по п.3, при этом указанное промежуточное соединение представляет собой 1-(8-метилбензо[4,5]имидазо[1,2- α]пиридин-3-ил)азетидин-3-ол.



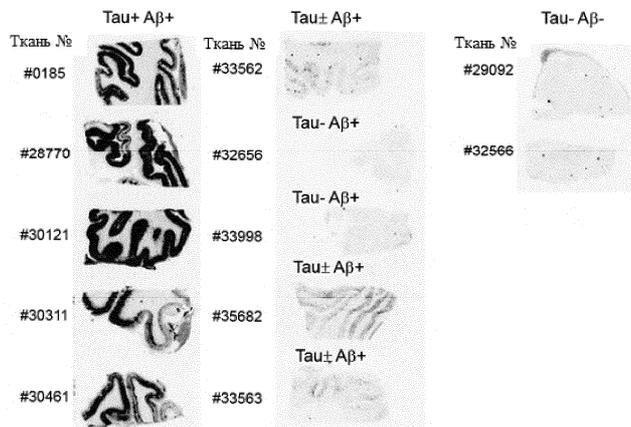
Фиг. 1



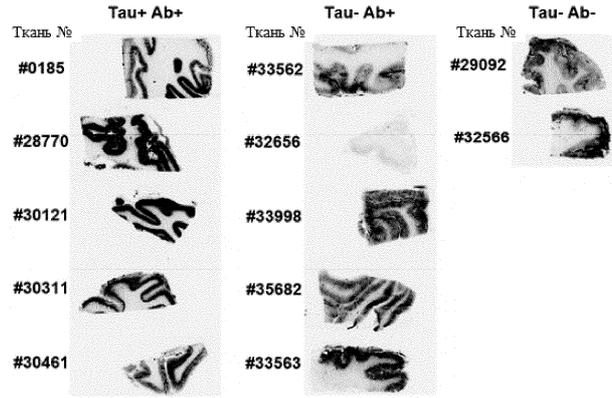
Фиг. 2



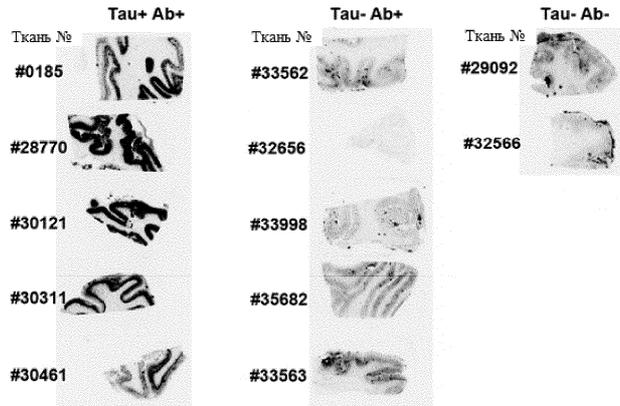
Фиг. 3



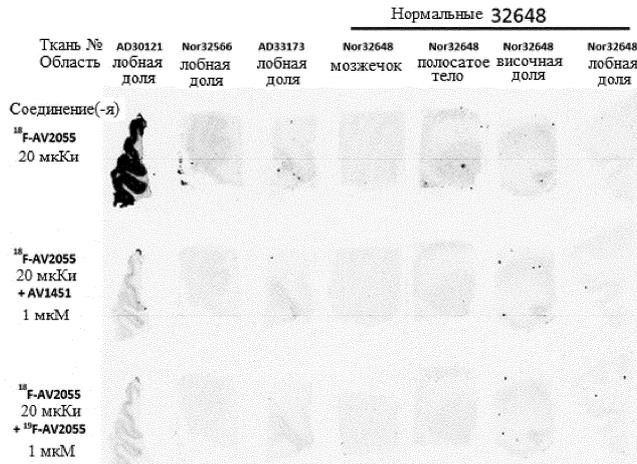
Фиг. 4



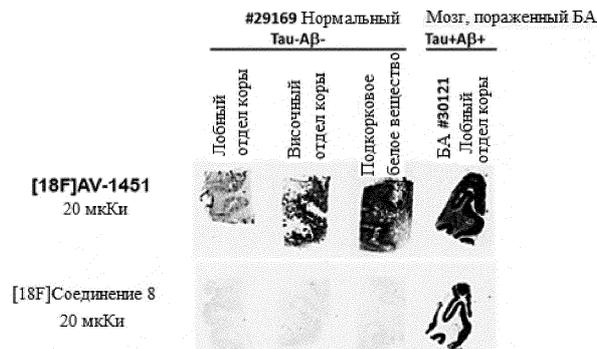
Фиг. 5



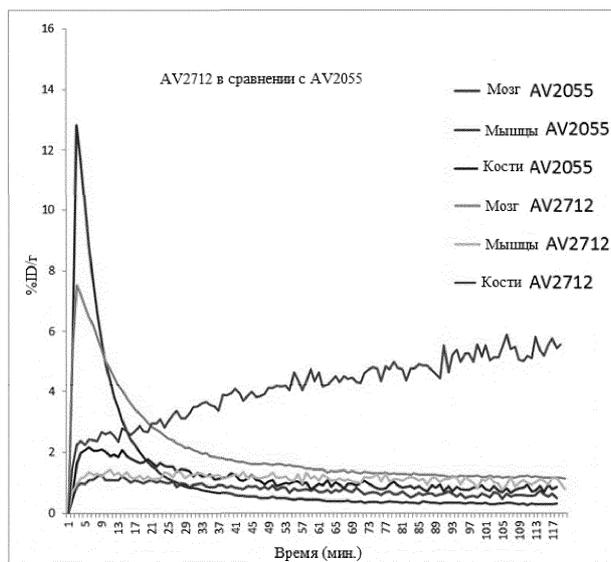
Фиг. 6



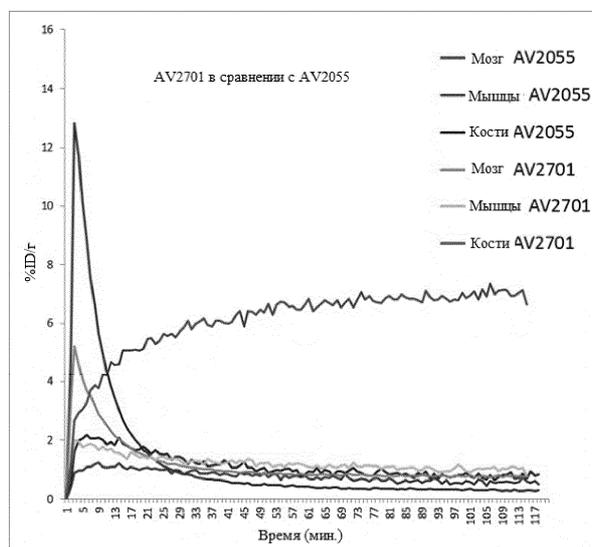
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

