

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **047985**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2024.10.07

(21) Номер заявки

202391387

(22) Дата подачи заявки

2021.12.15

(51) Int. Cl. *A61K 51/04* (2006.01)*A61K 101/02* (2006.01)*C07B 59/00* (2006.01)*C07D 257/08* (2006.01)(54) **АГЕНТЫ ДЛЯ ПРЕДВАРИТЕЛЬНО НАПРАВЛЕННОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ**

(31) 63/126,100; 63/166,484

(32) 2020.12.16; 2021.03.26

(33) US

(43) 2023.08.04

(86) PCT/US2021/063552

(87) WO 2022/132924 2022.06.23

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

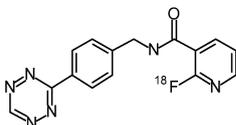
(72) Изобретатель:

Каньолини Альдо, Хойе Адам Томас,  
Ли Симинь, Райт Джастин Патрик,  
Сюн Хуэй (US)

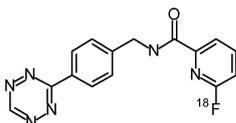
(74) Представитель:

Гизатуллина Е.М., Гизатуллин  
Ш.Ф., Угрюмов В.М., Строкова О.В.,  
Джермакян Р.В., Костюшенкова М.Ю.  
(RU)(56) SYVÄNEN STINA ET AL.:  
"Fluorine-18-Labeled Antibody Ligands for PET  
Imaging of Amyloid-[beta] in Brain", ACS  
CHEMICAL NEUROSCIENCE, vol. 11, no.  
24, 25 November 2020 (2020-11-25), pages  
4460-4468, XP055901652, US, ISSN: 1948-7193,  
DOI: 10.1021/acscemneuro.0c00652, cited in the  
application, abstract, figure 3, page 4464, column 2,  
paragraph 2 - page 4465, column 1, paragraph 4OUTI KEINÄNEN ET AL.: "A New Highly  
Reactive and Low Lipophilicity Fluorine-18 Labeled  
Tetrazine Derivative for Pretargeted PET Imaging",  
ACS MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, vol.  
7, no. 1, 10 December 2015 (2015-12-10), pages  
62-66, XP055718702, US, ISSN: 1948-5875, DOI:  
10.1021/acsmchemlett.5b00330, abstract, scheme  
1, page 65, column 1, paragraph 2

(57) В изобретении предложены новые соединения (I) и (II)



и



(I)

(II)

способы получения таких соединений, способы применения таких соединений для предварительно направленной визуализации и способы подготовки составов для такого применения.

**B1****047985****047985 B1**

Изобретение относится к соединению N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-2-фторникотинамид и варианту указанного соединения, радиоактивно меченому [ $^{18}\text{F}$ ], а также к фармацевтически приемлемым солям указанных соединений, к промежуточным соединениям для получения указанных соединений, к способам применения указанных соединений для предварительно направленной визуализации, к композициям и составам указанных соединений для диагностической визуализации (например, предварительно направленной визуализации) и к способам предварительно направленной визуализации с применением указанных соединений, композиций и составов.

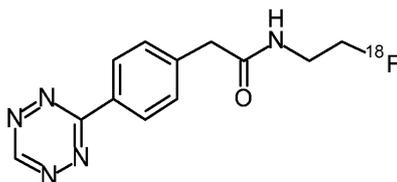
Настоящее изобретение также относится к соединению N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиколинамид и варианту указанного соединения, меченому  $^{18}\text{F}$ , а также к фармацевтически приемлемым солям указанных соединений, к промежуточным соединениям для получения указанных соединений, к способам применения указанных соединений для предварительно направленной визуализации, к композициям и составам указанных соединений для диагностической визуализации (например, предварительно направленной визуализации) и к способам предварительно направленной визуализации с применением указанных соединений, композиций и составов.

Согласно сложившейся практике ПЭТ-визуализация с применением крупных молекул достигалась путем непосредственного введения меток в полноразмерные антитела. Антитела обладают исключительной специфичностью и селективностью, но их медленный клиренс и плохое проникновение в мозг часто ограничивают их применение. Для визуализации с использованием антител применяют долгоживущие радионуклиды, и в этом случае визуализацию проводят через 7-10 дней после инъекции радиоиммунконъюгата, чтобы неспецифический фоновый сигнал исчез. Указанные сроки проведения плохо сочетаются с клинической практикой и подвергают пациента воздействию повышенного уровня радиоактивного излучения. Чтобы минимизировать нарушение общепринятой клинической практики и воздействие радиоактивного излучения на пациента были разработаны системы на основе предварительно направленной визуализации. Указанный подход с предварительным нацеливанием представляет собой двухстадийный способ на основе биортогональной реакции Дильса-Альдера с обращенными электронными требованиями (IEDDA) тетразинов и производных транс-циклооктена (ТЦО), которые сочетают преимущества специфичности и селективности крупной молекулы и быстрой фармакокинетики небольших молекул с короткоживущими радионуклидами. В литературе описаны многочисленные доклинические примеры предварительно направленной визуализации для периферических мишеней (см. *J. Med. Chem.* 2017, 60, 8201-8217 и *J. Label Compd. Radiopharm* 2014, 57 285-290.).

В случае визуализирующих агентов ЦНС на основе антител дополнительную проблему создает гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). В 2017 г. профессор Сювенен (Syvänen) с коллегами (Уппсальский университет) продемонстрировали улучшенный захват в головном мозге биспецифических антител, нацеленных на протофибриллы А $\beta$ , по механизму опосредованного рецептором трансферрина (TfR) транспорта через гематоэнцефалический барьер. Последующие исследования ПЭТ с использованием меченых I антител показали разное распределение для трансгенных мышей и мышей дикого типа через 3 дня после инъекции. Профиль распределения в разных областях головного мозга хорошо коррелировал с патологией А $\beta$ , см. Stina Syvänen et al. *Theranostics*, 2017; 7(2): 308-318; см. также Syvänen S., Fang X.T., Faresjö R., Rokka J., Lannfelt L., Olberg D.E., Eriksson J., Sehlin D. Fluorine-18-Labeled Antibody Ligands for PET Imaging of Amyloid-P in Brain. *ACS Chem. Neurosci.* 2020, 11, 4460-4468.

Помимо возможности проникновения крупных молекул в головной мозг, другим необходимым условием для любых успешных исследований предварительно направленной визуализации ЦНС является доступность проникающих в головной мозг, быстро выводящихся, реакционно-активных, но при этом стабильных низкомолекулярных "преследователей", содержащих группы, способные взаимодействовать с тетразином. Сообщалось, что некоторые меченые  $^{11}\text{C}$  и  $^{18}\text{F}$  низкомолекулярные преследователи тетразина характеризуются заметным захватом в головном мозге (см., Hannes Mikula et al. *Bioconjugate Chem.* 2016, 27, 7, 1707-1712; Hannes Mikula et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 53, 9655-9659). Тем не менее, их применение в исследованиях предварительно направленной визуализации ЦНС описано не было.

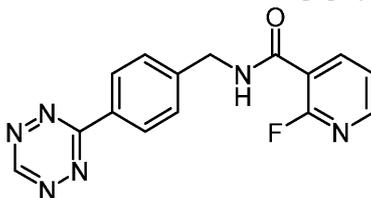
В 2019 году Брендон Кук (Brendon Cook) с сотрудниками описали первый случай предварительно направленной визуализации ЦНС для исследования распределения антисмыслового олигонуклеотида (АСО) в головном мозге крыс (2019 World Molecular Imaging Congress Conference, Poster 139). Крысам интратекально вводили 2,5 мМ конъюгат АСО-ТЦО в 30 мкл солевого раствора, после чего вводили внутривенную инъекцию проникающего в ЦНС тетразина, [ $^{18}\text{F}$ ]-537-Tz, через 24 и 168 ч после введения АСО-ТЦО. Получали сканограммы статической ПЭТ-КТ через 75-90 мин после введения [ $^{18}\text{F}$ ]-537-Tz. У животных, получавших АСО-ТЦО, наблюдали повышенный захват радиоизотопного индикатора в головном и спинном мозге по сравнению с контрольной группой. Также сообщалось, что для [ $^{18}\text{F}$ ]-537-Tz был показан уровень захвата в головном мозге ( $1,7 \pm 0,9\%ID$  через 10 мин после инъекции) у мышей дикого типа путем динамической ПЭТ-визуализации. Предполагается, что это соединение [ $^{18}\text{F}$ ]-537-Tz представляет собой 2-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил)-N-(2-фторэтил)ацетамид:



Для сравнения, динамическая ПЭТ-визуализация у самцов мышей CD-1  $[^{18}\text{F}]\text{N}$ -(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-2-фторникотинамида и  $[^{18}\text{P}]\text{N}$ -(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиколинамида, раскрытых в данном изобретении, показала, что эти соединения легко проникают через гематоэнцефалический барьер и достигают пикового максимального захвата в головном мозге  $3,3 \pm 0,4\% \text{ID/g}$  и  $4,3 \pm 0,3\% \text{ID/g}$  соответственно. Затем указанные соединения демонстрировали устойчивый клиренс из головного мозга до уровня, близкого к фоновому (мышцы) через 60 мин после инъекции. Указанные агенты, которые стабильно проникают в головной мозг, а затем быстро и полностью вымываются из головного мозга, обеспечивают более широкое окно для достижения повышенных отношений сигнала к фону, что позволяет получать изображения улучшенного качества. Таким образом, авторы изобретения ожидают, что соединения, раскрытые в данном изобретении, могут обеспечивать преимущества при предварительно направленной визуализации ЦНС.

В вариантах осуществления настоящего изобретения предложены новые соединения, композиции, составы и способы предварительно направленной визуализации. Указанный тип усовершенствованной технологии, расширяющий возможности проведения визуализации пациентов, таким образом, также необходим для усиления клинического благоприятного действия и влияния диагностической визуализации. Усовершенствованный визуализирующий агент позволит получать улучшенные изображения методом предварительно направленной визуализации по сравнению с известными на момент подачи заявки агентами.

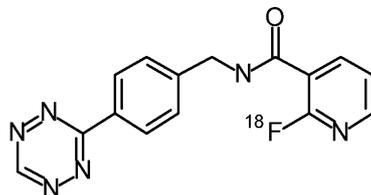
В вариантах осуществления настоящего изобретения также предложено соединение N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-2-фторникотинамид, также называемое в данном документе "соединением 1", структура которого может быть представлена как соединение формулы I:



I

Соединение формулы I показано выше в виде свободного основания. Соединение формулы I также можно превратить в фармацевтически приемлемую соль и использовать в форме соли в вариантах осуществления настоящего изобретения.

В вариантах осуществления настоящего изобретения предложен вариант  $^{18}\text{F}$  соединения 1, который также упоминается в данном документе как "соединение 2", структура которого может быть представлена как соединение формулы II:



II

Соединение формулы II показано выше в виде свободного основания. Соединение формулы II также можно превратить в фармацевтически приемлемую соль и использовать в форме соли в представленных вариантах осуществления.

В вариантах осуществления настоящего изобретения предложено применение фармацевтически приемлемых солей соединений формулы I либо формулы II или применение соединений в виде свободного основания.

В вариантах осуществления настоящего изобретения также предложено применение соединения формулы I и/или соединения формулы II, и/или их смесей для получения визуализирующих агентов, например, агентов для предварительно направленной визуализации.

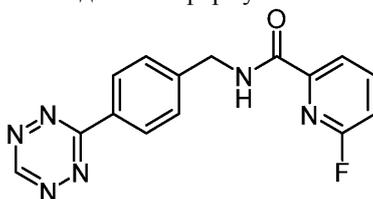
В вариантах осуществления настоящего изобретения предложено применение соединений формулы I или II для получения радиофармацевтического агента для визуализации (предварительно направленной

визуализации) у человека. Согласно другому аспекту в изобретении предложены способы получения соединений формулы I или II.

Согласно другому аспекту в вариантах осуществления настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение 1 или соединение 2, или их фармацевтически приемлемую соль, которое включено в состав в этаноле (например, 10% EtOH (об./об.)) и буфере (который может представлять собой буфер ФСБ), предпочтительно для применения у человека. Также следует отметить, что в некоторых вариантах осуществления состав не включает аскорбат или аскорбиновую кислоту, поскольку было обнаружено, что тетразиновый фрагмент в формуле I и формуле II может быть легко восстановлен в составе, содержащем аскорбат. Таким образом, хотя состав аскорбата широко используется во многих составах для визуализации, он может не подходить для визуализации с использованием соединений формулы I или формулы II.

В настоящем изобретении также предложены способы предварительно направленной визуализации, включающие введение пациенту поддающегося обнаружению количества соединения 1 или 2, или его фармацевтически приемлемой соли, или содержащей его композиции.

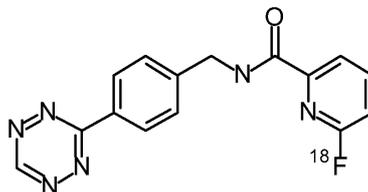
В вариантах осуществления настоящего изобретения также предложен N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиколинамид, также упоминаемый в данном документе как "соединение 3", структура которого может быть представлена как соединение формулы III:



III

Соединение формулы III показано в виде свободного основания. Соединение формулы III также можно превратить в фармацевтически приемлемую соль и использовать в форме соли в представленных вариантах осуществления.

В вариантах осуществления настоящего изобретения предложен вариант  $^{18}\text{F}$  соединения 3, которое также упоминается в данном документе как "соединение 4", структура которого может быть представлена как соединение формулы IV:



IV

Соединение формулы IV показано в виде свободного основания. Соединение формулы IV также можно превратить в фармацевтически приемлемую соль и использовать в форме соли в представленных вариантах осуществления.

В вариантах осуществления настоящего изобретения предложено применение фармацевтически приемлемых солей соединения формулы III либо IV, или применение соединений в виде свободного основания.

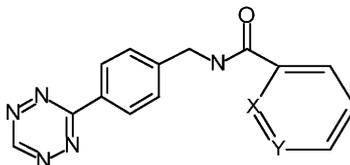
В вариантах осуществления настоящего изобретения также предложено применение соединения формулы III и/или соединения формулы IV, и/или их смесей для получения визуализирующих агентов, например, агентов для предварительно направленной визуализации.

В вариантах осуществления настоящего изобретения предложено применение соединений формулы III или IV для получения радиофармацевтического агента для визуализации (предварительно направленной визуализации) у человека. Согласно другому аспекту, в изобретении предложены способы получения соединений формулы III или IV.

Согласно другому аспекту, в вариантах осуществления настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение 3 или соединение 4, или их фармацевтически приемлемую соль, которая включена в состав в этаноле (например, 10% EtOH (об./об.)) и буфере (который может представлять собой буфер ФСБ), предпочтительно для применения у человека. Также следует отметить, что в некоторых вариантах осуществления состав не включает аскорбат или аскорбиновую кислоту, поскольку было обнаружено, что тетразиновый фрагмент в формуле III и формуле IV может быть легко восстановлен в составе, содержащем аскорбат. Таким образом, хотя состав аскорбата широко используется во многих составах для визуализации, он может не подходить для визуализации с использованием соединений формулы III или формулы IV.

В настоящем изобретении также предложены способы предварительно направленной визуализации, включающие введение пациенту поддающегося обнаружению количества соединения 3 или 4, или его фармацевтически приемлемой соли, или содержащей его композиции.

В вариантах осуществления настоящего изобретения предложено соединение формулы V, структура которого может быть представлена ниже:



где X может представлять собой C—F, C—<sup>18</sup>F или N;  
 Y может представлять собой C—F, C—<sup>18</sup>F или N,  
 причем один из (но не оба) X и Y представляет собой N,  
 причем если X представляет собой N, то Y представляет собой C—F или C—<sup>18</sup>F; и  
 при этом если Y представляет собой N, то X представляет собой C—F или C—<sup>18</sup>F,  
 или фармацевтически приемлемые соли указанного соединения.

Специалистам в данной области будет понятно, что формула V представляет собой род, который охватывает вышеуказанные соединения 1, 2, 3 и 4 (а также фармацевтически приемлемые соли этих соединений). Таким образом, приведенное выше раскрытие изобретения в отношении вариантов осуществления соединений 1, 2, 3 и 4 (или формул I-IV), а также связанных с ними применений, композиций, составов и т. д. в равной степени применимо к соединениям формулы V.

В вариантах осуществления настоящего изобретения предложено применение фармацевтически приемлемых солей соединения формулы V или применение соединений в виде свободной основы.

В вариантах осуществления настоящего изобретения также предложено применение соединений формулы V и/или их смесей для получения визуализирующих агентов, например, агентов для предварительно направленной визуализации.

В вариантах осуществления настоящего изобретения предложено применение соединений формулы V для получения радиофармацевтического агента для визуализации (предварительно направленной визуализации) у человека. Согласно другому аспекту, в изобретении предложены способы получения соединений формулы V.

Согласно другому аспекту, в вариантах осуществления настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединения формулы V или их фармацевтически приемлемую соль, которая включена в состав в этаноле (например, 10% EtOH (об./об.)) и буфере (который может представлять собой буфер ФСБ), предпочтительно для применения у человека. Также следует отметить, что в некоторых вариантах осуществления состав не включает аскорбат или аскорбиновую кислоту, поскольку было обнаружено, что тетразиновый фрагмент в формуле V может быть легко восстановлен в составе, содержащем аскорбат. Таким образом, хотя состав аскорбата широко используется во многих составах для визуализации, он может не подходить для визуализации с использованием соединений формулы V.

В настоящем изобретении также предложены способы предварительно направленной визуализации, включающие введение пациенту поддающегося обнаружению количества соединения формулы V или его фармацевтически приемлемой соли, или содержащей его композиции.

Приведенные ниже способы получения и примеры предложены для лучшего объяснения практического осуществления настоящего изобретения. Подходящие реакционные условия для стадий, приведенных для указанных схем, способов получения и примеров, хорошо известны в данной области и соответствующая модификация реакционных условий, включая замену растворителей и реагентов, входит в рамки компетенции специалистов.

Кроме того, специалистам в данной области будет понятно, что в некоторых случаях порядок, в котором вводят фрагменты, не является критичным. Конкретный порядок стадий, требуемых для получения соединений формулы I, или формулы II, или формулы III, или формулы IV зависит от конкретного синтезируемого соединения, исходного соединения и относительной лабильности замещенных фрагментов, что хорошо известно специалистам-химикам. Указанные соединения могут быть защищены или модифицированы в подходящий момент синтеза способами, хорошо известными в данной области. Промежуточные соединения и конечные продукты по настоящему изобретению могут быть дополнительно очищены, при желании, обычными способами, такими как перекристаллизация или хроматография на твердых носителях, например, на силикагеле или оксиде алюминия.

Соединения по настоящему изобретению предпочтительно включают в состав радиофармацевтических композиций, вводимых разными способами. Предпочтительно, указанные композиции предназначены для внутривенного применения, предпочтительно у человека. Указанные фармацевтические компо-

зиции и способы их получения хорошо известны в данной области; см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (P.P. Gerbino, 21<sup>st</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2006).

Предпочтительные составы могут представлять собой препараты соединения 1 или соединения 2. Предпочтительные составы могут представлять собой препараты соединения 3 или соединения 4. Особенно предпочтительным является соединение 1, или соединение 2, или соединение 3, или соединение 4, полученное в соответствии с методиками, описанными в данном документе. Предпочтительный состав соединения 1 или соединения 2 включает этанол, например, 10% EtOH (об./об.). Указанный состав также может включать буфер, например, буфер ФСБ. Также могут применяться и другие ингредиенты. Предпочтительный состав соединения 3 или соединения 4 включает этанол, например, 10% EtOH (об./об.). Указанный состав также может включать буфер, например, буфер ФСБ. Также могут применяться и другие ингредиенты.

Было обнаружено, что соединения формулы I, II, III и IV обладают неожиданным преимуществом для предварительно направленной визуализации, предпочтительно включая клиническую визуализацию у человека. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы I, II, III, IV или V могут быть использованы для предварительно направленной визуализации. Например, соединения формул I-V могут проникать в головной мозг и, таким образом, могут применяться в качестве изотопного индикатора для предварительно направленной визуализации ЦНС (центральной нервной системы). В некоторых вариантах осуществления предварительно направленная визуализация мишеней в ЦНС может быть достигнута в 3 или 4 стадии:

- 1) В.В. (внутривенное) или И.Т. (интратекальное) введение конъюгата биологический препарат-ТЦО (например, конъюгата челночное биспецифическое антитело-ТЦО или конъюгата олигонуклеотид-ТЦО);
- 2) ожидание в течение достаточного времени (дней) для обеспечения распределения и системного клиренса конъюгата биологический препарат-ТЦО;
- 3) необязательная стадия В.В. инъекции тетразинов, ограниченных на периферии, для маскировки циркулирующего на периферии конъюгата биологический препарат-ТЦО;
- 4) В.В. введение проникающего в головной мозг соединения формулы I, или формулы II, или формулы III, или формулы IV с последующей ПЭТ-визуализацией головного мозга.

Что касается получения конъюгата биологический препарат-ТЦО, то применение указанной технологии опубликовано в литературе (см. ниже) и известно из исследований предварительно направленной визуализации при онкологии):

- 1) Bioconjugate Chem. 2018, 29, 538-545 (Получение конъюгата ТЦО-антитело; применение агента, способствующего клиренсу, для маскировки циркулирующего конъюгата антитело-ТЦО);
- 2) Bioconjugate Chem. 2013, 24, 1210-1217 (Получение конъюгата ТЦО-антитело) J. Med. Chem. 2017, 60, 8201-8217 (Получение конъюгата ТЦО-антитело, оптимизация предварительно нацеливающего радиолиганда).

Для получения конъюгата олигонуклеотид-ТЦО, указанный тип конъюгата (в модификации ТЦО-ПЭГ4-олиго) коммерчески доступен от компании Bio-Synthesis, Льюисвилл, Техас, США. Таким образом, специалистам в данной области будут понятны способы получения конъюгата биологический препарат-ТЦО.

Некоторые из потенциальных преимуществ предварительно направленной визуализации включают: возможность применения короткоживущих радионуклидов посредством разделения доставки радиоактивного излучения и нацеливающего вектора, например, биологических препаратов с высокой специфичностью и селективностью, и возможность уменьшения воздействия радиоактивного излучения на пациента.

На фиг. 1 проиллюстрированы характерные хроматограммы полупрепаративной ВЭЖХ очистки [<sup>18</sup>F]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-2-фторникотинамида.

На фиг. 2 проиллюстрированы характерные хроматограммы аналитической ВЭЖХ состава [<sup>18</sup>F]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-2-фторникотинамида.

На фиг. 3 проиллюстрированы характерные хроматограммы полупрепаративной ВЭЖХ очистки [<sup>18</sup>F]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиколинамида.

На фиг. 4 проиллюстрированы характерные хроматограммы аналитической ВЭЖХ состава [<sup>18</sup>F]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиколинамида.

На фиг. 5 проиллюстрированы характерные хроматограммы полупрепаративной ВЭЖХ очистки [<sup>18</sup>F]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторникотинамида.

На фиг. 6 проиллюстрированы характерные хроматограммы аналитической ВЭЖХ состава [<sup>18</sup>F]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторникотинамида.

Фиг. 7. Характерный результат масс-спектрометрии ИЭР для реакции Malat1 АСО-ТЦО с тетразинами; и

Фиг. 8. Характерные радиоактивные следы тетразинов [<sup>18</sup>F]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-2-фторпиколинамида, [<sup>18</sup>F]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиколинамида и взаимодействие с Malat1 АСО-ТЦО.

Ниже могут использоваться определенные сокращения. Указанные сокращения имеют следующие значения: "№ CAS" означает регистрационный номер в Chemical Abstracts; "Ки" означает юри; "КТ" означает компьютерную томографию; "δ" означает химический сдвиг в спектроскопии ядерного магнитного резонанса; "ДМФА" означает N,N-диметилформамид; "ДМСО" означает диметилсульфоксид; "ДМСО-d<sub>6</sub>" означает дейтерированный ДМСО; "ИЭР/МС" означает масс-спектрометрию с ионизацией электронным распылением; "EtOH" означает этанол или этиловый спирт; "НАТУ" означает 1-[бис-(диметиламино)метил]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиния 3-оксид гексафторфосфата; "ВЭЖХ" означает высокоэффективную жидкостную хроматографию; "ч" означает час или часы; "мин" означает минуту или минуты; "%ID/г" означает % введенной дозы на грамм; "мКи" означает милликюри; "МГц" означает мегагерцы; "мкл" означает микролитр или микролитры; "N" означает число повторностей или размер выборки в эксперименте; "ЯМР" означает ядерный магнитный резонанс; "ПЭТ" означает позитронно-эмиссионную томографию, "ОAc" означает ацетат; "м.д." означает миллионные доли; "с" означает синглет; "СОС" означает стандартную ошибку среднего; "tR" означает время удерживания; "ТГФ" означает тетрагидрофуран.

### Основной химизм и способы получения

В приведенных ниже способах получения и примерах дополнительно проиллюстрировано изобретение и представлен типовой способ синтеза соединений по изобретению. Реагенты и исходные вещества легко доступны или могут быть легко синтезированы специалистом в данной области. Следует понимать, что приведенные ниже способы получения и примеры представлены для иллюстрации, а не ограничения, и что специалистами в данной области могут быть осуществлены различные модификации.

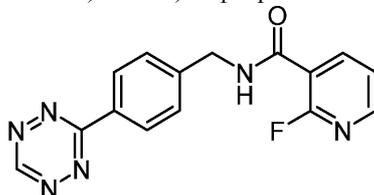
ЯМР-спектроскопию для спектров <sup>1</sup>H и <sup>19</sup>F проводят на ЯМР-спектрометре Bruker Avance™ III HD 400 МГц, эталонные стандарты <sup>1</sup>H ЯМР получали в виде растворов CDCl<sub>3</sub> или ДМСО-d<sub>6</sub>, выраженных в м.д., с использованием остаточных резонансов растворителя (CDCl<sub>3</sub>, 7,26 м.д.; ДМСО-d<sub>6</sub>, 2,50 м.д.). Для спектров <sup>19</sup>F эталонный стандарт не используется. При указании мультиплетности пиков могут быть применены следующие сокращения: с (синглет), д (дублет), т (триплет), кв (квартет), м (мультиплет), шир. с (широкий синглет), дд (дублет дублетов), дт (дублет триплетов). Постоянные спин-спиновые взаимодействия (J), в случае их указания, записаны в герцах (Гц).

ИЭР/МС проводили на системе СВЭЖХ Waters® Acquity. Измерения масс-спектрометрии с ионизацией электронным распылением (которые проводили в режиме положительных и/или отрицательных ионов) проводили с использованием масс-детектора Waters® Acquity QDa, подключенного к системе СВЭЖХ. Условия ЖХ-МС следующие, если иное не указано в экспериментальных разделах ниже. Колонка: Waters Acquity UPLC® ВЕН 2,1×30 мм, 1,7 мкм; длина волны 250-650 нм. Использование одного из двух градиентов: градиент 1: начальное удерживание при 10% В в течение 0,5 мин, 10-98% В в течение 3,5 мин, удерживание 98% В в течение 0,5 мин и возврат к 10% В в течение 0,6 мин; градиент 2: начальное удерживание при 10% В в течение 0,5 мин, 10-98% В в течение 1,5 мин, удерживание 98% В в течение 0,5 мин и возврат к 10% В для повторного уравнивания; температура колонки: 40°C +/-10°C; скорость потока: 0,5 мл/мин; растворитель для А: деионизированная вода с 0,1% HCOOH; растворитель для В: 100% ацетонитрил.

Безусловно, в данной области техники известны и знакомы специалистам обычной квалификации и другие приборы и средства для обнаружения и проведения ИЭР/МС.

Условия препаративной и аналитической ВЭЖХ, если применялись, подробно описаны ниже.

Пример 1. N-(4-(1,2,4,5-Тетразин-3-ил)бензил)-2-фторникотинамид

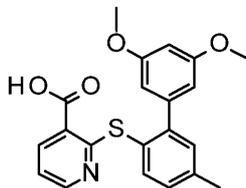


К перемешиваемому раствору гидрохлорида [4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил]метанамина (115 мг, 0,51 ммоль, Click Chemistry Tools, № CAS 1416711-59-5) и 2-фторпиридина-3-карбоновой кислоты (90 мг, 0,64 ммоль) в дихлорметане (6 мл), добавляли НАТУ (260 мг, 0,67 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламин (0,2 мл, 1,0 ммоль). Затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи.

Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном, органический слой последовательно промывали насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub>, насыщенным водным раствором NaCl, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали методом колоночной хроматографии на диоксиде кремния, элюируя градиентом 0-50% дихлорметана в этилацетате, с получением указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества пурпурного цвета после выпаривания растворителя желаемых хроматографических фракций (150 мг, выход 64%, содержат гексафторфосфатную соль). Указанное в заголовке соединение дополнительно очищали (75 мг, 0,16 ммоль) посредством растворения в 20 мл дихлорметана и промывки 3×0,5 М водным раствором ацетата калия. По-

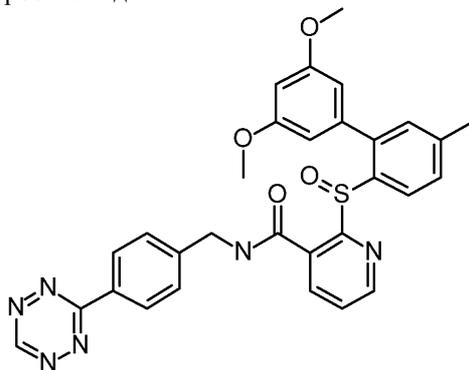
лученный органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением очищенного указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества пурпурного цвета (51 мг).  $^1\text{H}$  ЯМР (400,13 МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$  м.д.: 4,63 (д,  $J=6,0$  Гц, 2H), 7,51-7,47 (м, 1H), 7,65 (д,  $J=8,6$  Гц, 2H), 8,26-8,22 (м, 1H), 8,36-8,39 (м, 1H), 8,51-8,48 (м, 2H), 9,17-9,12 (м, 1H), 10,58 (с, 1H).  $^{19}\text{F}$  ЯМР (376,45 МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$  м.д.: -67,6. ЭР/МС (m/z): 311 (M+H).

Способ получения 1. 2-[2-(3,5-Диметоксифенил)-4-метилфенил]сульфанилпиридин-3-карбоновая кислота



Раствор метил-2-хлорпиридин-3-карбоксилата (380 мг, 2,2 ммоль) и 2-этилгексил-3-[2-(3,5-диметоксифенил)-4-метилфенил]сульфанилпропаноата (900 мг, 2,0 ммоль), трис-(дипалладий(0)ацетон)дипалладия(0) (180 мг, 0,20 ммоль) и 4,5-бис-(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантена (230 мг, 0,40 ммоль) в 1,4-диксоане (8 мл) барботировали  $\text{N}_2$  в течение 5 мин и добавляли 1 М раствор трет-бутоксид калия в ТГФ (2,20 мл, 2,20 ммоль). Реакционную смесь герметизировали и нагревали до  $100^\circ\text{C}$  в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и добавляли 1 н. водный раствор  $\text{NaOH}$  (6 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2-3 ч, разбавляли водой (30 мл) и экстрагировали этилацетатом (2 x 30 мл). Водный слой нейтрализовали до pH ~ 1 н. водным раствором  $\text{HCl}$  и экстрагировали этилацетатом (2x30 мл). Органические слои объединяли, промывали насыщенным водным  $\text{NaCl}$ , сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали методом колоночной хроматографии на диоксиде кремния, элюируя градиентом 0-100% гексанов в этилацетате, с получением указанного в заголовке соединения (270 мг, выход 33%) в виде твердого вещества желтого цвета. ЭР/МС (m/z): 382 [M+H].

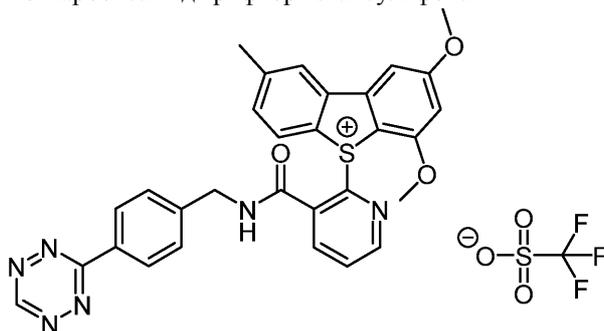
Способ получения 2. 2-[2-(3,5-Диметоксифенил)-4-метилфенил]сульфинил-N-[[4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил]метил]пиридин-3-карбоксамид



К перемешиваемой смеси 2-[2-(3,5-диметоксифенил)-4-метилфенил]сульфанилпиридин-3-карбоновой кислоты (100 мг, 0,26 ммоль) и гидрохлорида [4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил]метанамина (59 мг, 0,26 ммоль, Click Chemistry Tools, № CAS 1416711-59-5) и  $\text{NATU}$  (122 мг, 0,41 ммоль) в дихлорметане (2,6 мл) добавляли  $\text{N,N}$ -диизопропилэтиламин (120 мкл, 0,67 ммоль). Затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Летучие вещества удаляли при пониженном давлении. Полученный остаток растворяли в этилацетате (50 мл) и последовательно промывали 0,5 М водным раствором  $\text{KHCO}_3$  (2x30 мл) и насыщенным водным раствором  $\text{NaCl}$  (30 мл). Органические экстракты сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали методом хроматографии на силикагеле (0-100% гексана/этилацетата) с получением 2-[2-(3,5-диметоксифенил)-4-метилфенил]сульфанил-N-[[4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил]метил]пиридин-3-карбоксамида (121 мг, выход 84%) в виде розовой пены.

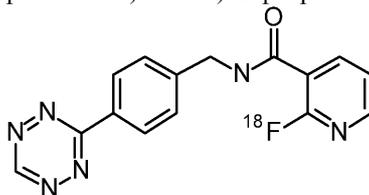
К перемешиваемому раствору 2-[2-(3,5-диметоксифенил)-4-метилфенил]сульфанил-N-[[4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил]метил]пиридин-3-карбоксамида (121 мг, 0,22 ммоль) в дихлорметане (2,5 мл) добавляли 3-хлорпероксибензойную кислоту (чистота 77%, 36 мг, 0,16 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали методом хроматографии на силикагеле, элюируя градиентом 0-100% гексанов/этилацетата, с получением 2-[2-(3,5-диметоксифенил)-4-метилфенил]сульфинил-N-[[4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил]метил]пиридин-3-карбоксамида (91 мг, 0,16 ммоль, выход 73%) в виде розовой пены:  $^1\text{H}$  ЯМР (400,13 МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$  м.д.: 2,39 (с, 3H), 3,69 (с, 6H), 4,60-4,42 (м, 2H), 6,50-6,46 (м, 3H), 7,19 (д,  $J=1,1$  Гц, 1H), 7,36-7,33 (м, 1H), 7,59-7,56 (м, 5H), 8,10-8,07 (м, 1H), 8,43 (д,  $J=8,5$ , 2H), 8,69-8,67 (м, 1H), 9,08 (т, 1H), 10,56 (с, 1H). ЭР/МС (m/z): 567 (M+H).

Способ получения 3. 2-(2,4-Диметокси-8-метилдibenзотиофен-5-иум-5-ил)-N-[[4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил]метил]пиридин-3-карбоксамид трифторметансульфонат



К перемешиваемой суспензии 2-[2-(3,5-диметоксифенил)-4-метилфенил]сульфинил-N-[[4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил]метил]пиридин-3-карбоксамид (25 мг, 0,04 ммоль) и диэтиламинополистирола (3,2 ммоль/г, 100 мг, 0,32 ммоль) в дихлорметане (3 мл), охлажденной до 0°C, добавляли 1 М раствор трифторметансульфонового ангидрида в дихлорметане (150 мкл, 0,15 ммоль). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры, перемешивали в течение 30 мин и гасили реакцию добавлением капли воды. Смесь фильтровали и твердую фазу промывали дихлорметаном. Объединенные фильтраты концентрировали при пониженном давлении и полученный остаток очищали методом хроматографии на силикагеле с использованием градиента 0-15% метанола в дихлорметане, с получением указанного в заголовке соединения (10 мг, 0,014 ммоль, выход 32%) в виде твердого вещества пурпурного цвета:  $^1\text{H}$  ЯМР (400,13 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  м.д.: 2,46 (с, 3H), 3,86 (с, 3H), 4,03 (с, 3H), 4,94-4,81 (м, 2H), 6,43 (млн. д,  $J=2,1$  Гц, 1H), 7,45-7,42 (м, 1H), 7,67 (д,  $J=2,1$  Гц, 1H), 7,80 (д, 8,5 Гц, 2H), 7,91-7,88 (м, 1H), 8,18 (д,  $J=8,4$  Гц, 1H), 8,28 (с, 1H), 8,65 (д,  $J=8,4$  Гц, 2H), 8,60-8,59 (м, 1H), 8,73-8,70 (м, 1H), 10,30 (т, 1H), 10,61 (с, 1H).  $^{19}\text{F}$  ЯМР (376,45 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  м.д.: -77,7. ЭР/МС ( $m/z$ ): 549 ( $\text{M}^+$ ).

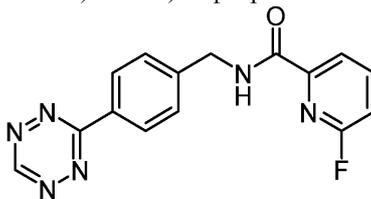
Пример 2. [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-Тетразин-3-ил)бензил)-2-фторникотинамид



Типичный радиохимический выход радиосинтеза указанного в заголовке соединения, составляет  $3,6 \pm 1,34\%$  ( $N = 3$ ) с использованием начальной активности от 0,435 до 1,442 Ки при времени синтеза 50 мин.

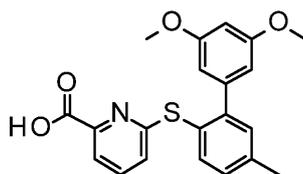
Фторидную активность [ $^{18}\text{F}$ ] (от 0,435 до 1,442 Ки) сохраняли на картридже Sep-Pak Accell Plus QMA Plus Light (130 мг, 37-55 мкм, номер по каталогу Waters WAT023525; предварительная обработка 5 мл воды для инъекций) и элюировали в реакционный сосуд TRACERlab  $\text{FX}_{\text{F-N}}$  с использованием 0,8 мл водного раствора бикарбоната тетраэтиламония, содержащего ацетонитрил [бикарбонат тетраэтиламония (3,5 мг) в воде (0,2 мл) и ацетонитриле (0,6 мл)]. Элюированную активность нагревали до 70°C и сушили при продувке сжатым газообразным азотом и в вакууме в течение 5 мин. Затем температуру повышали до 100°C и выдерживали в течение 5 мин под вакуумом с получением фторида [ $^{18}\text{F}$ ]тетраэтиламония. Реактор охлаждали до 35°C и добавляли раствор трифторметансульфоната 2-(2,4-диметокси-8-метилдibenзотиофен-5-иум-5-ил)-N-[[4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил]метил]пиридин-3-карбоксамид (1 мг, 1,43 мкмоль) в безводном ДМСО (1 мл). Температуру повышали до 40°C и реакционную смесь выдерживали при 40°C в течение 5 мин. Затем смесь разбавляли 3,5 мл 0,1% (об./об.) трифторуксусной кислоты в воде и полученную неочищенную реакционную смесь загружали в колонку препаративной ВЭЖХ для очистки (условия указаны на фиг. 1). Фракцию ВЭЖХ, содержащую очищенный [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-2-фторникотинамид (фиг. 1) собирали в пробирку, содержащую 40 мл воды, и загружали в картридж Sep-Pak® Light 1cc Vac C18 (50 мг, 55-105 мкм, номер по каталогу Waters WAT054955; предварительно кондиционированный последовательно 5 мл EtOH и 5 мл воды). Оставшийся [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-2-фторникотинамид элюировали с использованием 0,5 мл EtOH и восстанавливали до состава 5 мл 10% (об./об.) EtOH в фосфатно-солевом буфере. Количество полученного [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-2-фторникотинамида находилось в диапазоне от 0,014 до 0,033 Ки. Характерная аналитическая ВЭЖХ состава [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-2-фторникотинамида показана на фиг. 2.

## Пример 3. N-(4-(1,2,4,5-Тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиридинамид



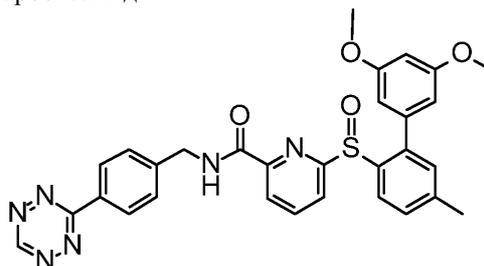
К смеси гидрохлорида [4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил]метанамина (60 мг, 0,27 ммоль, Click Chemistry Tools, № CAS 1416711-59-5) и 6-фторпиридин-2-карбоновой кислоты (45 мг, 0,32 ммоль) в дихлорметане (4 мл) добавляли N,N-диизопропилэтиламин (150 мкл, 0,86 ммоль), затем HATU (135 мг, 0,35 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Полученную розовую суспензию распределяли между дихлорметаном и 1 М водным раствором лимонной кислоты. Слои разделяли и водную фазу экстрагировали дихлорметаном (3×10 мл). Объединенные органические экстракты сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении на силикагеле. Полученный остаток очищали методом хроматографии на силикагеле, элюируя градиентом дихлорметана/этилацетата в качестве элюентов, с получением неочищенного указанного в заголовке соединения, загрязненного фторфосфатными солями. Неочищенный продукт растворяли в дихлорметане (10 мл) и промывали 0,5 М водным раствором ацетата калия (2×10 мл). Органические экстракты сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали с получением чистого указанного в заголовке соединения (64 мг, выход 77%) в виде твердого вещества пурпурного цвета:  $^1\text{H}$  ЯМР (400,13 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  м.д.: 4,62 (д, J=6,2 Гц, 2H), 7,45-7,43 (м, 1H), 7,61 (д, J=8,8 Гц, 2H), 8,02-7,99 (м, 1H), 8,20 (кв, 1H), 8,46 (д, J=8,5 Гц, 2H), 9,39 (т, 1H), 10,56 (с, 1H).  $^{19}\text{F}$  ЯМР (376,45 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  м.д.: -68,0. ЭР/МС (m/z): 311 (M+H).

Способ получения 4. 6-[2-(3,5-Диметоксифенил)-4-метил-фенил]сульфанилпиридин-2-карбоновая кислота



К раствору трис-(дибензилиденацетон)дипалладия(0) (312 мг, 0,33 ммоль) и бис-(2-дифенилфосфинофенилового) эфира (365 мг, 0,66 ммоль) в N,N-диметилацетамиде (15 мл) добавляли раствор метил-6-бромпиридин-2-карбоксилата (1,71 г, 8,0 ммоль), 2-этилгексил-3-[2-(3,5-диметоксифенил)-4-метилфенил]сульфанилпропаноата (3,0 г, 6,6 ммоль) и трет-бутоксид калия (2,3 г, 19,8 ммоль) в N,N-диметилацетамиде (20 мл). Смесь перемешивали при 120°C в течение 6 ч в атмосфере  $\text{N}_2$  и объединяли с реакционной смесью меньшего масштаба (с использованием 2-этилгексил-3-[2-(3,5-диметоксифенил)-4-метилфенил]сульфанилпропаноата (100 мг, 0,22 ммоль) и метил-6-бромпиридин-2-карбоксилата (58 мг, 0,27 ммоль) в N,N-диметилацетамиде). Реакционную смесь обрабатывали 2 М водным раствором NaOH (10 мл) и перемешивали при 40°C в течение 1 ч. Смесь разбавляли водой (70 мл), экстрагировали EtOAc (30 мл) и органический слой отбрасывали. Водную фазу доводили до pH ~ 3 добавлением 1 н. водного раствора HCl. Подкисленную смесь экстрагировали EtOAc (2×30 мл). Объединенные органические экстракты сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали методом препаративной ВЭЖХ (колонка: YMC-Triart C18, 250×50 мм, 7 мкм), элюируя градиентом 40%-80% ацетонитрила в воде, содержащей 0,225% муравьиной кислоты, в течение 25 мин. Желаемые фракции лиофилизировали с получением указанного в заголовке соединения (1,49 г, выход 53%) в виде твердого вещества желтого цвета. ЭР/МС (m/z): 382 [M+H]. Условия ЭР/МС: ЖХ (низкий pH): ЭР/МС проводят на системе жидкостной хроматографии Shimadzu LCMS 2020. Измерения масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией (записанные в положительном режиме) осуществляли на квадрупольном масс-спектрометре в режиме сканирования, подключенном к системе ЖХ. Колонка ЖХ-МС: Xtimate® C18 2,1×30 мм, 3 мкм, градиент: 10-80% В за 3 мин, 80% В за 0,5 мин, температура колонки: 50°C, скорость потока: 1,2 мл/мин, растворитель А: деионизированная вода с 0,037% муравьиной кислоты, растворитель В: ацетонитрил с 0,018% муравьиной кислоты, длина волны УФ 220 нм и 254 нм.

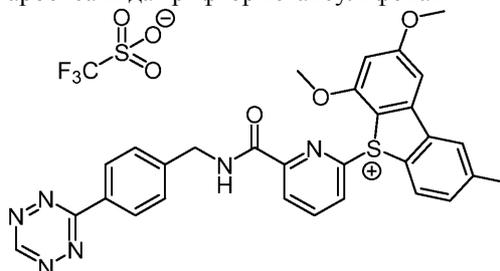
Способ получения 5. 6-[2-(3,5-Диметоксифенил)-4-метил-фенил]сульфинил-N-[[4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил]метил]пиридин-2-карбоксамид



К перемешиваемому раствору 6-[2-(3,5-диметоксифенил)-4-метилфенил]сульфанилпиридин-2-карбоновой кислоты (150 мг, 0,39 ммоль) и гидрохлоридной соли [4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил]метанамина (90 мг, 0,40 ммоль, Click Chemistry Tools, № CAS 1416711-59-5) в дихлорметане (4 мл) добавляли НАТУ (190 мг, 0,49 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламин (0,14 мл, 0,80 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали до частичного объема при пониженном давлении, разбавляли 30 мл этилацетата и последовательно промывали 0,5 М водным раствором КНСО<sub>3</sub> (дважды) и насыщенным водным раствором NaCl (один раз), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали методом колоночной хроматографии на диоксиде кремния, элюируя градиентом 0-90% этилацетата в гексанах, с получением 6-[2-(3,5-диметоксифенил)-4-метилфенил]сульфанил-N-[[4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил]метил]пиридин-2-карбоксамид (180 мг, выход 85%) в виде вспененного твердого вещества пурпурного цвета. ЭР/МС (m/z): 551 (M+H).

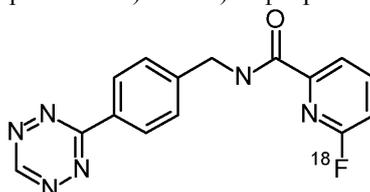
К перемешиваемому раствору 6-[2-(3,5-диметоксифенил)-4-метилфенил]сульфанил-N-[[4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил]метил]пиридин-2-карбоксамид (180 мг, 0,33 ммоль) в дихлорметане (10 мл) добавляли 3-хлорпероксибензойную кислоту (чистота 77%, 73 мг, 0,33 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2-3 ч. Смесь очищали методом колоночной хроматографии на диоксиде кремния, элюируя градиентом 0-100% этилацетата в гексанах, с получением указанного в заголовке соединения (167 мг, выход 99%) в виде пенистого твердого вещества пурпурного цвета. ЭР/МС (m/z): 567 (M+H).

Способ получения 6. 6-(2,4-Диметокси-8-метилдibenзотиофен-5-иум-5-ил)-N-[[4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил]метил]пиридин-2-карбоксамид трифторметансульфонат



К перемешиваемой суспензии 6-[2-(3,5-диметоксифенил)-4-метилфенил]сульфинил-N-[[4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил]метил]пиридин-2-карбоксамид (88 мг, 0,16 ммоль) и триэтиламина на полимерном носителе (0,4 г, 1 ммоль, 3,2 ммоль/г) в дихлорметане (8 мл) при 0°C добавляли 1 М раствор ангидрида трифторметансульфоной кислоты (0,42 мл, 0,42 ммоль) в дихлорметане. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин и гасили каплей воды. Полученную суспензию фильтровали, промывали дихлорметаном и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали методом колоночной хроматографии на диоксиде кремния, элюируя градиентом 0-15% метанола в дихлорметане, с получением указанного в заголовке соединения (91 мг, выход 81%) в виде твердого вещества пурпурного цвета. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ м.д.: 2,49 (с, 3H), 4,01-4,00 (м, 6H), 4,75-4,63 (м, 2H), 5,75 (с, 1H), 7,01 (д, J=2,1 Гц, 1H), 7,62-7,59 (м, 3H), 7,76-7,72 (м, 2H), 8,23 (т, J=7,8 Гц, 1H), 8,30 (д, J=0,9, 7,8 Гц, 1H), 8,37-8,34 (м, 1H), 8,44 (д, J=8,3 Гц, 1H), 8,55-8,52 (м, 2H), 9,12-9,08 (м, 1H), 10,61 (с, 1H). <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ м.д.: -77,7. ЭР/МС (m/z): 549 (M<sup>+</sup>).

Пример 4. [<sup>18</sup>F]N-(4-(1,2,4,5-Тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиколинамид



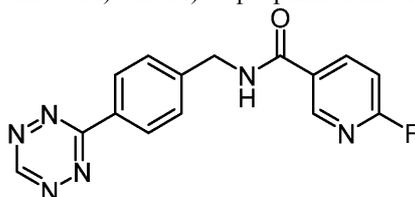
Типичный радиохимический выход радиосинтеза [<sup>18</sup>F]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-

фторпиколинамида составляет  $18,5 \pm 4,6\%$  ( $N = 6$ ) с использованием начальной активности от 0,675 до 1,327 Ки при времени синтеза 45-50 мин.

Фторидную активность [ $^{18}\text{F}$ ] (от 0,195 до 1,475 Ки) сохраняли на картридже Sep-Pak Accell Plus QMA Plus Light (130 мг, 37-55 мкм, номер по каталогу Waters WAT023525; предварительно кондиционированный 5 мл воды для инъекций) и элюировали в реакционный сосуд TRACERlab FX<sub>F-N</sub> с использованием 0,8 мл водного раствора бикарбоната тетраэтиламмония [бикарбонат тетраэтиламмония (3,5 мг) в воде (0,2 мл) и ацетонитриле (0,6 мл)]. Элюированную активность нагревали до 70°C и сушили при продувке сжатым газообразным азотом и в вакууме в течение 5 мин. Температуру повышали до 100°C и выдерживали в течение 5 мин в вакууме, с получением фторида [ $^{18}\text{F}$ ]тетраэтиламмония. В реактор добавляли 1 мл безводного ДМСО и охлаждали реактор до 35°C. Раствор фторида [ $^{18}\text{F}$ ]тетраэтиламмония переносили во флакон для инъекций TRACERlab (RV2), содержащий раствор трифторметансульфоната 6-(2,4-диметокси-8-метилдibenзотиофен-5-ил-5-ил)-N-[4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил]метил]пиридин-2-карбоксамида (1 мг, 1,43 мкмоль) в безводном ДМСО (0,2 мл) и выдерживали при комнатной температуре в течение 5 мин. Смесь разбавляли 3,5 мл 0,1% (об./об.) трифторуксусной кислоты в воде и полученную неочищенную реакционную смесь загружали в колонку полупрепаративной ВЭЖХ для очистки (условия указаны на фиг. 3). Фракцию ВЭЖХ, содержащую очищенный [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиколинамид (фиг. 3), собирали в пробирку, содержащую 40 мл воды, и загружали в картридж Sep-Pak® Light 1cc Vac C18 (50 мг, 55-105 мкм, номер по каталогу Waters WAT054955; предварительно кондиционированный 5 мл EtOH и 5 мл воды). Оставшийся [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиколинамид элюировали с использованием 0,5 мл EtOH и восстанавливали до состава 5 мл 10% (об./об.) EtOH в фосфатно-солевом буфере. Количество полученного [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиколинамида находилось в диапазоне от 0,0085 до 0,066 Ки. Характерная аналитическая ВЭЖХ состава [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиколинамида показана на фиг. 4.

Сравнительная ссылка.

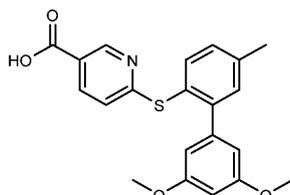
Пример 5. N-(4-(1,2,4,5-Тетразин-3-ил)бензил)-6-фторникотинамид



К перемешиваемому раствору гидрохлорида [4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил]метанамина (60 мг, 0,27 ммоль, Click Chemistry Tools, № CAS 1416711-59-5) и 6-фторпиридин-3-карбоновой кислоты (46 мг, 0,33 ммоль) в дихлорметане (4 мл) добавляли НАТУ (135 мг, 0,35 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламин (0,1 мл, 0,57 ммоль). Затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали и разбавляли этилацетатом, органический слой последовательно промывали насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$ , насыщенным водным раствором  $\text{NaCl}$ , сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали методом колоночной хроматографии на диоксиде кремния, элюируя градиентом 0-50% дихлорметана в этилацетате, с получением указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества пурпурного цвета (18 мг, 0,06 ммоль).

$^1\text{H}$  ЯМР (400,13 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ): 4,81 (д,  $J=5,9$  Гц, 2H), 6,61-6,56 (м, 1H), 7,06 (дд,  $J=2,1, 8,4$  Гц, 1H), 7,62 (д,  $J=8,1$  Гц, 2H), 8,35-8,30 (м, 1H), 8,69-8,64 (м, 3H), 10,24 (с, 1H),  $^{19}\text{F}$  ЯМР (376,45 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  м.д.: -62,8. ЭР/МС (m/z): 311  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

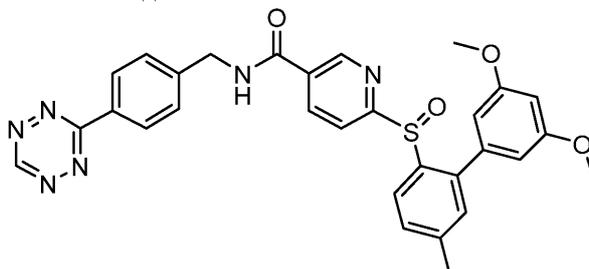
Способ получения 7. 6-[2-(3,5-Диметоксифенил)-4-метилфенил]сульфанилпиридин-3-карбоновая кислота



В раствор этил 6-хлорпиридин-3-карбоксилата (280 мг, 1,51 ммоль) и 2-этилгексил-3-[2-(3,5-диметоксифенил)-4-метилфенил]сульфанилпропаноата (740 мг, 1,66 ммоль) в 1,4-дихлорэтане (10 мл) добавляли 1 М раствор трет-бутоксид калия в ТГФ (1,8 мл, 1,8 ммоль). Раствор нагревали до 80°C в течение 4-5 ч, затем перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Добавляли 2 М водный раствор гидроксида лития (10 мл, 20 ммоль) и смесь перемешивали при 80°C в течение 2-3 ч. Раствор охлаждали до комнатной температуры, подкисляли 2н.  $\text{HCl}$  и экстрагировали этилацетатом. Затем органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали. Остаток очищали на колонке с силика-

гелем (0-80% гексанов/этилацетата) с получением указанного в заголовке соединения (527 мг, 1,31 ммоль) в виде твердого вещества грязно-белого цвета. ЭР/МС (m/z): 382 [M+H]<sup>+</sup>.

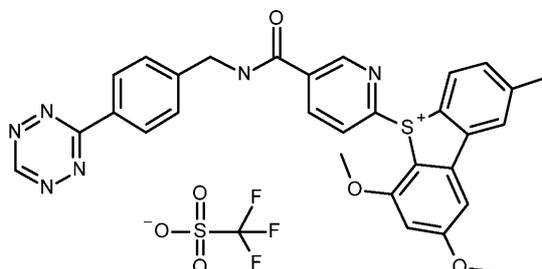
Способ получения 8. N-(4-(1,2,4,5-Тетразин-3-ил)бензил)-6-((3',5'-диметокси-5-метил-[1,1'-бифенил]-2-ил)сульфинил)никотинамид



К перемешиваемой смеси 6-[2-(3,5-диметоксифенил)-4-метилфенил]сульфанилпиридин-3-карбоновой кислоты (94 мг, 0,25 ммоль) и гидрохлорида [4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил]метанамина (55 мг, 0,25 ммоль) и НАТУ (115 мг, 0,30 ммоль) в дихлорметане (2 мл) добавляли N,N-диизопропилэтиламин (0,07 мл, 0,4 ммоль). Затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Полученный остаток разбавляли дихлорметаном и последовательно промывали насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub> и насыщенным водным раствором NaCl. Органические экстракты сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали хроматографией на силикагеле (0-80% гексанов/этилацетата) с получением N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-((3',5'-диметокси-5-метил-[1,1'-бифенил]-2-ил)тио)никотинамида (70 мг, 0,13 ммоль) в виде розовой пены.

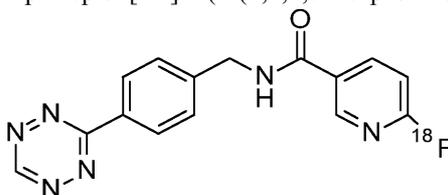
К раствору N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-((3',5'-диметокси-5-метил-[1,1'-бифенил]-2-ил)тио)никотинамида (70 мг, 0,13 ммоль) в дихлорметане (4 мл) добавляли 3-хлорпероксибензойную кислоту (20 мг, 0,09 ммоль, чистота 77%). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2-3 ч. Затем смесь очищали на колонке с силикагелем (12 г, 0-100% гексанов/этилацетата) с получением указанного в заголовке соединения (24 мг) в виде розовой пены: ЭР/МС (m/z): 567 [M+H]<sup>+</sup>.

Способ получения 9. 5-(5-((4-(1,2,4,5-Тетразин-3-ил)бензил)карбамоил)пиридин-2-ил)-2,4-диметокси-8-метил-5Н-дibenzo[b,d]тиофен-5-ия трифторметансульфонат



К перемешиваемой суспензии N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-((3',5'-диметокси-5-метил-[1,1'-бифенил]-2-ил)сульфинил)никотинамида (23 мг, 0,04 ммоль) и диэтиламинополистирола (3,2 ммоль/г, 70 мг, 0,22 ммоль) в дихлорметане (3 мл), охлажденном до 0°C, добавляли 1 М раствор ангидрида трифторметансульфоновой кислоты в дихлорметане (130 мкл, 0,13 ммоль). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры, перемешивали в течение 30 мин. Реакцию гасили добавлением капли воды. Смесь фильтровали и твердую фазу промывали дихлорметаном. Объединенные фильтраты концентрировали при пониженном давлении и полученный остаток очищали хроматографией на силикагеле, используя градиент 0-20% метанола в дихлорметане, с получением указанного в заголовке соединения (12 мг, 0,017 ммоль, выход 41%) в виде твердого вещества пурпурного цвета: <sup>1</sup>H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ м.д.: 2,55 (с, 3H), 3,95 (с, 3H), 4,00 (с, 3H), 4,64-4,62 (м, 2H), 6,92 (д, J=2,1 Гц, 1H), 7,62-7,57 (м, 3H), 7,69 (д, J=2,1 Гц, 8,26 (д, J=8,2 Гц, 1H), 8,39-8,37 (м, 2H), 8,48-8,44 (м, 2H), 8,54-8,52 (м, 1H), 8,92-8,91 (м, 1H), 9,48-9,44 (м, 1H), 10,58 (с, 1H), <sup>19</sup>F ЯМР (376,45 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ м.д.: -77,7. ЭР/МС (m/z): 549 [M<sup>+</sup>].

Сравнительный ссылочный пример 6. [<sup>18</sup>F]N-(4-(1,2,4,5-Тетразин-3-ил)бензил)-6-фторникотинамид



Типичный радиохимический выход радиосинтеза [<sup>18</sup>F]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторникотинамида составляет 20 ± 2,18% (N = 3) при использовании от 0,318 до 0,615 Ки начальной активности при времени синтеза 50 мин.

Фторидную активность [ $^{18}\text{F}$ ] (от 0,318 до 0,615 Ки) сохраняли на картридже Sep-Pak Accell Plus QMA Plus Light (130 мг, 37-55 мкм, номер по каталогу Waters WAT023525); и элюировали в реакционный сосуд TRACERlab FX<sub>F,N</sub> с использованием 0,8 мл водного раствора бикарбоната тетраэтиламмония [бикарбонат тетраэтиламмония (3,6 мг) в воде (0,2 мл) и ацетонитриле (0,6 мл)]. Элюированную активность нагревали до 70°C и сушили при продувке сжатым газообразным азотом и в вакууме в течение 5 мин. Затем температуру повышали до 100°C и выдерживали в течение 5 мин в вакууме с получением [ $^{18}\text{F}$ ] фторида тетраэтиламмония. Затем реактор охлаждали до 30°C и добавляли в реактор 1,2 мл безводного ДМСО. Раствор [ $^{18}\text{F}$ ] фторида тетраэтиламмония переносили во флакон для инъекций TRACERlab (RV2), содержащий исходный раствор трифторметансульфоната 5-(5-((4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)карбамоил)пиридин-2-ил)-2,4-диметокси-8-метил-5Н-дibenzo[b,d]тиофен-5-ия [(1 мг, 1,83 мкмоль) в 0,3 мл безводного ДМСО] и оставляли при комнатной температуре в течение 2 мин. Затем смесь разбавляли 3,5 мл 1% (об./об.) ТФУ в воде и полученную неочищенную реакционную смесь загружали на колонку полупрепаративной ВЭЖХ для очистки (условия приведены на фиг. 5). Фракцию ВЭЖХ, содержащую очищенный [ $^{18}\text{F}$ ] N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторникотинамид (фиг. 5), собирали во флакон, содержащий 40 мл 0,02% (об./об.) ТФУ в воде и загружали в картридж Sep-Pak® Light C18 (130 мг, 55-105 мкм, номер по каталогу Waters WAT023501).

Оставшийся [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторникотинамид промывали 5 мл 0,02% (об./об.) ТФУ в воде, элюировали с использованием 1 мл EtOH и восстанавливали до состава 10 мл 10% (об./об.) EtOH в ФСБ. Количество полученного [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторникотинамида находилось в диапазоне от 0,046 до 0,125 Ки. Характерные аналитические хроматограммы ВЭЖХ состава [ $^{18}\text{F}$ ] N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторникотинамида показаны на фиг. 6.

ПЭТ-КТ визуализация [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-2-фторникотинамида (пример 2).

Использовали мультимодальный сканер Siemens Inveon® (Siemens, Германия) для микровизуализации ПЭТ-КТ. Анестезировали самцов мышей CD-1 (возрастом 6 недель, ~30 г) смесью 3% изофлурана/97% кислорода и размещали на платформе сканера. Вводили мышам [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-2-фторникотинамид путем внутривенной инъекции болюса в хвостовую вену (~300 мКи в общем объеме 150 мкл солевого раствора). Всего снимали четыре сканограммы динамической ПЭТ, затем проводили сканирование КТ высокого разрешения по короткому протоколу для анатомической регистрации. Получали изображения ПЭТ каждую минуту периода сбора данных. Определяли захват изотопного индикатора в головном мозге, мышцах и костях посредством визуального отделения областей, представляющих интерес (ROI), на основании совмещенных изображений ПЭТ/КТ, и определяли соответствующие значения активности с использованием программного обеспечения Inveon® Research Workplace. Все значения представлены как % введенной дозы на грамм (%ID/g).

Анализ четырех 60-минутных сканограмм ПЭТ показал, что [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-2-фторникотинамид легко проникает через гематоэнцефалический барьер. Максимальный захват в головном мозге 3,3%ID/g наблюдали через 4,5 минуты после инъекции, после чего происходит устойчивый клиренс изотопного индикатора до 1,2%ID/g за 59,5 мин. Захват [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-2-фторникотинамида также наблюдали по всему организму в органах, таких как печень, почки и сердце. Уровень захвата в костях на протяжении периода сканирования оставался низким, что соответствовало отсутствию дефторирования. Кривые временной активности строили для [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-2-фторникотинамида у самцов мышей CD-1 (n = 4). Данные представлены в табличной форме (табл. 1) ниже.

В табл. 1 представлены результаты 60-минутной активности ПЭТ для [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-2-фторникотинамида (мозг, мышцы и кости, N = 4).

Таблица 1  
Таблица активности [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-2-фторникотинамида  
на 60-минутном ПЭТ (пример 2) (мозг, мышцы и кости)

Время (мин)	Головной мозг			Мышцы			Кости		
	Среднее значение (%ID/g)	СЭМ	N	Среднее значение (%ID/g)	СЭМ	N	Среднее значение (%ID/g)	СЭМ	N
0	0,00	0,00	4	0,00	0,00	4	0,00	0,00	4
0,5	0,00	0,00	4	0,00	0,00	4	0,00	0,00	4
1,5	0,64	0,24	4	0,16	0,10	4	0,19	0,10	4
2,5	2,74	0,93	4	0,76	0,31	4	0,95	0,37	4
3,5	2,47	0,80	4	0,79	0,32	4	1,06	0,39	4
4,5	3,27	0,35	4	1,13	0,20	4	1,32	0,14	4
5,5	3,05	0,34	4	1,21	0,18	4	1,37	0,14	4
6,5	2,95	0,28	4	1,33	0,18	4	1,42	0,15	4
7,5	2,74	0,27	4	1,36	0,19	4	1,44	0,14	4
8,5	2,57	0,30	4	1,44	0,17	4	1,52	0,11	4
9,5	2,42	0,29	4	1,51	0,17	4	1,56	0,10	4
10,5	2,29	0,28	4	1,53	0,18	4	1,58	0,08	4
11,5	2,18	0,26	4	1,57	0,16	4	1,54	0,10	4
12,5	2,07	0,24	4	1,60	0,13	4	1,58	0,12	4
13,5	1,97	0,22	4	1,58	0,17	4	1,63	0,09	4
14,5	1,89	0,20	4	1,58	0,15	4	1,58	0,07	4
15,5	1,82	0,20	4	1,67	0,14	4	1,59	0,08	4
16,5	1,75	0,19	4	1,64	0,15	4	1,64	0,08	4
17,5	1,70	0,17	4	1,65	0,11	4	1,65	0,07	4
18,5	1,65	0,16	4	1,59	0,12	4	1,64	0,06	4
19,5	1,60	0,15	4	1,64	0,12	4	1,65	0,09	4
20,5	1,56	0,14	4	1,63	0,11	4	1,62	0,04	4
21,5	1,51	0,13	4	1,67	0,10	4	1,61	0,09	4
22,5	1,47	0,12	4	1,68	0,12	4	1,59	0,02	4
23,5	1,45	0,11	4	1,66	0,13	4	1,63	0,04	4
24,5	1,42	0,11	4	1,69	0,10	4	1,63	0,08	4
25,5	1,39	0,09	4	1,64	0,13	4	1,62	0,05	4
26,5	1,37	0,09	4	1,62	0,13	4	1,57	0,05	4
27,5	1,36	0,08	4	1,69	0,11	4	1,62	0,05	4
28,5	1,33	0,09	4	1,65	0,13	4	1,61	0,03	4
29,5	1,32	0,08	4	1,68	0,10	4	1,66	0,05	4
30,5	1,29	0,07	4	1,72	0,11	4	1,64	0,02	4

31,5	1,29	0,07	4	1,64	0,11	4	1,58	0,04	4
32,5	1,27	0,07	4	1,66	0,08	4	1,64	0,03	4
33,5	1,26	0,06	4	1,69	0,08	4	1,55	0,03	4
34,5	1,25	0,06	4	1,62	0,09	4	1,67	0,03	4
35,5	1,25	0,06	4	1,65	0,15	4	1,57	0,05	4
36,5	1,24	0,06	4	1,70	0,11	4	1,61	0,07	4
37,5	1,22	0,05	4	1,66	0,09	4	1,58	0,02	4
38,5	1,21	0,06	4	1,62	0,09	4	1,61	0,05	4
39,5	1,21	0,05	4	1,67	0,14	4	1,66	0,03	4
40,5	1,21	0,05	4	1,65	0,11	4	1,60	0,03	4
41,5	1,20	0,05	4	1,70	0,10	4	1,65	0,05	4
42,5	1,19	0,05	4	1,63	0,09	4	1,63	0,06	4
43,5	1,18	0,06	4	1,68	0,15	4	1,71	0,10	4
44,5	1,19	0,05	4	1,66	0,13	4	1,61	0,04	4
45,5	1,19	0,05	4	1,70	0,09	4	1,60	0,03	4
46,5	1,19	0,05	4	1,59	0,09	4	1,52	0,03	4
47,5	1,19	0,06	4	1,64	0,06	4	1,57	0,06	4
48,5	1,18	0,05	4	1,57	0,11	4	1,62	0,05	4
49,5	1,18	0,05	4	1,65	0,08	4	1,59	0,05	4
50,5	1,17	0,05	4	1,57	0,11	4	1,66	0,04	4
51,5	1,18	0,05	4	1,61	0,07	4	1,64	0,03	4
52,5	1,17	0,05	4	1,62	0,12	4	1,64	0,05	4
53,5	1,16	0,05	4	1,66	0,13	4	1,55	0,07	4
54,5	1,17	0,05	4	1,58	0,11	4	1,61	0,04	4
55,5	1,17	0,05	4	1,55	0,09	4	1,65	0,08	4
56,5	1,17	0,05	4	1,72	0,09	4	1,62	0,05	4
57,5	1,18	0,05	4	1,59	0,05	4	1,65	0,08	4
58,5	1,17	0,05	4	1,57	0,10	4	1,64	0,04	4
59,5	1,17	0,05	4	1,53	0,08	4	1,62	0,09	4

ПЭТ-КТ визуализация [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиколинамида (пример 4).

Использовали мультимодальный сканер Siemens Inveon® (Siemens, Германия) для микровизуализации ПЭТ-КТ. Анестезировали самцов мышей CD-1 (возрастом 6 недель, ~30 г) смесью 3% изофлурана/97% кислорода и размещали на платформе сканера. Мышам вводили [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиколинамид путем внутривенной инъекции болюса в хвостовую вену (~300 мкКи в общем объеме 150 мкл солевого раствора). Всего снимали четыре сканограммы динамической ПЭТ, затем проводили сканирование КТ высокого разрешения по короткому протоколу для анатомической регистрации. Получали изображения ПЭТ каждую минуту периода сбора данных. Определяли захват изотопного индикатора в головном мозге, мышцах и костях посредством визуального отделения областей, представляющих интерес (ROI), на основании совмещенных изображений ПЭТ/КТ, и определяли соответствующие значения активности с использованием программного обеспечения Inveon® Research Workplace. Все значения представлены как % введенной дозы на грамм (%ID/g).

Анализ четырех 60-минутных сканограмм ПЭТ показал, что [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиколинамид легко проникает через гематоэнцефалический барьер. Максимальный захват в головном мозге 4,3%ID/g наблюдали через 2,5 минуты после инъекции, после чего происходит устойчивый клиренс изотопного индикатора до 1,1%ID/g за 59,5 мин. Захват [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиколинамида также наблюдали по всему организму в органах, таких как печень, почки и сердце. Уровень захвата в костях на протяжении периода сканирования оставался низким, что соответствовало отсутствию дефторирования. Кривые временной активности строили для [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиколинамида у самцов мышей CD-1 (n = 4). Данные представлены в табличной форме (табл. 2) ниже.

В табл. 2 представлены результаты 60-минутной активности ПЭТ для [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиколинамида (головной мозг, мышцы и кости, N = 4).

Таблица 60-минутной активности ПЭТ для [<sup>18</sup>F]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиколинамида (пример 4) (головной мозг, мышцы и кости)

Время (мин)	Головной мозг			Мышцы			Кости		
	Среднее значение %ID/г	СЭМ	N	Среднее значение %ID/г	СЭМ	N	Среднее значение %ID/г	СЭМ	N
0	0,00	0,00	4	0,00	0,00	4	0,00	0,00	4
0,5	0,00	0,00	4	0,00	0,00	4	0,00	0,00	4
1,5	0,68	0,29	4	0,08	0,05	4	0,10	0,06	4
2,5	4,30	0,30	4	0,94	0,22	4	0,89	0,15	4
3,5	3,34	0,09	4	1,11	0,24	4	1,09	0,15	4
4,5	2,61	0,04	4	1,14	0,21	4	1,02	0,09	4
5,5	2,14	0,02	4	1,13	0,22	4	0,97	0,14	4
6,5	1,94	0,02	4	1,18	0,22	4	1,05	0,07	4
7,5	1,71	0,02	4	1,23	0,22	4	1,09	0,11	4
8,5	1,58	0,01	4	1,18	0,17	4	1,11	0,11	4
9,5	1,46	0,01	4	1,24	0,21	4	1,13	0,06	4
10,5	1,38	0,01	4	1,22	0,14	4	1,03	0,07	4
11,5	1,32	0,01	4	1,24	0,16	4	1,03	0,07	4
12,5	1,27	0,01	4	1,19	0,12	4	1,11	0,05	4
13,5	1,23	0,01	4	1,19	0,15	4	1,06	0,07	4
14,5	1,21	0,01	4	1,16	0,16	4	1,11	0,06	4
15,5	1,17	0,00	4	1,17	0,17	4	1,11	0,06	4
16,5	1,16	0,00	4	1,21	0,15	4	1,08	0,04	4
17,5	1,15	0,01	4	1,24	0,13	4	1,05	0,03	4
18,5	1,14	0,00	4	1,24	0,10	4	1,16	0,06	4
19,5	1,13	0,01	4	1,17	0,12	4	1,07	0,04	4
20,5	1,12	0,01	4	1,20	0,14	4	1,05	0,08	4
21,5	1,13	0,01	4	1,22	0,12	4	1,16	0,09	4
22,5	1,14	0,01	4	1,15	0,10	4	1,12	0,09	4
23,5	1,11	0,01	4	1,16	0,10	4	1,16	0,11	4
24,5	1,12	0,01	4	1,22	0,09	4	1,07	0,08	4
25,5	1,10	0,02	4	1,16	0,09	4	1,22	0,07	4
26,5	1,10	0,03	4	1,13	0,14	4	1,12	0,06	4
27,5	1,09	0,02	4	1,12	0,09	4	1,13	0,11	4
28,5	1,10	0,02	4	1,16	0,09	4	1,13	0,08	4
29,5	1,09	0,03	4	1,19	0,10	4	1,16	0,04	4
30,5	1,09	0,03	4	1,14	0,10	4	1,20	0,07	4

31,5	1,09	0,03	4	1,15	0,09	4	1,21	0,13	4
32,5	1,09	0,02	4	1,16	0,09	4	1,11	0,10	4
33,5	1,09	0,02	4	1,12	0,07	4	1,20	0,10	4
34,5	1,10	0,02	4	1,17	0,09	4	1,18	0,09	4
35,5	1,09	0,02	4	1,12	0,10	4	1,21	0,08	4
36,5	1,09	0,02	4	1,15	0,08	4	1,20	0,08	4
37,5	1,08	0,03	4	1,14	0,08	4	1,25	0,05	4
38,5	1,09	0,02	4	1,15	0,07	4	1,23	0,13	4
39,5	1,09	0,02	4	1,10	0,10	4	1,28	0,12	4
40,5	1,10	0,02	4	1,13	0,12	4	1,16	0,08	4
41,5	1,09	0,02	4	1,14	0,11	4	1,21	0,11	4
42,5	1,10	0,03	4	1,16	0,07	4	1,22	0,13	4
43,5	1,09	0,02	4	1,12	0,10	4	1,22	0,12	4
44,5	1,10	0,03	4	1,14	0,09	4	1,28	0,08	4
45,5	1,10	0,02	4	1,14	0,14	4	1,23	0,10	4
46,5	1,11	0,03	4	1,18	0,07	4	1,29	0,09	4
47,5	1,11	0,04	4	1,18	0,09	4	1,29	0,11	4
48,5	1,11	0,04	4	1,18	0,10	4	1,23	0,12	4
49,5	1,11	0,04	4	1,13	0,11	4	1,27	0,10	4
50,5	1,12	0,04	4	1,10	0,09	4	1,28	0,17	4
51,5	1,12	0,04	4	1,09	0,10	4	1,27	0,11	4
52,5	1,11	0,04	4	1,18	0,08	4	1,29	0,12	4
53,5	1,12	0,04	4	1,14	0,10	4	1,31	0,11	4
54,5	1,12	0,04	4	1,12	0,09	4	1,34	0,14	4
55,5	1,12	0,04	4	1,14	0,10	4	1,27	0,09	4
56,5	1,12	0,05	4	1,11	0,08	4	1,31	0,17	4
57,5	1,13	0,05	4	1,07	0,12	4	1,29	0,15	4
58,5	1,13	0,04	4	1,09	0,10	4	1,33	0,13	4
59,5	1,13	0,05	4	1,12	0,10	4	1,40	0,11	4

ПЭТ-КТ визуализация [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторникотинамида (сравнительный пример б).

Использовали мультимодальный сканер Siemens Inveon® (Siemens, Германия) для микровизуализации ПЭТ/КТ. Анестезировали самцов мышей CD-1 (возрастом 6 недель, 30-40 г) смесью 3% изофлурана/97% кислорода и размещали на платформе сканера. Мышам вводили [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторникотинамид путем внутривенной инъекции болюса в хвостовую вену (~300 мкКи в общем объеме 150 мкл солевого раствора). Всего снимали две сканограммы динамической ПЭТ, затем проводили сканирование КТ высокого разрешения по короткому протоколу для анатомической регистрации. Получали изображения ПЭТ каждую минуту периода сбора данных. Определяли захват изотопного индикатора в головном мозге, мышцах и костях посредством визуального отделения областей, представляющих интерес (ROI), на основании совмещенных изображений ПЭТ/КТ, и определяли соответствующие значения активности с использованием программного обеспечения Inveon® Research Workplace. Все значения представлены как % введенной дозы на грамм (%ID/г).

Анализ двух ПЭТ-сканограмм показывает, что [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторникотинамид проникает через гематоэнцефалический барьер. Максимальный захват в головном мозге 2,6%ID/г наблюдали через 2,5 минуты после инъекции, после чего происходит устойчивый клиренс изотопного индикатора до 1,1%ID/г за 59,5 мин. Захват [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторникотинамида также наблюдали по всему организму в органах, таких как печень, почки, кишечник и сердце. Уровень захвата в костях на протяжении периода сканирования оставался низким, что соответствовало отсутствию дефторирования. Кривые временной активности строили для [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторникотинамида у самцов мышей CD-1 (n = 2). Данные представлены в табличной форме (табл. 3) ниже.

В табл. 3 представлены результаты 60-минутной активности ПЭТ для [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторникотинамида (головной мозг, мышцы и кости, N = 2).

Таблица 60-минутной активности ПЭТ для [<sup>18</sup>F]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторникотинамида (сравнительный пример б) (головной мозг, мышцы и кости)

Время (мин)	Головной мозг			Мышцы			Кости		
	Среднее значение %ID/г	СЭМ	N	Среднее значение %ID/г	СЭМ	N	Среднее значение %ID/г	СЭМ	N
0,0	0,00	0,00	2	0,00	0,00	2	0,00	0,00	2
0,5	0,00	0,00	2	0,00	0,00	2	0,00	0,00	2
1,5	0,52	0,52	2	0,07	0,07	2	0,09	0,09	2
2,5	2,57	0,24	2	0,56	0,11	2	0,83	0,13	2
3,5	2,45	0,07	2	0,67	0,09	2	0,95	0,19	2
4,5	2,29	0,09	2	0,73	0,02	2	0,85	0,07	2
5,5	2,20	0,08	2	0,72	0,02	2	0,86	0,06	2
6,5	2,23	0,08	2	0,80	0,00	2	0,90	0,13	2
7,5	2,15	0,08	2	0,84	0,01	2	0,90	0,10	2
8,5	2,10	0,09	2	0,84	0,03	2	0,90	0,10	2
9,5	2,00	0,12	2	0,78	0,03	2	0,81	0,15	2
10,5	1,95	0,12	2	0,79	0,01	2	0,90	0,06	2
11,5	1,89	0,12	2	0,84	0,01	2	0,92	0,14	2
12,5	1,86	0,13	2	0,84	0,02	2	0,94	0,20	2
13,5	1,83	0,13	2	0,88	0,02	2	0,97	0,11	2
14,5	1,78	0,12	2	0,88	0,04	2	0,98	0,00	2
15,5	1,76	0,14	2	0,89	0,04	2	0,98	0,12	2
16,5	1,72	0,12	2	0,93	0,07	2	0,83	0,11	2
17,5	1,69	0,15	2	0,91	0,04	2	1,00	0,18	2
18,5	1,65	0,13	2	0,89	0,00	2	0,97	0,08	2
19,5	1,63	0,14	2	0,90	0,03	2	0,93	0,17	2
20,5	1,61	0,15	2	0,95	0,07	2	1,01	0,03	2
21,5	1,58	0,15	2	0,98	0,07	2	0,91	0,25	2
22,5	1,56	0,15	2	0,95	0,03	2	1,02	0,10	2
23,5	1,55	0,17	2	1,00	0,09	2	1,04	0,06	2
24,5	1,51	0,15	2	0,98	0,05	2	1,11	0,14	2
25,5	1,49	0,15	2	0,99	0,09	2	0,93	0,06	2
26,5	1,46	0,14	2	0,95	0,05	2	0,86	0,09	2
27,5	1,45	0,15	2	0,94	0,03	2	0,94	0,08	2
28,5	1,42	0,14	2	1,00	0,06	2	1,00	0,08	2
29,5	1,40	0,15	2	0,97	0,05	2	1,05	0,03	2
30,5	1,38	0,16	2	0,99	0,05	2	0,95	0,14	2

31,5	1,38	0,15	2	0,95	0,01	2	1,04	0,05	2
32,5	1,36	0,15	2	0,97	0,04	2	1,04	0,09	2
33,5	1,36	0,14	2	1,00	0,07	2	1,01	0,01	2
34,5	1,34	0,16	2	1,04	0,06	2	1,06	0,15	2
35,5	1,33	0,15	2	1,04	0,08	2	0,97	0,10	2
36,5	1,30	0,16	2	1,04	0,07	2	1,01	0,03	2
37,5	1,31	0,15	2	1,03	0,05	2	0,99	0,10	2
38,5	1,29	0,15	2	1,03	0,05	2	1,12	0,01	2
39,5	1,26	0,16	2	1,03	0,05	2	1,13	0,05	2
40,5	1,25	0,14	2	1,05	0,07	2	1,07	0,17	2
41,5	1,26	0,17	2	1,08	0,08	2	1,06	0,10	2
42,5	1,23	0,15	2	1,06	0,05	2	1,00	0,01	2
43,5	1,23	0,17	2	1,07	0,06	2	1,09	0,02	2
44,5	1,21	0,15	2	1,02	0,03	2	0,97	0,08	2
45,5	1,21	0,15	2	1,10	0,07	2	1,09	0,00	2
46,5	1,19	0,15	2	1,06	0,05	2	1,04	0,16	2
47,5	1,19	0,16	2	1,07	0,05	2	1,07	0,01	2
48,5	1,18	0,17	2	1,06	0,02	2	1,06	0,11	2
49,5	1,18	0,16	2	1,06	0,00	2	1,03	0,09	2
50,5	1,17	0,16	2	1,11	0,06	2	1,27	0,09	2
51,5	1,16	0,16	2	1,09	0,05	2	1,15	0,03	2
52,5	1,15	0,17	2	1,10	0,05	2	1,19	0,14	2
53,5	1,14	0,16	2	1,10	0,04	2	1,08	0,09	2
54,5	1,13	0,15	2	1,10	0,02	2	1,11	0,14	2
55,5	1,09	0,13	2	1,11	0,05	2	1,13	0,01	2
56,5	1,09	0,13	2	1,05	0,02	2	1,13	0,13	2
57,5	1,09	0,13	2	1,13	0,08	2	1,09	0,01	2
58,5	1,08	0,13	2	1,05	0,01	2	1,03	0,09	2
59,5	1,09	0,13	2	1,09	0,03	2	1,07	0,00	2

Данные ПЭТ-КТ, представленные в табл. 1 и 2, показывают, что меченые  $^{18}\text{F}$  соединения примера 2 и примера 4 проникают через гематоэнцефалический барьер при испытании на мышцах CD-1. Максимальный захват в головном мозге (%ID/г) наблюдали приблизительно через 2 минуты после инъекции, после чего происходит устойчивый клиренс изотопного индикатора до исходных уровней, определяемых поглощением в мышцах через 60 мин после инъекции. Поглощение кости на протяжении всего периода сканирования оставалось низким, что соответствовало отсутствию дефторирования *in vivo*. Эти данные показывают, что  $^{18}\text{F}$ -меченые соединения примера 2 и примера 4 применимы в качестве визуализирующих агентов ПЭТ-КТ для предварительно направленной визуализации ЦНС.

Анализ двух ПЭТ-сканогамм показывает, что  $[^{18}\text{F}]\text{N}-(4-(1,2,4,5\text{-тетразин-3-ил)бензил})\text{-6-фторникотинамид}$  (сравнительный пример 6) проникает через гематоэнцефалический барьер. Максимальный захват в головном мозге 2,6%ID/г наблюдали через 2,5 минуты после инъекции, после чего происходит устойчивый клиренс изотопного индикатора до 1,1%ID/г за 59,5 мин.

Для сравнения, динамическая ПЭТ-визуализация у самцов мышей CD-1 из  $[^{18}\text{F}]\text{N}-(4-(1,2,4,5\text{-тетразин-3-ил)бензил})\text{-2-фторникотинамида}$  (пример 2) и  $[^{18}\text{F}]\text{N}-(4-(1,2,4,5\text{-тетразин-3-ил)бензил})\text{-6-фторпиколинамида}$  (пример 4), раскрытых в данном изобретении, показала, что эти соединения легко проникают через гематоэнцефалический барьер и достигают максимального захвата в головном мозге  $3,3 \pm 0,4\%ID/г$  и  $4,3 \pm 0,3\%ID/г$ , соответственно. Затем указанные соединения демонстрировали устойчивый клиренс из головного мозга до уровня, близкого к фоновому (мышцы) через 60 мин после инъекции.

Указанные агенты обладают более высоким проникновением в головной мозг с последующим быстрым и полным вымыванием из головного мозга и, следовательно, обеспечивают более широкое окно для достижения повышенных отношений сигнала к фону, что позволяет получать изображения улучшенного качества. Таким образом, мы ожидаем, что  $[^{18}\text{F}]\text{N}-(4-(1,2,4,5\text{-тетразин-3-ил)бензил})\text{-2-фторникотинамид}$  (пример 2) и  $[^{18}\text{F}]\text{N}-(4-(1,2,4,5\text{-тетразин-3-ил)бензил})\text{-6-фторпиколинамид}$  (пример 4), описанные в данном документе, обеспечивают преимущество перед  $[^{18}\text{F}]\text{N}-(4-(1,2,4,5\text{-тетразин-3-ил)бензил})\text{-6-фторникотинамидом}$  (сравнительный пример 6) для предварительно направленной визуализации ЦНС.

В дополнение к потенциальным применениям в исследованиях с предварительно направленной визуализацией, во многих публикациях также было показано, что тетразины с радиоактивной меткой могут быть полезными простетическими группами для мечения биомолекул. Стивен Лианг (Steven Liang) и другие сообщили об опосредованной сортировке модификации фрагментов однодоменных антител верблюдовых и последующем радиоактивном мечении  $^{18}\text{F}$ -мечеными тетразинами (Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 528–533; WO 2017/059397 A1). Стина Сиванен (Stina Syvänen) и коллеги сообщили о радиоактивном мечении биспецифических антител путем функционализации транс-циклооктеновыми (ТЦО) группами и последующей конъюгации с  $^{18}\text{F}$ -мечеными тетразинами, осуществляемой при температуре окружающей среды (ACS Chem. Neurosci. 2020, 11, 24, 4460–4468). Майкл Залуцкий (Michael Zalutsky) и его коллеги описали радиоактивное мечение биомолекул, таких как нанотела, радиоактивно мечеными тетразинами с функциональными группами AlF-хелата или фторпиридина (Bioconjugate Chem. 2018, 29, 4090–4103; WO 2020/242948 A1).

На основании литературных прецедентов можно было бы ожидать, что тетразины, заявленные в данном документе, будут полезны в качестве простетических групп для мечения биомолекул. Реакционная способность тетразинов N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-2-фторпиколинамида и N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиколинамида с транс-циклооктеном (ТЦО), конъюгированным с биомолекулой, антисмысловым олигонуклеотидом Malat1 (АСО) (Всемирная конференция по молекулярной визуализации 2019 г., постер 139), была подтверждена в экспериментах [ $^{19}\text{F}$ ] и [ $^{18}\text{F}$ ], контролируемых с использованием ЖХ-МС и ВЭЖХ-радиодетектирования соответственно.

К раствору 2,5 мг/мл (2,67 мкМ) Malat1 АСО-ТЦО в воде добавляли два эквивалента тетразина и осторожно встряхивали при комнатной температуре в защищенном от света месте в течение 30 мин. Реакционную смесь контролировали посредством ЭР/МС на системе Waters® Acquity UPLC, оснащенной масс-спектрометром Waters® Xevo QToF. Условия ЖХ-МС были следующими: колонка: Waters® ACQUITY PREMIER UPLC олигонуклеотид ВЕН С18 (130 Å, 1,7 мкм, 2,1 мм×50 мм); длина волны 250–650 нм; градиент: начальное удержание на уровне 5% В в течение 3,5 мин, 5–75% В в течение 1,5 мин, удержание 75% В в течение 4 мин, повышение от 75 до 98% В в течение 0,5 мин, удержание 98% В в течение 1 мин и возврат до 5% В для повторного уравнивания; температура колонки: 70°C +/- 5°C; скорость потока: 0,2 мл/мин; растворитель для А: 7 мМ ТЕА и 100 мМ HFIP в воде; растворитель для В: 7 мМ ТЕА и 100 мМ HFIP в 75% метаноле/25% ацетонитриле.

Масс-спектры отрицательной моды (500–3000 m/z) суммировали из интересующего пика и обрабатывали в MaxEnt для получения результатов массы с нулевым зарядом. Результат массы до и после взаимодействия с каждым тетразином (N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-2-фторпиколинамидом и N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиколинамидом) показал разницу в 282 Да (сдвиг с 7502 Да до 7784 Да), при этом не осталось родителя, что указывает на полную реакцию Malat1 АСО-ТЦО с тетразином (фиг. 7).

Концентрацию тетразина в растворах [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-2-фторпиколинамида и [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиколинамида рассчитали и 0,4 мл каждого из них подвергали взаимодействию с 2 частями Malat1 АСО-ТЦО. Реакционные смеси осторожно встряхивали при комнатной температуре в защищенном от света месте в течение 15 мин перед 100-кратным разбавлением водой. Затем разбавленные образцы анализировали на УФ-хроматографе для ВЭЖХ Agilent серии 1290, соединенном с детектором совпадений ВГО. Условия ВЭЖХ были следующими: колонка: Waters® ACQUITY PREMIER UPLC олигонуклеотид ВЕН С18 (130 Å, 1,7 мкм, 2,1 мм×50 мм); градиент: начальное удержание на уровне 5% В в течение 3 мин, 5–75% В в течение 1,5 мин, удержание 75% В в течение 6 мин, повышение от 75 до 98% В в течение 1 мин, удержание 98% В в течение 1 мин и возврат до 5% В для повторного уравнивания; температура колонки: 70°C +/- 5°C; скорость потока: 0,25 мл/мин; растворитель для А: 7 мМ ТЕА и 100 мМ HFIP в воде; растворитель для В: 7 мМ ТЕА и 100 мМ HFIP в 75% метаноле/25% ацетонитриле.

Радиоактивные следы для каждого тетразина ([ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-2-фторпиколинамида и [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиколинамида) до и после взаимодействия с Malat1 АСО-ТЦО показал сдвиг от одного пика (RT = 9 мин), состоящего из непрореагировавшего тетразина, к двум пикам, с более ранним пиком элюирования (RT = 3,4 мин), представляющим прореагировавшие молекулы (фиг. 8).

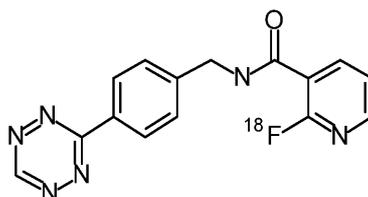
Соответственно, представленные варианты осуществления включают раскрытый в изобретении способ мечения молекулы радиоактивным изотопом. В частности, на первой стадии, биомолекулу модифицируют для присоединения или включения фрагмента ТЦО с образованием конъюгата биомолекула-ТЦО. (Один иллюстративный способ сделать это описан выше в ACS Chem. Neurosci. 2020, 11, 24, 4460–4468.) Затем на второй стадии конъюгат биомолекула-ТЦО будет вступать в реакцию с  $^{18}\text{F}$ -мечеными тетразинами с образованием биомолекула-ТЦО-тетразин- $^{18}\text{F}$  посредством реакции циклоприсоединения.

В частности, способ может включать способ радиоактивного мечения биомолекулы, включающий присоединение фрагмента ТЦО к биомолекуле с образованием, таким образом, конъюгата биомолекула-ТЦО; и

взаимодействие конъюгата биомолекула-ТЦО с  $^{18}\text{F}$ -меченым тетразином с образованием молекулы биомолекула-ТЦО-тетразин- $^{18}\text{F}$ , причем  $^{18}\text{F}$ -меченый тетразин выбран из группы, состоящей из соединения формулы II и соединения формулы IV.

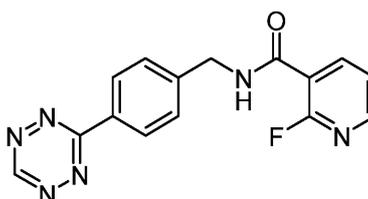
## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы



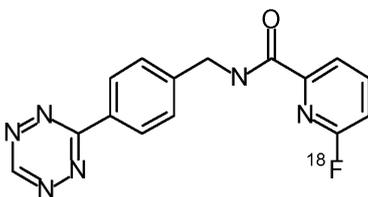
или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение формулы



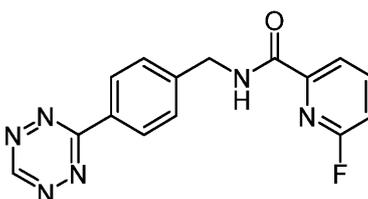
или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Соединение формулы



или его фармацевтически приемлемая соль.

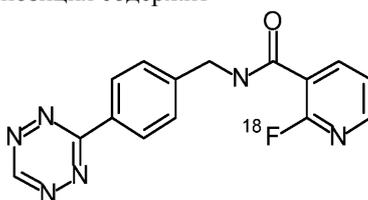
4. Соединение формулы



или его фармацевтически приемлемая соль.

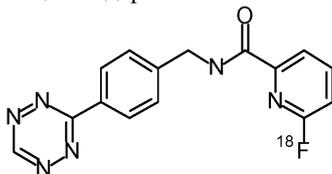
5. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение или его фармацевтически приемлемую соль по п.1 или 3, с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами.

6. Композиция по п.5, где композиция содержит



или фармацевтически приемлемую соль указанного соединения, этанол и фосфатно-солевой буфер (буфер ФСБ).

7. Композиция по п.5, где композиция содержит

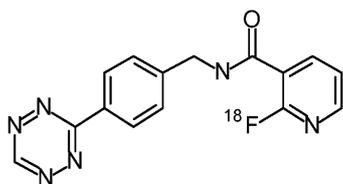


или фармацевтически приемлемую соль указанного соединения, этанол и буфер ФСБ.

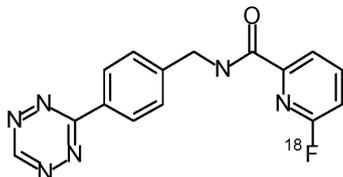
8. Композиция по любому из пп.5-7, отличающаяся тем, что не включает аскорбат или аскорбиновую кислоту.

9. Способ предварительно направленной визуализации, включающий:

а) введение млекопитающему поддающегося обнаружению количества соединения, выбранного из



и



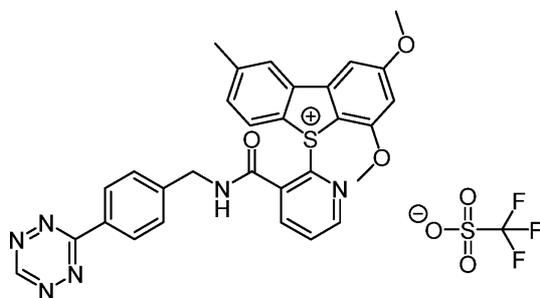
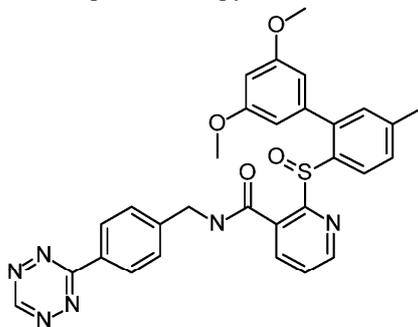
или их фармацевтически приемлемых солей, и  
 б) обнаружение указанного соединения путем ПЭТ-визуализации, причем соединение вводят после введения млекопитающему конъюгата биологической препарат-транс-циклоктен (ТЦО).

10. Способ предварительно направленной визуализации, включающий:

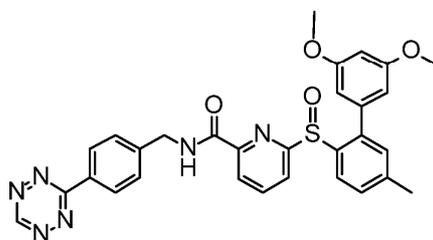
а) введение млекопитающему поддающегося обнаружению количества композиции по любому из пп.5-8;

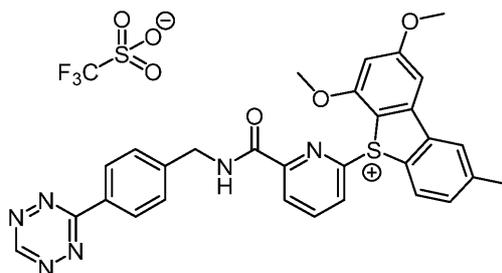
б) обнаружение композиции.

11. Промежуточное соединение, выбранное из группы, состоящей из

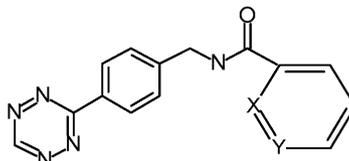


и



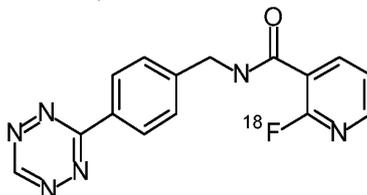


12. Соединение формулы

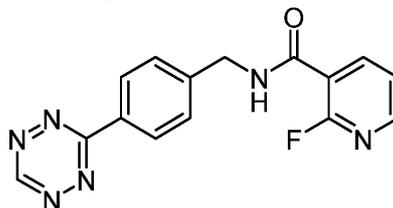


где X представляет собой C—F, C—<sup>18</sup>F или N;  
 Y представляет собой C—F, C—<sup>18</sup>F или N,  
 при условии, что только один из X и Y представляет собой N,  
 причем если X представляет собой N, то Y представляет собой C—F или C—<sup>18</sup>F; и  
 при этом если Y представляет собой N, то X представляет собой C—F или C—<sup>18</sup>F,  
 или фармацевтически приемлемые соли указанного соединения.

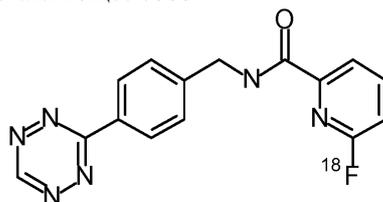
13. Соединение по п.12, представляющее собой



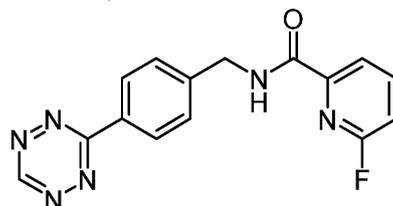
14. Соединение по п.12, представляющее собой



15. Соединение по п.12, представляющее собой



16. Соединение по п.12, представляющее собой



17. Способ предварительно направленной визуализации, включающий:

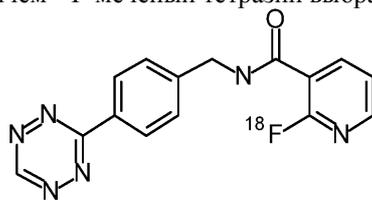
а) введение млекопитающему обнаруживаемого количества соединения по п.13 или 15, или его фармацевтически приемлемой соли, и

б) обнаружение указанного соединения путем ПЭТ-визуализации, причем соединение вводят после введения млекопитающему конъюгата биологический препарат-ТЦО.

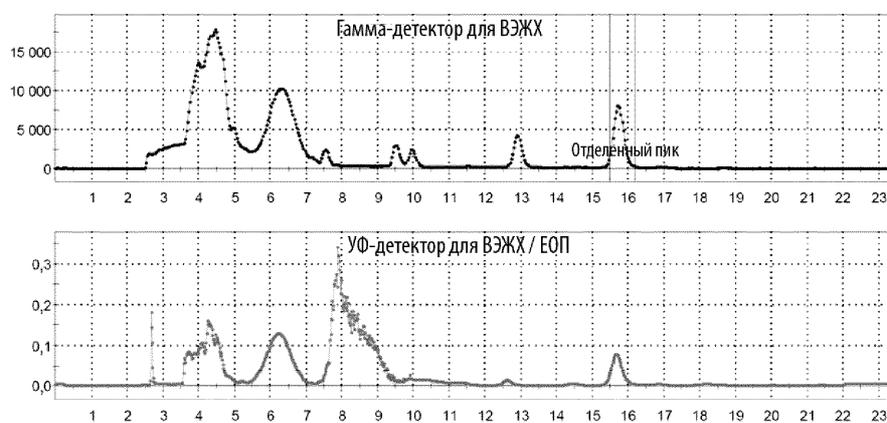
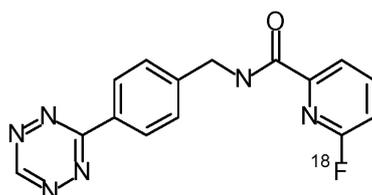
18. Способ радиоактивного мечения биомолекулы, включающий присоединение фрагмента ТЦО к биомолекуле с образованием, таким образом, конъюгата биомолекула-ТЦО и

047985

взаимодействие конъюгата биомолекула-ТЦО с  $^{18}\text{F}$ -меченым тетразином с образованием молекулы биомолекула-ТЦО-тетразин- $^{18}\text{F}$ , причем  $^{18}\text{F}$ -меченый тетразин выбран из группы, состоящей из



и



Характерные хроматограммы полупрепаративной ВЭЖХ очистки  $[^{18}\text{F}]\text{N}$ -(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-2-фторникотинамида

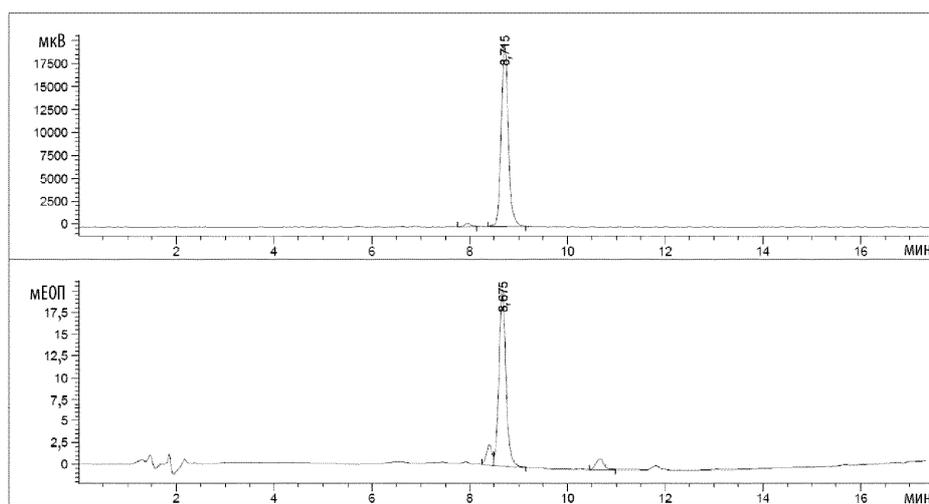
**Колонка:** полупрепаративная ZORBAX® Eclipse XDB C18 (Agilent, номер по каталогу 990967-202, 9,4 x 250 мм, 5 мкм)

**Условия:** скорость потока 4 мл/мин, 280 нм,  $t_R$  15,5 мин

**Подвижная фаза:** 70 % 20 мМ  $\text{NH}_4\text{OAc}$  в воде/30 % ацетонитрила

Фиг. 1

047985



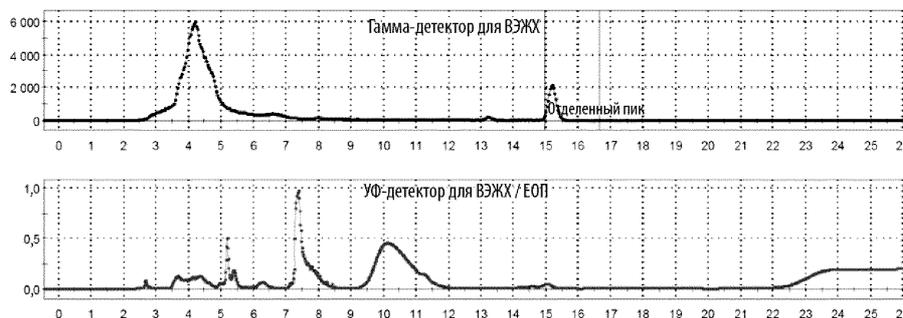
Характерные хроматограммы аналитической ВЭЖХ состава  $[^{18}\text{F}]\text{N}-(4-(1,2,4,5\text{-тетразин-3-ил)бензил)-2\text{-фторникотинамида}$

**Колонка:** ZORBAX® Eclipse XDB C18 (Agilent, номер по каталогу 993967-902, 4,6 x 150 мм, 5 мкм)

**Условия:** скорость потока 1 мл/мин, 280 нм, tR 8,7 мин

**Подвижная фаза:** градиентное элюирование от 90 % 20 мМ NH<sub>4</sub>OAc/10 % ацетонитрила до 10 % 20 мМ NH<sub>4</sub>OAc/90 % ацетонитрила за 15 мин

Фиг. 2



Характерные хроматограммы полупрепаративной ВЭЖХ очистки  $[^{18}\text{F}]\text{N}-(4-(1,2,4,5\text{-тетразин-3-ил)бензил)-6\text{-фторпиридинамида}$

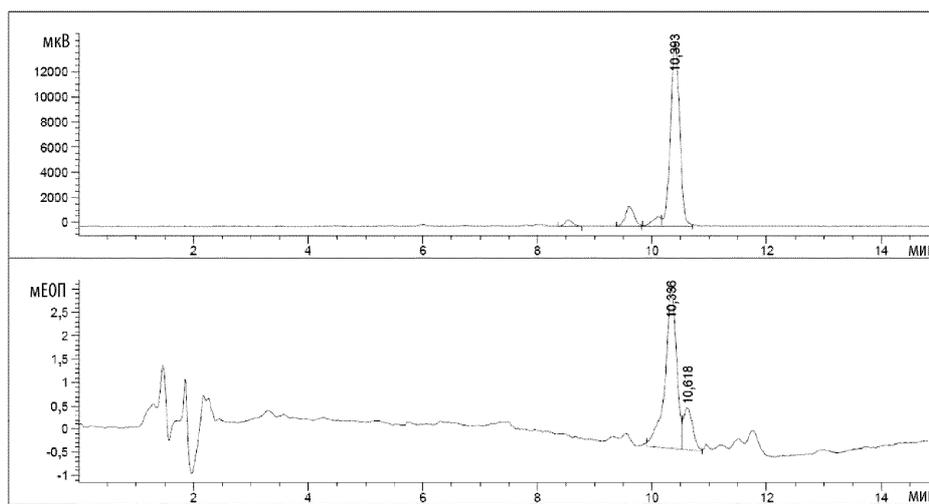
**Колонка:** полупрепаративная ZORBAX® Eclipse XDB C18 (Agilent, номер по каталогу 990967-202, 9,4 x 250 мм, 5 мкм)

**Условия:** скорость потока 4 мл/мин, 280 нм, время удерживания 15,5 мин

**Подвижная фаза:** 60 % 20 мМ NH<sub>4</sub>OAc в воде/40 % ацетонитрила

Фиг. 3

047985



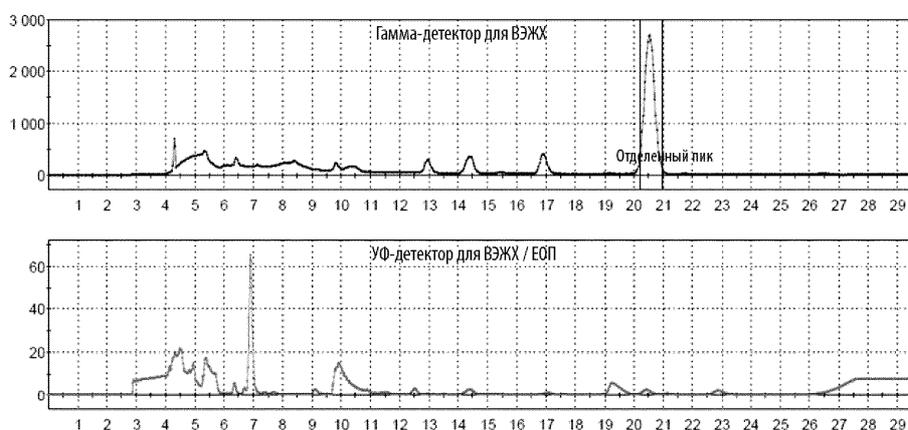
Характерные хроматограммы аналитической ВЭЖХ состава [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиколинамида

**Колонка:** ZORBAX® Eclipse XDB C18 (Agilent, номер по каталогу 993967-902, 4,6 x 150 мм, 5 мкм)

**Условия:** скорость потока 1 мл/мин, 280 нм, tR 10,3 мин

**Подвижная фаза:** градиентное элюирование от 90 % 20 мМ NH<sub>4</sub>OAc/10 % ацетонитрила до 10% 20 мМ NH<sub>4</sub>OAc/90 % ацетонитрила в течение 15 мин

Фиг. 4



Характерные хроматограммы полупрепаративной ВЭЖХ очистки [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторникотинамида

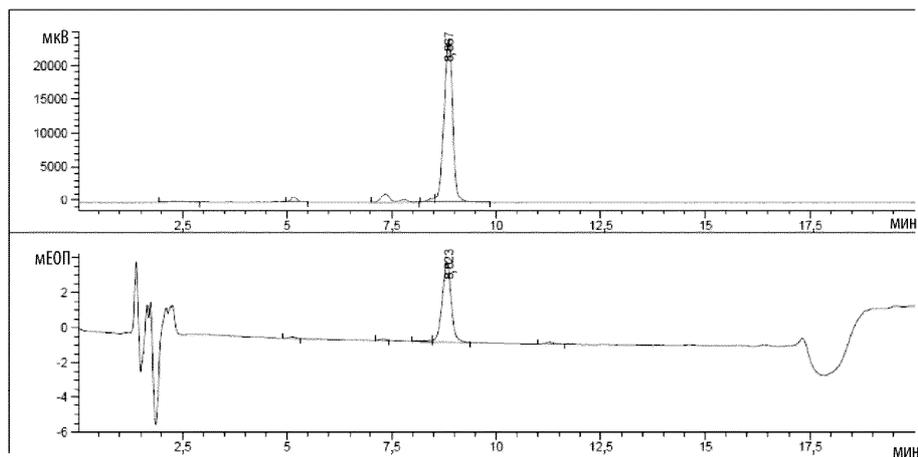
**Колонка:** полупрепаративная ZORBAX Eclipse XDB C18 (Agilent, номер по каталогу 990967-202, 9,4 x 250 мм, 5 мкм)

**Условия:** скорость потока 4 мл/мин, 280 нм, время удерживания 15,5 мин

**Подвижная фаза:** 70 % 0,1 % ТФУ (об./об.) в воде/30 % ацетонитрила

Фиг. 5

047985



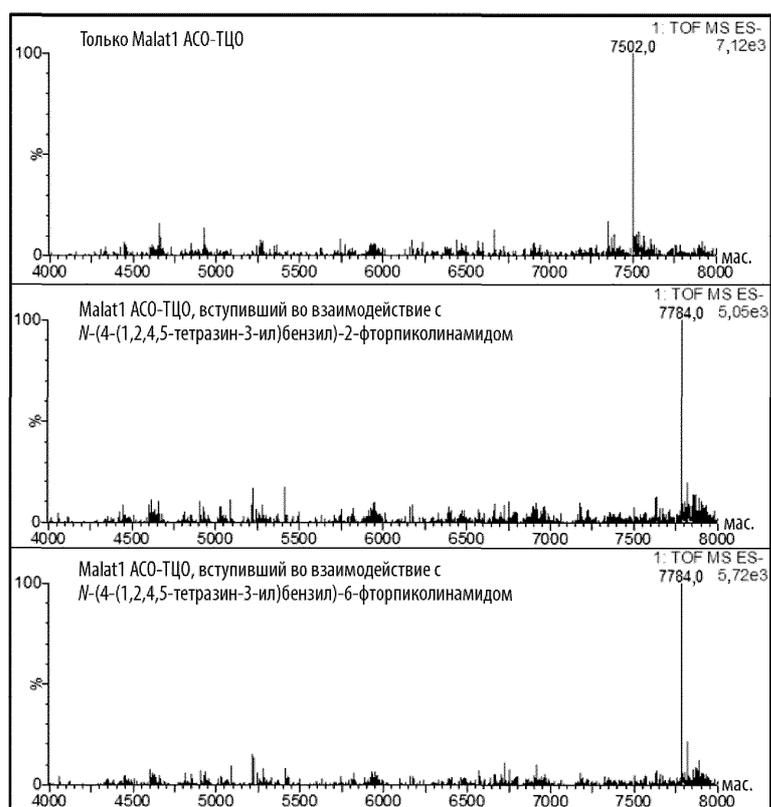
Характерные хроматограммы аналитической ВЭЖХ состава [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторникотинамида

**Колонка:** ZORBAX Eclipse XDB C18 (номер по каталогу 993967-902 4,6 x 150 мм, 5 мкм)

**Условия:** скорость потока 1 мл/мин, 280 нм, время удерживания 8,7 мин

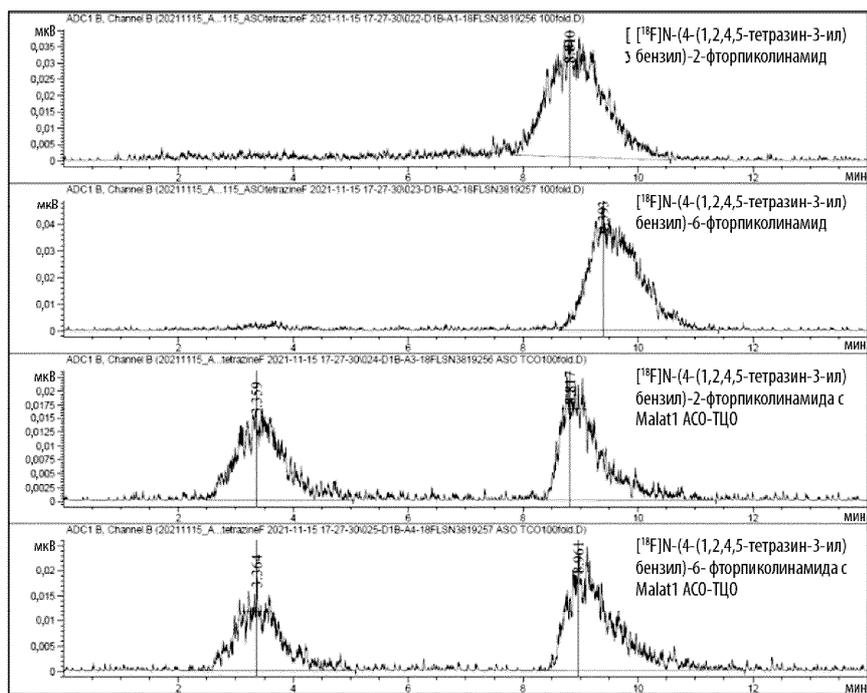
**Подвижная фаза:** градиентное элюирование от 75 % 0,1 % (об./об.) ТФУ в воде/25 % ацетонитрила до 50 % 0,1 % (об./об.) ТФУ в воде/50 % ацетонитрила за 15 мин

Фиг. 6



Характерный результат масс-спектрометрии ИЭР для реакции Malat1 АСО-ТЦО с тетразинами.

Фиг. 7



Характерные радиоактивные следы тетразинов [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-2-фторпиколинамида, [ $^{18}\text{F}$ ]N-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)-6-фторпиколинамида и взаимодействие с Malat1 ASO-ТЦО.

Фиг. 8

