

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **039208**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2021.12.17**

(21) Номер заявки  
**201990319**

(22) Дата подачи заявки  
**2017.07.14**

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

**(54) ЛИГАНДЫ ДЛЯ ПЕТ-ВИЗУАЛИЗАЦИИ ТАУ-БЕЛКОВ**

(31) **62/363,452; 16204242.8; 17152062.0**

(32) **2016.07.18; 2016.12.15; 2017.01.18**

(33) **US; EP; EP**

(43) **2019.06.28**

(86) **PCT/EP2017/067898**

(87) **WO 2018/015307 2018.01.25**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЯНССЕН ФАРМАЦЕВТИКА НВ (BE)**

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

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

(56) E.D. HOSTETLER ET AL.: "Preclinical Characterization of 18F-MK-6240, a Promising PET Tracer for In Vivo Quantification of Human Neurofibrillary Tangles", THE JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, vol. 57, no. 10, 26 May 2016 (2016-05-26), pages 1599-1606, XP055374993, ISSN: 0161-5505, DOI: 10.2967/jnumed.115.171678, abstract, figures, page 1604 - page 1605

KJELL N. NOT AGREN ET AL.: "Radiopharmaceuticals for positron emission tomography investigations of Alzheimer's disease", EUROPEAN JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE AND MOLECULAR IMAGING, vol. 37, no. 8, 22 December 2009 (2009-12-22), pages 1575-1593, XP019841927, ISSN: 1619-7089, abstract, page 1585

WILEY C.A. ET AL.: "Carbon 11-labeled Pittsburgh compound B and carbon 11-labeled (R)-PK11195 positron emission tomographic imaging in Alzheimer disease", ARCHIVES OF NEUROLOGY, vol. 66, no. 1, January 2009 (2009-01), pages 60-67, XP002770459, ISSN: 0003-9942, DOI: 10.1001/archneurol.2008.511, abstract

(57) 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). 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 предшественников указанных соединений.

**B1****039208****039208 B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

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). 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 предшественников указанных соединений.

### Уровень техники 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 при этом пациенты с AD нуждаются во всестороннем уходе, осуществляемом либо в доме престарелых, либо 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 распространенным нейродегенеративным расстройством является AD, агрегированный тау-белок также является характерным для других нейродегенеративных заболеваний, известных как "виды таупатии", которые также, но не исключительно, включают в себя деменцию, характеризующуюся только клубками (TD), заболевание, характеризующееся появлением аргирофильных зерен (AGD), прогрессирующий надъядерный паралич (PSP), кортикобазальную дегенерацию (CBD), болезнь Пика (PiD), а также лобно-височную деменцию и паркинсонизм, связанные с хромосомой 17 (FTDP-17). Гетерогенность этих 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); эта вариабельность преобразовывается в полиморфизм. Была выявлена корреляция нейрофибриллярных клубков с уровнем когнитивного нарушения при AD и/или шансом развития AD. Однако диагноз все еще может быть поставлен 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 Аβ-пептидов и общего количества тау-белков в спинно-мозговой жидкости с помощью люмбальной пункции является инвазивным и подвержено нежелательным эффектам. Помимо собственной сложности AD, разработка средств для лечения препятствует недостатку 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 обеспечить такие способы, в частности, при появлении способов лечения в отношении тау-белков.

Позитронно-эмиссионная томография (PET) представляет собой неинвазивную методику визуализации, которая предоставляет самое высокое пространственное и временное разрешение среди всех методов радионуклидной визуализации и обладает дополнительным преимуществом, заключающимся в том, что она может обеспечивать возможность правильного количественного определения концентраций маркеров в тканях. В ней для обнаружения применяются позитронно-активные радионуклиды.

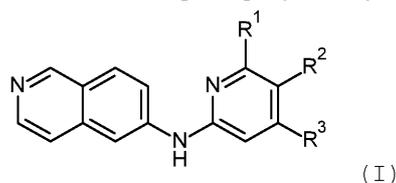
До настоящего времени было заявлено несколько радиоактивных маркеров для позитронно-эмиссионной томографии для визуализации агрегатов тау-белков (для обзора см., например, Ariza et al. *J. Med. Chem.* 2015, 58, 4365-4382). В "Preclinical Characterization of <sup>18</sup>F-MK-6240, a promising PET Tracer for In Vivo Quantification of Human Neurofibrillary Tangles" in *J. Nucl. Med.* 2016; 57: 1599-1610 раскрыт 6-фтор-3-(1H-пирроло[2,3-с]пиридин-1-ил)изохинолин-5-амин, который связывается с высокой аффинностью с гомогентами коры головного мозга больного AD человека, содержащими избыточную NFT, но плохо связывается с богатыми на амилоидные бляшки, бедными на NFT гомогентами головного мозга больного AD. Умеренное дефторирование наблюдается с <sup>18</sup>F-MK-6240, поглощаемым черепной коробкой. В статье "Radiopharmaceuticals for positron emission tomography investigations of Alzheimer's disease" in *Eur. J. Nucl. Med. Imaging* 2010; 37(8): 1575-1593 сообщается об изохинолиновом соединении [<sup>11</sup>C]PK11195, которое связывается с периферическими кортикальными бензодиазепиновыми рецепторами в активированной микроглии и которое, как далее сообщается в статье "Carbon 11-labeled Pittsburgh compound B and carbon 11-labeled (R)-PK11195 positron emission tomographic imaging in Alzheimer's disease" in *Arch. Neurol.* 2009; 66(1): 60-67, не демонстрирует каких-либо различий в удержании в мозге у боль-

ных и здоровых добровольцев. PET-визуализация головного мозга человека с хинолиновым соединением  $^{18}\text{F}$ -ТНК5351, характеризующимся высокой аффинностью по отношению к РНФ, как было показано, затрудняется нецелевым связыванием с ферментом моноаминоксидазой MAO-B (Alzheimer's Research & Therapy 2017; 9; 25 DOI 10.1186/s13195-017-0253-y).

Все еще существует потребность в обеспечении селективных, улучшенных радиоактивных маркеров для позитронно-эмиссионной томографии для визуализации агрегатов тау-белков с надлежащим балансом свойств, включающих без ограничения высокую аффинность и селективность в отношении агрегатов тау-белков, обратимое связывание, проникаемость, подходящий фармакокинетический профиль в головном мозге, т.е. быстрое распределение в мозге, быстрый клиренс, минимальное неспецифическое связывание и доступность для синтеза.

#### Краткое описание изобретения

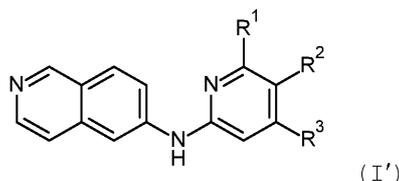
Следовательно, цель настоящего изобретения заключается в обеспечении изохинолин-6-аминовых соединений, применимых в качестве радиоактивных маркеров tau PET. Следовательно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к соединению, характеризующемуся формулой (I)



где по меньшей мере один атом является радиоактивным, и где  $\text{R}^2$  представляет собой метил, и либо  $\text{R}^1$  представляет собой F, и  $\text{R}^3$  представляет собой H, либо  $\text{R}^1$  представляет собой H, и  $\text{R}^3$  представляет собой F; или

$\text{R}^1$  и  $\text{R}^3$  одновременно представляют собой H, и  $\text{R}^2$  выбран из группы, состоящей из  $-\text{C}_{1-4}$ алкил-F,  $-\text{OC}_{1-4}$ алкил-F и  $-\text{NR}^4-\text{C}_{1-4}$ алкил-F, где  $\text{R}^4$  представляет собой H или метил; или его фармацевтически приемлемым соли или сольвату.

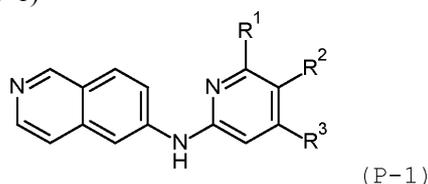
В частности, настоящее изобретение относится к соединению формулы (I')



где  $\text{R}^2$  представляет собой метил, и либо  $\text{R}^1$  представляет собой  $^{18}\text{F}$ , и  $\text{R}^3$  представляет собой H, либо  $\text{R}^1$  представляет собой H, и  $\text{R}^3$  представляет собой  $^{18}\text{F}$ ; или

$\text{R}^1$  и  $\text{R}^3$  одновременно представляют собой H, и  $\text{R}^2$  выбран из группы, состоящей из  $-\text{C}_{1-4}$ алкил- $^{18}\text{F}$ ,  $-\text{OC}_{1-4}$ алкил- $^{18}\text{F}$  и  $-\text{NR}^4-\text{C}_{1-4}$ алкил- $^{18}\text{F}$ , где  $\text{R}^4$  представляет собой H или метил; или его фармацевтически приемлемым 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 формулы (P-1)



где  $\text{R}^2$  представляет собой метил, и либо  $\text{R}^1$  выбран из группы, состоящей из Br,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{[N(CH}_3)_3]^+$  и  $4-\text{CH}_3-\text{Ph-SO}_2-\text{O}-$ , и  $\text{R}^3$  представляет собой H, либо  $\text{R}^1$  представляет собой H, и  $\text{R}^3$  выбран из группы, состоящей из Br,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{[N(CH}_3)_3]^+$  и  $4-\text{CH}_3-\text{Ph-SO}_2-\text{O}-$ ; или

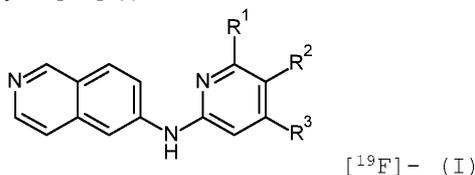
$\text{R}^1$  и  $\text{R}^3$  одновременно представляют собой H, и  $\text{R}^2$  выбран из группы, состоящей из  $-\text{C}_{1-4}$ алкил-Br,  $-\text{C}_{1-4}$ алкил-I,  $-\text{C}_{1-4}$ алкил-O-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,  $4-\text{CH}_3-\text{Ph-SO}_2-\text{O}-\text{C}_{1-4}$ алкил-,  $-\text{C}_{1-4}$ алкил-OH,  $-\text{OC}_{1-4}$ алкил-Br,  $-\text{OC}_{1-4}$ алкил-I,  $-\text{OC}_{1-4}$ алкил-O-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,  $4-\text{CH}_3-\text{Ph-SO}_2-\text{O}-\text{C}_{1-4}$ алкил-O-,  $-\text{OC}_{1-4}$ алкил-OH,  $-\text{NR}^4-\text{C}_{1-4}$ алкил-Br,  $-\text{NR}^4-\text{C}_{1-4}$ алкил-I,  $-\text{NR}^4-\text{C}_{1-4}$ алкил-O-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,  $4-\text{CH}_3-\text{Ph-SO}_2-\text{O}-\text{C}_{1-4}$ алкил-NR<sup>4</sup>- и  $-\text{NR}^4-\text{C}_{1-4}$ алкил-OH, где  $\text{R}^4$  представляет собой H или метил;

или его фармацевтически приемлемым соли или сольвату.

В соединениях формулы (P-1), в случае если либо  $\text{R}^1$ , либо  $\text{R}^3$  представляет собой  $-\text{[N(CH}_3)_3]^+$ , то приемлемые анионные противоионы включают в себя без ограничения трифторацетат ( $-\text{[OC(O)CF}_3\text{]}^-$ ), органический сульфонат (например,  $\text{C}_{1-4}$ алкилсульфонат или фенилсульфонат, где фенил может быть необязательно замещен  $\text{C}_{1-4}$ алкилом, галогеном или нитрогруппой) и тартрат. Конкретные примеры  $\text{C}_{1-4}$ алкилсульфоната включают метансульфонат (мезилат), 4-метилбензолсульфонат (тозилат), 4-бром-

бензолсульфонат и 4-нитробензолсульфонат. В частности, анионный противоион выбран из трифторацетата, тозилата и мезилата.

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



где  $\text{R}^2$  представляет собой метил, и либо  $\text{R}^1$  представляет собой F, и  $\text{R}^3$  представляет собой H, либо  $\text{R}^1$  представляет собой H, и  $\text{R}^3$  представляет собой F; или

$\text{R}^1$  и  $\text{R}^3$  одновременно представляют собой H, и  $\text{R}^2$  выбран из группы, состоящей из  $-\text{C}_{1-4}$ алкил-F,  $-\text{OC}_{1-4}$ алкил-F и  $-\text{NR}^4-\text{C}_{1-4}$ алкил-F, где  $\text{R}^4$  представляет собой H или метил;

или его фармацевтически приемлемым соли или сольвату.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I), в частности соединение формулы (I'), или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемые 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), в частности соединение формулы (I'), описанное в данном документе.

Настоящее изобретение дополнительно относится к применению соединения формулы (I), в частности соединения формулы (I'), в качестве средства для визуализации. В качестве примера, в настоящем изобретении представлено применение соединения формулы (I), в частности 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), в частности соединению формулы (I'), для применения для связывания и визуализации агрегатов тау-белков у пациентов, страдающих таупатией или предположительно страдающих таковой. 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), а также 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), в частности соединению формулы (I'), для диагностической визуализации агрегатов тау-белков в головном мозге субъекта и к применению соединения формулы (I), в частности 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), а также лобно-височную деменцию и паркинсонизм, связанные с хромосомой 17 (FTDP-17). В частности, таупатия представляет собой болезнь Альцгеймера.

Изобретение также относится к способу визуализации ткани или субъекта, предусматривающему приведение выявляемого количества меченого соединения формулы (I), в частности меченого соединения формулы (I'), описанного в данном документе, в контакт с тканью или субъектом, или доставку в них, или введение в них, и выявление соединения формулы (I), в частности соединения формулы (I').

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

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения соединения формулы (I'-a) или (I'-b), упоминаемого, в частности, ниже, как (I'-a1), (I'-a2), (I'-b1), (I'-b2), (I'-b3), или его фармацевтически приемлемых соли или сольвата, описанных в данном документе, предусматривающего:

(a) стадию осуществления реакции соединения формулы (P-a1) или его фармацевтически приемлемых соли или сольвата, определенных в данном документе, с источником фторида  $^{18}\text{F}^-$  в приемлемых условиях, или

(b) стадию осуществления реакции соединения формулы (P-a2) или его фармацевтически приемлемых соли или сольвата, определенных в данном документе, с источником фторида  $^{18}\text{F}^-$  в приемлемых

условиях, или

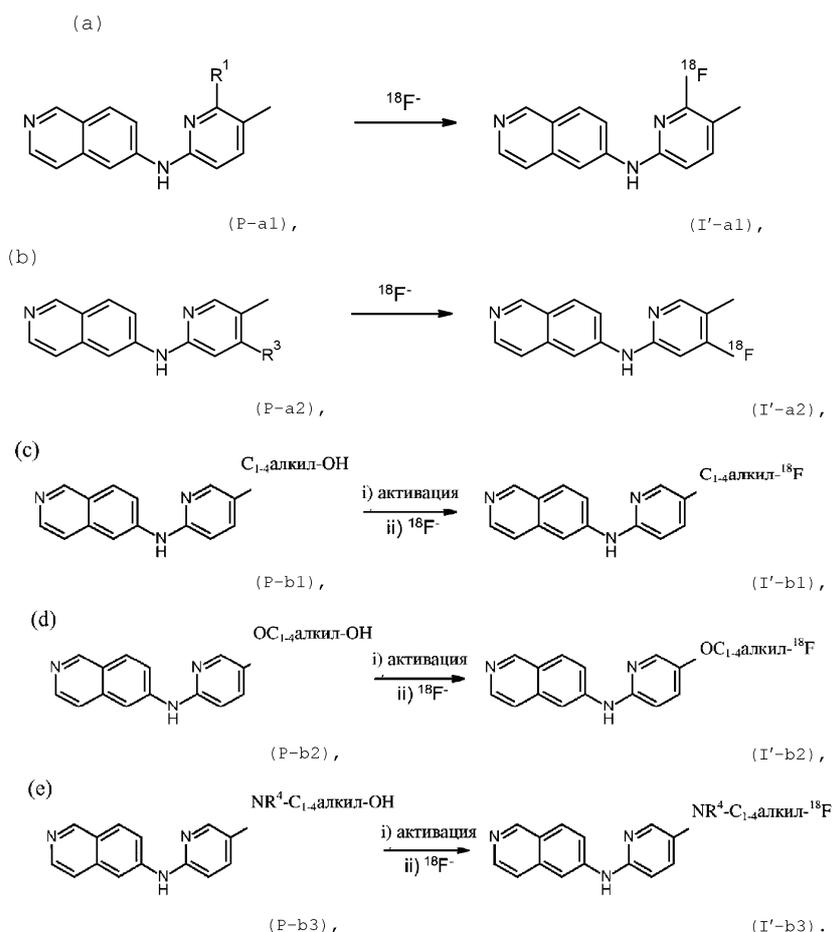
(с) стадию осуществления реакции соединения формулы (P-b1) или его фармацевтически приемлемой соли, определенных в данном документе, с активирующим реагентом, таким как метансульфонилхлорид или 4-толуолсульфонилхлорид, в присутствии основания, такого как триэтиламин или N,N-диизопропилэтиламин (DIPEA), и последующего осуществления реакции полученного в результате метансульфоната или 4-толуолсульфоната с источником фторида  $^{18}\text{F}^-$  в приемлемых условиях, или

(d) стадию осуществления реакции соединения формулы (P-b2) или его фармацевтически приемлемой соли, определенных в данном документе, с активирующим реагентом, таким как метансульфонилхлорид или 4-толуолсульфонилхлорид, в присутствии основания, такого как триэтиламин или DIPEA, и последующего осуществления реакции полученного в результате метансульфоната или 4-толуолсульфоната с источником фторида  $^{18}\text{F}^-$  в приемлемых условиях, или

(e) стадию осуществления реакции соединения формулы (P-b3) или его фармацевтически приемлемой соли, определенных в данном документе, с активирующим реагентом, таким как метансульфонилхлорид или 4-толуолсульфонилхлорид, в присутствии основания, такого как триэтиламин или DIPEA, и последующего осуществления реакции полученного в результате метансульфоната или 4-толуолсульфоната с источником фторида  $^{18}\text{F}^-$  в приемлемых условиях.

Типичные условия для активации предшественников формул (P-b1), (P-b2) и (P-b3) включают, например, метансульфонилхлорид в качестве активирующего средства, сухой диметилсульфоксид (DMSO) в качестве растворителя, при комнатной температуре на протяжении периода времени, достаточного для доведения реакции до завершения, как правило 10 мин. Специалисту в данной области будет понятно, что в случае, если  $\text{R}^4$  представляет собой H в (P-b3) - получение соединения формулы (I'-b3) будет предусматривать дополнительные стадии защиты аминной функциональной группы с помощью приемлемой защитной группы, например такой, как трет-бутилоксикарбонил (Boc) или альтернативная приемлемая защитная группа амина, и последующего отщепления такой защитной группы с использованием, как правило, трифторуксусной кислоты (TFA), в случае если защитной группой является Boc.

Подходящий источник  $^{18}\text{F}^-$  представляет собой, например, 4,7,13,16,21,24-гексаокса-1,10-дизабцикло[8.8.8]гексакозана [ $^{18}\text{F}$ ]-фторид калия (1:1) (также называемый [ $^{18}\text{F}$ ]KF.K222). Приемлемые условия предусматривают такие, которые соответствуют нуклеофильному замещению, известному из уровня техники, например с использованием DMSO или DMF в качестве растворителя, в частности DMSO, при традиционном нагревании или микроволновом излучении (например, 50 Вт), например, при приблизительно 90-160°C или при приблизительно 120-160°C, в частности при приблизительно 90 или 160°C, на протяжении периода времени, достаточного обеспечения протекания реакции до завершения, например 10 мин, в случае если реакцию осуществляют при микроволновом излучении



### Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показана *in vitro* автордиография (ARG) с использованием [ $^{18}\text{F}$ ]соед. № 1 (7,4 кБк/500 мкл/срез) на срезе зрительной зоны коры пациента с AD (стадия по Брааку VI) (А). Смежные срезы подвергали иммуноокрашиванию в отношении патологии, связанной с тау-белками (В, АТ8), и в отношении патологии, связанной с бета-амилоидами (С, 4G8);

на фиг. 2 - сравнение между ARG, показанной на фиг. 1 (А), и смежными срезами головного мозга больного AD человека, инкубируемыми с [ $^{18}\text{F}$ ]соед. № 1 (7,4 кБк/500 мкл/срез) в присутствии аутентичного эталонного соединения соед. № 1 (В) или Т808 (С) при 1 мкмоль/л;

на фиг. 3 - инкубация с 10 нМ [ $^3\text{H}$ ]соед. № 1 на ткани базального ганглия (стриатума) человека (А) с последующей обработкой 10 мкМ соед. № 1 (В) или 10 мкМ ТНК5351 (С). На фиг. 3D показана инкубация с 10 нМ [ $^3\text{H}$ ]соед. № 1 на ткани больного AD человека (париентальная-височная кора, стадия по Брааку VI) с подтвержденной патологией, связанной с тау-белками, и патологией, связанной с амилоидами, с помощью ИНС, как показано на фиг. 4. На фиг. 3E показана инкубация с 10 нМ [ $^3\text{H}$ ]соед. № 1 на ткани больного AD человека (латеральная затылочная извилина, стадия по Брааку 0), с подтвержденной патологией, связанной с амилоидами, но без патологии, связанной с тау-белками, с помощью ИНС, как показано на фиг. 5. На фиг. 3F показана инкубация с 10 нМ [ $^3\text{H}$ ]ТНК5351 на ткани базального ганглия человека и обработка 10 мкМ соед. № 1 (G) или 10 мкМ ТНК5351 (H). На фиг. 3I показана инкубация с [ $^3\text{H}$ ]ТНК-5351 на ткани больного AD человека (париентальная-височная кора, стадия по Брааку VI) с подтвержденной патологией, связанной с тау-белками, и патологией, связанной с амилоидами, как показано на фиг. 4. На фиг. 3J показана инкубация с 10 нМ [ $^3\text{H}$ ]ТНК5351 на ткани больного AD человека (латеральная затылочная извилина, стадия по Брааку 0), с подтвержденной патологией, связанной с амилоидами, но без патологии, связанной с тау-белками, как показано на фиг. 5. На фиг. 3K показана инкубация с 3 нМ [ $^3\text{H}$ ]-AV-45 на базальном ганглии человека (К) вышеупомянутой ткани больного AD человека как с патологией, связанной с бета-амилоидами, так и патологией, связанной с тау-белками (L), и вышеупомянутой ткани больного AD человека с патологией, связанной с бета-амилоидами, но без патологии, связанной с тау-белками (M);

на фиг. 4 - 4G8 и АТ8 ИНС патологии, связанной с амилоидами, и патологии, связанной с тау-белками, на срезах мозга больного AD из области париентальной-височной коры того же пациента, что и срезы, используемые для изображений на фиг. 3;

на фиг. 5 - срез головного мозга больного AD человека (латеральная затылочная извилина, женщина), смежный со срезом, используемым на фиг. 3E и 3J. Присутствие бета-амилоидных бляшек (А, В) и

отсутствие тау-клубков (C, D) подтверждали иммуногистохимией с использованием соответственно антител 4G8 и AT8;

на фиг. 6 - ИНС-подтверждение экспрессии MAO-B (слева) и MAO-A (справа) в ткани базального ганглия человека, используемой для *in vitro* связывания, показанного на фиг. 3;

на фиг. 7 - инкубация с 0,2 мКи/мл [<sup>18</sup>F]соед. № 1 на срезах ткани больного AD человека (париентальной-височной коры, стадия по Брааку VI) (A), и обработка 10 мкМ клоргиллина (B), 10 мкМ депренила (C) и 10 мкМ соед. № 1 (D);

на фиг. 8 - AT8 и 4G8 ИНС соответственно патологии, связанной с тау-белками, и патологии, связанной с амилоидами, на срезах мозга больного AD (париентальная-височная кора, стадия по Брааку VI), смежных со срезами, упомянутыми на фиг. 7;

на фиг. 9 - кривые время-активность для  $\mu$ PET, выраженные как стандартизированные величины поглощения (SUV) для [<sup>18</sup>F]соед. № 1;

на фиг. 10 - кривые время-активность для  $\mu$ PET для [<sup>18</sup>F]T807 (C) на целом мозге трех самок крыс Wistar. Показаны три отдельных исследования: исходное сканирование (только маркер); эксперимент перед обработкой (холодное соед. № 1 или T807, 10 мг/кг, инъецировали подкожно за 60 мин до инъекции радиоактивного маркера), и исследование слежения за меткой (холодное соед. № 1 или T807, 1 мг/кг, инъецировали внутривенно через 30 мин после инъекции радиоактивного маркера);

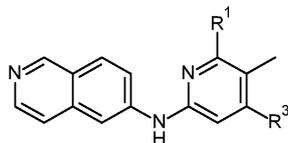
на фиг. 11 - кривые %SUV<sub>макс.</sub> кривых время-активность, полученных с помощью PET на мелком животном, [<sup>18</sup>F]соед. № 1 и [<sup>18</sup>F]T807 в целом головном мозге крысы линии Wistar;

на фиг. 12 - кривые время-активность, полученные с помощью  $\mu$ PET для [<sup>18</sup>F] соед. № 1, и на фиг. 13 показаны кривые время-активность, полученные с помощью  $\mu$ PET для [<sup>18</sup>F] T807 в целом головном мозге, в мозолистом теле, в мозжечке и в энторинальной области коры и черепе макака-резуса;

на фиг. 14 - кривые %SUV<sub>макс.</sub> кривых время-активность, полученных с помощью  $\mu$ PET на мелком животном, [<sup>18</sup>F]соед. № 1 и [<sup>18</sup>F]T807 в целом головном мозге макака-резуса.

#### Подробное описание изобретения

В одном варианте осуществления соединение формулы (I) представляет собой, в частности, соединение формулы (I-a)

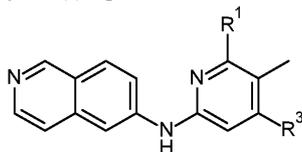


(I-a)

где по меньшей мере один атом является радиоактивным и где R<sup>1</sup> представляет собой F, и R<sup>3</sup> представляет собой H, или R<sup>1</sup> представляет собой H, и R<sup>3</sup> представляет собой F;

или его фармацевтически приемлемые соль или сольват.

Более конкретно, соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (I'-a)

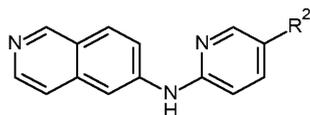


(I'-a)

где R<sup>1</sup> представляет собой <sup>18</sup>F, и R<sup>3</sup> представляет собой H, или R<sup>1</sup> представляет собой H, и R<sup>3</sup> представляет собой <sup>18</sup>F;

или его фармацевтически приемлемые соль или сольват.

В другом варианте осуществления соединение формулы (I) представляет собой, в частности, соединение формулы (I-b)

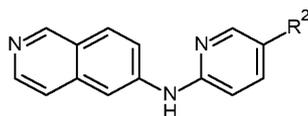


(I-b)

где по меньшей мере один атом является радиоактивным, и где R<sup>2</sup> выбран из группы, состоящей из -C<sub>1-4</sub>алкил-F, -OC<sub>1-4</sub>алкил-F и -NR<sup>4</sup>-C<sub>1-4</sub>алкил-F, где R<sup>4</sup> представляет собой H или метил;

или его фармацевтически приемлемые соль или сольват.

Более конкретно, соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (I'-b)

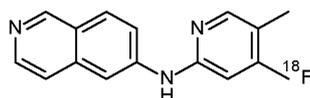


(I'-b)

где  $R^2$  выбран из группы, состоящей из  $-C_{1-4}$ алкил- $^{19}F$ ,  $-OC_{1-4}$ алкил- $^{18}F$  и  $-NR^4-C_{1-4}$ алкил- $^{18}F$ , где  $R^4$  представляет собой H или метил;

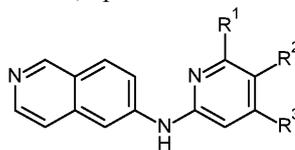
или его фармацевтически приемлемые соль или сольват.

В одном варианте осуществления соединение формулы (I), в частности формулы (I'), представляет собой



или его фармацевтически приемлемые соль или сольват.

В другом конкретном варианте осуществления соединения-предшественник для синтеза соединения формулы (I) или (I'), как определено выше, представляет собой, в частности, соединение формулы (P-1)



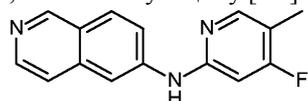
(P-1)

где  $R^2$  представляет собой метил, и либо  $R^1$  выбран из группы, состоящей из Br,  $-NO_2$ ,  $-[N(CH_3)_3]^+$  и  $4-Me-Ph-SO_2-O-$ , и  $R^3$  представляет собой H, либо  $R^1$  представляет собой H, и  $R^3$  выбран из группы, состоящей из Br,  $-NO_2$ ,  $-[N(CH_3)_3]^+$  и  $4-Me-Ph-SO_2-O-$ ; либо

$R^1$  и  $R^3$  одновременно представляют собой H, и  $R^2$  выбран из группы, состоящей из  $-C_{1-4}$ алкил-OH,  $-OC_{1-4}$ алкил-OH и  $-NR^4-C_{1-4}$ алкил-OH, где  $R^4$  представляет собой H или метил;

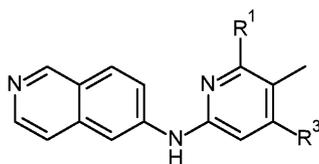
или его фармацевтически приемлемые соль или сольват.

Настоящее изобретение также относится к эталонному материалу, соответствующему немеченому радиоактивным изотопом соединению 1, соответствующему  $[^{19}F]$ -соединению



или его фармацевтически приемлемым соли или сольвату.

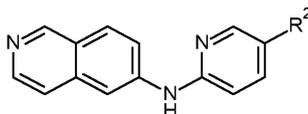
В другом конкретном варианте осуществления соединение формулы  $[^{19}F]$ -(I) представляет собой, в частности, соединение формулы  $[^{19}F]$ -(I-a)

 $[^{19}F]$ -(I-a)

где  $R^1$  представляет собой F, и  $R^3$  представляет собой H, или  $R^1$  представляет собой H, и  $R^3$  представляет собой F;

или его фармацевтически приемлемые соль или сольват.

В другом конкретном варианте осуществления соединения формулы  $[^{19}F]$ -(I) представляет собой, в частности, соединение формулы (I-b)

 $[^{19}F]$ -(I-b)

где  $R^2$  выбран из группы, состоящей из  $-C_{1-4}$ алкил-F,  $-OC_{1-4}$ алкил-F и  $-NR^4-C_{1-4}$ алкил-F, где  $R^4$  представляет собой H или метил;

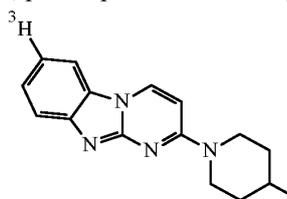
или его фармацевтически приемлемые соль или сольват.

$[^{19}F]$ -соед. № 1 продемонстрировало сильное связывание ( $pIC_{50}$  8,24) с выделенными агрегатами тау-белков человека в анализе с замещением радиоактивной меткой с применением тритиевого аналога соединения T-808 собственного производства (T-808, разработанное Siemens, см., например, J. Alzheimer-

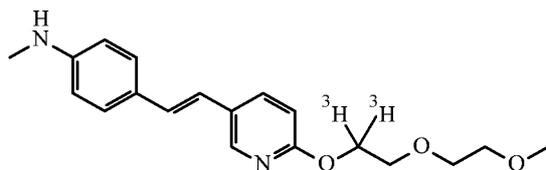
ers Dis. 2014, 38, 171-184), и который называется в данном документе [ $^3\text{H}$ ]-T808. В дополнение, соед. № 1 продемонстрировало слабое связывание с выделенными агрегатами бета-амилоидов человека (pIC<sub>50</sub> 5,18) в анализе с замещением радиоактивной меткой с применением тритиевого аналога флорбетацира собственного производства (также известного как Amyvid® от Eli Lilly and Co. или AV-45, см., например, J. Nucl. Med. 2010, 51, 913-920), и который называется в данном документе как [ $^3\text{H}$ ]-AV-45. Описание протоколов представлено в данном документе далее.

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

[ $^3\text{H}$ ]-AV-45 получали с помощью катализируемого иридием (катализатор Крабтри) тритиевого обмена AV-45, растворенного в дихлорметане



[ $^3\text{H}$ ]-T808,



[ $^3\text{H}$ ]-AV-45.

Как уже упоминалось, соединение формулы (I), в частности соединение формулы (I'), и композиции, содержащие соединение формулы (I), в частности соединение формулы (I'), могут применяться 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 агрегатов тау-белков предусматривает предоставление субъекту, в частности пациенту, выявляемого количества соединения формулы (I), в частности соединения формулы (I').

Дополнительно, настоящее изобретение относится к способу визуализации отложений агрегатов тау-белков, включающему стадии предоставления субъекту выявляемого количества соединения формулы (I), в частности соединения формулы (I'), обеспечения времени, достаточного для ассоциации соединения формулы (I), в частности 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), в частности соединение формулы (I'), может вводиться внутривенно, например путем инъекции с помощью шприца или посредством периферической внутривенной трубки, такой как короткий катетер. Соединение формулы (I), в частности соединение формулы (I'), или стерильный раствор, содержащий соединение формулы (I), в частности соединение формулы (I'), может, в частности, вводиться 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), в частности соединения формулы (I'), определенного в данном документе, или композиции, в частности стерильного состава, содержащего соединение формулы (I), в частности соединение формулы (I'), субъекту, и визуализацию субъекта с помощью системы для 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), в частности соединения формулы (I'), или композиции, содержащей соединение формулы (I), в частности соединение формулы (I'), субъекту и визуализацию с помощью системы для 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, при этом меченое соединение выявляют неинвазивным способом.

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. Термин "C<sub>1-4</sub>алкил" означает прямую или разветвленную насыщенную алкильную группу соответственно с 1, 2, 3 или 4 атомами углерода, например метил, этил, 1-пропил, 2-пропил, бутил и т.п.

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 терапевтически активные нетоксичные формы солей присоединения кислоты, которые могут быть образованы соединениями в соответствии с настоящим изобретением. Указанные соли могут быть получены путем обработки соединений в соответствии с настоящим изобретением в форме основания подходящими кислотами, например неорганическими кислотами, например галогеноводородной кислотой, в частности хлористоводородной кислотой, бромистоводородной кислотой, серной кислотой, азотной кислотой и фосфорной кислотой; органическими кислотами, например уксусной кислотой, гидроксидуксусной кислотой, пропановой 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, *p*-толуолсульфоновой кислотой, цикламовой кислотой, салициловой кислотой, *p*-аминосалициловой кислотой и памовой кислотой.

И наоборот, упомянутые формы солей могут быть превращены в форму свободного основания путем обработки соответствующим основанием.

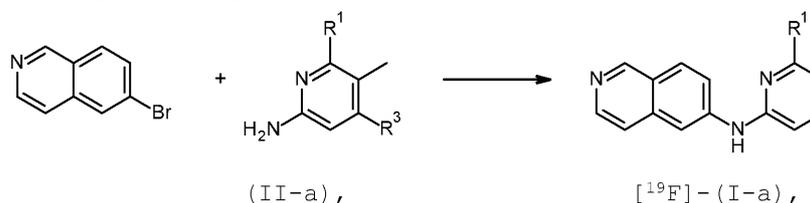
В дополнение, некоторые из соединений по настоящему изобретению могут образовывать сольваты с водой (т.е. гидраты) или обычными органическими растворителями, и подразумевается, что такие сольваты также охватываются объемом настоящего изобретения.

Термин "субъект", используемый в данном документе, относится к человеку, который является или являлся объектом лечения, наблюдения или эксперимента. Если не указано иное, то термин "субъект" включает людей без симптомов, людей с предсимптомами и пациентов-людей.

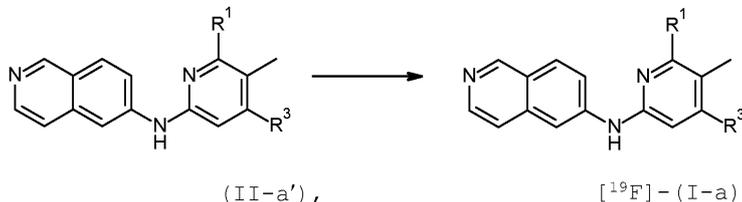
Получение.

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

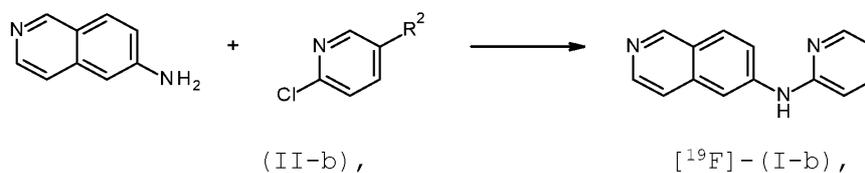
Соединения формулы  $[^{19}\text{F}]$ -(I-a) или  $[^{19}\text{F}]$ -(I-b), раскрытые в данном документе, могут быть получены с помощью реакции 6-бром-изохинолина с соответствующим 2-аминопиридиновым соединением формулы (II-a), где все переменные представляют собой описанные в данном документе для  $[^{19}\text{F}]$ -(I)



при условиях аминирования по Бухвальду-Хартвигу, где все переменные представляют собой описанные в данном документе для  $[^{19}\text{F}]$ -(I), или, в качестве альтернативы, с помощью реакции соединения формулы (II-a'), где  $\text{R}^1$  представляет собой  $-\text{NO}_2$ , и  $\text{R}^3$  представляет собой H, или  $\text{R}^1$  представляет собой H, и  $\text{R}^3$  представляет собой  $-\text{NO}_2$ , с источником фторида, таким как KF, в реакционно инертном растворителе, таком как DMSO, при условиях нагревания



или, в качестве альтернативы, с помощью реакции изохинолин-6-амина с соответствующим 2-хлорпиридиновым соединением формулы (II-b), где все переменные представляют собой описанные в данном документе для  $[^{19}\text{F}]$ -(I)



при условиях аминирования по Бухвальду-Хартвигу.

Соединение формулы (II-a') может быть получено, например, с помощью реакции изохинолин-6-

амина с 6-бром-3-метил-2-нитропиридином или 2-бром-5-метил-4-нитропиридином при условиях аминирования по Бухвальду-Хартвигу.

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, они могут применяться для картирования дифференциального распределения отложений агрегатов тау-белков у субъектов разного возраста и пола. Дополнительно, они дают возможность исследовать дифференциальное распределение отложений агрегатов тау-белков у субъектов, страдающих 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 ПЕТ-визуализации, то терапевтический эффект не может объясняться введением радиоактивных лигандов в соответствии с настоящим изобретением.

Экспериментальная часть.

Химия.

Используемый в данном документе термин "ACN или MeCN" означает ацетонитрил, "водн." означает водный, "tBuOH" означает трет-бутанол, "DCM" означает дихлорметан, "DIPE" означает диизопропиловый эфир, "DIPEA" означает N,N-диизопропилэтиламин, "DMF" означает N,N-диметилформамид, "DMSO" означает диметилсульфоксид, "Et<sub>2</sub>O" означает диэтиловый эфир, "EtOAc" означает этилацетат, "ч" означает часы, "HPLC" означает высокоэффективную жидкостную хроматографию, "LCMS" означает жидкостную хроматографию/масс-спектрометрию, "MeOH" означает метанол, "мин" означает минуты, "т.пл." означает точку плавления, "орг." означает органический, "Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>" означает трис(добензил-иденацетон)дипалладий(0), "преп." означает препаративный, "р.см." означает реакционную смесь, "к.т." означает комнатную температуру, "R<sub>t</sub>" означает время удерживания (в минутах), "насыщ." означает насыщенный, "раств." означает раствор, "TFA" означает трифторуксусную кислоту, "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.

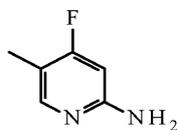
Ядерный магнитный резонанс (ЯМР): для нескольких соединений <sup>1</sup>H-ЯМР-спектры записывали на ЯМР-спектрометре либо Bruker Ultrashield AV300, Bruker DPX 360 МГц NMR, либо Bruker Avance III 400 МГц со стандартными последовательностями импульсов, работающих при 300, 360 и 400 МГц соответственно. Образцы растворяли в DMSO-d<sub>6</sub> или CDCl<sub>3</sub> и переносили в пробирки для ЯМР объемом 5 мм для измерения. Химические сдвиги (δ) указаны в частях на миллион (ppm) для слабополюсного сдвига от тетраметилсилана (TMS), который применяли в качестве внутреннего стандарта.

Очистку HPLC выполняли на GILSON Semi-Preparative System, функционирующей с помощью программного обеспечения Trilution, оснащенной колонкой Phenomenex Gemini C18 100A (длина 100 мм × 30 мм I.D.; частицы 5 мкм) при к.т. °C, со скоростью потока 40 мл/мин, с использованием градиентного элюирования за 20 мин, как указано в протоколах синтеза. Объем вводимой пробы составлял 8000 мкл. Частоту сбора данных устанавливали на 284 нм для детектора UV-Dual.

Некоторые способы получения соединений по настоящему изобретению проиллюстрированы в следующих примерах, которые предназначены для иллюстрации, но не для 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.

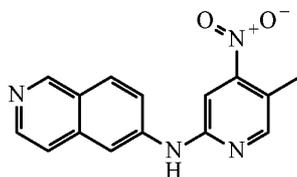
Получение промежуточного соединения 1



Тетраметилолово (0,736 мл, 5,309 ммоль) добавляли к смеси 5-бром-4-фторпиридин-2-амин (0,338 г, 1,77 ммоль, CAS 944401-69-8), бис(трифенилфосфин)палладия(II) хлорида (0,062 г, 0,0885 ммоль) и LiCl (0,300 г, 7,078 ммоль) в 10 мл DMF. Эту смесь закупоривали в пробирке после дегазирования азо-

том. Затем смесь взбалтывали при 120°C в течение 18 ч, после чего ее разбавляли водой. Затем добавляли насыщенный водный раствор KF и водн. слой экстрагировали с помощью EtOAc. Объединенные орг. слои высушивали (MgSO<sub>4</sub>), фильтровали и растворители выпаривали в вакууме. Неочищенный материал очищали колоночной флэш-хроматографией (оксид кремния; DCM/MeOH от 100/0 до 95/5). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме с получением промежуточного соединения 1 (0,190 г, 79%).

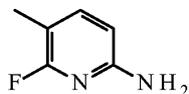
Получение промежуточного соединения 2



Способ 1: ко взбалтываемому раствору 6-аминоизохинолина (18,3 г, 127,1 ммоль) в толуоле (400 мл) добавляли 2-бром-5-метил-4-нитропиридин (23,0 г, 105,9 ммоль), Xantphos (2,45 г, 4,24 ммоль), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (1,94 г, 2,12 ммоль), tBuOK (16,6 г, 148,3 ммоль) под азотом. Азот барботировали через смесь в течение 5 мин, а затем флакон закупоривали и нагревали при 100°C в течение 2 ч. Смесь фильтровали и осадок на фильтре промывали с помощью EtOAc до экстрагирования всего продукта. К фильтрату добавляли воду и орг. слой отделяли, высушивали (MgSO<sub>4</sub>), фильтровали и концентрировали. Остаток помещали в воду, растирали в течение 1 ч, фильтровали и высушивали в вакууме при 55°C. Полученное в результате коричневое твердое вещество (растворенное в MeOH при pH 4) очищали посредством препаративной HPLC (стационарная фаза: RP XBridge Prep C18 OBD-10 мкм, 50×150 мм, подвижная фаза: 0,5% раствор NH<sub>4</sub>OAc в воде+10% CH<sub>3</sub>CN, MeOH). Чистые фракции объединяли и органический компонент элюента выпаривали. Формировался красный осадок, который фильтровали, промывали водой и высушивали. Полученный в результате осадок взбалтывали в DCM/MeOH/1н. NaOH (2 л/0,2 л/1 л) до полного растворения и орг. слой отделяли. Водн. слой экстрагировали еще раз с DCM. Объединенные орг. слои высушивали (MgSO<sub>4</sub>), фильтровали и выпаривали. Остаток растирали в двухфазной смеси эфира и воды, фильтровали и высушивали в вакууме в течение 2 дней при 50°C и 4 ч в лиофилизаторе при к.т. с получением промежуточного соединения 2 в виде оранжевых кристаллов (6,11 г, 18%). <sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 2,40 (s, 3 H) 7,50 (s, 1 H) 7,62-7,71 (m, 2 H) 8,01 (d, J=9,0 Гц, 1 H) 8,36 (d, J=5,7 Гц, 1 H) 8,45 (s, 2 H) 9,09 (s, 1 H) 9,97 (s, 1 H)

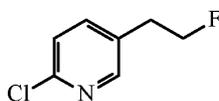
Способ 2. Ко взбалтываемому раствору 6-аминоизохинолина (7,62 г, 52,85 ммоль) в 200 мл толуола добавляли 2-бром-5-метил-4-нитропиридин (11,47 г, 52,85 ммоль), Xantphos (0,611 г, 1,057 ммоль), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (0,484 г, 0,529 ммоль) и tBuOK (8,30 г, 74,00 ммоль). Азот барботировали через смесь в течение 5 мин, а затем сосуд закупоривали и нагревали при 100°C в течение 2 ч, и еще 3 ч при 110°C. К смеси добавляли EtOAc, после чего ее взбалтывали в течение 30 мин. Затем смесь фильтровали через дикалит и осадок на фильтре промывали с помощью EtOAc до экстрагирования всего продукта. К фильтрату добавляли воду и орг. слой отделяли. Водн. слой экстрагировали с помощью EtOAc до тех пор, пока продукта не оставалось (LCMS контроль). Объединенные органические слои промывали солевым раствором, высушивали (MgSO<sub>4</sub>), фильтровали и концентрировали. Остаток помещали в воду/DIPE, растирали в течение ночи, фильтровали и высушивали в вакууме при 55°C с получением промежуточного соединения 2 (10,5 г, 71%, 57% чистота), которое использовали как таковое для следующей реакционной стадии.

Получение промежуточного соединения 3



Триметилбороксин (0,256 мл, 1,83 ммоль) добавляли ко взбалтываемому раствору 5-бром-6-фторпиридин-2-амин (0,291 г, 1,52 ммоль, CAS 944401-65-4), тетраakis(трифенилфосфин)палладия(0) (0,176 г, 0,152 ммоль) и Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,993 г, 3,047 ммоль) в 1,4-диоксане (5,3 мл) при барботировании азотом. Реакционную смесь взбалтывали при 105°C в течение 16 ч под азотом. Добавляли воду и EtOAc. Фазы отделяли и органическую высушивали над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и выпаривали. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (диоксид кремния; EtOAc в гептане от 0/100 до 50/50). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме с получением промежуточного соединения 3 в виде желтого твердого вещества (0,151 г, 79%).

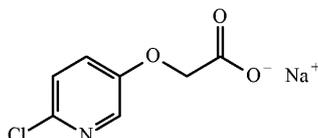
Получение промежуточного соединения 4



Deохо-Fluor® (50% в толуоле, 1,67 мл, 3,807 ммоль) добавляли каплями к раствору 2-хлор-5-(2-фторэтил)пиридина (0,400 г, 2,538 ммоль, CAS 117528-28-6) в сухом DCM (15 мл) при 0°C. Через 1 мин холодную баню убирали и реакционную смесь взбалтывали при комнатной температуре в течение 2 ч

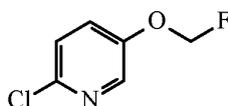
Смесь разбавляли водн. насыщ.  $\text{NaHCO}_3$  и экстрагировали с помощью DCM. Органический слой промывали водой, высушивали ( $\text{MgSO}_4$ ), фильтровали и растворители выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (диоксид кремния; EtOAc в гептане от 0/100 до 70/30). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме с получением промежуточного соединения 4 (0,193 г, 45%).

Получение промежуточного соединения 5



NaOH (0,064 г, 1,599 ммоль) добавляли к смеси [(6-хлорпиридин-3-ил)окси]уксусной кислоты (0,300 г, 1,599 ммоль, CAS 234109-28-5) в смеси  $\text{CH}_3\text{CN}$  (4 мл) и воды (4 мл). Смесь нагревали при  $85^\circ\text{C}$  в течение 1 ч. Растворитель концентрировали в вакууме с получением промежуточного соединения 5 (335 мг, 95%) в виде белого твердого вещества, которое использовали как таковое на следующей стадии.

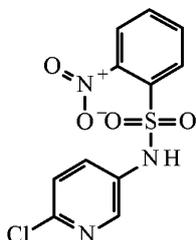
Получение промежуточного соединения 6



Selectfluor® (1,116 г, 3,15 ммоль) добавляли к раствору промежуточного соединения 5 (0,314 г, 1,5 ммоль) в смеси воды (7,5 мл) и  $\text{CH}_3\text{CN}$  (7,5 мл), предварительно дегазированной.

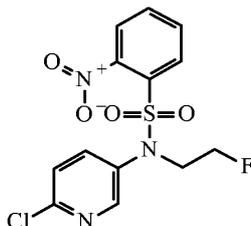
Добавляли трис(2,2'-бипиридил)дихлоррутения(II) гексагидрат (0,056 г, 0,075 ммоль). Реакционную смесь облучали 500 Вт лампой для судостроительной верфи, излучающей свет в видимой части спектра, помещенной на расстоянии 30 см от реакционной смеси, в течение 1 ч. После выключения света в реакционную среду наливали воду и диэтиловый эфир. Две фазы разделяли и водную экстрагировали с помощью  $\text{Et}_2\text{O}$ . Объединенные органические фазы высушивали над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Неочищенный продукт фильтровали через силикагель с  $\text{Et}_2\text{O}$  в качестве элюента и концентрировали в вакууме с получением промежуточного соединения 6 в виде бежевого маслянистого твердого вещества (0,167 г, 54%).

Получение промежуточного соединения 7



Взбалтываемый раствор 5-амино-2-хлорпиридина (1,00 г, 7,778 ммоль) в THF (27 мл) охлаждали до  $0^\circ\text{C}$ , затем к раствору добавляли 2-нитробензолсульфонилхлорид (1,72 г, 7,778 ммоль) и пиридин (0,942 мл, 11,668 ммоль). Обеспечивали нагревание полученной в результате смеси до к.т. и взбалтывали в течение 3 ч. 2-Нитробензолсульфонилхлорид (0,52 г, 2,334 ммоль) и пиридин (0,314 мл, 3,889 ммоль) добавляли при  $0^\circ\text{C}$  и смесь взбалтывали при к.т. в течение ночи. Затем к смеси добавляли воду и водн. слой экстрагировали EtOAc. Экстракт промывали насыщенным водн.  $\text{NaHCO}_3$  и соевым раствором. Орг. слой высушивали над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и выпаривали. Остаток очищали колоночной флэш-хроматографией (силикагель, EtOAc в гептане, от 0/100 до 10/90). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме с получением промежуточного соединения 7 (2,22 г, 91%).

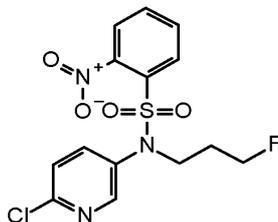
Получение промежуточного соединения 8



Промежуточное соединение 7 (1,1 г, 3,506 ммоль) и 2-фторэтил 4-метилбензолсульфонат (0,918 г, 4,208 ммоль, CAS 383-50-6) растворяли в DMF (10,6 мл). В атмосфере азота добавляли  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (1,942 г, 5,961 ммоль). Смесь нагревали до  $85^\circ\text{C}$  в течение ночи. После охлаждения до температуры окружающей среды темно-коричневую суспензию разбавляли водой и экстрагировали с EtOAc. Орг. слой промывали

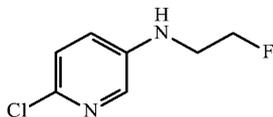
рассолом, высушивали над  $MgSO_4$ , фильтровали и концентрировали. Продукт очищали колоночной флэш-хроматографией (диоксид кремния,  $EtOAc$  в гептане, от 0/100 до 20/80). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме с получением промежуточного соединения 8 (0,687 г, 54%).

Получение промежуточного соединения 9



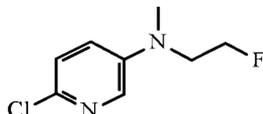
Промежуточное соединение 7 (0,700 г, 2,231 ммоль) и 3-фторпропил-4-метилбензолсульфонат (0,674 г, 2,901 ммоль, CAS 312-68-5) растворяли в DMF (6,7 мл). Добавляли  $Cs_2CO_3$  (1,45 г, 4,463 ммоль) и смесь нагревали до  $85^\circ C$  в течение ночи в атмосфере азота. Добавляли 3-фторпропил 4-метилбензолсульфонат (0,363 г, 1,562 ммоль) и  $Cs_2CO_3$  (0,727 г, 2,231 ммоль) и смесь нагревали при  $85^\circ C$  в течение ночи. После охлаждения до температуры окружающей среды темно-коричневую суспензию разбавляли водой и экстрагировали с  $EtOAc$ . Органический слой промывали рассолом, высушивали над  $MgSO_4$ , фильтровали и концентрировали. Продукт очищали колоночной флэш-хроматографией (диоксид кремния,  $EtOAc$  в гептане, от 0/100 до 15/85). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме с получением промежуточного соединения 9 (0,395 г, 42%).

Получение промежуточного соединения 10



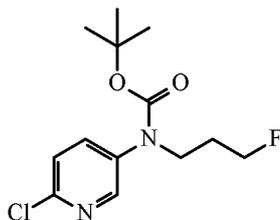
Ко взбалтываемому раствору промежуточного соединения 8 (0,687 г, 1,91 ммоль) в 11,6 мл DMF добавляли  $LiOH \cdot H_2O$  (0,491 г, 11,46 ммоль) и 2-меркаптоэтанол (0,164 мл, 2,33 ммоль) при  $0^\circ C$ . Реакционную смесь взбалтывали при к.т. в течение 2 ч. Добавляли воду и смесь экстрагировали с помощью  $EtOAc$ . Экстракт промывали водой и высушивали над  $MgSO_4$ . Концентрирование при пониженном давлении давало маслянистые остатки. Продукт очищали флэш-хроматографией (силикагель,  $EtOAc$  в гептане, от 0/100 до 30/70). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме с получением промежуточного соединения 10 в виде желтого масла (0,276 г, 83%).

Получение промежуточного соединения 11



Промежуточное соединение 10 (0,200 г, 1,145 ммоль) добавляли ко взбалтываемому раствору  $NaN$  (60% дисперсия в минеральном масле, 0,069 г, 1,718 ммоль) в DMF (9,2 мл) при  $0^\circ C$  в атмосфере азота. После взбалтывания в течение 30 мин при данной температуре  $CH_3I$  (0,134 мл, 1,833 ммоль) добавляли и взбалтывание продолжали в течение ночи при к.т.  $NaN$  (60% дисперсия в минеральном масле, 0,032 г, 0,802 ммоль) добавляли при  $0^\circ C$  и смесь взбалтывали 30 мин. Добавляли  $CH_3I$  (0,032 мл, 0,573 ммоль) и смесь взбалтывали при к.т. в течение 2 ч. Смесь разбавляли водой и экстрагировали с  $EtOAc$ . Орг. слой высушивали ( $MgSO_4$ ), фильтровали и выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии ( $EtOAc$  в гептане от 0/100 до 15/85). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме с получением промежуточного соединения 11 (0,137 г, 63%).

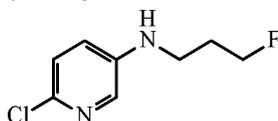
Получение промежуточного соединения 12



$NaN$  (60% дисперсия в минеральном масле, 0,178 г, 4,46 ммоль) добавляли ко взбалтываемому раствору трет-бутил(6-хлорпиридин-3-ил)карбамата (1,36 г, 75% чистота, 4,46 ммоль, CAS 171178-45-3) в сухом DMF (7 мл) при  $0^\circ C$  под  $N_2$ . Смесь взбалтывали при  $0^\circ C$  в течение 15 мин. Затем добавляли 1-бром-3-фторпропан (0,491 мл, 5,353 ммоль) при  $0^\circ C$ , обеспечивали нагревание смеси до к.т. и взбалтывали в течение ночи. Добавляли больше 1-бром-3-фторпропана (0,327 мл, 3,568 ммоль) и  $NaN$  (60% дисперсия в минеральном масле, 0,178 г, 4,46 ммоль) и смесь взбалтывали при к.т. в течение 4 ч. Добавляли

дополнительный 1-бром-3-фторпропан (0,818 мл, 8,921 ммоль) и NaH (60% дисперсия в минеральном масле, 0,178 г, 4,46 ммоль) и смесь взбалтывали при к.т. в течение ночи. Реакционную смесь помещали в DCM и промывали насыщенным раствором  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Органический слой отделяли, высушивали над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной флэш-хроматографией (диоксид кремния; EtOAc в гептане от 40 до 100%). Требуемые фракции извлекали и растворители выпаривали в вакууме с получением промежуточного соединения 12 в виде бесцветного масла (1,71 г, 75% чистота, количественный выход).

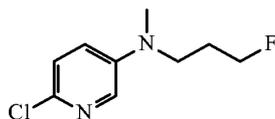
Получение промежуточного соединения 13



Способ 1. TFA (4 мл, 53,3 ммоль) добавляли к смеси промежуточного соединения 12 (1,71 г, 5,33 ммоль, 75% чистота) в 20 мл DCM при 0°C, а затем смесь взбалтывали при к.т. в течение 150 мин. Затем смесь разбавляли DCM и промывали водн. насыщ. раствором  $\text{NaHCO}_3$ . Орг. слой отделяли, высушивали ( $\text{MgSO}_4$ ), фильтровали и концентрировали в вакууме с получением промежуточного соединения 13 (1,91 г, 53% чистота, количественный), которое использовали как таковое.

Способ 2. Ко взбалтываемому раствору промежуточного соединения 7 (0,395 г, 0,93 ммоль) в DMF (5,6 мл) добавляли  $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (0,239 г, 5,58 ммоль) и 2-меркаптоэтанол (0,798 мл, 1,134 ммоль) при 0°C. Реакционную смесь взбалтывали при к.т. в течение 2 ч, после чего ее экстрагировали с помощью EtOAc. Объединенные орг. слои промывали водой, высушивали над  $\text{MgSO}_4$  и фильтровали. Концентрирование при пониженном давлении давало маслянистый остаток, который очищали флэш-хроматографией (силикагель, EtOAc в гептане, от 0/100 до 30/70). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме с получением промежуточного соединения 13 в виде желтого масла (0,168 г, 96%).

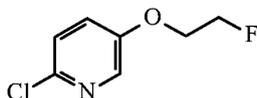
Получение промежуточного соединения 14



Способ 1. Формальдегид (37% в воде, 2,185 мл, 29,162 ммоль) добавляли к раствору промежуточного соединения 13 (полученного способом 1, 1,91 г, 9,721 ммоль, 53% чистота) в смеси уксусной кислоты (0,835 мл) и MeOH (20 мл). Затем порциями добавляли  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  (1,83 г, 29,162 ммоль). Смесь взбалтывали при к.т. в течение ночи (15 ч). Добавляли насыщ. раствор  $\text{NaHCO}_3$  и смесь экстрагировали с помощью EtOAc. Орг. слои высушивали над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (диоксид кремния; EtOAc в гептане от 0/100 до 80/20). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме с получением промежуточного соединения 14 (0,687 г, 63%) в виде бесцветного масла.

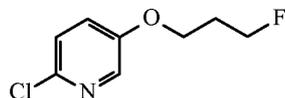
Способ 2. Промежуточное соединение 13 (полученное способом 2, 0,172 г, 0,912 ммоль) добавляли ко взбалтываемому раствору NaH (60% дисперсия в минеральном масле, 0,055 г, 1,368 ммоль) в DMF (7,3 мл) при 0°C в атмосфере азота. После взбалтывания в течение 30 мин при данной температуре добавляли  $\text{CH}_3\text{I}$  (0,107 мл, 1,459 ммоль) и взбалтывали в течение ночи при к.т. Смесь разбавляли водой и экстрагировали с помощью EtOAc. Органический слой фильтровали, высушивали и выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (EtOAc в гептане от 0/100 до 10/90). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме с получением промежуточного соединения 14 (0,143 г, 77%).

Получение промежуточного соединения 15



2-Хлор-5-гидроксипиридин (0,300 г, 2,316 ммоль) и 2-фторэтил-4-метилбензолсульфонат (0,505 г, 2,316 ммоль, CAS 383-50-6) растворяли в DMF (7 мл). В атмосфере азота добавляли  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (1,132 г, 3,474 ммоль). Смесь нагревали до 85°C в течение 5 ч. После охлаждения до температуры окружающей среды темно-коричневую суспензию разбавляли водой и экстрагировали с EtOAc. Орг. слои промывали с помощью солевого раствора, высушивали над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и концентрировали. Продукт очищали колоночной флэш-хроматографией (диоксид кремния, EtOAc в гептане, от 0/100 до 35/65). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме с получением промежуточного соединения 15 (0,374 г, 92%).

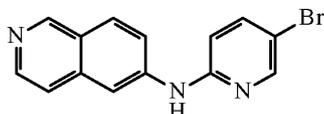
Получение промежуточного соединения 16



2-Хлор-5-гидроксипиридин (0,300 г, 2,316 ммоль) и 3-фторпропил-4-метилбензолсульфонат (0,538

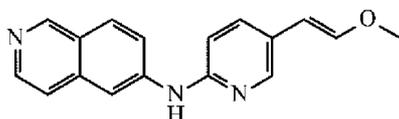
г, 2,316 ммоль, CAS 312-68-5) растворяли в DMF (7 мл). В атмосфере азота добавляли  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (1,132 г, 3,474 ммоль). Смесь нагревали до  $85^\circ\text{C}$  в течение 5 ч. После охлаждения до температуры окружающей среды темно-коричневую суспензию разбавляли водой и экстрагировали с EtOAc. Органический слой промывали рассолом, высушивали над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и концентрировали. Продукт очищали колоночной флэш-хроматографией (диоксид кремния, EtOAc в гептане, от 0/100 до 30/70). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме с получением промежуточного соединения 16 (0,408 г, 93%).

Получение промежуточного соединения 17



$\text{K}_3\text{PO}_4$  (1,70 г, 7,99 ммоль),  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  (0,152 г, 0,166 ммоль) и Xantphos (0,161 мг, 0,277 ммоль) добавляли к раствору 2,5-дибромпиридина (0,738 г, 3,052 ммоль, CAS 624-28-2) в сухом THF (20 мл) при барботировании азота через смесь. Через 10 мин добавляли 6-аминоизохинолин (0,400 г, 2,774 ммоль, CAS 23687-26-5) и смесь взбалтывали при к.т. в течение 10 мин. Затем смесь нагревали при  $100^\circ\text{C}$  в течение 16 ч. После охлаждения до к.т. смесь промывали с помощью водн. насыщ.  $\text{NaHCO}_3$  и экстрагировали с помощью EtOAc. Органический слой высушивали над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и растворитель выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (диоксид кремния; EtOAc в гептане от 0/100 до 75/25). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме с получением промежуточного соединения 17 (0,680 г, 80% чистота, выход 65%).

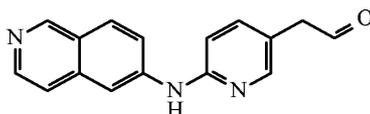
Получение промежуточного соединения 18



смесь изомера E (большой) и Z (меньший)

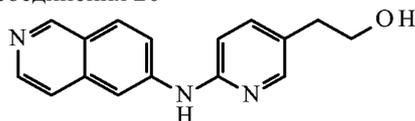
Промежуточное соединение 17 (0,680 г, 1,812 ммоль) в 1,4-диоксане (10,2 мл) дегазировали в течение 10 мин. Добавляли 2-[2-этоксивинил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан (0,538 г, 2,719 ммоль, CAS 1201905-61-4, полученный согласно процедуре, описанной в WO 2012010538, смесь 2:1 E и Z),  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (0,020 г, 0,0906 ммоль), X-Phos (0,095 г, 0,199 ммоль) и  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (0,886 г, 2,719 ммоль), а затем дегазированную воду (1,1 мл). Смесь дегазировали еще 10 мин и взбалтывали при  $80^\circ\text{C}$  в течение 6 ч. Затем смесь охлаждали до температуры окружающей среды и разбавляли EtOAc. Орг. фазу промывали водой и соевым раствором, высушивали над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (диоксид кремния; EtOAc в гептане от 0/100 до 100/0). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме с получением промежуточного соединения 18 (0,510 г, 91%, смесь E и Z).

Получение промежуточного соединения 19



К смеси промежуточного соединения 18 (0,510 г, 1,75 ммоль) в THF (5,3 мл) добавляли HCl (2M в воде, 3,939 мл, 7,877 ммоль). Смесь перемешивали при  $60^\circ\text{C}$  в течение ночи. Насыщ.  $\text{NaHCO}_3$  добавляли до pH 7. Смесь экстрагировали с помощью EtOAc. Орг. слой отделяли, высушивали ( $\text{MgSO}_4$ ), фильтровали и растворители выпаривали в вакууме с получением промежуточного соединения 19. Продукт применяли как таковой на следующей стадии (0,378 г, 82%).

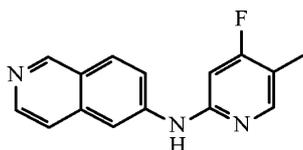
Получение промежуточного соединения 20



$\text{NaBH}_4$  (0,054 г, 1,436 ммоль) добавляли к раствору промежуточного соединения 19 в MeOH (4,5 мл) при  $0^\circ\text{C}$ . Смесь взбалтывали при к.т. в течение 30 мин. Добавляли воду и смесь экстрагировали с помощью EtOAc. Орг. слой отделяли, высушивали ( $\text{MgSO}_4$ ), фильтровали и растворители выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (диоксид кремния; MeOH в DCM от 0/100 до 10/90). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме с получением промежуточного соединения 20 (0,135 г, 35%).

В. Получение соединений формулы  $[\text{}^{19}\text{F}]$  (I).

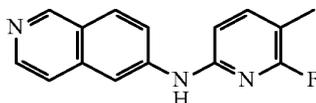
Получение соединения 1



Способ 1.  $K_3PO_4$  (0,872 г, 4,11 ммоль),  $Pd_2(dba)_3$  (0,078 г, 0,0856 ммоль) и Xantphos (0,083 г, 0,143 ммоль) добавляли к раствору 6-бромизохинолина (0,327 г, 1,57 ммоль) в сухом DMF (15 мл) при барботировании азота через смесь. Через 10 мин добавляли промежуточное соединение 1 (0,180 г, 1,427 ммоль) и смесь взбалтывали при к.т. в течение 10 мин. Затем смесь нагревали при  $100^\circ C$  в течение 16 ч. После охлаждения до к.т. смесь промывали с помощью насыщ.  $NaHCO_3$  и экстрагировали с помощью EtOAc. Орг. слой высушивали над  $MgSO_4$ , фильтровали и растворитель выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали колоночной флэш-хроматографией (оксид кремния; DCM/MeOH от 100/0 до 95/5). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме. Продукт дополнительно очищали с помощью обращенной фазы от 70%  $H_2O$  (25 mM  $NH_4HCO_3$ ) - 30% MeCN-MeOH до 27%  $H_2O$  (25 mM  $NH_4HCO_3$ ) - 73% MeCN-MeOH. Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме. Продукт растирали с DIPE с получением соединения 1 в виде белого твердого вещества (0,150 г, 41%).

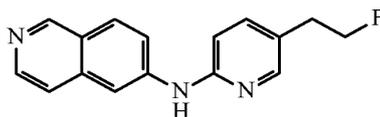
Способ 2. KF (10,2 г, 175,7 ммоль) добавляли к промежуточному соединению 2 (полученному способом 2, 9,85 г, 35,14 ммоль) в DMSO (236 мл). Полученную в результате смесь взбалтывали в течение 16 ч при  $160^\circ C$ , после чего LCMS демонстрировала полное превращение. Добавляли воду и DCM, двухфазную смесь встряхивали, а затем фильтровали через dicalite®. Орг. слой отделяли и водн. слой экстрагировали с помощью DCM. Объединенные орг. слои высушивали ( $MgSO_4$ ), фильтровали и выпаривали досуха. Красно-коричневый остаток очищали колоночной флэш-хроматографией с 120 г силикагеля с использованием градиента (гептан/EtOAc от 1:0 до 0:1). Фракции продукта выпаривали досуха с получением коричневого твердого вещества. Очистку проводили посредством препаративной HPLC (неподвижная фаза: RP XBridge Prep C18 OBD-10 мкм,  $50 \times 150$  мм, подвижная фаза: раствор 0,25%  $NH_4HCO_3$  в воде, MeOH) с получением соединения 1 в виде белых кристаллов (1,38 г, 15,5%) после выпаривания элюента, суспендирования в воде, фильтрования, промывания гептаном и высушивания в вакууме.  $^1H$ -ЯМР (400 МГц,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 2,17 (s, 3 H) 6,75 (d,  $J=11,9$  Гц, 1 H) 7,62 (d,  $J=5,7$  Гц, 1 H) 7,66 (dd,  $J=8,9, 2,1$  Гц, 1 H) 7,97 (d,  $J=8,8$  Гц, 1 H) 8,20 (d,  $J=11,2$  Гц, 1 H) 8,33 (d,  $J=5,7$  Гц, 1 H) 8,42 (d,  $J=1,8$  Гц, 1 H) 9,06 (s, 1 H) 9,61 (s, 1 H).

Получение соединения 2



$K_3PO_4$  (0,462 г, 2,175 ммоль),  $Pd_2(dba)_3$  (0,041 г, 0,0453 ммоль) и Xantphos (0,044 г, 0,0755 ммоль) добавляли к раствору промежуточного соединения 3 (0,100 г, 0,793 ммоль) в сухом THF при барботировании азота через смесь. Через 10 мин добавляли 6-бромизохинолин (0,157 г, 0,755 ммоль) и смесь взбалтывали при к.т. в течение 10 мин. Затем смесь нагревали при  $100^\circ C$  в течение 16 ч. После охлаждения до к.т. смесь промывали с помощью водн. насыщ.  $NaHCO_3$  и экстрагировали с помощью EtOAc. Органический слой высушивали над  $MgSO_4$ , фильтровали и растворитель выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали колоночной флэш-хроматографией (диоксид кремния; DCM/MeOH от 100/0 до 95/5). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали препаративной HPLC ((0,1%  $HCOOH$ )/25 mM  $NH_4HCO_3$ ); от 70/30 до 27/73). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме с получением соединения 2 (0,0238 г, 12%).  $^1H$ -ЯМР (300 МГц, хлороформ-d)  $\delta$  ppm 2,24 (s, 3 H) 6,72-6,86 (m, 2 H) 7,40-7,60 (m, 3 H) 7,89 (d,  $J=8,7$  Гц, 1 H) 7,93 (br s, 1 H) 8,44 (d,  $J=5,8$  Гц, 1 H) 9,10 (br s, 1 H).

Получение соединения 3

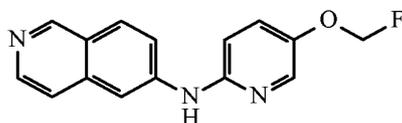


$K_3PO_4$  (0,300 г, 1,415 ммоль),  $Pd_2(dba)_3$  (0,027 г, 0,0295 ммоль) и Xantphos (0,028 г, 0,0491 ммоль) добавляли к раствору промежуточного соединения 4 (0,080 г, 0,491 ммоль) в сухом THF (5 мл) при барботировании азота через смесь. Через 10 мин добавляли изохинолин-6-амин (0,074 г, 0,516 ммоль, CAS 23687-26-5) и смесь взбалтывали при к.т. в течение 10 мин. Затем смесь нагревали при  $90^\circ C$  в течение 16 ч. После охлаждения до к.т. смесь промывали с помощью насыщ.  $NaHCO_3$  и экстрагировали с помощью EtOAc. Орг. слой высушивали над  $MgSO_4$ , фильтровали и растворитель выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (диоксид кремния; MeOH в DCM от 0/100 до 3/97). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме. Далее продукт очи-

шали препаративной HPLC ((0,1% HCOOH)/ACN: MeOH 1:1); от 95/5 до 63/37). Требуемые фракции собирали, концентрировали в вакууме с получением соединения 3 (0,051 г, 38%). <sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, хлороформ-d) δ ppm 2,98 (dt, J=24,7, 6,2 Гц, 2 H) 4,64 (dt, J=47,0, 6,3 Гц, 2 H) 6,82 (br s, 1 H) 6,98 (d, J=8,4 Гц, 1 H) 7,43-7,56 (т, 3 H) 7,89 (d, J=8,8 Гц, 1 H) 7,98 (s, 1 H) 8,22 (s, 1 H) 8,43 (d, J=5, 8 Гц, 1 H) 9, 10 (s, 1 H).

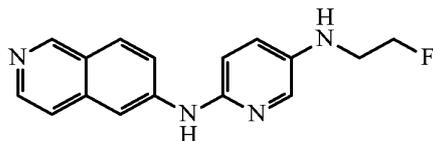
Соединение 3 также могло быть получено, в качестве альтернативы, из промежуточного соединения 20, например, путем образования соответствующего метансульфоната или 4-толуолсульфоната с последующим замещением источником фторида.

Получение соединения 4



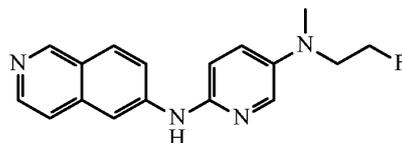
K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,481 г, 2,264 ммоль), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (0,043 г, 0,0472 ммоль) и Xantphos (0,045 г, 0,0786 ммоль) добавляли к раствору промежуточного соединения 6 (0,127 г, 0,786 ммоль) в THF (6 мл) при барботировании азота. Через 10 мин добавляли изохинолин-6-амин (0,125 г, 0,865 ммоль, CAS 23687-26-5) и смесь взбалтывали при к.т. в течение 10 мин. Затем смесь нагревали при 90°C в течение 16 ч. После охлаждения до к.т. смесь промывали с помощью насыщ. NaHCO<sub>3</sub> и экстрагировали с помощью EtOAc. Органический слой высушивали над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и растворитель выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (диоксид кремния; EtOAc в гептане от 5/95 до 100/0). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме. Продукт очищали препаративной HPLC (от 59% H<sub>2</sub>O (25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) - 41% MeCN-MeOH до 17% H<sub>2</sub>O (25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) - 83% MeCN-MeOH). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме. Продукт растирали с н-пентаном с получением соединения 4 в виде бежевого твердого вещества (0,075 г, 34%). <sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, хлороформ-d) δ ppm 5,69 (d, J=54,6 Гц, 2 H) 6,80 (br s, 1 H) 7,00 (d, J=8,9 Гц, 1 H) 7,39-7,47 (т, 1 H) 7,54 (d, J=5,8 Гц, 1 H) 7,89 (d, J=8,8 Гц, 1 H) 7,97 (s, 1 H) 8,22 (d, J=2,1 Гц, 1 H) 8,43 (d, J=5, 8 Гц, 1 H) 9,09 (s, 1 H).

Получение соединения 5



K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,294 г, 1,386 ммоль), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (0,026 г, 0,0289 ммоль) и Xantphos (0,028 г, 0,0481 ммоль) добавляли к раствору промежуточного соединения 10 (0,084 г, 0,481 ммоль) в THF (4 мл) при барботировании азота. Через 10 мин добавляли изохинолин-6-амин (0,069 г, 0,481 ммоль) и смесь взбалтывали при к.т. в течение 10 мин. Затем смесь нагревали при 100°C в течение 16 ч. Добавляли Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (0,026 г, 0,0289 ммоль) и Xantphos (0,028 г, 0,0481 ммоль) при барботировании азота и смесь дополнительно нагревали при 100°C в течение ночи. Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (0,026 г, 0,0289 ммоль) и Xantphos (0,028 г, 0,0481 ммоль) добавляли при барботировании азота и смесь дополнительно нагревали при 100°C в течение ночи. Смесь промывали с помощью водн. насыщ. NaHCO<sub>3</sub> и экстрагировали с помощью EtOAc. Органический слой высушивали над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и растворитель выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (диоксид кремния; EtOAc в DCM от 0/100 до 50/50). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме. Продукт дополнительно очищали препаративной HPLC (от 75% [25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>] - 25% [ACN: MeOH 1:1] до 38% [25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>] - 62% [ACN: MeOH 1:1]). Требуемые фракции объединяли и растворитель выпаривали. Продукт растирали с Et<sub>2</sub>O и фильтровали с получением соединения 5 (0,042 г, 31%). <sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 3,34-3,48 (m, 2 H) 4,58 (dt, J=47,6, 4,8 Гц, 2 H) 5,63 (br t, J=5, 9 Гц, 1 H) 6,86 (d, J=8,8 Гц, 1 H) 7,11 (dd, J=8,8, 2,7 Гц, 1 H) 7,47-7,57 (m, 2 H) 7,78 (d, J=2,5 Гц, 1 H) 7,87 (d, J=8,9 Гц, 1 H) 8,21-8,31 (m, 2 H) 8, 96 (s, 1 H) 9, 12 (s, 1 H).

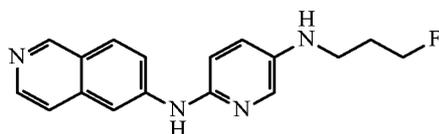
Получение соединения 6



K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,444 г, 2,092 ммоль), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (0,040 г, 0,0436 ммоль) и Xantphos (0,042 г, 0,0726 ммоль) добавляли к раствору промежуточного соединения 11 (0,137 г, 0,726 ммоль) в THF (6 мл) при барботировании азота. Через 10 мин добавляли изохинолин-6-амин (0,105 г, 0,726 ммоль) и смесь взбалтывали при к.т. в течение 10 мин. Затем смесь нагревали при 100°C в течение 16 ч. Еще добавляли Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (0,026 г, 0,0289 ммоль) и Xantphos (0,028 г, 0,0481 ммоль) при барботировании азота через смесь, после чего ее дополнительно нагревали при 100°C в течение ночи. Смесь промывали с помощью водн. насыщ. NaHCO<sub>3</sub>

и экстрагировали с помощью EtOAc. Объединенные органические слои высушивали над  $MgSO_4$ , фильтровали и растворитель выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (диоксид кремния; EtOAc в DCM от 0/100 до 65/35). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме. Продукт дополнительно очищали препаративной HPLC (от 70% [25 mM  $NH_4HCO_3$ ] - 30% [ACN: MeOH 1:1] до 27% [25 mM  $NH_4HCO_3$ ] - 73% [ACN: MeOH 1:1]). Требуемые фракции объединяли и растворитель выпаривали. Продукт растирали с  $Et_2O$  и фильтровали с получением соединения 6 (0,092 г, 43%).  $^1H$ -ЯМР (300 МГц,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 2,93 (s, 3 H) 3,62 (dt,  $J=26,7, 4,6$  Гц, 2 H) 4,60 (dt,  $J=47,7, 4,7$  Гц, 2 H) 6,93 (d,  $J=9,1$  Гц, 1 H) 7,28 (dd,  $J=9,0, 2,7$  Гц, 1 H) 7,46-7,60 (m, 2 H) 7,82-7,94 (m, 2 H) 8,27 (d,  $J=5, 8$  Гц, 1 H) 8,34 (s, 1 H) 8,97 (s, 1 H) 9,21 (s, 1 H).

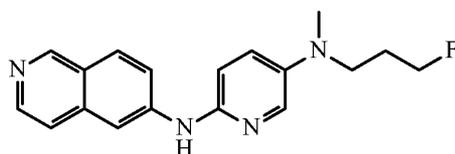
Получение соединения 7



· HCl

$K_3PO_4$  (0,544 г, 2,565 ммоль),  $Pd_2(dba)_3$  (0,049 г, 0,0534 ммоль) и Xantphos (0,052 г, 0,0891 ммоль) добавляли к раствору промежуточного соединения 13 (0,168 г, 0,891 ммоль) в THF (6 мл) при барботировании азота. Через 10 мин добавляли изохинолин-6-амин (0,128 г, 0,891 ммоль) и смесь взбалтывали при к.т. в течение 10 мин. Затем смесь нагревали при  $100^\circ C$  в течение 16 ч. Добавляли больше  $Pd_2(dba)_3$  (0,049 г, 0,0534 ммоль) и Xantphos (0,052 г, 0,0891 ммоль) под потоком азота и смесь снова нагревали при  $100^\circ C$  в течение ночи. Добавляли  $Pd_2(dba)_3$  (0,049 г, 0,0534 ммоль) и Xantphos (0,052 г, 0,0891 ммоль) под потоком азота и смесь снова нагревали при  $100^\circ C$  в течение 6 ч. Смесь промывали с помощью насыщ.  $NaHCO_3$  и экстрагировали с помощью EtOAc. Орг. слои высушивали над  $MgSO_4$ , фильтровали и растворитель выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (диоксид кремния; EtOAc в DCM от 0/100 до 45/55). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме. Продукт очищали препаративной HPLC (от 75% [25 mM  $NH_4HCO_3$ ] - 25% [ACN: MeOH 1:1] до 0% [25 mM  $NH_4HCO_3$ ] - 100% [ACN: MeOH 1:1]). Требуемые фракции объединяли и растворитель выпаривали. Остаток растворяли в DCM, добавляли HCl (5M в 2-пропанол) и полученную в результате смесь концентрировали в вакууме. Остаток растирали с  $Et_2O$  и фильтровали с получением соединения 7 в виде оранжевого твердого вещества (0,066 г, выход 22%).  $^1H$ -ЯМР (300 МГц,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 1,83-2,05 (m, 2 H) 3,17 (br t,  $J=6,8$  Гц, 2 H) 4,58 (dt,  $J=47,4, 5,8$  Гц, 2 H) 5,83 (br s, 1 H) 7,00 (d,  $J=8,8$  Гц, 1 H) 7,12 (dd,  $J=8,7, 2,7$  Гц, 1 H) 7,77 (dd,  $J=9,2, 1,2$  Гц, 1 H) 7,81 (d,  $J=2,5$  Гц, 1 H) 7,99 (d,  $J=6,9$  Гц, 1 H) 8,20 (d,  $J=9,1$  Гц, 1 H) 8,28 (d,  $J=6, 6$  Гц, 1 H) 8,42 (s, 1 H) 9,30 (s, 1 H) 10,08 (s, 1 H).

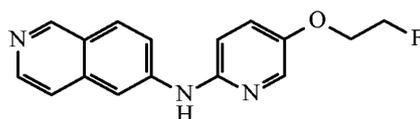
Получение соединения 8



· HCl

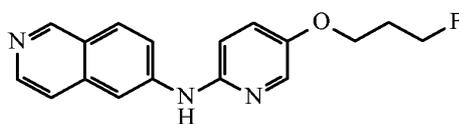
$K_3PO_4$  (0,431 г, 2,032 ммоль),  $Pd_2(dba)_3$  (0,039 г, 0,0423 ммоль) и Xantphos (0,041 г, 0,0706 ммоль) добавляли к раствору промежуточного соединения 14 (0,143 г, 0,706 ммоль) в THF (5,9 мл) при барботировании азота через смесь. Через 10 мин добавляли изохинолин-6-амин (0,102 г, 0,706 ммоль) и смесь взбалтывали при к.т. в течение 10 мин. Затем смесь нагревали при  $100^\circ C$  в течение 16 ч. Добавляли еще  $Pd_2(dba)_3$  (0,039 г, 0,0423 ммоль) и Xantphos (0,041 г, 0,0706 ммоль) при барботировании азота через смесь, после чего ее нагревали при  $100^\circ C$  в течение ночи. Дополнительный  $Pd_2(dba)_3$  (0,039 г, 0,0423 ммоль) и Xantphos (0,041 г, 0,0706 ммоль) добавляли при барботировании азота и смесь нагревали при  $100^\circ C$  в течение 6 ч. Смесь промывали с помощью насыщ.  $NaHCO_3$  и экстрагировали с помощью EtOAc. Орг. слой высушивали над  $MgSO_4$ , фильтровали и растворитель выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (диоксид кремния; EtOAc в DCM от 0/100 до 20/80). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме. Продукт дополнительно очищали препаративной HPLC (от 75% [25 mM  $NH_4HCO_3$ ] - 25% [ACN: MeOH 1:1] до 0% [25 mM  $NH_4HCO_3$ ] - 100% [ACN: MeOH 1:1]). Требуемые фракции объединяли и растворитель выпаривали. Неочищенный продукт растворяли в DCM, добавляли HCl (5н. в 2-пропанол) смесь концентрировали в вакууме. Остаток растирали с  $Et_2O$  и фильтровали с получением соединения 8 в виде оранжевого твердого вещества (0,058 г, 23%).  $^1H$ -ЯМР (300 МГц,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 1,78-2,02 (m, 2 H) 2,92 (s, 3 H) 3,45 (br t,  $J=7,1$  Гц, 2 H) 4,52 (dt,  $J=47,4, 5,7$  Гц, 2 H) 7,09 (d,  $J=8,9$  Гц, 1 H) 7,29 (dd,  $J=9,0, 3,0$  Гц, 1 H) 7,81 (dd,  $J=8,8, 1,2$  Гц, 1 H) 7,91 (d,  $J=2,6$  Гц, 1 H) 7,98 (d,  $J=6,6$  Гц, 1 H) 8,21 (d,  $J=9,1$  Гц, 1 H) 8,29 (d,  $J=6,7$  Гц, 1 H) 8,51 (s, 1 H) 9,32 (s, 1 H) 10,20 (s, 1 H).

Получение соединения 9



$K_3PO_4$  (0,449 г, 2,117 ммоль),  $Pd_2(dba)_3$  (0,040 г, 0,0441 ммоль) и Xantphos (0,043 г, 0,0735 ммоль) добавляли к раствору промежуточного соединения 15 (0,142 г, 0,809 ммоль) в THF (4 мл) при барботировании азота через смесь. Через 10 мин добавляли изохинолин-6-амин (0,106 г, 0,735 ммоль) и смесь взбалтывали при к.т. в течение 10 мин. Затем смесь нагревали при 100°C в течение 16 ч. После охлаждения до к.т. смесь промывали с помощью водн. насыщ.  $NaHCO_3$  и экстрагировали с помощью EtOAc. Объединенные органические слои высушивали над  $MgSO_4$ , фильтровали и растворитель выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали колоночной флэш-хроматографией (силикагель; EtOAc в гептане от 0/100 до 40/60). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме. Продукт растирали с диизопропиловым эфиром и фильтровали с получением соединения 9 в виде бежевого твердого вещества (0,116 г, 55%).  $^1H$ -ЯМР (300 МГц,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 4,28 (br dt,  $J=30,2, 3,3$  Гц, 2 H) 4,75 (br dt,  $J=47,9, 3,3$  Гц, 2 H) 6,99 (d,  $J=8,9$  Гц, 1 H) 7,43 (dd,  $J=8,9, 2,7$  Гц, 1 H) 7,52-7,68 (m, 2 H) 7,93 (d,  $J=8,8$  Гц, 1 H) 8,07 (d,  $J=2,5$  Гц, 1 H) 8,30 (br d,  $J=5,6$  Гц, 1 H) 8,42 (s, 1 H) 9,02 (s, 1 H) 9,44 (s, 1 H).

Получение соединения 10



· HCl

$K_3PO_4$  (0,449 г, 2,117 ммоль),  $Pd_2(dba)_3$  (0,040 г, 0,0441 ммоль) и Xantphos (0,043 г, 0,0735 ммоль) добавляли к раствору промежуточного соединения 16 (0,153 г, 0,809 ммоль) в THF (4 мл) при барботировании азота через смесь. Через 10 мин добавляли изохинолин-6-амин (0,106 г, 0,735 ммоль) и смесь взбалтывали при к.т. в течение 10 мин. Затем смесь нагревали при 100°C в течение 16 ч. Смесь промывали с помощью водн. насыщ.  $NaHCO_3$  и экстрагировали с помощью EtOAc. Объединенные орг. слои высушивали над  $MgSO_4$ , фильтровали и растворитель выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали колоночной флэш-хроматографией (диоксид кремния; EtOAc в гептане от 0/100 до 35/65). Требуемые фракции собирали и концентрировали в вакууме. Остаток растворяли в DCM, добавляли HCl (5н. в 2-пропанол) и смесь концентрировали в вакууме. Остаток растирали с DIPE и фильтровали с получением соединения 10 в виде желтого твердого вещества (0,147 г, 47%).  $^1H$ -ЯМР (300 МГц,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 2,00-2,23 (m, 2 H) 4,16 (t,  $J=6,2$  Гц, 2 H) 4,63 (dt,  $J=47,3, 5,8$  Гц, 2 H) 7,18 (d,  $J=8,9$  Гц, 1 H) 7,51 (dd,  $J=8,9, 3,0$  Гц, 1 H) 7,91 (dd,  $J=9,2, 1,4$  Гц, 1 H) 8,07 (d,  $J=6,7$  Гц, 1 H) 8,13 (d,  $J=2,7$  Гц, 1 H) 8,28 (d,  $J=9,1$  Гц, 1 H) 8,34 (d,  $J=6, 6$  Гц, 1 H) 8,63 (s, 1 H) 9,41 (s, 1 H) 10,44 (s, 1 H).

С. Радиохимический синтез.

Материалы и способы.

Общая информация.

Нерадиоактивный эталонный материал для T808 синтезировали с помощью Janssen Research & Development (подразделение Janssen Pharmaceutica NV, Бирс, Бельгия) согласно сообщениям в литературе (Declercq L., Celen S., Lecina J. et al. *Molecular Imaging* 2016, 15, 1-151). Все химические вещества и реагенты приобретали у коммерческих источников и применяли без дополнительной очистки. HPLC-анализ проводили на системе LaChrom Elite HPLC (Hitachi, Дармштадт, Германия), соединенной с детектором УФ-излучения, установленным на 254 нм. Для анализа меченых радиоактивным изотопом соединений, элюат HPLC после пропускания через УФ-детектор проводили через сцинтилляционный детектор с NaI (TI) размером 3 дюйма, присоединенный к одноканальному анализатору (GABI box; Raytest, Штраубенхардт, Германия). Данные получали и анализировали с применением систем сбора данных GINA Star (Raytest).

Тритирование соед. № 1



Соед. № 1 [ $^3H$ ] соед. № 1.

Соед. № 1 (1,74 мг, 6,87 мкмоль) и (1,2,5,6-η)-1,5-циклооктадиен(пиридин) (трициклогексилфосфин)иридия(I) гексафторфосфат, также называемый катализатором Крэбтри (7,72 мг, 9,59 мкмоль) растворяли в  $CH_2Cl_2$  (0,6 мл). Ярко-оранжевый раствор дегазировали три раза на коллекторе для тритирования RC Trites, а затем взбалтывали в атмосфере тритиевого газа (8,9 Ки) в течение 3,5 ч при комнатной температуре. Максимальное давление, достигаемое при реакции, составляло 882 мбар. После реакции

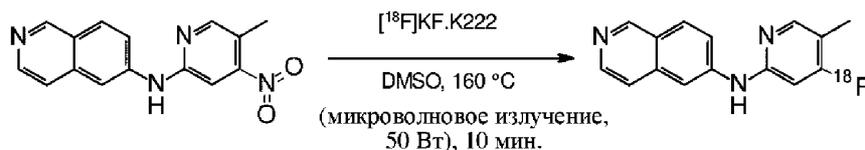
растворитель удаляли под вакуумом. Нестабильный тритий замещали путем добавления метанола (0,8 мл), взбалтывания раствора и повторного удаления растворителя под вакуумом. Данный способ повторяли три раза с получением сухого твердого неочищенного продукта.

Неочищенный продукт очищали с помощью способа HPLC: колонка Macherey+Nagel Nucleodur Gravity C18, 5 мкм, 8×150 мм; подвижная фаза А: вода с 0,1% TFA, В: ацетонитрил с 0,1% TFA; изократическая при 27% В; скорость потока 3,1 мл/мин, 230 и 254 нм, 20°C. После HPLC доводили pH фракций собранного продукта до нейтрального значения водным раствором NaHCO<sub>3</sub> (10%). Объем смеси уменьшали на роторном испарителе. Затем продукт экстрагировали с помощью картриджа Phenomenex StrataX (3 мл, 100 мг), которые элюировали этанолом (5 мл). Полученный продукт дополнительно очищали с помощью HPLC в основных условиях: Macherey+Nagel Nucleodur Sphinx RP, 5 мкм, 8×150 мм; подвижная фаза А: 10 mM NH<sub>4</sub>OAc с 0,05% NH<sub>4</sub>OH, В: ацетонитрил; изократическая при 46,5% В; скорость потока 3,1 мл/мин, 230 и 254 нм, 20°C. Объем фракций собранного продукта уменьшали на роторном испарителе. Затем продукт экстрагировали с помощью картриджа Phenomenex StrataX (3 мл, 100 мг), которые элюировали этанолом (5 мл).

Радиохимическую чистоту [<sup>3</sup>H] соед. № 1 определяли как >99% с помощью следующего способа HPLC: колонка: Macherey+Nagel Nucleodur Sphinx RP (5 мкм), 4,6×150 мм, температура колонки: 30°C, подвижная фаза А: 10 mM NH<sub>4</sub>OAc с 0,05% об./об. NH<sub>4</sub>OH в воде, подвижная фаза В: ацетонитрил, скорость потока: 1,0 мл/мин, объем введения: 5 мкл, длина волны выявления: УФ при 254 нм, градиент элюирования: градиент от 5%В до 95%В за 0-20 мин; изократическая при 95% В за 20-25 мин; градиент от 95% В до 5% В за 25-25,5 мин. Поточковым детектором радиоактивности служил Berthold LB 513 с коктейлем Zinsser Quickszint Flow 302 при скорости потока 3,0 мл/мин.

Специфическую активность определяли до 57,7 мКи/ммоль с помощью масс-спектрометрии. Условия LCMS: колонка Agilent Zorbax SB C18 (1,8 мкм) 2,1×50 мм; подвижная фаза А: вода, 0,1% муравьиная кислота, В: MeCN 0,1% муравьиная кислота; 0 мин. 5% В; 0,2 мин. 5% В; 5 мин. 80% В; скорость потока 0,6 мл/мин; введение 1,0 мкл (1,06 мКи, 39,2 кБк), УФ-выявление 225 нм; температура 60°C.

Радиофторирование соед. № 1 (n=6)



Промеж. соед. 2

[<sup>18</sup>F] соед. № 1

Получали фторид-18 ([<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup>) с помощью ядерной реакции <sup>18</sup>O(p,n)<sup>18</sup>F на циклотроне Cyclone 18/9 (Ion Beam Applications, Лувэн-ла-Нев, Бельгия) путем облучения 2 мл 97% обогащенного <sup>18</sup>O-H<sub>2</sub>O (Rotem NYOX18, Rotem Industries, Беэр-Шева, Израиль) протонами 18-МэВ. После облучения [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> захватывали в анионообменном картридже SepPak Light Accell plus QMA (форма CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, Waters, Милфорд, Массачусетс, США) и элюировали с помощью смеси КRYPTOFIX 2.2.2 (K-222, 27,86 мг) и K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,46 мг), растворенной в CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,75 мл; 95:5 об./об.). После выпаривания растворителя с помощью потока геля при 80°C и 35 Вт (микроволновый резонатор) добавляли безводный CH<sub>3</sub>CN (1 мл) и дополнительно высушивали [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> при тех же условиях. Раствор 0,50 мг нитросодержащего предшественника в 0,25 мл DMSO добавляли к сухому остатку [<sup>18</sup>F] F<sup>-</sup>/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/K-222 и смесь нагревали при 160°C и 50 Вт в течение 10 мин в микроволновом резонаторе. Неочищенную смесь для введения радиоактивной метки разбавляли с помощью 0,6 мл препаративного буфера (0,01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4, и EtOH (60:40 об./об.)) и очищали с применением HPLC с обращенной фазой (RP-HPLC) на колонке XBridge C<sub>18</sub> (5 мкм, 4,6 мм × 150 мм; Waters, Милфорд, США) с элюированием смесью Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4, и EtOH (60:40 об./об.) при расходе 0,8 мл/мин, и УФ-детекции при 254 нм. [<sup>18</sup>F]соед. № 1 элюировали 27 мин. Очищенный раствор с радиоактивным маркером 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<sub>18</sub>, 3,5 мкм, 3,0 мм×100 мм; Waters, Милфорд, США) с элюированием смесью 0,01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4, и CH<sub>3</sub>N (68:32 об./об.) при расходе 0,8 мл/мин. УФ-детекцию проводили при 254 нм. [<sup>18</sup>F]соед. № 1 элюировали 8 мин.

Получали [<sup>18</sup>F]соед. № 1 со средним, скорректированным относительно затухания радиохимическим выходом, составлявшим соответственно 12% (относительно радиоактивности [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> на препаративной хроматограмме, n=6). Эту радиохимическую чистоту исследовали с применением HPLC на аналитической колонке C<sub>18</sub>, и она составляла более 99%. [<sup>18</sup>F]соед. № 1 получали на протяжении общего времени синтеза, составлявшего 60 мин, и собирали со средней конкретной радиоактивностью 85 Гбк/ммоль в конце проведения синтеза (EOS, n=6).

Д. Аналитическая часть.

Точки плавления.

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

Для нескольких соединений точки плавления определяли с помощью прибора DSC823e (Mettler-Toledo). Точки плавления измеряли при градиенте температуры, составлявшем 10°C/мин. Максимальная температура составляла 300°C.

Для нескольких соединений значения точки плавления определяли в открытых капиллярных трубках на Mettler Toledo MP50. Точки плавления измеряли при градиенте температуры, составлявшем 10°C/мин. Максимальная температура составляла 300°C. Данные о точках плавления считывали с цифрового дисплея и сверяли с данными системы видеозаписи.

Способы LC/MS.

Измерения в ходе высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) осуществляли 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 (MS), который был оснащен источником ионизации при атмосферном давлении. В компетенции специалиста в данной области техники находится установка настраиваемых параметров (например, диапазона сканирования, времени выдержки и т.п.) с целью получения ионов, обеспечивающих определение номинальной мономерной молекулярной массы (MW) соединения. Сбор данных осуществляли с помощью соответствующего программного обеспечения.

Соединения описывали по их значениям экспериментального времени удерживания ( $R_t$ ) и ионам. Если в таблице данных не указано иное, то указанный молекулярный ион соответствует  $[M+H]^+$  (протонированная молекула) и/или  $[M-H]^-$  (депротонированная молекула). В случае если соединение не было непосредственно способно к ионизации, указывают тип аддукта (т.е.  $[M+NH_4]^+$ ,  $[M+HCOO]^-$  и т.д.). Для молекул со сложными изотопными распределениями (Br, Cl) сообщаемое значение представляет собой значение, которое получали 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, "ВЕН" означает мостиковый гибрид этилсилосана/диоксида кремния, "DAD" означает детектор на диодной матрице, "HSS" означает диоксид кремния повышенной прочности.

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

№ способа	Прибор	Колонка	Подвижная фаза	Градиент	Расхо	Время анали за (мин. )
					д ----- -- Т кол.	
1	Waters: Acquity® UPLC®-DAD и SQD	Waters: HSS T3 (1,8 мкм, 2,1 * 100 мм)	А: 10 мМ CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> в 95% H <sub>2</sub> O+5% CH <sub>3</sub> CN В: CH <sub>3</sub> 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
2	Waters: Acquity® UPLC® - DAD и SQD	Waters: ВЕН C18 (1,7 мкм, 2,1 * 50 мм)	А: 10 мМ CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> в 95% H <sub>2</sub> O+5% CH <sub>3</sub> CN В: CH <sub>3</sub> CN	От 95% А до 5% А за 1,3 мин., удерживание в течение 0,7 мин.	0,8 ----- -- 55	2
3	Agilent: 1100-DAD и MSD	YMC: Pack ODS-AQ (3 мкм, 4,6x50 мм)	А: 0,1% HCOOH в воде, В: CH <sub>3</sub> CN	От 95% А до 5% А за 4,8 мин., удерживание в течение 1	2,6	6

				мин., обратно до 95% А за 0,2 мин.		
4	Agilent 1290 Infinity DAD TOF- LC/MS G6224A	YMC-pack ODS-AQ C18 (50×4,6 мм, 3 мкм)	А: 0,1% НСООН в Н <sub>2</sub> O В: CH <sub>3</sub> CN	Система эмульсии ISET 2V1,0 для насоса Agilent G1312A V1,0 От 94,51% А до 5% А за 4,8 мин., удерживание в течение 1,0 мин., до 95% А за 0,2 мин.	2,6 ----- -- 35	6,0
5	Waters: Acquity® UPLC® - DAD и SQD	Waters: BEH C18 (1,7 мкм, 2,1 * 50 мм)	А: 10 мМ CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> в 95% Н <sub>2</sub> O+5% CH <sub>3</sub> CN В: CH <sub>3</sub> CN	От 95% А до 5% А за 1,3 мин., удерживание в течение 0,2 мин., до 95% А за 0,2 мин., удерживание в течение 0,1 мин.	0,7 ----- -- 70	1,8

Таблица 1b. Данные анализа LCMS (R<sub>t</sub> означает время удерживания (в минутах), [M+H]<sup>+</sup> означает массу протонированного соединения, способ относится к способу, применяемому для анализа (LC)MS)

№ соед.	Т. пл. (°С)	К. т.	[M+H] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	Способ LCMS
I-2		0,94	281,2	279,1	2
1	182,53°С. (DSC) *	1,84	254,2	252,1	1
2	203,3°С.	2,073	254,0		3
3	208,5°С.	1,878	268,0		3
4	173,1°С.	1,772	270,0		3
5	191,4°С.	1,413	283,2		4
6	146,3°С.	1,647	297,2		4
7	285,1°С.	1,533	297,2		4
8		1,758	311,2		4
9	104,6°С.	1,72	284,2	282,2	5
10	249,3°С.	1,947	298,2		4

\* от 30 до 300°С при 10°С/мин 50 мл N<sub>2</sub>.

Определения CHN и определения воды.

Для нескольких соединений количество углерода, водорода и азота (CHN) в (% вес./вес.) определяли с помощью Dynamic Flash Combustion на анализаторе EA 1108 CHN от Fisons instruments.

Для нескольких соединений воду (% вес./вес.) определяли с помощью измерителя влажности СА-02 (Mitsubishi), кулонометрический принцип, применяемый к титрованию Карла-Фишера.

Таблица 1с. Определения СНН и воды

№ соед.	С (% вес/вес)	Н (% вес/вес)	Н (% вес/вес)	Н <sub>2</sub> О (% вес/вес)
1	70,52	4,95	16,79	
I-2	57,63	3,96	15,07	0,42

Е. Биологическая часть.

Материалы и способы.

Общая информация.

Количественное определение радиоактивности в образцах для исследований биораспределения и радиоактивных метаболитов проводили с применением автоматизированного  $\gamma$ -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. Грызунов 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 в отношении животных.

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 и Davies (Greenberg S.G., Davies P. A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct T 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 ( $\sim 10$  г) гомогенизировали с 10-кратным объемом холодного буфера для гомогенизации (10 мМ Трис, 800 мМ NaCl, 1 мМ EGTA, 10% сахарозы, pH 7,4, содержащего фосфатазу PhosSTOP и ингибитор протеаз complete, не содержащий EDTA (Roche, Вилворде, Бельгия)) на льду. После центрифугирования при  $27000 \times g$  в течение 20 мин при  $4^{\circ}\text{C}$  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  $37^{\circ}\text{C}$  при встряхивании на орбитальном шейкере. Впоследствии путем ультрацентрифугирования при  $108000 \times g$  в течение 1,5 ч при комнатной температуре осадок обогащали агрегированными тау-белками. Надосадочную жидкость удаляли и осадок осторожно промывали дважды небольшим количеством TBS (50 мМ Трис, 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  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Обогащенные препараты агрегированных бета-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 Трис-основания, 1 мМ EDTA, 1 мМ EGTA, а также фосфатаза PhosSTOP и ингибитор протеаз complete без EDTA) на льду. После центрифугирования при  $27000 \times g$  в течение 20 мин клеточный дебрис удаляли при  $4^{\circ}\text{C}$ . Надосадочную жидкость, содержащую амилоидные бляшки, разделяли на аликвоты и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Анализы *in vitro* конкурентного связывания радиоактивного лиганда.

В анализах конкурентного связывания радиоактивного лиганда измеряли связывание меченого 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 с помощью 5% этанола. В 96-луночном формате добавляли  $^3\text{H}$ -Т808 (специфическая активность; 32,97 Ки/ммоль) 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 удаляли с помощью фильтрации 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 меченого радиоактивным изотопом лиганда, связавшегося с фибриллами посредством жидкостно-сцинтилляционной детекции в приборе Topcount (Packard Instrument Company, Коннектикут, США).

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

Для определения связывания соединения с агрегированным бета-амилоидом осуществляли сходный анализ, но с некоторыми небольшими модификациями. Вкратце, амилоидные препараты разбавляли до 150 мкг белка/мл в 50 мМ Трис с помощью 0,1% BSA и 5% этанола. Добавляли  $^3H$ -AV-45 (флорбетапир - 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. № 1 демонстрировало эффективное связывание ( $IC_{50}$  8,24, соответствующая  $K_i$  2,4 нМ) с экстрагированным тау-белком человека с использованием  $[^3H]$ -T808 и слабое связывание с агрегатами экстрагированного амилоида-бета человека ( $IC_{50}$  5,18, соответствующая  $K_i$  3,2 мкМ) с использованием  $[^3H]$ -AV-45 в данном анализе замещения радиоактивной метки.

Иммуногистохимия (ИНС): М&М головного мозга человека.

Блоки головного мозга человека с AD (стадия по Брааку V-VI) подвергали быстрой заморозке, делали срезы на криостате (толщиной 20 мкм) 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 мин и в блокирующем реагенте (PBS1x+0,05% Triton X-100) в течение 1 ч. Антитело к амилоиду или тау-белку [(4G8, Covance, SIG-38220), разбавление 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 ч. Ткань стриатума иммунологически метили антителами к MAO-B и MAO-A (1:100, Thermo Fisher) для подтверждения экспрессии MAO.

После сильного промывания срезы инкубировали с вторичным антителом к антителу мыши, конъюгированному с HRP (Envision, DAKO, R4000), с последующим нанесением хромогенного мечения DAB (DAKO, K3468). После контрастного окрашивания гематоксилином срезы обезвоживали и заливали органической заливочной средой (Vectamount, Vector labs, H-5000). На фиг. 1с показана патология, связанная с бета-амилоидами, в головном мозге с AD, определенная с помощью 4G8 ИНС, и на фиг. 1b показана патология, связанная с тау-белками, в головном мозге с AD, определенная с помощью AT8 ИНС.

Авторадиографические исследования.

а) Высушенные на воздухе замороженные срезы толщиной 10-мкм зрительной зоны коры пациентки с AD (68-летняя женщина с заболеванием стадии по Брааку V-VI) инкубировали в течение 60 мин с  $[^{18}F]$ соед. № 1 (7,4 кБк/500 мкл на срез), а затем промывали смесями PBS и этанола, как описано в другом месте (Xia C.F., Arteaga J., Chen G. et al. *Alzheimer's Dement.* 2013, 1-11). Для оценки специфичности связывания срезы инкубировали с маркером в присутствии 1 мкМ аутентичного T808 или 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 использованием программного обеспечения Optiquant. Результаты выражали в виде цифровых световых единиц на квадратный мм (DLU/мм<sup>2</sup>). Смежные срезы с AD иммуноокрашивали с помощью антител к тау-белку (AT8) и A $\beta$  (4G8) для установления отношения со связыванием  $[^{18}F]$ соед. № 1.

Цифровая авторадиография с  $[^{18}F]$ соед. № 1 на человеческих срезах больного AD продемонстрировала высокое и селективное связывание с кортикальными участками, богатыми на тау-белки (фиг. 1, А). Иммуногистохимию с антителами к тау-белкам и к A $\beta$  выполняли на смежных срезах, идентифицировали многочисленные отложения в виде NFT и нейритических бляшек, что подтверждает совместную локализацию связывания маркера с NFT (фиг. 1, соответственно В и С). Для оценки специфичности связывания маркера с этими NFT проводили исследования блокирования с аутентичным эталонным соед. № 1 и структурно неродственным эталонным соединением T808 (фиг. 2). Самоблокирование холодным соед. № 1 приводило к 99% ингибированию, что продемонстрировало, что связывание  $[^{18}F]$ соед. № 1 является специфическим. Связывание  $[^{18}F]$ соед. № 1 уменьшалось на 99% в присутствии 1 мкМ T808, указывая на тау-специфическое связывание, поскольку сообщалось о высокой аффинности T808 ( $K_D=22$  нМ) в отношении агрегированного тау и высокой селективности в отношении тау по сравнению с агрегатами A $\beta$  (27-кратная) (Zhang W., Arteaga J., Cashion D.K. et al. *J Alzheimers Dis.* 2012, 31(3), 601-612).

б)  $[^3H]$ -соед. № 1 связывалось с замороженными срезами мозга больного AD с патологией, связанной с тау-белками и патологией, связанной с A $\beta$ , но не связывалось с тканью больного AD без патологии, связанной с тау-белками, содержащей только бляшки A $\beta$  (фиг. 3D, E). Маркер тестировали при 10 нМ и при этом более высокие концентрации в данном исследовании не рассматривали. Важно отметить,

что [ $^3\text{H}$ ]-соед. № 1 также не демонстрировало связывания с богатой на MAO человеческой тканью (стриатумом) (фиг. 3А). Эти данные подтверждают, что соединение по изобретению является селективным по отношению к патологии, связанной с тау-белками, но не к патологии, связанной с А $\beta$  и MAO.

Для сравнения использовали маркер тау [ $^3\text{H}$ ]-ТНК-5351 и маркер А $\beta$  [ $^3\text{H}$ ]-AV-45, поскольку известно, что ТНК-5351 также связывается с MAO. Эти эксперименты показывают, что 10 нМ [ $^3\text{H}$ ]-ТНК-5351 связывалось с богатой на MAO человеческой тканью, и это связывание могло самоблокироваться с помощью 10 мкМ ТНК-5351 (холодного), а также 10 мкМ соед. № 1 (холодного) (фиг. 3F-H). Это указывает на то, что соед. № 1 при более высоких концентрациях может связывать MAO.

[ $^3\text{H}$ ]-ТНК5351 также связывалось с тканью больного AD, содержащей только бляшки А $\beta$  (негативной по тау), что подтверждает таким образом низкую селективность ТНК-5351 (фиг. 3I, J).

[ $^3\text{H}$ ]-AV-45 (селективное по отношению к бляшкам А $\beta$ ) связывалось, как предполагалось, с человеческими тканями как с патологией, связанной с тау-белками, и патологией, связанной с А $\beta$  (А $\beta$ +/тау+, ткань № 28391), так и с патологией, связанной только с А $\beta$  (А $\beta$ +/тау-, ткань № 92/050) (фиг. 3L-M). В качестве контроля для ткани человека, больного AD (ткань № 28391: фиг. 4, ткань № 92/050: фиг. 5) и ткани стриатума (фиг. 6), используемых в данном исследовании, выполняли иммуногистохимию. Ткани человека, больного AD (№ 28391; № 92/050), иммунологически метили с помощью 4G8 (антитело к амилоиду) и AT8 (антитело к тау-белку) и при этом четко продемонстрировано, что срезы из № 28391 являются А $\beta$ +/тау+, тогда как срезы из № 92/050 являются А $\beta$ +/тау- (фиг. 4 и 5). Дополнительно, экспрессию MAO-B и MAO-A в человеческой ткани стриатума (№ S96/037) подтверждали с использованием иммуногистохимии (фиг. 6). Эти данные подтверждают выводы из *in vitro* связывания, наблюдаемого на фиг. 3.

с) Связывание [ $^{18}\text{F}$ ] соед. № 1 с тканью человека, больного AD, оценивали в присутствии подтвержденных связывающих MAO. Как можно видеть на фиг. 7, 0,2 мКи/мл [ $^{18}\text{F}$ ] соед. № 1 продемонстрировало сильное связывание со срезами человека, больного AD с патологией, связанной с тау-белками (фиг. 7А). Этот паттерн связывания сохранялся при инкубировании образца с 10 мкМ клоргиллина, сильного необратимого связывающего MAO, с умеренной селективностью в отношении А-подтипа (фиг. 7В), или 10 мкМ селегилина (= депренила), сильного необратимого связывающего MAO-B (фиг. 7С). Связывание [ $^{18}\text{F}$ ] соед. № 1 могло быть полностью заблокировано 10 мкМ аутентичного соед. № 1 (фиг. 7D). Смежные срезы с AD иммуноокрашивали с помощью антител к тау-белкам (AT8) и антител к А $\beta$  (4G8) для установления отношения со связыванием [ $^{18}\text{F}$ ]соед. № 1 (фиг. 8).

Исследования визуализации с помощью MicroPET Крысы линии Wistar.

Динамическое dPET сканирование в течение 120 мин с [ $^{18}\text{F}$ ]соед. № 1 или [ $^{18}\text{F}$ ]Т807 выполняли на  $\mu$ PET сканере Focus 220 (Concorde Microsystems, Ноксвилл, Теннесси, США) одновременно на трех самках крыс Wistar. В ходе всей процедуры крыс держали под газовой анестезией (2,5% изофлуран в  $\text{O}_2$  при скорости потока 1 л/мин). Изображения, получаемые с помощью сканирования, собирали в режиме списка и сбор данных подвергали редискретизации Фурье в 24 временных интервалах (4 $\times$ 15 с, 4 $\times$ 60 с, 5 $\times$ 180 с, 8 $\times$ 300 с, 3 $\times$ 600 с). Данные, которые реконструировали посредством 3D-реконструкции с применением максимальной апостериорной вероятности (3D-MAP), вручную выравнивали с помощью матрицы  $^{18}\text{F}$ -FDG головного мозга крысы в координатах Paxinos с применением аффинной трансформации с обеспечением анализа предварительно определенных исследуемых объемных областей (VOI) (Casteels C. et al. J. Nucl. Med. 2006, 47, 1858-1866). Кривые время-активность (ТАС) целого головного мозга получали с применением VOI с помощью программного обеспечения PMOD (v 3.2, PMOD Technologies, 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 зависимости от времени после инъекции маркера. Сканирования начинали сразу же после IV инъекции приблизительно 50 МБк радиоактивного маркера (n=3/маркер). Для предварительной обработки и исследований замещения холодное эталонное соединение соед. № 1 или Т807 растворяли в смеси 5% DMSO, 5% Tween 80 и 40% (2-гидроксипропил)-бета-циклодекстрина, фильтровали через 0,22 мкм мембранный фильтр (Millex-GV, Millipore) перед инъекцией. Предварительную обработку (n=1) выполняли путем подкожной (SC) инъекции 10 мг/кг соед. № 1 или Т807 за 60 мин. до инъекции радиоактивного маркера. Замещение (n=1) проводили с помощью IV инъекции 1 мг/кг соед. № 1 или Т807 через 30 мин после инъекции радиоактивного маркера. Изображения  $\mu$ PET сравнивали с исходным сканированием (n=1), полученным у не подвергнутой обработке крысы.

Результаты 120 мин исходного исследования и исследования предварительной обработки и слежения за меткой [ $^{18}\text{F}$ ]соед. № 1 и сравнительного соединения [ $^{18}\text{F}$ ]Т807 показаны на фиг. 9-11 (кривые время-активность, ТАС и %SUV<sub>макс</sub>). С помощью ТАС исходных сканирований [ $^{18}\text{F}$ ]соед. № 1 (фиг. 9) продемонстрировали высокое первоначальное поглощение головным мозгом с высокой интенсивностью величины SUV в головном мозге ~2,0 по сравнению с ~1,8 для [ $^{18}\text{F}$ ]Т807 (фиг. 10). Поглощение костной тканью наблюдали в более поздние моменты времени для обоих соединений.

[ $^{18}\text{F}$ ]соед. № 1 характеризовалось более высокой скоростью выведения (величина SUV 0,2 через 60 мин p.i.) по сравнению с [ $^{18}\text{F}$ ]Т807 (величина SUV 0,4 через 60 мин p.i.), как показано на кривых %SUV<sub>макс</sub>. (фиг. 11). Для [ $^{18}\text{F}$ ]соед. № 1 не наблюдали эффектов самопроизвольного блокирования или

самопроизвольного слежения за меткой, что отмечает отсутствие специфического связывания, не связанного с тау-белками, в головном мозге (фиг. 9). Регистрировали более низкое поглощение мозгом в ходе исходного сканирования [ $^{18}\text{F}$ ]T807 по сравнению с исследованием с предварительной обработкой, вероятно, вызванное насыщением метаболических ферментов и/или белков плазмы (фиг. 10). Сходный эффект наблюдали через 40 мин p.i. в исследовании слежения за меткой.

Исследования визуализации с помощью МикроPET макака-резус.

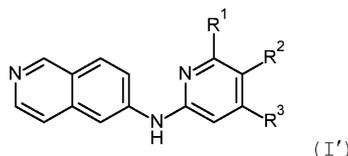
Динамическое сканирование  $\mu\text{PET}$  с использованием [ $^{18}\text{F}$ ]соед. № 1 или [ $^{18}\text{F}$ ]T807 длительностью 120 мин проводили с помощью сканера  $\mu\text{PET}$  Focus 220 у макака-резуса (6-летний самец *Macaca mulatta*, 7,6 кг), подвергнутого седативному воздействию кетамина (Ketalar®) и ксилазина (Rompun®) посредством внутримышечной (ИМ) инъекции. В ходе сканирования обезьяна несколько раз получала дополнительную дозу кетамина/ксилазина посредством ИВ инъекции. В ходе всего эксперимента отслеживали насыщенность крови  $\text{O}_2$ , частоту дыхательных движений и частоту сердечных сокращений.

Голову животного помещали по центру в поле обзора  $\mu\text{PET}$ -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 маркера. Сканирования начинали немедленно после ИВ инъекции 185 МБк [ $^{18}\text{F}$ ]соед. № 1 или [ $^{18}\text{F}$ ]T807 в подкожную вену правой ноги. Для исследования с предварительной обработкой холодное эталонное соединение соед. № 1 растворяли в смеси 10% DMSO и 40% (2-гидроксипропил)-бета-циклодекстрина, фильтровали через 0,22 мкм мембранный фильтр (Millex-GV, Millipore) перед инъекцией. Предварительную обработку (n=1) выполняли путем ИВ совместной инъекции 1 мг/кг холодного соед. № 1 и раствора радиоактивного маркера. Изображения  $\mu\text{PET}$  сравнивали с исходным сканированием (n=1), полученным у не подвергнутой обработке обезьяны.

Результаты 120 мин исходного сканирования [ $^{18}\text{F}$ ]соед. № 1 и [ $^{18}\text{F}$ ]T807 показаны на фиг. 12-14 (ТАС и %SUV<sub>макс</sub>). С помощью ТАС исходного сканирования [ $^{18}\text{F}$ ]соед. № 1 в головном мозге продемонстрировали высокое первоначальное поглощение головным мозгом (величина SUV ~5,4 во всем мозге) с быстрым выведением (фиг. 12). С помощью ТАС исходного сканирования [ $^{18}\text{F}$ ]T807 в головном мозге продемонстрировали более медленное первоначальное поглощение головным мозгом (величина SUV ~1,3) и выведение (фиг. 13). Однородное распределение [ $^{18}\text{F}$ ]соед. № 1 регистрировали во всех наблюдаемых участках мозга без усиленного поглощения в мозолистом теле. ТАС на стороне черепа продемонстрировали отсутствие поглощения костной тканью свободного  $^{18}\text{F}$ -фторида, наблюдаемого через 120 мин после p.i. инъекции, поскольку сигнал SUV в зависимости от времени не повышался.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

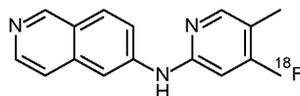
##### 1. Соединение формулы (I')



где  $\text{R}^2$  представляет собой метил, и либо  $\text{R}^1$  представляет собой  $^{18}\text{F}$ , и  $\text{R}^3$  представляет собой H, либо  $\text{R}^1$  представляет собой H, и  $\text{R}^3$  представляет собой  $^{18}\text{F}$ ; или

$\text{R}^1$  и  $\text{R}^3$  одновременно представляют собой H, и  $\text{R}^2$  выбран из группы, состоящей из  $-\text{C}_{1-4}$ алкил- $^{18}\text{F}$ ,  $-\text{OC}_{1-4}$ алкил- $^{18}\text{F}$  и  $-\text{NR}^4-\text{C}_{1-4}$  алкил- $^{18}\text{F}$ , где  $\text{R}^4$  представляет собой H или метил; или его фармацевтически приемлемая соль.

##### 2. Соединение по п.1, где соединение представляет собой



или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по п.1 или 2 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

4. Фармацевтическая композиция по п.3, где композиция представляет собой стерильный раствор.

5. Применение соединения по п.1 или 2 в связывании и визуализации агрегатов тау-белков.

6. Применение фармацевтической композиции по п.3 или 4 в связывании и визуализации агрегатов тау-белков.

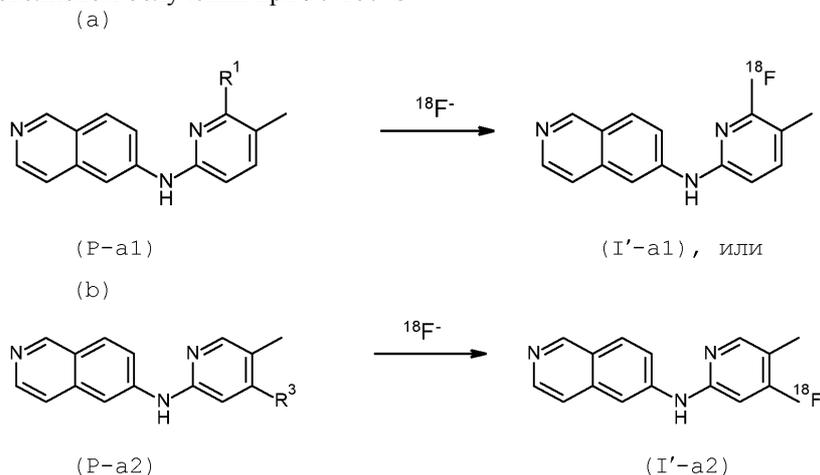
7. Применение соединения по п.1 или 2 для диагностической визуализации агрегатов тау-белков в головном мозге субъекта.

8. Применение фармацевтической композиции по п.3 или 4 для диагностической визуализации агрегатов тау-белков в головном мозге субъекта.

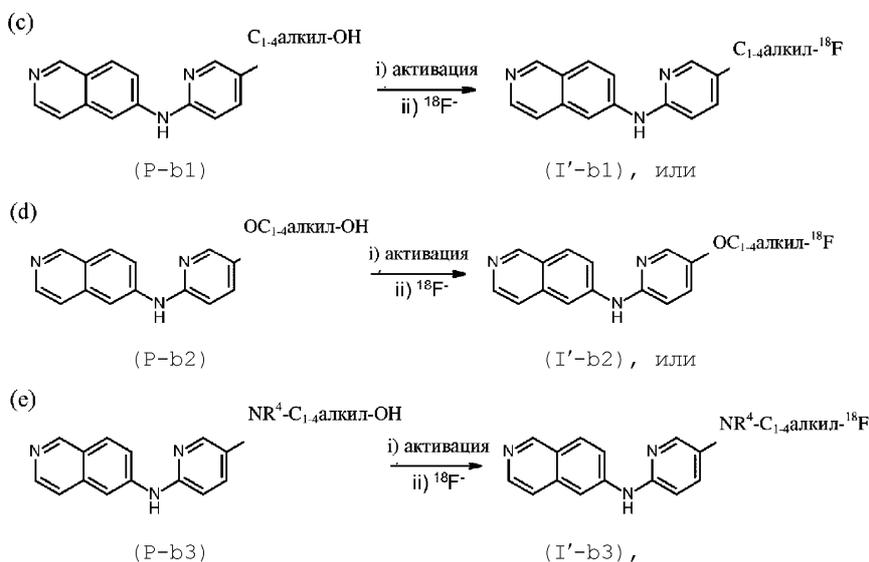
9. Применение соединения по п.1 или 2 в связывании и визуализации агрегатов тау-белков у пациента, страдающего или предположительно страдающего таупатией.

10. Применение фармацевтической композиции по п.3 или 4 в связывании и визуализации агрегатов тау-белков у пациента, страдающего или предположительно страдающего таупатией.

11. Способ получения соединения по п.1, предусматривающий стадию осуществления реакции (а) соединения формулы (P-a1) или (b) соединения формулы (P-a2), или его фармацевтически приемлемой соли с источником фторида  $^{18}\text{F}^-$  с использованием ДМСО или ДМФ в качестве растворителя при нагревании или микроволновом облучении при 90-160°C

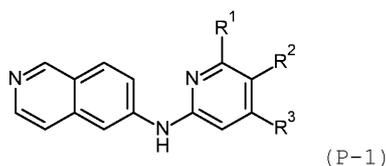


12. Способ получения соединения по п.1, предусматривающий стадию осуществления реакции (с) соединения формулы (P-b1), или (d) соединения формулы (P-b2), или (e) соединения формулы (P-b3), или их фармацевтически приемлемой соли с активирующим реагентом, представляющим собой метансульфонилхлорид или 4-толуолсульфонилхлорид, в присутствии основания и последующего осуществления реакции полученного в результате метансульфоната или 4-толуолсульфоната с источником фторида  $^{18}\text{F}^-$  с использованием ДМСО или ДМФ в качестве растворителя, при нагревании или микроволновом облучении при 90-160°C



где  $\text{R}^4$  является таким, как определено в п.1.

13. Соединение формулы (P-1)



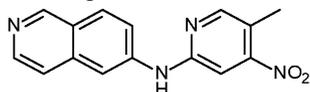
где  $\text{R}^2$  представляет собой метил, и либо  $\text{R}^1$  выбран из группы, состоящей из Br,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$  и  $4\text{-CH}_3\text{-Ph-SO}_2\text{-O-}$ , и  $\text{R}^3$  представляет собой H, либо  $\text{R}^1$  представляет собой H, и  $\text{R}^3$  выбран из группы, со-

стоящей из Br, -NO<sub>2</sub>, -[N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> и 4-CH<sub>3</sub>-Ph-SO<sub>2</sub>-O-; или

R<sup>1</sup> и R<sup>3</sup> одновременно представляют собой H, и R<sup>2</sup> выбран из группы, состоящей из -C<sub>1-4</sub>алкил-Br, -C<sub>1-4</sub>алкил-I, -C<sub>1-4</sub>алкил-O-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 4-CH<sub>3</sub>-Ph-SO<sub>2</sub>-O-C<sub>1-4</sub>алкил-, -C<sub>1-4</sub>алкил-OH, -OC<sub>1-4</sub>алкил-Br, -OC<sub>1-4</sub>алкил-I, -OC<sub>1-4</sub>алкил-O-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 4-CH<sub>3</sub>-Ph-SO<sub>2</sub>-O-C<sub>1-4</sub>алкил-O-, -OC<sub>1-4</sub>алкил-OH, -NR<sup>4</sup>-C<sub>1-4</sub>алкил-Br, -NR<sup>4</sup>-C<sub>1-4</sub>алкил-I, -NR<sup>4</sup>-C<sub>1-4</sub>алкил-O-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 4-CH<sub>3</sub>-Ph-SO<sub>2</sub>-O-C<sub>1-4</sub>алкил-NR<sup>4</sup>- и -NR<sup>4</sup>-C<sub>1-4</sub>алкил-OH, где R<sup>4</sup> представляет собой H или метил;

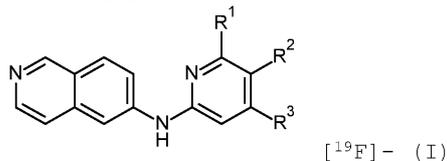
или его фармацевтически приемлемая соль.

14. Соединение по п.13, где соединение представляет собой



или его фармацевтически приемлемая соль.

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

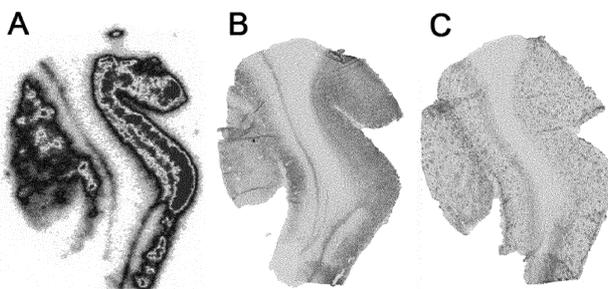
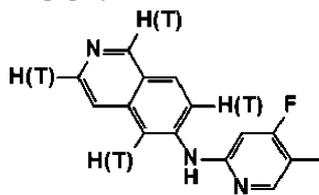


где R<sup>2</sup> представляет собой метил, и либо R<sup>1</sup> представляет собой F, и R<sup>3</sup> представляет собой H, либо R<sup>1</sup> представляет собой H, и R<sup>3</sup> представляет собой F; или

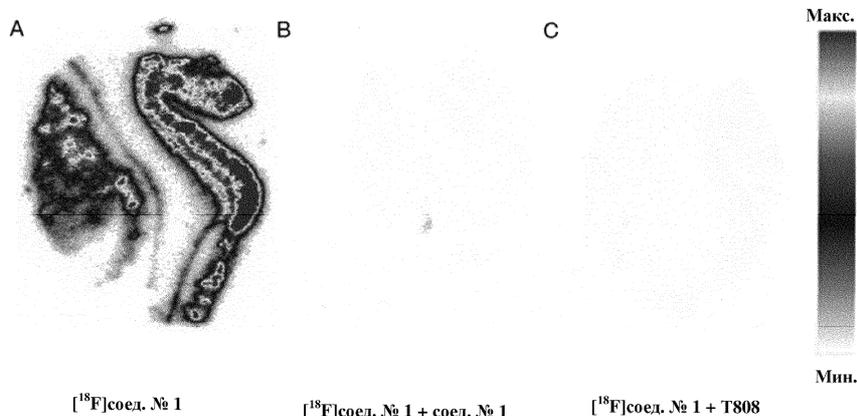
R<sup>1</sup> и R<sup>3</sup> одновременно представляют собой H, и R<sup>2</sup> выбран из группы, состоящей из -C<sub>1-4</sub>алкил-F, -OC<sub>1-4</sub>алкил-F и -NR<sup>4</sup>-C<sub>1-4</sub>алкил-F, где R<sup>4</sup> представляет собой H или метил;

или его фармацевтически приемлемая соль.

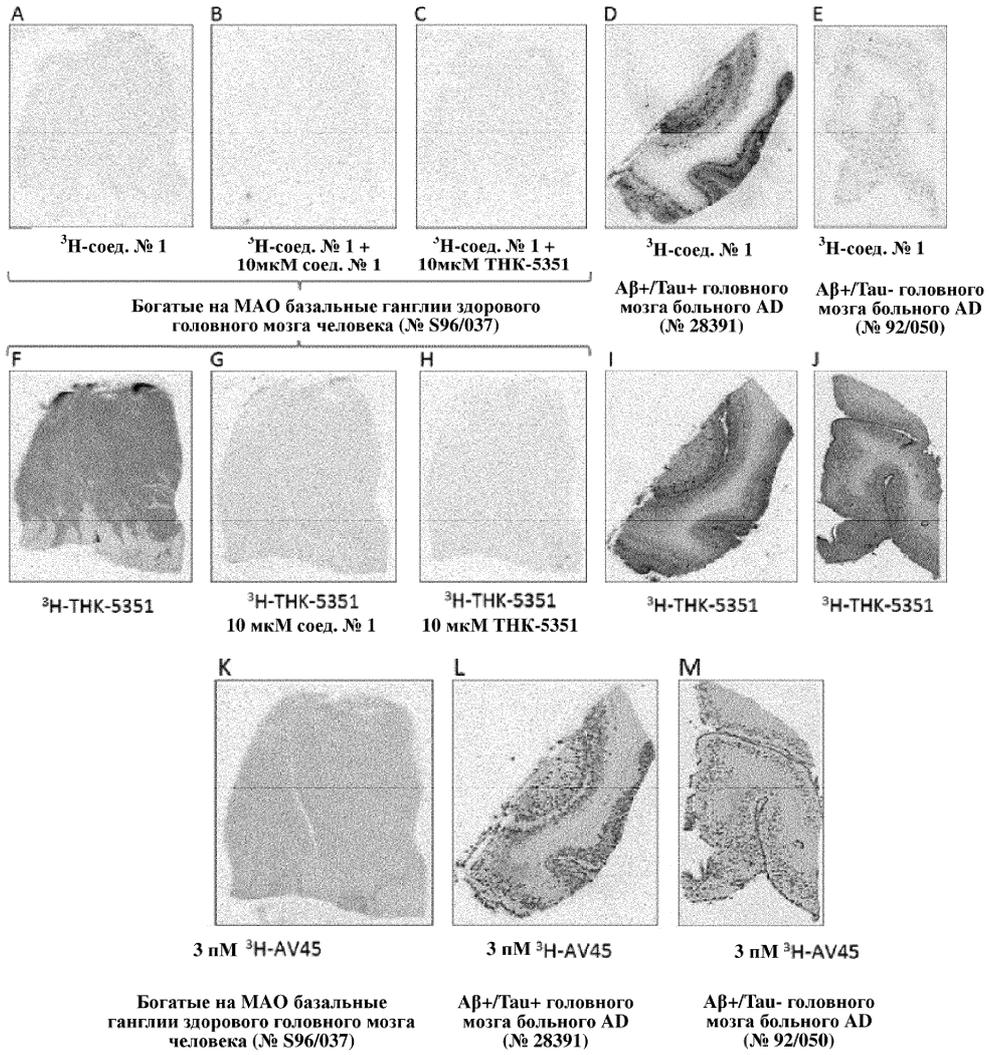
16. Соединение, характеризующееся формулой



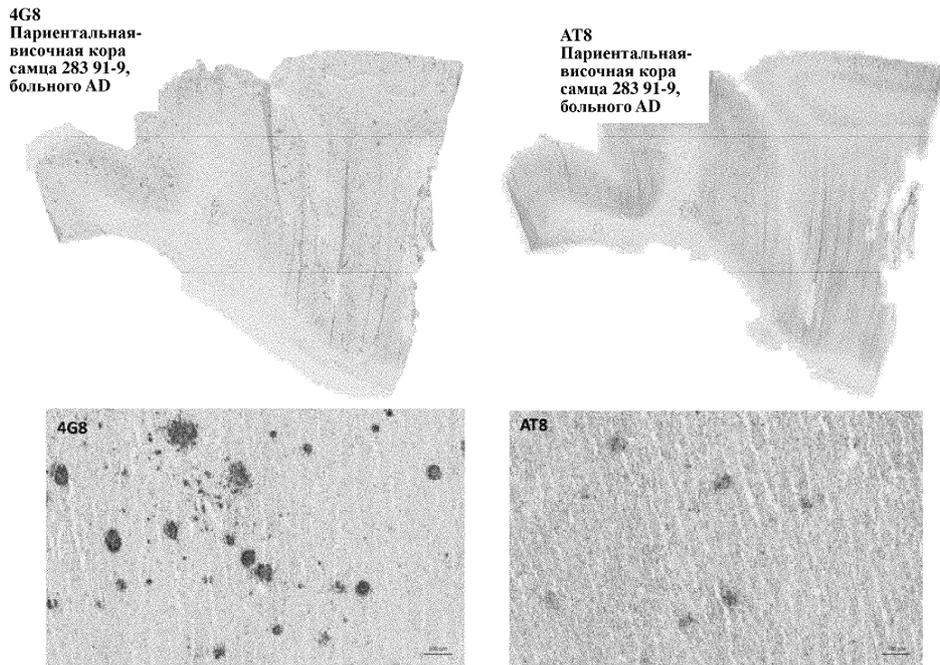
Фиг. 1



Фиг. 2

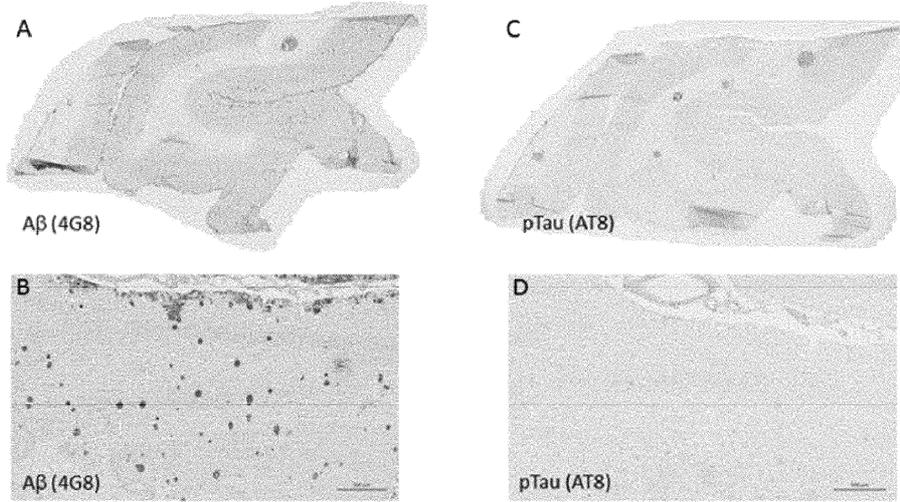


Фиг. 3



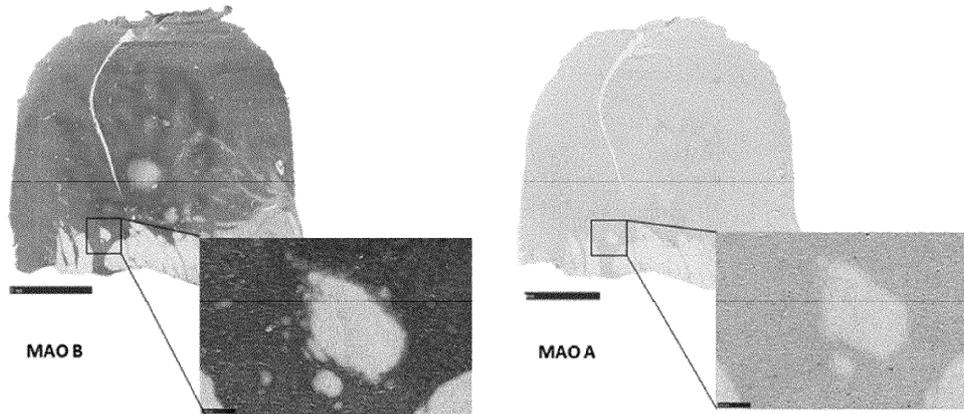
Фиг. 4

**Aβ+/Tau-** головного  
мозга больного AD  
(№ 92/050)



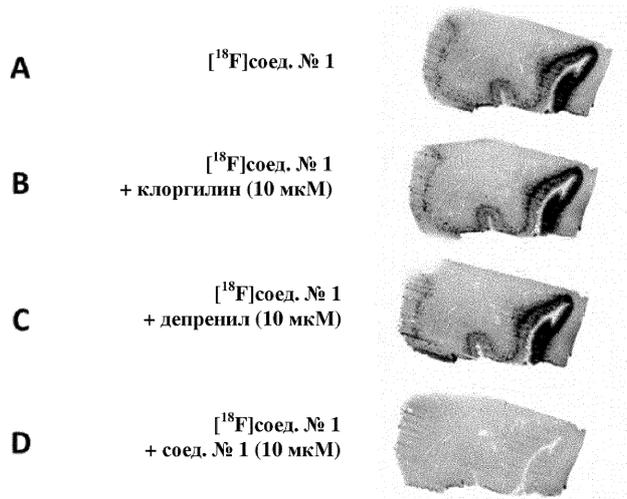
Фиг. 5

**Ткань стриатума человека**  
(S96/037)

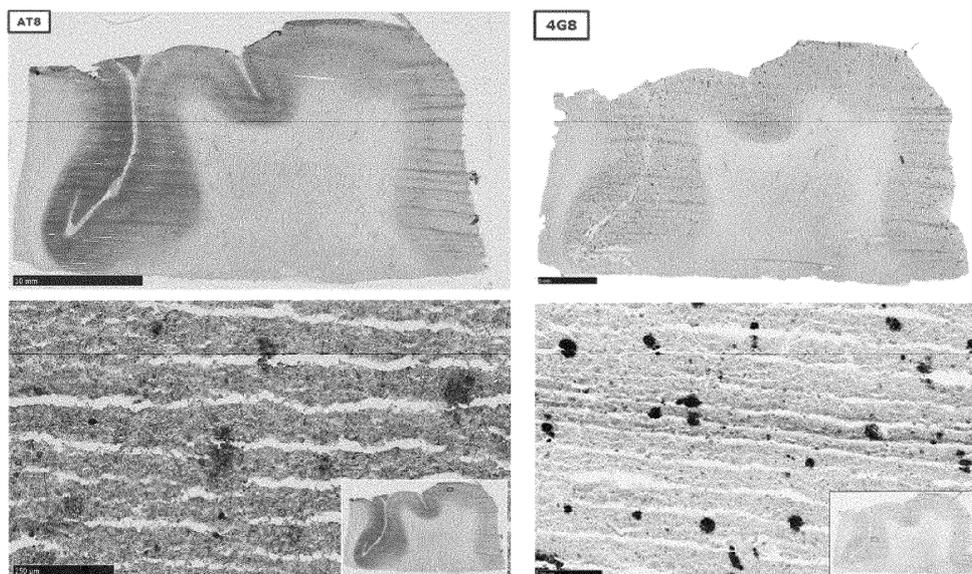


Фиг. 6

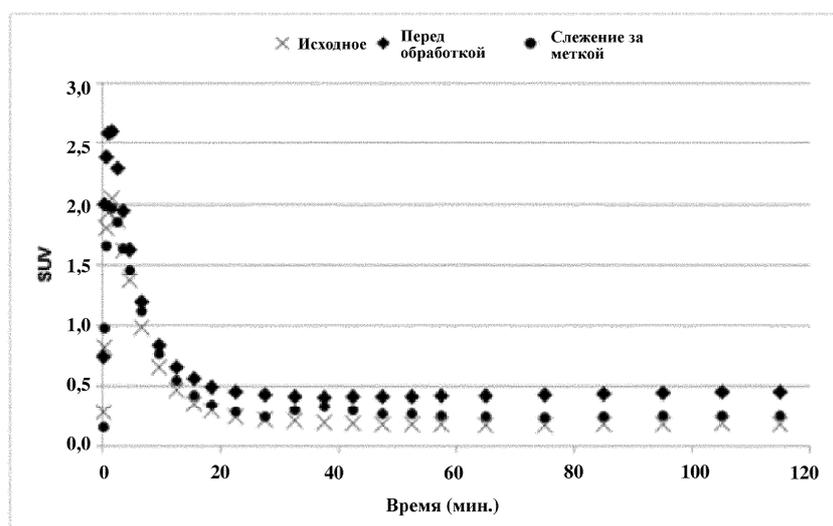
**Парентальная-височная кора**  
самки 4893-11, больной AD



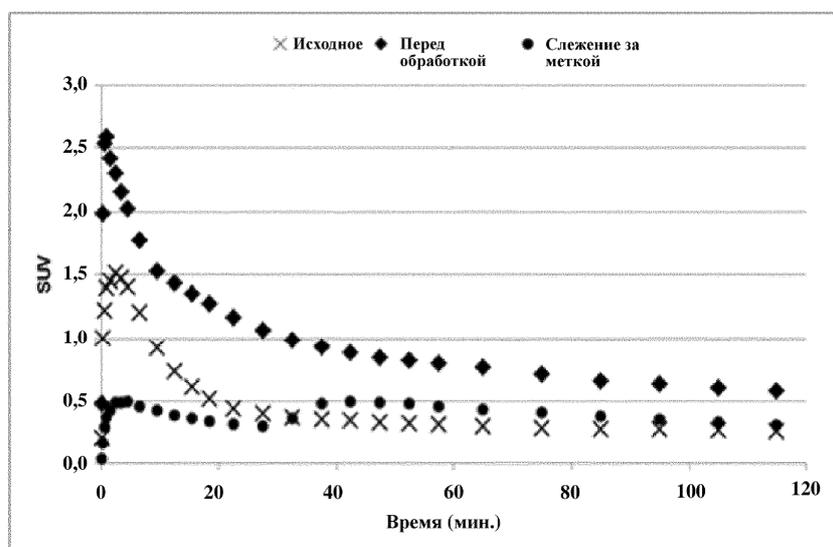
Фиг. 7



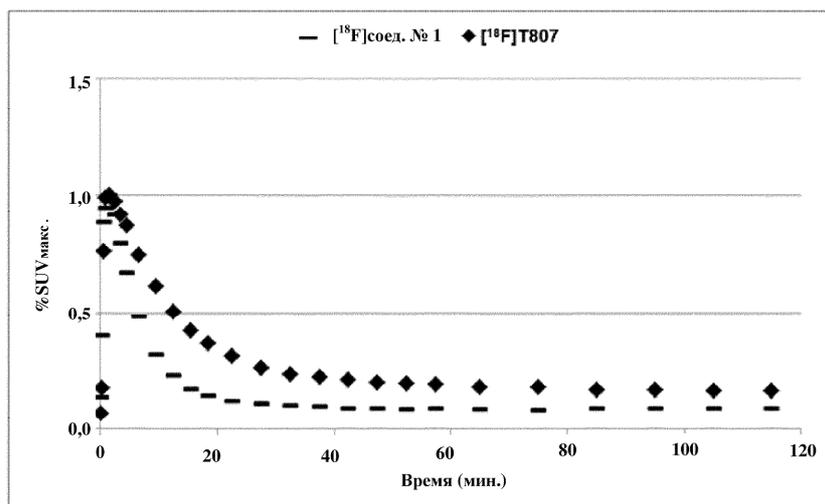
Фиг. 8



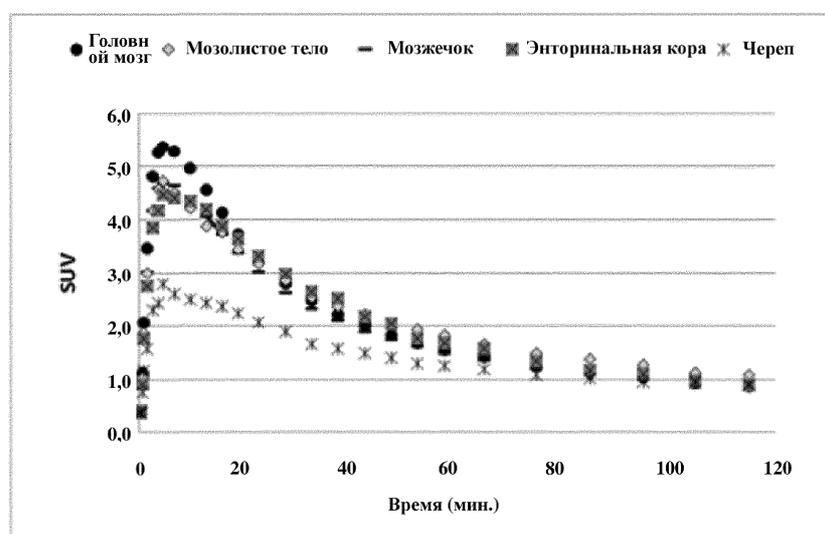
Фиг. 9



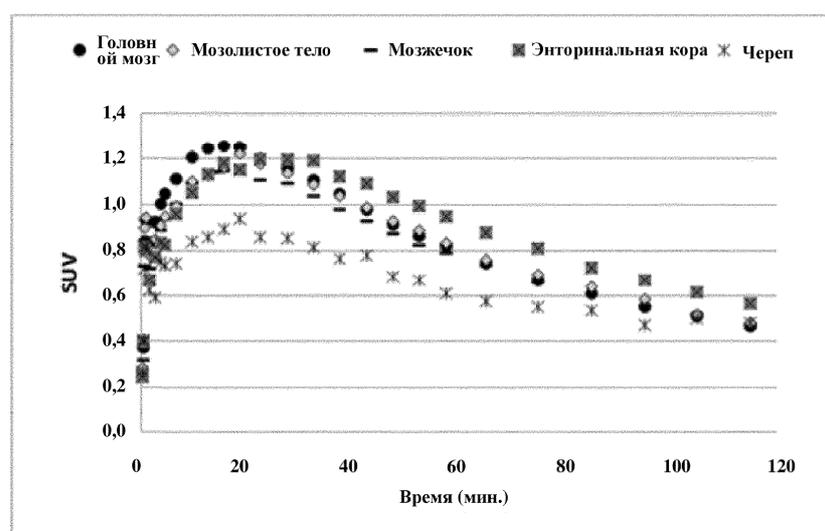
Фиг. 10



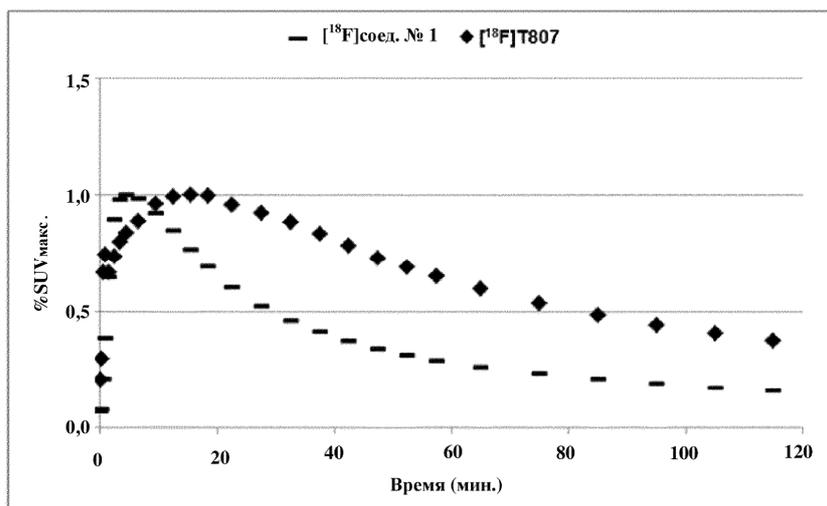
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14

