

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202092843** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2021.04.19

(51) Int. Cl. *A61K 51/04* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.06.26

---

(54) **РАДИОФАРМПРЕПАРАТ ДЛЯ ПОЗИТРОННО-ЭМИССИОННОЙ ТОМОГРАФИИ (ПЭТ) ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ РЕЦЕПТОРА МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА (CSF1R) ПРИ НЕЙРОВосПАЛЕНИИ**

---

(31) 62/689,958

(72) Изобретатель:

(32) 2018.06.26

**Хорти Андро Г., Нейк Рейви, Дэнналс  
Роберт Ф., Помпер Мартин Г. (US)**

(33) US

(86) PCT/US2019/039234

(74) Представитель:

(87) WO 2020/006075 2020.01.02

**Медведев В.Н. (RU)**

(71) Заявитель:

**ДЗЕ ДЖОНС ХОПКИНС  
ЮНИВЕРСИТИ (US)**

---

(57) Раскрыты радиофармпрепараты для позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) для визуализации рецепторов макрофагального колониестимулирующего фактора-1 у субъекта, пораженного или подверженного поражению нейровоспалительным или нейродегенеративным заболеванием или состоянием.

**202092843**

**A1**

**A1**

**202092843**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-566603EA/042

### **РАДИОФАРМПРЕПАРАТ ДЛЯ ПОЗИТРОННО-ЭМИССИОННОЙ ТОМОГРАФИИ (ПЭТ) ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ РЕЦЕПТОРА МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА (CSF1R) ПРИ НЕЙРОВОСПАЛЕНИИ**

**ИССЛЕДОВАНИЯ ИЛИ РАЗРАБОТКИ, ФИНАНСИРУЕМЫЕ ИЗ  
ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТА**

Это изобретение было сделано при государственной поддержке под AG054802, присужденном National Institutes of Health. Правительство имеет определенные права на изобретение.

#### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) является наиболее продвинутым способом для количественной оценки рецепторов мозга и их занятости эндогенными лигандами или лекарственными средствами *in vivo*. Были предприняты попытки ПЭТ визуализации гипотетических нейровоспалительных состояний (Masgrau R, et al. (2017)) с применением радиолигандов, которые направлены на транслокаторный белок (TSPO), который сообщает о реакционноспособных глиальных клетках. Из-за ограничений TSPO-направленной ПЭТ, включая отсутствие специфичности к типу клеток и чувствительности к генотипу, исследователи разработали ПЭТ радиофармпрепараты, направленные на другие аспекты нейровоспаления (P2X7, COX-2, CB2, ROS, A2AR, MMP) [см. Tronel C, et al. (2017); Janssen B, et al. (2018)]. Тем не менее, новые мишени визуализации, такие как рецептор P2X7, также полны ограничений, включая отсутствие клеточноспецифической экспрессии (ФИГ. 7). Агент, который направлен только на реакционноспособные микроглии, которые представляют вплоть до 10% клеток в мозге (Aguzzi A, et al. (2013)), может дать более специфичное и менее двусмысленное прочтение нейровоспалительных состояний через визуализацию этого клеточного медиатора повреждений и репараций в ЦНС.

В мозге, рецептор макрофагального колониестимулирующего фактора 1 (CSF1R) (также известный как c-FMS, CD-115 или M-CSFR) в основном экспрессируется микроглией, в то время как его экспрессия в других клетках, включая нейроны, низкая (Akiyama H, et al. (1994); Zhang Y, et al. (2014)) (ФИГ. 7). CSF1R является поверхностноклеточным белком в субсемействе тирозинкиназных рецепторов, активированных двумя гомодимерными лигандами, CSF1 и IL-34 (Peugraud F, et al. (2017)). CSF1R является первичным регулятором выживания, пролиферации, дифференциации и функции гемопоэтических клеток-предшественников (Chitu V, et al. (2016)). CSF1R напрямую контролирует развитие, выживание и сохранение микроглии и играет существенную роль в нейровоспалении (Ginhoux F, et al. (2010); Elmore MR, et al. (2014); Walker DG, et al. (2017); Smith AM, et al. (2013); Palle P, et al. (2017)). Ингибирование CSF1R используют как путь к лечению множества воспалительных и

нейровоспалительных расстройств (El-Gamal MI, et al. (2018)). Распределение CSF1R по областям в мозге здорового млекопитающего подробно не изучалось, но анализ экспрессии у мышей продемонстрировал повышенные уровни CSF1R в областях выше коры головного мозга, и более низкие уровни в других областях мозга (Lue LF, et al. (2001)).

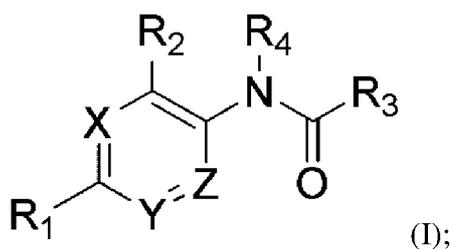
В нескольких отчетах была продемонстрирована активация CSF1R и CSF1 при вскрытии мозга при болезни Альцгеймера (БА) (Akiyama H, et al. (1994), Walker DG, et al. (2017), Lue LF, et al. (2001)). Исследования на мышах показали умеренную экспрессию CSF1R в контрольном мозге и высокую экспрессию в микроглии, расположенной рядом с отложениями амилоида бета ( $A\beta$ ) в моделях БА у трансгенных мышей (Murphy GM Jr, et al. (2000); Yan SD, et al. (1997); Boissonneault V, et al. (2009)). Ген, кодирующий когнатный лиганд для CSF1R, CSF1, активирован на стадии 2 патогенной микроглии (DAM), что может играть благоприятную роль в контроле БА (Deczkowska A, et al. (2018); Keren-Shaul H, et al. (2017)). Травматическое повреждение мозга у грызунов приводит к значительному и специфическому повышению уровней CSF1R в поврежденных областях (Raivich G, et al. (1998)). CSF1R изменен в очагах из-за рассеянного склероза (Prieto-Morin C, et al. (2016)). Активированный CSF1R был продемонстрирован при опухолях мозга (Alterman RL and Stanley ER (1994)). ВИЧ-ассоциированное когнитивное ухудшение коррелировано с уровнями CSF1R (Lentz MR, et al. (2010)). Клиническая ПЭТ-визуализация CSF1R может улучшить понимание пути CSF1R, относящегося к нейровоспалению при расстройствах ЦНС и направить разработку новых противовоспалительных терапий CSF1R.

Подходящие ПЭТ радиофармпрепараты для визуализации CSF1R не доступны. Единственный опубликованный радиомеченный ингибитор CSF1R был синтезирован в 2014 (Bernard-Gauthier V, Schirmacher R (2014)), но исследования визуализации с этим радиофармпрепаратом не описаны.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Раскрытый в данном случае объект представляет радиофармацевтический препарат для визуализации рецептора макрофагального колониестимулирующего фактора (CSF1R) у субъекта, страдающего или подозреваемого в наличии одного или нескольких нейровоспалительных или нейродегенеративных заболеваний или состояний.

В некоторых аспектах, раскрытый в данном случае объект представляет радиофармацевтический препарат для визуализации рецептора макрофагального колониестимулирующего фактора (CSF1R) у субъекта, страдающего или подозреваемого в наличии одного или нескольких нейровоспалительных или нейродегенеративных заболеваний или состояний, где радиофармацевтический препарат содержит соединение формулы (I):



где:

X, Y и Z каждый независимо выбирают из группы, состоящей из -N- и -CR<sub>5</sub>-, где R<sub>5</sub> выбирают из группы, состоящей из H, замещенного или незамещенного C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила или R\*, где R\* является группой, содержащей радиоизотоп, подходящий для визуализации позитронно-эмиссионной томографией (ПЭТ) или самим радиоизотопом;

R<sub>1</sub> выбирают из группы, состоящей из замещенного или незамещенного гетероалкила, замещенного или незамещенного гетероарила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкоксила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкиламино, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> диалкиламино, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил)(SO<sub>2</sub>)(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила), где R<sub>1</sub> необязательно может быть замещен R\* или R<sub>1</sub> может быть радиоизотопом, подходящим для визуализации ПЭТ;

R<sub>2</sub> является замещенным или незамещенным гетероалкилом, где R<sub>2</sub> необязательно может быть замещен R\*;

R<sub>3</sub> является замещенным или незамещенным гетероариллом, где R<sub>3</sub> необязательно может быть замещен R\*; и

R<sub>4</sub> выбирают из группы, состоящей из H, замещенного или незамещенного C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкоксила, циклоалкила, циклогетероалкила, арила и гетероарила; или его фармацевтически приемлемую соль;

где, по меньшей мере, один из R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> или R<sub>5</sub> замещен R\* или является радиоизотопом, подходящим для визуализации ПЭТ.

В других аспектах, раскрытый в данном случае объект представляет способ для визуализации рецептора макрофагального колониестимулирующего фактора (CSF1R) у субъекта, страдающего или подозреваемого в наличии одного или нескольких нейровоспалительных или нейродегенеративных заболеваний или состояний, где способ включает введение субъекту эффективного количества радиофармацевтического препарата формулы (I), или его фармацевтически приемлемой соли и получение изображения ПЭТ.

Некоторые аспекты раскрытого в данном случае объекта были изложены здесь выше, которые рассматриваются полностью или частично раскрытым в данном случае объектом, другие аспекты станут очевидными по мере продолжения описания, взятые вместе с сопровождающими примерами и чертежами, как лучше всего описано здесь ниже.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Файл патента или заявки содержит, по меньшей мере, один цветной чертеж. Копии этого патента или заявки на патент с цветными чертежами будут предоставлены

Ведомством по запросу и при уплате необходимой пошлины.

Описав, таким образом, раскрытый в данном случае объект в общих словах, далее сделана ссылка на прилагаемые чертежи, которые не обязательно изображены в масштабе, и где:

На ФИГ. 1А и ФИГ. 1В показано сравнение поглощения в мозге [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC для плацебо и LPS: мышь с инъекцией в правый передний мозг, исходный уровень и блокирование. Провели два независимых эксперимента (ФИГ. 1А и ФИГ. 1В). Момент времени равен 45 мин после инъекции радиофармпрепарата; LPS (5 мкг в 0,5 мкл) или физиологический раствор (0,5 мкл) вводят в правый передний мозг (ипсилатеральный передний квадрант) за 2-3 дня до исследования радиофармпрепарата. Блокатор (CPPC) вводят в.б. за 5 мин до радиофармпрепарата. (ФИГ. 1А) Области, представляющие интерес (ROI) включают мозжечок (CB), ипсилатеральную полусферу (И) и контрлатеральную полусферу (СН). Данные представляют собой средний % СУП±СО (n=3). (ФИГ. 1В) ROI включают мозжечок (CB), контрлатеральную полусферу (СН), ипсилатеральный каудальный квадрант (ICQ) и ипсилатеральный фронтальный квадрант (IFQ). Данные представляют собой средний %СУП±СО (n=4). Статистический анализ: сравнение LPS-исходного уровня с плацебо или LPS-блоком. \*P <0,05; отсутствие звездочки означает P >0,05 (ANOVA);

На ФИГ. 2А, ФИГ. 2В и ФИГ. 2С показано поглощение в мозг CSF1R радиофармпрепарата [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC у контрольных (Ctrl), обработанных LPS (в.б.) мышей (LPS исходный) и обработанных LPS (в.б.) мышей плюс блокатора ингибиторами CSF1R (LPS блок) в трех независимых экспериментах. Момент времени равен 45 мин после инъекции радиофармпрепарата [LPS (10 мг/кг)]. (ФИГ. 2А) Данные представляют собой средний %СУП±СО (n=5). CB, мозжечок. (ФИГ. 2В) Данные представляют собой среднее ССУП±СО (n=5). Блокатор (CPPC, 1 мг/кг, в.б.) вводят мышам, обработанным LPS. (ФИГ. 2С) Данные представляют собой среднее ССУП±СО (n=3-6). Блокатор (соединение 8, 2 мг/кг, в.б.) вводят мышам, обработанным LPS. Статистический анализ: сравнение LPS-исходного уровня с контролем или LPS-блоком. \*P <0,01; \*\*P=0,03; отсутствие звездочки означает P >0,05 (ANOVA);

На ФИГ. 3 показано сравнение поглощения в мозг [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC при у трансгенных с БА (n=6) и контрольных (n=5) мышей. Момент времени - 45 мин после инъекции радиофармпрепарата. Данные: средний %СУП±СО. \*P=0,04, \*\*P < 0,005 (ANOVA). Поглощение [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC было значительно больше в областях мозга мышей с БА. CB, мозжечок; Стх, кора головного мозга; Нірр, гиппокамп;

На ФИГ. 4А и ФИГ. 4В показана [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC ПЭТ/КТ визуализация ЭАЭ у мышей. (ФИГ. 4А) МІР (верх), фронтальный (середина) и сагитальный (Bottom) срезы, показывающие поглощение радиофармпрепарата от 45 до 60 мин на проекцию у указанной мыши. Цветной диапазон шкалы показывает %ВД/г ткани. (ФИГ. 4В) Поглощение областями мозга, нормализованное поглощением у контрольных животных в сравнении с тяжестью ЭАЭ. BS, ствол головного мозга; FCTX, лобная доля;

На ФИГ. 5А, ФИГ. 5В, ФИГ. 5С и ФИГ. 5D показана визуализация ПЭТ [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС у одних и тех же бабуинов в экспериментах на исходном уровне, LPS и LPS-плюс-блокирование. Доза LPS составляет 0,05 мг/кг (в.в.), за 4 ч до инъекции радиофармпрепарата. (ФИГ. 5А) Параметрические (VT) изображения. (ФИГ. 5В) Исходные кривые время-поглощение СУП [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС в областях мозга. (ФИГ. 5С) Кривые время-поглощение СУП [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС во всем мозге: исходный уровень (зеленый), после обработки LPS (красный) и блокирование после обработки LPS (черный). (ФИГ. 5D) Скорректированные на метаболиты кривые время-поглощение СУП [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС в плазме: исходный уровень (зеленый), после обработки LPS (красный) и блокирование после обработки LPS (черный). Вкладка на ФИГ. 5D показывает первые 120 сек сканирования;

На ФИГ. 6 показаны ауторадиография человека при вскрытии/изображения [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС (исходные и блокировка) в срезах серого вещества нижней теменной доли. Три субъекта с болезнью Альцгеймера (1-AD, 2-AD и 3-AD) и контрольный (4-контроль) субъект. См. также ФИГ. 20 и таблицы 5 и 6;

На ФИГ. 7 показано, что в клетках ЦНС ген CSF1R в основном экспрессируется в микроглии, в то время как гены TSP0 и P2RX7 демонстрируют мультиклеточную экспрессию. Аббревиатуры: ОРС=клетки-предшественники олигодендроцита; ФРКМ=фрагменты на тысячу нуклеотидов транскрипта на миллион локализованных ридов. Графики взяты из [http://web.stanford.edu/group/barres\\_lab/brain\\_rnaseq.html](http://web.stanford.edu/group/barres_lab/brain_rnaseq.html);

На ФИГ. 8 показан синтез пре-СРРС;

На ФИГ. 9 показан радиосинтез [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС;

На ФИГ. 10 показано исследование блокирования с [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС и блокатором СРРС. Исследование демонстрирует незначительную блокаду низкими дозами (0,6-3 мг/кг) и незначительное постепенное повышение поглощения при увеличении дозы (10-20 мг/кг) не меченого СРРС в момент времени 45 мин после инъекции меченого вещества. Данные: %СУП $\pm$ СО (n=5);

На ФИГ. 11А и ФИГ. 11В показано сравнение исходного и заблокированного поглощения [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС в коре головного мозга у CD1 мышей в одном том же эксперименте без (ФИГ. 11А) и с коррекцией крови (ФИГ. 11В). ФИГ. 11А: средний %СУП $\pm$ СО (n=3). Нет значительной разницы между исходным уровнем и блокированием двумя дозами не меченого СРРС (0,6 и 3 мг/кг) (P >0,05). ФИГ. 11В: Данные: среднее ССУП $\pm$ СО в коре (n=3). У мышей с инъекцией двух доз блокатора СРРС, значение скорректированного кровью ССУП было значительно ниже (P=0,05), чем на исходном уровне (ANOVA). Этот эксперимент демонстрирует, что [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС специфически радиометит CSF-1R в коре головного мозга CD1 мыши.

На ФИГ. 12А и ФИГ. 12В показано сравнение поглощения всем мозгом [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС у контрольных в сравнении с мышами с обедненной микроглией (ФИГ. 12А) и контрольных в сравнении с CSF1R нокаутированными (ФИГ. 12В) мышами через 45 мин после инъекции радиофармпрепарата. ФИГ. 12А: Данные представляют собой средний %СУП $\pm$ СО (n=5). ФИГ. 12В: Данные представляют собой средний %СУП к крови  $\pm$  СО

(n=5). Статистический анализ - ANOVA;

На ФИГ. 13 показаны [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC ПЭТ/КТ изображения сагиттальных срезов мышей с ЭАЭ без определения пороговых значений. Все изображения масштабированы до того же максимума, показанного на ФИГ. 4. S=слюнная железа; H=гардерова железа;

На ФИГ. 14А, ФИГ. 14В и ФИГ. 14С показана вызванная обработкой LPS повышенная экспрессия CSF1R в мозге мыши. ФИГ. 14А: Относительный уровень Csf1r мРНК, измеренный количественной ПЦР в реальном времени (n=5). ФИГ. 14В: вестерн-блоттинг экстрактов всего мозга мыши из мозга контрольных и обработанных LPS мышей. Каждая дорожка представляет мышь. ФИГ. 14С: Интенсивность полос CSF1R рассчитывают и нормализуют с таковыми для GAPDH с ФИГ. 14В (n=5);

На ФИГ. 15 показаны областные значения VT [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC из исследований бабуинов исходного уровня (зеленый), обработанных LPS (красный) и LPS плюс блокатором (желтый). Аббревиатуры: Th=таламус; Hp=гиппокамп; CC=мозолистое тело; WM=белое вещество; Oc=затылочная кора; CB=мозжечок; Amyg=миндалина; WB=весь мозг;

На ФИГ. 16 показаны уровни воспалительного цитокина IL-6 в сыворотке бабуина. Уровень IL-6 повышается после инъекции LPS и снижается в исследовании LPS-плюс-блокатор. IL-6 измеряют набором ELISA. Коротко: во все три разных момента времени (после инъекции 15, 45 и 90 минут), 2 мл периферической крови бабуина собирают в BD Vacutainer (BD Biosciences, кат № 367983, La Jolla, CA) и центрифугируют при 2000 x g в течение 10 мин при комнатной температуре. Сыворотку собирают в стерильные пробирки и хранят при  $-80^{\circ}\text{C}$  для будущего иммуноанализа. Образцы сыворотки оттаивают на льду и уровень IL-6 измеряют с применением IL-6 Monkey Instant ELISA™ (Thermo Fisher Scientific, кат. № BMS641INST, Halethorpe, MD) согласно инструкциям производителя.

На ФИГ. 17А и ФИГ. 17В показан ВЭЖХ анализ [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC ([ $^{11}\text{C}$ ]JHU11744) радиометаболитов в плазме бабуина. ФИГ. 17А - Радио-ВЭЖХ хроматограммы [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC и образцов плазмы крови, собранных в разные интервалы времени, ФИГ. 17В - времязависимое снижение относительной доли [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC у контрольных и обработанных LPS или LPS и блокирующим агентом бабуинов;

На ФИГ. 18А, ФИГ. 18В, ФИГ. 18С и ФИГ. 18D показаны типовые графики [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC кинетического анализа с применением (ФИГ. 18А) частевого моделирования и (ФИГ. 18В) анализа Логана, демонстрирующие, что оба являются подходящими способами (показанная типовая область: скорлупа, зеленые маркеры: единицы данных исследования ПЭТ, сплошные линии: согласованные данные; (ФИГ. 18С) Сравнения результатов VT частевым моделированием и анализом Логана, в типовом базовом исследовании, демонстрирующие, что они являются высоко сопоставимыми/коррелированными ( $R^2=0,9657$ ); (ФИГ. 18D) Типовые графики постоянности во времени областных оценок VT (область: скорлупа), показывающие стабильные результаты ( $<2,5\%$  изменения), полученные с применением 60 мин после инъекций;

На ФИГ. 19 показаны областные значения K1 [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC в исследованиях

исходного уровня (зеленый), LPS-обработанных (красный) и LPS плюс блокатор (желтый) бабуинов. Аббревиатуры: Th=таламус; Hp=гиппокамп; CC=мозолистое тело; WM=белое вещество; Oc=затылочная кора; CB=мозжечок; Amyg=миндалина; WB=весь мозг; и

На ФИГ. 20 показано соотношение исходный уровень/блокировка с разными блокаторами (PLX3397; BLZ945 и соединение 8) в экспериментах ауторадиографии с [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС в срезах мозга человека с БА при вскрытии.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Раскрытый в данном случае объект изобретения будет описан более полно в дальнейшем со ссылкой на прилагаемые чертежи, на которых показаны некоторые, но не все варианты осуществления раскрытого в данном случае объекта изобретения. Одинаковые номера относятся ко всем одинаковым элементам. Раскрытый в данном случае объект может быть воплощен во многих различных формах и не должен рассматриваться как ограниченный вариантами осуществления, изложенными в данном документе; скорее, эти варианты осуществления предоставлены для того, чтобы это раскрытие удовлетворяло применимым юридическим требованиям. Действительно, многие модификации и другие варианты осуществления раскрытого в данном случае объекта, изложенные в настоящем документе, придут в голову специалистам в области техники, к которой относится раскрытый в данном случае объект, пользующимся преимуществами идей, представленных в предшествующих описаниях и связанных чертежах. Следовательно, следует понимать, что раскрытый в данном случае объект не ограничивается конкретными раскрытыми вариантами осуществления, и что модификации и другие варианты осуществления предназначены для включения в объем прилагаемой формулы изобретения.

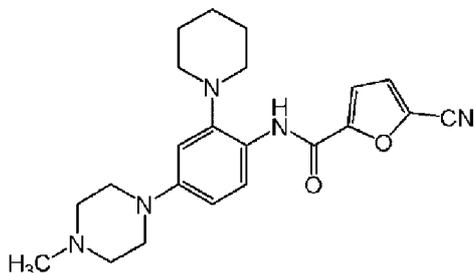
#### I. ПЭТ РАДИОФАРМПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ РЕЦЕПТОРА МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА 1 (CSF1R) ПРИ НЕЙРОВОСПАЛЕНИИ

Макрофагальный колониестимулирующий фактор-1 (CSF1) является одним из наиболее часто встречающихся провоспалительных цитокинов, ответственных за разные воспалительные заболевания. CSF1 взаимодействует с его рецептором, CSF1R, что приводит к дифференциации и пролиферации клеток клеточной линии моноцитов/макрофагов. Повышенные уровни экспрессии CSF1R ассоциированы с разными нейровоспалительными расстройствами включающими, но не ограниченными ими, болезнь Альцгеймера (БА), опухоли мозга, рассеянный склероз (РС), черепно-мозговую травму и подобные. См. Walker et al, 2017.

В ЦНС CSF-1R в основном экспрессируется микроглией (Akiyama, et al., 1994; Raivich et al., 1998), в то время как экспрессия в других клетках, включая нейроны, низкая. Chitu et al., 2016. Потенциально, CSF1R представляет селективный сайт связывания для визуализации активации микроглии при нейровоспалении. Наоборот, наиболее часто применяемые биомаркеры нейровоспаления, TSPO и P2RX7, оба демонстрируют мультиклеточную экспрессию, Raivich et al., 1998, и поэтому не могут считаться

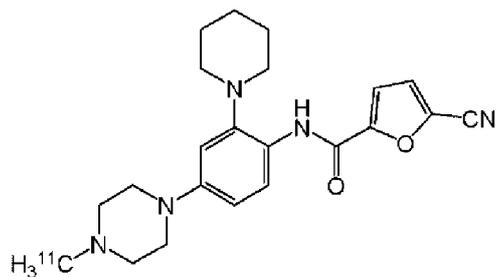
селективными сайтами связывания микроглиальной активации. См. ФИГ. 10.

Эффективный и селективный ингибитор CSF1R, 5-циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамид (**1**), разработан фармацевтической промышленностью как потенциальный противовоспалительный агент. Illig et al., 2008.



5-циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамид (**1**)

Раскрытый в данном случае объект представляет, частично, радиосинтез [ $^{11}\text{C}$ ]**1** ([ $^{11}\text{C}$ ]CMPPF; [ $^{11}\text{C}$ ]JHU11744; 5-циано-N-(4-(4-[ $^{11}\text{C}$ ]метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамид) и его оценку для ПЭТ-визуализации CSF1R при нейровоспалении.



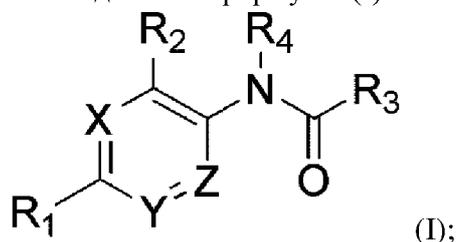
[ $^{11}\text{C}$ ]**1**

В общем, раскрытый в данном случае объект представляет ряд ПЭТ радиофармпрепаратов для визуализации рецептора макрофагального колониестимулирующего фактора-1 (CSF1R). Связывание радиофармпрепаратов на CSF1R тестируют на животных моделях нейровоспаления, мышцах с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (ЭАЭ) (модель рассеянного склероза) и ткани мозга при болезни Альцгеймера, взятой при вскрытии. Конкретные соединения легко проникают в мозг в животных моделях. Еще более конкретные соединения специфически связывают (и метят) CSF1R в животных моделях нейровоспаления. В некоторых вариантах осуществления, раскрытые в данном случае соединения демонстрируют значительно большее поглощение в животных моделях нейровоспаления, чем у контроля. В других вариантах осуществления, выбранные соединения специфически метят CSF1R в ткани мозга человека с болезнью Альцгеймера. Следовательно, раскрытые в данном случае соединения могут применяться при исследовании CSF1R при нейровоспалении и нейродегенерации.

#### *А. Радиофармацевтические препараты формулы (I)*

В некоторых вариантах осуществления, раскрытый в данном случае объект представляет радиофармацевтический препарат для визуализации рецептора

макрофагального колониестимулирующего фактора (CSF1R) у субъекта, страдающего или подозреваемого в наличии одного или нескольких нейровоспалительных или нейродегенеративных заболеваний или состояний, где радиофармацевтический препарат содержит соединение формулы (I):



где:

X, Y и Z каждый независимо выбирают из группы, состоящей из -N- и -CR<sub>5</sub>-, где R<sub>5</sub> выбирают из группы, состоящей из H, замещенного или незамещенного C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила, или R\*, где R\* является группой, содержащей радиоизотоп, подходящий для визуализации позитронно-эмиссионной томографией (ПЭТ), или самим радиоизотопом;

R<sub>1</sub> выбирают из группы, состоящей из замещенного или незамещенного гетероалкила, замещенного или незамещенного гетероарила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкоксила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкиламино, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> диалкиламино, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил)(SO<sub>2</sub>)(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила), где R<sub>1</sub> необязательно может быть замещен R\*, или R<sub>1</sub> может быть радиоизотопом, подходящим для визуализации ПЭТ;

R<sub>2</sub> является замещенным или незамещенным гетероалкилом, где R<sub>2</sub> необязательно может быть замещен R\*;

R<sub>3</sub> является замещенным или незамещенным гетероариллом, где R<sub>3</sub> необязательно может быть замещен R\*; и

R<sub>4</sub> выбирают из группы, состоящей из H, замещенного или незамещенного C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкоксила, циклоалкила, циклогетероалкила, арила и гетероарила; или его фармацевтически приемлемую соль;

где, по меньшей мере, один из R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> или R<sub>5</sub> замещен R\* или является радиоизотопом, подходящим для визуализации ПЭТ.

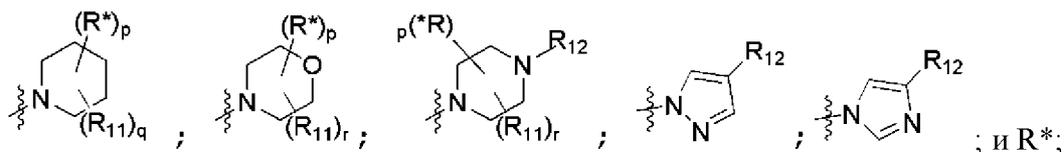
В некоторых вариантах осуществления, R<sub>1</sub> выбирают из группы, состоящей из замещенного или незамещенного пиперазинила, замещенного или незамещенного морфолинила, 1,1-диоксид-тиоморфолинила, замещенного или незамещенного пиразолила, замещенного или незамещенного имидазолила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкоксила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкиламино, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> диалкиламино, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил)(SO<sub>2</sub>)(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила), где R<sub>1</sub> необязательно может быть замещен R\*, или R<sub>1</sub> может быть радиоизотопом, подходящим для визуализации ПЭТ.

В некоторых вариантах осуществления, R<sub>2</sub> выбирают из группы, состоящей из замещенного или незамещенного пиперидинила и замещенного или незамещенного морфолинила, где R<sub>2</sub> необязательно может быть замещен R\*.

В некоторых вариантах осуществления, R<sub>3</sub> выбирают из группы, состоящей из замещенного или незамещенного пирролила и замещенного или незамещенного фурила,

где  $R_3$  необязательно может быть замещен  $R^*$ .

В некоторых вариантах осуществления,  $R_1$  выбирают из группы, состоящей из:



где:

$p$  является целым числом, выбранным из 0 и 1;

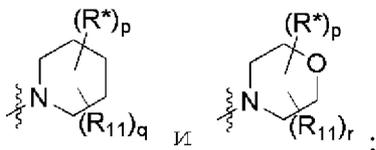
$q$  является целым числом, выбранным из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3, 4 и 5;

$r$  является целым числом, выбранным из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3 и 4;

$R_{11}$  выбирают из группы, состоящей из  $C_1$ - $C_8$  замещенного или незамещенного алкила,  $C_1$ - $C_8$  алкоксила, гидроксила, амина, циано, галогена, карбоксила и  $-CF_3$ ; и

$R_{12}$  выбирают из группы, состоящей из H, замещенного или незамещенного  $C_1$ - $C_8$  алкила, карбоксила,  $-(SO_2)-(C_1-C_8)$  алкила) и  $R^*$ .

В некоторых вариантах осуществления,  $R_2$  выбирают из группы, состоящей из:



где:

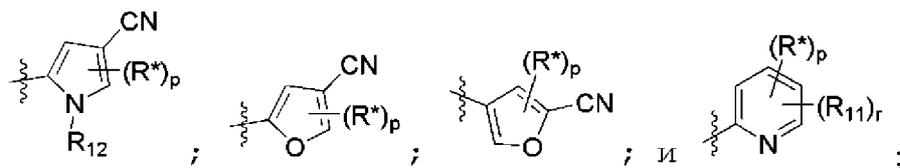
$p$  является целым числом, выбранным из 0 и 1;

$q$  является целым числом, выбранным из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3, 4 и 5;

$r$  является целым числом, выбранным из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3 и 4;

$R_{11}$  выбирают из группы, состоящей из  $C_1$ - $C_8$  замещенного или незамещенного алкила,  $C_1$ - $C_8$  алкоксила, гидроксила, амина, циано, галогена, карбоксила и  $-CF_3$ .

В некоторых вариантах осуществления,  $R_3$  выбирают из группы, состоящей из:



где:

$p$  является целым числом, выбранным из группы, состоящей из 0 и 1;

$R_{11}$  выбирают из группы, состоящей из  $C_1$ - $C_8$  замещенного или незамещенного алкила,  $C_1$ - $C_8$  алкоксила, гидроксила, амина, циано, галогена, карбоксила и  $-CF_3$ ; и

$R_{12}$  выбирают из группы, состоящей из H, замещенного или незамещенного  $C_1$ - $C_8$  алкила, карбоксила,  $-(SO_2)-(C_1-C_8)$  алкила) и  $R^*$ .

В некоторых вариантах осуществления,

(a) X, Y, Z каждый является  $-CR_5-$ ;

(b) X и Z каждый является  $-N-$  и Y является  $-CR_5-$ ;

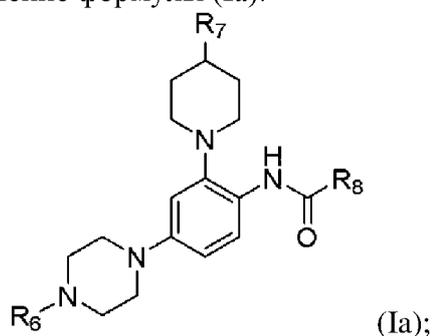
(c) X является  $-N-$  и Y и Z каждый является  $-CR_5-$ ;

(d) X и Y являются N и Z является  $-CR_5-$ ;

(e) X и Y каждый является  $-CR_5-$  и Z является N;

где  $R_5$ , по меньшей мере, в одном случае необязательно может быть замещен  $R^*$ .

В конкретных вариантах осуществления, соединением формулы (I) является соединение формулы (Ia):



где:

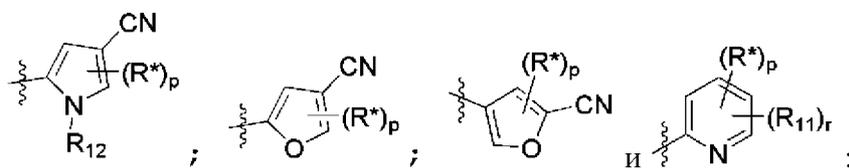
$R_6$  выбирают из группы, состоящей из H,  $C_1-C_8$  алкила,  $-C(=O)-O-R_9$  и  $-(CH_2)_n-R_{10}$ , где n является целым числом, выбранным из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8;  $R_9$  и  $R_{10}$  каждый является  $C_1-C_8$  прямым или разветвленным алкилом и где  $R_6$  необязательно может быть замещен  $R^*$  или  $R_6$  может быть  $R^*$ ;

$R_7$  выбирают из группы, состоящей из H или  $C_1-C_8$  алкила, где  $R_7$  необязательно может быть замещен  $R^*$  или  $R_7$  может быть  $R^*$ ; и

$R_8$  является замещенным или незамещенным пирролилом, фуранилом и пиридином, где  $R_8$  необязательно может быть замещен  $R^*$ ; или его фармацевтически приемлемая соль;

где, по меньшей мере, один из  $R_6$ ,  $R_7$  или  $R_8$  замещен  $R^*$  или является  $R^*$ .

В более конкретных вариантах осуществления,  $R_6$  выбирают из группы, состоящей из водорода, метила, этила, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, втор-бутила, трет-бутила, н-пентила, втор-пентила, изопентила, неопентила, н-гексила, втор-гексила, н-гептила, н-октила и  $-C(=O)-O-(C_1-C_8 \text{ алкила})_3$ ;  $R_7$  выбирают из группы, состоящей из водорода, метила, этила, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, втор-бутила, трет-бутила, н-пентила, втор-пентила, изопентила, неопентила, н-гексила, втор-гексила, н-гептила, н-октила;  $R_8$  выбирают из группы, состоящей из



где:

r является целым числом, выбранным из группы, состоящей из 0 и 1;

$R_{11}$  выбирают из группы, состоящей из  $C_1-C_8$  замещенного или незамещенного алкила,  $C_1-C_8$  алкоксила, гидроксила, амина, циано, галогена, карбоксила и  $-CF_3$ ; и

$R_{12}$  выбирают из группы, состоящей из H, замещенного или незамещенного  $C_1-C_8$  алкила, карбоксила,  $-(SO_2)-(C_1-C_8 \text{ алкила})$  и  $R^*$ ; и где каждый из  $R_6$ ,  $R_7$  и  $R_8$  необязательно

может быть замещен R\*.

В еще более конкретных вариантах осуществления, радиофармацевтический препарат выбирают из группы, состоящей из:

5-Циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамида (1a);

5-Циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(4-метилпиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамида (1c);

4-Циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(4-метилпиперидин-1-ил)фенил)-1H-пиррол-2-карбоксамида (1e);

4-Циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамида (1g);

5-Циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-3-карбоксамида (1h);

6-Фтор-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)пиколинамида (1i);

6-Бром-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)пиколинамида (1i);

*Трет*-бутил 4-(4-(5-цианофуран-2-карбоксамидо)-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата (7a);

*Трет*-бутил 4-(4-(5-цианофуран-2-карбоксамидо)-3-(4-метилпиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата (7b);

*Трет*-бутил 4-(4-(4-циано-1H-пиррол-2-карбоксамидо)-3-(4-метилпиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата (7c);

5-Циано-N-(4-(пиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамида (1b);

5-Циано-N-(2-(4-метилпиперидин-1-ил)-4-(пиперазин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамида (1d);

4-Циано-N-(2-(4-метилпиперидин-1-ил)-4-(пиперазин-1-ил)фенил)-1H-пиррол-2-карбоксамида (1f);

5-Циано-N-(4-(4-(2-фторэтил)пиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамида (1k);

4-Циано-N-(4-(4-(2-фторэтил)пиперазин-1-ил)-2-(4-метилпиперидин-1-ил)фенил)-1H-пиррол-2-карбоксамида (1l);

N-(4-(4-(2-бромэтил)пиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)-5-цианофуран-2-карбоксамида (1m);

4-Циано-1H-имидазол-2-карбоновой кислоты {2-Циклогекс-1-енил-4-[1-(2-диметиламиноацетил)пиперидин-4-ил]фенил}амида (1g); и

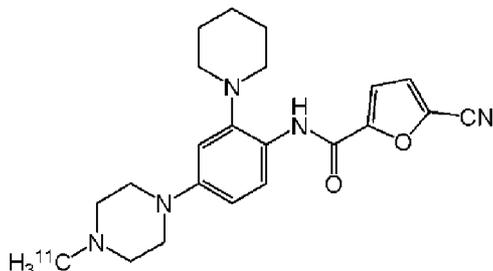
4-Циано-N-(5-(1-(метилглюсул)пиперидин-4-ил)-2',3',4',5'-тетрагидро-[1,1'-бифенил]-2-ил)-1H-имидазол-2-карбоксамида (1h).

В некоторых вариантах осуществления, R\* выбирают из группы, состоящей из <sup>11</sup>C,

$^{18}\text{F}$  и  $-(\text{CH}_2)_m\text{-R}_{13}$ , где  $\text{R}_{13}$  является  $\text{C}_1\text{-C}_8$  прямым или разветвленным алкилом, который необязательно может быть замещен радиоизотопом, подходящим для ПЭТ-визуализации.

В некоторых вариантах осуществления, радиоизотоп, подходящий для ПЭТ-визуализации, выбирают из группы, состоящей из  $^{11}\text{C}$  и  $^{18}\text{F}$ .

В еще более определенных вариантах осуществления, соединением формулы (I) является:



### *В. Способы визуализации*

В некоторых вариантах осуществления, раскрытый в данном случае объект представляет способ для визуализации рецептора макрофагального колониестимулирующего фактора (CSF1R) у субъекта, страдающего или подозреваемого в наличии одного или нескольких нейровоспалительных или нейродегенеративных заболеваний или состояний, где способ включает введение субъекту эффективного количества радиофармацевтического препарата формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли и получение ПЭТ изображения.

В конкретных вариантах осуществления, нейровоспалительное или нейродегенеративное заболевание или состояние выбирают из группы, состоящей из болезни Альцгеймера (БА), рассеянного склероза (РС), черепно-мозговой травмы, опухоли мозга, ВИЧ-ассоциированного когнитивного нарушения и одной или нескольких демиелинирующих заболеваний.

Примеры демиелинирующих заболеваний включают, но не ограничены ими, РС, болезнь Девика и другие воспалительные демиелинирующие заболевания; лейкоцисторфические расстройства, включающие нейропатии ЦНС, центральный понтинный миелинолиз, спинную сухотку (сифилитическую миелопатию) и прогрессирующую многоочаговую лейкоцисторфию; и демиелинирующие заболевания периферической нервной системы, включая синдром Гийена-Барре, хроническую воспалительную полинейропатию, болезнь Шарко-Мари-Тута, наследственную нейропатию со склонностью к параличу от сдавления нерва; и периферическую нейропатию, миелопатию и оптическую нейропатию.

В общем, “эффективное количество” активного ингредиента относится к количеству, необходимому для вызова желаемого биологического ответа. Как будет понятно специалисту в данной области, эффективное количество агента или устройства может варьироваться в зависимости от таких факторов, как желаемый биологический ожидаемый результат, доставляемого агента, состава фармацевтической композиции, целевой ткани и подобных.

"Контактирование" означает любое действие, которое приводит к, по меньшей мере, физическому контакту одного соединения, раскрытого в данном случае объекта, с, по меньшей мере, одной CSF1R-экспрессирующей опухолью или клеткой. Контактирование может включать обработку клетки(ок) или опухоли(ей) соединением в количестве, достаточном для контакта, по меньшей мере, одного соединения с, по меньшей мере, одной клеткой или опухолью. Способ может быть осуществлен на практике *in vitro* или *ex vivo* через введение и, предпочтительно, смешивание соединения и клетки(ок) и опухоли(ей) в контролируемой среде, такой как чашка Петри или пробирка. Способ может осуществляться на практике *in vivo*, в этом случае контактирование означает обработку, по меньшей мере, одной клетки или опухоли у субъекта, по меньшей мере, одним соединением раскрытого в данном случае объекта, такую как введение соединения субъекту любым подходящим путем.

Используемый здесь термин "обработка" может включать реверсию, облегчение, ингибирование развития, предотвращение или снижение вероятности болезни, расстройства или состояния, к которому применяется данный термин, или одного или нескольких симптомов или проявлений такого заболевания, расстройства или состояния. Профилактика относится к действиям, направленным на то, чтобы заболевание, расстройство, состояние или симптом или проявление таковых, или ухудшение тяжести таковых не возникало. Следовательно, раскрытые в данном случае соединения могут вводиться профилактически для предотвращения или снижения возникновения или рецидива заболевания, расстройства или состояния.

Термин "комбинация" применяется в широчайшем смысле и означает, что субъекту вводят, по меньшей мере, два агента, более конкретно, раскрытое в данном случае соединение и, по меньшей мере, одного другого активного агента. Более конкретно, термин "в комбинации" относится к одновременному введению двух (или нескольких) активных агентов для лечения, например, одного болезненного состояния. В настоящем описании, активные агенты могут быть объединены и введены в одной дозированной форме, могут быть введены в виде отдельных дозированных форм в одно и то же время, или могут быть введены в виде отдельных дозированных форм, которые вводят по очереди или последовательно в один или разные дни. В одном варианте осуществления раскрытого в данном случае объекта, активные агенты объединяют и вводят в одной дозированной форме. В другом варианте осуществления, активные агенты вводят в отдельных дозированных формах (например, где желательно менять количество одного, но не другого). Одна дозированная форма может включать дополнительные активные агенты для лечения болезненного состояния.

Субъектом, леченным раскрытыми в данном случае способами, во множестве вариантов осуществления, желательно является человек, хотя понятно, что описанные здесь способы являются эффективными в отношении всех позвоночных видов, которые предназначены для включения в термин «субъект». Следовательно, "субъект" может включать человека для медицинских целей, например, для лечения существующего

состояния или заболевания или профилактического лечения для профилактики возникновения состояния или заболевания, или животное (отличное от человека) для медицинских, ветеринарных целей, или исследовательских целей. Подходящие животные включают млекопитающих, включая, но не ограничиваясь ими, приматов, например человека, обезьян, человекообразных обезьян и подобных; крупный рогатый скот, например, крупный рогатый скот, коров и подобных; овечьих, например, овец и подобных; козых, например, коз и подобных; свинообразных, например, свиней, кабанов и подобных; лошадиных, например, лошадей, ослов, зебр и подобных; кошачьих, включая диких и домашних кошек; псовых, включая собак; зайцеобразных, включая кроликов, зайцев и подобных; и грызунов, включая мышей, крыс и подобных. Животное может быть трансгенным животным. В некоторых вариантах осуществления, субъектом является человек, включая, но не ограничиваясь ими, плод, новорожденного, младенца, подростка и взрослого. Дополнительно “субъект” может включать пациента, пораженного или подверженного поражению состоянием или заболеванием. Таким образом, термины “субъект” и “пациент” применяются здесь взаимозаменяемо.

### *C. Наборы*

В еще других вариантах осуществления, раскрытый в данном случае объект представляет набор, содержащий раскрытое в ланом случае соединение.

В некоторых вариантах осуществления, набор представляет упакованные фармацевтические композиции, содержащие фармацевтически приемлемый носитель и соединение по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления, упакованная фармацевтическая композиция будет содержать предшественники реакции для получения соединения по настоящему изобретению при объединении с радиомеченным предшественником. Другие упакованные фармацевтические композиции, представленные настоящим изобретением, дополнительно содержат устройства индикации, содержащие, по меньшей мере, один из: инструкции по получению соединений по изобретению из поставляемых предшественников, инструкции по применению композиции для визуализации клеток или тканей, экспрессирующих CSF1, или инструкции по применению композиции для визуализации глутаматергической нетротрансмиссии у пациента, страдающего связанным со стрессом расстройством, или инструкции по применению композиции для визуализации рака простаты.

### *D. Фармацевтические композиции и введение*

В другом аспекте, в настоящем описании представлена фармацевтическая композиция, включающая раскрытое в данном случае соединение, отдельно или в сочетании с одним или несколькими терапевтическими агентами в смеси с фармацевтически приемлемым эксципиентом. Специалист в данной области техники поймет, что фармацевтические композиции включают фармацевтически приемлемые соли соединений, описанных выше. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны специалистам в данной области техники и включают соли активных соединений, которые получены с относительно не токсичными кислотами или основаниями, в зависимости от

конкретных замещающих групп, имеющих в соединениях, описанных здесь. Когда соединения по настоящему изобретению содержат относительно кислотные функциональные группы, основно-аддитивные соли могут быть получены контактированием нейтральной формы таких соединений с достаточным количеством желаемого основания, в чистом виде или в подходящем инертном растворителе, или посредством ионного обмена, в результате чего один основной противоион (основание) в ионном комплексе заменяется другим. Примеры фармацевтически приемлемых основно-аддитивных солей включают соль натрия, калия, кальция, аммония, органических аминов или магния или аналогичные соли.

Когда соединения по настоящему описанию содержат относительно основные функциональные группы, кислотно-аддитивные соли могут быть получены контактированием нейтральной формы таких соединений с достаточным количеством желаемой кислоты, в чистом виде или в подходящем инертном растворителе, или посредством ионного обмена, в результате чего один кислотный противоион (кислота) в ионном комплексе заменяется другим. Примеры фармацевтически приемлемых кислотно-аддитивных солей включают соли, полученные из неорганических кислот, таких как хлористоводородная, бромистоводородная, азотная, карбоновая, моногидрокарбоновая, фосфорная, моногидрофосфорная, дигидрофосфорная, серная, моногидросерная, йодоводородная или фосфорная кислоты и подобные, а также соли, полученные из относительно нетоксичных органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, изомасляная, малеиновая, малоновая, бензойная, янтарная, субериновая, фумаровая, молочная, миндальная, фталевая, бензолсульфоновая, п-толуолсульфоновая, лимонная, винная, метансульфоновая и подобные. Также включены соли аминокислот, такие как аргинат и подобные, и соли органических кислот, таких как глюкуроновая и галактуроно́вая кислоты и подобные (см., например, Berge et al, "Pharmaceutical Salts", *Journal of Pharmaceutical Science*, 1977, 66, 1-19). Некоторые конкретные соединения настоящего описания содержат и основные и кислотные функциональные группы, которые позволяют превращать соединения в их основно- или кислотно-аддитивные соли.

Следовательно, фармацевтически приемлемые соли, подходящие для применения с раскрытым в данном случае объектом, включают, в качестве примера, но без ограничений, ацетат, бензолсульфонат, бензоат, бикарбонат, битартрат, бромид, эдетат кальция, карнисилат, карбонат, цитрат, эдетат, эдисилат, эстолат, эзилат, фумарат, глюцепат, глюконат, глутамат, гликоллиларсанилат, гексилрезорцинат, гидрабамин, гидробромид, гидрохлорид, гидроксинафтоат, йодид, изетионат, лактат, лактобионат, малат, малеат, миндалят, мезилат, мукат, напсилат, нитрат, памоат (эмбонат), пантотенат, фосфат/дифосфат, полигалактуронат, салицилат, стеарат, субацетат, сукцинат, сульфат, таннат, тартрат или теоклат. Другие фармацевтически приемлемые соли могут быть найдены в, например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20<sup>th</sup> ed.) Lippincott, Williams & Wilkins (2000). В терапевтических и/или диагностических применениях, соединения описания могут быть составлены для множества путей введения, включая

системное и местное или локализованное введение. Методики и составы обычно могут быть найдены в Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20<sup>th</sup> ed.) Lippincott, Williams & Wilkins (2000).

В зависимости от конкретных лечимых состояний, такие агенты могут быть составлены в жидкие или твердые дозированные формы и вводиться системно или местно. Агенты могут быть доставлены, например, в форме с управляемым по времени или длительным-замедленным высвобождением, как известно специалистам в данной области техники. Методики составления и введения могут быть найдены в Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20<sup>th</sup> ed.) Lippincott, Williams & Wilkins (2000). Подходящие пути могут включать пероральное, трансбуккальное, ингаляционное, подъязычное, ректальное, трансдермальное, вагинальное, чрезслизистое, назальное или кишечное введение; парентеральную доставку, включая внутримышечные, подкожные, интрамедуллярные инъекции, а также интратекальные, прямые внутрижелудочковые, внутривенные, внутрисуставные, внутригрудинные, внутрисиновиальные, внутripеченочные, внутриочаговые, внутричерепные, внутрибрюшинные, интраназальные или внутриглазные инъекции или другие способы доставки.

Для инъекций, агенты описания могут быть составлены и разведены в водных растворах, таких как физиологически совместимые буферы, такие как раствор Хэнка, раствор Рингера или буфер на основе физиологического раствора. Для такого чрезслизистого введения в составе используются смачивающие реагенты, подходящие для прохождения через барьер. Такие смачивающие реагенты обычно известны в данной области.

Применение фармацевтически приемлемых инертных носителей для составления соединений, раскрытых здесь, для практического применения, в дозах, подходящих для системного введения, входит в объем раскрытия. При правильном выборе носителя и подходящей производственной практики, композиции настоящего описания, в частности, составленные в виде растворов, можно вводить парентерально, например, внутривенной инъекцией. Соединения могут быть легко составлены с использованием фармацевтически приемлемых носителей, хорошо известных в данной области, в дозах, подходящих для перорального введения. Такие носители позволяют составлять соединения по описанию в виде таблеток, пилюль, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, кашиц, суспензий и подобных для перорального приема субъектом (например, пациентом), подлежащим лечению.

Для назальной или ингаляционной доставки, агенты по описанию также могут быть составлены способами, известными специалистам в данной области, и могут включать, например, но не ограничиваясь ими, примеры солюбилизующих, разбавляющих или диспергирующих веществ, таких как физиологический раствор; консервантов, таких как бензиловый спирт; промоторов абсорбции; и фторуглеродов.

Фармацевтические композиции, подходящие для использования в настоящем раскрытии, включают композиции, где активные ингредиенты содержатся в эффективном количестве для достижения предполагаемой цели. Определение эффективных количеств

находится в компетенции специалистов в данной области, особенно в свете подробного описания, представленного в данном документе. Обычно соединения по описанию эффективны в широком диапазоне доз. Например, при лечении взрослых людей, дозы от 0,01 до 1000 мг, от 0,5 до 100 мг, от 1 до 50 мг в сутки и от 5 до 40 мг в сутки являются примерами доз, которые могут применяться. Не ограничивающие дозы составляют от 10 до 30 мг в сутки. Точная доза будет зависеть от пути введения, формы, в которой вводят соединение, субъекта, подлежащего лечению, массы тела субъекта, подлежащего лечению, биодоступности соединения(й), токсичности адсорбции, распределения, метаболизма и выведения (ADME) соединения(й) и предпочтений и опыта лечащего врача.

В дополнение к активным ингредиентам эти фармацевтические композиции могут содержать подходящие фармацевтически приемлемые носители, включающие эксципиенты и вспомогательные вещества, которые облегчают обработку активных соединений в препараты, которые можно использовать в фармацевтике. Препараты, составленные для перорального введения, могут быть в форме таблеток, драже, капсул или растворов.

Фармацевтические препараты для перорального применения могут быть получены объединением активных соединений с твердыми эксципиентами, необязательно измельчая полученную смесь и обрабатывая смесь гранул, после добавления подходящих вспомогательных веществ, если желательно, для получения таблеток или сердцевин драже. Подходящими эксципиентами являются, в частности, наполнители, такие как сахара, включая лактозу, сахарозу, маннит или сорбит; препараты целлюлозы, например, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, желатин, трагакантовую камедь, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия (КМЦ) и/или поливинилпирролидон (ПВП: повидон). При желании, могут быть добавлены разрыхлители, такие как поперечно-сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота, или их соль, такая как альгинат натрия.

Сердцевины драже имеют подходящие покрытия. Для этой цели могут использоваться концентрированные растворы сахаров, которые могут необязательно содержать аравийскую камедь, тальк, поливинилпирролидон, гель карбопол, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и/или диоксид титана, растворы лаков и подходящие органические растворители или смеси растворителей. Красители или пигменты могут быть добавлены к покрытиям таблеток или драже для идентификации или для характеристики различных комбинаций доз активного соединения.

Фармацевтические препараты, которые можно использовать орально, включают в себя капсулы с плотной посадкой, сделанные из желатина, а также мягкие герметичные капсулы из желатина и пластификатора, такого как глицерин или сорбит. Капсулы с плотной посадкой могут содержать активные ингредиенты в смеси с наполнителем, таким как лактоза, связующими веществами, такими как крахмалы, и/или смазывающими

веществами, такими как тальк или стеарат магния, и, необязательно, стабилизаторами. В мягких капсулах, активные соединения могут быть растворены или суспендированы в подходящих жидкостях, таких как жирные масла, жидкий парафин или жидкие полиэтиленгликоли (ПЭГ). Кроме того, могут быть добавлены стабилизаторы.

## II. ОБЩИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Хотя здесь используются конкретные термины, они используются только в общем и описательном смысле, а не в целях ограничения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, что и обычно понимается рядовым специалистом в области, к которой принадлежит описанный в данном случае объект.

Хотя следующие термины, относящиеся к раскрытым в данном случае соединениям, как полагают, хорошо понимаются рядовыми специалистами в данной области, следующие определения даны для облегчения объяснения раскрытого в данном случае объекта. Эти определения призваны дополнить и проиллюстрировать, а не исключить, определения, которые будут очевидны любому специалисту в данной области после ознакомления с настоящим описанием.

Термины "замещенный", независимо от того, предшествует ли им термин "необязательно" или нет, "заместитель", в настоящем описании, относятся к способности, по оценке специалиста в этой области, менять одну функциональную группу на другую функциональную группу на молекуле при условии, что валентность всех атомов сохраняется. Когда более чем одна позиция в любой данной структуре может быть заменена более чем одним заместителем, выбранным из определенной группы, заместители могут быть либо одинаковыми, либо разными в каждом положении. Заместители также могут быть дополнительно замещены (например, заместитель арильной группы может иметь другой заместитель от него, такой как другая арильная группа, которая дополнительно замещена в одном или нескольких положениях).

Там, где группы заместителей или связывающие группы определены их обычными химическими формулами, записанными слева направо, они в равной степени охватывают химически идентичные заместители, которые были бы результатом записи структуры справа налево, например,  $-\text{CH}_2\text{O}-$  эквивалентно  $-\text{OCH}_2-$ ;  $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$  эквивалентно  $-\text{OC}(=\text{O})-$ ;  $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}-$  эквивалентно  $-\text{NRC}(=\text{O})\text{O}-$  и подобное.

Когда применяется термин "независимо выбранный", заместители, на которые ссылаются (например, R группы, такие как группы  $R_1$ ,  $R_2$  и подобные, или переменные, такие как "m" и "n"), могут быть идентичными или разными. Например, обе  $R_1$  и  $R_2$  могут быть замещенными алкилами, или  $R_1$  может быть водородом и  $R_2$  может быть замещенным алкилом, и так далее.

Термины "a", "an" или "a(n)", когда они используются в отношении группы заместителей здесь, означают, по меньшей мере, один. Например, если соединение замещено "an" алкилом или арилом, соединение необязательно замещено, по меньшей мере, одним алкил и/или, по меньшей мере, одним арилом. Более того, там, где группа

замещена R-заместителем, группа может быть названа "R-замещенной". Если группа R-замещена, группа замещена, по меньшей мере, одним R-заместителем и каждый R-заместитель необязательно другой.

Упомянутая "R" или группа обычно имеет структуру, которая распознается в данной области техники как соответствующая этому наименованию, если не указано иное. Для целей иллюстрации, определенные типовые "R" группы, указанные выше, определены ниже.

Описания соединений настоящего описания ограничены принципами химической связи, известными специалистам в данной области. Соответственно, когда группа может быть замещена одним или несколькими из ряда заместителей, такие замещения выбираются таким образом, чтобы соответствовать принципам химической связи и дать соединения, которые не являются заведомо нестабильными и/или известны специалисту в данной области как вероятно нестабильные в условиях окружающей среды, таких как водные, нейтральные и некоторые известные физиологические условия. Например, гетероциклоалкил или гетероарил присоединен к остальной части молекулы через гетероатом кольца соответствии с принципами химической связи, известными специалистам в данной области, тем самым избегая заведомо нестабильных соединений.

Если явно не определено иное, "замещающая группа" в настоящем описании включает функциональную группу, выбранную из одной или нескольких следующих групп, которые определены здесь:

Термин углеводород в настоящем описании относится к любой химической группе, включающей водород и углерод. Углеводород может быть замещенным или незамещенным. Как известно специалисту в данной области техники, все валентности должны быть удовлетворены при проведении любых замещений. Углеводород может быть ненасыщенным, насыщенным, разветвленным, неразветвленным, циклическим, полициклическим или гетероциклическим. Иллюстративные углеводороды дополнительно определены ниже, и включают, например, метил, этил, н-пропил, изопропил, циклопропил, аллил, винил, н-бутил, трет-бутил, этинил, циклогексил и подобные.

Термин "алкил," сам по себе или как часть другого заместителя, означает, если не указано иное, прямую (т.е. неразветвленную) или разветвленную, ациклическую или циклическую углеводородную группу или из комбинацию, которая может быть полностью насыщенной, моно- или полиненасыщенной и может включать ди- и мультивалентные группы, имеющие указанное количество атомов углерода (т.е., C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> означает от одного до десяти углеродов, включая 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 углеродов). В конкретных вариантах осуществления, термин "алкил" относится к C<sub>1-20</sub> включительно, включая 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20 углеродов, линейным (т.е., "прямым"), разветвленным или циклическим, насыщенным или, по меньшей мере, частично и, в некоторых случаях, ненасыщенным (т.е., алкенилу и алкинилу) углеводородным радикалам, полученным из углеводородной группы, содержащей от

одного до двадцати атомов углерода через удаление одного атома водорода.

Типовые насыщенные углеводородные группы включают, но не ограничены ими, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, н-пентил, втор-пентил, изопентил, неопентил, н-гексил, втор-гексил, н-гептил, н-октил, н-децил, н-ундецил, додецил, циклогексил, (циклогексил)метил, циклопропилметил и их гомологи и изомеры.

“Разветвленный” относится к алкильной группе, в которой низшая алкильная группа, такая как метил, этил или пропил, присоединена к линейной алкильной цепи. “Низший алкил” относится к алкильной группе, имеющей от 1 до примерно 8 атомов углерода (т.е., C<sub>1-8</sub> алкилу), например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 атомов углерода. “Высший алкил” относится к алкильной группе, имеющей от примерно 10 до примерно 20 атомов углерода, например, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления, “алкил” относится, в частности, к C<sub>1-8</sub> прямым алкилам. В других вариантах осуществления, “алкил” относится, в частности, к C<sub>1-8</sub> разветвленным алкилам.

Алкильные группы необязательно могут быть замещены (“замещенный алкил”) одной или несколькими заместителями алкильной группы, которые могут быть одинаковыми или разными. Термин “заместитель алкильной группы” включает, но не ограничен ими, алкил, замещенный алкил, галоген, ариламино, ацил, гидроксил, арилоксил, алкоксил, алкилтио, арилтио, аралкилоксил, аралкилтио, карбоксил, алкоксикарбонил, оксо и циклоалкил. Вдоль алкильной цепи необязательно может быть вставлен один или несколько атомов кислорода, серы или замещенных или незамещенных атомов азота, где заместителем азота является водород, низший алкил (также называемый здесь «алкиламиноалкил») или арил.

Таким образом, используемый здесь термин “замещенный алкил” включает алкильные группы, определенные в настоящем документе, в которых один или несколько атомов или функциональных групп алкильной группы замещены другим атомом или функциональной группой, включая, например, алкил, замещенный алкил, галоген, арил, замещенный арил, алкоксил, гидроксил, нитро, amino, алкиламино, диалкиламино, сульфат и меркапто.

Термин «гетероалкил», сам по себе или в комбинации с другим термином, означает, если не указано иное, стабильную прямую или разветвленную цепь или циклическую углеводородную группу, или их комбинации, состоящую, по меньшей мере, из одного атома углерода и, по меньшей мере, одного гетероатома, выбранного из группы, состоящей из O, N, P, Si и S, и где атомы азота, фосфора и серы необязательно могут быть окислены, и гетероатом азота необязательно может быть кватернизован. Гетероатом(ы) O, N, P и S и Si могут быть размещены в любом внутреннем положении гетероалкильной группы или в положении, в котором алкильная группа присоединена к остальной части молекулы. Примеры включают, но не ограничены ими, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>25</sub>-S(O)-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, -

$\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ ,  $\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$  и  $-\text{CN}$ . Вплоть до двух или трех гетероатомов могут быть расположены последовательно, так как, например, в  $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$  и  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ .

Как описано выше, гетероалкильные группы, в настоящем описании, включают такие группы, которые присоединены в остатку молекулы через гетероатом, такой как  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}'$ ,  $-\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{OR}'$ ,  $-\text{SR}$ ,  $-\text{S}(\text{O})\text{R}$  и/или  $-\text{S}(\text{O}_2)\text{R}'$ . Когда “гетероалкил” указана после указания определенных гетероалкильных групп, таких как  $-\text{NR}'\text{R}$  или подобные, должно быть понятно, что термины гетероалкил и  $-\text{NR}'\text{R}''$  не являются избыточными или взаимоисключающими. Скорее, конкретные гетероалкильные группы указаны для придания ясности. Таким образом, термин “гетероалкил” не должен интерпретироваться в настоящем документе как исключая определенные гетероалкильные группы, такие как  $-\text{NR}'\text{R}''$  или подобные.

“Циклический” и “циклоалкил” относятся к не ароматической моно- или мультициклической кольцевой системе, содержащей от примерно 3 до примерно 10 атомов углерода, например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 атомов углерода. Циклоалкильная группа может быть необязательно частично ненасыщенной. Циклоалкильная группа также может быть необязательно замещена заместителем алкильной группы, как определено в настоящем документе, оксо и/или алкиленом. Вдоль циклической алкильной цепи необязательно может быть вставлен один или несколько атомов кислорода, серы или замещенных или незамещенных атомов азота, где заместителем азота является водород, незамещенный алкил, замещенный алкил, арил или замещенный арил, с получением гетероциклической группы. Типовые моноциклические циклоалкильные кольца включают циклопентил, циклогексил и циклогептил. Мультициклические циклоалкильные кольца включают адамантил, октагидронафтил, декалин, камфору, камфан и норадамантил, и конденсированные кольцевые системы, такие как дигидро- и тетрагидронафталин и подобные.

Термин “циклоалкилалкил” в настоящем описании относится к циклоалкильной группе, как определено в настоящем документе выше, которая присоединена к исходной молекуле через алкильную группу, также определенную выше. Примеры циклоалкилалкильных групп включают циклопропилметил и циклопентилэтил.

Термины “циклогетероалкил” или “гетероциклоалкил” относятся к не ароматической кольцевой системе, ненасыщенной или частично ненасыщенной кольцевой системе, такой как 3-10-членная замещенная или незамещенная циклоалкильная кольцевая система, включая один или несколько гетероатомов, которые могут быть одинаковыми или разными, и выбраны из группы, состоящей из азота (N), кислорода (O), серы (S), фосфора (P) и кремния (Si), и необязательно может включать одну или несколько двойных связей.

Циклогетероалкильное кольцо может быть необязательно конденсировано с или другим образом присоединено к другим циклогетероалкильным кольцам и/или не ароматическим углеводородным кольцам. Гетероциклические кольца включают такие,

которые имеют от одного до трех гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, серы и азота, где гетероатомы серы и азота могут быть необязательно окислены и гетероатом азота может быть необязательно кватернизирован. В некоторых вариантах осуществления, Термин гетероциклическое относится к не ароматическому 5-, 6- или 7-членному кольцу или полициклической группе, где, по меньшей мере, одним атомом кольца является гетероатом, выбранный из O, S и N (где гетероатомы серы и азота могут быть необязательно окислены), включая, но не ограничиваясь ими, би- или трициклические группы, содержащие конденсированные шестичленные кольца, содержащие от одного до трех гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, серы и азота, где (i) каждое 5-членное кольцо имеет 0-2 двойных связей, каждое 6-членное кольцо имеет 0-2 двойных связей и каждое 7-членное кольцо имеет 0-3 двойных связей, (ii) гетероатомов азота и серы могут быть необязательно окислены, (iii) гетероатом азота может быть необязательно кватернизирован и (iv) любое из вышеуказанных гетероциклических колец может быть конденсировано с арильным или гетероарильным кольцом. Типовые циклогетероалкильные кольцевые системы включают, но не ограничены ими, пирролидинил, пирролинил, имидазолидинил, имидазолинил, пиразолидинил, пиразолинил, пиперидил, пиперазинил, индолинил, хинуклидинил, морфолинил, тиоморфолинил, тиadiaзанил, тетрагидрофуранил и подобные.

Термины “циклоалкил” и “гетероциклоалкил”, сами по себе или в комбинации с другими терминами, представляют, если не указано иное, циклические версии “алкила” и “гетероалкила”, соответственно. Дополнительно, для гетероциклоалкила, гетероатом может занимать положение, в котором гетероцикл присоединен к остатку молекулы. Примеры циклоалкила включают, но не ограничены ими, циклопентил, циклогексил, 1-циклогексенил, 3-циклогексенил, циклогептил и подобные. Примеры гетероциклоалкила включают, но не ограничены ими, 1-(1,2,5,6-тетрагидропиридил), 1-пиперидинил, 2-пиперидинил, 3-пиперидинил, 4-морфолинил, 3-морфолинил, тетрагидрофуран-2-ил, тетрагидрофуран-3-ил, тетрагидротиен-2-ил, тетрагидротиен-3-ил, 1-пиперазинил, 2-пиперазинил и подобные. Термины “циклоалкилен” и “гетероциклоалкилен” относятся к двухвалентным производным циклоалкила и гетероциклоалкила, соответственно.

Ненасыщенной алкильной группой является такая, которая имеет одну или несколько двойных связей или тройных связей. Примеры ненасыщенных алкильных групп включают, но не ограничены ими, винил, 2-пропенил, кротил, 2-изопентенил, 2-(бутадиенил), 2,4-пентадиенил, 3-(1,4-пентадиенил), этинил, 1- и 3-пропинил, 3-бутинил и высшие гомологи и изомеры. Алкильные группы, которые ограничены углеводородными группами, называют “гомоалкил.”

Более конкретно, термин “алкенил” в настоящем описании относится к одновалентной группе, полученной из  $C_{1-20}$ , включая прямую или разветвленную углеводородную группу, имеющую, по меньшей мере, одну двойную связь углерод-углерод, удалением одной молекулы водорода. Алкенильные группы включают, например, этенил (т.е., винил), пропенил, бутенил, 1-метил-2-бутен-1-ил, пентенил,

гексенил, октенил, алленил и бутадиенил.

Термин “циклоалкенил” в настоящем описании относится к циклическому углеводороду, содержащему, по меньшей мере, одну двойную связь углерод-углерод. Примеры циклоалкенильных групп включают циклопропенил, циклобутенил, циклопентенил, циклопентадиен, циклогексенил, 1,3-циклогексадиен, циклогептенил, циклогептатриенил и циклооктенил.

Термин “алкинил” в настоящем описании относится к одновалентной группе, полученной из прямого или разветвленного  $C_{1-20}$  углеводорода с указанным количеством атомов углерода, имеющую, по меньшей мере, одну тройную связь углерод-углерод. Примеры “алкинила” включают этинильную, 2-пропинильную (пропаргильную), 1-пропинильную, пентинильную, гексинильную и гептинильную группы и подобные.

Термин “алкилен” сам по себе или как часть другого заместителя относится к прямой или разветвленной двухвалентной алифатической углеводородной группе, полученной из алкильной группы, имеющей от 1 до примерно 20 атомов углерода, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 атомов углерода. Алкиленовая группа может быть прямой, разветвленной или циклической. Алкиленовая группа также может быть необязательно незамещена и/или замещена одним или более “заместителями алкильной группы”. Вдоль алкиленовой группы необязательно может быть вставлен один или несколько атомов кислорода, серы или замещенных или незамещенных атомов азота (также называемый здесь «алкиламиноалкил»), где заместителем азота является алкил, описанный выше. Типовые алкиленовые группы включают метилен ( $-CH_2-$ ); этилен ( $-CH_2-CH_2-$ ); пропилен ( $-(CH_2)_3-$ ); циклогексилен ( $-C_6H_{10}-$ );  $-CH=CH-CH=CH-$ ;  $-CH=CH-CH_2-$ ;  $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ,  $-CH_2CH=CHCH_2-$ ,  $-CH_2C\equiv CCH_2-$ ,  $-CH_2CH_2CH(CH_2CH_2CH_3)CH_2-$ ,  $-(CH_2)_q-N(R)-(CH_2)_r-$ , где каждый из  $q$  и  $r$  независимо является целым числом от 0 до примерно 20, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, и  $R$  является водородом или низшим алкилом; метилendiоксил ( $-O-CH_2-O-$ ); и этилendiоксил ( $-O-(CH_2)_2-O-$ ). Алкиленовая группа может иметь от примерно 2 до примерно 3 атомов углерода и может дополнительно иметь 6-20 атомов углерода. Обычно алкильная (или алкиленовая) группа будет иметь от 1 до 24 атомов углерода, и эти группы, имеющие 10 или менее атомов углерода являются некоторыми вариантами осуществления настоящего описания. “Низший алкил” или “низший алкилен” является алкильной или алкиленовой группой с более короткой цепью, обычно имеющей восемь или меньше атомов углерода.

Термин “гетероалкилен” сам по себе или как часть другого заместителя означает двухвалентную группу, полученную из гетероалкила, представленную, но не ограниченную ими,  $-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-$  и  $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$ . Для гетероалкиленовых групп, гетероатомы также могут занимать любой или оба конца цепи (например, алкиленоксо, алкилендиоксо, алкиленамино, алкилендиамино и подобные). Также дополнительно, для алкиленовых и гетероалкиленовых связывающих групп, направление, в котором написана формула связывающей группы, не предполагает

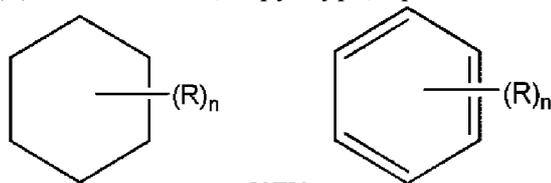
ориентации связующей группы. Например, формула  $-C(O)OR'$  - представляет и  $-C(O)OR'$  и  $-R'OC(O)-$ .

Термин “арил” означает, если не указано иное, ароматический углеводородный заместитель, который может представлять собой одно кольцо или несколько колец (например, от 1 до 3 колец), которые конденсированы вместе или ковалентно связаны. Термин «гетероарил» относится к арильным группам (или кольцам), которые содержат от одного до четырех гетероатомов (в каждом отдельном кольце в случае нескольких колец), выбранных из N, O и S, где атомы азота и серы необязательно окислены и атом(ы) азота необязательно кватернизованы. Гетероарильная группа может быть присоединена к остальной части молекулы через углерод или гетероатом. Неограничивающие примеры арильных и гетероарильных групп включают фенил, 1-нафтил, 2-нафтил, 4-бифенил, 1-пирролил, 2-пирролил, 3-пирролил, 3-пиразолил, 2-имидазолил, 4-имидазолил, пиразинил, 2-оксазолил, 4-оксазолил, 2-фенил-4-оксазолил, 5-оксазолил, 3-изоксазолил, 4-изоксазолил, 5-изоксазолил, 2-тиазолил, 4-тиазолил, 5-тиазолил, 2-фурил, 3-фурил, 2-тиенил, 3-тиенил, 2-пиридил, 3-пиридил, 4-пиридил, 2-пиримидил, 4-пиримидил, 5-бензотиазолил, пуринил, 2-бензимидазолил, 5-индолил, 1-изохинолил, 5-изохинолил, 2-хиноксалинил, 5-хиноксалинил, 3-хинолил и 6-хинолил. Заместители для каждого из вышеуказанных арильных и гетероарильных кольцевых систем выбирают из группы приемлемых заместителей, описанных ниже. Термины “арилен” и “гетероарилен” относятся к двухвалентным формам арила и гетероарила, соответственно.

Для краткости, термин “арил” при применении в сочетании с другими терминами (например, арилокси, арилтиокси, арилалкил) включает и арильные и гетероарильные кольца, как определено выше. Таким образом, термины “арилалкил” и “гетероарилалкил” включают такие группы, в которых арильная или гетероарильная группа присоединена к алкильной группе (например, бензилу, фенэтилу, пиридилметилу, фурилметилу и подобным), включающей такие алкильные группы, в которых атом углерода (например, метиленовая группа) замещен, например, атомом кислорода (например, феноксиметил, 2-пиридилоксиметил, 3-(1-нафтилокси)пропил и подобные). Однако, термин “галоарил” в настоящем описании охватывает только арилы, замещенные одним или несколькими галогенами.

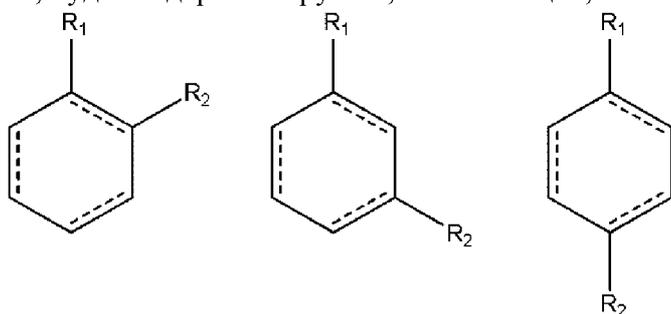
Если гетероалкил, гетероциклоалкил или гетероарил включает определенное количество членов (например “3-7 членов”), термин “член” относится к углероду или гетероатому.

Дополнительно, структура, представленная в общем формулой:



в настоящем описании относится к кольцевой структуре, например, но не

ограниченной ими, 3-углероду, 4-углероду, 5-углероду, 6-углероду, 7-углероду и подобному, алифатическому и/или ароматическому циклическому соединению, включая насыщенную кольцевую систему, частично насыщенную кольцевую структуру и ненасыщенную кольцевую структуру, включающей замещающую R группу, где R может присутствовать или отсутствовать, и если присутствует, каждая из одной или нескольких R групп может быть замещена одним или несколькими доступными атомами углерода или кольцевыми структурами. Присутствие или отсутствие R группы и количество R групп определяется значением переменной “n”, которая является целым числом, обычно имеющим значение от 0 до количества атомов углерода на кольце, доступном для замещения. Каждая R группа, если их больше одной, замещена на доступном углероде кольцевой структуры скорее, чем на другой R группе. Например, структура выше, где n равно 0-2, будет содержать группы, включающие, но не ограниченные ими:



и подобные.

Пунктирная линия, представляющая связь в циклической кольцевой структуре, указывает, что связь может присутствовать или отсутствовать в кольце. То есть, пунктирная линия, представляющая связь в циклической кольцевой структуре, указывает, что кольцевая структура выбрана из группы, состоящей из насыщенной кольцевой структуры, частично насыщенной кольцевой структуры и ненасыщенной кольцевой структуры.

Символ (  ) означает точку присоединения группы к остатку молекулы.

Когда названный атом ароматического кольца или гетероциклического ароматического кольца определен как «отсутствующий», названный атом заменяется прямой связью.

Каждый из вышеуказанных терминов (например, “алкил”, “гетероалкил”, “циклоалкил” и “гетероциклоалкил”, “арил”, “гетероарил”, “фосфонат” и “сульфонат” а также их двухвалентные производные) включает и замещенные и незамещенные формы указанной группы. Необязательные заместители для каждого типа группы представлены ниже.

Заместителями для алкильной, гетероалкильной, циклоалкильной, гетероциклоалкильной одновалентной и двухвалентной групп (включая группы, часто называемые алкилен, алкенил, гетероалкилен, гетероалкенил, алкинил, циклоалкил, гетероциклоалкил, циклоалкенил и гетероциклоалкенил) могут быть одна или несколько из множества групп, выбранных из, но не ограниченных ими:  $-OR'$ ,  $=O$ ,  $=NR'$ ,  $=N-OR'$ , -

$\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{SR}'$ , -галогена,  $-\text{SiR}'\text{R}''\text{R}'''$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ ,  $-\text{CO}_2\text{R}'$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})\text{R}'$ ,  $-\text{NR}'-\text{C}(\text{O})\text{NR}''\text{R}'''$ ,  $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ ,  $-\text{NR}-\text{C}(\text{NR}'\text{R}''\text{R}''')=\text{NR}''$ ,  $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{NRSO}_2\text{R}'$ ,  $-\text{CN}$  и  $-\text{NO}_2$  в количестве от нуля до  $(2m'+1)$ , где  $m'$  равно общему числу атомов углерода в таких группах. Каждый из  $\text{R}'$ ,  $\text{R}''$ ,  $\text{R}'''$  и  $\text{R}''''$  может независимо относиться к водороду, замещенной или незамещенной гетероалкильной, замещенной или незамещенной циклоалкильной, замещенной или незамещенной гетероциклоалкильной, замещенной или незамещенной арильной (например, арилу, замещенному 1-3 галогенами), замещенной или незамещенной алкильной, алкокси или тиоалкокси группам. В настоящем описании, “алкокси” группой является алкил, присоединенный к остатку молекулы через двухвалентный кислород. Когда соединение по описанию включает более одной R группы, например, каждую из R групп независимо выбирают так, как будто каждая является  $\text{R}'$ ,  $\text{R}''$ ,  $\text{R}'''$  и  $\text{R}''''$  группами, когда присутствует более одной из этих групп. Когда  $\text{R}'$  и  $\text{R}''$  присоединены к одному и тому же атому азота, они могут быть объединены с атомом азота с образованием 4-, 5-, 6- или 7-членного кольца. Например,  $-\text{NR}'\text{R}''$  включает, но не ограничена ими, 1-пирролидинил и 4-морфолинил. Из представленного выше обсуждения заместителей, специалист в данной области техники поймет, что термин “алкил” включает группы, включающие атомы углерода, связанные с группами, отличными от водородных групп, такими как галоалкил (например,  $-\text{CF}_3$  и  $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ ) и ацил (например,  $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{CF}_3$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{OCH}_3$  и подобные).

Аналогично заместителям, описанным для алкильных групп выше, типовые заместители для арильных и гетероарильных групп (а также их двухвалентных производных) варьируются, и их выбирают из, например: галогена,  $-\text{OR}'$ ,  $-\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{SR}'$ ,  $-\text{SiR}'\text{R}''\text{R}'''$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ ,  $-\text{CO}_2\text{R}'$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})\text{R}'$ ,  $-\text{NR}'-\text{C}(\text{O})\text{NR}''\text{R}'''$ ,  $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ ,  $-\text{NR}-\text{C}(\text{NR}'\text{R}''\text{R}''')=\text{NR}''$ ,  $-\text{NR}-\text{C}(\text{NR}'\text{R}''\text{R}''')=\text{NR}''$ ,  $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{NRSO}_2\text{R}'$ ,  $-\text{CN}$  и  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{R}'$ ,  $-\text{N}_3$ ,  $-\text{CH}(\text{Ph})_2$ , фтор( $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ )алкокси и фтор( $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ )алкила, в количестве от нуля до общего количества открытых валентностей на ароматической кольцевой системе; и где  $\text{R}'$ ,  $\text{R}''$ ,  $\text{R}'''$  и  $\text{R}''''$  могут быть независимо выбраны из водорода, замещенного или незамещенного алкила, замещенного или незамещенного гетероалкила, замещенного или незамещенного циклоалкила, замещенного или незамещенного гетероциклоалкила, замещенного или незамещенного арила и замещенного или незамещенного гетероарила. Когда соединение по описанию включает более одной R группы, например, каждую из R групп независимо выбирают так, как будто каждая является  $\text{R}'$ ,  $\text{R}''$ ,  $\text{R}'''$  и  $\text{R}''''$  группами, когда присутствует более одной из этих групп.

Два заместителя на соседних атомах арильного или гетероарильного кольца необязательно могут образовывать кольцо формулы  $-\text{T}-\text{C}(\text{O})-(\text{CRR}')_q-\text{U}-$ , где T и U независимо являются  $-\text{NR}-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{CRR}'-$  или одинарной связью, и q является целым числом от 0 до 3. Альтернативно, два заместителя на соседних атомах арильного или гетероарильного кольца необязательно могут быть замещены заместителем формулы  $-\text{A}-$

$(\text{CH}_2)_r\text{-B-}$ , где А и В независимо являются  $-\text{CRR}'$ -,  $-\text{O-}$ ,  $-\text{NR}'$ -,  $-\text{S-}$ ,  $-\text{S(O)-}$ ,  $-\text{S(O)}_2$ -,  $-\text{S(O)}_2\text{NR}'$ - или одинарной связью, и  $r$  является целым числом от 1 до 4.

Одна из одинарных связей полученного таким образом нового кольца необязательно может быть замещена двойной связью. Альтернативно, два заместителя на соседних атомах арильного или гетероарильного кольца необязательно могут быть замещены заместителем формулы  $-(\text{CRR}')_s\text{-X}'-(\text{C}''\text{R}''')_d$ -, где  $s$  и  $d$  независимо являются целыми числами от 0 до 3, и  $\text{X}'$  является  $-\text{O-}$ ,  $-\text{NR}'$ -,  $-\text{S-}$ ,  $-\text{S(O)-}$ ,  $-\text{S(O)}_2$ - или  $-\text{S(O)}_2\text{NR}'$ -. Заместители  $\text{R}$ ,  $\text{R}'$ ,  $\text{R}''$  и  $\text{R}'''$  могут быть независимо выбраны из водорода, замещенного или незамещенного алкила, замещенного или незамещенного циклоалкила, замещенного или незамещенного гетероциклоалкила, замещенного или незамещенного арила и замещенного или незамещенного гетероарила.

Используемый здесь термин “ацил” относится к группе органической кислоты, где  $-\text{OH}$  карбоксильной группы замещен другим заместителем, и имеет общую формулу  $\text{RC(=O)-}$ , где  $\text{R}$  является алкильной, алкенильной, алкинильной, арильной, карбоциклической, гетероциклической или ароматической гетероциклической группой, как определено в настоящем документе). Как таковой, термин “ацил” конкретно включает арилацильные группы, такие как 2-(фуран-2-ил)ацетильная- и 2-фенилацетильная группа. Конкретные примеры ацильных групп включают ацетил и бензоил. Ацильные группы также включают амиды,  $-\text{RC(=O)NR}'$ , сложные эфиры,  $-\text{RC(=O)OR}'$ , кетоны,  $-\text{RC(=O)R}'$  и альдегиды,  $-\text{RC(=O)H}$ .

Термины “алкоксил” или “алкокси” применяются здесь взаимозаменяемо и относятся к насыщенной (т.е., алкил-О-) или ненасыщенной (т.е., алкенил-О- и алкинил-О-) группе, присоединенной к исходной молекулярной группе через атом кислорода, где термины “алкил,” “алкенил” и “алкинил” такие, как описаны выше, и могут включать  $\text{C}_{1-20}$  включительно, линейные, разветвленные или циклические, насыщенные или ненасыщенные оксо-углеводородные цепи, включая, например, метоксил, этоксил, пропоксил, изопропоксил, н-бутоксил, втор-бутоксил, трет-бутоксил и н-пентоксил, неопентоксил, н-гексоксил и подобные.

Термин “алкоксиалкил” в настоящем описании относится к простому алкил-О-алкиловому эфиру, например, метоксиэтильной или этоксиметильной группе.

“Арилоксил” относится к арил-О- группе, где арильная группа такая, как описана выше, включая замещенный. Термин “арилоксил” в настоящем описании может относиться к фенилоксилу или гексилоксилу и алкилу, замещенному алкилу, галогену или алкоксилу, замещенному фенилоксилу или гексилоксилу.

“Аралкил” относится к арил-алкильной группе, где арил и алкил такие, как описаны выше, и включают замещенный арил и замещенный алкил. Типовые аралкильные группы включают бензил, фенилэтил и нафтилметил.

“Аралкилоксил” относится к аралкил-О- группе, где аралкильная группа такая, как описана выше. Типовой аралкилоксильной группой является бензилоксил, т.е.,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-O-}$ . Аралкилоксильная группа может быть необязательно замещена.

“Алкоксикарбонил” относится к алкил-О-С(=О)- группе. Типовые алкоксикарбонильные группы включают метоксикарбонил, этоксикарбонил, бутилоксикарбонил и *трет*-бутилоксикарбонил.

“Арилоксикарбонил” относится к арил-О-С(=О)- группе. Типовые арилоксикарбонильные группы включают фенокси- и нафтоксикарбонил.

“Аралкоксикарбонил” относится к аралкил-О-С(=О)- группе. Типовой аралкоксикарбонильной группой является бензилоксикарбонил.

“Карбамоил” относится к амидной группе формулы -С(=О)NH<sub>2</sub>. “Алкилкарбамоил” относится к R'RN-С(=О)- группе, где один из R и R' является водородом и другой из R и R' является алкилом и/или замещенным алкилом, как описано выше. “Диалкилкарбамоил” относится к R'RN-С(=О)- группе, где каждый из R и R' независимо является алкилом и/или замещенным алкилом, как описано выше.

Термин карбонилдиоксил, в настоящем описании, относится к карбонатной группе формулы -О-С(=О)-OR.

“Ацилоксил” относится к ацил-О- группе, где ацил такой, как описано выше.

Термин “амино” относится к -NH<sub>2</sub> группе и также относится к азотсодержащей группе, которая, как известно в данной области техники, получена из аммиака замещением одного или нескольких водородных радикалов органическими радикалами. Например, термины “ациламино” и “алкиламино” относятся к определенным N-замещенным органическим радикалам с ацильными и алкильными замещающими группами, соответственно.

“Аминоалкил” в настоящем описании относится к аминогруппе, ковалентно связанной с алкиленовым линкером. Более конкретно, термины алкиламино, диалкиламино и триалкиламино в настоящем описании относятся к одной, двум или трем, соответственно, алкильным группам, как определено выше, присоединенным к исходной молекулярной группе через атом азота. Термин алкиламино относится к группе, имеющей структуру -NHR' где R' является алкильной группой, как определено выше; а термин диалкиламино относится к группе, имеющей структуру -NR'R", где R' и R" каждый независимо выбирают из группы, состоящей из алкильных групп. Термин триалкиламино относится к группе, имеющей структуру -NR'R"R"', где R', R" и R"' каждый независимо выбирают из группы, состоящей из алкильных групп. Дополнительно, R', R" и R"', взятые вместе, необязательно могут быть -(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-, где k является целым числом от 2 до 6. Примеры включают, но не ограничены ими, метиламино, диметиламино, этиламино, диэтиламино, диэтиламинокарбонил, метилэтиламино, изопропиламино, пиперидино, триметиламино и пропиламино.

Аминогруппой является -NR'R", где R' и R" обычно выбраны из водорода, замещенного или незамещенного алкила, замещенного или незамещенного гетероалкила, замещенного или незамещенного циклоалкила, замещенного или незамещенного гетероциклоалкила, замещенного или незамещенного арила или замещенного или незамещенного гетероарила.

Термины алкилтиоэфир и тиоалкоксил относятся к насыщенной (т.е., алкил-S-) или ненасыщенной (т.е., алкенил-S- и алкинил-S-) группе, присоединенной в исходной молекулярной группе через атом серы. Примеры тиоалкоксильных групп включают, но не ограничены ими, метилтио, этилтио, пропилтио, изопропилтио, *n*-бутилтио и подобные.

“Ациламино” относится к ацил-NH- группе, где ацил такой, как описано выше. “Ароиламино” относится к ароил-NH- группе, где ароил такой, как описано выше.

Термин “карбонил” относится к -C(=O)- группе и может включать альдегидную группу, представленную общей формулой R-C(=O)H.

Термин “карбоксил” относится к -COOH группе. Такие группы также называют здесь группа “карбоновой кислоты”.

Термины “гало”, “галогенид” или “галоген” в настоящем описании относятся к фторным, хлорным, бромным и йодным группам. Дополнительно, термины, такие как “галоалкил”, включают моногалоалкил и полигалоалкил. Например, термин “гало(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкил” включает, но не ограничен ими, трифторметил, 2,2,2-трифторэтил, 4-хлорбутил, 3-бромпропил и подобные.

Термин “гидроксил” относится к -OH группе.

Термин “гидроксиалкил” относится к алкильной группе, замещенной -OH группой.

Термин “меркапто” относится к -SH группе.

Термин “оксо” в настоящем описании означает атом кислорода, который связан двойной связью с атомом углерода или с другим элементом.

Термин “нитро” относится к -NO<sub>2</sub> группе.

Термин “тио” относится к соединению, описанному ранее, где атом углерода или кислорода замещен атомом серы.

Термин “сульфат” относится к -SO<sub>4</sub> группе.

Термин тиогидроксил или тиол, в настоящем описании, относится к группе формулы -SH.

Более конкретно, термин “сульфид” относится к соединению, имеющему группу формулы -SR.

Термин “сульфон” относится к соединению, имеющему сульфонильную группу -S(O<sub>2</sub>)R.

Термин “сульфоксид” относится к соединению, имеющему сульфинильную группу -S(O)R.

Термин уреидо относится к группе мочевины формулы -NH-CO-NH<sub>2</sub>.

Термин “защитная группа” в отношении раскрытых в данном случае соединений, относится к химическому заместителю, который может быть селективно удален легкодоступными реагентами, который не взаимодействует с восстановленной функциональной группой в молекуле. Подходящие защитные группы известны в данной области техники и продолжают развиваться. Подходящие защитные группы могут быть найдены, например, у Wutz et al. ("Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, Fourth Edition," Wiley-Interscience, 2007). Защитные группы для защиты карбоксильной группы,

как писано у Wutz et al. (страницы 533-643), применяют некоторых вариантах осуществления. В некоторых вариантах осуществления, защитную группу удаляют обработкой кислотой. Типовые примеры защитных групп включают, но не ограничены ими, бензил, *p*-метоксибензил (PMB), третичный бутил (*t*-Bu), метоксиметил (MOM), метоксиэтоксиметил (MEM), метилтиометил (MTM), тетрагидропиранил (THP), тетрагидрофуранил (THF), бензилоксиметил (BOM), триметилсилил (TMS), триэтилсилил (TES), *t*-бутилдиметилсилил (TBDMS) и трифенилметил (тритил, Tr). Специалисты в данной области техники распознают подходящие ситуации, в которых требуются защитные группы, и смогут выбрать подходящую защитную группу для применения в конкретных обстоятельствах.

В описании и формуле изобретения данная химическая формула или название должны охватывать все таутомеры, конгенеры и оптические и стереоизомеры, а также рацемические смеси, в которых такие изомеры и смеси существуют.

Некоторые соединения настоящего описания могут иметь асимметричные атомы углерода (оптические или хиральные центры) или двойные связи; энантиомеры, рацематы, диастереомеры, таутомеры, геометрические изомеры, стереоизомерные формы, которые могут быть определены в терминах абсолютной стереохимии как (R) -или (S) - или как D- или L- для аминокислот и индивидуальных изомеров, входят в объем настоящего описания. Соединения настоящего описания не включают те, которые известны в данной области как слишком нестабильные для синтеза и/или выделения. Подразумевается, что настоящее описание включает соединения в рацемической, скалемической и оптически чистой формах. Оптически активные (R)- и (S)- или D- и L-изомеры могут быть получены с использованием хиральных синтонов или хиральных реагентов, или разделены с использованием обычных методик. Если описанные здесь соединения содержат олефиновые связи или другие центры геометрической асимметрии, и если не указано иное, предполагается, что соединения включают геометрические изомеры E и Z.

Если не указано, структуры, изображенные в данном документе, также включают все стереохимические формы структуры; т.е. конфигурации R и S для каждого асимметричного центра. Следовательно, отдельные стереохимические изомеры, а также смеси энантиомеров и диастереомеров настоящих соединений входят в объем описания.

Специалисту в данной области техники будет очевидно, что некоторые соединения настоящего раскрытия могут существовать в таутомерных формах, причем все такие таутомерные формы соединений входят в объем описания. Термин «таутомер» в настоящем описании относится к одному из двух или более структурных изомеров, которые существуют в равновесии и которые легко превращаются из одной изомерной формы в другую.

Если не указано иное, изображенные здесь структуры также включают соединения, которые отличаются только присутствием одного или нескольких изотопно обогащенных атомов. Например, соединения, имеющие настоящие структуры с замещением водорода дейтерием или тритием, или замещение углерода  $^{13}\text{C}$ - или  $^{14}\text{C}$ -обогащенным углеродом,

включены в объем настоящего описания.

Соединения настоящего описания также могут содержать не существующие в природе доли атомных изотопов на одном или нескольких атомах, которые составляют такие соединения. Например, соединения могут быть радиомечены радиоактивными изотопами, такими как тритий ( $^3\text{H}$ ), йод-125 ( $^{125}\text{I}$ ) или углерод-14 ( $^{14}\text{C}$ ). Все изотопные варианты соединений настоящего описания, радиоактивные или нет, включены в объем настоящего описания.

Соединения настоящего описания могут существовать в виде солей. Настоящее описание включает такие соли. Примеры применимых солевых форм включают гидрохлориды, гидробромиды, сульфаты, метансульфонаты, нитраты, малеаты, ацетаты, цитраты, фумараты, тартраты (например, (+)-тартраты, (-)-тартраты или их смеси, включая рацемические смеси, сукцинаты, бензоаты и соли с аминокислотами, такими как глутаминовая кислота. Эти соли могут быть получены способами, известными специалистам в данной области. Также включены основно-аддитивные соли, такие как соли натрия, калия, кальция, аммония, органического amino или магния, или аналогичные соли. Когда соединения настоящего описания содержат относительно основные функциональные группы, кислотно-аддитивные соли могут быть получены контактированием нейтральной формы таких соединений с достаточным количеством желаемой кислоты либо в чистом виде, либо в подходящем инертном растворителе, либо путем ионного обмена. Примеры приемлемых кислотно-аддитивных солей включают соли, полученные из неорганических кислот, таких как хлористоводородная, бромистоводородная, азотная, карбоновая, моногидрокарбоновая, фосфорная, моногидрофосфорная, дигидрофосфорная, серная, моногидросерная, йодоводородная или фосфорная кислоты и подобные, а также соли органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, изомасляная, малеиновая, малоновая, бензойная, янтарная, субериновая, фумаровая, молочная, миндальная, фталевая, бензолсульфоновая, п-толилсульфоновая, лимонная, винная, метансульфоновая и подобные. Также включены соли аминокислот, такие как аргинат и подобные, и соли органических кислот, таких как глюкуроновая или галактуоновая кислоты и подобные. Некоторые конкретные соединения настоящего описания содержат как основные, так и кислотные функциональные группы, которые позволяют превращать соединения в либо основно-, либо кислотно-аддитивные соли.

Нейтральные формы соединений могут быть регенерированы путем контактирования соли с основанием или кислотой и выделения исходного соединения обычным способом. Исходная форма соединения отличается от различных солевых форм некоторыми физическими свойствами, такими как растворимость в полярных растворителях.

Некоторые соединения настоящего описания могут существовать в несольватированных формах, а также в сольватированных формах, включая гидратированные формы. В общем, сольватированные формы эквивалентны несольватированным формам и входят в объем настоящего описания. Некоторые

соединения настоящего описания могут существовать во множестве кристаллических или аморфных форм. В общем, все физические формы эквивалентны для использования, предусмотренного настоящим раскрытием, и предполагается, что они входят в объем настоящего описания.

В дополнение к солевым формам, в настоящем описании представлены соединения, которые находятся в форме пролекарства. Пролекарства соединений, описанных в настоящем документе, представляют собой те соединения, которые легко претерпевают химические изменения в физиологических условиях для предоставления соединений настоящего описания. Кроме того, пролекарства могут быть превращены в соединения настоящего описания химическими или биохимическими способами *in vivo* среде. Например, пролекарства могут медленно превращаться в соединения настоящего описания при помещении в резервуар трансдермального пластыря с подходящим ферментом или химическим реагентом.

Следуя давней конвенции о патентном праве, термины «a», «an» и «the» относятся к «одному или нескольким» при использовании в этой заявке, включая формулу изобретения. Таким образом, ссылка на «субъект» включает множество субъектов, если контекст явно не противоречит (например, множество субъектов) и так далее.

В этом описании и формуле изобретения, термины «содержать», «содержит» и «содержащий» используются в неисключительном смысле, за исключением случаев, когда контекст требует иного. Точно так же, термин «включать» и его грамматические варианты предназначены не для ограничения, так что повторение элементов в списке не исключает других подобных элементов, которые могут быть заменены или добавлены к перечисленным элементам.

Для целей данного описания и прилагаемой формулы изобретения, если не указано иное, все числа, выражающие количества, размеры, измерения, пропорции, формы, составы, параметры, проценты, количества, характеристики и другие числовые значения, используемые в спецификации и формуле изобретения, должны быть понимаются как модифицируемые во всех случаях термином «примерно», даже если термин «примерно» не может явным образом использоваться вместе со значением, количеством или диапазоном. Соответственно, если не указано иное, числовые параметры, указанные в нижеследующем описании и прилагаемой формуле изобретения, не являются и не должны быть точными, но могут быть приблизительными и/или большими или меньшими по желанию, отражая допуски, коэффициенты пересчета, округление, погрешность измерения и подобные и другие факторы, известные специалистам в данной области, в зависимости от желаемых свойств, которые стремятся получить с помощью раскрытого в данном случае объекта. Например, термин «примерно» в отношении значения, может охватывать варианты, в некоторых вариантах осуществления,  $\pm 100\%$ , в некоторых вариантах осуществления,  $\pm 50\%$ , в некоторых вариантах осуществления,  $\pm 20\%$ , в некоторых вариантах осуществления,  $\pm 10\%$ , в некоторых вариантах осуществления,  $\pm 5\%$ ,

в некоторых вариантах осуществления,  $\pm 1\%$ , в некоторых вариантах осуществления,  $\pm 0,5\%$ , и в некоторых вариантах осуществления,  $\pm 0,1\%$  от указанного значения, так как такие вариации подходят для проведения способа или применения описанных композиций.

Дополнительно, термин “примерно” при применении в связи с одним или несколькими числами или диапазонами чисел, должен пониматься как относящийся ко всем таким числам, включая все числа в диапазоне, и изменяющий этот диапазон, расширяя границы выше и нижеуказанных числовых значений. Перечисление числовых диапазонов по конечным точкам включает все числа, например целые числа, включая их дробные части, входящие в этот диапазон (например, перечисление от 1 до 5 включает 1, 2, 3, 4 и 5, а также их дробные части, например, 1,5, 2,25, 3,75, 4,1 и подобные) и любой диапазон в этом диапазоне.

### ПРИМЕРЫ

Следующие примеры были включены в качестве руководства для специалиста в данной области техники для практического применения типовых вариантов реализации раскрытого в данном случае объекта. В свете настоящего описания и общего уровня квалификации в данной области, специалисты могут понять, что следующие примеры предназначены только для примера, и что можно использовать многочисленные изменения, модификации и изменения, не выходя за объем раскрытого в данном случае объекта. Описания синтеза и конкретные примеры, которые следуют ниже, предназначены только для целей иллюстрации и не должны рассматриваться как ограничивающие каким-либо образом описание соединений другими способами.

#### ПРИМЕР 1

### ПЭТ-ВИЗУАЛИЗАЦИЯ МИКРОГЛИИ ЧЕРЕЗ ТАРГЕТИРОВАНИЕ РЕЦЕПТОРА МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА 1 (CSF1R)

#### 1.1 Обзор

5-циано-N-(4-(4-[ $^{11}\text{C}$ ]метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамид ([ $^{11}\text{C}$ ]CPPC) является ПЭТ радиофармпрепаратом, специфическим для CSF1R, специфическим к микроглии маркером. Это соединение может применяться в качестве неинвазивного инструмента для визуализации реакционноспособной микроглии, связанной с заболеванием микроглии и их роли в нейровоспалении *in vivo*. Нейровоспаление считается основным патогенным признаком широкого спектра нейропсихиатрических расстройств. [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC также может применяться для исследования специфичности иммунной среды злокачественных образований центральной нервной системы и для отслеживания потенциальных неблагоприятных нейровоспалительных эффектов иммунотерапии периферических злокачественных образований. Этот ПЭТ агент представляет ценность для развития новых терапевтических агентов для нейровоспаления, особенно таких, которые направлены на CSF1R, не только обеспечивая неинвазивное, повторяемое считывание у пациентов, но также позволяя измерять связывание с мишенью лекарственного средства.

В то время как нейровоспаление является развивающейся концепцией, а вовлеченные клетки и их функции определяются, микроглия считается ключевым клеточным медиатором повреждения и восстановления мозга. Возможность специфического и неинвазивного измерения активности микроглии была бы благом для изучения нейровоспаления, которое вовлечено в широкий спектр нейропсихиатрических расстройств, включая черепно-мозговые травмы, демиелинирующие заболевания, болезнь Альцгеймера (БА) и болезнь Паркинсона, среди прочих.

[<sup>11</sup>C]CPPC является позитронно-активным высокоаффинным лигандом, специфическим к рецептору макрофагального колониестимулирующего фактора 1 (CSF1R), экспрессия которого по существу ограничена микроглией в мозге. [<sup>11</sup>C]CPPC демонстрирует высокое и специфическое поглощение в липополисахаридной модели нейровоспаления у мышей и приматов, отличных от человека. Он также демонстрирует специфическое и повышенное поглощение в модели БА на мышах, модели демиелинирования на экспериментальном аллергическом энцефаломиелите у мышей и на ткани мозга пациентов с БА, полученной при вскрытии. Радиационная дозиметрия у мышей показала, что [<sup>11</sup>C]CPPC является безопасным для дальнейших исследований на людях. [<sup>11</sup>C]CPPC может быть синтезирован с достаточным радиохимическим выходом, чистотой и специфической радиоактивностью, и обладает специфичностью связывания в соответствующих моделях, что указывает на потенциал для ПЭТ-визуализации CSF1R и микроглиального компонента нейровоспаления у человека.

### *1.2 Объем работ*

Эффективный и селективный ингибитор CSF1R, 5-циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамид, разработан фармацевтической промышленностью (Illig CR, et al. (2008)). В настоящем документе описан радиосинтез его изотополога, 5-циано-N-(4-(4-[<sup>11</sup>C]метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамид ([<sup>11</sup>C]CPPC), и оценивается потенциал [<sup>11</sup>C]CPPC для ПЭТ-визуализации CSF1R при нейровоспалении.

### *1.3 Материалы и способы*

#### *1.3.1. Химия*

Ингибиторы CSF1R BLZ945 (Krauser JA, et al. (2015)) и пексидартиниб (PLX3397) (DeNardo DG, et al. (2011)) получают коммерчески, и соединение **8** получают своими силами, как описано ранее (Illig CR, et al. (2008)). Синтез CPPC [5-циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамид] проводят как описано ранее (Illig CR, et al. (2008)) и аналогично получают не метильный предшественник для радиомечения [<sup>11</sup>C]CPPC, 5-циано-N-(4-(пиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамид (Pre-CPPC) (ФИГ. 8). [<sup>11</sup>C]CPPC получают реакцией [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>I с Pre-CPPC (ФИГ. 9).

#### *1.3.2 Исследования биораспределения и ПЭТ-визуализации с [<sup>11</sup>C]CPPC на животных*

Протоколы для животных одобрены Animal Care and Use Committee of the Johns

Hopkins Medical Institutions.

### *1.3.3 Животные*

Мыши C57BL/6J (22-27 г) или мыши CD-1 (25-27 г) от Charles River Laboratories служат в качестве контролей. Мышей с обедненной микроглией получают как описано ранее (Elmore MR, et al. (2014)). Мышей CSF1R KO (B6.Cg-Csf1r<sup>tm1.2Jwp/J</sup>) покупают у Jackson Laboratories. Мышиную модель связанного с БА амилоидоза сверхэкспрессирующего белок-предшественник амилоида со Шведскими и Индианскими мутациями получают своими силами (Melnikova T, et al. (2013)). Самцам мышей CD-1 внутрочерепно вводят инъекцию (Dobos N, et al. (2012)) LPS (5 мкг; правый передний мозг) в качестве внутрочерепной LPS модели нейровоспаления (в.ч.-LPS). В.б. модель нейровоспаления (в.б.-LPS) создают инъекцией LPS самцам мышей CD-1 (10 мг/кг; 0,2 мл; в.б.) как описано ранее (Qin L, et al. (2007)). Для модели экспериментального аутоиммунного энцефалита (ЭАЭ) у мышей, самкам мышей C57BL/6J инокулируют MOG<sub>35-55</sub> пептид, как описано ранее (Jones MV, et al. (2008)). Симптоматических MOG-инокулированных мышей и не инокулированных, здоровых мышей сканируют через 14 дней после первой инокуляции.

### *1.3.4 Биораспределение [<sup>11</sup>C]CPPC в областях мозга у мышей*

Конечный итог экспериментов на мышах рассчитывают как процент от стандартизированного уровня поглощения (%СУП) или %СУП, скорректированного для концентрации радиоактивности в крови (ССУП):

$$\text{ССУП} = \% \text{СУП} \text{ ткани} / \% \text{СУП} \text{ крови} \quad \text{ССУП} = \% \text{СУП} \text{ ткани} / \% \text{СУП} \text{ крови.}$$

### *1.3.5 Исходный уровень*

Контрольных мышей умерщвляют смещением шейных позвонков в разные моменты времени после инъекции 5,6 МБк (0,15 мКи) [<sup>11</sup>C]CPPC в 0,2 мл физиологического раствора в боковую хвостовую вену. Мозг вынимают и иссекают на льду. Разные области мозга взвешивают, и содержание в них радиоактивности определяют на  $\gamma$ -счетчике. Все другие исследования биораспределения у мышей проводят аналогично.

### *1.3.6 Блокирование*

Мышей (самцов CD1 или C57BL/6J) умерщвляют смещением шейных позвонков через 45 мин после в.в. инъекции [<sup>11</sup>C]CPPC. Блокаторы, CPPC (0,3, 0,6, 1,2, 3,0, 10 и 20 мг/кг), или ингибитор CSF1R, соединение **8** (Illig CR, et al. (2008)) (2 мг/кг), дают в.б. за 5 мин до [<sup>11</sup>C]CPPC, в то время как животные для определения исходного уровня получают носитель. Мозг вынимают и иссекают на льду, и образцы крови берут из сердца. Поглощение [<sup>11</sup>C]CPPC областями мозга на исходном уровне сравнивают с теми же показателями при блокировании.

### *1.3.7 Исследования биораспределения в модели нейровоспаления у мышей (LPS-обработанные, БА)*

Эти исследования проводят аналогично экспериментам с исходным уровнем и блокированием у контрольных мышей.

### *1.3.8 Определение уровней CSF1R в мозге контрольных и LPS-обработанных*

*мышей*

Уровни Csf1r мРНК и CSF1R белка измеряют кРВ-ПЦР и вестерн-блоттингом, соответственно (ФИГ. 14).

### *1.3.9 Визуализация ПЭТ/КТ у мышей с ЭАЭ*

Каждой мыши (трем с ЭАЭ и одной контрольной) вводят в.в. инъекцией [<sup>11</sup>C]CPPC, затем визуализируют с помощью ПЭТ/КТ сканера. Данные ПЭТ и КТ воссоздают с применением программного обеспечения производителя и демонстрируют с применением программы для анализа данных диагностической визуализации (AMIDE) (amide.sourceforge.net/). Для сохранения динамического диапазона, ПЭТ сигнал для гардеровой железы и слюнной железы частично маскируют.

### *1.3.10 Дозиметрия радиоактивного излучения всего тела у мышей*

Самцам мышей CD-1 вводят инъекцией [<sup>11</sup>C]CPPC, как описано выше, для исследования исходного уровня, и их умерщвляют через 10, 30, 45, 60 и 90 мин после обработки. Разные органы быстро вынимают и определяют процент введенной дозы (%ВД) на орган. Дозиметрию излучения человека для [<sup>11</sup>C]CPPC экстраполируют из данных биораспределения у мышей с применением программы SAAM II (Simulation Analysis and Modeling II) и OLINDA/EXM. Данные анализируют коммерчески (RADAR, Inc).

### *1.3.11 ПЭТ исследования бабуинов с [<sup>11</sup>C]CPPC*

Три 90-минутных динамических ПЭТ сканирования (первое: исходный уровень; второе: исходный уровень после обработки LPS; третье: обработка LPS плюс блокирование) проводят на самцах бабуинов (Papio Anubis; 25 кг) с применением High Resolution Research Tomograph (CPS Innovations, Inc.). Коротко, все ПЭТ сканирования проводят с в.в. инъекцией 444-703 МБк (12-19 мКи) [<sup>11</sup>C]CPPC [удельная радиоактивность: 1,096-1,184 ГБк/мкмоль (29,6-32,0 Ки/мкмоль)]. При LPS сканировании, бабуинам вводят в.в. инъекцией 0,05 мг/кг LPS за 4 ч до радиофармпрепарата. При LPS-плюс-блокирование сканировании, селективный CSF1R ингибитор CPPC (1 мг/кг) дают п.к. за 1,5 ч до радиофармпрепарата. Изменения уровня цитокина IL-6 в сыворотке отслеживают с применением ELISA (ФИГ. 14). Анализ данных ПЭТ и анализ радиометаболитов в артериальной крови бабуинов описан подробно ниже в настоящем документе.

### *1.3.12 Ауторадиография мозга человека, полученного при вскрытии*

Применение тканей человека одобрено Institutional Review Board of the Johns Hopkins Medical Institutions. Срезы нижней теменной коры (20 мкм) от трех человек, страдающих БА и одного здорового контроля (см. демографию в Таблице 5) на предметных стеклах применяют для *in vitro* ауторадиографии. Срезы с исходным уровнем исследуют с [<sup>11</sup>C]CPPC, а срезы с блокированием исследуют с [<sup>11</sup>C]CPPC плюс блокатор (CPPC, BLZ945, пексидартиниб или соединение **8**) для тестирования специфичности связывания с CSF1R. Срезы экспонируют на рентгеновскую пленку и анализируют с конечным результатом, выраженным как пмоль/мм<sup>3</sup> влажной ткани ± СО.

**Таблица 5. Демографические данные, связанные с тканью мозга человека, полученной при вскрытии, которую применяют в исследовании ауторадиографии.**

Образец	Диагноз	Шкала CERAD	Шкала Braak	Возраст	Пол	Раса	Время после смерти, ч
1-AD	Альцгеймер	с	6	88	F	белая	8
2-AD	Альцгеймер	с	6	58	F	белая	8,5
3-AD	Альцгеймер	с	6	61	м	белая	13,5
4-Ctrl	Здоровый контроль	н/д	н/д	48	F	черная	12

#### *1.4 Результаты*

##### *1.4.1 Химия*

Предшественник для мечения, Pre-CPPC, получают за четыре стадии с общим выходом 54% (ФИГ. 7) в мультимиллиграммах. Радиофармпрепарат [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC получают с откорректированным без распада радиохимически выходом  $21\pm 8\%$  ( $n=17$ ), радиохимической чистотой  $>95\%$  и удельной радиоактивностью в конце синтеза  $977\pm 451$  ГБк/мкмоль ( $26,4\pm 12,2$  Ки/мкмоль) (ФИГ. 9).

##### *1.4.2 Исследования биораспределения в областях мозга у контрольных мышей*

Поглощение [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC областями мозга в разные моменты времени после инъекции радиофармпрепарата показаны в таблицах 1 и 2. Значение пикового поглощения 150% СУП обнаружено в лобной доле через 5-15 мин после инъекции радиофармпрепарата. Между 30 и 60 мин, которые включают 45-минутный момент времени для нескольких исследований, описанных ниже, изменения в %СУП были стабильными.

##### *1.4.3 Оценка специфического связывания [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC у контрольных мышей*

###### *1.4.3.1 Исследование блокирования*

Блокирование поглощения [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC изначально проводят с повышающимися дозами не радиомеченого CPPC (0,6-20 мг/кг). Исследование показало отсутствие снижения %СУП поглощения радиофармпрепарата при низких дозах, и тенденцию к постепенному повышению поглощения при высоких дозах (ФИГ. 10). Когда поглощение в мозг корректируют на входную функцию крови в виде ССУП, однако, наблюдается значительное блокирующее действие при 20% снижении радиоактивности (ФИГ. 11).

###### *1.4.3.2 Сравнение нормальных контрольных мышей и мышей с обедненной микроглией.*

Исследование показало небольшое (14%), но значительное снижение поглощения радиофармпрепарата в мозге мышей с обедненной микроглией (ФИГ. 12А).

###### *1.4.3.3 Сравнение нормальных контрольных мышей и CSF1R KO мышей.*

Исследование демонстрирует сравнимое поглощение [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC в мозге (%СУП) в мозге КО мышей в сравнении с контрольными (ФИГ. 12В).

##### *1.4.4 Биораспределение [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC в моделях вызванного LPS нейровоспаления у*

### *мышей*

Эти исследования проводят на двух моделях вызванного LPS нейровоспаления у мышей: внутричерепной LPS (в.ч.-LPS) (Dobos N, et al. (2012)) и в.б. LPS (в.б.-LPS) (Qin L, et al. (2007); Catorce MN и Gevorkian G (2016)). Сначала проверяют индукцию CSF1R экспрессии в мозге в.б.-LPS мышей, и находят двухкратное повышение Csf1r мРНК и шестикратное повышение белка с применением кРВ-ПЦР и вестерн-блоттинга, соответственно (ФИГ. 14).

#### *1.4.4.1 в.ч.-LPS мыши*

Проводят два независимых эксперимента (ФИГ. 1). В обоих экспериментах повышение %СУП у LPS мышей в сравнении с плацебо мышами было значительным, и оно было выше в ипсилатеральной полусфере, чем в контрлатеральной полусфере. Наибольшее увеличение наблюдают в ипсилатеральном фронтальном квадранте (53%), где вводят LPS (ФИГ. 1В). Блокада [<sup>11</sup>C]СРРС не радиомеченным СРРС была дозозависимой. Снижение поглощения в первом эксперименте было незначительным при применении низкой дозы блокатора (0,3 мг/кг) (ФИГ. 1А). Более высокие дозы блокатора (0,6 или 1,2 мг/кг) значительно снижают поглощение [<sup>11</sup>C]СРРС у обработанных LPS животных (ФИГ. 1В).

#### *1.4.4.2 в.б.-LPS мыши*

Проводят три независимых эксперимента. В первом эксперименте в.б.-LPS мыши, [<sup>11</sup>C]СРРС показали повышенный %СУП поглощения в мозге (55%) в сравнении с контрольными животными, но блокирование не радиомеченным СРРС не вызвало значительного снижения %СУП радиоактивности у LPS животных (ФИГ. 2А). Во втором и третьем экспериментах, %СУП поглощения корректируют на радиоактивность крови как ССУП (ФИГ. 2В и ФИГ. 2С). ССУП поглощение было значительно больше у в.б.-LPS мышей в сравнении с контрольными. Блокирование двумя разными ингибиторами CSF1R, СРРС (ФИГ. 2В) и соединением **8** (ФИГ. 2С), значительно снижает поглощение до контрольного уровня. Концентрация радиоактивности в крови изменяется в в.б.-LPS исходных (14% снижение) и в.б.-LPS блокирующих экспериментах (39% повышение) в сравнении с контролями.

### *1.4.5 Распределение [<sup>11</sup>C]СРРС в областях мозга в модели БА у трансгенных мышей*

Поглощение [<sup>11</sup>C]СРРС было значительно выше во всех областях мозга мышей с БА при наибольшем повышении (31%) в коре головного мозга (ФИГ. 3).

#### *1.4.6 Дозиметрия радиации всего тела у мышей*

Большая часть органов получили 0,002-0,006 мЗв/МБк [0,007-0,011 биологического эквивалента рентгена (Бэр)/мКи]. Тонкий кишечник получил наивысшую дозу 0,047 мЗв/МБк (0,17 Бэр/мКи). Эффективная доза составляла 0,0048 мЗв/МБк (0,018 Бэр/мКи) (Таблица 3).

#### *1.4.7 [<sup>11</sup>C]СРРС ПЭТ/СТ в модели ЭАЭ рассеянного склероза у мышей*

Трем мышам, представляющим спектр тяжести ЭАЭ (баллы ЭАЭ 0,5, 2,5 и 4,5) и

одной здоровой мыши, не получающей антиген или адъювант, вводят инъекцию [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС и динамически сканируют с применением ПЭТ/КТ (ФИГ. 4). Изображения проекций максимальной интенсивности (ПМИ) и сагиттальные срезы каждой мыши (ФИГ. 4А) показывают интенсивность поглощения радиофармпрепарата, которая коррелирует с тяжестью заболевания с наибольшим повышением (99%) в стволе головного мозга (ФИГ. 4В), в то время как поглощение мышцами было сравнимо у всех мышей. Необработанные изображения без определения пороговых значений для гардеровой и слюнной желез показаны на ФИГ. 13.

#### *1.4.8 ПЭТ у бабуинов*

Сравнение динамических сканов ПЭТ [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС у одних и тех же бабуинов в исходном, LPS и LPS-плюс-блок экспериментах продемонстрировало повышение параметрического объема распределения ( $V_T$ ) после обработки LPS, и снижение до исходного уровня  $V_T$  после обработки LPS-плюс-блок (ФИГ. 5 и ФИГ. 15). Уровни IL-6 в сыворотке значительно повышаются после введения LPS, что позволяет предположить успешное индуцирование острого воспаления (ФИГ. 16).

Динамическая [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС ПЭТ исходная визуализация у бабуинов показала поглощение радиоактивности в мозге с пиковым СУП 2,5-4,0 через 20 мин после инъекции, с последующим постепенным снижением (ФИГ. 5В).  $V_T$  областей был умеренно гетерогенным, наивысшим в скорлупе, хвостом ядре, таламусе и островке; промежуточным в лобной доле; и наименьшим в мозжечке, гипоталамусе и затылочной коре (ФИГ. 5А и ФИГ. 15).

Сравнение ПЭТ бабуинов исходного уровня с LPS с LPS-плюс-блокировка показало незначительную разницу СУП в мозге. Однако скорость вымывания в скане исходного уровня была выше, чем в скане LPS (ФИГ. 5С).

Радиометаболитный анализ образцов крови бабуинов показал, что [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС метаболизировался на два метаболита (71-76% всего метаболитов) через 90 мин после инъекции (ФИГ. 17). Эти гидрофильные метаболиты проникают в мозг минимально, что продемонстрировали эксперименты на мышях. Анализ ВЭЖХ показал, что, по меньшей мере, 95% радиоактивности в мозге мыши составлял исходный [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС (таблица 4).

Скорректированная на метаболиты [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС радиоактивность в плазме бабуинов значительно снижалась (~50%) у обработанных LPS в сравнении с исходным уровнем, и восстанавливалась до исходных уровней в эксперименте LPS-плюс-блокирование (ФИГ. 5D). Математическое моделирование с применением компартментного анализа и анализа Логана (ФИГ. 18) продемонстрировало значительное повышение (90-120%) параметрических значений  $V_T$  у обработанных LPS бабуинов ( $V_T=35-52$ ) в сравнении с исходным уровнем ( $V_T=15-25$ ), с возвращением к исходному уровню в исследовании LPS-плюс-блокирование (ФИГ. 5 и ФИГ. 15), в то время как значение  $K_1$  изменилось незначительно (ФИГ. 19). Повышение связывания радиофармпрепарата в мозге обработанных LPS бабуинов было CSF1R-специфическим, что показано на скане блокирования.

#### 1.4.9 Ауторадиография [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC в мозге человека, полученном при вскрытии

Сравнение ауторадиографии исходного уровня [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC в срезах мозга при БА в сравнении с контрольными (ФИГ. 6 и таблица 6) показало повышение (75-99%) связывания радиофармпрепарата в мозге при БА. Специфичность связывания тестировали через сравнение исходного связывания со связыванием в экспериментах с блокированием с применением четырех разных ингибиторов CSF1R. Соотношение исходный уровень/блокирование в мозге при БА составляло 1,7-2,7 (блокатор: CPPC), в то время как в контрольном мозге соотношение составляло 1,4 (ФИГ. 6 и таблица 6). Когда другие блокаторы CSF1R (соединение 8, BLZ945 и PLX3397) применяют в одних и тех же мозгах при БА, соотношения исходный уровень/блокирование составляли  $2,0 \pm 0,23$ ,  $1,79 \pm 0,88$  и  $1,25 \pm 0,25$ , соответственно (ФИГ. 20).

**Таблица 6. Ауторадиография связывания (пмоль/мм<sup>3</sup>) [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC в срезах мозга человека с БА и контрольных, взятых при вскрытии (см. также ФИГ. 13)**

Образец	1-AD	2-AD	3-AD	4-контроль
Исходный уровень	$8,18 \pm 0,68$	$7,20 \pm 1,55$	$7,43 \pm 1,59$	$4,11 \pm 1,14$
Блокирование немеченым CPPC	$4,72 \pm 1,07$	$2,67 \pm 0,53$	$3,73 \pm 1,07$	$2,86 \pm 1,06$

#### 1.5 Обсуждение

Раскрытый в данном случае объект представляет ПЭТ радиофармпрепарат, специфический к CSF1R *in vitro* в ткани мозга человека и *in vivo* в моделях нейровоспаления на приматах, отличных от человека, и мышах. Хотя исследователи [см. Tronel C, et al. (2017); Janssen B, et al. (2018)] работали над разработкой и внедрением ПЭТ биомаркеров для нейровоспаления, ни один из них не оказался селективным к микроглии, резидентным иммунным клеткам в мозге, до [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC.

Везущий ингибитор CSF1R для разработки [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC был выбран из литературы (Illig CR, et al. (2008)). Оригинальный, не радиомеченный CPPC демонстрирует высокую эффективность ингибирования CSF1R [ $\text{IC}_{50}=0,8$  нМ (Illig CR, et al. (2008))] и подходящие физические свойства для ПЭТ мозга, включая оптимальную липофильность с расчетным коэффициентом распределения ( $\text{clogD}_{7,4}$ ) 1,6 и молекулярной массой 393 Да, которые предвещают прохождение гематоэнцефалического барьера. [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC получают с подходящим радиохимическим выходом с высокой чистотой и специфической радиоактивностью (ФИГ. 9).

##### 1.5.1 Исследования биораспределения и специфического связывания [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC у контрольных мышей

Поглощение [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC в мозге у контрольных мышей было устойчивым, с пиком 150% СУП или 6,4% ID/г ткани в лобной доле, с последующим снижением (таблица 2). Распределение в областях мозга было умеренно гетерогенным, с наибольшим поглощением радиоактивности в лобной доле, что согласуется с анализом экспрессии CSF1R в мозге нормальной мыши (Nandi S, et al. (2012)). Среди исследованных здесь областей мозга, ствол головного мозга и мозжечок показали наименьшее поглощение

[<sup>11</sup>C]CPPC.

Специфичность связывания CSF1R для [<sup>11</sup>C]CPPC в мозге нормальной мыши оценивали с применением трех подходов: сравнение исходных контролей с (i) блокированием, (ii) мышами с обедненной микроглией и (iii) CSF1R KO мышами. Исходный анализ блокирования с повышением дозы в мозге нормальной мыши не показал значительное снижение %СУП (ФИГ. 9 и ФИГ. 10А). Однако когда %СУП корректируют на радиоактивность в крови как ССУП, наблюдают умеренное, но значимое снижение (20%) (ФИГ. 10В), демонстрируя, что [<sup>11</sup>C]CPPC специфически метит CSF1R в мозге нормальной мыши. Эта концентрация [<sup>11</sup>C]CPPC в крови была выше в исследованиях с блокированием, что также заслуживает внимания.

Постоянная обработка мышей ингибитором CSF1R PLX3397 (пексидартинибом) эффективно обедняет микроглию (90%) и снижает CSF1R в мозге животного (Elmore MR, et al. (2014)). Поглощение [<sup>11</sup>C]CPPC в мозге у мышей с обедненной микроглией было ниже (14%), чем у контролей (ФИГ. 12А). Такое пониженное поглощение может быть из-за комбинации двух эффектов, а именно, обеднения микроглии и блокирующего действия самого PLX3397. Наконец, сравнение поглощения [<sup>11</sup>C]CPPC у контрольных и CSF1R KO мышей показало сравнимое поглощение радиофармпрепарата у контрольных и КО мышей (ФИГ. 12В). Хотя обедненная (PLX3397) или отсутствующая (КО) CSF1R мишень показывает, что поглощение CSF1R-специфического радиофармацевтического препарата в мозге должно быть от незначительного до отсутствующего, имеется только умеренная экспрессия CSF1R в мозге здоровых грызунов (Nandi S, et al. (2012); Michaelson MD, et al. (1996); и Lee SC, et al. (1993)), что требует внимания к соответствующим животным моделям, где CSF1R будет присутствовать в более высоких количествах.

#### *1.6.2 Оценка [<sup>11</sup>C]CPPC в моделях вызванного LPS нейровоспаления у мышей*

Стимулирование LPS является общей моделью нейровоспаления (Qin L, et al. (2007); Catorce MN and Gevorkian G (2016)). Вызванное LPS нейровоспаление применяют для тестирования разных ПЭТ радиофармпрепаратов на грызунах, приматах, отличных от человека, и даже человеку [см. Tronel C, et al. (2017)]. Отчеты, описывающие экспрессию CSF1R в моделях LPS нейровоспаления не доступны. Уровни CSF1R в мозге в.б.-LPS мышей в сравнении с контрольными мышами сравнивают с применением кРВ-ПЦР и вестерн-блоттинга, и обнаруживают значительное повышение экспрессии Csf1r мРНК и CSF1R белка (ФИГ. 14). В этом исследовании применяют две мышинные модели вызванного LPS нейровоспаления, в.ч.-LPS (Dobos N, et al. (2012); Aid S, et al. (2010) и в.б.-LPS (Qin L, et al. (2007), Catorce MN and Gevorkian G (2016)). Даже если стереотактическая хирургия может повредить гематоэнцефалический барьер у в.ч.-LPS животных, эта модель, которая дает локализованное нейровоспаление, изначально кажется более привлекательной, чем в.б.-LPS модель с диффузным нейровоспалением. Однако дополнительные исследования с [<sup>11</sup>C]CPPC показали сравнимые результаты для обеих моделей.

Эксперименты связывания [<sup>11</sup>C]CPPC продемонстрировали значительное

повышение (вплоть до 53%) поглощения у в.ч.-LPS мышей (ФИГ. 1). Повышенное связывание имело ~50% специфичность в сравнении с плацебо животными и опосредованными через CSF1R, что продемонстрировано в экспериментах с повышением дозы блокирования (ФИГ. 1). У в.б.-LPS мышей, связывание [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC также было значительно выше (вплоть до 55-59%) в сравнении с контрольными животными (ФИГ. 2). Связывание [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC всего мозга у в.б.-LPS мышей было более чем на 50% специфическим и опосредованным через CSF1R, что продемонстрировано в экспериментах блокирования с применением двух разных ингибиторов CSF1R, CPPC (ФИГ. 2B) и соединения **8** (ФИГ. 2C). У в.б.-LPS животных, концентрация радиоактивности в крови резко изменялась, что потребовало коррекции %СУП для входной функции крови как ССУП (ФИГ. 2B и ФИГ. 2C). Изменения радиоактивности крови могут быть объяснены неизбежными системными изменениями уровней CSF1R у в.б.-LPS мышей. Исследования [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC моделях внутричерепного и в.б. LPS показали сравнимые результаты, демонстрирующие, что радиофармпрепарат специфически метит CSF1R в обеих моделях. Связывающую способность *ex vivo* ( $\text{BP}_{\text{ex vivo}}=0,53-0,62$ ) [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC у LPS мышей оценивают как поглощение LPS - поглощение плацебо/поглощение плацебо поглощение LPS - поглощение плацебо/поглощение плацебо. Предыдущее исследование обработанных LPS крыс с TSPO радиофармпрепаратом [ $^{11}\text{C}$ ]PK11195 лазо сравнимое значение BP, равное 0,47 (Dickens AM, et al. (2014)).

### *1.5.3 Визуализация [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC ЭАЭ мышей*

ПЭТ/КТ визуализация в модели C57BL/6 MOG<sub>35-55</sub> ЭАЭ показала что интенсивность сигнала ПЭТ была пропорциональна баллам заболевания (ФИГ. 4) и в большей степени концентрировалась в стволе головного мозга, мозжечке и шейном отделе позвоночника, в соответствии с распределением демиелинирования по областям в модели ЭАЭ. Поглощение [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC в стволе головного мозга было вплоть до двух раз выше у мышей с ЭАЭ в сравнении с контрольными животными.

### *1.5.4 Дозиметрия радиации всего тела у мышей*

Дозиметрию проводят для будущей трансляции [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC на людей. Исследование на мышах продемонстрировало, что предложенная доза 740 МБк (20 мКи) [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC, введенная человеку, даст дозовую нагрузку ниже текущего предела Food and Drug Administration (5 Бэр; (5. Federal Register §361,1 (2018)), но актуальное исследование на людях должно подтвердить эту оценку.

### *1.5.5 ПЭТ-визуализация у бабуинов*

Системное введение LPS бабуинам вызывает активацию микроглии (Hannestad J, et al. (2012)). В этом докладе, свойства связывания [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC тестируют на контрольных бабуинах и на тех же бабуинах, которым ввели инъекцией низкую дозу LPS (0,05 мг/кг, в.в.). Более чем двухкратное повышение значения объема распределения ( $V_T$ ) наблюдают во всех областях мозга животных, обработанных LPS (ФИГ. 5 и ФИГ. 15). Повышение параметрического  $V_T$  у LPS-бабуинов полностью блокировали инъекцией не радиомеченного CPPC (ФИГ. 5A и ФИГ. 15). Параметрическое моделирование этих

изображений является существенным, так как инъекция LPS и блокатора вызывает изменения во входной функции крови (ФИГ. 5D), наиболее вероятно из-за изменений CSF1R на периферии. Параметрическое моделирование не требует включения радиометаболитов мозга, так как ВЭЖХ анализ показал в основном неизменный исходный [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC в мозге животного (>95%).

ПЭТ сканы [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC показали, что связывание радиофармпрепарата в мозге бабуинов, обработанных LPS, были специфическим и опосредованным CSF1R, что делает этот агент подходящим для визуализации нейровоспаления у приматов, отличных от человека. Повышение  $V_T$  [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC (85-120%) у бабуинов, обработанных LPS (0,05 мг/кг), было, по меньшей мере, таким же или выше, чем для TSP0 радиофармпрепарата [ $^{11}\text{C}$ ]PBR28 (интервал, 35,6-100,7%) в ответ на большую дозу LPS (0,1 мг/кг), как показано в предыдущем отчете (Hannestad J, et al. (2012)). Следовательно, [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC может обеспечивать инновационный инструмент с высокой чувствительностью для количественной визуализации активированной микроглии при нейровоспалении.

#### *1.5.6 Связывание [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC в мозге при БА*

Существует иммунный компонент БА, в частности, вовлекающий врожденную иммунную систему, который отличается от “типовых” нейровоспалительных заболеваний, таких как рассеянный склероз или некоторые модели, описанные выше (Heppner FL, et al. (2015)). Предыдущие исследования предоставляют доказательство активации CSF1R в мозгах людей, страдающих БА (Akiyama H, et al. (1994); Walker DG, et al. (2017); Lue LF, et al. (2001)) и в моделях БА у трансгенных мышей (Murphy GM Jr, et al., (2000); Yan SD, et al. (1997); и Boissonneault V, et al. (2009)). Связывание [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC тестировали на мозге трансгенных мышей с БА и на ткани мозга человека с АД, взятой при вскрытии. В соответствии с предыдущими данными (Murphy GM Jr, et al., (2000); Yan SD, et al. (1997); и Boissonneault V, et al. (2009)), *ex vivo* поглощение [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC в мозге трансгенных мышей с БА было значительно выше (вплоть до 31%), чем у контрольных животных (ФИГ. 3).

Ауторадиография человека при вскрытии показала, что [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC специфически метит CSF1R в мозге при AD (соотношение исходного уровня/самоблокирования вплоть до 2,7) (ФИГ. 6 и таблица 6). В отдельном эксперименте, ингибиторы CSF1R, структурно отличные от CPPC [соединение **8**,  $IC_{50}=0,8$  нМ (Pillig CR, et al. (2008)); BLZ945,  $IC_{50}=1,2$  нМ (Krauser JA, et al. (2015)); и PLX3397,  $IC_{50}=20$  нМ (DeNardo DG, et al. (2011))], блокируют связывание [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC в той же БА ткани (ФИГ. 20), подтверждая, что связывание было CSF1R-специфическим (ФИГ. 6, ФИГ. 20 и таблица 6). Соотношение исходный уровень/блокирование для более эффективных ингибиторов CSF1R, а именно, соединения **8** и BLZ945, было вплоть до двух раз выше, чем для менее эффективного PLX3397. Эти открытия могут быть распространены на визуализацию других нейродегенеративных расстройств или состояний с врожденным иммунным компонентом, таких как амиотрофический боковой склероз, старение или болезнь Паркинсона (Deczkowska A, et al. (2018)), которые вовлекают DAM. [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC также может

обеспечить косвенное считывание визуализации для подачи сигналов TREM2 (Deczkowska A, et al. (2018); Hickman SE and El Khoury J (2014)), которые не были визуализированы *in vivo*.

### 1.6 Резюме

Раскрытый в данном случае объект представляет, частично, [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC, ПЭТ радиофармпрепарат для визуализации CSF1R при нейровоспалении. Специфическое связывание радиофармпрепарата повышается в моделях вызванного LPS нейровоспаления у мышей (вплоть до 59%) и бабуинов (вплоть до 120%), мышинных моделях БА (31%) и рассеянном склерозе (вплоть до 100%) и в ткани мозга человека с БА, взятой при вскрытии (соотношение исходный уровень/блок 2,7). Дозиметрия излучения у мышей демонстрирует, что [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC является безопасным для исследований на людях. Радиометаболиты [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC минимально проникают в мозг животного, показывая, что их включение в анализ изображения не требуется. [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC готов для клинического перевода для исследования CSF1R во множестве клинических сценариев.

### 1.7 Дополнительные материалы и способы

#### 1.7.1 Ингибиторы CSF1R

BLZ945 (Krauser JA, et al. (2015)) покупают у AstaTech (Bristol, PA), пексидартиниб (PLX3397) (DeNardo DG, et al. (2011)) у eNovation Chemicals (Bridgewater, NJ) и соединение **8** получают своими силами как описано ранее (Illig CR, et al. (2008)).

#### 1.7.2 Химия

$^1\text{H}$  ЯМР спектр записывают на ЯМР спектрометре Bruker-500 при номинальных резонансных частотах 500 МГц в  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  или  $\text{DMCO-d}_6$  (ссылаясь на внутренний  $\text{Me}_4\text{Si}$  при  $\delta$  0 ч./млн.). Масс спектр высокого разрешения записывают коммерчески с применением ионизации электрораспылением (ИЭР) на оборудовании для масс-спектрометрии University of Notre Dame.

**Синтез 5-Циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2- карбоксиамида (CPPC)** проводят как описано в других источниках (Illig CR, et al. (2008)).

**1-(5-Хлор-2-нитрофенил)пиперидин:** К охлажденному ( $0^\circ\text{C}$ ) раствору 1,0 г (10,0 ммоль) 4-хлор-2-фторнитробензола в 15 мл EtOH добавляют 1,7 мл (30,0 ммоль) пиперидина по каплям в течение 5 мин. Раствор перемешивают при  $0^\circ\text{C}$  в течение 10 мин и затем при  $23^\circ\text{C}$  в течение 30 мин. Смесь выливают в воду (225 мл) и экстрагируют EtOAc ( $2 \times 30$  мл). Объединенные экстракты промывают насыщенным водн.  $\text{NaHCO}_3$  и насыщенным раствором соли (30 мл каждого) и затем сушат над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и выпаривают с получением неочищенного соединения. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем (Гексан:EtOAc=9,5:0,5) с получением 1-(5-хлор-2-нитрофенил)пиперидина в виде желтого твердого вещества (1,32 г, 96% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,77 (д,  $J=5,0$  Гц, 1H), 7,13 (с, 1H), 6,93 (д,  $J=10,0$  Гц, 1H), 3,30-3,27 (м, 2H), 2,91-2,86 (м, 2H), 1,90-1,86 (м, 1H), 1,75-1,73 (м, 2H), 1,49-1,42 (м, 1H).

**1-Метил-4-(4-нитро-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазин:** Смесь 1-(5-хлор-2-

нитрофенил)пиперидина (1,0 г, 4,15 ммоль) и 1-метилпиперазина (1,38 мл, 12,46 ммоль) нагревают при перемешивании под  $N_2$  при  $138^\circ C$  в течение 12 ч. После охлаждения до кт, смесь выливают в воду и экстрагируют этилацетатом ( $2 \times 100$  мл). Объединенные экстракты промывают водой и насыщенным раствором соли и затем сушат над  $Na_2SO_4$  и выпаривают с получением неочищенного соединения. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем ( $CH_2Cl_2:MeOH=9:1$ ) с получением 1-метил-4-(4-нитро-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазина в виде желтого твердого вещества (1,2 г, 96% выход).  $^1H$  ЯМР (500 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7,62 (д,  $J=5,0$  Гц, 1H), 6,80 (с, 1H), 6,43 (д,  $J=10,0$  Гц, 1H), 3,84 (т,  $J=5,0$  Гц, 4H), 3,71 (т,  $J=5,0$  Гц, 2H), 3,60 (т,  $J=5,0$  Гц, 4H), 3,50 (д,  $J=10,0$  Гц, 2H), 3,80 (д,  $J=5,0$  Гц, 2H), 1,55-1,51 (м, 3H).

**4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)анилин:** К смеси 1-метил-4-(4-нитро-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазина (1,2 г, 3,94 ммоль) и  $NH_4Cl$  (2,10 г, 39,4 ммоль) в ТГФ/MeOH/ $H_2O$  (10:5:3) (20 мл), добавляют Zn порошок (2,57 г, 39,4 ммоль) при  $90^\circ C$ , затем смесь кипятят с обратным холодильником в течение 1 ч. После завершения реакции, реакционную смесь фильтруют через Целит и разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным  $MgSO_4$ , фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем ( $CH_2Cl_2:MeOH=9:1$ ) с получением 4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)анилина в виде коричневого твердого вещества (0,98 г, 90,7% выход).

**5-Циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамид (СРРС):** К смеси 4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)анилина (0,5 г, 1,82 ммоль), 5-цианофуран-2-карбоновой кислоты (0,3 г, 2,18 ммоль), ГАТУ (0,83 г, 2,18 ммоль) в ДМФ (10 мл) добавляют ДИПЭА (0,63 мл, 3,64 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и затем разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным  $MgSO_4$ , фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем ( $CH_2Cl_2:MeOH=9:1$ ) с получением 5-циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамид в виде желтого твердого вещества (0,6 г, 84,5% выход).  $^1H$  ЯМР (500 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  9,53 (с, 1H), 8,31 (д,  $J=8,7$  Гц, 1H), 7,23 (д,  $J=16,6$  Гц, 2H), 6,80 (с, 1H), 6,72 (д,  $J=8,8$  Гц, 1H), 3,20 (с, 4H), 2,85 (с, 4H), 2,59 (с, 4H), 2,36 (с, 3H), 1,80 (с, 4H), 1,65 (с, 2H). МСВР рассчитано для  $C_{22}H_{28}N_5O_2$  ( $[M+H]$ ) 394,223752, найдено 394,223065.

**Синтез 5-Циано-N-(4-(пиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамид (пре-СРРС)**

На ФИГ. 8 изображен синтез 5-циано-N-(4-(пиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамид (Пре-СРРС):

**Стадия а. Трет-бутил 4-(4-нитро-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилат:** К смеси 1-(5-хлор-2-нитрофенил)пиперидина (1,0 г, 4,15 ммоль) и трет-бутил пиперазин-1-карбоксилата (1,55 г, 8,30 ммоль), в ДМСО (10 мл) добавляют  $K_2CO_3$  (1,72 г, 12,45 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при  $110^\circ C$  в течение 12 ч и затем

разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным MgSO<sub>4</sub>, фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем (Гексан:EtOAc=3:7) с получением трет-бутил 4-(4-нитро-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата в виде белого твердого вещества (1,40 г, 86,4% выход). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,99 (д, J=10,0 Гц, 1H), 6,38 (д, J=10,0 Гц, 1H), 6,31 (с, 1H), 3,58 (т, J=5,0 Гц, 4H), 3,34 (т, J=5,0 Гц, 4H), 2,28 (т, J=5,0 Гц, 2H), 2,78 (д, J=10,0 Гц, 2H), 1,70 (д, J=5,0 Гц, 2H), 1,55-1,51 (м, 3H), 1,47 (с, 9H).

**Стадия в. Трет-бутил 4-(4-амино-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилат:** К смеси трет-бутил 4-(4-нитро-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата (1,20 г, 3,07 ммоль) и NH<sub>4</sub>Cl (1,64 г, 30,7 ммоль) в ТГФ/MeOH/H<sub>2</sub>O (10:5:3) (20 мл), добавляют Zn порошок (2,0 г, 30,7 ммоль) при 90°C, затем смесь кипятят с обратным холодильником в течение 1 ч. После завершения реакции, реакцию смесь фильтруют через Целит и разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным MgSO<sub>4</sub>, фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=9:1) с получением трет-бутил 4-(4-амино-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата в виде коричневого твердого вещества (1,0 г, 90,3% выход).

**Стадия с. Трет-бутил 4-(4-(5-цианофуран-2-карбоксамидо)-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилат:** К смеси трет-бутил 4-(4-амино-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата (0,5 г, 1,38 ммоль), 5-цианофуран-2-карбоновой кислоты (0,23 г, 1,66 ммоль), ГАТУ (0,63 г, 1,66 ммоль) в ДМФ (10 мл) добавляют ДИПЭА (0,48 мл, 2,76 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и затем разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным MgSO<sub>4</sub>, фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=9:1) с получением трет-бутил 4-(4-(5-цианофуран-2-карбоксамидо)-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата в виде желтого твердого вещества (0,60 г, 90,9% выход). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,59 (с, 1H), 8,31 (д, J=5,0 Гц, 1H), 7,25 (д, J=5,0 Гц, 1H), 7,21 (д, J=5,0 Гц, 1H), 6,79 (с, 1H), 6,72 (д, J=5,0 Гц, 1H), 3,58 (т, J=5,0 Гц, 4H), 3,10 (т, J=5,0 Гц, 4H), 2,99 (т, J=5,0 Гц, 2H), 2,72 (т, J=10,0 Гц, 2H), 1,83 (д, J=10,0 Гц, 2H), 1,55-1,51 (м, 3H), 1,49 (с, 9H).

**Стадия d. 5-Циано-N-(4-(пиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамид (Пре-СРРС):** К раствору трет-бутил 4-(4-(5-цианофуран-2-карбоксамидо)-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата (0,5 г, 1,04 ммоль) в метиленхлориде (5 мл) добавляют трифторуксусную кислоту (0,39 мл, 5,21 ммоль) по каплям при 0°C и затем смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 12 ч. После завершения реакции, реакцию смесь концентрируют при пониженном давлении. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=9:1) с

получением 5-циано-N-(4-(пиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамид в виде бледно-желтого твердого вещества (0,3 г, 76,0% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,60 (с, 1H), 8,31 (д,  $J=5,0$  Гц, 1H), 7,25 (д,  $J=5,0$  Гц, 1H), 7,21 (д,  $J=5,0$  Гц, 1H), 6,79 (с, 1H), 6,72 (д,  $J=5,0$  Гц, 1H), 3,15 (т,  $J=5,0$  Гц, 4H), 3,08 (т,  $J=5,0$  Гц, 4H), 2,99 (т,  $J=5,0$  Гц, 2H), 2,73 (т,  $J=10,0$  Гц, 2H), 1,84 (д,  $J=10,0$  Гц, 2H), 1,57 (с, 1H), 1,55-1,51 (м, 3H); МСВР рассчитано для  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_2$  ( $[\text{M}+\text{H}]$ ) 380,208102, найдено 380,207980.

На ФИГ. 9 представлен радиосинтез  $^{11}\text{C}$ СРРС:

В 1 мл V-флаконе, Пре-СРРС (1 мг) добавляют к 0,2 мл безводного ДМФ.  $^{11}\text{C}$ Метилйодид, переносимый потоком гелия, улавливают в вышеупомянутый раствор. Реакционную смесь нагревают при  $80^\circ\text{C}$  в течение 3,5 мин, затем гасят 0,2 мл воды. Неочищенный продукт реакции очищают высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) с обращенной фазой со скоростью потока 12 мл/мин. Радиомеченный продукт ( $t_R=6,5-7,2$  мин) затем полностью отделяют от предшественника ( $t_R=2,5$  мин) удаленно собирают в раствор 0,3 г аскорбата натрия в смеси 50 мл воды с 1 мл 8,4% водн.  $\text{NaHCO}_3$ . Водный раствор переносят через активированный световой картридж Waters Oasis Sep-Pak (Milford, MA). После промывания картриджа 10 мл солевого раствора, продукт элюируют 1 мл этанола через 0,2 мкм стерильный фильтр в стерильный апиrogenный флакон и добавляют 10 мл 0,9% солевого раствора через тот же фильтр. Конечный продукт,  $^{11}\text{C}$ СРРС, анализируют аналитической ВЭЖХ для определения радиохимической чистоты и удельной радиоактивности.

### 1.7.3 Условия ВЭЖХ

Препаративная: колонка, XBridge C18,  $10 \times 250$  мм (Waters, Milford, MA). Подвижная фаза: 45%:55% ацетонитрил:триэтиламин-фосфатный буфер, pH 7,2. Скорость потока: 12 мл/мин, время удержания 7 мин. Аналитическая: колонка, Luna C18, 10 микрон,  $4,6 \times 250$  мм (Phenomenex, Torrance, CA). Подвижная фаза: 60%:40% ацетонитрил:0,1М водн. формиат аммония. Скорость потока: 3 мл/мин, время удержания 3,5 мин.

### 1.8.4 Исследования биораспределения и ПЭТ-визуализации с $^{11}\text{C}$ СРРС у мышей

<b>Таблица 1. Итоги <math>^{11}\text{C}</math>СРРС биораспределения и других исследований на мышах</b>				
	<b>Исследование</b>	<b>Мыши (количество животных)</b>	<b>Блокатор (дозы)</b>	<b>Чертеж или таблица</b>
	Контроль, исходный уровень	C57BL/6J (3 на момент времени; всего: 12)	-	Таблица 2
	Контроль, исходный уровень - увеличение дозы	CD1 (5 на дозу; всего: 30)	СРРС (0-20 мг/кг, ВБ)	Фиг. 10
	Контроль, исходный уровень в сравнении с	CD1 (3 на группу; всего: 9)	СРРС (0, 0,6 или 0,3	Фиг. 11

<b>Таблица 1. Итоги [<sup>11</sup>C]СРРС биораспределения и других исследований на мышах</b>			
блокированием, без крови (фиг. S5FA) и с коррекцией крови (фиг. S5B)		мг/кг, ВБ)	
Контроль в сравнении с обедненной микроглией	C57BL/6J (3 на группу; всего: 10)	PLX3397 (290 мг/кг корм)	Фиг. 12А
Контроль в сравнении с CSF 1R-KO	Контроль - C57BL/6J (5), CSF 1R-KO - B6.Cg-Csf1 <sup>rtm1,2Jwp</sup> /J (5) всего: 10	-	Фиг. 12В
Контроль в сравнении с LPS (внутричерепно) Эксперимент 1	Исходный уровень плацебо - CD1 (3) Исходный уровень LPS - CD1 (3) Блок LPS - CD1 (3) Всего: 9	СРРС (0,3 мг/кг, ВБ)	Фиг. 1А
Контроль в сравнении с LPS (внутричерепно) Эксперимент 2	Плацебо - CD1 (4) Исходный уровень LPS - CD1 (4) Блок-1 LPS - CD1 (4) Блок-2 LPS - CD1 (4) Всего: 16	Блок-1: СРРС (0,6 мг/кг, ВБ) Блок-2: СРРС (1,2 мг/кг, ВБ)	Фиг. 1В
Контроль в сравнении с LPS (ВБ) Эксперимент 1	Контроль - CD1 (5) Исходный уровень LPS мыши ВБ - CD1 (5) Блокирование LPS мыши ВБ - CD1 (5) Всего: 15	СРРС (1 мг/кг, ВБ)	Фиг. 2А
Контроль в сравнении с LPS (ВБ) Эксперимент 2	Контроль - CD1 (5) Исходный уровень LPS мыши ВБ - CD1 (5) Блокирование LPS мыши ВБ - CD1 (5)	СРРС (1 мг/кг, ВБ)	Фиг. 2В

<b>Таблица 1. Итоги [<math>^{11}\text{C}</math>]СРРС биораспределения и других исследований на мышах</b>				
		Всего: 15		
Контроль в сравнении с LPS (ВБ) Эксперимент 3	Контроль - CD1 (3) Исходный уровень LPS мыши ВБ - CD1 (6) Блок LPS мыши ВБ - CD1 (6) Всего: 15	Соединение 8 (2 мг/кг, ВБ)	Фиг. 2С	
Контроль в сравнении с моделью Альцгеймера у мышей	Контроль - (6) Трансгенные APP - (6) Всего мышей: 12	-	Фиг. 3	
Дозиметрия излучения всего тела	CD1 (3 на момент времени) Всего: 15	-	Таблица 3	
ПЭТ/КТ, мыши ЭАЭ	Мыши ЭАЭ (3) Контроль (1) Всего: 4	-	Фиг. 4, Фиг. 13	
Радиометаболиты в плазме и мозге мышей	CD1 (3 на момент времени) Всего: 6	-	Таблица 4	
ПЦР и вестерн-блоттинг мозга LPS мышей	Контроль - CD1 (6) В.б. обработка LPS - CD1 (6) Всего: 12	-	Фиг.14	

#### *1.7.5 Распределение [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС в областях мозга у нормальных контрольных мышей, исходный уровень*

Применяют самцов мышей C57BL/6J в возрасте от четырех до восьми недель, весящих 22-24 г от Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Животных умерщвляют смещением шейных позвонков через 5, 15, 30 и 60 мин (3 мыши на момент времени) после инъекции 5,6 МБк (0,15 мКи) [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС [удельная радиоактивность=462 ГБк/мкмоль (12,5 Ки/мкмоль)] в 0,2 мл солевого раствора в боковую хвостовую вену. Мозги вынимают и иссекают на льду. Области мозга (мозжечок, обонятельные луковицы, гиппокамп, лобную долю, ствол головного мозга и остаток мозга) взвешивают и их радиоактивность определяют на  $\gamma$ -счетчике LKB/Wallac 1283 CompuGamma CS (Bridgeport, CT). Рассчитывают стандартизированного уровня поглощения (%СУП) (Таблица 2).

#### **Таблица 2. Распределение [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС в областях мозга у контрольных мышей после инъекции радиофармпрепарата: СУП $\pm$ СО (n=3)**

	5 мин	15 мин	30 мин	60 мин

Мозжечок	138 ± 9	110 ± 17	70 ± 4	71 ± 3
Обонятельные луковицы	142 ± 12	124 ± 21	86 ± 9	90 ± 3
Гиппокамп	124 ± 4	121 ± 25	94 ± 12	95 ± 3
Лобная доля	147 ± 8	150 ± 30	102 ± 16	107 ± 8
Ствол головного мозга	120 ± 19	106 ± 17	75 ± 11	79 ± 3
Остаток мозга	137 ± 7	118 ± 21	81 ± 7	82 ± 3

### 1.7.6 Оценка специфического связывания [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC у контрольных мышей

1.7.6.1 Распределение [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC в областях мозга у нормальных контрольных мышей, исследование блокирования при увеличении дозы с немеченым CPPC (ФИГ. 10).

Используют самцов CD-1 мышей (26-28 г, возраст=шесть - семь недель) от Charles River Laboratories. Раствор CPPC (0,3, 0,6, 1,2, 3,0, 10 и 20 мг/кг) дают ВБ за 5 мин до ВВ [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC, в то время как животные с исходным уровнем получают носитель (n=5 на дозу). Животных умерщвляют смещением шейных позвонков через 45 мин после инъекции 5,1 МБк (0,14 мКи) [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC [удельная радиоактивность=511 ГБк/мкмоль (13,8 Ки/мкмоль)] в 0,2 мл солевого раствора в боковую хвостовую вену. Весь мозг вынимают, взвешивают и его радиоактивность определяют на  $\gamma$ -счетчике LKB/Wallac 1283 CompuGamma CS (Bridgeport, CT). Рассчитывают стандартизированного уровня поглощения (%СУП).

1.7.7 Сравнение поглощения [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC при исходном уровне и блокировании в одном и том же эксперименте с и без коррекции крови (ФИГ. 11)

Используют самцов CD-1 мышей (25-27 г, возраст=шесть - семь недель) от Charles River Laboratories. Растворы CPPC (0,6 или 3,0 мг/кг) дают ВБ за 5 мин до ВВ [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC, в то время как животные с исходным уровнем получают носитель (n=3 на дозу). Животных умерщвляют смещением шейных позвонков через 45 мин после инъекции 5,0 МБк (0,135 мКи) [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC [удельная радиоактивность=390 ГБк/мкмоль (10,5 Ки/мкмоль)] в 0,2 мл солевого раствора в боковую хвостовую вену. Мозги вынимают, кору быстро рассекают на льду и образцы крови (0,2-0,5 см<sup>3</sup>) берут из сердца. Кору и образцы крови взвешивают и их радиоактивность определяют на  $\gamma$ -счетчике LKB/Wallac 1283 CompuGamma CS (Bridgeport, CT). Итоговые переменные для коры представляют без коррекции крови как %СУП (ФИГ. 11А) и с коррекцией крови как ССУП (ФИГ. 11В).

1.7.7.1 Поглощение [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC в мозге у мышей с обедненной микроглией и контрольных мышей (ФИГ. 12А)

Покупают самцов мышей C57BL/6J (22-24 г) от Charles River Laboratories. Мышей с обедненной микроглией получают кормлением мышей C57BL/6 (5 животных) в течение 3 недель мышинным кормом с добавлением пексидартиниба (PLX3397) (290 мг/кг) как описано ранее (Elmore MR, et al. (2014)). Контрольных мышей C57BL/6J (5 животных) кормят стандартным кормом для мышей в течение 3 недель. В последний день обработки, всех животных умерщвляют смещением шейных позвонков через 45 мин после инъекции 5,0 МБк (0,135 мКи) [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC [удельная радиоактивность=475 ГБк/мкмоль (12,8

Ки/мкмоль)] в 0,2 мл солевого раствора в боковую хвостовую вену. Мозги удаляют, взвешивают и их радиоактивность определяют на  $\gamma$ -счетчике LKB/Wallac 1283 CompuGamma CS (Bridgeport, CT). Итоговые переменные рассчитывают как %СУП.

*1.7.7.2 Поглощение [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC в мозге CSF1R нокаутированных и контрольных мышей (ФИГ. 12В). Способы:*

Применяют B6.Cg-Csf1rtm1,2Jwp/J (CSF1R нокаут, КО) мышей (21-23 г; возраст=четыре-восемь недель; Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) (5 животных) и C57BL/6J контрольных мышей того же возраста (23-27 г) (5 животных). Животным вводят ВВ 3,7 МБк (0,1 мКи) [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC [удельная радиоактивность=306 ГБк/мкмоль (8,3 Ки/мкмоль)] и умерщвляют смещением шейных позвонков через 45 мин после инъекции радиофармпрепарата. Весь мозг вынимают и образцы крови (0,2-0,5 см<sup>3</sup>) берут из сердца. Весь мозг и образцы крови взвешивают, и их радиоактивность определяют на  $\gamma$ -счетчике LKB/Wallac 1283 CompuGamma CS. Итоговые переменные рассчитывают как %СУП.

*1.7.7.3 Поглощение [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC в мозге у контрольных и LPS-обработанных (внутричерепно) мышей (ФИГ. 1)*

*Эксперимент 1, ФИГ. 1А.* Девять самцов мышей CD-1 (25-27 г, возраст=шесть-семь недель) от Charles River Laboratories делят на три когорты: 1) обработанные плацебо мыши (n=3), исходный уровень; 2) обработанные липополисахаридом (LPS-внутричерепно) мыши (n=3), исходный уровень; и 3) обработанные липополисахаридом (LPS-внутричерепно) мыши (n=3), блокировка. Мышей CD1 анестезируют авертином (250 мг/кг, ВВ). Перипроцедурное обезболивание проводят финадином (2,5 мг/кг, ПК). Координаты для интрапаренхимальной инъекции в правый передний мозг: AP -0,5 мм' DV -2,5 мм; и ML 1,0 справа от середины. Отверстия сверлят перпендикулярно в заранее обнаженном черепе. Стерильный физиологический раствор с фосфатным буфером (ФРФБ) (0,5 мкл) или 5 мкг липополисахарида (LPS, O11:B4, Calbiochem, San Diego, CA) в 0,5 мкл ФРФБ вводят инъекцией в паренхиму мозга с применением 1 мкл шприца Гамильтона. После инъекции иглу оставляют в мозге в течение еще 3 мин и медленно удаляют. Рассечение герметично закрывают зубным цементом. Исследование радиофармпрепарата проводят на 3 день после введения LPS. Раствор CPPC (0,3 мг/кг) дают ВВ, за 5 мин до ВВ [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC, в то время как животные исходного уровня получают носитель. LPS и контрольным животным вводят ВВ инъекцией 3,7 МБк (0,1 мКи) [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC [удельная радиоактивность=274 ГБк/мкмоль (7,4 Ки/мкмоль)] и умерщвляют смещением шейных позвонков через 45 мин после инъекции радиофармпрепарата. Весь мозг вынимают и рассекают на льду. Мозжечок, ипсилатеральную полусферу мозга и контралатеральную полусферу мозга, и образцы крови взвешивают, и их радиоактивность определяют на  $\gamma$ -счетчике LKB/Wallac 1283 CompuGamma CS. Итоговые переменные рассчитывают как %СУП.

*Эксперимент 2, ФИГ. 1В.* Шестнадцать самцов мышей CD-1 (25-27 г, возраст=шесть-семь недель) от Charles River Laboratories делят на четыре когорты: 1) обработанные плацебо мыши (n=4), исходный уровень; 2) обработанные

липополисахаридом (LPS-внутричерепно) мыши (n=4), исходный уровень; 3) обработанные липополисахаридом (LPS-внутричерепно) мыши (n=4), блокировка - 0,6 мг/кг CPPC; и 4) обработанные липополисахаридом (LPS-внутричерепно) мыши (n=4), блокировка - 1,2 мг/кг CPPC. Мышей CD1 анестезируют авертином (250 мг/кг, ВБ). Перипроцедурное обезболивание проводят финадином (2,5 мг/кг, ПК). Координаты для интрапаренхимальной инъекции в правый передний мозг: AP -0,5 мм, DV -2,5 мм; и ML 1,0 справа от середины. Отверстия сверлят перпендикулярно в заранее обнаженном черепе. Стерильный физиологический раствор с фосфатным буфером (ФРФБ) (0,5 мкл) или 5 мкг липополисахарида (LPS, O11:B4, Calbiochem, San Diego, CA) в 0,5 мкл ФРФБ вводят инъекцией в паренхиму мозга с применением 1 мкл шприца Гамильтона. После инъекции иглу оставляют в мозге в течение еще 3 мин и медленно удаляют. Рассечение герметично закрывают зубным цементом. Исследование радиофармпрепарата проводят на 3 день после введения LPS. Раствор CPPC (0,3 мг/кг) дают ВБ, за 5 мин до ВВ [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC, в то время как животные исходного уровня получают носитель. LPS и контрольным животным вводят ВВ инъекцией 3,7 МБк (0,1 мКи) [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC [удельная радиоактивность=366 ГБк/мкмоль (9,9 Ки/мкмоль)] и умерщвляют смещением шейных позвонков через 45 мин после инъекции радиофармпрепарата. Весь мозг вынимают и рассекают на льду. Мозжечок, ипсилатеральную полусферу мозга, которую затем рассекают на два квадранта, и каудальную и контралатеральную полусферу мозга и образцы крови взвешивают, и их радиоактивность определяют на  $\gamma$ -счетчике LKB/Wallac 1283 CompuGamma CS. Итоговые переменные рассчитывают как %СУП.

*1.7.7.4 Поглощение [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC в мозге контрольных и LPS-обработанных (внутрибрюшинно) мышей (ФИГ. 2)*

*Эксперимент 1, ФИГ. 2А.* Пятнадцать самцов мышей CD-1 (25-27 г, возраст=шесть-семь недель) от Charles River Laboratories делят на три когорты: 1) контрольные мыши (n=5), исходный уровень; 2) обработанные липополисахаридом (LPS) - ВБ мыши (n=5), исходный уровень; и 3) обработанные липополисахаридом (LPS) - ВБ мыши (n=5), блокировка CPPC. Раствор LPS (O11:B4, Calbiochem, San Diego, CA) в стерильном солевом растворе (10 мг/кг, 0,2 мл) вводят внутрибрюшинно, и исследование радиофармпрепарата проводят на 5 день после введения LPS. Раствор CPPC (1 мг/кг) дают ВБ, за 5 мин до ВВ [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC, в то время как животные исходного уровня получают носитель. LPS и контрольным животным вводят ВВ инъекцией 3,7 МБк (0,1 мКи) [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC [удельная радиоактивность=444 ГБк/мкмоль (12,0 Ки/мкмоль)] и умерщвляют смещением шейных позвонков через 45 мин после инъекции радиофармпрепарата. Весь мозг вынимают и рассекают на льду. Мозжечок и остаток мозга взвешивают, и их радиоактивность определяют на  $\gamma$ -счетчике LKB/Wallac 1283 CompuGamma CS. Итоговые переменные рассчитывают как %СУП.

*Эксперимент 2, ФИГ. 2В.* Пятнадцать самцов мышей CD-1 (25-27 г, возраст=шесть-семь недель) от Charles River Laboratories делят на три когорты: 1) контрольные мыши (n=5), исходный уровень; 2) обработанные липополисахаридом (LPS)

- ВБ мыши (n=5), исходный уровень; и 3) обработанные липополисахаридом (LPS) - ВБ мыши (n=5), блокировка CPPC. Раствор LPS (O111:B4, Calbiochem, San Diego, CA) в стерильном солевом растворе (10 мг/кг, 0,2 мл) вводят внутривентриально, и исследование радиофармпрепарата проводят на 3 день после введения LPS. Раствор CPPC (1 мг/кг) дают ВБ, за 5 мин до ВВ [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC, в то время как животные исходного уровня получают носитель. LPS и контрольным животным вводят ВВ инъекцией 3,7 МБк (0,1 мКи) [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC [удельная радиоактивность=374 ГБк/мкмоль (10,1 Ки/мкмоль)] и умерщвляют смещением шейных позвонков через 45 мин после инъекции радиофармпрепарата. Весь мозг вынимают и рассекают на льду и образцы крови (0,2-0,5 см<sup>3</sup>) берут из сердца. Весь мозг и образцы крови взвешивают, и их радиоактивность определяют на  $\gamma$ -счетчике LKB/Wallac 1283 CompuGamma CS. Итоговые переменные рассчитывают как ССУП.

*Эксперимент 3, ФИГ. 2С.* Пятнадцать самцов мышей CD-1 (25-27 г, возраст=шесть-семь недель) от Charles River Laboratories делят на три когорты: 1) контрольные мыши (n=3), исходный уровень; 2) обработанные липополисахаридом (LPS) - ВБ мыши (n=6), исходный уровень; и 3) обработанные липополисахаридом (LPS) - ВБ мыши (n=6), блокировка соединением **8**. Раствор LPS (O111:B4, Calbiochem, San Diego, CA) в стерильном солевом растворе (10 мг/кг, 0,2 мл) вводят внутривентриально, и исследование радиофармпрепарата проводят на 3 день после введения LPS. Раствор соединения **8** (2 мг/кг) дают ВБ, за 5 мин до ВВ [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC, в то время как животные исходного уровня получают носитель. LPS и контрольным животным вводят ВВ инъекцией 3,0 МБк (0,08 мКи) [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC [удельная радиоактивность=148 ГБк/мкмоль (4,0 Ки/мкмоль)] и умерщвляют смещением шейных позвонков через 45 мин после инъекции радиофармпрепарата. Весь мозг вынимают и рассекают на льду и образцы крови (0,2-0,5 см<sup>3</sup>) берут из сердца. Весь мозг и образцы крови взвешивают, и их радиоактивность определяют на  $\gamma$ -счетчике LKB/Wallac 1283 CompuGamma CS. Итоговые переменные рассчитывают как ССУП к крови.

*1.7.7.5 Поглощение [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC в мозге в модели Альцгеймера у мышей и контрольных мышей (ФИГ. 3)*

Используют Мышиную модель связанного с Альцгеймером амилоидоза сверхэкспрессирующего белок-предшественник амилоида (APP) со Шведскими и Индианскими мутациями. Трансгенные APP имеют чувствительный к тетрациклиновому трансактиватору (tTa) промотор, который активируют сверхэкспрессией tTa, управляемой промотором CaMKII (5). Благодаря такому сочетанию трансгенов, сверхэкспрессию трансгенного APP наблюдают только в основных нейронах переднего мозга. Мыши, не экспрессирующие какие-либо трансгены, служат контролем. Самцы мышей с Альцгеймером (БА) и контрольные однопометные животные того же пола на момент исследования имеют возраст 16 месяцев. В этом возрасте, мыши с БА имеют значительные отложения А $\beta$  амилоидных бляшек в переднем мозге, включая кору и гиппокамп (Melnikova T, et al. (2013). Шесть мышей с БА и шесть контролей того же возраста используют в этом исследовании. Животным вводят ВВ 5,6 МБк (0,15 мКи)

[ $^{11}\text{C}$ ]СРРС [удельная радиоактивность=340 ГБк/мкмоль (9,2 Ки/мкмоль)] и умерщвляют смещением шейных позвонков через 45 минут после инъекции радиофармпрепарата. Весь мозг вынимают и быстро рассекают на льду. Мозжечок и остальной мозг взвешивают, и их радиоактивность определяют на  $\gamma$ -счетчике LKB/Wallac 1283 CompuGamma CS. Итоговые переменные рассчитывают как %СУП.

#### 1.7.8 Способы дозиметрии излучения [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС всего тела у мышей

Дозиметрию излучения [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС изучают на пятнадцати самцах мышей CD-1 (23-27 г) согласно нашей опубликованной методике (Stabin MG, et al. (2005)). Раствор [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС в 0,2 мл солевого раствора (7,4 МБк или 0,2 мКи) вводят инъекцией в виде болюса в боковую хвостовую вену, и группы мышей (n=3) умерщвляют через 10, 30, 45, 60 и 90 мин после инъекции радиофармпрепарата. Легкие, сердце, почки, печень, селезенку, кишечник, желудок и мозг быстро вынимают и кладут на лед. Также собирают одно бедро и образцы мышц бедра, костного мозга и крови. Органы взвешивают, и радиоактивность тканей измеряют на автоматизированном гамма-счетчике (LKB Wallac 1282 CompuGamma CS Universal Gamma Counter). Процент введенной дозы на орган (%ВД/орган) рассчитывают сравнением с образцами стандартного разведения исходной дозы. Все измерения корректируют на распад. Полученные значения %ВД/орган подгоняют с применением программы SAAM II (Foster DM (1998)). Временные интегралы активности (Stabin MG и Siegel JA (2003)) вводят в программу OLINDA/EXM (Stabin MG, et al. (2005)) с применением модели взрослых самцов. Активность наблюдают в кишечнике (~35%). Количество распадов в оставшемся теле оценивают как равную 100% от введенной активности одним целым с полным распадом  $^{11}\text{C}$ , минус распады в других органах тела.

##### 1.7.8.1 Результаты

Подходящая метаболическая модель, количество распадов в исходных органах и дозы в органах суммированы ниже:

Подходящая метаболическая модель была следующей:

<u>Орган</u>	<u>%</u>	<u>T-bio(ч)</u>	<u>%</u>	<u>T-bio(ч)</u>
Мозг	3,83	0,302	0,38	$\infty$
Сердце	1,00	0,272	0,14	$\infty$
Легкие	8,27	0,159	1,53	2,27
Печень	97,6	0,746	-100	0,335
Почки	8,32	0,297	1,52	$\infty$
Селезенка	1,43	0,823	-1,24	0,145

Количество распадов в исходных органах (в МБк-ч/МБк введенных):

Мозг	1,10E-02
НОТК	7,00E-04
Тонкий кишечник	1,53E-01

ВОТК	1,81E-02
Стенки сердца	2,80E-03
Почки	2,65E-02
Печень	8,80E-02
Легкие	2,00E-02
Селезенка	3,00E-03
Остальное	1,68E-01

**Таблица 3. Расчетные дозы для человека**

<u>Орган-мишень</u>	<u>мЗв/МБк</u>	<u>БЭР/мКи</u>
Надпочечники	3,11E-03	1,15E-02
Мозг	2,70E-03	9,99E-03
Молочные железы	1,29E-03	4,76E-03
Стенки желчного пузыря	5,35E-03	1,98E-02
Стенки НОТК	4,29E-03	1,59E-02
Тонкий кишечник	4,73E-02	1,75E-01
Стенки желудка	2,76E-03	1,02E-02
Стенки ВОТК	1,73E-02	6,42E-02
Стенки сердца	3,72E-03	1,38E-02
Почки	2,56E-02	9,48E-02
Печень	1,60E-02	5,90E-02
Легкие	6,10E-03	2,26E-02
Мышцы	1,84E-03	6,79E-03
Яичники	5,21E-03	1,93E-03
Поджелудочная железа	3,18E-03	1,18E-02
Красный костный мозг	2,19E-03	8,09E-03
Остеогенные клетки	2,13E-03	7,87E-03
Кожа	1,19E-03	4,41E-03
Селезенка	6,08E-03	2,25E-02
Яички	1,20E-03	4,42E-03
Вилочковая железа	1,44E-03	5,33E-03
Щитовидная железа	1,18E-03	4,38E-03
Стенки мочевого пузыря	2,14E-03	7,92E-03
Матка	4,57E-03	1,69E-02
Все тело	2,90E-03	1,07E-02
Эффективная доза	4,80E-03	1,78E-02

### 1.7.8.2 Сущность исследования дозиметрии излучения

Все данные хорошо соответствуют двум экспоненциальным функциям. Большинство органов по-вероятности получают примерно 0,002-0,006 мЗв/МБк (0,007-0,011 БЭР/мКи). Тонкий кишечник по-вероятности получает наибольшую дозу, примерно 0,047 мЗв/МБк (0,17 БЭР/мКи). Эффективная доза составляет примерно 0,0048 мЗв/МБк (0,018 БЭР/мКи).

### 1.7.9 ПЭТ/КТ визуализация у мышей с экспериментальным аутоиммунным энцефалитом (ФИГ. 4, ФИГ. 13)

Взрослых самок мышей C57BL/6J, возраст=13 недель (Jackson Laboratories, Bar Harbor ME) инокулируют пептидом MOG35-55 и оценивают по поведению как описано ранее (Jones MV, et al. (2008)): Коротко, неполный адьювант Фрейнда (Pierce), содержащий 8 мг/мл убитых нагреванием *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA (Difco) смешивают при 1:1 с 2 мг/мл раствора MOG35-55 (Johns Hopkins Biosynthesis & Sequencing Facility): NH<sub>2</sub>-MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK-COOH, разведенный в физиологическом растворе с фосфатным буфером (ФРФБ). После получения стабильной эмульсии, всего 100 мкл полученной смеси делят на две подкожные инъекции в основание хвоста (т.е. 400 мкг *M. tuberculosis* и 100 мкг MOG35-55 на мышь). В день иммунизации (день 0 после иммунизации: день 0 п.и.) и через 2 дня, 250 нг коклюшного токсина (EMD/Calbiochem, USA), разведенного в ФРФБ, вводят внутривенно. Симптоматических MOG-инокулированных мышей и не инокулированных, здоровых мышей сканируют через 14 дней после первой инокуляции. Оценку определяют согласно (Beeton C, et al. (2007)). Коротко, мышей оценивают от 0-5, где оценка 0 представляет отсутствие клинически наблюдаемых признаков, и оценка 5 представляет полный паралич задней конечности с недержанием. Оценка 3 представляет умеренный парализ со случайным спотыканием. Оценки 0,5 (дистальный вялых хвост), 2,5 (мягкий/умеренный парализ со спотыканием) и 4,5 (полный паралич задней конечности) определяют в этом исследовании. Каждой мыши вводят ВВ 8,14 МБк [220 мКи, SA >370 ГБк/мкмоль (>10 Ки/мкмоль)], обрабатывают с применением ПЭТ/КТ сканера Sedecal SuperArgus (Madrid, Spain). КТ сканы для СТ морфологической со-регистрации проводят для 512 срезов при 60 кВп. Данные ПЭТ и КТ восстанавливают с применением программы производителя и показывают с применением программы AMIDE (<http://amide.sourceforge.net/>). Для сохранения динамического диапазона, ПЭТ сигнал гардеровой и слюнной железы частично маскируют с применением способа определения пороговых значений (ФИГ. 4), при этом не маскированные изображения показаны на ФИГ. 13. Области, представляющие интерес, рисуют на трех срезах над видимыми повреждениями ПЭТ и количественно оценивают в указанных областях.

### 1.7.10 Анализ радиометаболитов в плазме и крови мышши

Применяют шесть самцов мышей CD-1 (25-27 г, возраст=шесть-семь недель) от Charles River Laboratories. Животным вводят ВВ инъекцией 37 МБк (1 мКи) [<sup>11</sup>C]СРРС [удельная радиоактивность=673 ГБк/мкмоль (18,2 Ки/мкмоль)] и умерщвляют смещением

шейных позвонков через 10 мин (3 животных) и 30 мин (3 животных) после инъекции радиофармпрепарата. Весь мозг вынимают и рассекают на льду и образцы крови ( $0,5 \text{ см}^3$ ) берут из сердца. Радиометаболиты [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC в плазме и мозге мыши анализируют с применением общего способа ВЭЖХ, описанного выше для бабуинов. Перед ВЭЖХ анализом, мозг мыши гомогенизируют в 2 мл смеси 50% ацетонитрил:50% фосфатный буфер ( $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4$ , pH 7,2). Гомогенаты центрифугируют (14000g в течение 5 мин), и супернатанты фильтруют с применением 0,2-микронного фильтра, и фильтрат анализируют радио-ВЭЖХ с phenomenex Gemini C18, 10 мк,  $4,6 \times 250$  м и 2 мл/мин изократным элюированием и 50% ацетонитрилом - 50% водным триэтиламин,  $c=0,06 \text{ M}$  и  $\text{pH}=7,2$  в качестве подвижной фазы. Исследование демонстрирует, что в плазме мыши радиофармпрепарат [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC образует те же два радиометаболита, что и в плазме бабуина (ФИГ. 17). Радиометаболиты плохо проникают через гематоэнцефалический барьер, и их присутствие в мозге является низким (таблица 4).

**Таблица 4. Исходный [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC и его радиометаболиты в плазме и мозге**

**мышь**

Момент времени	Плазма		Мозг	
	% метаболитов	% исходного [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC	% метаболитов	% исходного [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC
10 мин	$29,9 \pm 2,3$	$70,2 \pm 2,2$	$3,4 \pm 0,1$	$96,6 \pm 0,1$
30 мин	$60,3 \pm 1,4$	$39,7 \pm 1,3$	$4,9 \pm 1,7$	$95,1 \pm 1,6$

*1.7.11 Количественная ПЦР в реальном времени (кРВ-ПЦР) и вестерн-блоттинг целого мозга контрольных и LPS-обработанных CD1 мышей.*

Шести самцам мышей CD-1 (25-27 г, Charles River) внутрибрюшинно вводят LPS (O111:B4, Calbiochem, San Diego, CA, 10 мг/кг, 0,2 мл). Мышей умерщвляют на 4 день после инъекции LPS и весь мозг собирают. Половину мозга мгновенно замораживают в жидком азоте и хранят при  $-80^\circ\text{C}$  для вестерн-блоттинга. Другую половину мозга сразу же хранят в 1 мл RNeasy Lysis Buffer (Millipore Sigma, St. Luis, MO) при  $4^\circ\text{C}$ . Через 24 ч раствор RNeasy Lysis Buffer удаляют из образцов, и мозг замораживают при  $-80^\circ\text{C}$  для полного выделения РНК.

*Вестерн-блоттинг:* Для вестерн-блоттинга образцы мозга гомогенизируют с реагентом T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific, Halethorpe, MD) в течение 30 секунд всего 6 раз и центрифугируют при 12000 об./мин в течение 5 мин. Супернатант собирают, и 10 мкг белков отделяют SDS-PAGE и переносят на NC мембрану. Следующие антитела применяют для вестерн-блоттинга:  $\alpha$ -mCSF1R Ab (Cell Signaling Technology, Danver, MA),  $\alpha$ mGAPDH Ab (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX). Блоты визуализируют на Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Hercules, CA) и Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad). Интенсивность полосы измеряют в программе Image Lab™ Software (Bio-Rad).

*кРВ-ПЦР:* Для кРВ-ПЦР, полную РНК выделяют из мозга с применением набора

Quick-RNA™ Miniprep Kit, (Zymo Research, Irvine, CA) и кДНК синтезируют из выделенной РНК с применением набора High-capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific). Реакции кПЦР проводят с применением следующих анализов Taqman™: Csf1r: Mm01266652\_m1, Pgk1: Mm00435617\_m1, Gapdh: Mm99999915\_g1). Относительное количество рассчитывают с применением Pgk1 и Gapdh в качестве внутренних контролей.

#### *1.7.12 Анализ радиометаболитов у бабуинов*

ПЭТ исследования у бабуинов показаны на ФИГ. 15 и ФИГ. 16.

Относительную долю [<sup>11</sup>C]СРРС в плазме определяют высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) в образцах крови, взятых через 5, 10, 20, 30, 60 и 90 мин после инъекции радиофармпрепарата. Применяют модифицированный способ ВЭЖХ с переключением колонок (Coughlin, NeuroImage 165, 2018, страница 120). Система ВЭЖХ, содержащая насос для четырехкомпонентных смесей 1260 infinity, модуль колоночного отделения 1260 infinity, датчики радиации 1260 infinity UV и Raytest GABI Star, работает с программой OpenLab CDS EZChrom (A.01.04). 0,4-1,5 мл образцов плазмы, загруженных в 2 мл петлю дозатора Rheodyne, сначала направляли в улавливающую колонку (заполненную Phenomenex Strata-X 33 мкм полимерным сорбентом с обращенной фазой) и оба датчика с подвижной фазой 1% ацетонитрила и 99% воды при 2 мл/мин. Через 1 мин изократического элюирования, аналитическую подвижную фазу, состоящую из 65% ацетонитрила и 35% водного раствора триэтиламина, с=0,06М и рН=7,2 (доводят фосфорной кислотой) применяют для направления уловленных на улавливающей колонке не полярных соединений в аналитическую колонку (Gemini C18(2) 10 мкм 4,62×50 мм) и датчики при 2 мл/мин. Систему ВЭЖХ стандартизируют с применением не радиоактивного СРРС и [<sup>11</sup>C]СРРС до анализа образцов плазмы крови, в которые добавляют 5 мкл СРРС в концентрации 1 мг/мл. Кривые активность-время для цельной плазмы получают через анализ 0,3 мл образцов плазмы крови на автоматическом гамма-счетчике PerkinElmer Wizard 2480. Не содержащие плазму фракции (fp) [<sup>11</sup>C]СРРС определяют с применением ультрафильтрационных аппаратов centrifree.

Анализ радиометаболитов проводят с применением способа ВЭЖХ с переключением колонок, который позволяет впрыскивать плазму крови непосредственно в систему ВЭЖХ без времязатратного периода осаждения и экстракции белков. Сначала образец направляют в улавливающую колонку для твердофазной экстракции исходной метки и ее не полярных радиометаболитов. Большинство составляющих плазмы крови и полярных метаболитов исходного радиофармпрепарата не остаются в улавливающей колонке и элюируются в датчики. Затем применяют аналитическую подвижную фазу для элюирования уловленных соединений из улавливающей колонки в аналитическую колонку, где их разделяют и далее направляют в детекторы. Таким путем все радиоактивные соединения, присутствующие в образце, могут быть определены, что позволяет провести точный количественный анализ относительной доли исходной метки в

сравнении с ее метаболитами. Как показано на ФИГ. 17А, 100% введенного [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC может быть эффективно уловлено в применяемой улавливающей колонке, и аналитическая подвижная фаза элюирует их за 7,35 мин. Типовая хроматограмма ВЭЖХ образцов плазмы, полученных в разные интервалы времени, представлена на ФИГ. 17А, и времязависимая относительная доля [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC в плазме крови не обработанных контрольных и обработанных LPS или LPS+блокирующим агентом бабуинов представлена на ФИГ. 17В. Введение LPS или LPS и блокирующего агента не влияет на схему и скорость метаболизма [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC. Были определены два пика при 0,97 мин и 4,82 мин элюирования, относящиеся к менее липофильному радиометаболиту исходной метки. Относительная доля [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC составляет  $84,87 \pm 2,01$ ,  $75,57 \pm 1,76$ ,  $62,5 \pm 4,47$ ,  $51,73 \pm 6,14$ ,  $34,8 \pm 1,31$  и  $25,6 \pm 2,77$  через 5, 10, 20, 30, 60 и 90 мин после инъекции радиофармпрепарата.

На не содержащую плазму фракцию [ $^{11}\text{C}$ ]CPPC, определенную с применением ультрафильтрационных аппаратов centrifree, также не влияет обработка LPS или LPS и блокиратором, и она составляет  $5,48 \pm 0,98\%$ .

#### *1.7.13 Способы ПЭТ-визуализации у бабуинов*

Изображения ПЭТ получают с применением CPS/CTI High Resolution Research Tomograph (HRRT), который имеет продольное разрешение (FWHM) 2,4 мм и разрешением в плоскости 2,4-2,8 мм. Животных анестезируют и обрабатывают, как описано ранее (Horti AG, et al. (2016)). Данные ПЭТ для 90 мин группируют в 30 рамок: четыре 15-сек, четыре 30-сек, три 1-мин, две 2-мин, пять 4-мин и двенадцать 5-мин рамок. Изображения восстанавливают с применением итеративного алгоритма ожидаемой максимизации упорядоченных подмножеств (OS-EM) (с шестью итерациями и 16 подмножествами) с коррекцией на радиоактивный распад, время блокировки, затухание, рассеяние и случайные сигналы (Rahmim A, et al. (2005)). Реконструированное пространство изображений состоит из кубических объемных пикселей, каждый размером  $1,22 \text{ мм}^3$  и габаритных размеров 31 см x 31 см (трансаксиально) и 25 см (аксиально).

Образцы крови получают через артериальный катетер с интервалами постоянной продолжительности в течение 90 мин сканирования (так быстро, как возможно в течение первых 90 секунд, с последующим сбором образцов через интервалы с увеличивающейся длительностью). Образцы центрифугируют при 1200 x g, и радиоактивность в плазме измеряют с применением перекрестно-калиброванного гамма-счетчика. Выбранные образцы крови (5, 10, 20, 30, 60 и 90 мин) анализируют высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) для определения радиоактивных метаболитов в плазме, как описано выше.

#### *1.7.14 Анализ ПЭТ данных для бабуинов*

Анализ изображения и кинетическое моделирование проводят с применением программы PMOD (v3,7, PMOD Technologies Ltd, Zurich, Switzerland). Динамические изображения ПЭТ сначала сорегистрируют с изображениями МРТ. Локально разработанный шаблон исследуемого объема (VOI), включающий 13 типовых структур

мозга бабуинов, затем переносят на МРТ изображения животных. VOI включает переднюю и височную извилину, таламус, гиппокамп, хвостатое ядро, скорлупу, миндалину, бледный шар, островок, гипоталамус, мозжечок, мозолистое тело и белое вещество. Кривую активность-время (ТАС) каждого VOI получают наложением VOI на ПЭТ рамки.

Затем, на основе ТАС и скорректированных на метаболиты входных функций артериальной плазмы, проводят кинетическое моделирование для количественной характеристики связывания [ $^{11}\text{C}$ ]СМРFF в мозге. Для поглощения в мозге, основным критерием эффективности является объем распределения в областях мозга (VT) [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС, определенный как концентрация радиофармпрепарата в ткани области относительно крови при равновесии. VT областей пропорционален плотности рецептора в определенном VOI. Так как не предполагается, что какая-либо область мозга избежит специфического поглощения [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС, другие общеприменимые критерии эффективности, а именно, не замещающая связывающая способность (BPND), не могут быть получены надежно. Для каждого VOI, VT рассчитывают с применением и компартментного моделирования, и графического способа Логана. Logan J, et al. (1990). Также проводят анализ согласованности по времени. Типовые результаты представлены на ФИГ. 18.

В общем, и компартментное моделирование, и способ Логана подходят для анализа [ $^{11}\text{C}$ ]СРРС ПЭТ данных (пример показана на ФИГ. 18 а и b), и они дают очень сопоставимые результаты VT для областей (ФИГ. 18c). Все области мозга дают стабильные оценки VT для длительности сканирования более 60 минут (ФИГ. 18-d). Чтобы способствовать получению параметрических изображений VT (ФИГ. 5 и ФИГ. 13), способ Логана выбирают для представления всех значений VT в настоящем документе.

## ПРИМЕР 2

### СИНТЕЗ АРИЛАМИДОВ

В общем, путь синтеза начинается с реакции SNAr 2-фтор-4-хлорнитробензола **2** с пиперидином или 4-метилпиперидином в этаноле с получением N-алкилированных соединений **4a-b** с очень высоким выходом. N-метилпиперазин взаимодействует с **4a-b** в безпримесной реакции при 140°C с получением соединений **5a-b**. С другой стороны, N-Вос пиперазин взаимодействует с **4a-b** в присутствии неорганического основания  $\text{K}_2\text{CO}_3$  с ДМСО в качестве растворителя с получением соединений **5c-5d**. Восстановление нитрогруппы до анилина с последующим образованием стандартной амидной связи с 5-цианофуран-2-карбоновой кислотой или 4-циано-1Н-пиррол-2-карбоновой кислотой дает желаемые продукты **1a**, **1c**, **1e** и **7a-c**. Для радиосинтеза, предшественник **1b**, **1d** и **1f** получают из **7a-c** снятием защиты N-Вос с применением ТФК в метиленхлориде.

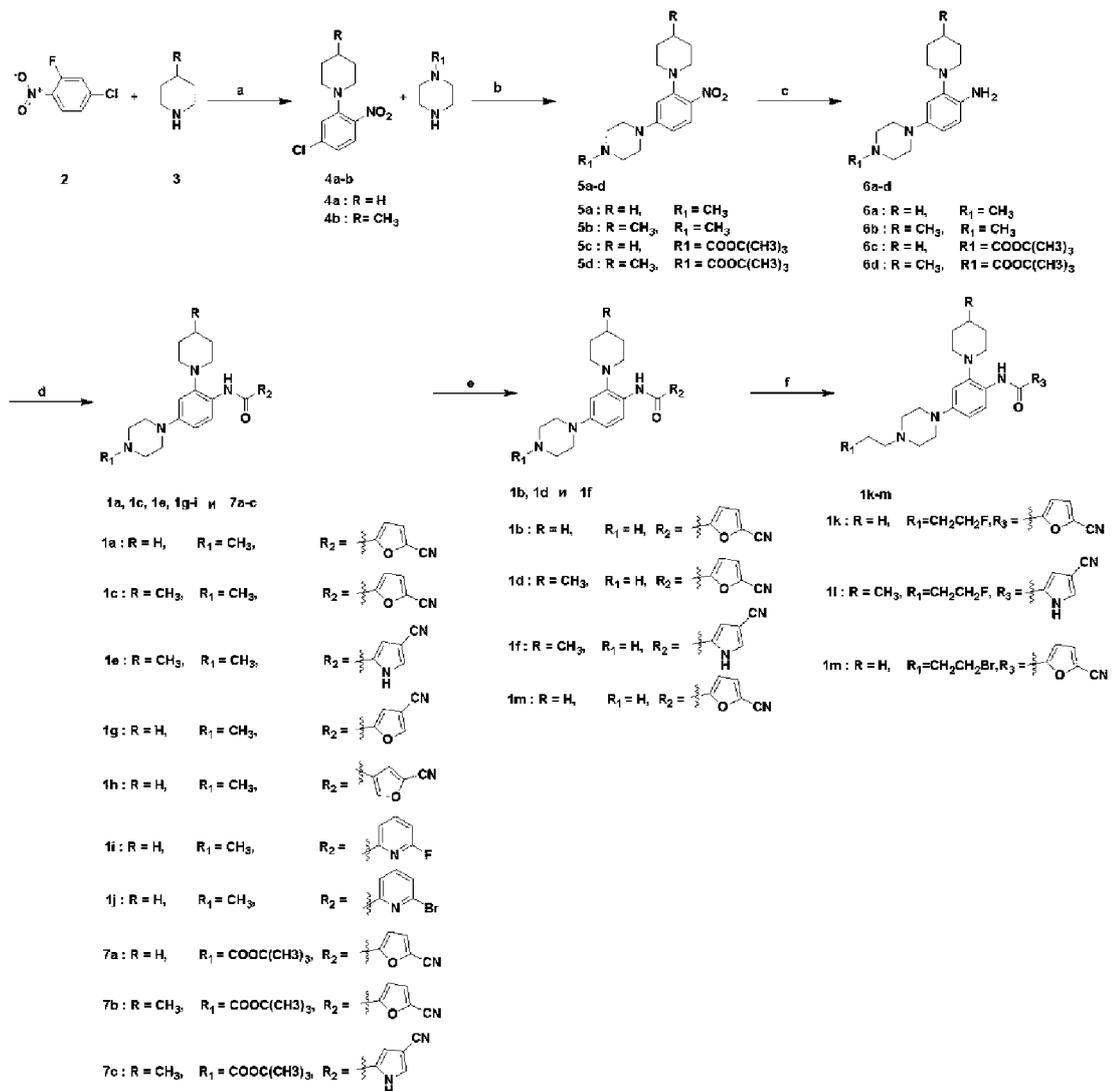
Синтез также включает сочетание Сузуки-Мияра, см. Miyaura and Suzuki, 1995, между анилинбороновым эфиром **8** (который отличается от “соединения **8**”, указанного выше) и енольным производным сложного эфира трифлата N-Вос-замещенного пиперидинона **9**. См. Wustrow and Wise, 1991. После гидрогенирования олефина **10**,

полученный анилин **11** бромуют N-бромсукцинимидом (NBS) с получением **12**. После этого, сочетание Сузуки-Мияра с 1-циклогексенбороновой кислотой и соединением **12** дает соединение амина **13**. Калиевую соль замещенного триметилсилилэтоксиметилом (SEM) имидазол-2-карбоксилата получают согласно описанной методике. См. Wall et al., 2008. Соединение **13** сочетают с **14** с применением ГАТУ и N, N-диизопропилэтиламина (ДИПЭА) в ДМФ с получением амида **15** с хорошим выходом. Одновременное удаление обеих Вос и SEM групп трифторуксусной кислотой (ТФК) дает промежуточное соединение **16**, которое применяют для получения **1g** и **17**. Удаление Вос дает соединение предшественник **1h**.

### Синтез ариламинов 7a-d и 8a-b.

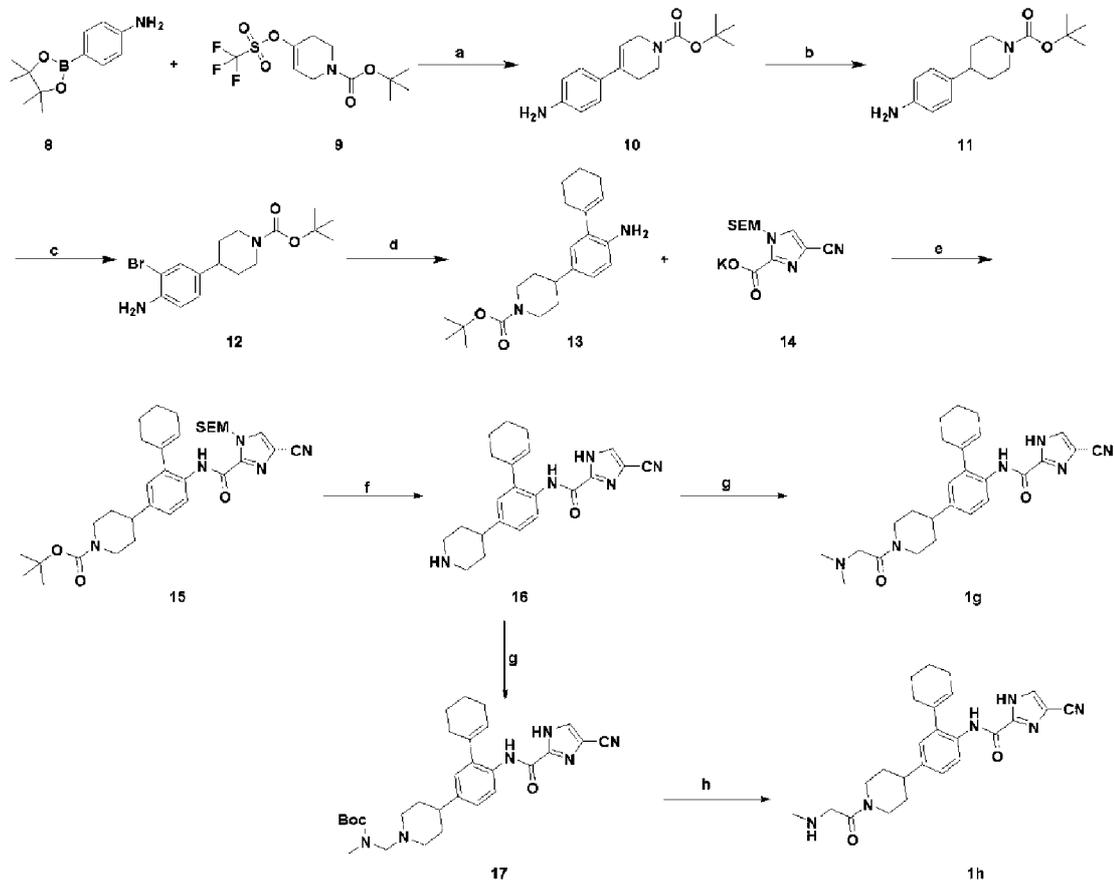
Реагенты и условия: (а) Этанол, 0°C до кт, 0,5 ч, 96%; (b) 140°C, 12 ч для **5a-b**, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ДМСО, 110°C, 12 ч для **5c-d**, 80% - 95%; (c) Zn, NH<sub>4</sub>Cl, ТГФ/MeOH/H<sub>2</sub>O, кипение с обратным холодильником, 1 ч, 90%; (d) ГАТУ, ДИПЭА, ДМФ, кт, 5-цианофуран-2-карбоновая кислота для **1a**, **1c**, **7a-b** и 4-циано-1H-пиррол-2-карбоновая кислота для **1e**, **7c**, 12 ч, 75-82%; (e) ТФК, МС, кт, 12 ч, 90%.

Синтез ариламинов **1a-l** представлен ниже:



*Реагенты и условия:* (а) Этанол, 0°C до кт, 0,5 ч, 96%; (b) 140°C, 12 ч для 5a-b, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ДМСО, 110°C, 12 ч для 5c-d, 80% - 95%; (c) Zn, NH<sub>4</sub>Cl, ТГФ/MeOH/H<sub>2</sub>O, кипение с обратным холодильником, 1 ч, 90%; (d) Карбоновая кислота, ГАТУ, ДИПЭА, ДМФ, 12 ч, 75-82%; (e) ТФК, МС, кт, 12 ч, 90%; f) Фторэтилтозилат, Et<sub>3</sub>N, АСН, 90°C, 12 ч, 60-70% для 1k-1 и 1,2-дибромэтан, Et<sub>3</sub>N, АЦН, 90°C, 12 ч, для 1m, 65%.

Синтез ариламинов **1g** и **1h** представлен ниже:



*Реагенты и условия:* (а) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, LiCl, 2 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, диоксан, 100°C, 2 ч. (b) H<sub>2</sub>, 10% Pd/C, MeOH, 20 ф./кв.д., 1 ч. (c) NBS, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, комнатная температура, 10 ч. (d) Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>.ДХМ, 2 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,4-Диоксан, 100°C, 15 ч. (e) ГАТУ, ДИПЭА, ДМФ, 10 ч. (f) ТФК, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, комнатная температура, 20 ч, г) ГАТУ, ДИПЭА, ДМФ, диметилглицин для **1g** и N-(*трет*-бутоксикарбонил)-N-метил для **17**, 12 ч, ч) ТФК, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, комнатная температура, 20 ч.

**1-(5-Хлор-2-нитрофенил)пиперидин (4a):** К охлажденному (0°C) раствору 1,0 г (10,0 ммоль) 4-хлор-2-фторнитробензола в 15 мл EtOH добавляют 1,7 мл (30,0 ммоль) пиперидина по каплям в течение 5 мин. Раствор перемешивают при 0°C в течение 10 мин и затем при 23°C в течение 30 мин. Смесь выливают в воду (225 мл) и экстрагируют EtOAc (2×30 мл). Объединенные экстракты промывают насыщенным водн. NaHCO<sub>3</sub> и насыщенным раствором соли (30 мл каждый) и затем сушат над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и выпаривают с получением неочищенного соединения. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем (Гексан:EtOAc=9,5:0,5) с получением 1-(5-хлор-2-нитрофенил)пиперидина в виде желтого твердого вещества (1,32 г, 96% выход). <sup>1</sup>H ЯМР

(500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,77 (д, J=5,0 Гц, 1H), 7,13 (с, 1H), 6,93 (д, J=10,0 Гц, 1H), 3,30-3,27 (м, 2H), 2,91-2,86 (м, 2H), 1,90-1,86 (м, 1H), 1,75-1,73 (м, 2H), 1,49-1,42 (м, 1H).

**1-(5-Хлор-2-нитрофенил)-4-метилпиперидин (4b):** К охлажденному (0°C) раствору 1,0 г (10,0 ммоль) 4-хлор-2-фторнитробензола в 15 мл EtOH добавляют 1,01 мл (30,0 ммоль) 4-метилпиперидина по каплям в течение 5 мин. Раствор перемешивают при 0°C в течение 10 мин и затем при 23°C в течение 30 мин. Смесь выливают в воду (225 мл) и экстрагируют EtOAc (2×30 мл). Объединенные экстракты промывают насыщенным водн. NaHCO<sub>3</sub> и насыщенным раствором соли (30 мл каждый) и затем сушат над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и выпаривают с получением неочищенного соединения. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем (Гексан:EtOAc=9,5:0,5) с получением 1-(5-хлор-2-нитрофенил)-4-метилпиперидина в виде желтого твердого вещества (1,4 г, 96% выход). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,77 (д, J=5,0 Гц, 1H), 7,13 (с, 1H), 6,93 (д, J=10,0 Гц, 1H), 3,30-3,27 (м, 2H), 2,91-2,86 (м, 2H), 1,90-1,86 (м, 1H), 1,75-1,73 (м, 2H), 1,49-1,42 (м, 1H), 1,02 (д, J=5,0 Гц, 3H).

**1-Метил-4-(4-нитро-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазин (5a):** Смесь 1-(5-хлор-2-нитрофенил)пиперидина (1,0 г, 4,15 ммоль) и 1-метилпиперазина (1,38 мл, 12,46 ммоль) нагревают при перемешивании под N<sub>2</sub> при 138°C в течение 12 ч. После охлаждения до кт, смесь выливают в воду и экстрагируют этилацетатом (2×100 мл). Объединенные экстракты промывают водой и насыщенным раствором соли и затем сушат над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и выпаривают с получением неочищенного соединения. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=9:1) с получением 1-метил-4-(4-нитро-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазина в виде желтого твердого вещества (1,2 г, 96% выход). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,62 (д, J=5,0 Гц, 1H), 6,80 (с, 1H), 6,43 (д, J=10,0 Гц, 1H), 3,84 (т, J=5,0 Гц, 4H), 3,71 (т, J=5,0 Гц, 2H), 3,60 (т, J=5,0 Гц, 4H), 3,50 (д, J=10,0 Гц, 2H), 3,80 (д, J=5,0 Гц, 2H), 1,55-1,51 (м, 3H).

**1-Метил-4-(3-(4-метилпиперидин-1-ил)-4-нитрофенил)пиперазин (5b):** Смесь 1-(5-хлор-2-нитрофенил)-4-метилпиперидина (1,0 г, 3,92 ммоль) и 1-метилпиперазина (1,30 мл, 11,77 ммоль) нагревают при перемешивании под N<sub>2</sub> при 138°C в течение 12 ч. После охлаждения до кт, смесь выливают в воду и экстрагируют этилацетатом (2×100 мл). Объединенные экстракты промывают водой и насыщенным раствором соли и затем сушат над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и выпаривают с получением неочищенного соединения. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=9:1) с получением 1-метил-4-(3-(4-метилпиперидин-1-ил)-4-нитрофенил)пиперазина в виде желтого твердого вещества (1,2 г, 96% выход). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,62 (д, J=5,0 Гц, 1H), 6,80 (с, 1H), 6,43 (д, J=10,0 Гц, 1H), 3,84 (т, J=5,0 Гц, 4H), 3,71 (т, J=5,0 Гц, 2H), 3,60 (т, J=5,0 Гц, 4H), 3,50 (д, J=10,0 Гц, 2H), 1,80 (д, J=5,0 Гц, 2H), 1,55-1,51 (м, 3H), 1,03 (д, J=5,0 Гц, 3H).

**Трет-бутил 4-(4-нитро-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилат (5c):** К смеси 1-(5-хлор-2-нитрофенил)пиперидина (1,0 г, 4,15 ммоль) и трет-бутилпиперазин-1-карбоксилата (1,55 г, 8,30 ммоль) в ДМСО (10 мл) добавляют K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,72 г, 12,45 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при 110°C в течение 12 ч и затем

разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным MgSO<sub>4</sub>, фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем (Гексан:EtOAc=3:7) с получением *трет*-бутил 4-(4-нитро-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата в виде белого твердого вещества (1,40 г, 86,4% выход). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,99 (д, J=10,0 Гц, 1H), 6,38 (д, J=10,0 Гц, 1H), 6,31 (с, 1H), 3,58 (т, J=5,0 Гц, 4H), 3,34 (т, J=5,0 Гц, 4H), 2,28 (т, J=5,0 Гц, 2H), 2,78 (д, J=10,0 Гц, 2H), 1,70 (д, J=5,0 Гц, 2H), 1,55-1,51 (м, 3H), 1,47 (с, 9H).

***Трет*-бутил 4-(3-(4-метилпиперидин-1-ил)-4-нитрофенил)пиперазин-1-карбоксилат (5d):** К смеси 1-(5-Хлор-2-нитрофенил)-4-метилпиперидина (1,0 г, 3,92 ммоль) и *трет*-бутил пиперазин-1-карбоксилата (1,46 г, 7,85 ммоль) в ДМСО (10 мл) добавляют K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,62 г, 11,77 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при 110°C в течение 12 ч и затем разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным MgSO<sub>4</sub>, фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем (Гексан:EtOAc=3:7) с получением *трет*-бутил 4-(3-(4-метилпиперидин-1-ил)-4-нитрофенил)пиперазин-1-карбоксилата в виде белого твердого вещества (1,42 г, 89,8% выход). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,99 (д, J=10,0 Гц, 1H), 6,38 (д, J=10,0 Гц, 1H), 6,31 (с, 1H), 3,58 (т, J=5,0 Гц, 4H), 3,34 (т, J=5,0 Гц, 4H), 2,28 (т, J=5,0 Гц, 2H), 2,78 (д, J=10,0 Гц, 2H), 1,70 (д, J=5,0 Гц, 2H), 1,55-1,51 (м, 3H), 1,47 (с, 9H), 1,00 (д, J=5,0 Гц, 3H).

**4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)анилин (6a):** К смеси 1-метил-4-(4-нитро-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазина (1,2 г, 3,94 ммоль) и NH<sub>4</sub>Cl (2,10 г, 39,4 ммоль) в ТГФ/MeOH/H<sub>2</sub>O (10:5:3) (20 мл) добавляют Zn порошок (2,57 г, 39,4 ммоль) при 90°C, затем смесь кипятят с обратным холодильником в течение 1 ч. После завершения реакции, реакционную смесь фильтруют через Целит и разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным MgSO<sub>4</sub>, фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH=9:1) с получением 4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)анилина в виде коричневого твердого вещества (0,98 г, 90,7% выход).

**4-(4-Метилпиперазин-1-ил)-2-(4-метилпиперидин-1-ил)анилин (6b):** К смеси 1-Метил-4-(3-(4-метилпиперидин-1-ил)-4-нитрофенил)пиперазина (1,2 г, 3,76 ммоль) и NH<sub>4</sub>Cl (2,01 г, 37,6 ммоль) в ТГФ/MeOH/H<sub>2</sub>O (10:5:3) (20 мл) добавляют Zn порошок (2,46 г, 37,6 ммоль) при 90°C, затем смесь кипятят с обратным холодильником в течение 1 ч. После завершения реакции, реакционную смесь фильтруют через Целит и разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным MgSO<sub>4</sub>, фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=9:1) с получением 4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(4-метилпиперидин-1-ил)анилина в виде коричневого твердого вещества (1,0 г, 92,0% выход).

***Трет*-бутил 4-(4-амино-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилат**

**(6с):** К смеси *трет*-бутил 4-(4-нитро-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата (1,20 г, 3,07 ммоль) и  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1,64 г, 30,7 ммоль) в ТГФ/МеОН/Н<sub>2</sub>О (10:5:3) (20 мл) добавляют Zn порошок (2,0 г, 30,7 ммоль) при 90°C, затем смесь кипятят с обратным холодильником в течение 1 ч. После завершения реакции, реакцию смесь фильтруют через Целит и разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным  $\text{MgSO}_4$ , фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1$ ) с получением *трет*-бутил 4-(4-амино-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата в виде коричневого твердого вещества (1,0 г, 90,3% выход).

***Трет*-бутил 4-(4-амино-3-(4-метилпиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилат (6d):** К смеси *трет*-бутил 4-(3-(4-метилпиперидин-1-ил)-4-нитрофенил)пиперазин-1-карбоксилата (1,2 г, 2,96 ммоль) и  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1,58 г, 29,6 ммоль) в ТГФ/МеОН/Н<sub>2</sub>О (10:5:3) (20 мл) добавляют Zn порошок (1,93 г, 29,6 ммоль) при 90°C, затем смесь кипятят с обратным холодильником в течение 1 ч. После завершения реакции, реакцию смесь фильтруют через Целит и разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным  $\text{MgSO}_4$ , фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1$ ) с получением *трет*-бутил 4-(4-амино-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата в виде коричневого твердого вещества (1,0 г, 90,0% выход).

**5-Циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамид (1a) (JHU11744):** К смеси 4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)анилина (0,5 г, 1,82 ммоль), 5-цианофуран-2-карбоновой кислоты (0,3 г, 2,18 ммоль), ГАТУ (0,83 г, 2,18 ммоль) в ДМФ (10 мл) добавляют ДИПЭА (0,63 мл, 3,64 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и затем разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным  $\text{MgSO}_4$ , фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1$ ) с получением 5-циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксиамида в виде желтого твердого вещества (0,6 г, 84,5% выход). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,53 (с, 1H), 8,31 (д, J=8,7 Гц, 1H), 7,23 (д, J=16,6 Гц, 2H), 6,80 (с, 1H), 6,72 (д, J=8,8 Гц, 1H), 3,20 (с, 4H), 2,85 (с, 4H), 2,59 (с, 4H), 2,36 (с, 3H), 1,80 (с, 4H), 1,65 (с, 2H).

**5-Циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(4-метилпиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамид (1с) (JHU11734):** К смеси 4-(4-Метилпиперазин-1-ил)-2-(4-метилпиперидин-1-ил)анилина (0,5 г, 1,73 ммоль), 5-цианофуран-2-карбоновой кислоты (0,28 г, 2,08 ммоль), ГАТУ (0,79 г, 2,08 ммоль) в ДМФ (10 мл) добавляют ДИПЭА (0,60 мл, 3,46 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и затем разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным  $\text{MgSO}_4$ , фильтруют и

концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1$ ) с получением 5-циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(4-метилпиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамида в виде желтого твердого вещества (0,62 г, 87,8% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,60 (с, 1H), 8,30 (д,  $J=5,0$  Гц, 1H), 7,25 (д,  $J=5,0$  Гц, 1H), 7,21 (д,  $J=5,0$  Гц, 1H), 6,79 (с, 1H), 6,72 (д,  $J=5,0$  Гц, 1H), 3,19 (т,  $J=5,0$  Гц, 4H), 2,99 (т,  $J=5,0$  Гц, 2H), 2,73 (т,  $J=10,0$  Гц, 2H), 2,59 (т,  $J=5,0$  Гц, 4H), 2,36 (с, 3H), 1,84 (д,  $J=10,0$  Гц, 2H), 1,52-1,47 (м, 3H), 1,07 (д,  $J=5,0$  Гц, 3H).

**4-Циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(4-метилпиперидин-1-ил)фенил)-1H-пиррол-2-карбоксамид (1e) (JHU11761):** К смеси 4-(4-Метилпиперазин-1-ил)-2-(4-метилпиперидин-1-ил)анилина (0,5 г, 1,73 ммоль), 5-цианофуран-2-карбоновой кислоты (0,28 г, 2,08 ммоль), ГАТУ (0,79 г, 2,08 ммоль), в ДМФ (10 мл) добавляют ДИПЭА (0,60 мл, 3,46 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и затем разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным  $\text{MgSO}_4$ , фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1$ ) с получением 4-циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(4-метилпиперидин-1-ил)фенил)-1H-пиррол-2-карбоксамида в виде коричневого твердого вещества (0,62 г, 87,8% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,58 (с, 1H), 9,0 (с, 1H), 8,25 (д,  $J=5,0$  Гц, 1H), 7,45 (с, 1H), 6,82 (д,  $J=10,0$  Гц, 2H), 6,72 (д,  $J=5,0$  Гц, 1H), 3,19 (т,  $J=5,0$  Гц, 4H), 2,99 (т,  $J=5,0$  Гц, 2H), 2,73 (т,  $J=10,0$  Гц, 2H), 2,60 (т,  $J=5,0$  Гц, 4H), 2,37 (с, 3H), 1,84 (д,  $J=10,0$  Гц, 3H), 1,52-1,47 (м, 2H), 1,08 (д,  $J=5,0$  Гц, 3H).

**4-Циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамид (1g) (JHU11765):** К смеси 4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)анилина (0,5 г, 1,82 ммоль), 4-цианофуран-2-карбоновой кислоты (0,3 г, 2,18 ммоль), ГАТУ (0,83 г, 2,18 ммоль) в ДМФ (10 мл) добавляют ДИПЭА (0,63 мл, 3,64 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и затем разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным  $\text{MgSO}_4$ , фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1$ ) с получением 4-циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамида в виде бледно-желтого твердого вещества (0,62 г, 86,1% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,41 (с, 1H), 8,31 (д,  $J=8,7$  Гц, 1H), 8,03 (с, 1H), 7,33 (с, 1H), 6,78 (с, 1H), 6,72 (д,  $J=8,8$  Гц, 1H), 3,19 (с, 4H), 2,83 (с, 4H), 2,59 (с, 4H), 2,36 (с, 3H), 1,76 (с, 4H), 1,63 (с, 2H).

**5-Циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-3-карбоксамид (1h) (JHU11766):** К смеси 4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)анилина (0,5 г, 1,82 ммоль), 5-цианофуран-3-карбоновой кислоты (0,3 г, 2,18 ммоль), ГАТУ (0,83 г, 2,18 ммоль) в ДМФ (10 мл) добавляют ДИПЭА (0,63 мл, 3,64 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и затем разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют,

сушат над безводным  $MgSO_4$ , фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем ( $CH_2Cl_2:MeOH=9:1$ ) с получением 5-циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-3-карбоксамид в виде желтого твердого вещества (0,6 г, 84,5% выход).  $^1H$  ЯМР (500 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,92 (с, 1H), 8,28 (д,  $J=8,3$  Гц, 1H), 8,11 (с, 1H), 7,37 (с, 1H), 6,79 (с, 1H), 6,73 (д,  $J=8,7$  Гц, 1H), 3,18 (с, 4H), 2,82 (с, 4H), 2,59 (с, 4H), 2,36 (с, 3H), 1,74 (с, 4H), 1,65 (с, 2H).

**6-Фтор-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)пиколинамид (Ii) (JHU11767):** К смеси 4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)анилина (0,5 г, 1,82 ммоль), 6-фторпиколиновой кислоты (0,308 г, 2,18 ммоль), ГАТУ (0,83 г, 2,18 ммоль) в ДМФ (10 мл) добавляют ДИПЭА (0,63 мл, 3,64 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и затем разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным  $MgSO_4$ , фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем ( $CH_2Cl_2:MeOH=9:1$ ) с получением 5-циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамид в виде желтого твердого вещества (0,52 г, 72,2% выход).  $^1H$  ЯМР (500 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  10,66 (с, 1H), 8,45 (д,  $J=8,8$  Гц, 1H), 8,17 (д,  $J=7,0$  Гц, 1H), 7,10 (д,  $J=8,2$  Гц, 1H), 6,78 (с, 1H), 6,72 (д,  $J=8,8$  Гц, 1H), 3,21 (с, 4H), 2,87 (с, 4H), 2,62 (с, 4H), 2,38 (с, 3H), 1,87 (с, 4H), 1,64 (с, 2H).

**6-Бром-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)пиколинамид (Ii) (JHU11769):** К смеси 4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)анилина (0,5 г, 1,82 ммоль), 6-бромпиколиновой кислоты (0,441 г, 2,18 ммоль), ГАТУ (0,83 г, 2,18 ммоль) в ДМФ (10 мл) добавляют ДИПЭА (0,63 мл, 3,64 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и затем разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным  $MgSO_4$ , фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем ( $CH_2Cl_2:MeOH=9:1$ ) с получением 5-циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамид в виде желтого твердого вещества (0,53 г, 63,8% выход).  $^1H$  ЯМР (500 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  10,89 (с, 1H), 8,45 (д,  $J=8,7$  Гц, 1H), 8,23 (д,  $J=7,0$  Гц, 1H), 7,74 (т,  $J=7,6$  Гц, 1H), 7,62 (д,  $J=7,3$  Гц, 1H), 6,79 (с, 1H), 6,73 (д,  $J=8,8$  Гц, 1H), 3,20 (с, 4H), 2,87 (с, 4H), 2,60 (с, 4H), 2,36 (с, 3H), 1,91 (с, 4H), 1,64 (с, 2H).

**Трет-бутил 4-(4-(5-цианофуран-2-карбоксамидо)-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилат (7a):** К смеси трет-бутил 4-(4-амино-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата (0,5 г, 1,38 ммоль), 5-цианофуран-2-карбоновой кислоты (0,23 г, 1,66 ммоль), ГАТУ (0,63 г, 1,66 ммоль) в ДМФ (10 мл) добавляют ДИПЭА (0,48 мл, 2,76 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и затем разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным  $MgSO_4$ , фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с

силикагелем ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1$ ) с получением *трет*-бутил 4-(4-(5-цианофуран-2-карбоксамидо)-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата в виде желтого твердого вещества (0,60 г, 90,9% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,59 (с, 1H), 8,31 (д,  $J=5,0$  Гц, 1H), 7,25 (д,  $J=5,0$  Гц, 1H), 7,21 (д,  $J=5,0$  Гц, 1H), 6,79 (с, 1H), 6,72 (д,  $J=5,0$  Гц, 1H), 3,58 (т,  $J=5,0$  Гц, 4H), 3,10 (т,  $J=5,0$  Гц, 4H), 2,99 (т,  $J=5,0$  Гц, 2H), 2,72 (т,  $J=10,0$  Гц, 2H), 1,83 (д,  $J=10,0$  Гц, 2H), 1,55-1,51 (м, 3H), 1,49 (с, 9H).

***Трет*-бутил 4-(4-(5-цианофуран-2-карбоксамидо)-3-(4-метилпиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилат (7b):** К смеси *трет*-бутил 4-(4-амино-3-(4-метилпиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата (0,5 г, 1,33 ммоль), 5-цианофуран-2-карбоновой кислоты (0,22 г, 1,60 ммоль), ГАТУ (0,61 г, 1,60 ммоль) в ДМФ (10 мл) добавляют ДИПЭА (0,46 мл, 2,66 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и затем разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным  $\text{MgSO}_4$ , фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1$ ) с получением *Трет*-бутил 4-(4-(5-цианофуран-2-карбоксамидо)-3-(4-метилпиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата в виде желтого твердого вещества (0,58 г, 88,0% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,59 (с, 1H), 8,31 (д,  $J=5,0$  Гц, 1H), 7,25 (д,  $J=5,0$  Гц, 1H), 7,21 (д,  $J=5,0$  Гц, 1H), 6,79 (с, 1H), 6,72 (д,  $J=5,0$  Гц, 1H), 3,58 (т,  $J=5,0$  Гц, 4H), 3,10 (т,  $J=5,0$  Гц, 4H), 2,99 (т,  $J=5,0$  Гц, 2H), 2,72 (т,  $J=10,0$  Гц, 2H), 1,83 (д,  $J=10,0$  Гц, 2H), 1,55-1,51 (м, 3H), 1,49 (с, 9H), 1,07 (д,  $J=5,0$  Гц, 3H).

***Трет*-бутил 4-(4-(4-циано-1H-пиррол-2-карбоксамидо)-3-(4-метилпиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилат (7c):** К смеси *трет*-бутил 4-(4-амино-3-(4-метилпиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата (0,5 г, 1,33 ммоль), 4-циано-1H-пиррол-2-карбоновой кислоты (0,23 г, 1,60 ммоль), ГАТУ (0,61 г, 1,60 ммоль) в ДМФ (10 мл) добавляют ДИПЭА (0,46 мл, 2,66 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и затем разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным  $\text{MgSO}_4$ , фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1$ ) с получением *Трет*-бутил 4-(4-(4-циано-1H-пиррол-2-карбоксамидо)-3-(4-метилпиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата в виде желтого твердого вещества (0,58 г, 88,0% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,40 (с, 1H), 8,99 (с, 1H), 8,26 (д,  $J=5,0$  Гц, 1H), 7,45 (с, 1H), 6,83 (д,  $J=10,0$  Гц, 2H), 6,73 (д,  $J=5,0$  Гц, 1H), 3,58 (т,  $J=5,0$  Гц, 4H), 3,10 (т,  $J=5,0$  Гц, 4H), 2,99 (т,  $J=5,0$  Гц, 2H), 2,72 (т,  $J=10,0$  Гц, 2H), 1,83 (д,  $J=10,0$  Гц, 2H), 1,55-1,51 (м, 3H), 1,49 (с, 9H), 1,07 (д,  $J=5,0$  Гц, 3H).

**5-Циано-N-(4-(пиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамид (1b) (JHU11745):** К раствору *трет*-бутил 4-(4-(5-цианофуран-2-карбоксамидо)-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата (0,5 г, 1,04 ммоль) в метиленхлориде (5 мл) добавляют трифторуксусную кислоту (0,39 мл, 5,21 ммоль) по каплям при  $0^\circ\text{C}$ , и затем смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 12 ч.

После завершения реакции, реакционную смесь концентрируют при пониженном давлении. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=9:1) с получением 5-циано-N-(4-(пиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамида в виде бледно-желтого твердого вещества (0,3 г, 76,0% выход). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,54 (с, 1H), 8,31 (д, J=5,0 Гц, 1H), 7,25 (д, J=5,0 Гц, 1H), 7,21 (д, J=5,0 Гц, 1H), 6,79 (с, 1H), 6,73 (д, J=8,8 Гц, 1H), 3,18 (с, 4H), 3,11 (с, 4H), 2,85 (с, 4H), 2,36 (с, 1H), 1,80 (с, 4H), 1,66 (с, 2H).

**5-Циано-N-(2-(4-метилпиперидин-1-ил)-4-(пиперазин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамид (1d) (JHU11735):** К раствору *трет*-бутил 4-(4-(5-цианофуран-2-карбоксамидо)-3-(4-метилпиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата (0,5 г, 1,01 ммоль) в метиленхлориде (5 мл) добавляют трифторуксусную кислоту (0,37 мл, 5,05 ммоль) по каплям при 0°C, и затем смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 12 ч. После завершения реакции, реакционную смесь концентрируют при пониженном давлении. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=9:1) с получением 5-циано-N-(2-(4-метилпиперидин-1-ил)-4-(пиперазин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамида в виде бледно-желтого твердого вещества (0,32 г, 80,4% выход). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,60 (с, 1H), 8,31 (д, J=5,0 Гц, 1H), 7,25 (д, J=5,0 Гц, 1H), 7,21 (д, J=5,0 Гц, 1H), 6,79 (с, 1H), 6,72 (д, J=5,0 Гц, 1H), 3,15 (т, J=5,0 Гц, 4H), 3,08 (т, J=5,0 Гц, 4H), 2,99 (т, J=5,0 Гц, 2H), 2,73 (т, J=10,0 Гц, 2H), 1,84 (д, J=10,0 Гц, 2H), 1,57 (с, 1H), 1,55-1,51 (м, 3H), 1,07 (д, J=5,0 Гц, 3H).

**4-Циано-N-(2-(4-метилпиперидин-1-ил)-4-(пиперазин-1-ил)фенил)-1H-пиррол-2-карбоксамид (1f) (JHU11762):** К раствору *трет*-бутил 4-(4-(4-циано-1H-пиррол-2-карбоксамидо)-3-(4-метилпиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата (0,5 г, 1,02 ммоль) в метиленхлориде (5 мл) добавляют трифторуксусную кислоту (0,37 мл, 5,05 ммоль) по каплям при 0°C, и затем смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 12 ч. После завершения реакции, реакционную смесь концентрируют при пониженном давлении. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=9:1) с получением 4-циано-N-(2-(4-метилпиперидин-1-ил)-4-(пиперазин-1-ил)фенил)-1H-пиррол-2-карбоксамида в виде беловатого твердого вещества (0,30 г, 78,4% выход). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, MeOD) δ 10,45 (с, 1H), 8,98 (с, 1H), 8,24 (д, J=5,0 Гц, 1H), 7,45 (д, J=5,0 Гц, 1H), 6,83 (д, J=10,0 Гц, 2H), 6,72 (д, J=5,0 Гц, 1H), 3,15 (т, J=5,0 Гц, 4H), 3,08 (т, J=5,0 Гц, 4H), 2,99 (т, J=5,0 Гц, 2H), 2,73 (т, J=10,0 Гц, 2H), 1,84 (д, J=10,0 Гц, 2H), 1,57 (с, 1H), 1,55-1,51 (м, 3H), 1,07 (д, J=5,0 Гц, 3H).

**5-Циано-N-(4-(4-(2-фторэтил)пиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамид (1k) (JHU11763):** К раствору 5-циано-N-(4-(пиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамида (**1b**) (0,1 г, 0,26 ммоль) в ацетонитриле (1 мл) добавляют 2-фторэтилтозилат (0,07 г, 0,31 ммоль) и триэтиламин (0,053 г, 0,52 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при 90°C в течение ночи и затем разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным MgSO<sub>4</sub>, фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный

остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем (Метанол:Дихлорметан=0,5:9,5) с получением **1k** в виде бледно-желтого твердого вещества (0,06 г, 53,57% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,53 (с, 1H), 8,31 (д,  $J=8,7$  Гц, 1H), 7,25 (с, 1H), 7,21 (с, 1H), 6,79 (с, 1H), 6,72 (д,  $J=8,8$  Гц, 1H), 4,67 (с, 1H), 4,58 (с, 1H), 3,21 (с, 4H), 2,89-2,68 (м, 10H), 1,80 (с, 4H), 1,65 (с, 2H).

**4-Циано-N-(4-(4-(2-фторэтил)пиперазин-1-ил)-2-(4-метилпиперидин-1-ил)фенил)-1H-пиррол-2-карбоксамид (1l) (JHU11764):** К раствору 4-Циано-N-(2-(4-метилпиперидин-1-ил)-4-(пиперазин-1-ил)фенил)-1H-пиррол-2-карбоксамиды (**1f**) (0,1 г, 0,25 ммоль) в ацетонитриле (1 мл) добавляют 2-фторэтилтозилат (0,066 г, 0,305 ммоль) и триэтиламин (0,051 г, 0,50 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при 90°C в течение ночи и затем разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным  $\text{MgSO}_4$ , фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем (Метанол:Дихлорметан=0,5:9,5) с получением **1l** в виде бледно-желтого твердого вещества (0,057 г, 51,35% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,83 (с, 1H), 9,01 (с, 1H), 8,26 (д,  $J=8,4$  Гц, 1H), 7,45 (с, 1H), 6,83 (д,  $J=15,7$  Гц, 2H), 6,74 (д,  $J=8,6$  Гц, 1H), 4,67 (с, 1H), 4,58 (с, 1H), 3,21 (с, 4H), 2,98 (д,  $J=11,2$  Гц, 2H), 2,84-2,67 (м, 8H), 1,85 (д,  $J=12,8$  Гц, 2H), 1,43-1,26(м, 3H), 1,08 (д,  $J=6,4$  Гц, 3H).

**N-(4-(4-(2-бромэтил)пиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)-5-цианофуран-2-карбоксамид (1m) (JHU11768):** К раствору 5-циано-N-(4-(пиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксамиды (**1b**) (0,01 г, 0,026 ммоль) в ацетонитриле (1 мл) добавляют 1,2-дибромэтан (0,039 г, 2,10 ммоль) и триэтиламин (0,0053 г, 0,052 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при 90°C в течение ночи и затем разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным  $\text{MgSO}_4$ , фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем (Метанол:Дихлорметан=0,5:9,5) с получением **1m** в виде бледно-желтого твердого вещества (0,01 г, 83,33% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,53 (с, 1H), 8,31 (д,  $J=8,7$  Гц, 1H), 7,23 (д,  $J=17,5$  Гц, 2H), 6,80 (с, 1H), 6,72 (д,  $J=8,8$  Гц, 1H), 3,20 (с, 4H), 2,84 (с, 4H), 2,69 (с, 4H), 2,64 (с, 2H), 1,80 (с, 4H), 1,65 (с, 2H).

**трет-Бутиловый эфир 4-(4-аминофенил)-3,6-дигидро-2H-пиридин-1-карбоновая кислота (10):** Раствор 4-(4,4,5,5-тетраметил[1,3,2]диоксаборолан-2-ил)фениламина (4,0 г, 18 ммоль), трет-бутилового эфира 4-трифторметансульфонилокси-3,6-дигидро-2H-пиридин-1-карбоновой кислоты (7,4 г, 22 ммоль) и 2 М водного  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (80 мл) в толуоле (160 мл) и EtOH (80 мл) помещают под аргон и нагревают 80°C в течение 3 ч. Смесь промывают 1 М водным NaOH, и органический слой удаляют, сушат ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) и концентрируют в вакууме. Остаток очищают хроматографией на силикагеле, элюируя 20% EtOAc/гексаном с получением 3,2 г (63%) указанного в заголовке соединения в виде желтой пены.  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 500 МГц):  $\delta$  7,18–7,23 (м, 2H,  $J=8,4$  Гц), 6,64–6,69 (м, 2H,  $J=8,6$  Гц), 5,90 (шс, 1H), 4,02–4,08 (м, 2H), 3,68 (с, 2H), 3,62 (т, 2H,  $J=5,6$

Гц), 2,48 (шс, 2Н), 1,49 (с, 9Н).

***трет*-Бутиловый эфир 4-(4-аминофенил)пиперидин-1-карбоновой кислоты (11):** Раствор *трет*-бутилового эфира 4-(4-аминофенил)-3,6-дигидро-2Н-пиридин-1-карбоновой кислоты (0,350 г, 1,28 ммоль) в метаноле гидрируют над 10% Pd/C при 20 ф./кв.д. в течение 1 ч. Раствор фильтруют через диатомовую землю, и фильтрат концентрируют с получением 0,35 г (100%) указанного в заголовке соединения в виде желтого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 500 МГц):  $\delta$  6,96–7,01 (д, 2Н,  $J=8,4$  Гц), 6,62–6,67 (д, 2Н,  $J=8,4$  Гц), 4,21 (шс, 2Н), 3,58 (шс, 2Н), 2,77 (т, 2Н,  $J=12,6$  Гц), 2,53 (тт, 1Н,  $J=12,1$ , 3,5 Гц), 1,77 (д, 2Н,  $J=12,3$  Гц), 1,52–1,59, (м, 2Н), 1,48 (с, 9Н).

***трет*-Бутиловый эфир 4-(4-амино-3-бромфенил)пиперидин-1-карбоновой кислоты (12):** К раствору *трет*-бутилового эфира 4-(4-аминофенил)пиперидин-1-карбоновой кислоты (0,20 г, 0,71 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 мл) добавляют N-бромсукцинимид (NBS) (0,13 г, 0,71 ммоль), и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 10 ч. Реакционную смесь разбавляют EtOAc (10 мл) и промывают насыщенным водным  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 10$  мл) и насыщенным раствором соли (10 мл). Концентрация органического слоя дает 0,26 г (100%) указанного в заголовке соединения в виде желтой пены.  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 500 МГц):  $\delta$  7,27 (д, 1Н,  $J=2,1$  Гц), 6,96 (дд, 1Н,  $J=8,1$ , 1,9 Гц), 6,73 (д, 1Н,  $J=8,1$  Гц), 4,24 (шс, 2Н), 4,01 (шс, 2Н), 2,78 (т, 2Н,  $J=12,2$  Гц), 2,53 (тт, 1Н,  $J=12,2$ , 3,3 Гц), 1,79 (д, 2Н,  $J=12,6$  Гц), 1,52–1,59 (м, 2Н), 1,50 (с, 9Н).

***трет*-Бутиловый эфир 4-(4-амино-3-циклогекс-1-енилфенил)пиперидин-1-карбоновой кислоты (13):** *трет*-Бутиловый эфир 4-(4-амино-3-бромфенил)пиперидин-1-карбоновой кислоты (0,13 г, 0,42 ммоль), циклогекс-1-енилбороновую кислоту 4 (0,08 г, 0,63 ммоль),  $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ . ДХМ (0,034 г, 0,042) водный 2 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1,5 мл) в 1,4-диоксане нагревают при  $100^\circ\text{C}$  в течение 20 ч. Реакционную смесь разбавляют EtOAc (10 мл) и промывают насыщенным водным  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 10$  мл) и насыщенным раствором соли (10 мл) и органический слой сушат над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и затем концентрируют. Остаток очищают хроматографией на силикагеле, 30% EtOAc/гексан, с получением 0,12 г (85%) указанного в заголовке соединения в виде желтого масла.  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 500 МГц):  $\delta$  6,90 (дд, 1Н,  $J=8,1$ , 2,1 Гц), 6,85 (д, 1Н,  $J=1,9$  Гц), 6,67 (д, 1Н,  $J=8,1$  Гц), 5,76 (дкв, 1Н,  $J=3,5$ , 1,8 Гц), 4,23 (шс, 2Н), 3,71 (с, 2Н), 2,79 (т, 2Н,  $J=12,7$  Гц), 2,54 (тт, 1Н,  $J=12,3$ , 3,4 Гц), 2,22–2,29 (м, 2Н), 2,16–2,22 (м, 2Н), 1,62–1,85 (м, 8Н), 1,50 (с, 9Н).

***трет*-Бутиловый эфир (4-[[4-циано-1-(2-триметилсиланилэтоксиметил)-1Н-имидазол-2-карбонил]амино]-3-циклогекс-1-енилфенил)пиперидин-1-карбоновой кислоты (15):** К раствору калиевой соли 4-циано-1-(2-триметилсиланилэтоксиметил)-1Н-имидазол-2-карбоксилата (3,34 г, 10,9 ммоль) в 20 мл ДМФ добавляют ДИПЭА (3,80 мл, 21,8 ммоль) и ГАТУ (11,02 г, 12,0 ммоль) и реакционную смесь перемешивают при  $25^\circ\text{C}$  в течение 15 мин. Добавляют раствор *трет*-бутилового эфира 4-(4-амино-3-циклогекс-1-енилфенил)пиперидин-1-карбоновой кислоты (3,92 г, 11,0 ммоль) в 10 мл ДМФ, и реакционную смесь перемешивают в течение 12 ч при  $25^\circ\text{C}$ . Реакционную смесь The разбавляют EtOAc (60 мл) и промывают насыщенным водным  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 60$  мл) и

насыщенным раствором соли (100 мл), и органический слой сушат над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и затем концентрируют. Остаток очищают флэш-хроматографией (силикагель, 2%  $\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) с получением 5,5 г (85%) указанного в заголовке соединения в виде желтого масла.  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 500 МГц):  $\delta$  9,68 (с, 1H), 8,25 (д, 1H,  $J=8,4$  Гц), 7,78 (с, 1H), 7,12 (дд, 1H,  $J=8,6, 2,1$  Гц), 7,02 (д, 1H,  $J=2,1$  Гц), 5,96 (с, 2H), 5,83 (дт, 1H,  $J=3,6, 1,9$  Гц), 4,25 (шс, 2H), 3,63–3,69 (м, 2H), 2,80 (т, 2H,  $J=11,7$  Гц), 2,63 (тт, 1H,  $J=12,2, 3,5$  Гц), 2,27–2,33 (м, 2H), 2,20–2,27 (м, 2H), 1,77–1,87 (м, 6H), 1,56–1,68 (м, 2H), 1,49 (с, 9H), 0,95–1,00 (м, 2H), 0,01 (с, 9H).

**Соль трифторуксусной кислоты (2-циклогекс-1-енил-4-пиперидин-4-илфенил)амида 4-циано-1H-имидазол-2-карбоновой кислоты (16):** К раствору *трет*-бутилового эфира 4-(4-{[4-циано-1-(2-триметилсиланилэтоксиметил)-1H-имидазол-2-карбонил]амино}-3-циклогекс-1-енилфенил)пиперидин-1-карбоновой кислоты 7 (1,50 г, 2,48 ммоль) в 10 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  добавляют 3 мл ТФК, и раствор перемешивают в течение 20 ч при 25°C. Реакционную смесь разбавляют 5 мл  $\text{EtOH}$  и затем концентрируют. Остаток кристаллизуют из метанола и этилового эфира с получением 0,85 г (70%) указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 МГц):  $\delta$  8,18 (д, 1H,  $J=8,4$  Гц), 8,04 (с, 1H), 7,22 (дд, 1H,  $J=8,6, 2,1$  Гц), 7,12 (д, 1H,  $J=2,3$  Гц), 5,76 (м, 1H), 3,54 (м, 2H), 3,16 (м, 2H), 2,92 (м, 1H), 2,30 (м, 4H), 2,10 (м, 2H), 1,87 (м, 6H).

**{2-Циклогекс-1-енил-4-[1-(2-диметиламиноацетил)пиперидин-4-ил]фенил}амид 4-циано-1H-имидазол-2-карбоновой кислоты (1g) (JHU11759):** Суспензию соли трифторуксусной кислоты (2-циклогекс-1-енил-4-пиперидин-4-илфенил)амида 4-циано-1H-имидазол-2-карбоновой кислоты (0,655 г, 1,34 ммоль) в ДМФ (15 мл) добавляют ГАТУ (0,61 г, 1,60 ммоль) и ДИПЭА (0,932 мл, 5,35 ммоль) и перемешивают в течение 15 мин. Затем добавляют диметилглицин (0,15 г, 1,47 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и затем разделяют между  $\text{EtOAc}$  и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным  $\text{MgSO}_4$ , фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1$ ) с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 500 МГц):  $\delta$  9,49 (с, 1H), 8,24 (д, 1H,  $J=8,3$  Гц), 7,70 (с, 1H), 7,12 (дд, 1H,  $J=8,4, 2,1$  Гц), 7,01 (д, 1H,  $J=2,1$  Гц), 5,82 (м, 1H), 4,75 (д, 1H,  $J=13,4$  Гц), 4,13 (д, 1H,  $J=13,4$  Гц), 3,57 (д, 1H,  $J=14,2$  Гц), 3,18 (д, 1H,  $J=14,2$  Гц), 3,12 (тд, 1H,  $J=13,3, 2,4$  Гц), 2,73 (дддд, 1H,  $J=11,9, 11,9, 3,8, 3,8$  Гц), 2,65 (ддд, 1H,  $J=13,3, 13,3, 2,4$  Гц), 2,40 (с, 6H), 2,18–2,32 (м, 4H), 1,60–1,98 (м, 9H).

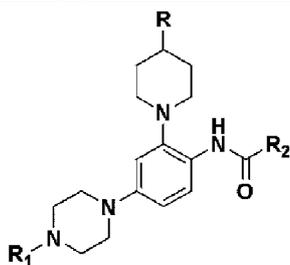
***Трет*-бутил ((4-(6-(4-циано-1H-имидазол-2-карбоксамидо)-2',3',4',5'-тетрагидро-[1,1'-бифенил]-3-ил)пиперидин-1-ил)метил)(метил)карбамат (17):** К суспензии соли трифторуксусной кислоты (2-циклогекс-1-енил-4-пиперидин-4-илфенил)амида 4-циано-1H-имидазол-2-карбоновой кислоты (0,15 г, 0,30 ммоль) в ДМФ (15 мл) добавляют ГАТУ (0,14 г, 0,36 ммоль) и ДИПЭА (0,212 мл, 1,22 ммоль) и перемешивают в течение 15 мин. Затем добавляют *N*-(трет-бутоксикарбонил)-*N*-

метилглицин (0,063 г, 0,33 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и затем разделяют между EtOAc и насыщенным раствором соли. Органический слой отделяют, сушат над безводным MgSO<sub>4</sub>, фильтруют и концентрируют в вакууме. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=9:1) с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, 500 МГц): δ 12,57 (с, 1H), 9,53 (с, 1H), 8,27 (д, J=5,0 Гц, 1H), 7,75 (с, 1H), 7,15-7,04 (м, 2H), 5,86 (с, 1H), 4,80 (с, 1H), 4,24-3,95 (м, 3H), 3,18 (д, J=10,0 Гц, 1H), 2,95 (с, 3H), 2,74-2,61 (м, 2H), 2,32-2,25 (м, 4H), 1,85-1,73 (м, 6H), 1,49 (с, 9H).

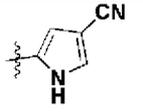
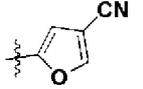
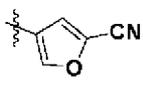
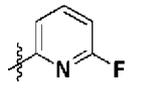
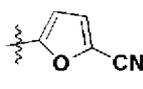
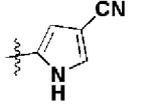
**4-Циано-N-(5-(1-(метилглицил)пиперидин-4-ил)-2',3',4',5'-тетрагидро-[1,1'-бифенил]-2-ил)-1H-имидазол-2-карбоксамид (1h) (JHU11760):** К раствору *трет*-бутил ((4-(6-(4-циано-1H-имидазол-2-карбоксамидо)-2',3',4',5'-тетрагидро-[1,1'-бифенил]-3-ил)пиперидин-1-ил)метил)(метил)карбамата (0,1 г, 0,18 ммоль) в метиленхлориде (5 мл) добавляют трифторуксусную кислоту (0,056 мл, 0,73 ммоль) по каплям при 0°C, и затем смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 12 ч. После завершения реакции, реакционную смесь концентрируют при пониженном давлении. Полученный остаток очищают хроматографией на колонке с силикагелем (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=9:1) с получением 4-циано-N-(5-(1-(метилглицил)пиперидин-4-ил)-2',3',4',5'-тетрагидро-[1,1'-бифенил]-2-ил)-1H-имидазол-2-карбоксамид в виде бледно-желтого твердого вещества (0,04 г, 46,0% выход). <sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, 500 МГц): δ 9,51 (с, 1H), 8,14 (д, J=5,0 Гц, 1H), 7,65 (с, 1H), 6,97-6,85 (м, 2H), 5,76 (с, 1H), 4,73 (д, J=10,0, 1H), 4,00-3,66 (м, 3H), 3,14 (д, J=10,0 Гц, 1H), 2,71-2,67 (м, 6H), 2,24 (д, J=5,0, 3H), 2,17-2,15 (м, 1H), 1,87-1,74 (с, 8H).

### ПРИМЕР 3

#### СРОДСТВО СВЯЗЫВАНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ CSF1R **1a**, **1c**, **1e**, **1g-1l**



Наименование соединения	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	IC <sub>50</sub> , нМ Ilig et al., 2008	IC <sub>50</sub> , нМ*	K <sub>D</sub> , нМ**
<b>1a</b> JHU11744	H	CH <sub>3</sub>		0,8	4,1	8,2
<b>1c</b> JHU11734	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>		1	1,9	2,5

<b>1e</b> JHU11761	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>		0,8	3,94	0,54
<b>1g</b> JHU11765	H	CH <sub>3</sub>				>1000
<b>1h</b> JHU11766	H	CH <sub>3</sub>				>1000
<b>1i</b> JHU11767	H	CH <sub>3</sub>				30
<b>1k</b> JHU11763	H	- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F			12,9	32
<b>1l</b> JHU11764	CH <sub>3</sub>	- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F			3,14	2,6

\* CSF1R RTK киназа человека. Ферментативный радиометрический анализ, Eurofins, коммерческий анализ; \*\* CSF1R анализ конкурентного связывания, KinomeScan, DiscoverX, коммерческий анализ

#### ССЫЛКИ

Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в описании, указывают на уровень специалистов в данной области, к которым относится раскрытый в данном случае объект. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки (например, веб-сайты, базы данных и т. д.), упомянутые в описании, включены в настоящее описание в качестве ссылки во всей своей полноте в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, заявка на патент, патент и другие ссылки были конкретно и индивидуально указаны для включения в качестве ссылки. Следует понимать, что, хотя здесь упоминается ряд заявок на патент, патентов и других ссылок, такая ссылка не является признанием того, что какой-либо из этих документов составляет часть общих знаний в данной области. В случае противоречия между спецификацией и любой из включенных ссылок, спецификация (включая любые ее поправки, которые могут быть основаны на включенной ссылке) имеет преимущественную силу. Здесь используются стандартные общепринятые в данной области значения терминов, если не указано иное. Здесь используются стандартные сокращения для различных терминов.

Masgrau R, Guaza C, Ransohoff RM, Galea E (2017) Should we stop saying ‘glia’ and ‘neuroinflammation’? Trends Mol Med 23:486-500.

Tronel C, et al. (2017) Molecular targets for PET imaging of activated microglia: The current situation and future expectations. Int J Mol Sci 18:E802.

Janssen B, Vugts DJ, Windhorst AD, Mach RH (2018) PET imaging of microglial activation-beyond targeting TSPO. Molecules 23:607.

Aguzzi A, Barres BA, Bennett ML (2013) Microglia: Scapegoat, saboteur, or something

else? *Science* 339:156-161.

Akiyama H, et al. (1994) Expression of the receptor for macrophage colony stimulating factor by brain microglia and its upregulation in brains of patients with Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res* 639:171-174.

Zhang Y, et al. (2014) An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci* 34:11929-11947.

Peyraud F, Cousin S, Italiano A (2017) CSF-1R inhibitor development: Current clinical status. *Curr Oncol Rep* 19:70.

Chitu V, Gokhan Ş, Nandi S, Mehler MF, Stanley ER (2016) Emerging roles for CSF-1 receptor and its ligands in the nervous system. *Trends Neurosci* 39:378-393.

Ginhoux F, et al. (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330:841-845.

Elmore MR, et al. (2014) Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron* 82:380-397.

Walker DG, Tang TM, Lue LF (2017) Studies on colony stimulating factor receptor-1 and ligands colony stimulating factor-1 and interleukin-34 in Alzheimer's disease brains and human microglia. *Front Aging Neurosci* 9:244.

Smith AM, et al. (2013) M-CSF increases proliferation and phagocytosis while modulating receptor and transcription factor expression in adult human microglia. *J Neuroinflammation* 10:85.

Palle P, Monaghan KL, Milne SM, Wan ECK (2017) Cytokine signaling in multiple sclerosis and its therapeutic applications. *Med Sci (Basel)* 5:E0023.

El-Gamal MI, et al. (2018) Recent advances of colony-stimulating factor-1 receptor (CSF-1R) kinase and its inhibitors. *J Med Chem* 61:5450-5466.

Lue LF, et al. (2001) Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and nondemented elderly microglia in vitro. *Glia* 35:72-79.

Murphy GM Jr, Zhao F, Yang L, Cordell B (2000) Expression of macrophage colony-stimulating factor receptor is increased in the AbetaPP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 157:895-904.

Yan SD, et al. (1997) An intracellular protein that binds amyloid-beta peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 389:689-695.

Boissonneault V, et al. (2009) Powerful beneficial effects of macrophage colony-stimulating factor on beta-amyloid deposition and cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Brain* 132:1078-1092.

Deczkowska A, et al. (2018) Disease-associated microglia: A universal immune sensor of neurodegeneration. *Cell* 173:1073-1081.

Keren-Shaul H, et al. (2017) A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease. *Cell* 169:1276-1290.e17.

Raivich G, et al. (1998) Regulation of MCSF receptors on microglia in the normal and injured mouse central nervous system: A quantitative immunofluorescence study using confocal

laser microscopy. *J Comp Neurol* 395:342-358.

Prieto-Morin C, Ayrignac X, Ellie E, Tournier-Lasserre E, Labauge P (2016) CSF1R-related leukoencephalopathy mimicking primary progressive multiple sclerosis. *J Neurol* 263:1864-1865.

Alterman RL, Stanley ER (1994) Colony stimulating factor-1 expression in human glioma. *Mol Chem Neuropathol* 21:177-188.

Lentz MR, et al. (2010) Exploring the relationship of macrophage colony-stimulating factor levels on neuroaxonal metabolism and cognition during chronic human immunodeficiency virus infection. *J Neurovirol* 16:368-376.

Bernard-Gauthier V, Schirrmacher R (2014) 5-(4-((4-[(18F)Fluorobenzyl]oxy)-3-methoxybenzyl)pyrimidine-2,4-diamine: A selective dual inhibitor for potential PET imaging of Trk/CSF-1R. *Bioorg Med Chem Lett* 24:4784-4790.

Illig CR, et al. (2008) Discovery of novel FMS kinase inhibitors as anti-inflammatory agents. *Bioorg Med Chem Lett* 18:1642-1648.

Krauser JA, et al. (2015) Phenotypic and metabolic investigation of a CSF-1R kinase receptor inhibitor (BLZ945) and its pharmacologically active metabolite. *Xenobiotica* 45:107-123.

DeNardo DG, et al. (2011) Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov* 1:54-67.

Melnikova T, et al. (2013) Reversible pathologic and cognitive phenotypes in an inducible model of Alzheimer-amyloidosis. *J Neurosci* 33:3765-3779.

Dobos N, et al. (2012) The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in a mouse model of neuroinflammation-induced depression. *J Alzheimers Dis* 28:905-915.

Qin L, et al. (2007) Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 55:453-462.

Jones MV, et al. (2008) Behavioral and pathological outcomes in MOG 35-55 experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 199:83-93.

Catorce MN, Gevorkian G (2016) LPS-induced murine neuroinflammation model: Main features and suitability for pre-clinical assessment of nutraceuticals. *Curr Neuropharmacol* 14:155-164.

Nandi S, et al. (2012) The CSF-1 receptor ligands IL-34 and CSF-1 exhibit distinct developmental brain expression patterns and regulate neural progenitor cell maintenance and maturation. *Dev Biol* 367:100-113.

Michaelson MD, et al. (1996) CSF-1 deficiency in mice results in abnormal brain development. *Development* 122:2661-2672.

Lee SC, et al. (1993) Macrophage colony-stimulating factor in human fetal astrocytes and microglia. Differential regulation by cytokines and lipopolysaccharide, and modulation of class II MHC on microglia. *J Immunol* 150:594-604.

Aid S, Parikh N, Palumbo S, Bosetti F (2010) Neuronal overexpression of cyclooxygenase-2 does not alter the neuroinflammatory response during brain innate immune

activation. *Neurosci Lett* 478:113-118.

Dickens AM, et al. (2014) Detection of microglial activation in an acute model of neuroinflammation using PET and radiotracers  $^{11}\text{C}$ -(R)-PK11195 and 18F-GE-180. *J Nucl Med* 55:466-472.

5. Federal Register §361.1 (2018), pp 21378-21381.

Hannestad J, et al. (2012) Endotoxin-induced systemic inflammation activates microglia: [ $^{11}\text{C}$ ]PBR28 positron emission tomography in nonhuman primates. *Neuroimage* 63:232-239.

Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B (2015) Immune attack: The role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* 16:358-372.

Hickman SE, El Khoury J (2014) TREM2 and the neuroimmunology of Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* 88:495-498.

Stabin MG, Sparks RB, & Crowe E (2005) OLINDA/EXM: the second-generation personal computer software for internal dose assessment in nuclear medicine. *J. Nucl. Med.* 46(6):1023- 1027.

Foster DM (1998) Developing and testing integrated multicompartiment models to describe a single-input multiple-output study using the SAAM II software system. *Adv Exp Med Biol* 445:59- 78.

Stabin MG & Siegel JA (2003) Physical models and dose factors for use in internal dose assessment. *Health Phys.* 85(3):294-310.

Beeton C, Garcia A, & Chandy KG (2007) Induction and clinical scoring of chronic-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Vis Exp* (5):224.

Horti AG, et al. (2016) 18F-FNDP for PET Imaging of Soluble Epoxide Hydrolase. *J. Nucl. Med.* 57(11):1817-1822.

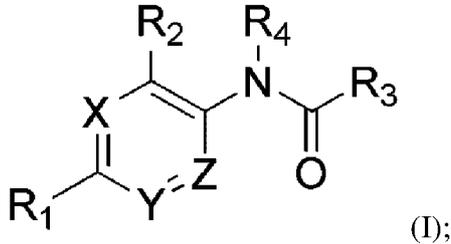
Rahmim A, Cheng JC, Blinder S, Camborde ML, & Sossi V (2005) Statistical dynamic image reconstruction in state-of-the-art high-resolution PET. *Phys. Med. Biol.* 50(20):4887-4912.

Logan J, et al. (1990) Graphical analysis of reversible radioligand binding from time-activity measurements applied to [N-11C-methyl]-(-)-cocaine PET studies in human subjects. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 10(5):740-747.

Хотя вышеупомянутый объект был описан довольно подробно посредством иллюстрации и примера с целью ясности понимания, специалистам в данной области техники будет понятно, что определенные изменения и модификации могут быть осуществлены в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Радиофармацевтический препарат для визуализации рецептора макрофагального колониестимулирующего фактора (CSF1R) у субъекта, страдающего или подозреваемого в наличии одного или нескольких нейровоспалительных или нейродегенеративных заболеваний или состояний, где радиофармацевтический препарат содержит соединение формулы (I):



где:

X, Y и Z каждый независимо выбирают из группы, состоящей из -N- и -CR<sub>5</sub>-, где R<sub>5</sub> выбирают из группы, состоящей из H, замещенного или незамещенного C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила или R\*, где R\* является группой, содержащей радиоизотоп, подходящий для визуализации позитронно-эмиссионной томографией (ПЭТ), или самим радиоизотопом;

R<sub>1</sub> выбирают из группы, состоящей из замещенного или незамещенного гетероалкила, замещенного или незамещенного гетероарила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкоксила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкиламино, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> диалкиламино, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил)(SO<sub>2</sub>)(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила), где R<sub>1</sub> необязательно может быть замещен R\* или R<sub>1</sub> может быть радиоизотопом, подходящим для визуализации ПЭТ;

R<sub>2</sub> является замещенным или незамещенным гетероалкилом, где R<sub>2</sub> необязательно может быть замещен R\*;

R<sub>3</sub> является замещенным или незамещенным гетероариллом, где R<sub>3</sub> необязательно может быть замещен R\*; и

R<sub>4</sub> выбирают из группы, состоящей из H, замещенного или незамещенного C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкоксила, циклоалкила, циклогетероалкила, арила и гетероарила; или его фармацевтически приемлемую соль;

где, по меньшей мере, один из R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> или R<sub>5</sub> замещен R\* или является радиоизотопом, подходящим для визуализации ПЭТ.

2. Радиофармацевтический препарат по пункту 1, где R<sub>1</sub> выбирают из группы, состоящей из замещенного или незамещенного пиперазинила, замещенного или незамещенного морфолинила, 1,1-диоксидтиоморфолинила, замещенного или незамещенного пиразолила, замещенного или незамещенного имидазолила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкоксила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкиламино, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> диалкиламино, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил)(SO<sub>2</sub>)(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила), где R<sub>1</sub> необязательно может быть замещен R\* или R<sub>1</sub> может быть радиоизотопом, подходящим для визуализации ПЭТ.

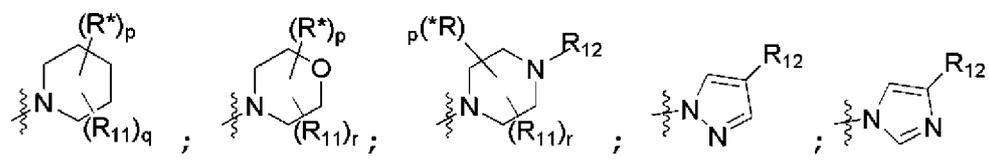
3. Радиофармацевтический препарат по пункту 1, где R<sub>2</sub> выбирают из группы, состоящей из замещенного или незамещенного пиперидинила и замещенного или

незамещенного морфолинила, где  $R_2$  необязательно может быть замещен  $R^*$ .

4. Радиофармацевтический препарат по пункту 1, где  $R_3$  выбирают из группы, состоящей из замещенного или незамещенного пирролила и замещенного или незамещенного фуридила, где  $R_3$  необязательно может быть замещен  $R^*$ .

5. Радиофармацевтический препарат по пункту 1, где  $R_1$  выбирают из группы,

состоящей из:



$R^*$ ;

где:

$p$  является целым числом, выбранным из 0 и 1;

$q$  является целым числом, выбранным из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3, 4 и 5;

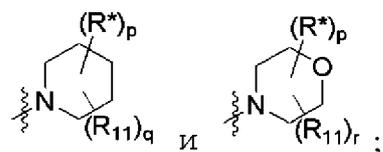
$r$  является целым числом, выбранным из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3 и 4;

$R_{11}$  выбирают из группы, состоящей из  $C_1$ - $C_8$  замещенного или незамещенного алкила,  $C_1$ - $C_8$  алкоксила, гидроксила, амина, циано, галогена, карбоксила и  $-CF_3$ ; и

$R_{12}$  выбирают из группы, состоящей из H, замещенного или незамещенного  $C_1$ - $C_8$  алкила, карбоксила,  $-(SO_2)-(C_1-C_8)$  алкила) и  $R^*$ .

6. Радиофармацевтический препарат по пункту 1, где  $R_2$  выбирают из группы,

состоящей из:



и

где:

$p$  является целым числом, выбранным из 0 и 1;

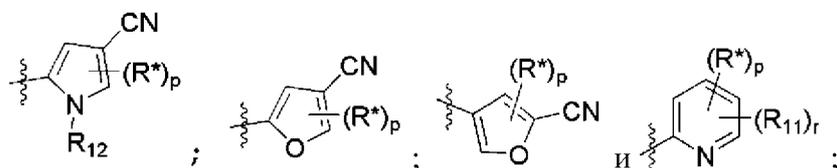
$q$  является целым числом, выбранным из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3, 4 и 5;

$r$  является целым числом, выбранным из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3 и 4;

$R_{11}$  выбирают из группы, состоящей из  $C_1$ - $C_8$  замещенного или незамещенного алкила,  $C_1$ - $C_8$  алкоксила, гидроксила, амина, циано, галогена, карбоксила и  $-CF_3$ .

7. Радиофармацевтический препарат по пункту 1, где  $R_3$  выбирают из группы,

состоящей из:



где:

$p$  является целым числом, выбранным из группы, состоящей из 0 и 1;

$R_{11}$  выбирают из группы, состоящей из  $C_1$ - $C_8$  замещенного или незамещенного алкила,  $C_1$ - $C_8$  алкоксила, гидроксила, амина, циано, галогена, карбоксила и  $-CF_3$ ; и

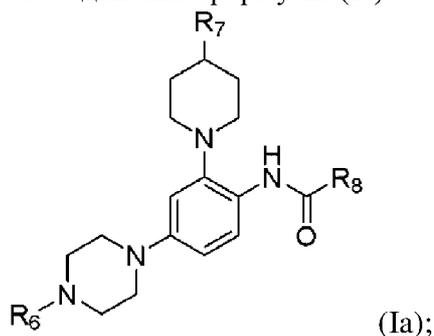
$R_{12}$  выбирают из группы, состоящей из H, замещенного или незамещенного  $C_1$ - $C_8$  алкила, карбоксила,  $-(SO_2)-(C_1-C_8)$  алкила) и  $R^*$ .

8. Радиофармацевтический препарат по пункту 1, где:

- (a) X, Y, Z каждый является  $-CR_5-$ ;
- (b) X и Z каждый является  $-N-$  и Y является  $-CR_5-$ ;
- (c) X является  $-N-$  и Y и Z каждый является  $-CR_5-$ ;
- (d) X и Y являются  $N$  и Z является  $-CR_5-$ ;
- (e) X и Y каждый является  $-CR_5-$  и Z является  $N$ ;

где  $R_5$ , по меньшей мере, в одном случае необязательно может быть замещен  $R^*$ .

9. Радиофармацевтический препарат по пункту 1, где соединением формулы (I) является соединение формулы (Ia):



где:

$R_6$  выбирают из группы, состоящей из H,  $C_1-C_8$  алкила,  $-C(=O)-O-R_9$  и  $-(CH_2)_n-R_{10}$ , где n является целым числом, выбранным из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8;  $R_9$  и  $R_{10}$  каждый является  $C_1-C_8$  прямым или разветвленным алкилом и где  $R_6$  необязательно может быть замещен  $R^*$  или  $R_6$  может быть  $R^*$ ;

$R_7$  выбирают из группы, состоящей из H или  $C_1-C_8$  алкила, где  $R_7$  необязательно может быть замещен  $R^*$  или  $R_7$  может быть  $R^*$ ; и

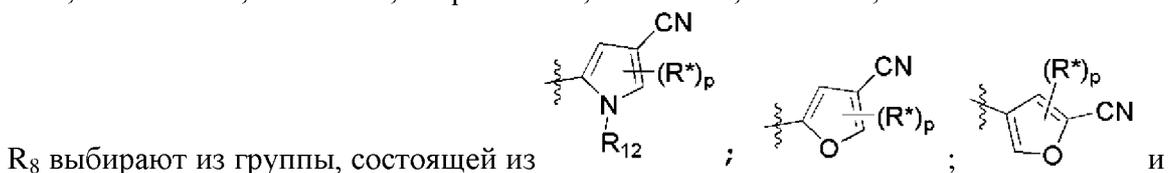
$R_8$  является замещенным или незамещенным пирролилом, фуранилом и пиридином, где  $R_8$  необязательно может быть замещен  $R^*$ ; или его фармацевтически приемлемая соль;

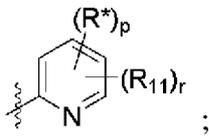
где, по меньшей мере, один из  $R_6$ ,  $R_7$  или  $R_8$  замещен  $R^*$  или является  $R^*$ .

10. Радиофармацевтический препарат по пункту 9, где:

$R_6$  выбирают из группы, состоящей из водорода, метила, этила, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, втор-бутила, трет-бутила, н-пентила, втор-пентила, изопентила, неопентила, н-гексила, втор-гексила, н-гептила, н-октила и  $-C(=O)-O-(C_1-C_8$  алкила)<sub>3</sub>;

$R_7$  выбирают из группы, состоящей из водорода, метила, этила, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, втор-бутила, трет-бутила, н-пентила, втор-пентила, изопентила, неопентила, н-гексила, втор-гексила, н-гептила, н-октила;





где:

$p$  является целым числом, выбранным из группы, состоящей из 0 и 1;

$R_{11}$  выбирают из группы, состоящей из  $C_1$ - $C_8$  замещенного или незамещенного алкила,  $C_1$ - $C_8$  алкоксила, гидроксила, амина, циано, галогена, карбоксила и  $-CF_3$ ; и

$R_{12}$  выбирают из группы, состоящей из H, замещенного или незамещенного  $C_1$ - $C_8$  алкила, карбоксила,  $-(SO_2)$ -( $C_1$ - $C_8$  алкила) и  $R^*$ ; и

где каждый из  $R_6$ ,  $R_7$  и  $R_8$  необязательно может быть замещен  $R^*$ .

11. Радиофармацевтический препарат по пункту 9, где радиофармацевтический препарат выбирают из группы, состоящей из:

5-Циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксиамида (1a);

5-Циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(4-метилпиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксиамида (1c);

4-Циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(4-метилпиперидин-1-ил)фенил)-1H-пиррол-2-карбоксиамида (1e);

4-Циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксиамида (1g);

5-Циано-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-3-карбоксиамида (1h);

6-Фтор-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)пиколинамида (1i);

6-Бром-N-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)пиколинамида (1i);

*Трет*-бутил 4-(4-(5-цианофуран-2-карбоксамидо)-3-(пиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата (7a);

*Трет*-бутил 4-(4-(5-цианофуран-2-карбоксамидо)-3-(4-метилпиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата (7b);

*Трет*-бутил 4-(4-(4-циано-1H-пиррол-2-карбоксамидо)-3-(4-метилпиперидин-1-ил)фенил)пиперазин-1-карбоксилата (7c);

5-Циано-N-(4-(пиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксиамида (1b);

5-Циано-N-(2-(4-метилпиперидин-1-ил)-4-(пиперазин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксиамида (1d);

4-Циано-N-(2-(4-метилпиперидин-1-ил)-4-(пиперазин-1-ил)фенил)-1H-пиррол-2-карбоксиамида (1f);

5-Циано-N-(4-(4-(2-фторэтил)пиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)фуран-2-карбоксиамида (1k);

4-Циано-N-(4-(4-(2-фторэтил)пиперазин-1-ил)-2-(4-метилпиперидин-1-ил)фенил)-1Н-пиррол-2-карбоксамид (1l);

N-(4-(4-(2-бромэтил)пиперазин-1-ил)-2-(пиперидин-1-ил)фенил)-5-цианофуран-2-карбоксамид (1m);

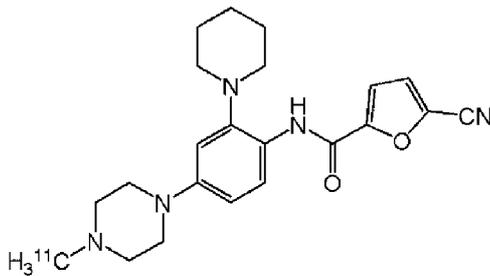
4-Циано-1Н-имидазол-2-карбоновой кислоты {2-Циклогекс-1-енил-4-[1-(2-диметиламиноацетил)пиперидин-4-ил]фенил}амида (1g); и

4-Циано-N-(5-(1-(метилглицил)пиперидин-4-ил)-2',3',4',5'-тетрагидро-[1,1'-бифенил]-2-ил)-1Н-имидазол-2-карбоксамид (1h).

12. Радиофармацевтический препарат по любому из пунктов 1-11, где R\* выбирают из группы, состоящей из  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$  и  $-(\text{CH}_2)_m\text{-R}_{13}$ , где R<sub>13</sub> является C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> прямым или разветвленным алкилом, который необязательно может быть замещен радиоизотопом, подходящим для ПЭТ-визуализации.

13. Радиофармацевтический препарат по любому из пунктов 1-12, где радиоизотоп, подходящий для ПЭТ-визуализации, выбирают из группы, состоящей из  $^{11}\text{C}$  и  $^{18}\text{F}$ .

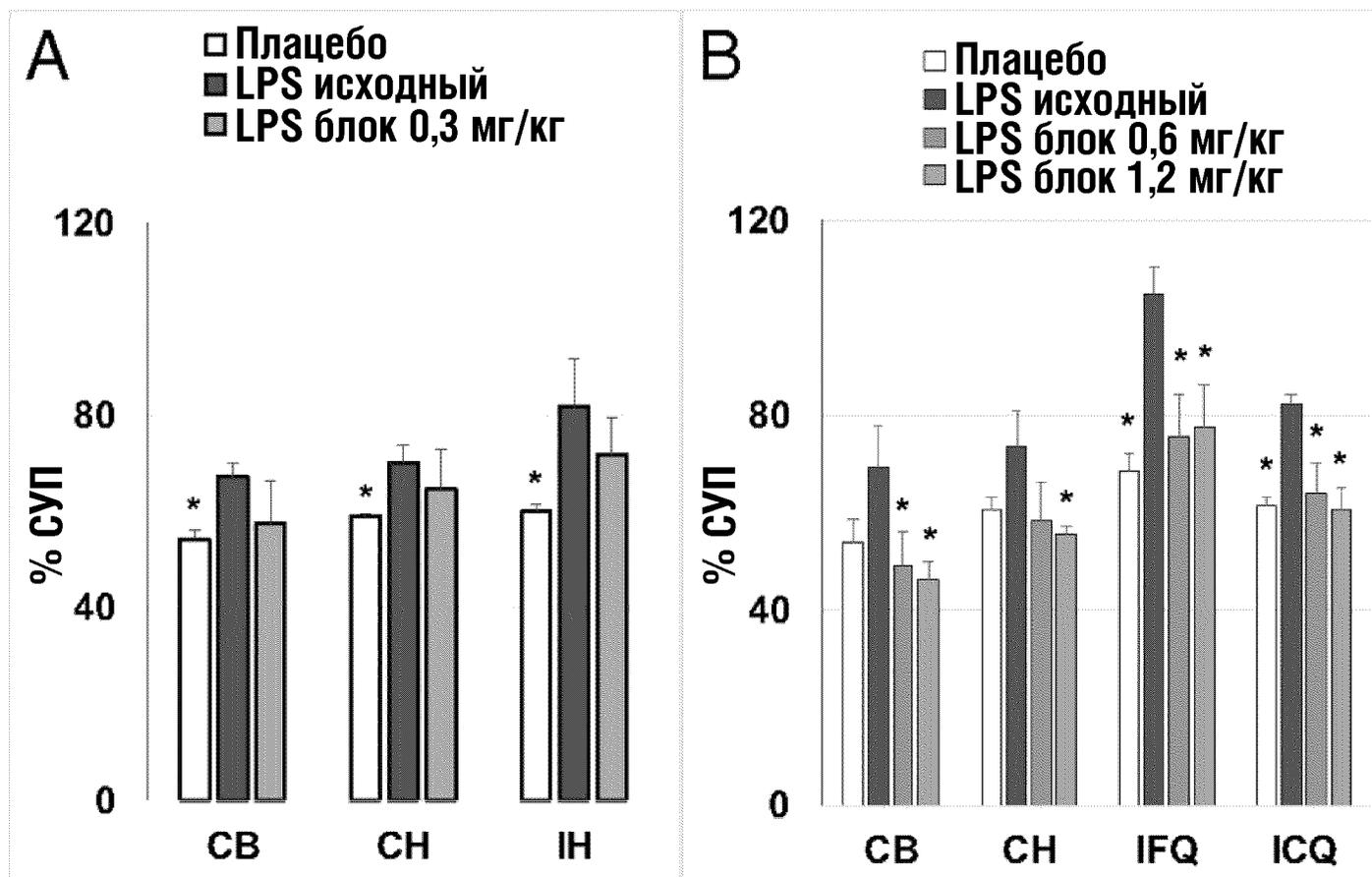
14. Радиофармацевтический препарат по пункту 1, где соединением формулы (I) является:



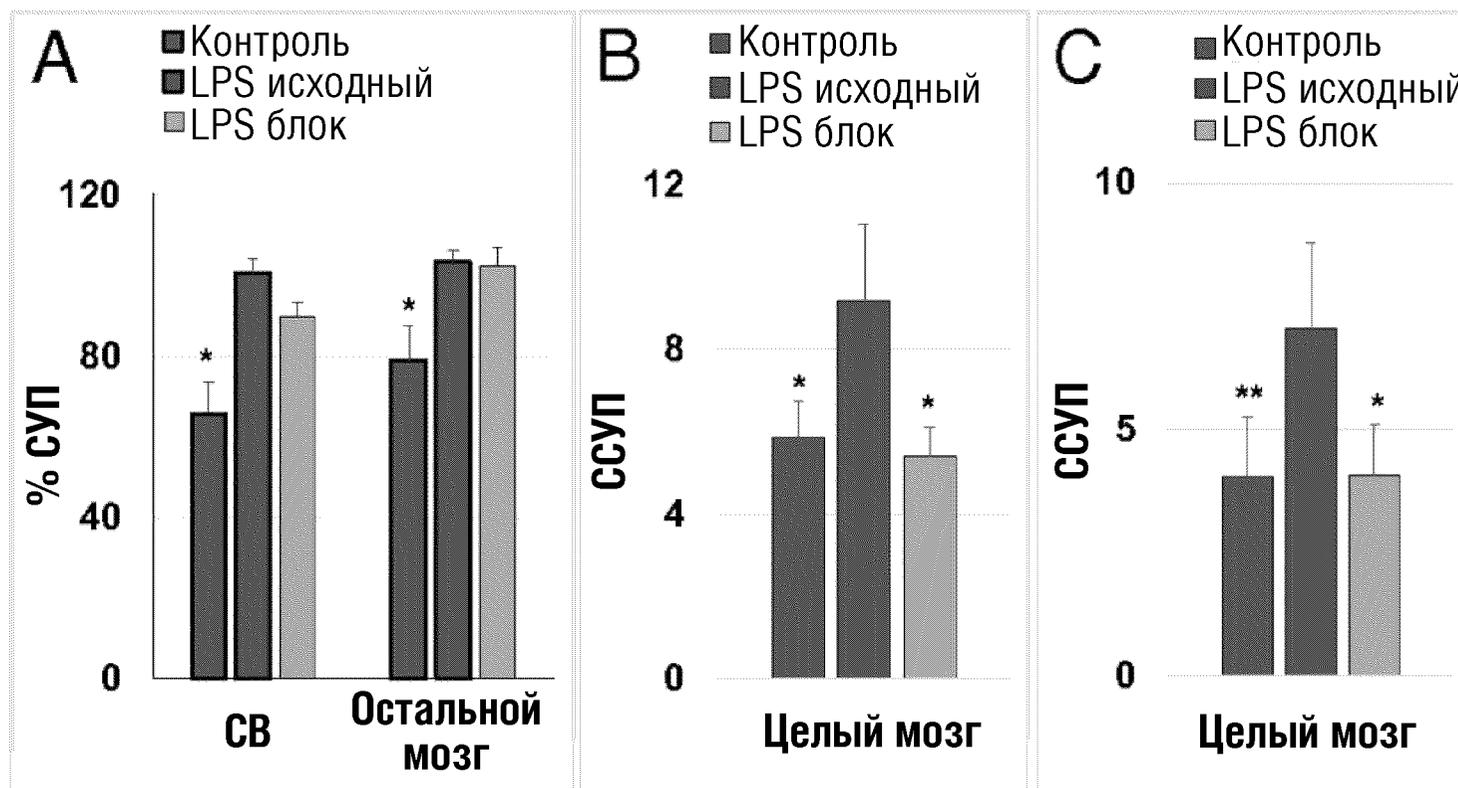
15. Способ визуализации рецептора макрофагального колониестимулирующего фактора (CSF1R) у субъекта, страдающего или подозреваемого в наличии одного или нескольких нейровоспалительных или нейродегенеративных заболеваний или состояний, где способ включает введение субъекту эффективного количества радиофармацевтического препарата по любому из пунктов 1-14, или его фармацевтически приемлемой соли и получение ПЭТ изображения.

16. Способ по пункту 15, где нейровоспалительное или нейродегенеративное заболевание или состояние выбирают из группы, состоящей из болезни Альцгеймера (БА), рассеянного склероза (РС), черепно-мозговой травмы, опухоли мозга, ВИЧ-ассоциированного когнитивного ухудшения и одного или нескольких демиелинирующих заболеваний.

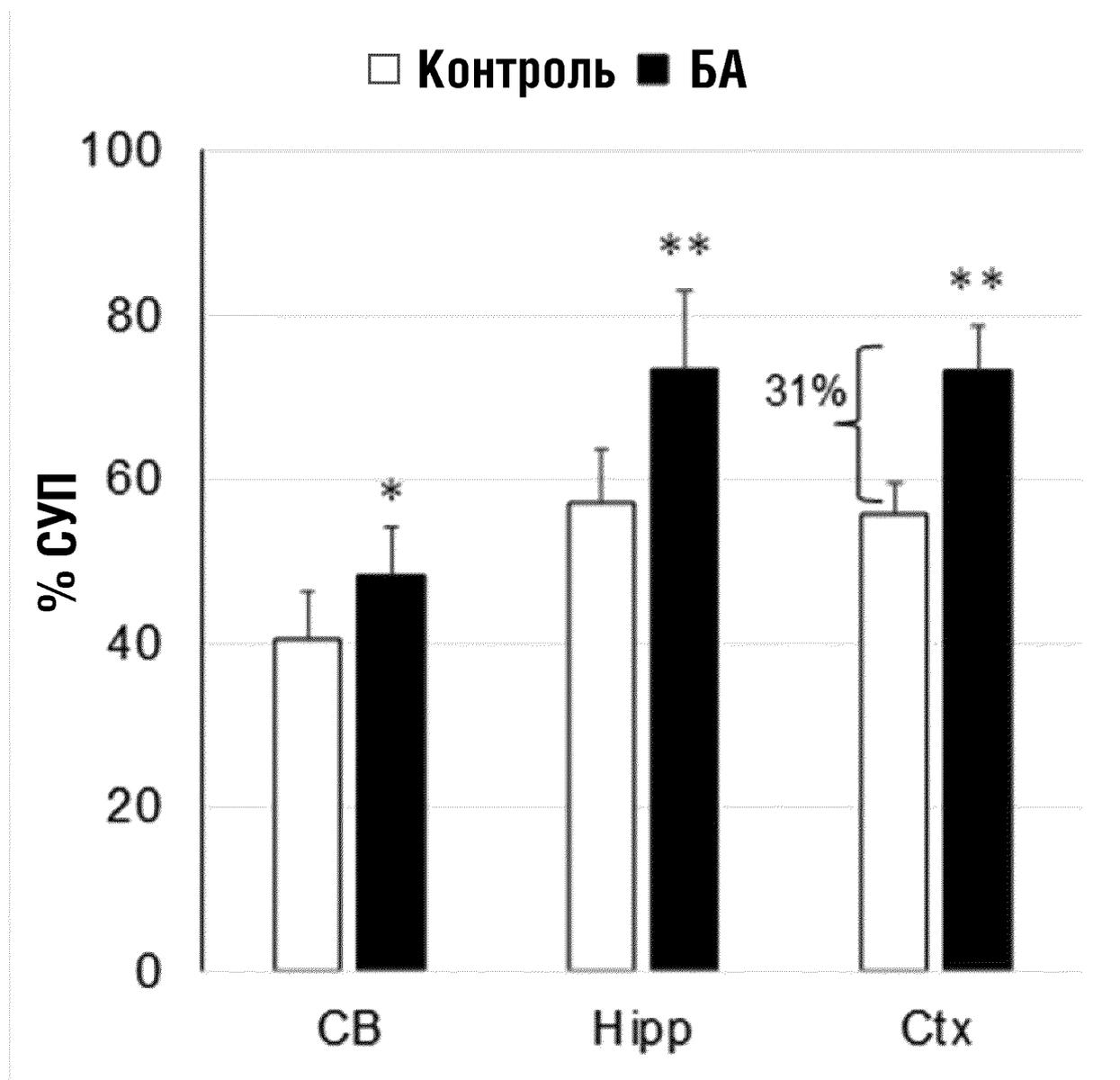
ФИГ.1



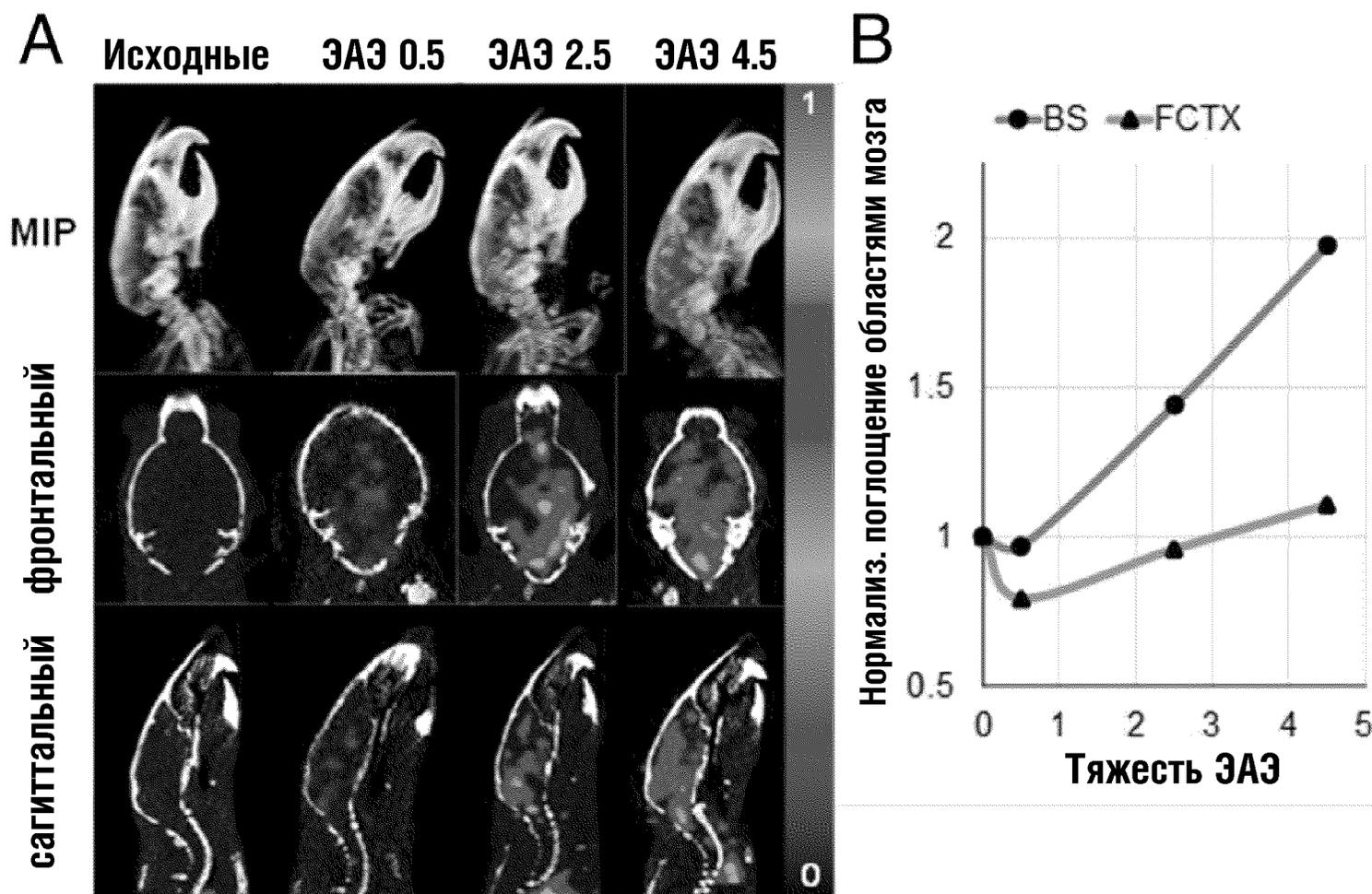
**ФИГ.2**



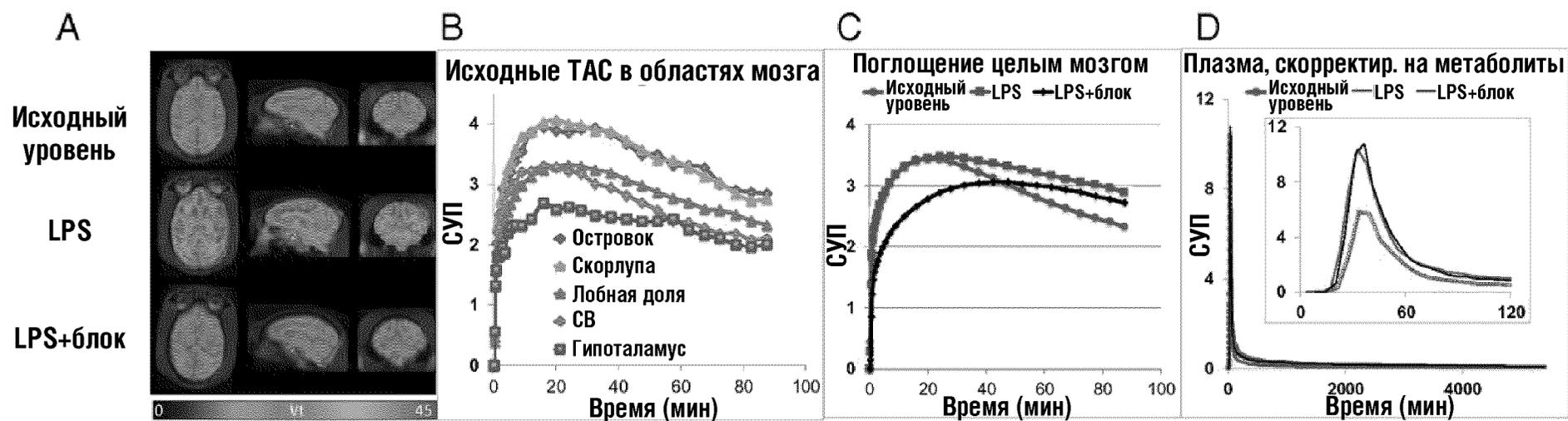
ФИГ.3



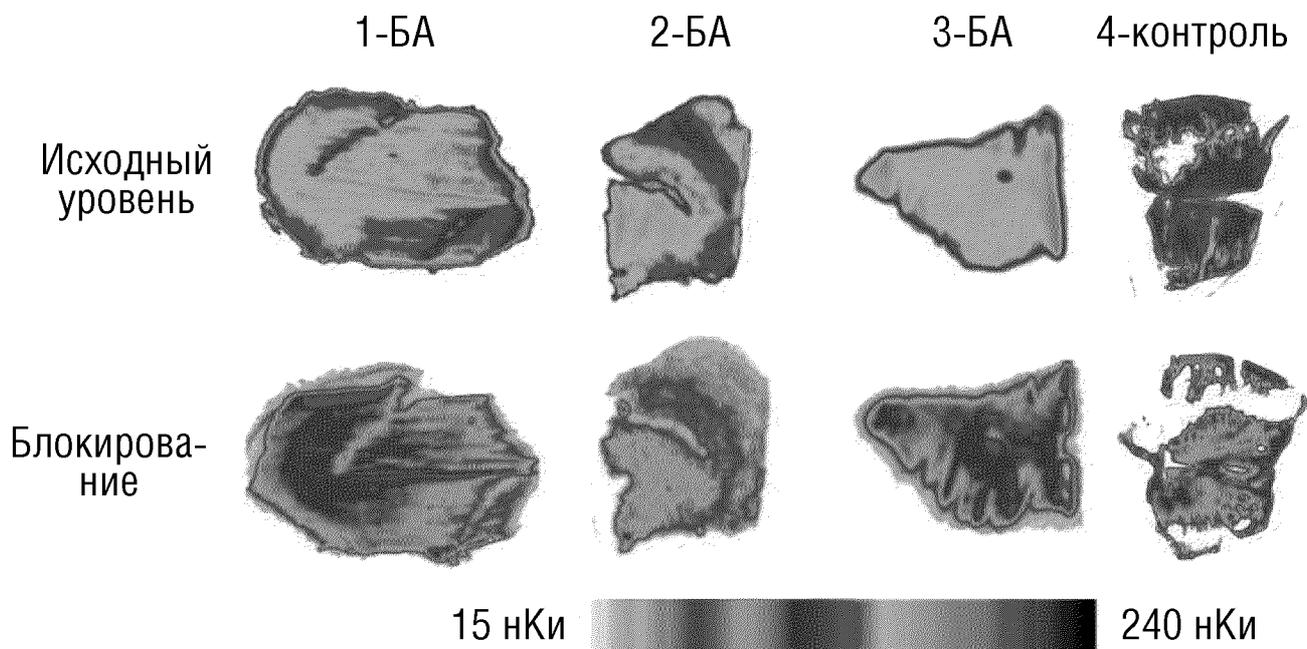
ФИГ.4

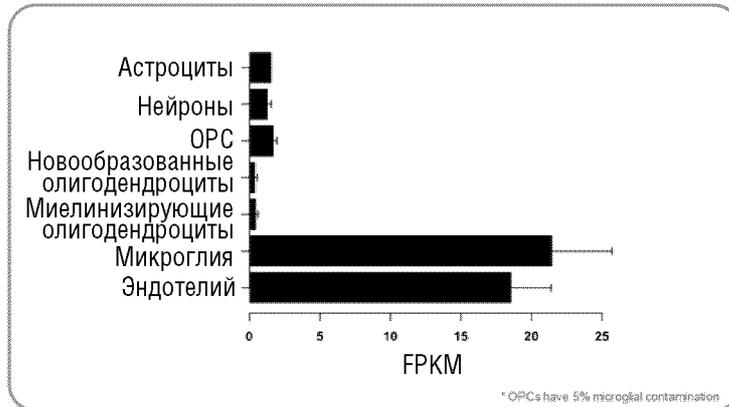
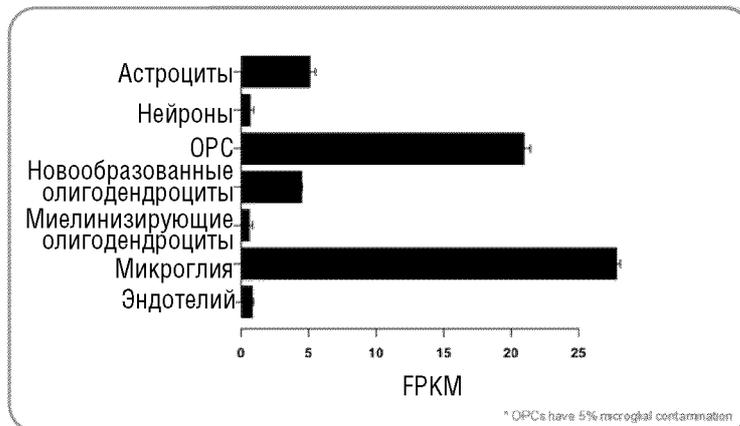
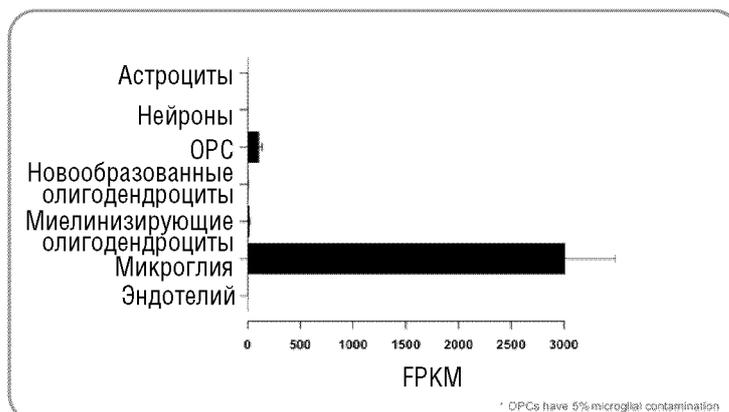


ФИГ.5

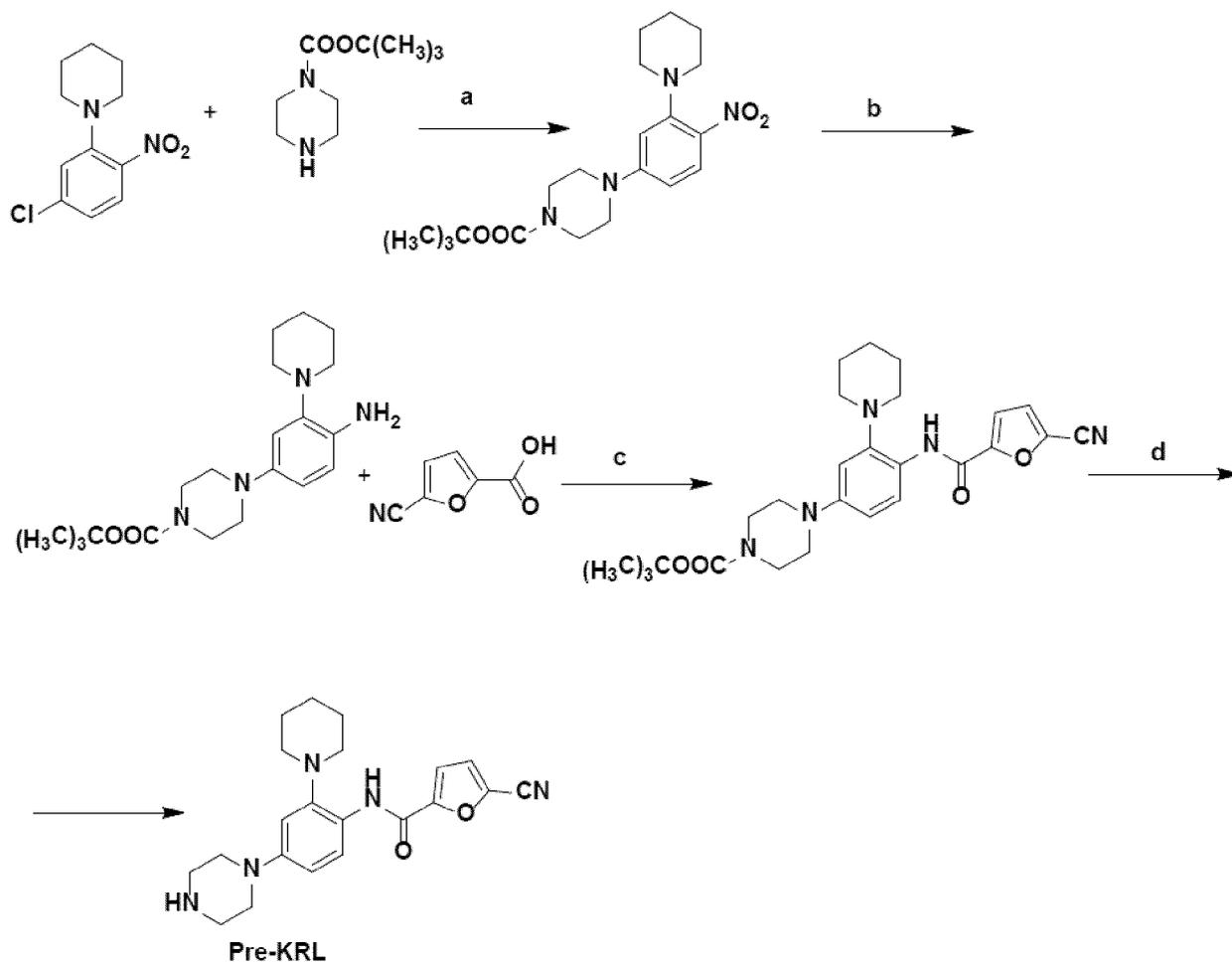


# ФИГ.6

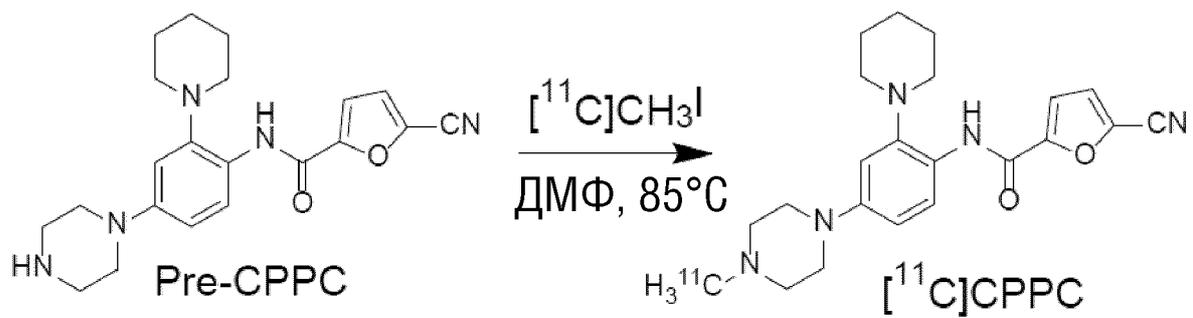


**ФИГ.7А (ИЗВЕСТНЫЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ)***TSPO***ФИГ.7В (ИЗВЕСТНЫЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ)***P2RX7***ФИГ.7С (ИЗВЕСТНЫЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ)***CSF1R*

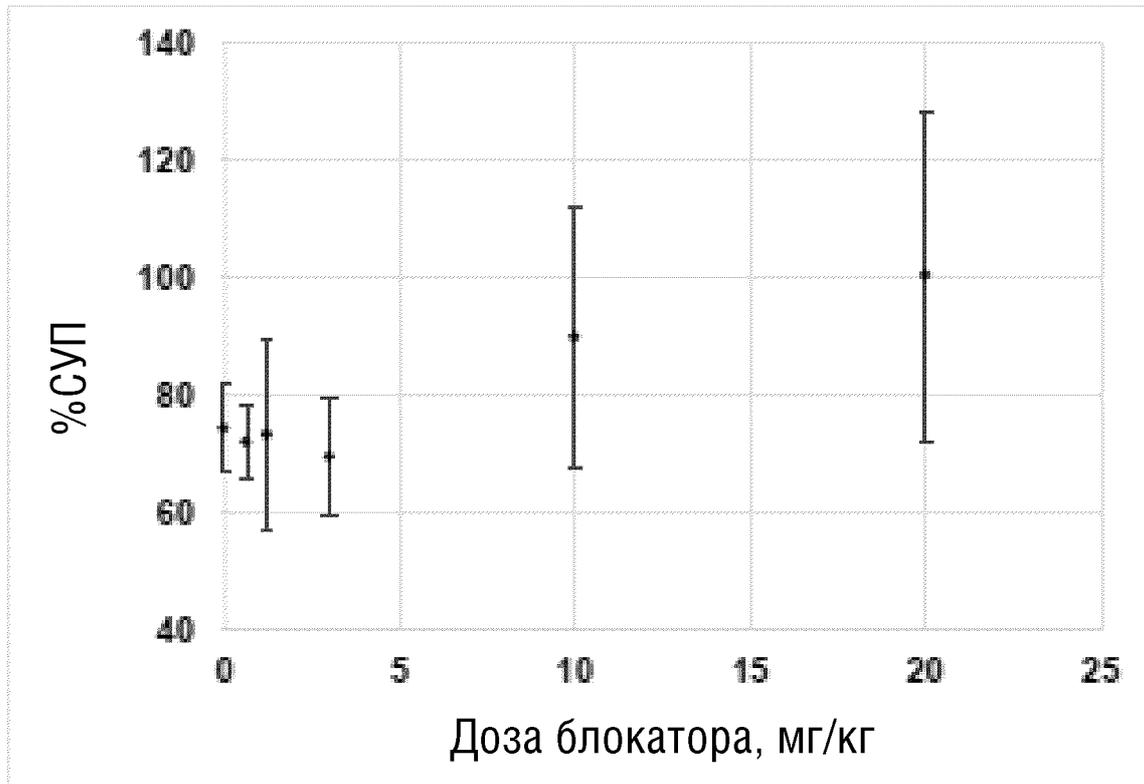
## ФИГ.8



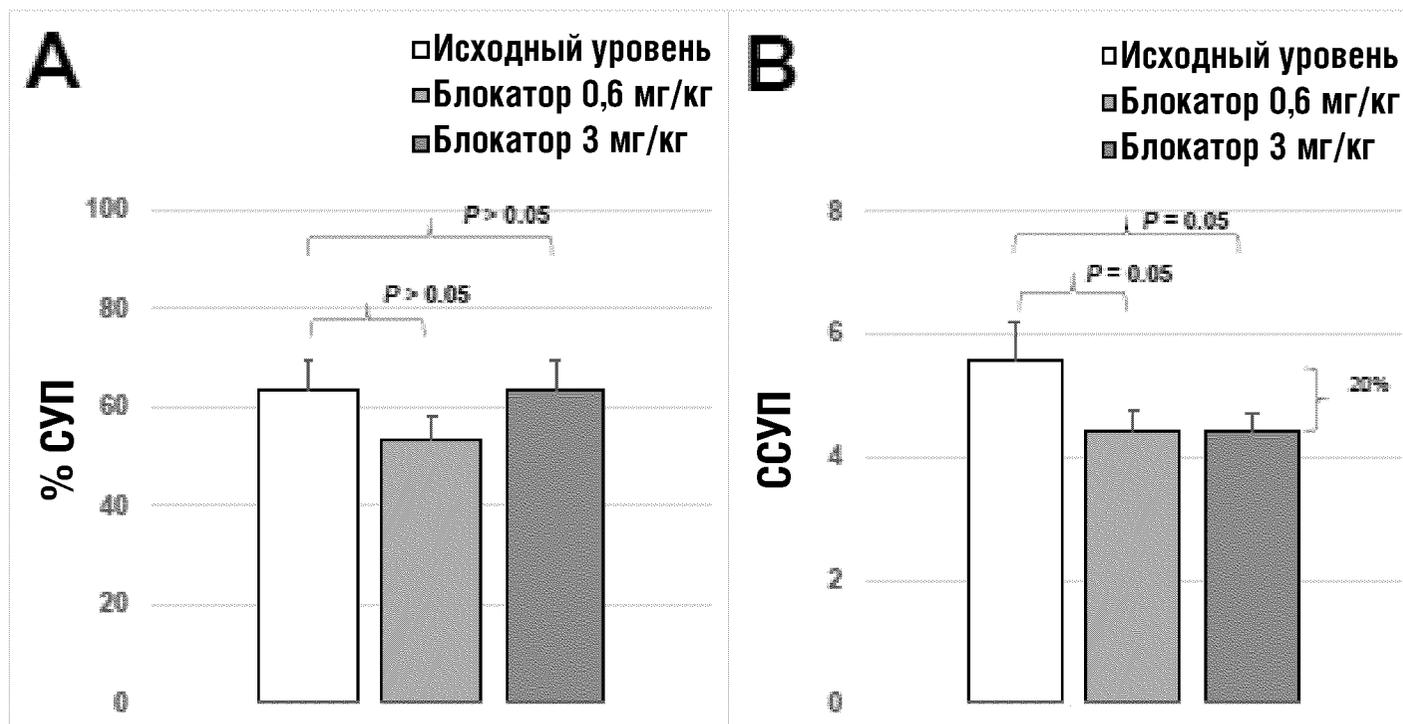
## ФИГ.9



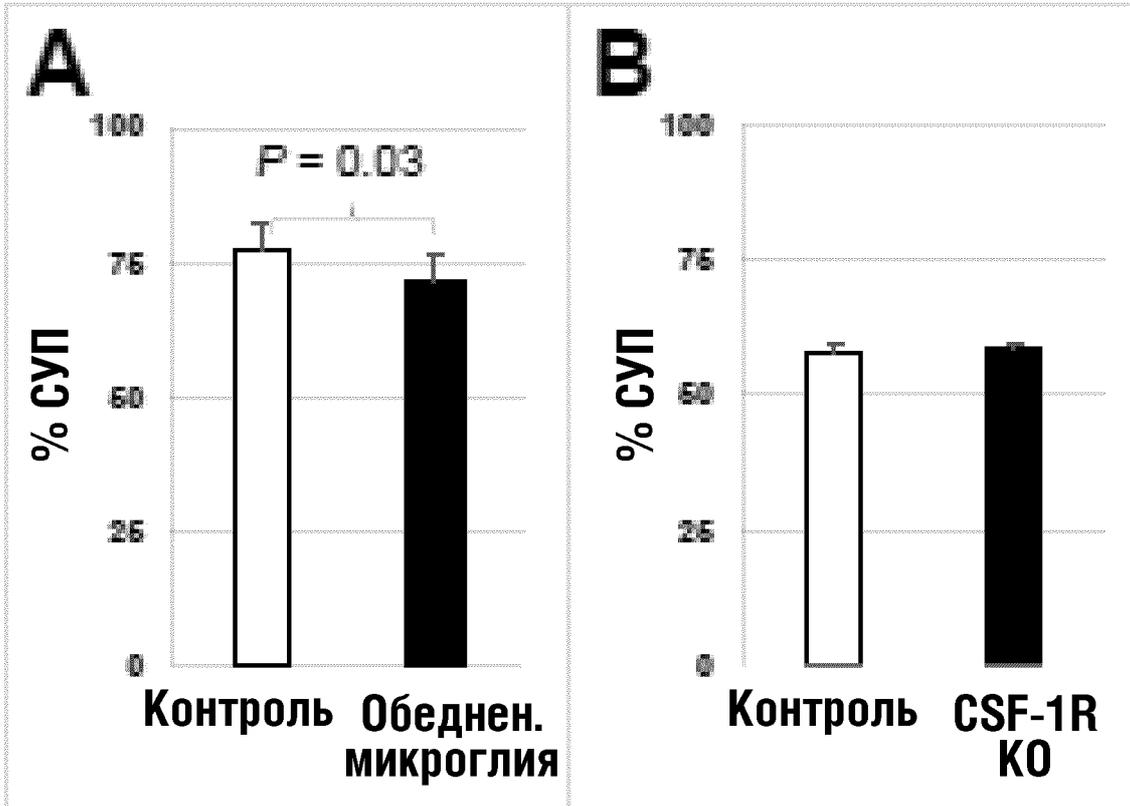
ФИГ.10



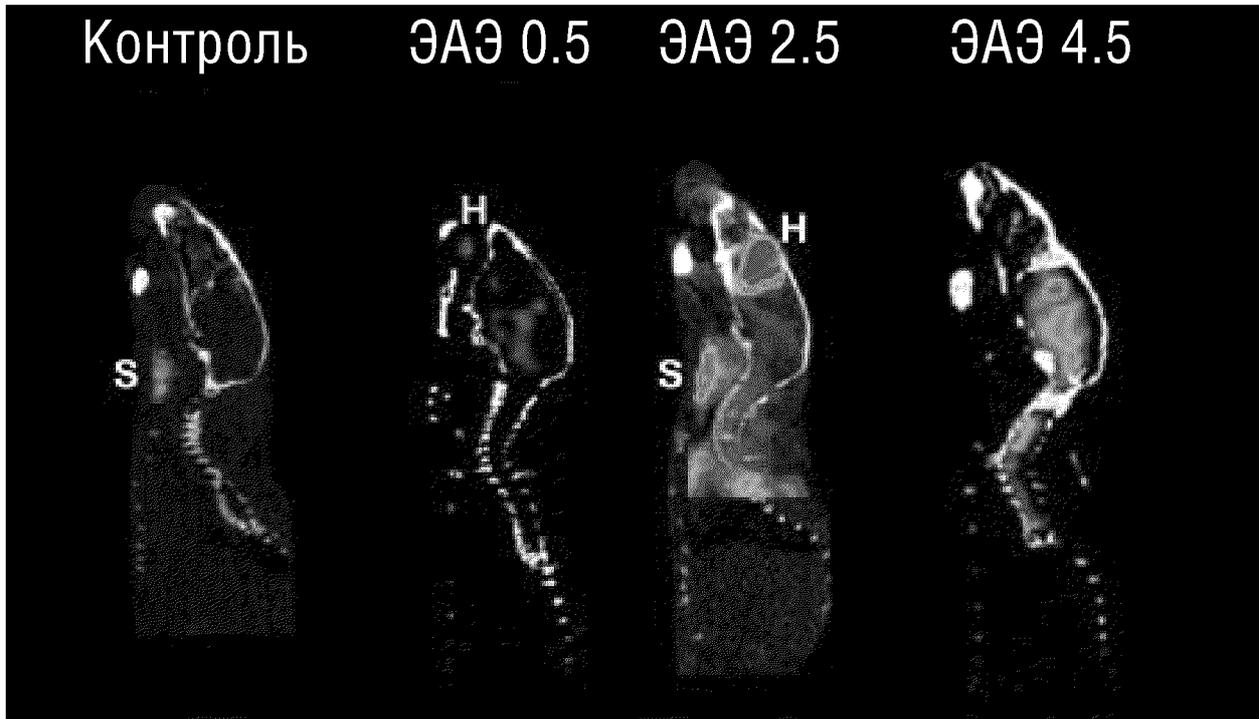
ФИГ.11



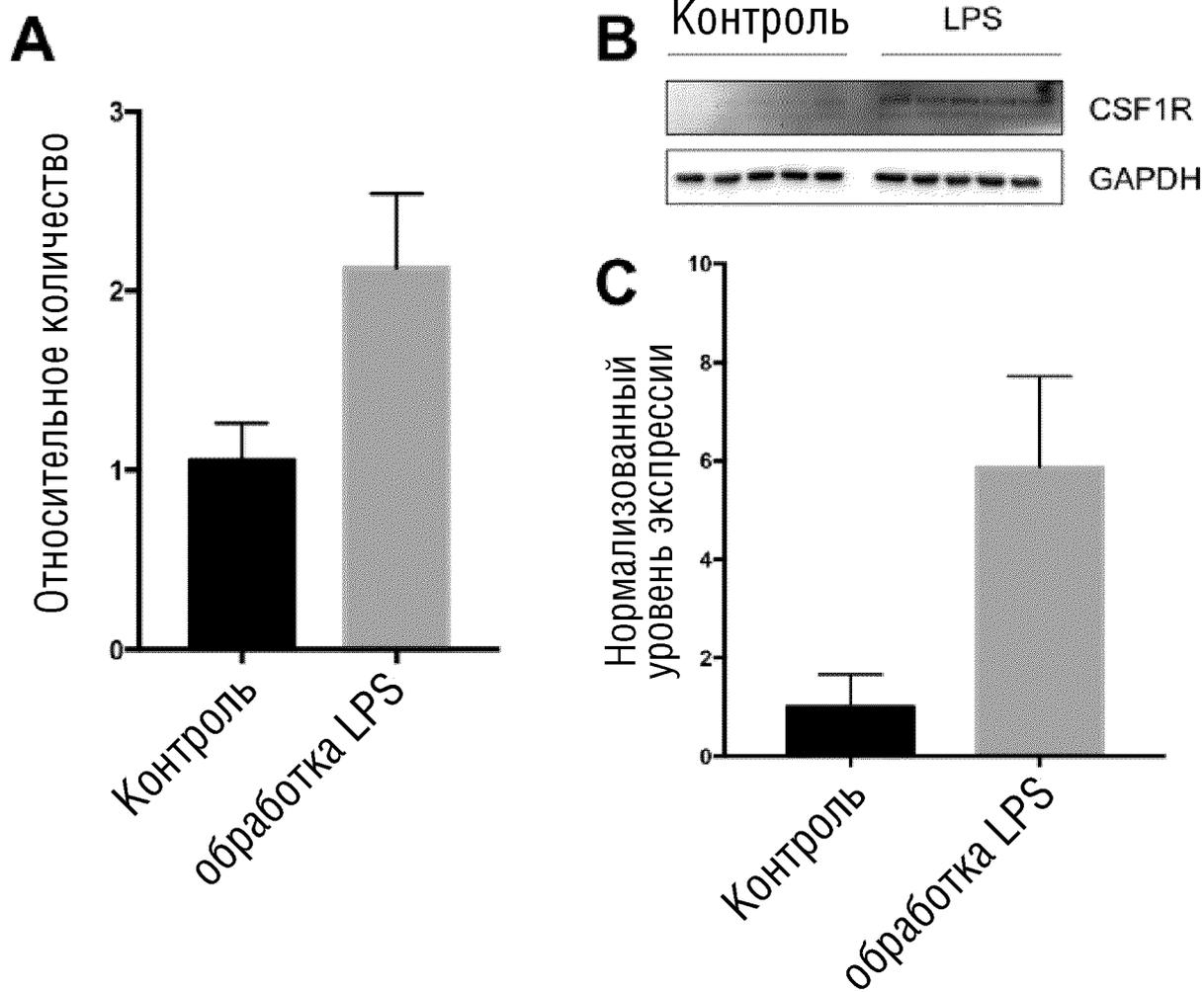
ФИГ.12



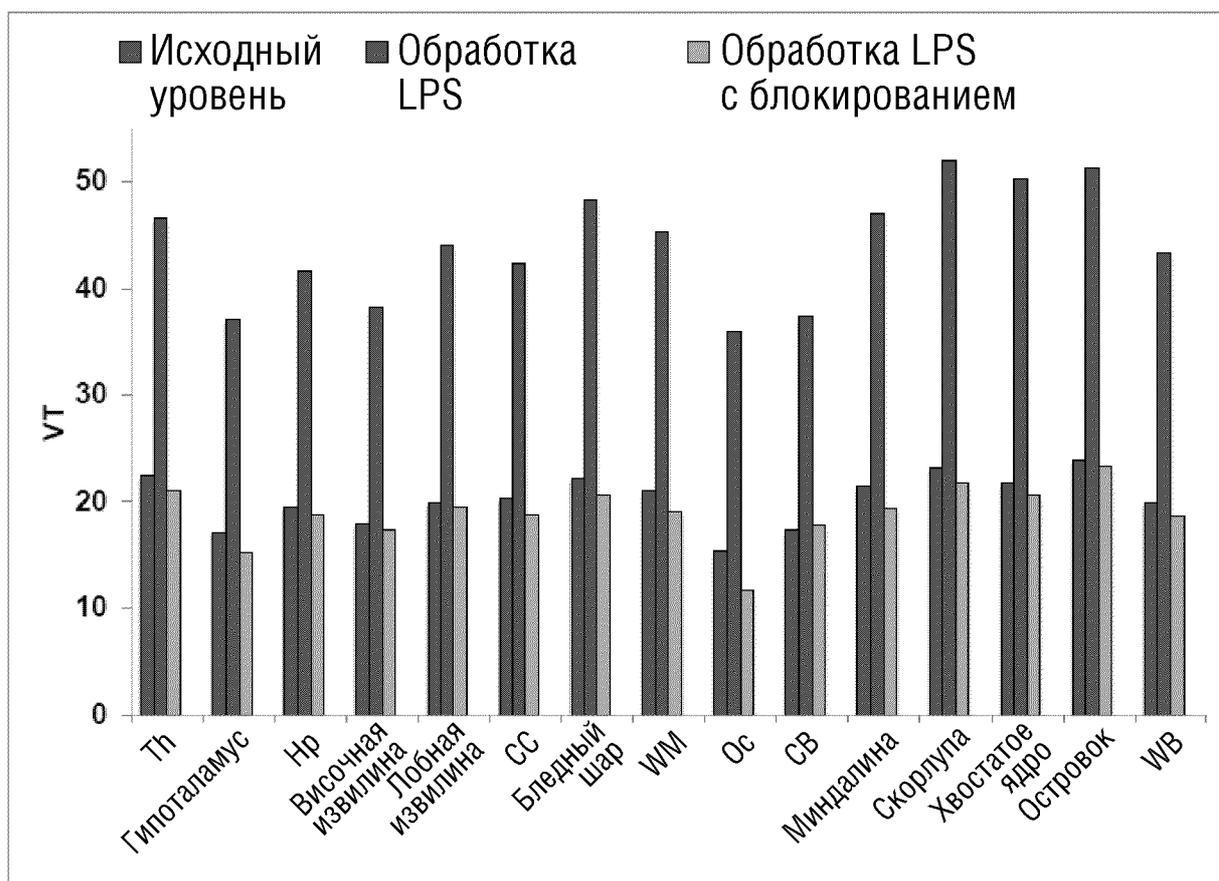
**ФИГ.13**



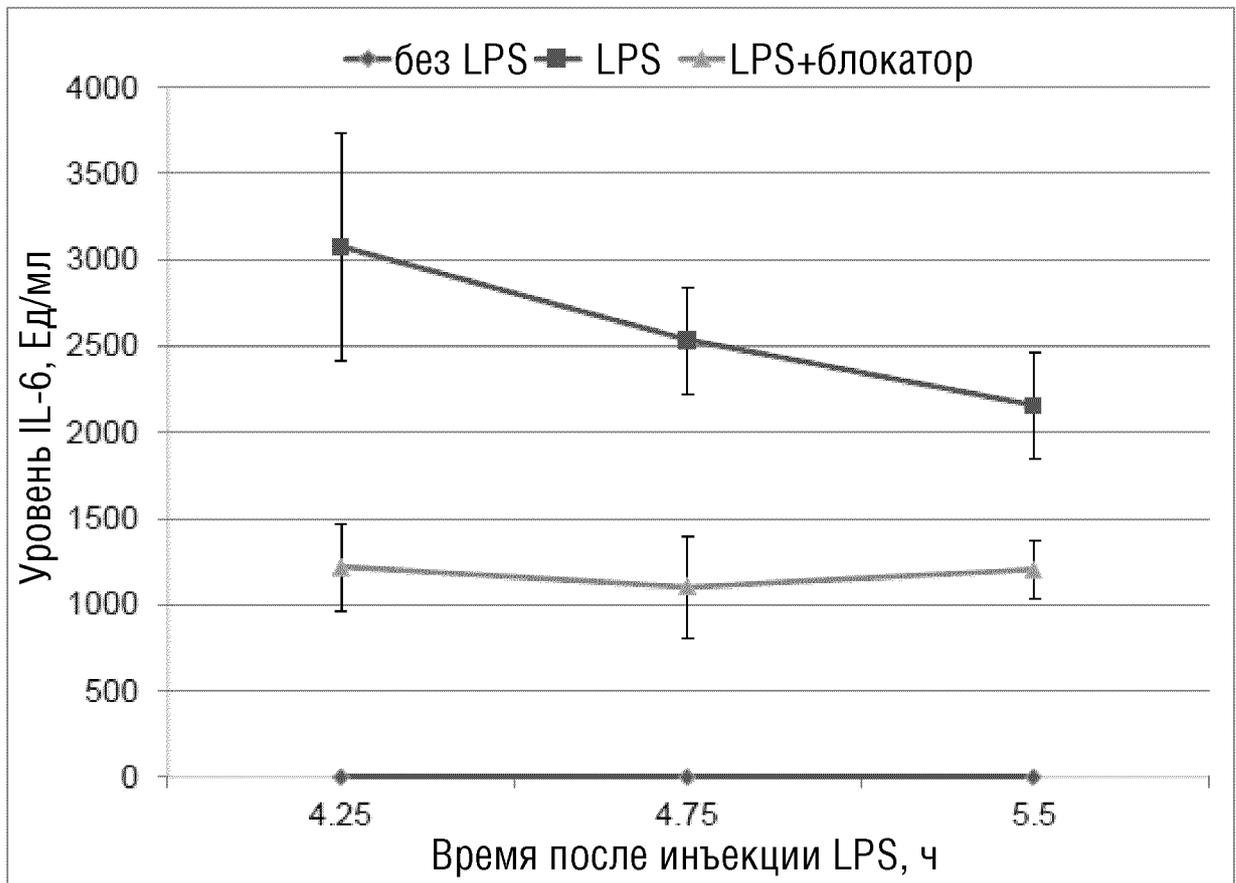
ФИГ.14



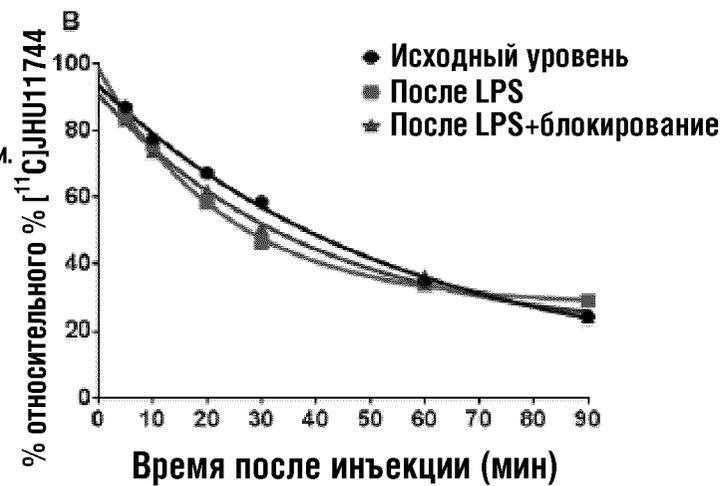
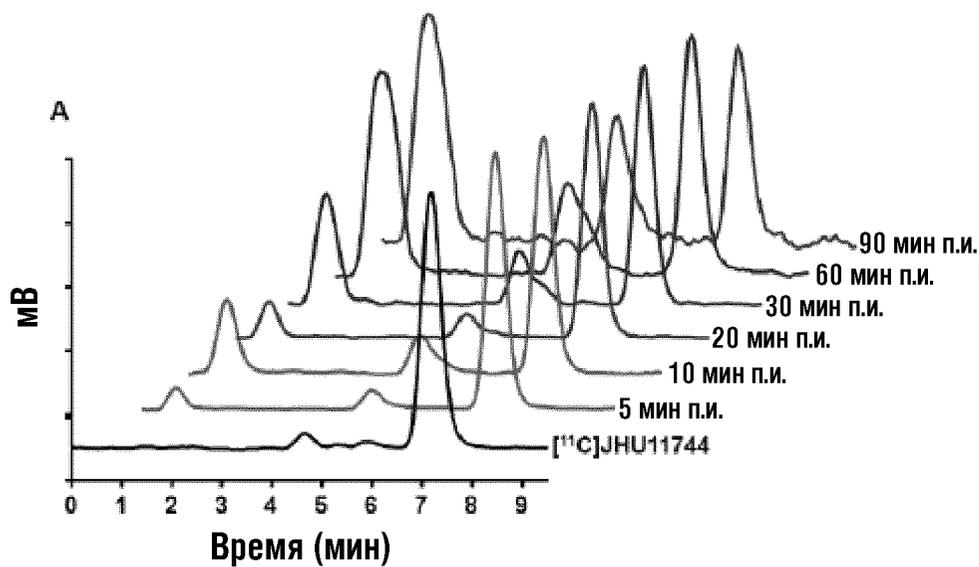
ФИГ.15



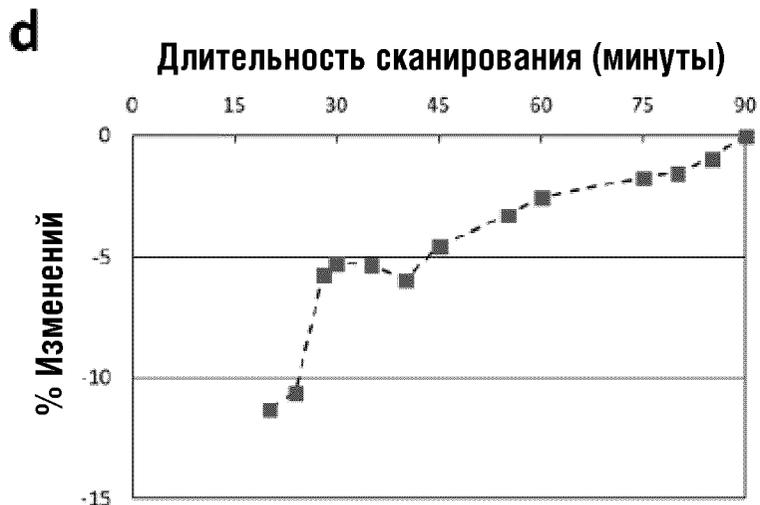
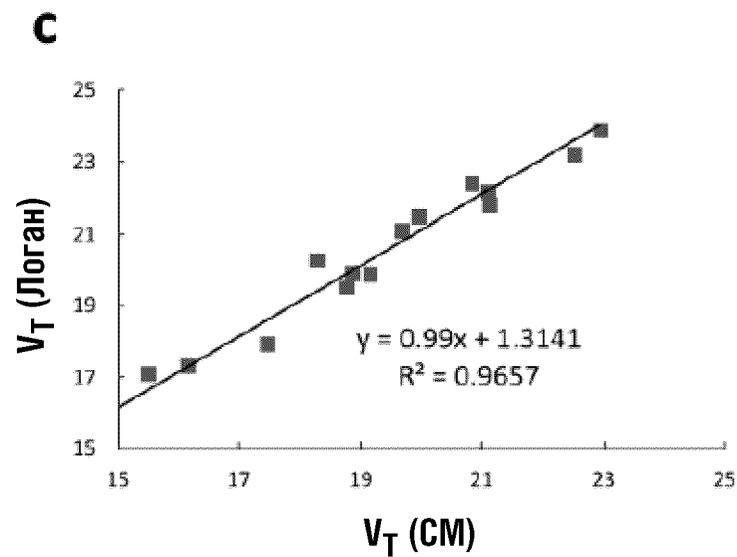
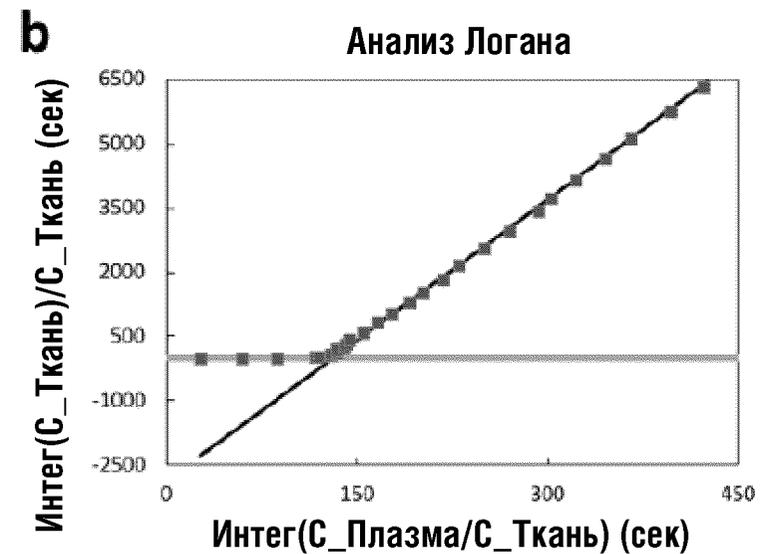
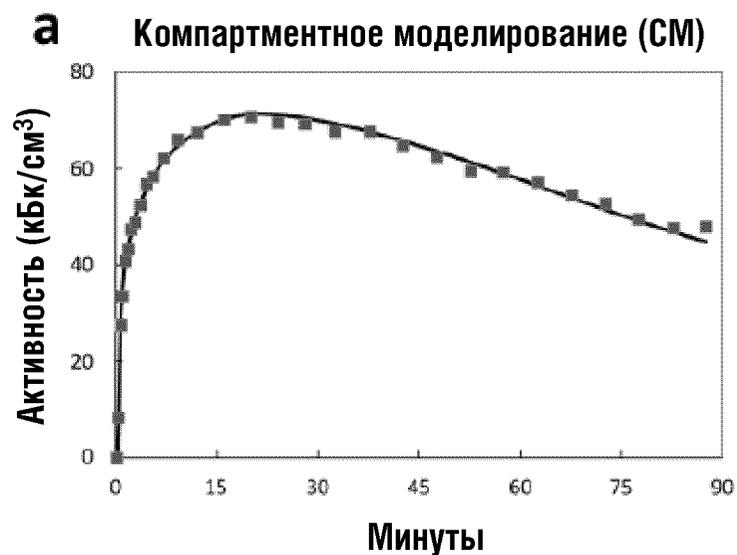
ФИГ.16



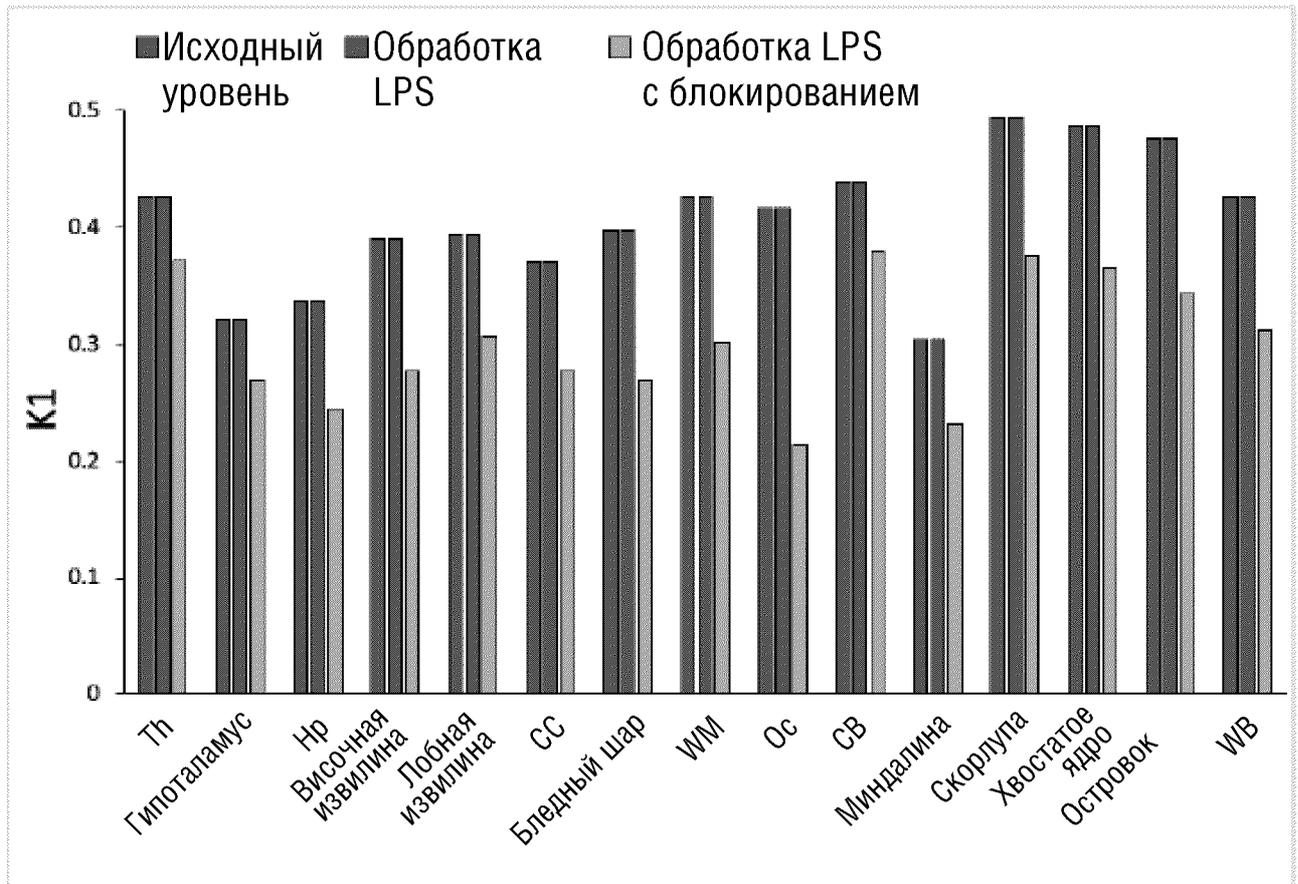
ФИГ.17



ФИГ.18



ФИГ.19



ФИГ.20

