

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490708 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.06.10

(22) Дата подачи заявки
2022.10.21

(51) Int. Cl. C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 31/454 (2006.01)

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ИНГИБИТОРОМ O-GLCNACASE (OGA)

(31) 63/270,820

(32) 2021.10.22

(33) US

(86) PCT/US2022/078475

(87) WO 2023/070064 2023.04.27

(71) Заявитель:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:

Биглан Кевин, Флейшер Адам С.,
Мерголт Дастиг Джеймс, Натхолл
Хью Н. (US)

(74) Представитель:

Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина
Е.М., Угрюмов В.М., Строкова О.В.,
Джермакян Р.В., Костюшенкова М.Ю.
(RU)

(57) В настоящем изобретении предложены способы замедления прогрессирующего, лечения и/или предотвращения заболевания, характеризующегося отложениями бета-амилоида, и/или заболевания, характеризующегося отложениями бета-амилоида и агрегацией аберрантного таубелка. Такие способы включают введение нуждающемуся в таком лечении пациенту эффективного количества антитела к N3pG A β и эффективного количества ингибитора O-GlcNacase (OGA).

A1

202490708

202490708

A1

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ИНГИБИТОРОМ O-GLCNACASE (OGA)

Настоящее изобретение относится к комбинации одного или более ингибиторов O-GlcNAcase (OGA) и одного или более антител к N3pGlu амилоиду β (к N3pG A β), а также к способам их применения для лечения расстройств, характеризующихся i) отложениями бета-амилоида (A β) и/или ii) комбинацией отложений бета-амилоида (A β) и тау-опосредованной нейродегенерации. Некоторые аспекты настоящего описания связаны с лечением болезни Альцгеймера (БА).

Болезнь Альцгеймера представляет собой разрушительное нейродегенеративное заболевание, которое патологически характеризуется отложениями бета-амилоида и/или агрегацией аберрантного тау-белка. БА поражает миллионы людей во всем мире, и лечение БА является одной из наиболее существенных неудовлетворенных потребностей общества. Нейропатологическим отличительным признаком БА является присутствие внутриклеточных сплетений нейрофибрилл, содержащих гиперфосфорилированный тау-белок. Другая патологическая особенность БА представляет собой присутствие отложений бета-амилоида (A β). Взаимодействие между патологией тау-белка и патологией A β все еще находится в процессе расшифровки. Возможно, что A β запускает патологию тау-белка, при которой на более поздних стадиях проявляется более сложное и синергичное взаимодействие между A β и тау-белком, приводящее к прогрессированию заболевания (Busche et al., *Nature Neuroscience* 23:1183-93 (2020)).

Ингибиторы OGA, которые являются проникающими в мозг, желательны для обеспечения лечения тау-опосредованных расстройств нейродегенерации, например болезни Альцгеймера. Антитела, нацеленные на A β (такие как антитела к N3pGlu A β), продемонстрировали многообещающую эффективность в удалении отложений амилоида в мозге субъектов, и их используют/разрабатывают в качестве терапевтического средства для лечения болезни Альцгеймера. В настоящем изобретении представлены i) определенные соединения, которые представляют собой ингибиторы OGA в комбинации с антителами к N3pGlu A β , и ii) соответствующие способы лечения заболеваний, опосредованных аберрантными тау-белками и/или отложениями амилоидов, таких как БА.

Олигомеризация белка тау, ассоциированного с микротрубочками, в нитевидные структуры, а именно спаренные спиральные нити (ССН) и прямые или скрученные нити, которая приводит к образованию нейрофибриллярных клубков (НФК) и нейропильных нитей (НН), является одной из определяющих патологических особенностей болезни Альцгеймера и других видов тауопатии. Количество НФК в мозге индивидуумов с болезнью Альцгеймера тесно связано с тяжестью заболевания. Это позволяет

предположить, что тау-белок играет ключевую роль в нейронной дисфункции и нейродегенерации (Nelson et al., *J Neuropathol Exp Neurol.*, 71(5), 362-381(2012)). Было показано, что патология тау-белка коррелирует с продолжительностью заболевания в случае ПСПВ; случаи с более агрессивным течением заболевания имеют более высокую
5 нагрузку тау-белком, чем случаи с более медленным прогрессированием. (Williams et al., *Brain*, 130, 1566-76 (2007)). Недавние исследования (Yuzwa et al., *Nat Chem Biol*, 4(8), 483-490 (2008)) подтверждают терапевтический потенциал ингибиторов O-GlcNAcase (OGA) для ограничения гиперфосфорилирования тау-белка и агрегации в патологический тау-белок для лечения болезни Альцгеймера и связанных с опосредованным тау-белком
10 нейродегенеративных расстройств. В частности, ингибитор OGA Thiamet-G был связан с замедлением потери моторных нейронов в мышинной модели JNPL3 тау (Yuzwa et al., *Nat Chem Biol*, 8, 393-399 (2012)) и с уменьшением патологии тау-белка и дистрофии нейритов в мышинной модели Tg4510 тау (Graham et al., *Neuropharmacology*, 79, 307-313 (2014)). Соответственно, ингибиторы OGA признаны действенным терапевтическим подходом для
15 уменьшения накопления гиперфосфорилированных патологических форм тау, а именно НФК и НН. В патенте США № 9,120,781 представлены производные гексагидробензооксазола и гексагидробензотиазола, которые обладают ингибирующей активностью по отношению к OGA и дополнительно раскрыты как подходящие для лечения заболеваний и расстройств, связанных с дефицитом или сверхэкспрессией OGA и/или
20 накоплением или дефицитом 2-ацетамидо-2-деокси-5 β -D-глюкопиранозиды (*O-GlcNAc*). Дополнительно патент США 2016/0031871 раскрывает определенные ингибиторы гликозидазы для лечения болезни Альцгеймера.

Накопление пептида β -амилоида в форме амилоидных отложений в головном мозге является ранним и существенным событием при болезни Альцгеймера, что приводит к
25 нейродегенерации и впоследствии к появлению клинических симптомов, таких как когнитивные и функциональные нарушения (Selkoe, *JAMA* 283:1615-7 (2000); Hardy et al., *Science* 297:353-6 (2002); Masters et al., *Nat. Rev. Dis. Primers* 1:15056 (2015); и Selkoe et al., *EMBO Mol. Med.* 8:595-608 (2016)). Бета-амилоид образуется при протеолитическом расщеплении более крупного гликопротеина, называемого белком-предшественником
30 амилоида (APP). APP представляет собой встроенный в мембрану белок, экспрессируемый во многих тканях, но особенно в синапсах нейронов. APP расщепляется γ -секретазой с высвобождением пептида A β , охватывающего группу пептидов размером в диапазоне от 37 до 49 аминокислотных остатков. Мономеры A β агрегируют в различные типы структур более высокого порядка, включая олигомеры, протофибриллы и амилоидные фибриллы.
35 Амилоидные олигомеры являются растворимыми и могут распространяться по головному

мозгу, в то время как амилоидные фибриллы являются более крупными и нерастворимыми и могут дополнительно агрегировать с образованием амилоидных отложений или бляшек. Амилоидные отложения, обнаруживаемые у пациентов-людей, включают в себя гетерогенную смесь пептидов Аβ, некоторые из которых включают в себя усеченный N-конец и дополнительно могут включать в себя N-концевые модификации, такие как N-концевой пироглутаматный остаток (pGlu). Амилоидные отложения, обнаруженные у пациентов, включают неоднородную смесь Аβ-пептидов. N3pGlu Аβ (также называемый N3pG Аβ, N3pE Аβ, Аβ pE3-42 или Аβp3-42) представляет собой усеченную форму пептида Аβ и обнаруживается только в амилоидных отложениях. В N3pGlu Аβ отсутствуют первые два аминокислотных остатка на N-конце человеческого Аβ, а в третьем положении аминокислотной последовательности Аβ имеется пироглутамат, который является производным от глутаминовой кислоты. Хотя пептид N3pGlu Аβ представляет собой второстепенный компонент осажденного Аβ в головном мозге, исследования показали, что пептид N3pGlu Аβ обладает свойствами агрессивной агрегации и накапливается в начале каскада отложения.

Антитела к N3pGlu Аβ известны в данной области. Например, в патенте США № 8,679,498; патенте США № 8,961,972; патенте США № 10,647,759; и патенте США № 11,078,261 (которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки) описаны антитела к N3pGlu Аβ, способ получения антител, содержащие антитела составы и способы лечения заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, с помощью таких антител.

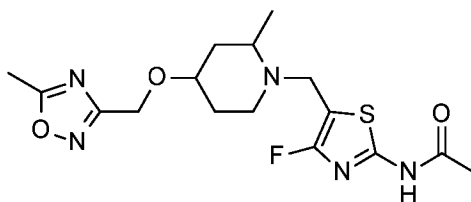
Как было показано, пассивная иммунизация путем длительного введения антител к Аβ, включая N3pGlu Аβ, обнаруживается в отложениях, разрушает агрегаты Аβ и способствует клиренсу отложений в головном мозге на различных животных моделях. Донанемаб (описан в патенте США № 8,679,498) представляет собой антитело, направленное на пироглутаматную модификацию третьей аминокислоты эпитопа бета-амилоида (N3pGlu Аβ), который присутствует только в отложениях амилоида в головном мозге.

Стратегия лечения и предотвращения для донанемаба включает нацеливание на N3pGlu Аβ, специфичную в отношении отложений амилоида, у больных БА, имеющих раннее появление симптомов и существующую нагрузку головного мозга амилоидом. Такое объяснение основано на амилоидной гипотезе БА, гласящей, что продукция и отложение Аβ является ранним и необходимым событием в патогенезе БА. См., например, Selkoe, *JAMA* 283:1615-1617 (2000), полностью включена в настоящий документ путем ссылки. Донанемаб недавно продемонстрировал эффективность в удалении отложений

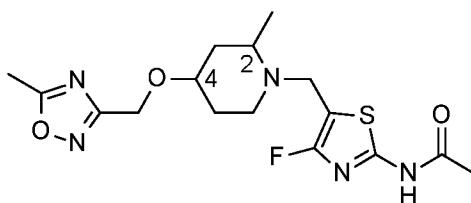
амилоида и замедлении прогрессирования БА. См., например, Mintun et al., *New England Journal of Medicine* 384.18: 1691-1704 (2021), которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Комбинация антитела, которое специфически связывается с N3pG A β и которое
 5 снижает уровень бета-амилоида в мозге человека, с ингибитором OGA является желательной для лечения таких заболеваний, как БА. Такая комбинация обеспечивает снижение патогенных видов тау-белка и агрегатов тау-белка, а также снижение бета-амилоида (A β). Такая комбинация также предпочтительно может быть более эффективной, чем любая молекула по отдельности. Например, такое лечение такой комбинацией может
 10 обеспечить применение более низких доз одной или обеих молекул по сравнению с каждой молекулой по отдельности, что потенциально может привести к меньшим побочным эффектам (или более короткой продолжительности одной или другой терапии) при сохранении эффективности. Полагают, что предложенная в настоящем документе комбинация будет не только снижать количество бета-амилоида, но также уменьшать
 15 содержание aberrантного тау-белка, агрегацию тау-белков в патологический тау-белок и его распространение, для лечения заболеваний, таких как БА.

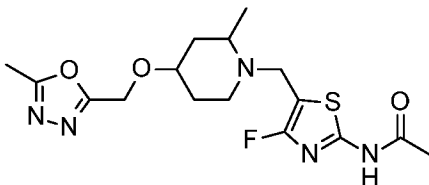
В одном аспекте настоящее описание относится к способу лечения пациента, имеющего заболевание, характеризующееся отложениями бета-амилоида (A β). В
 20 некоторых вариантах осуществления настоящее описание относится к способу лечения пациента, имеющего заболевание, характеризующееся отложениями бета-амилоида и агрегацией aberrантного тау-белка. Этот способ включает введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела к N3pG A β в сочетании с эффективным количеством ингибитора OGA, причем ингибитор OGA представляет собой соединение формулы:



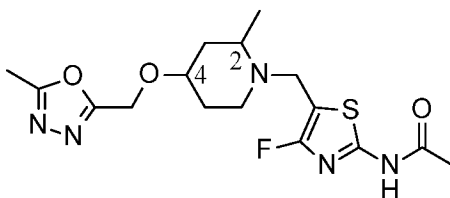
25 или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления метил в положении 2 ингибитора OGA находится в *cis*-конфигурации относительно кислорода в положении 4 пиперидинового кольца.



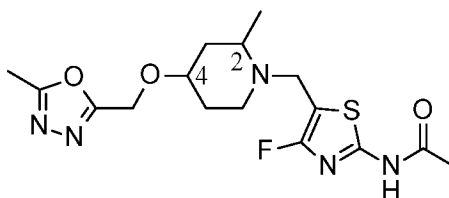
В некоторых вариантах осуществления ингибитор OGA представляет собой N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамид. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор OGA является кристаллическим. В некоторых вариантах осуществления N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамид характеризуется пиком на спектре рентгеновской порошковой дифрактометрии при угле дифракции 2-тета $12,1^\circ$ в комбинации с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из $15,3^\circ$, $21,6^\circ$, $22,2^\circ$, $22,7^\circ$, $23,5^\circ$, $24,3^\circ$ и $26,8^\circ$, с допуском на углы дифракции $0,2$ градуса. Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения пациента, имеющего заболевание, характеризующееся отложениями бета-амилоида (A β), включающему введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела к N3pG A β в комбинации с эффективным количеством ингибитора OGA, причем ингибитор OGA представляет собой соединение формулы:



или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления настоящее описание относится к способу лечения пациента, имеющего заболевание, характеризующееся отложениями бета-амилоида и агрегацией aberrантного тау-белка. В некоторых вариантах осуществления метил в положении 2 ингибитора OGA находится в *цис*-конфигурации относительно кислорода в положении 4 пиперидинового кольца:

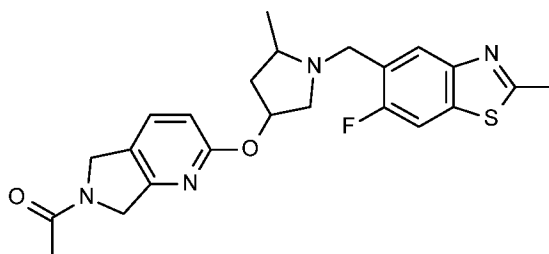


В некоторых вариантах осуществления метил в положении 2 ингибитора OGA находится в *транс*-конфигурации по отношению к кислороду в положении 4 пиперидинового кольца:

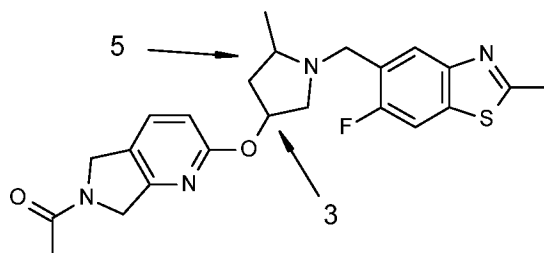


В некоторых вариантах осуществления ингибитор OGA представляет собой N-[4-фтор-5-
 5 [[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-
 2-ил]ацетамид. В некоторых вариантах осуществления ингибитор OGA представляет собой
 N-[4-фтор-5-[[
 пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамид. В некоторых вариантах осуществления
 изобретения ингибитор OGA является кристаллическим. В некоторых вариантах
 осуществления ингибитор OGA характеризуется пиком на спектре рентгеновской
 10 порошковой дифрактометрии при угле дифракции 2-тета $13,5^\circ$ в комбинации с одним или
 более пиками, выбранными из группы, состоящей из $5,8^\circ$, $13,0^\circ$, $14,3^\circ$, $17,5^\circ$, $20,4^\circ$, $21,4^\circ$ и
 $22,2^\circ$, с допуском на углы дифракции $0,2$ градуса.

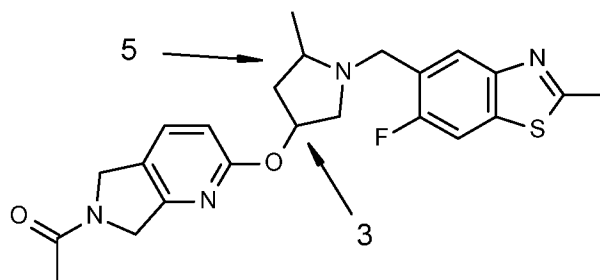
Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения пациента,
 имеющего заболевание, характеризующееся отложениями бета-амилоида (A β),
 включающему введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества
 15 антитела к N3pG A β в комбинации с эффективным количеством ингибитора OGA, причем
 ингибитор OGA представляет собой соединение формулы:



или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления
 настоящее описание относится к способу лечения пациента, имеющего заболевание,
 20 характеризующееся отложениями бета-амилоида и агрегацией aberrantного тау-белка. В
 некоторых вариантах осуществления метил в положении 5 ингибитора OGA находится в
цис-конфигурации относительно кислорода в положении 3 пиперидинового кольца:

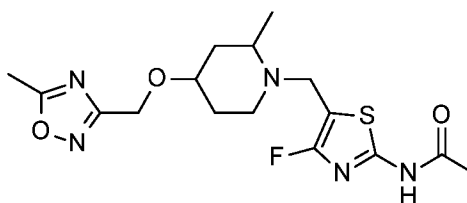


В некоторых вариантах осуществления метил в положении 5 ингибитора OGA находится в *транс*-конфигурации по отношению к кислороду в положении 3 пиперидинового кольца:

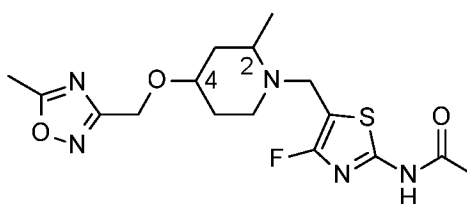


В некоторых вариантах осуществления ингибитор OGA представляет собой 1-(2-(((3R,5S)-5-((6-фтор-2-метилбензо[d]тиазол-5-ил)метил)-5-метилпирролодин-3-ил)окси)-5,7-дигидро-6H-пирроло[3,4-b]пиридин-6-ил)этан-1-он. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор OGA является кристаллическим.

Еще один аспект настоящего описания относится к способу лечения пациента, имеющего заболевание, характеризующееся отложениями бета-амилоида и/или агрегацией аберрантного тау-белка, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела к N3pG Aβ в комбинации с эффективным количеством ингибитора OGA, причем ингибитор OGA представляет собой соединение формулы:



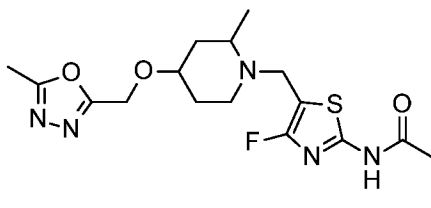
или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления метил в положении 2 ингибитора OGA находится в *цис*-конфигурации относительно кислорода в положении 4 пиперидинового кольца:



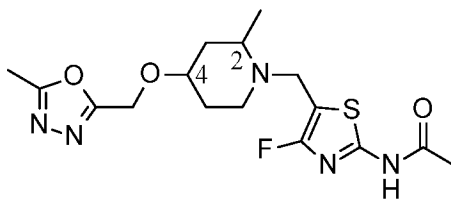
В некоторых вариантах осуществления ингибитор OGA представляет собой N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамид. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор OGA является кристаллическим. В некоторых вариантах осуществления N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамид характеризуется пиком на спектре рентгеновской порошковой дифрактометрии при угле дифракции 2-тета 12,1° в комбинации с одним или более пиками,

выбранными из группы, состоящей из 15,3°, 21,6°, 22,2°, 22,7°, 23,5°, 24,3° и 26,8°, с допуском на углы дифракции 0,2 градуса.

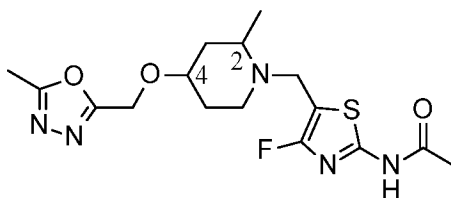
Еще один аспект настоящего описания относится к способу лечения пациента, имеющего заболевание, характеризующееся отложениями бета-амилоида и/или агрегацией аберрантного тау-белка, включающему введение нуждающемуся в таком лечении пациенту эффективного количества антитела к N3pG Aβ в комбинации с эффективным количеством ингибитора OGA, причем ингибитор OGA представляет собой соединение формулы:



или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления метил в положении 2 ингибитора OGA находится в *цис*-конфигурации по отношению к кислороду в положении 4 пиперидинового кольца:

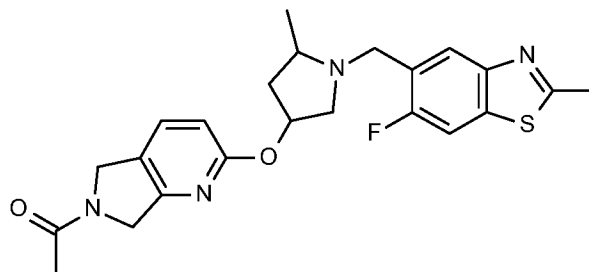


В некоторых вариантах осуществления метил в положении 2 ингибитора OGA находится в *транс*-конфигурации по отношению к кислороду в положении 4 пиперидинового кольца:

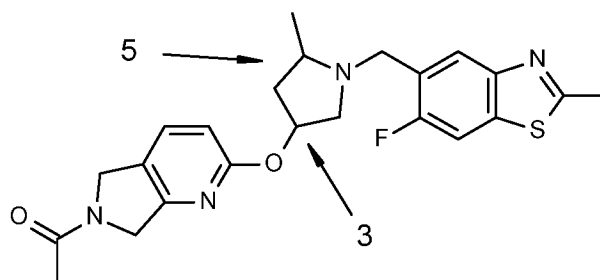


В некоторых вариантах осуществления ингибитор OGA представляет собой N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамид. В некоторых вариантах осуществления ингибитор OGA представляет собой N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамид. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор OGA является кристаллическим. В некоторых вариантах осуществления ингибитор OGA характеризуется пиком на спектре рентгеновской порошковой дифрактометрии при угле дифракции 2-тета 13,5° в комбинации с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из 5,8°, 13,0°, 14,3°, 17,5°, 20,4°, 21,4° и 22,2°, с допуском на углы дифракции 0,2 градуса.

Еще один аспект настоящего описания относится к способу лечения пациента, имеющего заболевание, характеризующееся отложениями бета-амилоида и/или агрегацией aberrантного тау-белка, включающему введение нуждающемуся в таком лечении пациенту эффективного количества антитела к N3pG A β в комбинации с эффективным количеством ингибитора OGA, причем ингибитор OGA представляет собой соединение формулы:

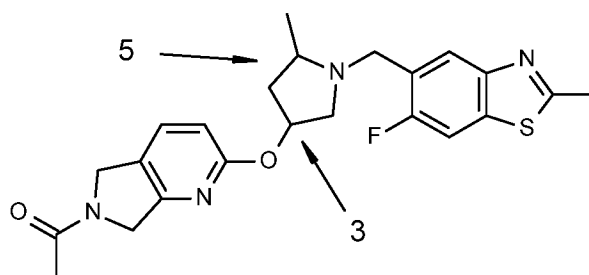


или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления метил в положении 5 ингибитора OGA находится в *цис*-конфигурации по отношению к кислороду в положении 3 пиперидинового кольца:



10

В некоторых вариантах осуществления метил в положении 5 ингибитора OGA находится в *транс*-конфигурации по отношению к кислороду в положении 3 пиперидинового кольца:



15

В некоторых вариантах осуществления ингибитор OGA представляет собой 1-(2-(((3R,5S)-1-((6-фтор-2-метилбензо[d]тиазол-5-ил)метил)-5-метилпирролидин-3-ил)окси)-5,7-дигидро-6H-пирроло[3,4-b]пиридин-6-ил)этан-1-он. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор OGA является кристаллическим.

20

В настоящем изобретении также предложен способ лечения когнитивного или нейродегенеративного заболевания, включающий введение нуждающемуся в этом лечении пациенту эффективного количества антитела к N3pGlu A β в комбинации с эффективным количеством ингибитора OGA. В настоящее изобретение дополнительно предложен способ

лечения клинической или доклинической БА, включающий введение нуждающемуся в этом лечении пациенту эффективного количества антитела к N3pGlu A β в комбинации с эффективным количеством ингибитора OGA. В настоящем изобретении также предложен способ лечения продромальной БА (иногда также называется мягким когнитивным нарушением или MCI), легкой деменции при БА, умеренной деменции при БА и/или тяжелой деменции при БА, включающий введение нуждающемуся в этом лечении пациенту эффективного количества антитела к N3pGlu A β в комбинации с эффективным количеством ингибитора OGA.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения, предотвращения или замедления ухудшения функционального состояния / снижения когнитивных функций у пациента с диагнозом доклинической болезни Альцгеймера (БА) (также называется предсимптомной БА), клинической формы БА, продромальной формы БА, легкой деменции при БА, умеренной деменции при БА, тяжелой деменции при БА, синдрома Дауна, клинической церебральной амилоидной ангиопатии или доклинической церебральной амилоидной ангиопатии. Такие способы включают введение нуждающемуся в таком лечении пациенту эффективного количества антитела к N3pG A β в комбинации с эффективным количеством ингибитора OGA, как описано в настоящем документе. В настоящем изобретении дополнительно предложен способ предотвращения потери памяти, снижения когнитивных функций или ухудшения функционального состояния у клинически бессимптомных субъектов с низкими или очень низкими уровнями A β 1-42 в спинномозговой жидкости (СМЖ) и/или низким или очень низким уровнем отложений A β в мозге, включающий введение эффективного количества антитела к N3pG A β в сочетании с эффективным количеством ингибитора OGA, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления клинически бессимптомные субъекты имеют подтвержденную генетическую мутацию, вызывающую болезнь Альцгеймера. В настоящем описании «клинически бессимптомные субъекты, имеющие подтвержденную генетическую мутацию, вызывающую болезнь Альцгеймера» включают пациентов, имеющих подтвержденную генетическую мутацию PSEN1 E280A, вызывающую болезнь Альцгеймера (мутацию Paisa), генетическую мутацию, которая вызывает аутосомно-доминантную болезнь Альцгеймера, или которые подвергаются более высокому риску развития БА из-за наличия одной или двух аллелей APOE e4. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения, предотвращения или замедления ухудшения функционального состояния / снижения когнитивных функций у пациента, имеющего подтвержденную генетическую мутацию PSEN1 E280A, вызывающую болезнь Альцгеймера (мутация Paisa), генетическую мутацию,

которая вызывает аутосомно-доминантную болезнь Альцгеймера, или носителя одной или двух аллелей APOE e4, включающий введение нуждающемуся в таком лечении пациенту эффективного количества антитела к N3pG Aβ в комбинации с эффективным количеством ингибитора OGA, как описано в настоящем документе.

5 В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении также предложен способ лечения, предотвращения или замедления ухудшения функционального состояния / снижения когнитивных функций у пациента с клинической формой БА, продромальной формой БА, легкой деменцией при БА, умеренной деменцией при БА и тяжелой деменцией при БА, включающий введение нуждающемуся в таком лечении пациенту эффективного
10 количества антитела к N3pG Aβ в комбинации с эффективным количеством ингибитора OGA, как описано в настоящем документе. В настоящем изобретении дополнительно предложен способ предотвращения потери памяти или ухудшения функционального состояния / снижения когнитивных функций у клинически бессимптомных пациентов с
15 низкими уровнями НФК в головном мозге и/или низкими уровнями отложений амилоида в головном мозге, включающий введение эффективного количества антитела к N3pG Aβ в комбинации с эффективным количеством ингибитора OGA, как описано в настоящем документе.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ профилактики прогрессирования легкого когнитивного нарушения при БА, включающий
20 введение нуждающемуся в таком лечении пациенту эффективного количества антитела к N3pG Aβ в комбинации с эффективным количеством ингибитора OGA.

В настоящих вариантах осуществления также предложено антитело к N3pG Aβ для применения в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с ингибитором OGA для применения в терапии.

25 В изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело к N3pG Aβ, с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами в комбинации с фармацевтической композицией ингибитора OGA с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами.

30 Кроме того, в изобретении предложен набор, содержащий антитело к N3pG Aβ и ингибитор OGA. В изобретении дополнительно предложен набор, содержащий фармацевтическую композицию, содержащую антитело к N3pG Aβ (с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами), и фармацевтическую композицию, содержащую ингибитор OGA (с одним или более
35 фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами). В

настоящем документе термин «набор» включает отдельные контейнеры каждого компонента, причем один компонент представляет собой антитело к N3pG Aβ, а другой компонент представляет собой ингибитор OGA, в одной упаковке. «Набор» также может включать в себя отдельные контейнеры каждого компонента, причем один компонент представляет собой антитело к N3pG Aβ, а другой компонент представляет собой ингибитор OGA, в отдельных упаковках с инструкциями по введению каждого компонента в виде комбинации.

В изобретении дополнительно предложено применение антитела к N3pG Aβ для производства лекарственного средства для лечения БА, легкой степени БА, продромальной формы БА или для профилактики прогрессирования легкого когнитивного нарушения при БА, причем лекарственное средство необходимо вводить одновременно, отдельно или последовательно с ингибитором OGA.

В некоторых вариантах осуществления настоящего описания антитело к N3pG Aβ содержит тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), причем HC содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), а LC содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR), при этом упомянутая HCVR содержит определяющие комплементарность области (CDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, а упомянутая LCVR содержит CDR LCDR1, LCDR2 и LCDR3. В некоторых вариантах осуществления антитела к N3pG Aβ настоящего изобретения имеют аминокислотную последовательность LCDR1, представленную SEQ ID NO.5, аминокислотную последовательность LCDR2, представленную SEQ ID NO.6, аминокислотную последовательность LCDR3, представленную SEQ ID NO.7, аминокислотную последовательность HCDR1, представленную SEQ ID NO.8, аминокислотную последовательность HCDR2, представленную SEQ ID NO.9, и аминокислотную последовательность HCDR3, представленную SEQ ID NO.10.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело к N3pG Aβ, содержащее LCVR и HCVR, где аминокислотная последовательность LCVR представлена SEQ ID NO.1, а аминокислотная последовательность HCVR представлена SEQ ID NO.2. В дополнительном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело к N3pG Aβ, содержащее легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC), где аминокислотная последовательность LC представлена SEQ ID NO.3, а аминокислотная последовательность HC представлена SEQ ID NO.4.

В некоторых вариантах осуществления антитела к N3pG Aβ настоящего изобретения имеют аминокислотную последовательность LCDR1, представленную SEQ ID NO.15, аминокислотную последовательность LCDR2, представленную SEQ ID NO.16, аминокислотную последовательность LCDR3, представленную SEQ ID NO.17,

аминокислотную последовательность HCDR1, представленную SEQ ID NO.18, аминокислотную последовательность HCDR2, представленную SEQ ID NO.19, и аминокислотную последовательность HCDR3, представленную SEQ ID NO.20. В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело к N3pG A β ,
5 содержащее LCVR и HCVR, где аминокислотная последовательность LCVR представлена SEQ ID NO.11, а аминокислотная последовательность HCVR представлена SEQ ID NO.12. В дополнительном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено антитело к N3pG A β , содержащее легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC), где аминокислотная последовательность LC представлена SEQ ID NO.13, а аминокислотная
10 последовательность HC представлена SEQ ID NO.14.

Антитела к N3pG A β настоящего изобретения могут быть получены и очищены с использованием известных способов. Например, последовательности кДНК, кодирующие HC антитела к N3pG A β , и последовательности кДНК, кодирующие LC антитела к N3pG A β , можно клонировать и встроить в вектор экспрессии GS (глутаминсинтетазы). Затем
15 сконструированный вектор экспрессии иммуноглобулина может быть стабильно трансфицирован в клетки CHO. Специалист в данной области поймет, что экспрессия антител в млекопитающих приведет к гликозилированию, обычно по высоко консервативных сайтах N-гликозилирования в области Fc. Стабильные клоны могут быть проверены на экспрессию антитела, специфично связывающегося с отложениями амилоида
20 или N3pG A β . Положительные клоны могут быть размножены в бессывороточной культуральной среде для продукции антител в биореакторах. Среда, в которую было секретировано антитело, может быть очищена обычными способами. Например, среда может быть удобным образом нанесена на FF колонку с белком A или G с сефарозой, которая была уравновешена совместимым буфером, таким как забуференный фосфатом
25 физиологический раствор. Колонку можно промыть для удаления неспецифических связывающих компонентов. Связанное антитело может быть элюировано, например, градиентом pH, и фракции антитела могут быть обнаружены, например, с помощью таких техник, как ДСН-ПААГ электрофорез, и затем объединены. Антитело может быть сконцентрировано и/или стерильно профильтровано с использованием общепринятых
30 методик. Растворимые агрегаты и мультимеры могут быть эффективно удалены с помощью общепринятых методик, включая эксклюзионную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, ионообменную или гидроксиапатитную хроматографию. Продукт можно незамедлительно замораживать, например, при -70° C или можно лиофилизировать.

Антитела к N3pG A β настоящего изобретения связывают N3pG A β человека (также называется N3pGlu A β). В одном варианте осуществления антитела к N3pG A β настоящего изобретения связывают конформационный эпитоп N3pG A β человека.

Используемый в данном документе термин «антитело» обозначает молекулу иммуноглобулина, содержащую две тяжелые цепи (HC) и две легкие цепи (LC), связанные дисульфидными связями. Аминоконцевая часть каждой LC и HC включает переменную область, ответственную за распознавание антигена через определяющие комплементарность области (CDR), содержащиеся в них. CDR перемежаются с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными участками. Назначение аминокислот доменам CDR в областях LCVR и HCVR антител настоящего изобретения основано на следующем: нумерации по Кабату (Kabat, et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-93 (1971); Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)) и конвенции по нумерации по Норсу (North et al., *A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations*, *Journal of Molecular Biology*, 406:228-256 (2011)). В соответствии с указанными выше способами определяли CDR антител настоящего изобретения.

Антитела к N3pGlu A β настоящего изобретения включают каппа LC и HC IgG. В конкретном варианте осуществления антитела к N3pGlu A β настоящего изобретения представляют собой человеческий изотип IgG1.

Антитела настоящего изобретения представляют собой моноклональные антитела («мАт»). Моноклональные антитела могут быть получены, например, посредством гибридомных технологий, рекомбинантных технологий, технологий фагового дисплея, синтетических технологий, например, CDR-трансплантации, или комбинаций указанных или других технологий, известных в данной области техники. Моноклональные антитела настоящего изобретения представляют собой человеческие или гуманизированные антитела. Гуманизированные антитела могут быть сконструированы так, чтобы содержать одну или более каркасных областей человека (или по существу человеческих каркасных областей), окружающих CDR, полученные из антитела, не являющегося человеческим. Каркасные последовательности зародышевой линии человека можно получить в ImMunoGeneTics (IMGT®) через их веб-сайт imgt.cines.fr, или из *The Immunoglobulin FactsBook*, Marie-Paule Lefranc and Gerard Lefranc, Academic 25 Press, 2001, ISBN 012441351. В другом варианте осуществления настоящего изобретения антитело или кодирующая его нуклеиновая кислота предоставлены в изолированной форме. Используемый в данном документе термин «выделенный» относится к белку, пептиду или нуклеиновой кислоте, которые не обнаружены в природе и не содержат или практически не содержат другие

макромолекулярные вещества, обнаруженные в клеточной среде. Термин «по существу не содержат», как используется в данном документе, означает, что представляющие интерес белок, пептид или нуклеиновая кислота содержат более 80% (в мольном отношении) макромолекулярных компонентов, предпочтительно более 90% и более предпочтительно более 95%.

Антитело к N3pGlu A β настоящего изобретения или его комбинацию с ингибитором OGA вводят в виде фармацевтической композиции. Фармацевтическую композицию настоящего изобретения можно вводить пациенту с риском или проявлением заболеваний или расстройств, как описано в данном документе, парентеральными путями (например, подкожным, внутривенным, внутривенным, внутримышечным). Подкожные и внутривенные пути являются предпочтительными. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции настоящего изобретения предпочтительно вводят посредством внутривенной инъекции.

Термины «лечение», «проведение лечение» или «лечить» и т. п. включают в себя сдерживание, замедление или остановку прогрессирования или тяжести существующего симптома, состояния, заболевания или расстройства у пациента. Термин «пациент» или «субъект» обозначает человека.

Термин «предотвращение» означает профилактическое введение антитела настоящего изобретения бессимптомному пациенту или пациенту с доклинической болезнью Альцгеймера для предотвращения возникновения или прогрессирования заболевания.

Термины «заболевание, характеризующееся отложением A β » или «заболевание, характеризующееся отложениями A β » используются взаимозаменяемо и относятся к заболеванию, которое патологически характеризуется отложениями A β в головном мозге или в сосудистой системе головного мозга субъекта. Это включает в себя такие заболевания, как болезнь Альцгеймера (БА), синдром Дауна (СД) и церебральная амилоидная ангиопатия (ЦАА). Клинический диагноз, стадия или прогрессирование болезни Альцгеймера может быть легко определен лечащим диагностом или медицинским работником, таким как специалист в данной области, с использованием известных методов и путем наблюдения результатов. Это, как правило, включает в себя некоторую форму визуализации бляшек головного мозга, оценку психического или когнитивного расстройства (например, рейтинг клинической деменции — сводные данные боксов (CDR-SB), мини-экзамен по психическому состоянию (MMSE) или когнитивная шкала оценки болезни Альцгеймера (ADAS-Cog)) или функциональную оценку (например, кооперативное исследование болезни Альцгеймера — активность повседневной жизни

(ADCS-ADL). Когнитивную и функциональную оценку можно использовать для определения изменений когнитивной функции пациента (например, снижения когнитивных функций) и функционального снижения (например, ухудшения функционального состояния). «Клиническая стадия болезни Альцгеймера», как используется в данном описании, представляет собой диагностированную стадию болезни Альцгеймера. Это включает в себя состояния, диагностированные как продромальная болезнь Альцгеймера, легкая деменция при болезни Альцгеймера, умеренная деменция при болезни Альцгеймера и тяжелая деменция при болезни Альцгеймера. Термин «доклиническая стадия болезни Альцгеймера» представляет собой стадию, которая предшествует клинической стадии болезни Альцгеймера, где измеримые изменения в биомаркерах (таких как уровни Аβ42 в СМЖ или отложения бляшек в головном мозге по данным ПЭТ-сканирования на амилоид) указывают на самые ранние признаки у пациента с патологией Альцгеймера, прогрессирующие до клинической стадии болезни Альцгеймера. Обычно это происходит до того, как становятся заметны такие симптомы, как потеря памяти и спутанность сознания. Доклиническая болезнь Альцгеймера также включает досимптоматическое аутосомно-доминантное носительство, а также пациентов с более высоким риском развития БА из-за носительства одного или двух аллелей АPOE ε4. Термин «клиническая БА» представляет собой стадию заболевания, на которой обнаруживаются когнитивные признаки и симптомы.

В некоторых вариантах осуществления субъект является позитивным в отношении амилоидных отложений, когда амилоид обнаруживается в головном мозге способами, такими как визуализация амилоида с использованием радиоактивно меченных соединений для ПЭТ, или с использованием диагностического средства для обнаружения Аβ или биомаркера Аβ. Примеры способов, которые можно использовать в настоящем описании для измерения нагрузки/содержания амилоида в головном мозге, включают, например, флорбетапир (Carpenter, et al., «The Use of the Exploratory IND in the Evaluation and Development of ¹⁸F-PET Radiopharmaceuticals for Amyloid Imaging in the Brain: A Review of One Company's Experience,» *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 53.4:387 (2009), которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки); флорбетабен (публикация Syed et al., «¹⁸F]Florbetaben: A Review in β-Amyloid PET Imaging in Cognitive Impairment,» *CNS Drugs* 29, 605–613 (2015), которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки); и флуметамол (Heurling et al., «Imaging β-amyloid Using [¹⁸F] Flutemetamol Positron Emission Tomography: From Dosimetry to Clinical Diagnosis,» *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 43.2: 362-373 (2016), которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки).

[¹⁸F]-флорбетапир может обеспечивать качественное и количественное измерение нагрузки бляшками в головном мозге у пациентов, включая пациентов с продромальной БА или легкой деменцией при БА. Например, отсутствие значимого сигнала [¹⁸F] флорбетапира на визуальных показаниях указывает на то, что пациенты, клинически проявляющие когнитивные нарушения, имеют редкие амилоидные бляшки или не имеют их вовсе. Таким образом, [¹⁸F]-флорбетапир также обеспечивает подтверждение амилоидной патологии. ПЭТ с [¹⁸F]-флорбетапиром также обеспечивает количественную оценку фибриллярных амилоидных бляшек в головном мозге, и в некоторых вариантах осуществления ее можно использовать для оценки снижения уровня амилоидных бляшек в головном мозге с помощью антител настоящего описания.

Визуализацию амилоида с использованием радиоактивно меченых соединений для ПЭТ также можно использовать для определения того, снижаются или увеличиваются отложения Аβ в головном мозге пациента-человека (например, для вычисления процентного снижения уровня Аβ после лечения или для оценки прогрессирования БА). Специалист в данной области техники может сопоставить значения соотношения стандартизованных значений накопления (SUVr), полученные при визуализации амилоида (с использованием радиоактивно меченных соединений для ПЭТ) для расчета % снижения уровня отложений Аβ в головном мозге пациента до и после лечения. Значения SUVr могут быть преобразованы в стандартизированные значения в центилоидах, где 100 — среднее значение для БА и 0 — среднее значение для молодых контролей, что обеспечивает сопоставимость между ПЭТ-метками амилоида и расчетом снижения, выраженным в центилоидных единицах (Klunk et al., «The Centiloid Project: Standardizing Quantitative Amyloid Plaque Estimation by PET,» *Alzheimer's & Dementia* 11.1: 1-15 (2015) и Navitsky et al., «Standardization of Amyloid Quantitation with Florbetapir Standardized Uptake Value Ratios to the Centiloid Scale,» *Alzheimer's & Dementia* 14.12: 1565-1571 (2018), которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки). В некоторых вариантах осуществления изменение отложения амилоидных бляшек в головном мозге относительно исходного уровня измеряют путем ПЭТ-сканирования с [¹⁸F]-флорбетапиром.

Для измерения нагрузки/содержания амилоида для целей настоящего описания также можно использовать анализ β-амилоида в спинномозговой жидкости или плазме. Например, Аβ42 можно использовать для измерения амилоида головного мозга (Palmqvist, S. et al., «Accuracy of Brain Amyloid Detection in Clinical Practice Using Cerebrospinal Fluid Beta-amyloid 42: a Cross-validation Study Against Amyloid Positron Emission Tomography. *JAMA Neurol* 71, 1282-1289 (2014), которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки). В некоторых вариантах осуществления в качестве биомаркера бета-

амилоида можно использовать соотношение $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ или $A\beta_{42}/A\beta_{38}$ (Janelidze et al., «CSF Abeta42/Abeta40 and Abeta42/Abeta38 Ratios: Better Diagnostic Markers of Alzheimer Disease,» *Ann Clin Transl Neurol* **3**, 154-165 (2016), которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки).

5 В некоторых вариантах осуществления отложения амилоидных бляшек в головном мозге или $A\beta$ в СМЖ или плазме можно использовать для стратификации субъектов в группы и определения того, какая группа субъектов может ответить на лечение/предотвращение заболевания (как описано в настоящем документе) с использованием антител или способов, описанных в настоящем документе.

10 Уровни тау-белка в головном мозге человеческого индивида можно определять с использованием таких способов, как визуализация тау-белка с использованием радиоактивно меченных соединений для ПЭТ (Leuzy et al., «Diagnostic Performance of RO948 F18 Tau Positron Emission Tomography in the Differentiation of Alzheimer Disease from Other Neurodegenerative Disorders,» *JAMA Neurology* **77**:8:955-965 (2020); Ossenkoppele et al.,
15 «Discriminative Accuracy of [^{18}F]-flortaucipir Positron Emission Tomography for Alzheimer Disease vs Other Neurodegenerative Disorders,» *JAMA* **320**, 1151-1162, (2018), полностью включены в настоящий документ путем ссылки).

В некоторых вариантах осуществления для целей настоящего описания можно использовать биомаркер [^{18}F]-флортауципир, который представляет собой лиганд ПЭТ.
20 ПЭТ-изображения тау-белка можно, например, количественно оценивать для определения соотношения стандартизованных значений накопления (SUV_T) с помощью опубликованных способов (Pontecorvo et al., «A Multicentre Longitudinal Study of Flortaucipir (^{18}F) in Normal Ageing, Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease Dementia,» *Brain* **142**:1723-35 (2019); Devous et al., «Test–Retest Reproducibility for the Tau PET Imaging Agent
25 Flortaucipir F18,» *Journal of Nuclear Medicine* **59**:937-43 (2018); Southekal et al., «Flortaucipir F18 Quantitation Using Parametric Estimation of Reference Signal Intensity,» *J. Nucl. Med.* **59**:944-51 (2018), которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки) и/или для визуальной оценки пациентов, например, для определения того, имеет ли пациент характерные для БА особенности (публикация Fleisher et al., «Positron Emission Tomography
30 Imaging With [^{18}F]-flortaucipir and Postmortem Assessment of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes,» *JAMA Neurology* **77**:829-39 (2020), которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки). Более низкие значения SUV_T указывают на меньшую нагрузку тау-белком, тогда как более высокие значения SUV_T указывают на более высокую нагрузку тау-белком. В одном варианте осуществления количественная оценка при
35 сканировании с флортауципиром осуществляется с помощью автоматизированного

конвейера обработки изображений, как описано в публикации Southekal et al., «Flortaucipir F18 Quantitation Using Parametric Estimation of Reference Signal Intensity,» *J. Nucl. Med.* 59:944–951 (2018), полностью включено в настоящий документ путем ссылки. В некоторых вариантах осуществления подсчет в пределах конкретной представляющей интерес области

5 головного мозга (например, мультиблочный барицентрический дискриминантный анализ или MUBADA, см. публикацию Devous et al., «Test-Retest Reproducibility for the Tau PET Imaging Agent Flortaucipir F18,» *J. Nucl. Med.* 59:937–943 (2018), которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки) сравнивают с референсной областью, причем референсная область представляет собой, например, весь мозжечок (wholeCere),

10 серое вещество мозжечка (cereCrus), белое вещество на основе атласа (atlasWM), специфичное для субъекта белое вещество (ssWM, например, с использованием параметрической оценки интенсивности референсного сигнала (PERSI), см. публикацию Southekal et al., «Flortaucipir F18 Quantitation Using Parametric Estimation of Reference Signal Intensity,» *J. Nucl. Med.* 59:944-951 (2018), которая полностью включена в настоящий

15 документ путем ссылки). Предпочтительный способ определения нагрузки тау-белком представляет собой количественный анализ, описанный как соотношение стандартизованных значений накопления (SUVr), который представляет собой количества в пределах конкретной представляющей интерес области в головном мозге (например, MUBADA) по сравнению с референсной областью (например, с использованием PERSI).

20 В некоторых вариантах осуществления фосфорилированный тау-белок (P-тау; фосфорилированный по треонину 181 или 217), можно использовать для измерения нагрузки тау-белком / содержания тау-белка для целей настоящего описания (Barthelemy et al., «Cerebrospinal Fluid Phospho-tau T217 Outperforms T181 as a Biomarker for the Differential Diagnosis of Alzheimer's Disease and PET Amyloid-positive Patient Identification,» *Alzheimer's*

25 *Res. Ther.* 12, 26 (2020); Mattsson et al., «A β Deposition is Associated with Increases in Soluble and Phosphorylated Tau that Precede a Positive Tau PET in Alzheimer's Disease,» *Science Advances* 6(16), (2020); полностью включены в настоящий документ путем ссылки). В конкретном варианте осуществления антитела, направленные против тау-белка человека, фосфорилированного по треонину в положении 217, можно использовать для измерения

30 нагрузки тау-белком / содержания тау-белка у субъекта для целей настоящего описания (см. публикацию международной заявки на патент № WO 2020/242963, которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки). Настоящее описание включает в некоторых вариантах осуществления применение антител к тау-белку, описанных в публикации WO 2020/242963, для измерения нагрузки тау-белком / содержания тау-белка

35 у субъекта. Антитела к тау-белку, описанные в WO 2020/242963, направлены против

изоформ тау-белка человека, экспрессируемых в ЦНС (например, распознают изоформы, экспрессируемые в ЦНС, и не распознают изоформы тау-белка человека, экспрессируемые исключительно вне ЦНС). Такие антитела к изоформам тау-белка человека, экспрессируемым в ЦНС, могут быть использованы в способе идентификации/выбора

5 пациентов, которые соответствуют одному или более из следующего: (i) имеют заболевание, описанное в настоящем документе; (ii) имеют риск возникновения заболевания, описанного в настоящем документе; (iii) нуждаются в лечении заболевания, описанного в настоящем документе; или (iv) нуждаются неврологической визуализации.

Уменьшение или замедление ухудшения когнитивных функций можно измерить с

10 помощью оценок когнитивных функций, таких как краткая шкала оценки психического статуса (MMSE) или шкала оценки когнитивных функций при болезни Альцгеймера (ADAS-Cog). Уменьшение или замедление ухудшения функционального состояния можно измерить с помощью шкалы кооперативного исследования повседневной деятельности при

15 болезни Альцгеймера (ADCS-ADL). Уменьшение или замедление ухудшения функционального состояния и когнитивных функций можно измерить с помощью сложных показателей, например, по рейтинговой шкале клинической деменции — сумма ячеек (CDR-SB), или интегрированной шкале оценки болезни Альцгеймера (iADRS).

Используемый в настоящем документе термин «мг/кг» означает количество в миллиграммах антитела или лекарственного средства, вводимого пациенту с учетом его

20 массы тела в килограммах. Дозу дают однократно. Например, доза антитела 10 мг/кг для пациента массой 70 кг будет представлять собой одну дозу 700 мг антитела, вводимую путем однократного введения. Доза антитела 20 мг/кг для пациента массой 70 кг будет представлять собой одну дозу 1400 мг антитела, вводимую путем однократного введения. Аналогично доза антитела 40 мг/кг для пациента с массой 80 кг будет представлять собой

25 дозу 3200 мг антитела, вводимую путем однократного введения.

В настоящем документе фраза «в комбинации с» относится к введению антитела к N3pGlu A β настоящего изобретения с другой молекулой («молекула комбинации», например ингибитор OGA, симптоматический агент или антитело к A β), одновременно или

30 последовательно в любом порядке или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления фраза «в комбинации с» относится к введению антитела к N3pGlu A β настоящего изобретения с ингибитором OGA, одновременно или последовательно в любом порядке или любой их комбинации. Две молекулы можно вводить либо в составе одной и той же фармацевтической композиции, либо в отдельных фармацевтических композициях. Антитело к N3pGlu A β можно вводить до, одновременно с или после введения ингибитора

35 OGA, или в какой-либо их комбинации. Если комбинацию вводят через повторяющиеся

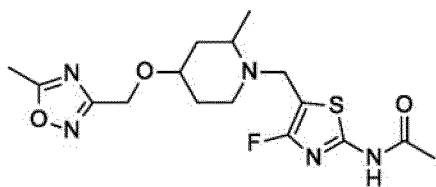
интервалы (например, во время стандартного курса лечения), антитело к N3pGlu A β можно вводить до, одновременно или после каждого введения ингибитора OGA или в какой-либо их комбинации, или через различные промежутки времени по отношению к терапии ингибитором OGA, или в виде однократной дозы или серии доз до, в любое время во время или после курса лечения ингибитором OGA.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения антитела и фрагменты антител (например, антитела к N3pG A β) или нуклеиновые кислоты, кодирующие их, предложены в выделенной форме. Используемый в данном документе термин «выделенный» относится к белку, пептиду или нуклеиновой кислоте, которые не обнаружены в природе и не содержат или по существу не содержат другие макромолекулярные вещества, обнаруженные в клеточной среде. Термин «по существу не содержит», как используется в настоящем документе, означает представляющие интерес белок, пептид или нуклеиновую кислоту, которые содержат более чем 80% (в мольном отношении) макромолекулярных компонентов, предпочтительно более 90% и более предпочтительно более 95%.

В некоторых вариантах осуществления антитело настоящего изобретения экспрессируется в клеточных культурах. После экспрессии и/или секреции антител и фрагментов антител настоящего изобретения среду осветляют для удаления клеток, а осветленную среду очищают с использованием любого из многих обычно используемых методов. Очищенные антитела и фрагменты антител могут быть составлены в фармацевтических композициях в соответствии с хорошо известными способами изготовления белков и антител для парентерального введения, особенно для подкожного, интратекального или внутривенного введения. Антитела и фрагменты антител могут быть лиофилизированы вместе с подходящими фармацевтически приемлемыми эксципиентами, а затем восстановлены разбавителем на водной основе перед применением. Альтернативно антитела и фрагменты антител могут быть приготовлены в водном растворе и храниться до применения. В любом случае форма для хранения и форма для инъекции фармацевтических композиций антител и фрагментов антител будут содержать фармацевтически приемлемый эксципиент или эксципиенты, которые представляют собой ингредиенты, отличные от антител и фрагментов антител. Является ли ингредиент фармацевтически приемлемым, зависит от его влияния на безопасность и эффективность или на безопасность, чистоту и эффективность фармацевтической композиции. Если считается, что ингредиент оказывает достаточно неблагоприятное влияние на безопасность или эффективность (или на безопасность, чистоту или эффективность), чтобы гарантировать, что он не используется в

композиции для введения людям, то он не является фармацевтически приемлемым для использования в фармацевтической композиции антитела и фрагментов антитела.

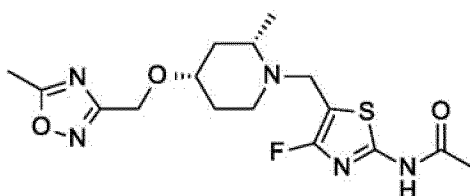
Новые комбинации и способы настоящего изобретения включают ингибиторы OGA, проникающие в головной мозг. В некоторых вариантах осуществления новых комбинаций и способов настоящего изобретения ингибитор OGA содержит соединение формулы I:



Формула I

или его фармацевтически приемлемую соль.

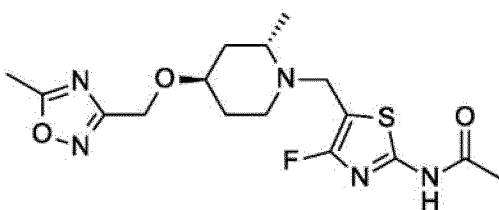
В некоторых вариантах осуществления ингибитор OGA в новых комбинациях и способах настоящего изобретения представляет собой соединение формулы Ia:



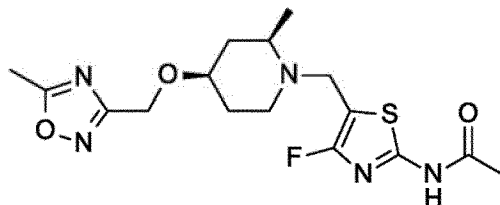
Формула Ia

или его фармацевтически приемлемую соль.

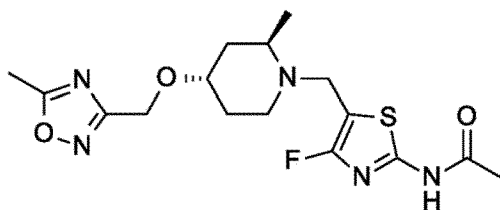
Определенные конфигурации формулы I, которые содержат варианты осуществления ингибитора OGA в новых комбинациях и способах настоящего изобретения, дополнительно включают:



Формула Ib



Формула Ic



Формула Id

и их фармацевтически приемлемые соли.

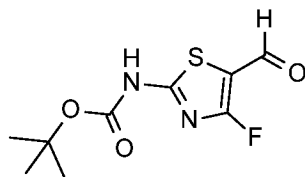
Соединение формулы I 5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил, где метильные и кислородные заместители в пиперидиновом кольце находятся в *цис*- или *транс*-конфигурации, или его фармацевтически приемлемая соль включены в объем ингибитора OGA настоящей новой комбинации. Настоящая новая комбинация также предполагает все
5 отдельные энантиомеры и диастереомеры, а также смеси энантиомеров соединений 5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ила настоящего изобретения, включая рацематы. Абсолютные конфигурации соединения 5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ила в новых комбинациях и способах, предложенных в настоящем документе, включают:

N-[4-фтор-5-[[*(2S,4S)*]-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-
10 пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамид и его фармацевтически приемлемые соли; и
N-[4-фтор-5-[[*(2S,4S)*]-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамид являются особенно предпочтительными.

Соединения ингибитора OGA 5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ила настоящего изобретения или их соли могут быть получены различными способами, известными
15 среднему специалисту в данной области. Рядовому специалисту в данной области понятно, что конкретные этапы синтеза для каждого из описанных способов можно комбинировать различным образом или осуществлять в сочетании с этапами из других схем с получением соединений согласно настоящему изобретению или их солей. Продукты на каждой стадии ниже могут быть выделены с помощью обычных способов, хорошо известных в данной
20 области техники, включая экстракцию, выпаривание, осаждение, хроматографию, фильтрование, растирание и кристаллизацию. На следующих схемах все заместители, если не указано иное, являются такими, как определено выше. Реагенты и исходные материалы общедоступны рядовым специалистам в данной области. Не ограничивая объем данного изобретения, следующие способы получения и примеры представлены для дополнительной
25 иллюстрации данного изобретения. Дополнительно, специалисту в данной области техники понятно, что соединения Формул Ia, Ib, Ic и Id могут быть получены с использованием исходного материала с соответствующей стереохимической конфигурацией, который может быть получен специалистом в данной области. Например, в приведенных ниже способах получения используют исходные материалы с конфигурацией, по существу
30 соответствующей формуле Ia.

Следующие способы получения и примеры предназначены для иллюстрации, а не ограничения изобретения, и средние специалисты в данной области могут осуществлять различные модификации. Следующие примеры и анализы демонстрируют, что антитела к N3pG Aβ настоящего изобретения полезны для лечения заболевания, характеризующегося
35 отложением Aβ, такого как болезнь Альцгеймера, синдром Дауна и ЦАА.

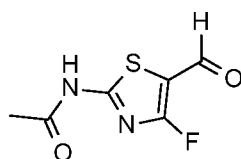
Получение 1. Синтез трет-бутил-N-(4-фтор-5-формилтиазол-2-ил)карбамата



Фторид цезия (227 г, 1480 ммоль) добавляют к раствору *tert*-бутил N-(4-хлор-5-формилтиазол-2-ил)карбамата (38,8 г, 148 ммоль; для получения *tert*-бутил N-(4-хлор-5-формилтиазол-2-ил)карбамата (см., например, N. Masuda, et al., *Bioorg Med Chem*, 12, 6171-6182 (2004)) в диметилсульфоксиде (DMSO, 776 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивают в термостате, установленном на 145 °С, с внутренней температурой 133 °С в течение 48 часов и смесь охлаждают на ледяной бане. В смесь добавляют насыщенный водный раствор бикарбоната натрия (500 мл), насыщенный водный раствор NaCl (500 мл) и этилацетат (500 мл). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 10 минут и фильтруют через диатомитовую землю, промывают этилацетатом (500 мл). Фильтрат переносят в делительную воронку, и слои разделяют, затем водный слой экстрагируют этилацетатом (1 л). Объединенные органические фазы промывают насыщенным водным раствором NaCl (1 л), затем слой насыщенного водного раствора NaCl экстрагируют этилацетатом (300 мл). Объединенные органические экстракты сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют для получения остатка. Остаток пропускают через слой силикагеля (330 г), элюируя 5% этилацетатом в дихлорметане (1,5 л), и фильтрат концентрируют под пониженным давлением для получения остатка (24,2 г).

Остаток (32,7 г смесь полученных остатков, 133 ммоль) растворяют в изопропанол (303 мл), фильтруют и очищают с помощью сверхкритической флюидной хроматографии (СФХ), используя колонну IC (производное полисахарида целлюлозы: трис(3,5-дихлорфенилкарбамат, 30 x 250 мм, 5 мкм) с 10% изопропиловым спиртом (без добавки) при скорости 180 мл/мин с впрыскиваниями по 3 мл. Фракции, содержащие продукт, концентрируют для получения указанного в заголовке соединения (16,1 г, выход 48%). MS m/z 247,0 (M + H).

Получение 2. Синтез N-(4-фтор-5-формилтиазол-2-ил)ацетамида (способ А)



Бромид цинка (91,9 г, 408 ммоль) одной порцией при комнатной температуре добавляют в смесь трет-бутил-N-(4-фтор-5-формилтиазол-2-ил)карбамата (33,5 г, 136 ммоль) и дихлорметана (503 мл), в сосуде с рубашкой. Реакционную смесь перемешивают в течение ночи при внутренней температуре 37 °С, затем температуру рубашки устанавливают на -10 °С и по каплям добавляют тетрагидрофуран (111 мл) в течение более 15 минут, поддерживая внутреннюю температуру ниже 6 °С. Затем температуру рубашки устанавливают на -30 °С и по каплям добавляют пиридин (110 мл, 1360 ммоль) в течение более 5 минут, поддерживая внутреннюю температуру ниже 5 °С. Температуру рубашки устанавливают на 0 °С и в течение более 5 минут по каплям добавляют уксусный ангидрид (116 мл, 1220 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи при внутренней температуре 37 °С, охлаждают до комнатной температуры и пропускают через тонкий слой диатомитовой земли, элюируя тетрагидрофураном (500 мл). Фильтрат переносят в колбу и смесь концентрируют под пониженным давлением для получения остатка, который дополнительно концентрируют из толуола (50 мл). В остаток добавляют раствор моногидрата лимонной кислоты (57,2 г, 272 ммоль) в воде (400 мл) и 2-метилтетрагидрофуран (400 мл) и смесь перемешивают при 40 °С в течение 5 минут. Смесь пропускают через тонкий слой диатомитовой земли, элюируя 2-метилтетрагидрофураном (100 мл). Фильтрат переносят в делительную воронку, и слои разделяются. Водный слой экстрагируют 2-метилтетрагидрофураном (2 × 250 мл), а комбинированные органические экстракты разбавляют водой (500 мл). В смесь по порциям в течение более 5 минут при перемешивании добавляют твердый бикарбонат натрия, пока не прекратится выделение газа. Смесь переносят в делительную воронку и слои разделяют; водный слой экстрагируют 2-метилтетрагидрофураном (200 мл и 100 мл). Объединенные органические экстракты сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют под пониженным давлением для получения остатка, который разбавляют 2-метилтетрагидрофураном (100 мл), и смесь пропускают через тонкий слой силикагеля (250 г), элюируя 2-метилтетрагидрофураном (2,5 л). Фильтрат концентрируют под пониженным давлением для получения остатка, который суспендируют в смеси 1 : 1 дихлорметана и гептана (202 мл). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 30 минут и фильтруют. Отфильтрованное твердое вещество собирают и сушат в вакууме при 40 °С в течение 2 часов для получения указанного в заголовке соединения (18,0 г, выход 70%). МС m/z 189,0 (M + H).

Альтернативный способ синтеза N-(4-фтор-5-формилтиазол-2-ил)ацетамида (способ B)

Дихлорметан (1325 г, 15,6 моль) добавляют в 2-амино-4-хлортиазол-5-карбальдегид (100 г, 0,61 моль) и пиридин (194,6 г, 2,46 моль) и охлаждают до 0–5 °С. По каплям

добавляют уксусный ангидрид (188,4 г, 1,85 моль), поддерживая температуру 0–5 °С. После завершения добавления, температуру доводят до 20–25 °С и совершают перемешивание в течение 41 часа. Концентрируют при пониженном давлении с последующим добавлением 35%-ной водной HCl (200 мл) и воды (1,5 л), поддерживая температуру ниже 40 °С.

- 5 Охлаждают до 20–25 °С и перемешивают в течение 18 часов. Полученную смесь фильтруют и собранное твердое вещество промывают водой. Твердые вещества сушат при 60–65 °С в течение 24 часов для получения N-(4-хлор-5-формилтиазол-2-ил)ацетамида (75 г, выход 66%).

10 В инертной атмосфере сульфолан (1000 мл) добавляют в N-(4-хлор-5-формилтиазол-2-ил)ацетамид (50 г, 0,24 моль, непосредственно полученный выше), хлорид тетраметиламмония (107,1 г, 0,98 моль) и фторид цезия (370,6 г, 2,4 моль). Нагревают до 130 °С и перемешивают в течение 23 часов. Анализ ВЭЖХ показывает 75%-ное превращение с выходом *in situ* 45% указанного в заголовке соединения.

15 *Альтернативный способ синтеза N-(4-фтор-5-формилтиазол-2-ил)ацетамида (способ С)*

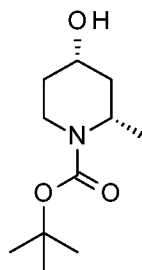
2-пропанол (150 мл) добавляют в тетрагидрат фторида тетраметиламмония (10,2 г, 109,0 ммоль) и концентрируют смесь до приблизительно половины объема в вакууме с внутренней температурой, поддерживаемой при 70 °С, для удаления воды. Добавляют 2-пропанол (200 мл) и смесь концентрируют приблизительно до половины объема в вакууме.

20 Повторяют еще два раза. Добавляют диметилформамид (DMF, 200 мл) и концентрируют приблизительно до половины объема в вакууме. Добавляют тетрагидрофуран (ТГФ, 200 мл) и концентрируют приблизительно до половины объема. Повторяют еще два раза. Загружают N-(4-хлор-5-формилтиазол-2-ил)ацетамид (1,22 г, 6,0 ммоль, полученный выше в способе В) и DMF (12 мл). Нагревают до 110 °С и перемешивают в течение 12 часов.

25 Реакционную смесь охлаждают до 25 °С. Добавляют 2-метилтетрагидрофуран (40 мл) и воду (40 мл). Разделяют полученные слои и экстрагируют водный слой 2-метилтетрагидрофураном (40 мл). Слои разделяют и объединенные органические слои промывают водой (20 мл). Слои разделяют и органический слой концентрируют при пониженном давлении. Добавляют этилацетат (20 мл) и воду (5 мл), полученные слои

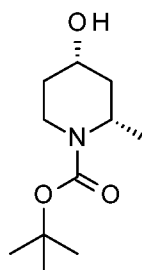
30 разделяют и органический слой концентрируют для удаления растворителя. Добавляют этилацетат (2 мл) и гептан (2 мл) и фильтруют полученную смесь. Отфильтрованные твердые вещества сушат в вакууме при 55 °С в течение 18 часов для получения указанного в заголовке соединения в виде 93%-ной смеси с N-(4-хлор-5-формилтиазол-2-ил)ацетамидом.

Получение 3. Синтез трет-бутил-(2S,4S)-4-гидрокси-2-метилпиперидин-1-карбоксилата



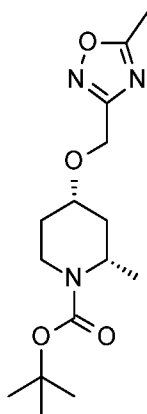
В колбу добавляют трет-бутил-(2S)-2-метил-4-оксопиперидин-1-карбоксилат (50 г, 234,4 ммоль) и тетрагидрофуран (500 мл). Смесь охлаждают до $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ в атмосфере азота и по каплям в течение 45 минут добавляют 1 М раствор три(втор-бутил)боргидрида лития (304,77 мл, 304,8 ммоль) в тетрагидрофуране, поддерживая внутреннюю температуру ниже $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 часа и охлаждают до $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. В реакционную смесь добавляют смесь воды (25,3 мл) и тетрагидрофурана (100,2 мл), поддерживая внутреннюю температуру ниже $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. По каплям в течение 1 часа добавляют 30% масс./масс. водный раствор пероксида водорода (118,9 мл, 1,2 моль) в воде (126,70 мл), поддерживая внутреннюю температуру ниже $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. В смесь добавляют 5 М водный раствор HCl (46,9 мл, 234,4 ммоль) и метил-трет-бутиловый эфир (1 л) и смесь нагревают до комнатной температуры. Слои разделяют и органическую фазу перемешивают с раствором метабисульфита натрия (222,8 г, 1,17 моль) в воде (500 мл) в течение 10 минут при комнатной температуре. Разделяют слои и сушат органическую фазу над сульфатом магния, фильтруют и концентрируют при пониженном давлении. Остаток очищают флеш-хроматографией над силикагелем, элюируя 0–50% метил-трет-бутиловым эфиром/изогексаном), и содержащие продукт фракции объединяют и концентрируют при пониженном давлении для получения указанного в заголовке соединения (40,4 г, выход 78%). ИЭР/МС m/z 238 (M + Na).

Альтернативный способ синтеза трет-бутил-(2S,4S)-4-гидрокси-2-метилпиперидин-1-карбоксилата



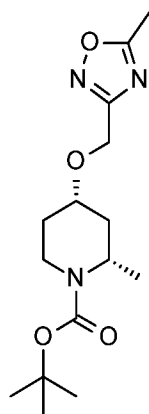
В эмалированный реактор, содержащий деионизированную воду (460 л) и дигидрофосфат калия (6,5 кг, 0,41 экв.), при 20 °С загружают ДМСО (27,4 кг, 1,0 об.) И D-(+)-моногидрат глюкозы (28,9 кг, 1,25 экв.). Внутреннюю температуру доводят до 30 °С, а рН реакции доводят до 6,9 путем добавления 8% раствора водного гидроксида натрия (15 л, 0,3 экв.). В реактор загружают трет-бутил-(2S)-2-метил-4-оксопиперидин-1-карбоксилат (24,9 кг, 1,0 экв. (99,1% э.и.)) и смесь перемешивают при 30 °С в течение 15 мин. Через открытое отверстие непосредственно в реакционную смесь загружают средство для кетовосстановления (KRED-130, 250 г, 1% масс./масс.), глюкозодегидрогеназу (GDH-101, 250 г, 1% масс./масс.) и натриевую соль НАДФ (63 г, 0,25% масс./масс.). Смесь выдерживают при температуре 30 °С и рН $7,0 \pm 0,2$ посредством добавления 8% водного раствора NaHCO_3 . После перемешивания в течение 16,5 часа в реакционную смесь загружают диатомитовую землю (12,5 кг, 50% масс./масс.) и толуол (125 л, 5 об.). После перемешивания в течение 30 мин при 30 °С смесь переносят в другой реактор емкостью 2000 л через поточный фильтр GAF (4 штуцера) в течение 1 часа. Смесь оставляют на 30 мин без перемешивания, слои разделяют и водный слой повторно экстрагируют толуолом (2 x 125 л). Смеси органических слоев фильтруют (встроенный GAF-фильтр) и смесь с толуолом промывают 25% раствором водного раствора хлорида натрия (125 л, 5 об.) при 25 °С. Полученный раствор в толуоле подвергают азеотропной сушке (частичный вакуум, внутренняя температура < 60 °С) до 0,10% масс./масс. воды и охлаждают до 20 °С. Смесь отфильтровывают из реактора через патронный фильтр в чистые бочки под положительным давлением азота. Затем реакционную смесь переносят из бочек в эмалированный сосуд вместимостью 500 л и концентрируют в вакууме (< 60 °С) до целевого остаточного объема приблизительно 56 л (2,25 об.). При 40 °С загружают н-гептан (169 кг, 10 об.) и смесь посыпают 25 г трет-бутил-(2S,4S)-4-гидрокси-2-метилпиперидин-1-карбоксилата. Полученный густой шлам разбавляют дополнительным количеством н-гептана (25 л, 1 об.) и охлаждают до 16 °С в течение 4 часов. Продукт выделяют центрифугированием, промывая н-гептаном (25 л на цикл центрифугирования; необходимо 4 цикла), выход 20,3 кг (выход 81%; > 99,9% э.и.), после сушки в течение 11 часов в лотковой сушилке при 30 °С. ИЭР/МС m/z 238 (M + Na).

Получение 4. Синтез трет-бутил-(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]пиперидин-1-карбоксилата



3-(Хлорметил)-5-метил-1,2,4-оксадиазол (43,5 г, 301 ммоль) при комнатной
 5 температуре добавляют в раствор трет-бутил-(2S,4S)-4-гидрокси-2-метилпиперидин-1-
 карбоксилата (29,5 г, 137 ммоль) в ацетонитриле (590 мл). Реакционную смесь
 перемешивают на ледяной бане и порциями в течение 10 минут добавляют трет-бутоксид
 натрия (54,3 г, 548 ммоль), поддерживая внутреннюю температуру ниже 10 °С.
 Реакционную смесь перемешивают на ледяной бане при внутренней температуре 5 °С в
 10 течение 9 часов, медленно нагревают до комнатной температуры и перемешивают в течение
 ночи. Реакционную смесь охлаждают на ледяной бане и добавляют насыщенный водный
 раствор хлорида аммония (200 мл) в течение 5 минут, поддерживая внутреннюю
 температуру в течение добавления ниже 10 °С. Затем смесь разбавляют водой (100 мл) и
 нагревают до комнатной температуры. Смесь экстрагируют метил-трет-бутиловым эфиром
 15 (2 × 300 мл) и объединенные органические экстракты промывают насыщенным водным
 раствором NaCl (300 мл). Объединенные органические экстракты сушат над сульфатом
 натрия, фильтруют и концентрируют для получения остатка. Остаток быстро пропускают
 через слой силикагеля (300 г), элюируя метил-трет-бутиловым эфиром (1 л), и фильтрат
 концентрируют при пониженном давлении для получения указанного в заголовке
 20 соединения (46,5 г, выход > 99%). MS m/z 334,0 (M + Na).

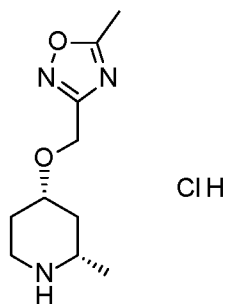
Альтернативный способ синтеза трет-бутил-(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]пиперидин-1-карбоксилата



К раствору трет-бутил(2S,4S)-4-гидрокси-2-метилпиперидин-1-карбоксилата (0,25 г, 1,16 ммоль) и 3-(хлорметил)-5-метил-1,2,4-оксадиазола (308 мг, 2,3 ммоль) в N,N-диметилформамиде (3 мл) в атмосфере азота при 0 °С порциями добавляют трет-бутоксид натрия (0,35 г, 3,5 ммоль) в течение 5 минут. Перемешивают реакцию смесь при комнатной температуре в течение 10 минут и при 40 °С в течение 12 минут. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и гасят водой (10 мл). Слои разделяют и водную фазу экстрагируют метил-трет-бутиловым эфиром (2 x 10 мл). Объединенные органические экстракты промывают 5% водным раствором хлорида лития, сушат над сульфатом магния, фильтруют и концентрируют при пониженном давлении для получения указанного в заголовке соединения (0,49 г, выход 81%, чистота 60%) в виде коричневого масла. MS m/z 334,0 (M + Na).

15

Получение 5. Синтез гидрохлорида 5-метил-3-[[[(2S,4S)-2-метил-4-пиперидил]оксиметил]-1,2,4-оксадиазола



Колбу, содержащую трет-бутил-(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]пиперидин-1-карбоксилат (4,0 г, 12,9 ммоль), погружают в ледяную баню. В эту колбу по каплям, в течение 5 минут, при перемешивании, добавляют 4 М раствор соляной кислоты в 1,4-диоксане (25,9 мл, 104 ммоль), поддерживая внутреннюю температуру в течение добавления ниже 20 °С. Реакционную смесь перемешивают при

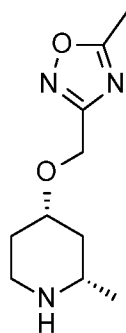
20

комнатной температуре в течение 1 часа и концентрируют при пониженном давлении для получения указанного в заголовке соединения (3,5 г, выход 92%, исходя из чистоты 83%, измеренной с помощью ^1H -ЯМР). МС m/z 212,0 (M + H).

5 *Альтернативный способ синтеза гидрохлорида 5-метил-3-[[[(2S,4S)-2-метил-4-пиперидил]оксиметил]-1,2,4-оксадиазола*

Метанол (50 мл) добавляют в трет-бутил-(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]пиперидин-1-карбоксилат (12,9 г, 0,04 моль). Смесь охлаждают до 0 °С. В охлажденную смесь по каплям добавляют 4 М раствор соляной кислоты в метаноле (80 мл), поддерживая внутреннюю температуру ниже 20 °С. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 18 часов. Смесь концентрируют для удаления растворителя. Добавляют ацетон (10 мл) и смесь перемешивают в течение 20 минут. Добавляют тетрагидрофуран (40 мл) и перемешивают смесь в течение 3 часов. Твердые вещества собирают фильтрованием в атмосфере азота, и отфильтрованный твердый осадок промывают тетрагидрофураном. Отфильтрованное твердое вещество сушат в вакууме при 45 °С в течение 2 часов для получения указанного в заголовке соединения с чистотой 90%. Повторная кристаллизация с применением ацетона повышает чистоту указанного в заголовке соединения до 95%.

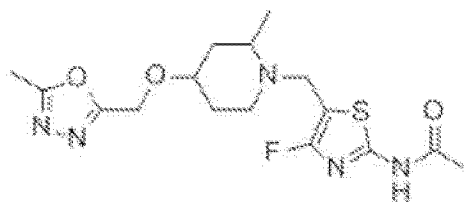
20 **Получение 6. Синтез 5-метил-3-[[[(2S,4S)-2-метил-4-пиперидил]оксиметил]-1,2,4-оксадиазола**



В раствор трет-бутил-(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]пиперидин-1-карбоксилата (0,49 г, 1,6 ммоль) в дихлорметане (10 мл) в атмосфере азота добавляют трифторуксусную кислоту (1,8 мл, 23 ммоль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 3 часов. Смесь концентрируют при пониженном давлении для получения маслянистой жидкости желтого цвета. Остаток растворяют в метаноле (5 мл) и выливают на катионообменный картридж, элюируют последовательно метанолом (2 × 10 мл) и 2 М раствором аммиака в метаноле (10 мл).

Фильтрат концентрируют при пониженном давлении для получения указанного в заголовке соединения (0,3 г, выход 91%). МС m/z 212,0 (M + H).

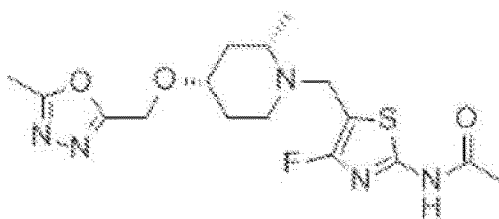
В других вариантах осуществления новых комбинаций и способов настоящего изобретения
5 ингибитор OGA представляет собой соединение формулы X:



Формула X

или его фармацевтически приемлемую соль.

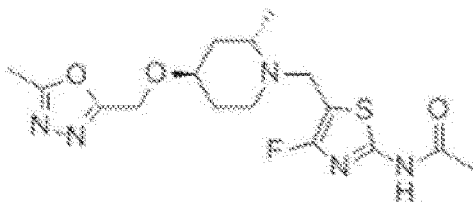
Кроме того, в настоящем изобретении предложено соединение формулы Xa:



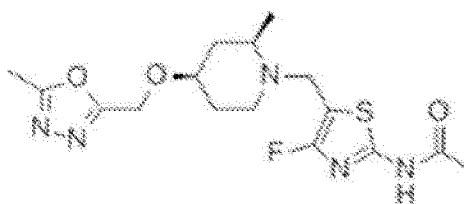
Формула Xa

10 или его фармацевтически приемлемая соль.

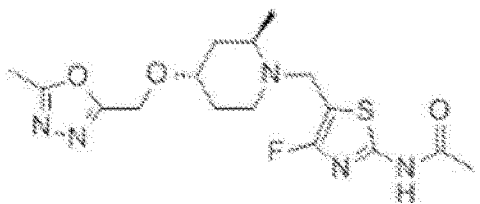
Определенные конфигурации формулы X, которые содержат варианты осуществления ингибитора OGA новых комбинаций и способов настоящего изобретения, дополнительно включают:



Формула Xb



Формула Xc



Формула Xd

15 и их фармацевтически приемлемые соли.

5-Метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил соединение формулы X, где метильные и кислородные заместители в пиперидиновом кольце находятся в *цис*- или *транс*-

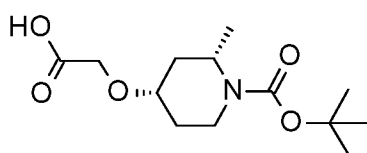
конфигурации, или его фармацевтически приемлемая соль включены в объем ингибитора OGA согласно настоящей новой комбинации. Настоящая новая комбинация также предполагает все отдельные энантиомеры и диастереомеры, а также смеси энантиомеров 5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил соединений настоящего изобретения, включая рацематы.

- 5 Абсолютные конфигурации 5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил соединений новых комбинаций и способов, представленных в настоящем документе, включают:

N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамид и его фармацевтически приемлемые соли, включая таковые со свободным основанием, и включая кристаллическую форму.

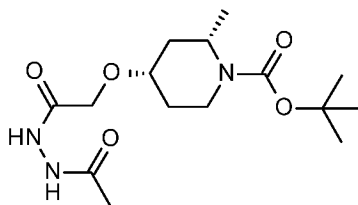
- 10 5-Метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил соединения новых комбинаций и способов настоящего изобретения или их соли можно получать при помощи различных способов, известных специалистам в данной области, некоторые из которых представлены ниже на схемах, в способах получения и примерах. Рядовому специалисту в данной области понятно, что конкретные этапы синтеза для каждого из описанных способов можно
- 15 комбинировать различным образом или осуществлять в сочетании с этапами из других схем с получением соединений согласно настоящему изобретению или их солей. Продукты на каждой стадии ниже могут быть выделены с помощью обычных способов, хорошо известных в данной области техники, включая экстракцию, выпаривание, осаждение, хроматографию, фильтрование, растирание и кристаллизацию. На схемах ниже все
- 20 заместители, если не указано иное, имеют значение, указанное ранее. Реагенты и исходные материалы общедоступны рядовым специалистам в данной области. Без ограничения объема настоящего изобретения следующие схемы, примеры получения и примеры представлены для дополнительной иллюстрации настоящего изобретения. Дополнительно специалисту в данной области понятно, что соединения формул Ха, Хб, Хс, и Хд могут быть
- 25 получены с использованием исходного материала с соответствующей стереохимической конфигурацией, который может быть получен специалистом в данной области. Например, в приведенных ниже примерах получения используют исходные материалы с конфигурацией, по существу соответствующей формуле Ха.

- 30 **Получение 7. Синтез 2-[[[(2S,4S)-1-трет-бутоксикарбонил-2-метил-4-пиперидил]окси]уксусной кислоты**



2-Хлор-1-морфолиноэтанон (59,4 г, 363 ммоль) добавляют к раствору трет-бутил-(2S,4S)-4-гидрокси-2-метилпиперидин-1-карбоксилата (52,1 г, 242 ммоль) в ацетонитриле (521 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивают на ледяной бане и порциями в течение 10 минут добавляют трет-бутоксид натрия (48,0 г, 484 ммоль), поддерживая внутреннюю температуру ниже 15 °С. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 часов и добавляют в течение 5 минут в другую колбу, содержащую насыщенный водный раствор хлорида аммония (250 мл) и воду (250 мл), при охлаждении на ледяной бане, поддерживая внутреннюю температуру ниже 15 °С во время добавления. Смесь нагревают до комнатной температуры экстрагируют метил-трет-бутиловым эфиром (2 × 500 мл) и объединенные органические экстракты промывают насыщенным водным NaCl (300 мл). Объединенные органические фазы сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют, получая остаток, который объединяют с 2-пропанолом (414 мл) и 2 М водным раствором гидроксида натрия (303 мл, 605 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивают в термостате при 47 °С в течение ночи с внутренней температурой 45 °С. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры, концентрируют для удаления 2-пропанола и разбавляют водой (50 мл). Смесь экстрагируют метил-трет-бутиловым эфиром (250 мл), водный слой охлаждают на ледяной бане и подкисляют уксусной кислотой (55,6 мл, 968 ммоль). Водную смесь экстрагируют этилацетатом (4 × 250 мл). Объединенные органические экстракты сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют с получением остатка, который концентрируют из толуола (3 × 100 мл), с получением указанного в заголовке соединения (79,8 г, выход > 99%). МС m/z 272,0 (M-H).

Получение 8. Синтез трет-бутил (2S,4S)-4-[2-(2-ацетилгидразино)-2-оксо-этокси]-2-метил-пиперидин-1-карбоксилата



Тетрагидрофуран (798 мл) добавляют в колбу, содержащую 2-[[[(2S,4S)-1-трет-бутоксикарбонил-2-метил-4-пиперидил]окси]уксусную кислоту (79,8 г, 224 ммоль), и смесь перемешивают на ледяной бане с внутренней температурой 5 °С. К смеси добавляют одной порцией 1,1'-карбонилдиимидазол (43,5 г, 268 ммоль) и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 часов. Добавляют дополнительную порцию 1,1'-карбонилдиимидазола (7,25 г, 44,7 ммоль) и реакционную смесь

перемешивают при комнатной температуре в течение 30 минут. Реакционную смесь погружают в ледяную баню и добавляют одной порцией ацетогидразид (21,5 г, 291 ммоль). Затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь охлаждают, перемешивая, в ледяной бане, и в течение 2 минут

5 добавляют насыщенный водный раствор бикарбоната натрия (500 мл), поддерживая внутреннюю температуру ниже 15 °С. Разбавляют смесь водой (300 мл) и концентрируют полученную смесь при пониженном давлении для удаления тетрагидрофурана. Полученную водную смесь экстрагируют 2-метилтетрагидрофураном (4 × 500 мл). Объединенные органические экстракты сушат над сульфатом натрия, фильтруют и

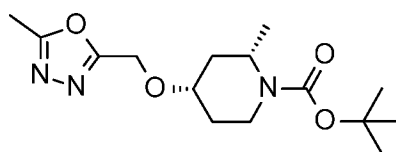
10 концентрируют при пониженном давлении с получением остатка, который объединяют с этилацетатом (200 мл) и гептаном (200 мл). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 30 минут, разбавляют гептаном (200 мл), энергично перемешивают при комнатной температуре в течение дополнительных 30 минут и фильтруют. Отфильтрованное твердое вещество сушат в вакууме при 40 °С в течение 2 часов с

15 получением первой порции указанного в заголовке соединения (71,5 г). Фильтрат повторно фильтруют и отфильтрованное твердое вещество сушат в потоке газообразного азота при комнатной температуре в течение 15 минут, получая вторую порцию указанного в заголовке соединения (1,98 г). Большую часть первой порции продукта (71,1 г, 216 ммоль) и второй порции продукта (1,97 г, 5,98 ммоль) объединяют с трет-бутилметилловым эфиром

20 (731 мл) и смесь перемешивают в термостате с температурой 45 °С в течение 30 минут при внутренней температуре 40 °С, охлаждают до комнатной температуры в течение 1 часа при перемешивании и фильтруют. Отфильтрованное твердое вещество сушат в вакууме при комнатной температуре в потоке газообразного азота в течение 30 минут с получением указанного в заголовке соединения (53,7 г, выход 71%). MS m/z 352,0 (M + Na).

25

Получение 9. Синтез трет-бутил-(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)метокси]пиперидин-1-карбоксилата



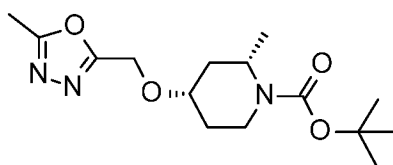
К раствору трет-бутил-(2S,4S)-4-гидрокси-2-метилпиперидин-1-карбоксилата (0,5 г, 2 ммоль) в N,N-диметилформамиде (5 мл) в атмосфере азота при комнатной температуре порциями добавляют трет-бутоксид натрия (920 мг, 9,3 ммоль). Полученную реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 40 минут. Реакционную смесь

30

охлаждают до 0 °С и добавляют 2-(хлорметил)-5-метил-1,3,4-оксадиазол (416 мг, 3,1 ммоль). Полученный раствор перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь концентрируют при пониженном давлении и полученный остаток разбавляют водой. Смесь экстрагируют 3 порциями этилацетата. Объединенные органические экстракты сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют при пониженном давлении для получения неочищенного масла.

Остаток растворяют в диметилсульфоксиде (до общего объема 2 мл) и очищают посредством препаративной ВЭЖХ (Phenomenex Gemini-NX 10 мкм 30 x 100 мм C-18), элюируя с градиентом 15% (CH₃CN и вода с 10 мМ бикарбоната аммония, доведенного до рН 9 с помощью гидроксида аммония) до 100% CH₃CN в течение 7 минут (50 мл/мин, 1 инъекция, 204 нм), с получением указанного в заголовке соединения (28 мг, выход 4%). МС m/z 312 (M + H).

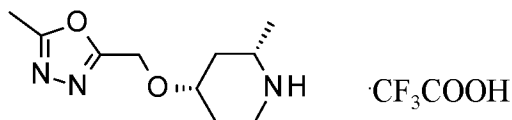
Альтернативный способ синтеза трет-бутил-(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)метокси]пиперидин-1-карбоксилата



В колбу добавляют трет-бутил(2S,4S)-4-[2-(2-ацетилгидразино)-2-оксоэтокс]-2-метилпиперидин-1-карбоксилат (53,7 г, 163 ммоль) и ацетонитрил (537 мл) и суспензию перемешивают при комнатной температуре. К смеси добавляют N,N-диизопропилэтиламин (114 мл, 652 ммоль) одной порцией и п-толуолсульфонилхлорид (77,7 г, 408 ммоль) тремя порциями в течение 5 минут при охлаждении на водяной бане. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи, затем охлаждают на ледяной бане. N',N'-диметилэтан-1,2-диамин (21,8 г, 245 ммоль) добавляют по каплям в течение 10 минут, поддерживая внутреннюю температуру ниже 15 °С. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 30 минут и разбавляют насыщенным водным раствором лимонной кислоты (50 мл), этилацетатом (500 мл) и водой (450 мл) при комнатной температуре. Слои разделяют и органический слой промывают смесью насыщенного водного раствора лимонной кислоты (50 мл) и воды (450 мл). Органический слой промывают насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (500 мл), а затем водный слой экстрагируют этилацетатом (500 мл). Объединенные органические экстракты сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют с получением остатка, который пропускают через небольшой слой силикагеля (400 г), элюируя последовательно 25% этилацетатом в гептане (2 фракции по 500 мл) и этилацетатом (5 фракций по 500 мл).

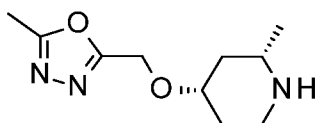
Фракции, содержащие продукт, концентрируют для получения указанного в заголовке соединения (53,3 г, выход > 99%). МС m/z 312,2 (M + H).

Получение 10. Синтез 5-метил-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-пиперидил]оксиметил]-1,3,4-оксадиазола 2,2,2-трифторуксусной кислоты



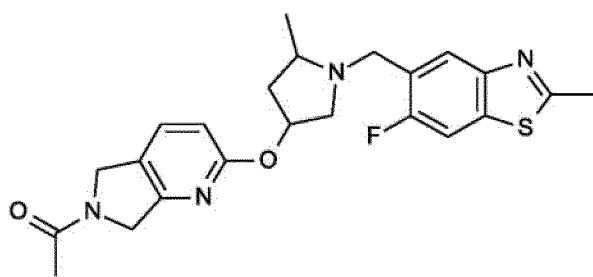
В раствор трет-бутил-(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)метокси]пиперидин-1-карбоксилата (27,5 мг, 0,09 ммоль) в дихлорметане (3 мл) в атмосфере азота добавляют трифторуксусную кислоту (0,035 мл, 0,45 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Смесь концентрируют при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения (0,04 г, выход 84%). МС m/z 212,0 (M + H).

Получение 11. Синтез 2-метил-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-пиперидил]оксиметил]-1,3,4-оксадиазола



В колбу добавляют трет-бутил-(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)метокси]пиперидин-1-карбоксилат (52,9 г, 170 ммоль) и дихлорметан (265 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивают на ледяной бане при внутренней температуре 5 °С и добавляют по каплям трифторуксусную кислоту (265 мл, 3500 ммоль) в течение 5 минут, поддерживая внутреннюю температуру ниже 10 °С. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 15 минут и концентрируют, получая остаток, который разбавляют водой (300 мл) и метил-трет-бутиловым эфиром (300 мл). Слои разделяют, водный слой перемешивают на ледяной бане и подщелачивают 50% водным раствором гидроксида натрия (20 мл), поддерживая внутреннюю температуру ниже 10 °С во время добавления. Смесь экстрагируют дихлорметаном (4 × 300 мл) и объединенные органические экстракты сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют с получением указанного в заголовке соединения (30,5 г, выход 85%). МС m/z 212,2 (M + H).

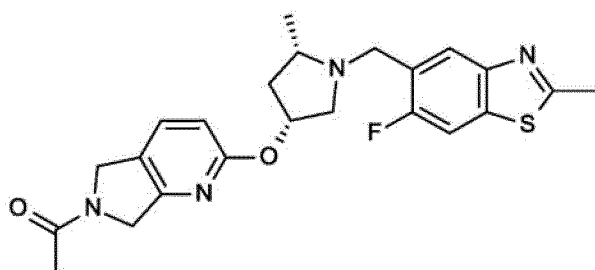
В других вариантах осуществления новых комбинаций и способов настоящего изобретения ингибитор OGA представляет собой соединение формулы XX:



Формула XX

или его фармацевтически приемлемую соль.

5 Дополнительно в настоящем изобретении предложено соединение формулы XXa:

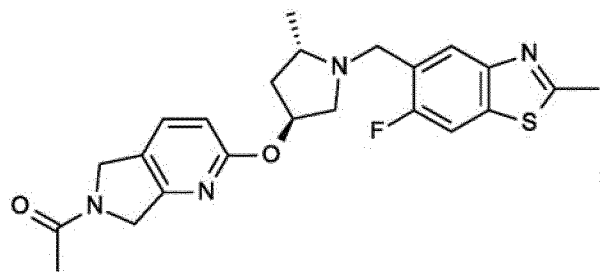


Формула XXa

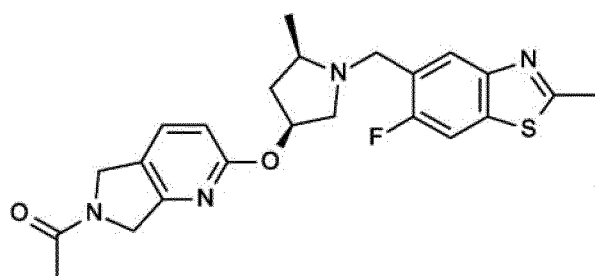
или его фармацевтически приемлемая соль.

Определенные конфигурации формулы X, которые содержат варианты осуществления ингибитора OGA новых комбинаций и способов настоящего изобретения,

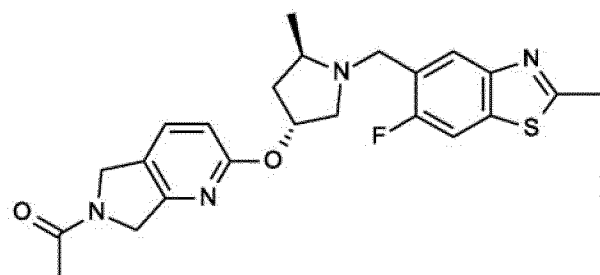
10 дополнительно включают:



Формула XXb



Формула XXc



Формула XXd

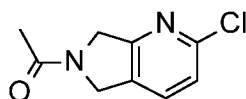
и их фармацевтически приемлемые соли.

5- (Метилпирролидин-3-ил)окси соединение формулы XX, где метильные и кислородные заместители в пирролидиновом кольце находятся в *цис*- или *транс*- конфигурации, или его фармацевтически приемлемая соль включены в объем ингибитора OGA настоящей новой комбинации. Настоящая новая комбинация также предполагает все отдельные энантиомеры и диастереомеры, а также смеси энантиомеров 5- (метилпирролидин-3-ил)окси соединений настоящего изобретения, включая рацематы. Абсолютные конфигурации 5-(метилпирролидин-3-ил)окси соединений новых комбинаций и способов, предложенных в настоящем документе, включают:

1-(2-(((3R,5S)-1-((6-фтор-2-метилбензо[d]тиазол-5-ил)метил)-5-метилпирролидин-3-ил)окси)-5,7-дигидро-6H-пирроло[3,4-b]пиридин-6-ил)этан-1-он и его фармацевтически приемлемые соли, включая свободное основание и включая кристаллическую форму.

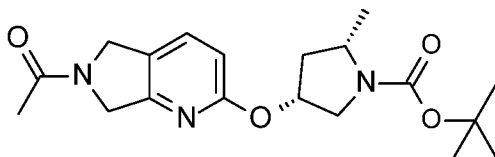
5-(Метилпирролидин-3-ил)окси соединения новых комбинаций и способов настоящего изобретения или их соли можно получать при помощи различных способов, известных рядовым специалистам в данной области, некоторые из которых представлены ниже на схемах, в способах получения и примерах. Рядовому специалисту в данной области понятно, что конкретные этапы синтеза для каждого из описанных способов можно комбинировать различным образом или осуществлять в сочетании с этапами из других схем с получением соединений согласно настоящему изобретению или их солей. Продукты на каждой стадии ниже могут быть выделены с помощью обычных способов, хорошо известных в данной области техники, включая экстракцию, выпаривание, осаждение, хроматографию, фильтрование, растирание и кристаллизацию. На схемах ниже все заместители, если не указано иное, имеют значение, указанное ранее. Реагенты и исходные материалы общедоступны рядовым специалистам в данной области. Без ограничения объема настоящего изобретения следующие схемы, примеры получения и примеры представлены для дополнительной иллюстрации настоящего изобретения. Дополнительно специалисту в данной области понятно, что соединения формул XXa, XXb, XXc, и XXd могут быть получены с использованием исходного материала с соответствующей стереохимической конфигурацией, который может быть получен специалистом в данной области. Например, в приведенных ниже способах получения используют исходные материалы с конфигурацией, по существу соответствующей формуле XXa.

Получение 12. 1-(2-Хлор-5,7-дигидро-6H-пирроло[3,4-b]пиридин-6-ил)этан-1-он



N,N-Диизопропилэтиламин (DIPEA, 3,6 мл, 21 ммоль) и ацетилхлорид (0,4 мл, 6 ммоль) добавляют по каплям к имеющему температуру 0 °С раствору 2-хлор-6,7-дигидро-5Н-пирроло[3,4-*b*]пиридина гидрохлорида (1,0 г, 5,2 ммоль) в дихлорметане (DCM, 13 мл).
 5 Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 24 часов. Полученную смесь разбавляют DCM (20 мл) и промывают насыщенным водным раствором NaHCO₃ (30 мл). Водный слой экстрагируют DCM (2X в 30 мл). Объединенные органические экстракты сушат над MgSO₄, фильтруют и концентрируют при пониженном давлении. Полученный остаток растворяют в DCM, адсорбируют на диатомитовую землю
 10 и очищают посредством флеш-хроматографии на силикагеле, элюируя градиентом 50–100% ацетона в гексанах, с получением указанного в заголовке соединения после выпаривания растворителя желаемых хроматографических фракций (0,95 г, выход 92%). ИЭР/МС *m/z*: 197 (M + H).

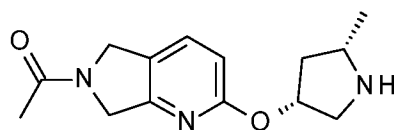
15 **Получение 13. Трет-бутил-(2*S*,4*R*)-4-((6-ацетил-6,7-дигидро-5Н-пирроло[3,4-*b*]пиридин-2-ил)окси)-2-метилпирролидин-1-карбоксилат**



К раствору трет-бутил(2*S*,4*R*)-4-гидрокси-2-метилпирролидин-1-карбоксилата (0,41 г, 2,03 ммоль) добавляют 1-(2-хлор-5,7-дигидро-6Н-пирроло[3,4-*b*]пиридин-6-ил)этан-1-он (0,47 г, 2,36 ммоль) и тетрагидрофуран (ТГФ, 8 мл) при комнатной температуре (комн. темп.) порциями добавляют трет-бутоксид калия (КО-*t*-Bu, 0,45 г, 4 ммоль) и смесь перемешивают при 50 °С в течение 4,5 часа. Реакционную смесь разбавляют водой (50 мл) и этилацетатом (EtOAc, 50 мл). Водный слой экстрагируют EtOAc (2X в 50 мл) и объединенные органические экстракты сушат над MgSO₄, фильтруют
 25 и концентрируют при пониженном давлении. Полученный остаток растворяют в DCM и очищают посредством флеш-хроматографии на силикагеле, элюируя градиентом 40–100% ацетона в гексанах, с получением указанного в заголовке соединения после выпаривания растворителя желаемых хроматографических фракций (0,34 г, выход 47%). ИЭР/МС *m/z*: 262 (M + H-C₄H₉).

30

Получение 14. 1-(2-(((3R,5S)-5-Метилпирролидин-3-ил)окси)-5,7-дигидро-6Н-пирроло[3,4-b]пиридин-6-ил)этан-1-она гидрохлорид

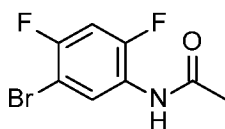


HCl

К раствору трет-бутил-(2S,4R)-4-((6-ацетил-6,7-дигидро-5Н-пирроло[3,4-
5 b]пиридин-2-ил)окси)-2-метилпирролидин-1-карбоксилата (0,34 г, 0,94 ммоль) в DCM (5,0 мл) добавляют 4 М раствор HCl в 1,4-диоксане (1,2 мл, 4,8 ммоль). Полученную смесь перемешивают при КТ в течение 3 часов. Полученную суспензию концентрируют при пониженном давлении и полученный остаток помещают под вакуум на 1 час с получением указанного в заголовке соединения (0,28 г, выход > 99%). ИЭР/МС m/z: 262 (M + H).

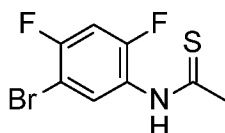
10

Получение 15. N-(5-Бром-2,4-дифторфенил)ацетамид



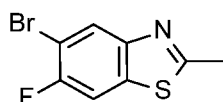
В колбу добавляют уксусный ангидрид (Ac₂O, 389 мл) при перемешивании в термостате при приблизительно 61 °С (внутренняя температура 60 °С). В колбу добавляют
15 5-бром-2,4-дифторанилин (77,7 г, 374 ммоль) порциями в течение 30 минут, поддерживая внутреннюю температуру ниже 65 °С во время добавления. Реакционную смесь перемешивают в термостате при приблизительно 61 °С в течение 10 минут и охлаждают до комн. темп., получая остаток, который концентрируют из толуола (4 × 200 мл) с получением бледно-коричневого/розового твердого вещества. Концентрированное твердое
20 вещество суспендируют в гептане (80 мл) и смесь перемешивают на ротационном испарителе на водяной бане с температурой 50 °С в течение 15 минут при атмосферном давлении, охлаждают до комн. темп. и фильтруют. Отфильтрованное твердое вещество собирают и сушат в вакууме при 40 °С в течение 2 часов с получением указанного в заголовке соединения (89,6 г, выход 95%) в виде твердого вещества почти белого цвета.
25 ИЭР/МС m/z: 250 (M + H).

Получение 16. N-(5-Бром-2,4-дифторфенил)тиоацетамид



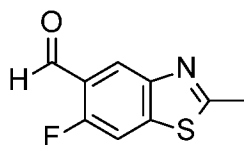
К раствору N-(5-бром-2,4-дифторфенил)ацетамида (89,6 г, 358 ммоль) в безводном ацетонитриле (ACN, 896 мл) добавляют пиридин-1-ий-1-ил-[пиридин -1-ий-1-ил(сульфидо)фосфиноил]сульфанил-сульфид-тиоксо-фосфан (68,2 г, 179 ммоль, *J. Org. Chem.* 76, 1546–1553(2011)) при комн. темп. Суспензию перемешивают в термостате при 85 °С в течение ночи (внутренняя температура 80 °С), охлаждают до комн. темп. и выливают в смесь льда (200 г) и насыщенного водного раствора NaCl (700 мл). Смесь разбавляют EtOAc (900 мл), перемешивают при комн. темп. в течение 10 минут, слои разделяют и водный слой дополнительно экстрагируют EtOAc (900 мл). Объединенные органические экстракты промывают насыщенным водным раствором NaCl (900 мл), сушат над Na₂SO₄ и концентрируют при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения в виде темно-коричневого масла, которое растворяют в DMF (953 мл) при комн. темп. и используют без дополнительной очистки.

Получение 17. 5-Бром-6-фтор-2-метил-1,3-бензотиазол



К раствору N-(5-бром-2,4-дифторфенил)тиоацетамида в DMF добавляют трет-бутоксид натрия (NaO-*t*-Bu, 42,6 г, 430 ммоль) порциями в течение 20 минут при перемешивании, поддерживая внутреннюю температуру ниже 30 °С. Реакционную смесь перемешивают при комн. темп. в течение 5 минут, перемешивают в течение ночи в термостате при 42 °С (внутренняя температура 40 °С) и охлаждают до комн. темп. Реакционную смесь по каплям добавляют к смеси льда (250 г) и H₂O (700 мл) в течение 5 минут, поддерживая внутреннюю температуру ниже 20 °С. Смесь перемешивают при комн. темп. в течение 10 минут и фильтруют. Отфильтрованное твердое вещество сушат в вакууме при 40 °С в течение ночи и суспендируют в 50% MeOH/H₂O (480 мл). Смесь перемешивают в термостате при 45 °С в течение 15 минут, охлаждают до комн. темп. и фильтруют. Отфильтрованное твердое вещество сушат в вакууме при 40 °С в течение 72 часов с получением бледно-коричневого твердого вещества. Материал объединяют с EtOAc (700 мл) и смесь перемешивают при комн. темп. в течение 10 минут, добавляют H₂O (700 мл) и слои разделяют. Водный слой экстрагируют EtOAc (700 мл), затем объединенные органические экстракты промывают насыщенным водным раствором NaCl (700 мл), сушат над MgSO₄ и концентрируют при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения (62,7 г, выход 71%). в виде коричневого твердого вещества. ¹H ЯМР (d₆-DMSO) δ: 2,82 (с, 3H), 7,57 (м, 1H), 8,12 (м, 1H).

Получение 18. 6-Фтор-2-метил-1,3-бензотиазол-5-карбальдегид



5-Бром-6-фтор-2-метил-1,3-бензотиазол (100,9 г, 410 ммоль) в DMF (1009 мл) барботируют N₂ в течение 5 минут при комн. темп. при перемешивании. Формиат калия (52,3 г, 615,0 ммоль), ацетат палладия(II) (2,82 г, 12,30 ммоль), 2-(ди-трет-бутилфосфино)бифенил (5,19 г, 17,2 ммоль) и 1,1,3,3-тетраметилбутил добавляют

изоцианид (90,8 мл, 492,0 ммоль) и смесь барботируют N₂ в течение 30 минут при комн. темп. при перемешивании. Реакционную смесь перемешивают в течение ночи при

10 внутренней температуре 65 °С, охлаждают до 20–25 °С и добавляют по каплям 2 М водный раствор HCl (820 мл) в течение 30 минут, поддерживая внутреннюю температуру ниже 30 °С. Полученную смесь перемешивают при 20–25 °С в течение 2 часов и разбавляют EtOAc (1,5 л) и H₂O (1 л). Слои разделяют и органический слой промывают 10% водным раствором N-ацетилцистеина (2 × 1 л), насыщенным водным раствором Na₂CO₃ (750 мл ×

15 2) и насыщенным водным раствором NaCl (750 мл); органический экстракт сушат над MgSO₄ и концентрируют при пониженном давлении с получением первой партии неочищенного материала. Водный слой HCl после первой экстракции дополнительно экстрагируют EtOAc (1 л, затем 500 мл) и объединенные органические экстракты промывают насыщенным водным раствором NaCl (500 мл), сушат над MgSO₄ и

20 концентрируют при пониженном давлении с получением второй партии неочищенного материала. Объединенные водные слои N-ацетилцистеина затем экстрагируют EtOAc (1 л, затем 500 мл) и объединенные органические экстракты промывают последовательно насыщенным водным раствором Na₂CO₃ (500 мл) и насыщенным водным раствором NaCl (500 мл); объединенные органические экстракты сушат над MgSO₄ и концентрируют при

25 пониженном давлении с получением третьей партии сырого материала. Три партии неочищенного материала объединяют в метил-трет-бутиловом эфире (МТБЕ, 250 мл) и гептане (250 мл) и полученную суспензию перемешивают при комн. темп. в течение 20 минут. Полученный осадок фильтруют и промывают гептаном (250 мл). Отфильтрованное твердое вещество сушат в вакууме при 45 °С с получением первой серии продукта.

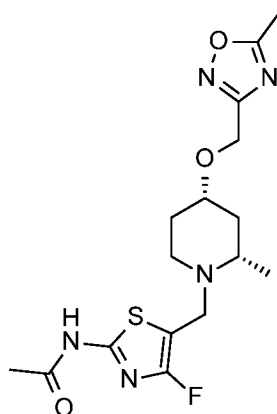
30 Фильтрат концентрируют и остаток очищают посредством колоночной хроматографии на диоксиде кремния, элюируя градиентом 0–100% EtOAc/гептан. Фракции, содержащие продукт, объединяют и концентрируют до объема примерно 400 мл, полученную суспензию перемешивают при комн. темп. в течение 15 минут, фильтруют и

отфильтрованное твердое вещество промывают гептаном (200 мл) с получением второй серии продукта. Первую и вторую серии продукта объединяют с гептаном (500 мл), суспендируют при комн. темп., фильтруют и отфильтрованное твердое вещество промывают гептаном (250 мл). Отфильтрованное твердое вещество сушат в вакууме при 45 °С в течение ночи для получения указанного в заголовке соединения (63,5 г, выход 79%). ИЭР/МС m/z: 196 (M + H).

Следует понимать, что отдельные изомеры, энантиомеры и диастереомеры соединений ингибиторов OGA, представленных в настоящем документе в качестве части новых комбинаций и способов настоящего изобретения, могут быть выделены или отделены специалистом в данной области в любой удобной точке синтеза соединений по данному изобретению с применением таких методов, как технология селективной кристаллизации или хиральная хроматография (см., например, J. Jacques, et al., *Enantiomers, Racemates, and Resolutions*, John Wiley and Sons, Inc., 1981, и E.L. Eliel and S.H. Wilen, «*Stereochemistry of Organic Compounds*,» Wiley-Interscience, 1994).

Фармацевтически приемлемая соль соединений ингибиторов OGA по изобретению, образуется, например, с помощью реакции между подходящим свободным основанием соединения по изобретению и подходящей фармацевтически приемлемой кислотой, в подходящем растворителе, при стандартных условиях, известных в данной области. Образование таких солей хорошо известно и изучено в данной области. См., например, Gould, P.L., «Salt selection for basic drugs,» *International Journal of Pharmaceutics*, 33: 201-217 (1986); Bastin, R.J., et al. «Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities,» *Organic Process Research and Development*, 4: 427-435 (2000); и Berge, S.M., et al., «Pharmaceutical Salts,» *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66: 1-19, (1977).

Пример 1. Синтез ингибитора OGA N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил] ацетамида (формула Ia)



Это соединение и его синтез описаны в патенте США № US 10,081,625, который

полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

N-(4-фтор-5-формилтиазол-2-ил)ацетамид (28,3 г, 150 ммоль) при комнатной температуре добавляют в гидрохлорид 5-метил-3-[[[(2S,4S)-2-метил-4-пиперидил]оксиметил]-1,2,4-оксадиазола (48,7 г, 185 ммоль, чистота 94%) в этилацетате (707 мл). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре и по каплям в течение более 1 минуты добавляют N, N-диизопропилэтиламин (34,1 мл, 195 ммоль) и одной порцией добавляют триацетоксиборгидрид натрия (98,5 г, 451 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в термостате на 31 °С в течение ночи с внутренней температурой 30 °С и охлаждают на ледяной бане до внутренней температуры 5 °С. В смесь добавляют 2 М водный раствор соляной кислоты (226 мл) в течение 15 минут, поддерживая внутреннюю температуру ниже 10 °С. В смесь добавляют воду (250 мл), и смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 5 минут. Слои разделяют и органический слой экстрагируют смесью 2 М водного раствора соляной кислоты (28 мл) в воде (50 мл). Первый водный слой перемешивают на ледяной бане, и, в течение 10 минут, по каплям добавляют 50%-й водный раствор гидроксида натрия (25,7 мл), поддерживая внутреннюю температуру ниже 10 °С. Смесь разбавляют насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (100 мл), перемешивают при комнатной температуре в течение 10 минут и экстрагируют этилацетатом (3 × 400 мл). Объединенные органические экстракты сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют для получения остатка. Второй водный слой после экстракции водной соляной кислотой разбавляют 2-метилтетрагидрофураном (200 мл) и смесь пропускают через тонкий слой диатомовой земли. Фильтрат переносят в делительную воронку, и слои разделяются. Водный слой перемешивают на ледяной бане, и, в течение 5 минут, по каплям добавляют 50%-й водный раствор гидроксида натрия (3,15 мл), поддерживая внутреннюю температуру ниже 10 °С. Смесь разбавляют насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (10 мл), перемешивают при комнатной температуре в течение 5 минут и последовательно экстрагируют этилацетатом (3 × 40 мл) и 10% изопропанолом в этилацетате (100 мл). Объединенные органические экстракты сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют для получения остатка, который объединяют с остатком после первой части обработки. Объединенный остаток пропускают через слой силикагеля (350 г), элюируя этилацетатом (3,5 л), и фильтрат концентрируют для получения остатка (45,8 г). Остаток (47,5 г объединенных партий, 123,9 ммоль) очищают посредством флеш-хроматографии на силикагеле, элюируя 50–100% этилацетатом в гептане. Фракции, содержащие продукт, концентрируют до остатка, который суспендируют в смеси 1 : 1 метил-трет-бутилового эфира и гептана (448 мл). Смесь перемешивают в термостате на 46 °С в течение 30 минут при внутренней

температуре 45 °С и охлаждают до комнатной температуры в течение 2 часов при перемешивании. Смесь фильтруют, промывая собранное твердое вещество смесью 1 : 1 метил-трет-бутилового эфира и гептана (30 мл). Отфильтрованное твердое вещество сушат в вакууме при 40 °С в течение ночи для получения указанного в заголовке соединения (28,5 г, выход 49%). МС m/z 384,0 (M + H). Оптическое вращение: $[\alpha]_D^{20} = +33,4^\circ$ (c = 0,26, метанол).

Альтернативный способ синтеза N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамида

10 В раствор N-(4-фтор-5-формилтиазол-2-ил)ацетамида (50 мг, 0,28 ммоль) и 5-метил-3-[[[(2S,4S)-2-метил-4-пиперидил]оксиметил]-1,2,4-оксадиазола (40 мг, 0,19 ммоль) в дихлорметане (10 мл) в атмосфере азота добавляют N,N-диизопропилэтиламин (0,1 мл, 0,57 ммоль) и триацетоксиборгидрид натрия (120 мг, 0,57 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 12 часов. Реакционную смесь
15 выливают в насыщенный водный раствор бикарбоната натрия (10 мл). Слои разделяют и водную фазу экстрагируют дихлорметаном (2 × 10 мл). Смесь органических экстрактов сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют при пониженном давлении для получения маслянистой жидкости оранжевого цвета. Остаток растворяют в метаноле (до общего объема 9,8 мл), фильтруют и очищают с помощью препаративной
20 ВЭЖХ (Phenomenex Gemini-NX 10 мкм 50 × 150 мм C-18), элюируя с градиентом 15% (CH₃CN и вода с 10 mM бикарбоната аммония, доведенные до pH 9 гидроксидом аммония), до 100% CH₃CN в течение 10 минут (110 мл/мин, 1 впрыскивание, 271/204 нм) с получением указанного в заголовке соединения (20 мг, выход 28%). МС m/z 384,2 (M + H).

25 *Пример 1А. Кристаллический N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамид*

Неочищенный N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамид (29,9 г) в течение 30 минут
30 диспергируют в 448 мл 50%-го метил-трет-бутилового эфира в гептане при 46 °С. Смесь перемешивают и охлаждают до 19 °С в течение двух часов, после чего фильтруют, а затем промывают 30 мл 50%-го метил-трет-бутилового эфира в гептане для получения указанного в заголовке соединения (28,5 г, выход 95%).

35 *Рентгеновская порошковая дифрактометрия (XRPD) примера 1А*

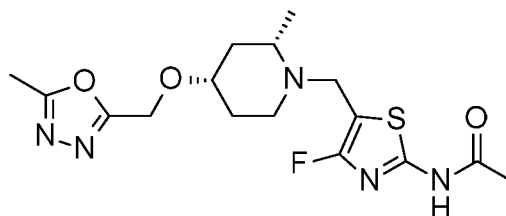
Рентгенограммы кристаллических твердых веществ получены на порошковом рентгеновском дифрактометре Bruker D4 Endeavour, оснащенный источником CuK α ($\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$) и детектором Vantec, работающем при 35 кВ и 50 мА. Образец сканировали при 2θ от 4 до 40° , с размером шага $2\theta 0,0087^\circ$, со скоростью сканирования 0,5 секунд/шаг, с щелью 0,6 мм, с неподвижной отсеивающей решеткой 5,28 мм и щелью детектора 9,5 мм. Сухой порошок помещают на кварцевый держатель образца и обеспечивают гладкую поверхность с помощью предметного стекла. В области кристаллографии хорошо известно, что для любой данной кристаллической формы относительные интенсивности пиков дифракции могут варьироваться вследствие предпочтительной ориентации, обусловленной такими факторами, как морфология и габитус кристалла. При наличии эффектов предпочтительной ориентации интенсивности пиков являются переменными, но положения характеристических пиков полиморфа не меняются. (См., например The U. S. Pharmacopeia 38 - National Formulary 35 Chapter 941 Characterization of crystalline and partially crystalline solids by X-ray powder diffraction (XRPD) Official May 1, 2015). Кроме того, в области кристаллографии хорошо известно, что для любой данной кристаллической формы угловые положения пиков могут незначительно изменяться. Например, положения пиков могут смещаться из-за изменения температуры или влажности, при которой анализируют образец, смещения образца или наличия или отсутствия внутреннего стандарта. В данном случае изменчивость положения пика в $\pm 0,2 2\theta$ будет учитывать эти потенциальные изменения, не мешая однозначной идентификации указанной кристаллической формы. Подтверждение кристаллической формы может быть сделано на основе любой уникальной комбинации отличительных пиков (в единицах $^\circ 2\theta$), как правило более выраженных пиков. Дифрактограммы кристаллической формы, записанные при температуре и относительной влажности окружающей среды, откорректированы по стандартным пикам NIST 675 при 8,85 и 26,77 градусах 2-тета.

Приготовленный образец кристаллического N-[4-фтор-5-[[2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамида характеризуется рентгеновской дифрактограммой при использовании излучения CuK α , имеющей дифракционные пики (значения 2-тета), описанные в таблице 1 ниже. В частности, дифрактограмма имеет пик при $12,1^\circ$ в сочетании с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из $15,3^\circ$, $21,6^\circ$, $22,2^\circ$, $22,7^\circ$, $23,5^\circ$, $24,3^\circ$ и $26,8^\circ$, с допуском на углы дифракции 0,2 градуса.

Таблица 1. Пики на рентгеновской порошковой дифрактограмме кристаллического N-[4-фтор-5-[[2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамида, пример 1А

Пик	Угол (2-тета °) +/-0,2°	Относительная интенсивность (% от самого интенсивного пика)
1	7,7	9
2	10,1	9
3	12,1	100
4	15,3	50
5	18,3	11
6	19,3	13
7	21,6	16
8	22,2	16
9	22,7	16
10	23,5	30
11	24,3	35
12	26,8	27

Пример 2. Синтез ингибитора OGA N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил] ацетамида (формула Ха)



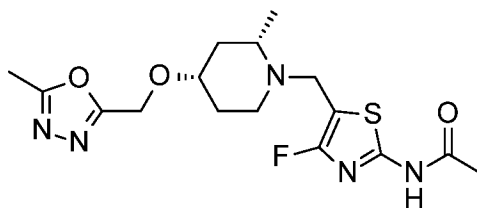
5

Это соединение и его синтез описаны в патенте США № US 10,081,625, который полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

К раствору 2-метил-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-пиперидил]оксиметил]-1,3,4-оксадиазол 2,2,2-трифторуксусной кислоты (160 мг, 0,7 ммоль) в этилацетате (1 мл) в атмосфере азота добавляют N,N-диизопропилэтиламин (210 мкл, 0,12 ммоль) и раствор перемешивают в течение 5 минут. Добавляют N-(4-фтор-5-формилтиазол-2-ил)ацетамид (40 мг, 0,12 ммоль) и перемешивают в течение 5 минут, добавляют триацетоксиборгидрид натрия (55 мг, 0,25 ммоль) и нагревают реакционную смесь до 40 °С и перемешивают в течение ночи. Смесь концентрируют при пониженном давлении для получения коричневого твердого вещества. Остаток растворяют в диметилсульфоксиде (до общего объема 1 мл), фильтруют и очищают посредством препаративной ВЭЖХ (Phenomenex Gemini-NX 10 мкм 30 x 100 мм C-18), элюируя с градиентом 15% (CH₃CN и вода с 10 mM бикарбоната аммония, доведенные до pH 9 гидроксидом аммония), до 100% CH₃CN в течение 12 (100 мл/мин, 1 впрыскивание, 271/204 нм) с получением указанного в заголовке соединения (7 мг, выход 14%). MS m/z 384,2 (M + H).

20

Альтернативный способ синтеза кристаллического N-[4-фтор-5-[[[(2S, 4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамида



Триацетоксиборгидрид натрия (59,1 г, 279 ммоль) добавляют к смеси 2-метил-5-
 5 [[(2S, 4S)-2-метил-4-пиперидил]оксиметил]-1,3,4-оксадиазола (23,3 г, 93,0 ммоль),
 этилацетата (438 мл) и N,N-диизопропилэтиламина (32,4 мл, 186 ммоль) при комнатной
 температуре. Реакционную смесь перемешивают в термостате при 31 °С в течение 15 минут
 при внутренней температуре 30 °С, затем N-(4-фтор-5-формилтиазол-2-ил)ацетамид (17,5 г,
 93,0 ммоль) добавляют порциями в течение 5 минут. Реакционную смесь перемешивают в
 10 термостате на 31 °С в течение ночи с внутренней температурой 30 °С и охлаждают на
 ледяной бане до внутренней температуры 5 °С. В смесь добавляют 2 М водный раствор
 соляной кислоты (140 мл) в течение 15 минут, поддерживая внутреннюю температуру ниже
 10 °С. Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 15 минут, разбавляют
 водой (50 мл) и этилацетатом (20 мл) и разделяют слои. Органический слой экстрагируют
 15 смесью 2 М водного раствора соляной кислоты (35 мл) в воде (100 мл). Объединенные
 водные слои перемешивают на ледяной бане и в течение 10 минут по каплям добавляют
 50% водный раствор гидроксида натрия (19,5 мл), поддерживая внутреннюю температуру
 ниже 10 °С. Смесь разбавляют насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (50 мл)
 и экстрагируют 2-метилтетрагидрофураном (3 × 200 мл). Объединенные органические
 20 экстракты сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют с получением
 остатка, который очищают посредством флеш-хроматографии на силикагеле, элюируя 0–
 15% 2-пропанола в дихлорметане. Фракции, содержащие продукт, концентрируют с
 получением остатка, который концентрируют из гептана (100 мл). Концентрированный
 материал смешивают с 40% этилацетатом в гептане (457 мл) и смесь перемешивают в
 25 термостате при 50 °С в течение 1 часа, охлаждают до комнатной температуры и фильтруют.
 Отфильтрованное твердое вещество сушат в вакууме при 40 °С в течение 1 часа для
 получения первой порции продукта (22,9 г). Фильтрат концентрируют с получением
 остатка, который смешивают с 40% этилацетатом в гептане (50 мл), и смесь перемешивают
 в термостате при 50 °С в течение 30 минут, охлаждают до комнатной температуры и
 30 фильтруют. Отфильтрованное твердое вещество объединяют с 50% этилацетатом в гептане
 (33 мл) и смесь перемешивают в термостате при 50 °С в течение 1 часа, охлаждают до

комнатной температуры и фильтруют. Отфильтрованное твердое вещество сушат в вакууме при 40 °С в течение 1 часа для получения второй порции продукта (2,50 г).

Комбинацию партий, включающую первую и вторую порции продукта (29,3 г), объединяют с этилацетатом (117 мл) и гептаном (117 мл) при комнатной температуре.

- 5 Смесь перемешивают в термостате при 51 °С в течение 30 минут при внутренней температуре 50 °С, затем охлаждают до комнатной температуры и фильтруют. Отфильтрованное твердое вещество сушат в течение ночи при 40 °С в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (26,7 г, выход 75%) в виде кристаллического твердого вещества. МС m/z 384,0 (M + H). Оптическое вращение:
- 10 $[\alpha]_D^{20} = +39^\circ$ (c = 0,2, метанол).

Рентгеновская порошковая дифрактограмма (XRPD) кристаллического N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамида

15

- Кристаллический N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамид (218 мг) растворяют в 1,25 мл метанола при 60 °С в течение 5 минут. Раствор охлаждают до комнатной температуры при перемешивании в течение 20 минут. Полученное твердое вещество выделяют посредством вакуумного фильтрования. Конечный твердый продукт составляет 163 мг или выход 75%.
- 20

- Рентгенограммы кристаллических твердых веществ получены на порошковом рентгеновском дифрактометре Bruker D4 Endeavour, оснащенный источником CuK α ($\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$) и детектором Vantec, работающем при 35 кВ и 50 мА. Образец сканировали при 2θ от 4° до 40°, с шагом 0,0087° 2θ и скоростью сканирования 0,5 с/шаг и с дивергенцией 0,6 мм, фиксированной противорассеивающей щелью 5,28 мм и щелью детектора 9,5 мм. Сухой порошок помещают на кварцевый держатель образца и обеспечивают гладкую поверхность с помощью предметного стекла. В области кристаллографии хорошо известно, что для любой данной кристаллической формы относительные интенсивности пиков дифракции могут варьироваться вследствие предпочтительной ориентации, обусловленной такими факторами, как морфология и габитус кристалла. При наличии эффектов предпочтительной ориентации интенсивности пиков являются переменными, но положения характеристических пиков полиморфа не меняются. См., например, The U. S. Pharmacopeia 38 - National Formulary 35 Chapter <941> Characterization of crystalline and partially crystalline solids by X-ray powder diffraction (XRPD) Official May 1, 2015. Кроме того,
- 25
- 30
- 35 в области кристаллографии хорошо известно, что для любой данной кристаллической

формы угловые положения пиков могут незначительно изменяться. Например, положения пиков могут смещаться из-за изменения температуры или влажности, при которой анализируют образец, смещения образца или наличия или отсутствия внутреннего стандарта. В данном случае изменчивость положения пика в $\pm 0,2 \ 2\theta$ будет учитывать эти потенциальные изменения, не мешая однозначной идентификации указанной кристаллической формы. Подтверждение кристаллической формы может быть сделано на основе любой уникальной комбинации отличительных пиков (в единицах $^\circ 2\theta$), как правило более выраженных пиков. Диаграммы дифракции кристаллической формы, записанные при температуре и относительной влажности окружающей среды, корректировали по стандартным пикам NIST 675 при 8,85 и 26,77 градусах 2θ .

Таким образом, кристаллический N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамид характеризуется XRPD-дифрактограммой при использовании излучения CuK α , имеющей дифракционные пики (значения 2 -тета), описанные в таблице 2. Более конкретно, дифрактограмма предпочтительно имеет пик при $13,5^\circ$ в сочетании с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из $5,8^\circ$, $13,0^\circ$, $14,3^\circ$, $17,5^\circ$, $20,4^\circ$, $21,4^\circ$, и $22,2^\circ$, с допуском на углы дифракции $0,2$ градуса.

Таблица 2. Пики на рентгеновской порошковой дифрактограмме кристаллического N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамида

Пик	Угол (2 -тета $^\circ$)	Интенсивность (%)
1	5,8	78
2	9,2	18
3	11,7	24
4	13,0	34
5	13,5	100
6	14,3	39
7	17,5	50
8	18,3	30
9	19,7	11
10	20,1	14
11	20,4	43
12	20,7	17

Пик	Угол (2-тета °)	Интенсивность (%)
13	21,4	37
14	22,0	17
15	22,2	39
16	23,1	12
17	23,8	16
18	23,9	25
19	24,9	19
20	25,2	30
21	28,7	10
22	37,0	11

Анализ фермента OGA in vitro

Генерирование белков OGA

5 Нуклеотидную последовательность, кодирующую полноразмерную человеческую *O-GlcNAc-β-N-ацетилглюкозаминидазу* (NM_012215), встраивают в вектор pFastBac1 (Invitrogen) с помощью N-концевой полигистидиновой (HIS) метки. Генерирование бакуловируса осуществляется в соответствии с протоколом Bac-to-Bac системы экспрессии бакуловируса (Invitrogen). Клетки Sf9 инфицировали при $1,5 \times 10^6$ клеток/мл с
10 использованием 10 мл вируса *PI* на литр культуры и инкубировали при 28 °C в течение 48 часов. Клетки центрифугируют, промывают ФБС и пеллеты хранят при -80 °C.

Описанный выше белок OGA (His-OGA) очищают следующим образом: 4 л клеток лизируют в течение 45 мин при 4 °C в 200 мл буфера, содержащего 50 mM Tris, pH 8,0, 300 mM NaCl, 10% глицерина, 10 mM имидазола, 1 mM дитиотреитола (ДТТ), 0,1% Triton™
15 X-100, 4 таблетки ингибиторов протеазы (полностью свободные от ЭДТК, Roche). Затем данный клеточный лизат центрифугируют в течение 40 минут при 16 500 оборотах в минуту при 4 °C и надосадочную жидкость инкубируют с 6 мл Ni-НТУ смолы (никель-нитрилтриуксусной кислоты) в течение 2 часов при 4 °C.

20 Затем смолу помещают в колонну и промывают 50 mM Tris, pH 8,0, 300 mM NaCl, 10% глицерина, 10 mM имидазола, 0,1% Triton™ X-100, 1 mM ДТТ, а затем 50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 10 mM имидазола, 10% глицерина, 1 mM ДТТ. Белки элюируют с помощью 50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 300 mM имидазола, 10% глицерина, 1 mM ДТТ. Смесь фракций, содержащих His-OGA, концентрируют до 6 мл и загружают в Superdex75

(16/60). Белок элюируют с помощью 50 мМ Tris, рН 8,0, 150 мМ NaCl, 10% глицерина, 2 мМ ДТТ. Фракции, содержащие His-OGA, объединяют и концентрацию белка измеряют с помощью КАБ (колориметрический анализ Брэдфорда).

5 Анализ фермента OGA

Фермент OGA катализирует удаление *O-GlcNAc* из нуклеоцитоплазматических белков. Для измерения этой активности флуоресцеиновый ди-N-ацетил- β -N-ацетил-D-глюкозаминид (*FD-GlcNAc*, Kim, et al., *Carbohydrate Research* (2006), 341(8), 971-982) применяют в качестве субстрата с конечной концентрацией 10 мкМ (в формате 96-луночного анализа) или 6,7 мкМ (в формате 384-луночного анализа). Этот флуорогенный субстрат становится флуоресцентным при расщеплении с помощью OGA, так что активность фермента можно измерить по увеличению флуоресценции, обнаруженной при 535 нм (возбуждение при 485 нм).

Буфер для анализа готовят до конечной концентрации 50 мМ $\text{H}_2\text{NaPO}_3\text{-HNa}_2\text{PO}_3$, 0,01% бычьего сывороточного альбумина и 0,01% Triton™ X-100 в воде при рН 7. Конечная концентрация фермента составляет 3 нМ (в формате 96-луночного анализа) или 3,24 нМ (в формате 384-луночного анализа). Оба формата анализа дают практически эквивалентные результаты.

Испытуемые соединения разводят в чистом диметилсульфоксиде (ДМСО), используя концентрационные кривые из десяти точек. Максимальная концентрация соединения в реакционной смеси составляет 30 мкМ. Соединения с подходящей концентрацией предварительно инкубируют с ферментом OGA в течение 30 минут, после чего реакцию инициируют посредством добавления субстрата. Реакцию оставляют протекать в течение 60 минут при комнатной температуре. Затем, не останавливая реакцию, считывают флуоресценцию. Значения IC_{50} рассчитывают путем построения графика нормализованных данных в зависимости от логарифма соединения и аппроксимации данных с использованием логистического уравнения с четырьмя параметрами.

Соединение по примеру 1 испытывали по существу так же, как описано выше, и оно имеет IC_{50} 1,97 нМ \pm 1,22 (n = 9). Эти данные демонстрируют, что соединение по примеру 1 ингибирует активность фермента OGA *in vitro*.

Соединение по примеру 2 также испытывали по существу так же, как описано выше, и оно имеет IC_{50} 2,13 нМ \pm 0,89 (n = 5). Этот результат демонстрирует, что соединение по примеру 2 ингибирует активность фермента OGA *in vitro*.

35 Цельноклеточный анализ для измерения ингибирования активности фермента OGA

Выращивание клеток

Используя стандартные условия, известные в данной области, клетки TRex-293, модифицированные для индуцибельной экспрессии формы P301S-1N4R белка тау, ассоциированного с микротрубочками, генерируют и поддерживают в ростовой среде, состоящей из DMEM с высоким содержанием глюкозы (Sigma# D5796), дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки, не содержащей тетрациклина (ФБС, Sigma F2442), 20 мМ ГЭПЭС, 5 мкг/мл бластицидина (Life Technologies# A11139-03) и 200 мкг/мл зеоцина (Life Technologies# R250-01). Для экспериментов клетки высевают в питательной среде при 10 000–14 000 клеток на лунку в 384-луночном планшете Corning Biocoat (356663), покрытом поли-D-лизином, и инкубируют 20–24 часа в клеточном инкубаторе при 37 °C / 5% CO₂. Эксперименты выполняются без стимулирования экспрессии тау.

15 *Обработка соединений*

Испытуемые соединения последовательно разводят 1/3 в чистом ДМСО, используя 10-точечные концентрационные кривые, и дополнительно разводят в ростовой среде. Спустя 20–24 часа после посева клетки обрабатывают испытуемым соединением в ростовой среде; максимальная концентрация соединения составляет 15 мкМ (0,15% DMSO). Максимальное ингибирование определяют путем параллельных измерений 15 мкМ Thiamet G, а минимальное ингибирование определяют путем параллельных измерений обработки 0,15% ДМСО. Клетки возвращают в инкубатор при 37 °C / 5% CO₂ на 20–24 часа. Для каждого планшета соединения испытывают в двух экземплярах.

25

Иммуноокрашивание

Спустя 20–24 часа обработки соединением среду удаляют из планшета для анализа, в каждую лунку добавляют 25 мкл 3,7% раствора формальдегида (Sigma # F1635) в DPBS (Sigma #D8537; фосфатно-солевой буферный раствор Дульбекко) и инкубируют в течение 30 минут. Затем клетки один раз промывают DPBS, а затем пермеабилзируют в 0,1% Triton™ X-100 (Sigma# T9284). Спустя 30 минут клетки дважды промывают DPBS, а затем в каждую лунку добавляют блокирующий раствор (1% BSA/DPBS/0,1% Triton™ X-100) и инкубируют в течение 60 минут. Блокирующий раствор удаляют, в клетки добавляют 0,40–0,33 мкг/мл раствора антитела *O-GlcNAc* Protein (клон RL2, Thermo, MA1072) в блокирующем растворе и оставляют отстаиваться на ночь при 2–8 °C. На следующий день клетки дважды промывают DPBS, добавляют в каждую лунку вторичное антитело, антитело козы к IgG мыши Alexa Fluor 488 (Life Technologies # A11001) в концентрации

2 мкг/мл в DPBS и оставляют при комнатной температуре на 90 минут. Вторичное антитело удаляют, клетки дважды промывают DPBS и добавляют в каждую лунку раствор DAPI (Sigma #D9564; 4',6-диамидино-2-фениндола дилактат) и РНКазу (Sigma, R6513) в DPBS в концентрации 1 и 50 мкг/мл соответственно. Планшет герметизируют, инкубируют в течение одного часа и анализируют на Acumen eX3 hci (TTP Labtech). Все описанные выше 5 стадии инкубации и промывания выполняют при комнатной температуре, за исключением первичного антитела.

Анализ и результаты

10 Планшеты анализируют на приборе Acumen eX3 с использованием возбуждающих лазеров на 488 и 405 нм и двух эмиссионных фильтров FL2 (500-530 нм) и FL1 (420-490 нм). Фильтр FL2 представляет собой сигнал, соответствующий антителу к белку O-GlcNAc (клон RL2), а фильтр FL1 представляет собой сигнал, соответствующий ядрам клетки (ДАПИ). Для анализа данных применяется отношение Общий FL2/Общий FL1 (общая 15 флуоресценция каждой лунки без выбора объекта или популяции). Данные нормализованы к максимальному ингибированию, соответствующему обработке 15 мкМ Thiamet G, и минимальному ингибированию, достигаемому с помощью обработки 0,15% ДМСО. Данные аппроксимированы с помощью приложения нелинейной аппроксимации кривых по точкам (логистическое уравнение с 4 параметрами), и значения IC₅₀ рассчитывают и 20 выводят на экран.

Соединение по примеру 1 испытывали по существу так же, как описано выше, и оно имеет IC₅₀ 21,9 нМ ± 7,3 (n = 5). Эти данные демонстрируют, что соединение по примеру 1 ингибирует активность фермента OGA в клеточном анализе.

25 Соединение по примеру 2 также испытывали по существу так же, как описано выше, и оно имеет IC₅₀ 22,6 нМ ± 7,3 (n = 3). Этот результат демонстрирует, что соединение по примеру 2 ингибирует активность фермента OGA в клеточном анализе.

Исследование однократных нарастающих доз у здоровых субъектов для оценки безопасности и фармакокинетики соединения примера 1

30 Одноцентровое слепое для субъектов и исследователей с однократными нарастающими дозами плацебо-контролируемое перекрестное рандомизированное исследование фазы 1 проводили для оценки безопасности, переносимости и фармакокинетики (ФК) соединения примера 1 у здоровых субъектов. Исследование проводили в 2 чередующихся когортах (когорты 1 и 2) в течение вплоть до 3 периодов 35 исследования при 6 уровнях доз. Субъектов случайным образом распределяли по 1 из 3

последовательностей лечения в каждой когорте, при этом каждая последовательность включала 2 дозы соединения примера 1 и 1 дозу плацебо в течение 3 периодов исследования полностью перекрестным образом. План клинического исследования представлен в таблице 3.

5

Таблица 3. План клинического исследования

	Когорта 1	Когорта 2
Период 1	0,15 мг соединения примера 1 или плацебо	---
Период 1	≥ 7 дней отмывки	0,6 мг соединения примера 1 или плацебо
Период 2	2 мг соединения примера 1 или плацебо	≥ 7 дней отмывки
Период 2	≥ 7 дней отмывки	5 мг соединения примера 1 или плацебо
Период 3	10 мг соединения примера 1 или плацебо	≥ 7 дней отмывки
Период 3	---	16 мг соединения примера 1 или плацебо

После ночного голодания в течение по меньшей мере 8 часов пероральные капсулы вводили с примерно 240 мл воды комнатной температуры утром каждого дня дозирования в положении сидя. Дозы от 0,15 мг до 2 мг вводили в виде перорального раствора соединения примера 1 с помощью шприца для перорального дозирования с водой, аналогично дозированию пероральных капсул. В таблицах 4а и 4b представлены схемы лечения.

15 Таблица 4а. Схемы лечения соединением примера 1

Дозировка активного вещества (мг)	от 0,15 до 2	от 5 до 16
Лекарственная форма	Пероральный раствор	Капсула
Дозировка	Экстемпоральное приготовление	Экстемпоральное приготовление
Способ введения	Пероральный	Пероральный
Инструкции по дозировке	Однократная доза	Однократная доза

Таблица 4b. Схемы лечения для плацебо

Дозировка активного вещества (мг)	Не применимо	Не применимо
Лекарственная форма	Пероральный раствор (вещество-носитель)	Капсула (ГПМЦ ¹)
Дозировка	Соответствующее плацебо	Соответствующее плацебо
Способ введения	Пероральный	Пероральный

Инструкции по дозировке	Однократная доза	Однократная доза
-------------------------	------------------	------------------

¹ ГПМЦ = гипромеллоза

Капсулы, содержащие соединение примера 1, получают экстемпорально. Пероральные дозы от 0,15 мг до 2 мг соединения примера 1 получают экстемпорально в виде лекарственного средства в растворе. Для любой конкретной когорты/периода дозирования общее количество вводимых капсул является одинаковым для всех субъектов, независимо от того, назначено ли им плацебо или соединение примера 1. Однако количество капсул может варьироваться между периодами дозирования и когортами. То же самое относится и к экстемпорально приготовленным растворам для перорального дозирования для обеспечения слепоты исследования. Соединение примера 1 поставляют в виде свободного основания без неактивных ингредиентов для экстемпорального приготовления. Соответствующий объем перорального раствора-носителя без соединения примера 1 применяют в качестве плацебо для доз от 0,15 мг до 2 мг.

Образцы венозной крови, приблизительно по 3 мл каждый, собирали для определения концентраций соединения примера 1 в плазме. Концентрации соединения примера 1 анализировали с использованием проверенного метода жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией. Оценки параметров ФК для соединения примера 1 рассчитывали с применением стандартных некомпартментных способов анализа. Концентрации соединения примера 1 в плазме суммировали по введенной дозе соединения примера 1 и приблизительному времени взятия образца крови для оценки ФК. Данные ФК для однократных нарастающих доз соединения примера 1 у здоровых субъектов, полученные с помощью процедуры, по существу как описано выше, представляли в таблице 5 и таблице 6.

Таблица 5. Средние концентрации в плазме для исследования однократных нарастающих доз после перорального введения соединения примера 1 здоровым субъектам

Доза (мг) соединения примера 1	0,15	0,6	2	5	10	16
Время (ч)	Концентрация соединения примера 1 в плазме (нг/мл)					
0,5	0,271	6,15	16,2	14,6	28,8	59,7
1	0,278	6,25	21,8	58,9	122	150
1,5	0,246	5,21	19,5	55,3	127	183
2	0,179	4,84	18,6	50,3	125	187
3	0,161	3,96	15,3	43,1	106	153
4	...	3,6	12,6	36,5	100	127
5	...	3,02	10,5	29,5	81,7	100
6	...	2,35	8,75	24,8	72,3	88

8	...	2,1	7,09	18,4	55,1	63
12	...	1,09	4,24	9,74	32,7	32,2
24	...	0,307	1,34	2,76	11	6,83
48	0,634	2,28	0,828

Таблица 6. Параметры ФК соединения примера 1 после перорального введения здоровым субъектам¹

Доза (мг) ²	0,15 мг	0,6 мг	2 мг	5 мг	10 мг	16 мг
N ³	8	7	6	7	6	5
CL/F ⁴ (л/ч)	NC ¹⁴	13,6 (33)	15,1 (88)	12,6 (39)	8,20 (28)	11,9 (19)
AUC(0–∞) ⁵ (нг*ч/мл)	NC ¹⁴	44,0 (33)	133 (88)	396 (39)	1220 (28)	1340 (19)
C _{макс} ⁶ (нг/мл)	0,318 (52)	6,61 (30)	20,9 (38)	59,1 (18)	134 (17)	199 (25)
V _z /F ⁷ (л)	NC ¹⁴	120 (13)	119 (40)	114 (25)	104 (21)	102 (23)
t _{1/2} ⁸ (ч)	NC ¹⁴	6,08 (4,35– 9,76)	5,48 (3,94– 11,2)	6,23 (3,82– 8,48)	8,82 (6,91– 12,4)	5,92 (4,40– 7,33)
t _{макс} ⁹ (ч)	1,02 (0,50– 1,50)	1,00 (0,50– 1,50)	1,25 (1,00– 2,00)	1,02 (1,00– 3,00)	1,50 (1,00– 2,07)	1,98 (1,00– 2,00)
Ae ₀₋₂₄ ¹⁰ (мг)	0,003 (52%) ¹²	0,048 (53%)	0,155 (57%)	0,436 (57%)	1,3 (30%)	1,14 (36%)
CL _r ¹¹ (л/ч)	NC ¹⁴	1,17 (30)	1,25 (30)	1,18 (32)	1,22 (10)	0,96 (46) ¹³

5

¹ Данные представлены как среднее геометрическое (средний геометрический %CV), если не указано иное

² Количество вводимого соединения примера 1

³ N = количество субъектов

10 ⁴ CL/F = кажущийся клиренс, рассчитанный после перорального введения

⁵ AUC(0–∞) = площадь под кривой зависимости концентрации от времени от нуля до бесконечности

⁶ C_{макс} = максимальная наблюдаемая концентрация лекарственного средства

⁷ V_z/F = кажущийся объем распределения после перорального введения

15 ⁸ t_{1/2} = конечный период полувыведения (среднее геометрическое (мин. - макс.))

⁹ t_{макс} = время максимальной наблюдаемой концентрации лекарственного средства; медиана (мин. - макс.)

¹⁰ Ae₀₋₂₄ = количество соединения примера 1, выведенное с мочой в течение 24 часов после введения дозы

20 ¹¹ CL_r = почечный клиренс

¹² N = 5

¹³ N = 3

¹⁴ NC = не рассчитано

Данные показывают, что $AUC(0-\infty)$ и C_{\max} увеличивались примерно пропорционально дозе в диапазоне доз от 0,6 мг до 16 мг для соединения примера 1. Медиана t_{\max} составляет примерно 1 час, а $t_{1/2}$ составляет примерно 6 часов для соединения примера 1.

5

Оценка занятости фермента O-GlcNAcase в головном мозге после однократной пероральной дозы соединения примера 1, измеренной путем позитронно-эмиссионной томографии с радиолигандом [^{18}F]LSN3316612, у здоровых субъектов

10

Одноцентровое, открытое, нерандомизированное исследование путем позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), демонстрирующее проникновение в головной мозг и связывание с O-GlcNAcase (OGA) в головном мозге после однократной пероральной дозы 0,25 мг, 1 мг и 5 мг N-[4-фтор-5-[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамида (соединение формулы I), проводилось специалистом в данной области техники, по существу как указано ниже. [^{18}F]LSN3316612 представляет собой позитронно-активный радиофармацевтический препарат для визуализации OGA *in vivo* в головном мозге, и его применяют для оценки связывания с соединениями, которые ингибируют OGA. Получение и применение ^{18}F -LSN3316612 в качестве радиолиганда для ПЭТ известно в данной области, например, как описано в S. Lu, et. al, *Science Translational Medicine*, 12, (2020). В указанном исследовании ПЭТ с однократной дозой с применением индикатора [^{18}F]LSN3316612 оценивали занятость фермента (ЕО) OGA в головном мозге в подходящем диапазоне доз, которые, как было продемонстрировано, являлись безопасными и хорошо переносимыми.

15

20

25

30

35

Здоровых субъектов распределяли в 1 из 4 когорт, по 4 субъекта в каждой когорте, предназначенных для исследования. Все субъекты проходили одно исходное ПЭТ-сканирование и два ПЭТ-сканирования после введения дозы. Исходное ПЭТ-сканирование проводили приблизительно за 14 дней до введения дозы соединения примера 1. В целом каждый субъект получает однократную дозу соединения примера 1 и 3 введения ПЭТ-индикатора [^{18}F]LSN3316612. Дозирование соединения примера 1 проводили после завершения исходного ПЭТ-сканирования. Сканирование проводили примерно через 2 и 24 часа после введения дозы для доз 0,25 мг и 5 мг соединения примера 1 и примерно через 2 и 24 часа или 30 и 54 часа после введения дозы для дозы 1 мг соединения примера 1. Данные динамической ПЭТ головного мозга получали в течение 120 мин сразу после инъекции индикатора. ЕО суммировали по дозе соединения примера 1 и примерному времени сканирования.

Соединение примера 1 вводили перорально в виде капсул для доз ≥ 3 мг. Для доз ниже 3 мг соединение примера 1 взвешивали в подходящей емкости и растворяли в соответствующем объеме дегазированного Sprite® или разбавителя.

[¹⁸F]LSN3316612 получали в клинической лаборатории радиохимии из
5 нерадиоактивного предшественника в день каждого ПЭТ-сканирования. [¹⁸F]LSN3316612 для инъекций представлял собой прозрачный раствор для внутривенных инъекций, приготовленный в физиологическом растворе, содержащем этанол, стерильную воду для инъекций и аскорбат натрия. [¹⁸F]LSN3316612 доставлялся в физиологическом растворе (0,9% NaCl), составленном таким образом, чтобы содержать примерно 3,3% (об./об.)
10 этанола (EtOH) и аскорбат натрия (4,67 мг/мл). [¹⁸F]LSN3316612 вводили внутривенно в течение 3-минутного периода инфузии с применением инфузионного насоса с последующей промывкой 10 мл физиологического раствора. Перед проведением ПЭТ пациентам вводили внутривенный катетер (для инфузии радиоактивного индикатора) в соответствии со стандартной клинической практикой. Каждый субъект получал
15 однократную инъекцию [¹⁸F]LSN3316612 при каждой процедуре сканирования. Радиофармацевтический препарат вводили внутривенно в дозе примерно 5 мКи (не более 6 мКи) при максимальной массовой дозой 10 мкг и максимальном объеме 10 мл.

Для каждого ПЭТ-сканирования в лаборатории радиохимии синтезировали радиолиганд из предшественника в соответствии с протоколом производства образцов для
20 ПЭТ, известным в данной области, таким как описанный в Lee, J., Liow, J., Paul, S. *et al.* «PET Quantification of Brain O-GlcNAcase With [¹⁸F]LSN3316612 in Healthy Human Volunteers,» *EJNMMI Res* **10**, 20 (2020).

Образцы артериальной крови отбирали у всех субъектов во время каждого ПЭТ-сканирования для измерения радиоактивности для получения данных для кинетического
25 анализа ПЭТ-индикатора. Образцы венозной крови отбирали после введения дозы соединения примера 1 для измерения концентраций соединения примера 1 в плазме с применением валидированного анализа жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией.

Первичным результатом визуализации для ПЭТ с [¹⁸F]LSN3316612 являлся общий
30 объем распределения (V_T), который определяли в областях, где присутствует OGA, включая области коры, области базальных ганглиев, таламус и мозжечок. В анализе использовали данные временной активности с поправкой на затухание в различных областях мозга. Данные визуализации анализировали при помощи модели двух тканевых компартментов с входной артериальной функцией для определения V_T . OGA EO после однократной дозы

соединения примера 1 получали с применением графического анализа по графику занятости:

$$V_T(\text{исходный}) - V_T(\text{дозирование}) = \text{Занятость} * (V_T(\text{исходный}) - V_{ND}),$$

5 где $V_T(\text{исходный})$ и $V_T(\text{дозирование})$ представляют собой общие объемы распределения в нескольких регионах, полученные при исходном сканировании и после введения соединения примера 1 соответственно. Занятость определяли как наклон линейной регрессии графика, а объем распределения несмещаемого компартмента V_{ND} определяли как отрезок, отсекаемый на оси x.

10 Следуя процедуре, по существу как описано выше, данные по связыванию с OGA в головном мозге после однократной пероральной дозы 0,25 мг, 1 мг и 5 мг соединения примера 1 представляли в таблицах 7a–7c.

Таблица 7a. Занятость OGA в головном мозге для дозы 0,25 мг соединения примера 1

Примерное время (ч)	Средняя занятость фермента (%)	Средняя концентрация соединения примера 1 в плазме (нг/мл)
0,5		0,934
1		0,595
2	25,6	0,373
3		0,391
4		0,367
5		0,39
6		0,357
8		0,294
12		0,213
24	46	0,107

15 Таблица 7b. Занятость OGA в головном мозге для дозы 1 мг соединения примера 1

Примерное время (ч)	Средняя занятость фермента (%)	Средняя концентрация соединения примера 1 в плазме (нг/мл)
0,5		6,29
1		6,24
2	97,3	5,75
3		4,97
4		4,28
5		3,87
6		3,08
8		2,45
12		1,42
24	80,6	0,412
30	68	0,222

54	30,3	0,0735
----	------	--------

Таблица 7с. Занятость OGA в головном мозге для дозы 5 мг соединения примера 1

Примерное время (ч)	Средняя занятость фермента (%)	Средняя концентрация соединения примера 1 в плазме (нг/мл)
0,5		32,4
1		30,7
2	98,2	36
3		31,9
4		31,5
5		30,6
6		25,3
8		17,8
12		12,5
24	92,5	3,07

5 В данных, представленных выше в таблицах 7а–7с, представлено зависимое от концентрации изменение OGA EO в головном мозге с EO для дозы 5 мг соединения примера 1, превышающей 90% EO через 24 часа после введения дозы. Было обнаружено, что доза 1 мг соединения примера 1 обеспечивает 80,6% EO через 24 часа после введения дозы и 30,3% EO через 54 часа после введения дозы. Было обнаружено, что доза 0,25 мг соединения примера 1 обеспечивает 46% EO через 24 часа после введения дозы.

10 Используя данные ФК из исследования однократных нарастающих доз соединения примера 1 у здоровых субъектов и результаты исследования ПЭТ, демонстрирующие проникновение в головной мозг и связывание с OGA в головном мозге после однократной пероральной дозы соединения примера 1, как описано выше, ниже приводили низкие дозы и режимы дозирования для лечения нейродегенеративного заболевания, включая БА и другие нейродегенеративные таупатии, с помощью соединения примера 1:

- Общая доза соединения примера 1 от 0,25 мг/день до 5 мг/день.
- Общая доза соединения примера 1 от 0,1 мг/день до 3 мг/день.
- Общая доза соединения примера 1 от 0,25 мг/день до 3 мг/день.
- 20 Общая доза соединения примера 1 от 0,1 мг/день до 2 мг/день.
- Общая доза соединения примера 1 от 0,25 мг/день до 2 мг/день.
- Общая доза соединения примера 1 от 0,1 мг/день до 1 мг/день.
- Общая доза соединения примера 1 от 0,25 мг/день до 1 мг/день.
- Общая доза соединения примера 1 5 мг/день.
- 25 Общая доза соединения примера 1 3 мг/день.
- Общая доза соединения примера 1 2 мг/день.

Общая доза соединения примера 1 1 мг/день.

Общая доза соединения примера 1 0,25 мг/день.

Общая доза соединения примера 1 0,1 мг/день.

5 Предпочтительно, чтобы общую суточную дозу соединения примера 1 вводили в виде одной стандартной дозы.

10 Более предпочтительно, чтобы общую суточную дозу соединения примера 1 вводили в виде двух стандартных доз. Предпочтительно, чтобы общую суточную дозу примера 1 вводили в виде двух стандартных доз, при этом каждая доза содержит равные количества соединения примера 1. Предпочтительно, чтобы общая суточная доза соединения примера 1 вводилась двумя стандартными дозами, при этом каждую стандартную дозу вводят с интервалом по меньшей мере 8 часов.

Кроме того, ниже указаны общие дозы соединения примера 1 в фармацевтической композиции:

15 Общая доза соединения примера 1 от 0,25 мг до 5 мг.

Общая доза соединения примера 1 от 0,1 мг до 3 мг.

Общая доза соединения примера 1 от 0,25 мг до 3 мг.

Общая доза соединения примера 1 от 0,1 мг до 2 мг.

Общая доза соединения примера 1 от 0,25 мг до 2 мг.

Общая доза соединения примера 1 от 0,1 мг до 1 мг.

20 Общая доза соединения примера 1 от 0,25 мг до 1 мг.

Общая доза соединения примера 1 3 мг.

Общая доза соединения примера 1 2 мг.

Общая доза соединения примера 1 1 мг.

Общая доза соединения примера 1 0,25 мг.

25 Кроме того, предпочтительно, чтобы общая доза фармацевтической композиции, содержащей соединение примера 1 или его фармацевтически приемлемую соль, содержалась в одной стандартной дозе.

30 Более предпочтительно, чтобы общая доза фармацевтической композиции, содержащей соединение примера 1 или его фармацевтически приемлемую соль, содержалась в одной стандартной дозе, при этом однократную стандартную дозу вводили один раз в день.

Кроме того, предпочтительно, чтобы общая доза фармацевтической композиции, содержащей соединение примера 1 или его фармацевтически приемлемую соль, содержалась в двух стандартных дозах.

Предпочтительно, чтобы общая доза фармацевтической композиции, содержащей соединение примера 1 или его фармацевтически приемлемую соль, содержалась в двух стандартных дозах, при этом каждая из стандартных доз содержала равные количества соединения примера 1.

5 Более предпочтительно, чтобы общая доза фармацевтической композиции, содержащей соединение примера 1 или его фармацевтически приемлемую соль, содержалась в двух стандартных дозах, при этом каждую из доз вводили в течение одного дня.

10 Кроме того, предпочтительно, чтобы общая доза фармацевтической композиции, содержащей соединение примера 1 или его фармацевтически приемлемую соль, содержалась в двух стандартных дозах, причем каждая из стандартных доз содержала равные количества соединения примера 1, и при этом каждую из доз вводили в течение одного дня, предпочтительно с интервалом по меньшей мере 8 часов.

15 **Пример 3. Экспрессия и очистка сконструированных антител к N3pGlu Aβ**

Антитела к N3pGlu Aβ известны в данной области. Например, в патенте США № 8,679,498; патенте США № 8,961,972; патенте США № 10,647,759; и патенте США № 11,078,261 (которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки) описаны антитела к N3pGlu Aβ, способ получения антител, содержащие антитела составы и способы
20 лечения заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, с помощью таких антител. Аминокислотные последовательности примерных антител к N3pG Aβ представлены в таблице 8 ниже.

Таблица 8. Антитело к N3pGlu Aβ, SEQ ID NO.

Антитело	Легкая цепь	Тяжелая цепь	LCVR	HCVR
I	3	4	1	2
II	13	14	11	12

Антитела к N3pGlu A β настоящего изобретения могут быть экспрессированы и очищены по существу следующим образом. Для антитела I подходящую клетку-хозяина, такую как НЕК 293 EBNA или CHO, либо временно, либо стабильно трансфицируют системой экспрессии для секреции антител с использованием оптимального заранее определенного соотношения векторов HC : LC или одной векторной системы, кодирующей как HC, такую как SEQ ID NO: 22, так и LC, такую как SEQ ID NO: 21. Осветленную среду, в которую было секретировано антитело, очищают с использованием любой из многочисленных общепринятых методик. Например, среда может быть удобным образом нанесена на сефарозную колонку FF с белком A или G, уравновешенную совместимым буфером, таким как фосфатно-солевой буфер (pH 7,4). Колонку промывают для удаления неспецифических связывающихся компонентов. Связанное антитело элюируют, например, с помощью градиента pH (например, от 0,1 М фосфатно-натриевого буфера с pH 6,8 до 0,1 М цитратно-натриевого буфера с pH 2,5). Фракции антитела детектируют, например с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ, и затем объединяют. Дополнительная очистка является необязательной и проводится в зависимости от предполагаемого применения. Антитело может быть сконцентрировано и/или стерильно профильтровано с использованием общепринятых методик. Растворимые агрегаты и мультимеры могут быть эффективно удалены с помощью общепринятых методик, включая эксклюзионную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, ионообменную или гидроксиапатитную хроматографию. Чистота антитела I после указанных стадий хроматографии составляет более 99%. Продукт можно незамедлительно замораживать при -70° С или можно лиофилизировать.

Антитело II может быть получено и очищено по существу следующим образом. Вектор экспрессии глутаминсинтетазы (GS), содержащий последовательность ДНК, кодирующую аминокислотную последовательность HC SEQ ID NO: 24, и последовательность ДНК, кодирующую аминокислотную последовательность LC SEQ ID NO: 23, используют для трансфекции клеточной линии яичника китайского хомячка (CHO) методом электропорации. Вектор экспрессии кодирует промотор SV Early (Simian Virus 40E) и ген GS. После трансфекции клетки подвергают массовой селекции с 0–50 мкМ L-метионинсульфоксимином (MSX). Выбранные массы клеток или мастер-лунки затем масштабируются в бессывороточных суспензионных культурах, которые будут использоваться для производства. Очищенную среду, в которую было секретировано антитело, наносят на аффинную колонку с белком A, которая уравновешена совместимым буфером, таким как забуференный фосфатом физиологический раствор (pH 7,4). Колонку промывают 1 М NaCl для удаления неспецифических связывающихся компонентов.

Связанное антитело к N3pGlu Aβ элюируют, например цитратом натрия при pH (примерно) 3,5, и фракции нейтрализуют 1 М трис-буфером. Фракции антитела к N3pGlu A обнаруживают, например с помощью SDS-PAGE или аналитического исключения по размеру, и объединяют. Антитело II к N3pGlu Aβ по настоящему изобретению концентрируют в PBS буфере при pH 7,4 или 10 mM цитратно-натриевом буфере, 150 mM NaCl, при pH около 6. Конечный материал может быть стерильно отфильтрован с использованием общепринятых методик. Чистота антитела II к N3pGlu Aβ составляет более 95%. Антитело II к N3pGlu Aβ настоящего изобретения можно немедленно заморозить при -70 °C или хранить при 4 °C в течение нескольких месяцев.

10

Пример 4. Аффинность связывания и кинетика антител к N3pGlu Aβ

Аффинность связывания и кинетику антитела к N3pGlu Aβ настоящего изобретения (антитела I или антитела II) с пептидом pE3-42 Aβ измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием BIACORE® 3000 (GE Healthcare). Аффинность связывания измеряют путем захвата антитела к N3pGlu Aβ через иммобилизованный белок A на чипе BIACORE® CMS и пропускания пептида pE3-42 Aβ, начиная со 100 nM в 2-кратном серийном разведении до 3,125 nM. Эксперименты проводят при 25 °C в буфере HBS-EP (GE Healthcare BR100669; 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% ПАВ P20, pH 7,4).

15

20

Для каждого цикла антитело захватывают с помощью инъекции 5 мкл раствора антител с концентрацией 10 мкг/мл с расходом 10 мкл/мин. Пептид связывается при инъекции 250 мкл со скоростью 50 мкл/мин, а затем диссоциируется в течение 10 минут. Поверхность чипа регенерируют с 5 мкл инъекции глицинового буфера при pH 1,5 при расходе 10 мкл/мл. Данные соответствуют модели привязки Ленгмюра 1: 1 для получения k_{on} , k_{off} , и для вычисления K_D . В соответствии с процедурами, по существу как описано выше, были изучены следующие параметры (показанные в таблице 9).

25

Таблица 9. Аффинность и кинетика связывания

Антитело	k_{on} ($\times 10^5$ 1/Мс)	k_{off} ($\times 10^{-4}$ 1/с)	K_D (нМ)
I	3,62	2,7	0,75
II	1,64E+03	6,98E-05	4,57

Эти данные демонстрируют, что антитела настоящего изобретения связывают pE3-42 Aβ.

30

Пример 5. Связывание с мишенью *ex vivo*

Для определения связывания с мишенью *ex vivo* на срезах головного мозга из фиксированного PDAPP мозга проводят иммуногистохимический анализ с экзогенно добавленными антителами к N3pGlu A β настоящего изобретения (антитело I или антитело II). Серийные криостатные коронарные срезы старых PDAPP мышей (в возрасте 25 месяцев) инкубируют с 20 мкг/мл взятого в качестве примера антитела к N3pGlu A β настоящего изобретения. Используют вторичные реагенты HRP, специфичные для человеческого IgG, и отложенные бляшки визуализируют с помощью DAB-Plus (DAKO). Биотинилированное мышинное антитело 3D6, за которым следует вторичный Step-HRP, используют в качестве положительного контроля. Антитело положительного контроля (биотинилированное 3D6) метило значительные количества отложенного A β в гиппокампе PDAPP, а антитела A β к N3pGlu (антитело I или антитело II) метили подмножество отложений. Эти гистологические исследования продемонстрировали, что приведенные в качестве примера антитела к N3pGlu A β настоящего изобретения связывали отложенную мишень A β *ex vivo*.

15

Пример 6. Исследования связывания с мишенью *in vivo*

Измеряют способность антител к N3pGlu A β по настоящему изобретению пересекать гематоэнцефалический барьер и связываться с осажденной бляшкой *in vivo*. Старым трансгенным мышам PDAPP (в возрасте от 18,5 до 32 месяцев) внутрибрюшинно вводили антитела к N3pGlu A β (например, антитело I или II) или IgG отрицательного контроля. Шесть мышей на группу получают одну инъекцию 40 мг/кг антитела в день 1 и в день 3. Связывание с мишенью *in vivo* определяют на день 6, когда мышей умерщвляют и собирают мозг для гистохимического анализа.

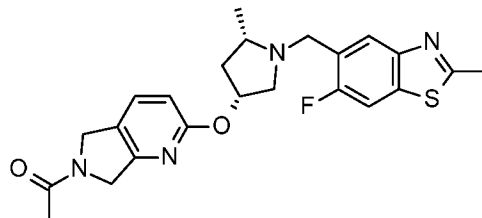
Степень связывания мишеней *in vivo* количественно определяют как относительную площадь, положительную для связывания антител к N3pGlu A β *in vivo*, нормированную по общей площади бляшек, как определено с помощью иммуноокрашивания экзогенного контрольного антитела на сестринских срезах (соотношение TE). Соотношение TE генерируется путем измерения относительной площади связанного антителом, и нормализации значения по отношению к общей относительной площади возможной цели (общее отложение A β визуализируется с помощью экзогенной иммуногистохимии с антителом положительного контроля (3D6) на сестринском срезе).

30

В соответствии с процедурами, по существу описанными выше, обнаружено, что оба антитела I и II к N3pGlu A β взаимодействуют с отложившейся бляшкой. Эти результаты демонстрируют, что антитела I и II к N3pGlu при периферическом введении могут

преодолевать гематоэнцефалический барьер и воздействовать на намеченную мишень отложенного Аβ.

Пример 7. Получение ингибитора OGA 1-(2-(((3R,5S)-1-((6-фтор-2-метилбензо[d]тиазол-5-ил)метил)-5-метилпирролидин-3-ил)окси)-5,7-дигидро-6H-пирроло[3,4-b]пиридин-6-ил)этан-1-она

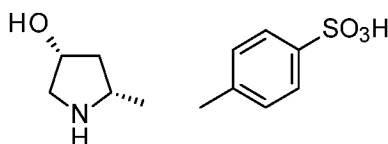


Это соединение и его синтез описаны в патенте США № US 10,752,362, который полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

К раствору 6-фтор-2-метил-1,3-бензотиазол-5-карбальдегида (0,19 г, 0,95 ммоль) и 1-(2-(((3R,5S)-5-метилпирролидин-3-ил)окси)-5,7-дигидро-6H-пирроло[3,4-b]пиридин-6-ил)этан-1-она гидрохлорида (0,28 г, 0,94 ммоль) в DCM (9 мл) добавляют DIPEA (0,45 мл, 2,6 ммоль). Полученный раствор перемешивают при комн. темп. в течение 40 минут. К раствору добавляют триацетоксиборгидрид натрия ($\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, 0,65 г, 3,04 ммоль). Полученный раствор перемешивают при комн. темп. в течение 17 часов. Реакционную смесь медленно гасят насыщенным водным раствором NaHCO_3 (5 мл). Водный слой экстрагируют DCM (2 x 5 мл). Объединенные органические экстракты сушат над MgSO_4 , фильтруют и концентрируют при пониженном давлении. Полученный остаток растворяют в DCM и очищают посредством флеш-хроматографии на силикагеле, элюируя градиентом 40–100% ацетона в гексанах, с получением указанного в заголовке соединения после выпаривания растворителя желаемых хроматографических фракций (0,27 г, выход 65%). ИЭР/МС m/z : 441 ($M + H$); $[\alpha]_D^{20} = +101,4^\circ$ ($c = 0,2$, MeOH).

Альтернативный способ получения ингибитора OGA 1-(2-(((3R,5S)-1-((6-фтор-2-метилбензо[d]тиазол-5-ил)метил)-5-метилпирролидин-3-ил)окси)-5,7-дигидро-6H-пирроло[3,4-b]пиридин-6-ил)этан-1-она

Получение 4-метилбензолсульфоновой кислоты;(3R,5S)-5-метилпирролидин-3-ола



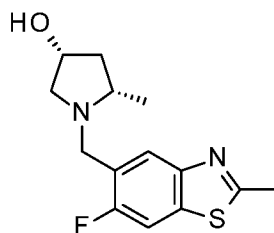
В колбу добавляют трет-бутил(2S,4R)-4-гидрокси-2-метилпирролидин-1-карбоксилат (53,0 г, 263 ммоль) и 2-пропанол (265 мл) при комнатной температуре. Смесь перемешивают при комнатной температуре (внутренняя температура 20 °С) и одной порцией добавляют моногидрат п-толуолсульфоновой кислоты (60,1 г, 316 ммоль).

5 Реакционную смесь перемешивают в термостате при 62 °С в течение ночи, затем охлаждают до комнатной температуры и концентрируют до общего объема приблизительно 150 мл. Смесь разбавляют метил-трет-бутиловым эфиром (МТБЕ, 530 мл) и смесь энергично перемешивают при комнатной температуре в течение 30 минут, а затем фильтруют в потоке газообразного N₂. Отфильтрованное твердое вещество сушат в

10 вакууме при 40 °С в течение 2 часов для получения 4-метилбензолсульфоновой кислоты;(3R,5S)-5-метилпирролидин-3-ола (67,6 г, выход 93%) в виде белого твердого вещества. ИЭР/МС m/z: 102 (M + H).

Получение (3R,5S)-1-[(6-фтор-2-метил-1,3-бензотиазол-5-ил)метил]-5-метилпирролидин-3-ола

15



В колбу добавляют 4-метилбензолсульфовую кислоту; (3R,5S)-5-метилпирролидин-3-ол (61,9 г, 226 ммоль), EtOAc (850 мл) и 6-фтор-2-метил-1,3-бензотиазол-5-карбальдегид (42,5 г, 216 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную

20 смесь перемешивают на ледяной бане (внутренняя температура 3 °С) и добавляют одной порцией триэтиламин (60,1 мл, 431 ммоль). Реакционную смесь перемешивают на ледяной бане в течение 30 минут, затем добавляют одной порцией триацетоксиборгидрид натрия (91,4 г, 431 ммоль). Реакционную смесь перемешивают на ледяной бане в течение 10 минут, затем при комнатной температуре в течение 2 часов (внутренняя температура 20 °С).

25 Реакционную смесь перемешивают на ледяной бане и добавляют 15% водный раствор KHSO₄ (650 мл) в течение 5 минут, поддерживая в течение добавления внутреннюю температуру ниже 15 °С. Смесь энергично перемешивают при комнатной температуре в течение 1 часа, затем добавляют насыщенный водный раствор лимонной кислоты (100 мл) и смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 5 минут, затем слои

30 разделяют. Водный слой промывают EtOAc (400 мл), затем водный слой перемешивают на ледяной бане и добавляют порциями твердый Na₂CO₃ (80 г) в течение 10 минут при

интенсивном перемешивании до $pH = 10$ (измеряют с помощью pH -бумаги). Водный слой затем экстрагируют $EtOAc$ (3×400 мл). Объединенные органические фазы сушат над Na_2SO_4 и концентрируют с получением остатка, который измельчают в мелкий порошок с помощью пестика и ступки, затем смешивают со смесью 25% МТВЕ/гептан (280 мл). Смесью энергично перемешивают в термостате при $45\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 1 часа, затем при комнатной температуре в течение 1 часа и затем фильтруют для получения первой порции отфильтрованного твердого вещества. Фильтрат концентрируют, затем остаток объединяют со смесью 25% МТВЕ/гептан (40 мл) и смесь энергично перемешивают при комнатной температуре в течение 30 минут, а затем фильтруют с получением второй порции отфильтрованного твердого вещества. Первую и вторую партии отфильтрованных твердых веществ объединяют, смесь измельчают шпателем, затем сушат в вакууме при комнатной температуре в течение ночи, получая (3R,5S)-1-[(6-фтор-2-метил-1,3-бензотиазол-5-ил)метил]-5-метилпирролидин-3-ол (53,3 г, выход 87%) в виде твердого вещества кремового цвета. ИЭР/МС m/z : 281 (M + H).

15

Альтернативный способ получения ингибитора OGA 1-(2-(((3R,5S)-1-((6-фтор-2-метилбензо[d]тиазол-5-ил)метил)-5-метилпирролидин-3-ил)окси)-5,7-дигидро-6H-пирроло[3,4-b]пиридин-6-ил)этан-1-она

В колбу добавляют (3R,5S)-1-[(6-фтор-2-метил-1,3-бензотиазол-5-ил)метил]-5-метилпирролидин-3-ол (26,9 г, 95,0 ммоль), 1-(2-хлор-5,7-дигидропирроло[3,4-b]пиридин-6-ил)этанон (22,1 г, 109 ммоль), карбонат цезия (92,8 г, 285 ммоль), MorDalPhos (1,76 г, 3,80 ммоль), димер хлорида палладия(II)(пи-циннамил) (984 мг, 1,90 ммоль) и толуол (538 мл) при комнатной температуре. Газообразный N_2 барботируют через смесь при комнатной температуре при перемешивании в течение 30 минут, затем реакционную смесь перемешивают в термостате с температурой $86\text{ }^\circ\text{C}$ в течение ночи (внутренняя температура $80\text{ }^\circ\text{C}$). Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры, разбавляют $EtOAc$ (269 мл) и добавляют диатомитовую землю (27 г). Смесью перемешивают при комнатной температуре в течение 5 минут, затем фильтруют через диатомитовую землю и промывают $EtOAc$ (200 мл). Фильтрат концентрируют с получением остатка, который растворяют в $EtOAc$ (100 мл) и смесь пропускают через небольшой слой силикагеля (300 г), элюируя $EtOAc$ (2 л), а затем смесью 20% изопропанол/ $EtOAc$ (IPA/ $EtOAc$, 2 л). Фракцию IPA/ $EtOAc$ концентрируют с получением остатка, который сушат в вакууме при комнатной температуре в течение 1 часа, с получением указанного в заголовке соединения (42,1 г, выход 88%, чистота 88% по массе) в виде бледно-коричневой пены.

35

Пену объединяют с другой партией аналогичной чистоты и объединенный материал

(46,0 г, 92,3 ммоль) смешивают с МТВЕ (230 мл) и гептаном (230 мл) при комнатной температуре. Смесь энергично перемешивали в термостате при 45 °С в течение 1 часа, затем при комнатной температуре в течение 30 минут, а затем фильтровали. Отфильтрованное твердое вещество объединяют с EtOAc (400 мл) и добавляют SiliaMetS® Thiol (40 г). Смесь перемешивают на роторном испарителе при комнатной температуре в течение 1 часа, затем фильтруют. Фильтрат концентрируют с получением остатка, который смешивают с 25% EtOAc/гептаном (400 мл), и смесь энергично перемешивают в термостате при 50 °С в течение 1 часа, затем при комнатной температуре в течение 10 минут, затем фильтруют, отложив первую порцию фильтрата. Отфильтрованное твердое вещество смешивают с 35% EtOAc/гептаном (400 мл) и смесь энергично перемешивают в термостате при 50 °С в течение 1 часа, затем при комнатной температуре в течение 10 минут, затем фильтруют, отложив вторую порцию фильтрата. Отфильтрованное твердое вещество объединяют с EtOAc (500 мл) и 15% водным раствором KHSO₄ (500 мл). Смесь энергично перемешивают при комнатной температуре в течение 15 минут, затем переносят в делительную воронку и 15 слои разделяют, оставляя слой смеси жидкости и твердых частиц в органике. Органический слой дополнительно экстрагируют 15% водным раствором KHSO₄ (100 мл), оставляя слой смеси жидкости и твердых частиц в органике. Слой смеси жидкости и твердых частиц отделяют от органики, разбавляют CH₂Cl₂ (100 мл) и 15% водным раствором KHSO₄ (100 мл) и слои разделяют. Объединенные водные слои перемешивают на ледяной бане и добавляют порциями твердый Na₂CO₃ (100 г) в течение 5 минут при перемешивании (рН, измеренный с помощью рН-бумаги, равен 10). Смесь экстрагируют CH₂Cl₂ (2 × 500 мл), объединенные органические фазы сушат над Na₂SO₄ и концентрируют с получением первой партии неочищенного продукта. Первую и вторую серии фильтратов после фильтрования объединяют и концентрируют, затем остаток объединяют с EtOAc (100 мл) и 15% водным раствором KHSO₄ (100 мл). Смесь энергично перемешивают при комнатной температуре в течение 15 минут, затем переносят в делительную воронку и слои разделяют. Водный слой перемешивают на ледяной бане и добавляют порциями твердый Na₂CO₃ (15 г) в течение 5 минут при перемешивании (рН, измеренный с помощью рН-бумаги, равен 10). Смесь экстрагируют CH₂Cl₂ (2 × 100 мл), объединенные органические фазы сушат над Na₂SO₄ и концентрируют, получая остаток, который смешивают с 25% EtOAc/гептаном (80 мл), и смесь энергично перемешивают в термостате при температуре 50 °С в течение 30 минут, затем при комнатной температуре в течение 10 минут, затем фильтруют, чтобы получить вторую серию неочищенного продукта. Две серии неочищенного продукта объединяют со смесью 25% EtOAc/гептана (400 мл) и смесь энергично перемешивают в термостате при 50 °С в течение 30 минут, затем при комнатной температуре в течение 10 минут, затем

фильтруют. Отфильтрованное твердое вещество сушат в вакууме при комнатной температуре в течение 3 дней с получением конечного соединения, указанного в заголовке (37,4 г, выход 90%) в виде белого твердого вещества. ИЭР/МС m/z : 441 (M + H). Оптическое вращение $[\alpha]_{D_{20}} = +104,0^\circ$ ($c = 0,2$, MeOH).

5 Соединение примера 7 тестировали, по существу как описано выше, для анализа фермента OGA человека *in vitro*, и оно продемонстрировало IC_{50} $0,214 \text{ нМ} \pm 0,037$ ($n = 4$). Эти данные демонстрируют, что соединение по примеру 7 ингибирует активность фермента OGA *in vitro*. Соединение примера 7 тестировали, по существу как описано выше, для
цельноклеточного анализа для измерения ингибирования активности фермента OGA, и оно
10 продемонстрировало IC_{50} $70,5 \text{ нМ} \pm 0,002$ ($n = 2$). Эти данные демонстрируют, что соединение по примеру 7 ингибирует активность фермента OGA в клеточном анализе.

Пример 8. Комбинированное исследование *in vivo*

Следующий пример демонстрирует, как можно спланировать исследование для
15 проверки того, что комбинация ингибитора OGA по настоящему описанию в комбинации с антителом к N3pGlu A β по настоящему описанию может быть полезна для лечения заболевания, характеризующегося отложениями амилоида и/или агрегацией aberrантного тау-белка, такого как БА. Однако следует понимать, что следующие описания изложены в качестве иллюстрации, а не ограничения, и средние специалисты в данной области могут
20 осуществлять различные модификации.

Для оценки влияния гиперфосфорилирования тау-белка и снижения агрегации с помощью типичных ингибиторов OGA, а также уменьшения отложений бета-амилоида, иллюстрируемого антителом к N3pGlu A β , в комбинированной терапии, как описано в настоящем документе, задержку прогрессирования заболевания можно оценить с помощью
25 биомаркеров и/или оценки снижения когнитивных функций и ухудшения функционального состояния с использованием проверенных рейтинговых шкал.

Пациенты могут быть разделены на экспериментальные группы, состоящие из двойных слепых групп плацебо и комбинированной терапии. Группам комбинированной терапии вводят эффективное количество ингибитора OGA в сочетании с эффективным
30 количеством антитела к N3pGlu A β . Группы монотерапии (группа монотерапии ингибитором OGA в той же дозировке, что и ингибитор OGA в группе комбинированной терапии; и группа монотерапии антителом к N3pGlu A β в той же дозировке, что и антитело к N3pGlu A β в группе комбинированной терапии) могут быть включены для дальнейшего выяснения вклада каждой отдельной молекулы в модификацию заболевания. Более того,
35 группы лечения могут быть охарактеризованы на основе диагноза доклинической или

клинической формы БА или на основании диагноза того, что пациент (хотя и не имеет симптомов БА) обладает генетической мутацией, вызывающей заболевание БА. Например, группы могут включать одно или более из нижеперечисленного: (а) бессимптомный, но вызывающий БА положительный результат генетической мутации; (b) продромальная форма БА; (c) легкая деменция при БА; (d) умеренная деменция при БА; и (e) тяжелая деменция при БА. Каждая группа лечения может получать соответствующее лечение (например, каждые четыре недели для антитела к N3pGlu A β и ежедневно для ингибитора OGA) в течение периода лечения от 9 месяцев до 18 месяцев.

После периода лечения нейродегенерацию БА можно оценить с помощью одной или более из следующих оценок биомаркеров: (а) ПЭТ-визуализация амилоида; (b) фосфорилированный тау-белок (P-тау; либо фосфорилированный по треонину 181 или 217) (c) ПЭТ-визуализация тау-белка (оценка накопления НФК); (d) объемная МРТ (оценка нейроанатомической атрофии); (e) ФДГ-ПЭТ ПЭТ-визуализация (оценка гипометаболизма); (f) перфузионная ПЭТ-визуализация с флорбетапиром (оценка гипометаболизма); (g) концентрация тау-белка в СМЖ (оценка нейродегенерации); и/или (i) концентрация фосфорилированного тау-белка в СМЖ (оценка нейродегенерации). Кроме того, можно применять одну или более проверенных рейтинговых шкал, оценивающих снижение когнитивных функций и ухудшение функционального состояния в каждой группе лечения, например ADAS-cog, MMSE, CDR-SB, ADCS-ADL и опросник функциональной активности (FAQ).

Это исследование может продемонстрировать, что комбинированная терапия ингибитором OGA настоящего изобретения и антителом к N3pGlu A β настоящего изобретения может привести к уменьшению бляшек A β и ограничению гиперфосфорилирования тау-белка и внутринейрональной агрегации в патологическом тау-белке, например НФК, для лечения таких заболеваний, как БА.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ**SEQ ID NO:1 LCVR антитела I**

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSRGKTYLNWLLQKPGQSPQLLIYAVSKLDS
 5 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHYPFTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:2: HCVR антитела I

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGYDFTRYINWVRQAPGQGLEWMGWINPGSGN
 TKYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREGITVYWGQGTITVTVSS

10

SEQ ID NO:3: LC антитела I

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSRGKTYLNWLLQKPGQSPQLLIYAVSKLDS
 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSL
 15 SSSLTTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:4: HC антитела I

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGYDFTRYINWVRQAPGQGLEWMGWINPGSGN
 TKYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREGITVYWGQGTITVTVSSA
 20 STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 25 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:5: LCDR1 антитела I

KSSQSLLYSRGKTYLN

30

SEQ ID NO:6: LCDR2 антитела I

AVSKLDS

SEQ ID NO:7: LCDR3 антитела I

VQGTHYPFT

35

SEQ ID NO:8: HCDR1 антитела I

GYDFTRYIIN

SEQ ID NO:9: HCDR2 антитела I

5 WINPGSGNTKYNEKFKG

SEQ ID NO:10: HCDR3 антитела I

EGITVY

10 **SEQ ID NO:11: LCVR антитела II**

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSLGNWLAWYQQKPGKAPKLLIYQASTLESQVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQHYKGSFWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:12: HCVR антитела II

15 EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGSGSYNGFDYWGQGT
LVTVSS

SEQ ID NO:13: LC антитела II

20 DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSLGNWLAWYQQKPGKAPKLLIYQASTLESQVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQHYKGSFWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSST
LTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

25 **SEQ ID NO:14: HC антитела II**

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGSGSYNGFDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
AVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
30 PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG

35 **SEQ ID NO:15: LCDR1 антитела II**

RASQSLGNWLA

SEQ ID NO:16: Lcdr2 антитела II
YQASTLES

5

SEQ ID NO:17: Lcdr3 антитела II
QHVKGSFWT

SEQ ID NO:18: Hcdr1 антитела II
10 AASGFTFSSYPMS

SEQ ID NO:19: Hcdr2 антитела II
AISGSGGSTYYADSVKG

SEQ ID NO:20: Hcdr3 антитела II
15 AREGGSGSYNGFDY

SEQ ID NO:21: последовательность ДНК LC антитела I

gatattgtgatgactcagactccactctccctgtccgtcaccctggacagccggcctccatctcctgcaagcaagtcagagcctttatata
20 gtcgcggaacacctattgaattggctcctgcagaagccaggccaatctccacagctcctaattatgcggtgtctaaactggactctgggg
tccagacagattcagcggcagtgggctaggcacagattcactgaaaatcagcagggaggccgaagatgtggggtttactg
cgtgcaaggtacacattaccattcacgtttggccaagggaccaagctggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatctccc
gccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggt
ggataacgccctcaatcgggtaactccaggagagtgacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctg
25 acgctgagcaaacgagactacgagaaacacaagctacgcctgcgaagtacccatcagggcctgagctgcccgtcacaagagctt
caacaggggagagtgc

SEQ ID NO:22: последовательность ДНК HC антитела I

caggtgcagctggtgcagtctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcagtgaaagtttctgcaaggcatctggttacgacttcaactag
30 atactatataaactgggtgacagagccctggacaagggctgagtgatgggatggattaatcctggaagcggtaataactaagtaaatg
agaaattcaaggcagagtcaccattaccgaggacgaatccacgagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacag
gccgtgtattactgtgagagagaaggcatcacggctactggggccaagggaccacggctaccgtctcctcagcctccaccaagggccca
tcggtctcccgtagcaccctcctcaagagcacctctgggggacagcggccctgggtgctgctgtaaggactactccccgaaccg
gtgacgggtgctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtcctacagtcctcaggacttactccctcagca
35 gcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaag

aaagttgagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctgggggaccgtcagttctcttccc
 cccaaaaccaaggacaccctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtca
 agttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtc
 agcgtctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtcaaggttccaacaaagccctcccagccccatcga
 5 gaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggacgagctgaccaagaacca
 ggtcagcctgacctgcctggtcaaaaggcttctatcccagcgacatgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaactaca
 agaccacgccccctgctggactccgacggctccttctctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaac
 gtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggt

10 **SEQ ID NO:23 последовательность ДНК LC антитела II**

Gacatccagatgaccagtccttccaccctgtctcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggaccagtcagagtcttgtaa
 ctggtggcctggtatcagcagaaccagggaaagccccaaactcctgatctatcaggcgtctactttagaatctggggtcccatcaagatt
 cagcggcagtggtactgggacagagttcactctcaccatcagcagcctgcagcctgatgattttgcaacttattactgccaacattataaggt
 tcttttggacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaacggaccgtggctgcaccatctgtcttcatctcccgccatctgatgagcag
 15 ttgaaatctggaactgcctctgttgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctcaa
 tcgggtaactcccaggagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcag
 actacgagaacacaaagtctacgcctgcgaagtcaccatcagggcctgagctcgccctcacaagagcttcaacaggggagagtgctc

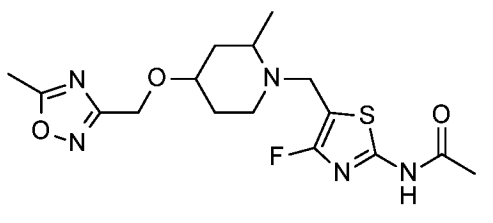
SEQ ID NO: 24 последовательность ДНК HC антитела II

20 gaggtgcagctgttgagctctggggaggcttggtacagcctggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttagcag
 ctatcctatgagctgggtccgccaggctccagggaaagggctggagtgggtctcagctattagtggtagtggtgtagcacatactacgca
 gactccgtgaagggccggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacag
 gccgtatattactgtcgcagagaggggggctcaggaggtattataacggcttgattattggggccagggaaccctggtcaccgtctctca
 gcctccaccaagggcccatcggcttcccgtagcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctgtgtaa
 25 ggactactccccgaaccggtgacggtgctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacftcccggctgctctacagtctca
 ggactctactccctcagcagcgtggtgacctgccctcagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagc
 aacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctgggggga
 ccgtcagttctcttcccccaaaaccaaggacaccctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtggtggacgtgagcc
 acgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaagccgcgggaggagcagtacaa
 30 cagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggcttccaacaagc
 cctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggac
 gagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaaggcttctatcccagcgacatgccgtggagtgggagagcaatgggca
 gccggagaactacaagaccacgccccctgctggactccgacggctccttctctctatagcaagctcaccgtggacaagagcag
 gtggcagcaggggaacgttctctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggt

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения пациента, имеющего заболевание, характеризующееся отложениями бета-амилоида (A β), включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела к N3pG A β в комбинации с эффективным количеством ингибитора O-Glcnacase (OGA),

причем ингибитор OGA представляет собой соединение формулы:



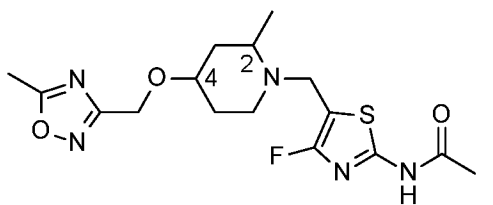
или его фармацевтически приемлемую соль.

10

2. Способ по п. 1, в котором заболевание, характеризующееся отложениями амилоида бета (A β), выбрано из группы, состоящей из доклинической болезни Альцгеймера (БА), клинической БА, продромальной БА, легкой деменции при БА, умеренной деменции при БА, тяжелой деменции при БА, синдрома Дауна, клинической церебральной амилоидной ангиопатии и доклинической церебральной амилоидной ангиопатии.

15

3. Способ по п. 1, в котором метил в положении 2 ингибитора OGA находится в *цис*-конфигурации относительно кислорода в положении 4 пиперидинового кольца:



20

4. Способ по п. 3, в котором ингибитор OGA представляет собой N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамид.

25

5. Способ по п. 4, в котором ингибитор OGA имеет кристаллическую форму.

6. Способ по п. 5, в котором соединение характеризуется пиком на спектре рентгеновской порошковой дифрактометрии при угле дифракции 2-тета 12,1° в

комбинации с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из 15,3°, 21,6°, 22,2°, 22,7°, 23,5°, 24,3° и 26,8°, с допуском на углы дифракции 0,2 градуса.

7. Способ по п. 1, в котором антитело к N3pG A β содержит переменную область легкой цепи (LCVR) и переменную область тяжелой цепи (HCVR), причем LCVR содержит определяющие комплементарности области (CDR) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, а HCVR содержит CDR HCDR1, HCDR2 и HCDR3, при этом аминокислотная последовательность:

5 i) LCDR1 задана SEQ ID NO: 5, аминокислотная последовательность LCDR2 задана SEQ ID NO: 6, аминокислотная последовательность LCDR3 задана SEQ ID NO: 7, аминокислотная последовательность HCDR1 задана SEQ ID NO: 8, аминокислотная последовательность HCDR2 задана SEQ ID NO: 9, а аминокислотная последовательность HCDR3 задана SEQ ID NO: 10; или

10 ii) LCDR1 задана SEQ ID NO: 15, аминокислотная последовательность LCDR2 задана SEQ ID NO: 16, аминокислотная последовательность LCDR3 задана SEQ ID NO: 17, аминокислотная последовательность HCDR1 задана SEQ ID NO: 18, аминокислотная последовательность HCDR2 задана SEQ ID NO: 19, а аминокислотная последовательность HCDR3 задана SEQ ID NO: 20.

20 8. Способ по п. 7, в котором антитело к N3pG A β содержит переменную область легкой цепи (LCVR) и переменную область тяжелой цепи (HCVR), причем аминокислотная последовательность:

i) LCVR задана SEQ ID NO: 1, а аминокислотная последовательность HCVR задана SEQ ID NO: 2; или

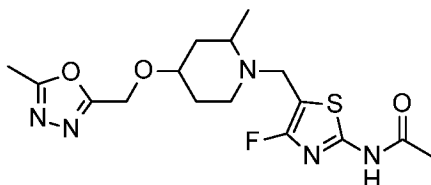
25 ii) LCVR задана SEQ ID NO: 11, а аминокислотная последовательность HCVR задана SEQ ID NO: 12.

9. Способ по п. 8, в котором антитело к N3pG A β содержит легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC), причем аминокислотная последовательность:

30 i) LC задана SEQ ID NO: 3, а аминокислотная последовательность HC задана SEQ ID NO: 4; или

ii) LC задана SEQ ID NO: 13, а аминокислотная последовательность HC задана SEQ ID NO: 14.

10. Способ лечения пациента, имеющего заболевание, характеризующееся отложениями бета-амилоида (A β), включающий введение нуждающемуся в таком лечении пациенту эффективного количества антитела к N3pG A β в комбинации с эффективным количеством ингибитора OGA, причем ингибитор OGA представляет собой соединение формулы:

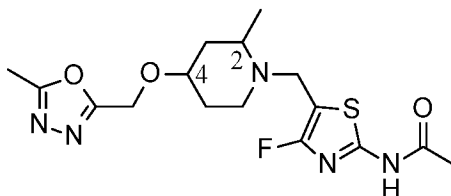


или его фармацевтически приемлемую соль.

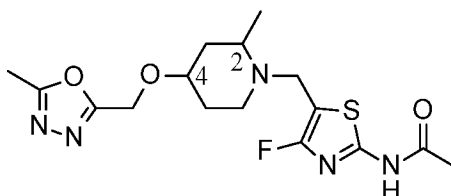
11. Способ по п. 10, в котором заболевание, характеризующееся отложениями амилоида бета (A β), выбрано из группы, состоящей из доклинической болезни Альцгеймера (БА), клинической БА, продромальной БА, легкой деменции при БА, умеренной деменции при БА, тяжелой деменции при БА, синдрома Дауна, клинической церебральной амилоидной ангиопатии или доклинической церебральной амилоидной ангиопатии.

15

12. Способ по п. 10, в котором метил в положении 2 ингибитора OGA находится в *цис*-конфигурации относительно кислорода в положении 4 пиперидинового кольца:



13. Способ по п. 10, в котором метил в положении 2 ингибитора OGA находится в *транс*-конфигурации относительно кислорода в положении 4 пиперидинового кольца:



14. Способ по п. 12, в котором ингибитор OGA представляет собой N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамид.

25

15. Способ по п. 13, в котором ингибитор OGA представляет собой N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамид.

5

16. Способ по п. 14, в котором ингибитор OGA имеет кристаллическую форму.

17. Способ по п. 15, в котором ингибитор OGA характеризуется пиком на спектре рентгеновской порошковой дифрактометрии при угле дифракции 2-тета $13,5^\circ$ в

10 комбинации с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из $5,8^\circ$, $13,0^\circ$, $14,3^\circ$, $17,5^\circ$, $20,4^\circ$, $21,4^\circ$ и $22,2^\circ$, с допуском на углы дифракции 0,2 градуса.

18. Способ по п. 10, в котором антитело к N3pG A β содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR) и вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), причем LCVR

15 содержит определяющие комплементарности области (CDR) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, а HCVR содержит CDR HCDR1, HCDR2 и HCDR3, при этом аминокислотная последовательность:

i) LCDR1 задана SEQ ID NO: 5, аминокислотная последовательность LCDR2 задана SEQ ID NO: 6, аминокислотная последовательность LCDR3 задана SEQ ID NO: 7, аминокислотная последовательность HCDR1 задана SEQ ID NO: 8, аминокислотная последовательность HCDR2 задана SEQ ID NO: 9, а аминокислотная последовательность HCDR3 задана SEQ ID NO: 10; или

ii) LCDR1 задана SEQ ID NO: 15, аминокислотная последовательность LCDR2 задана SEQ ID NO: 16, аминокислотная последовательность LCDR3 задана SEQ ID NO: 17, аминокислотная последовательность HCDR1 задана SEQ ID NO: 18, аминокислотная последовательность HCDR2 задана SEQ ID NO: 19, а аминокислотная последовательность HCDR3 задана SEQ ID NO: 20.

19. Способ по п. 18, в котором антитело к N3pG A β содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR) и вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), причем аминокислотная последовательность

i) LCVR задана SEQ ID NO: 1, а аминокислотная последовательность HCVR задана SEQ ID NO: 2; или

ii) LCVR задана SEQ ID NO: 11, а аминокислотная последовательность HCVR задана SEQ ID NO: 12.

35

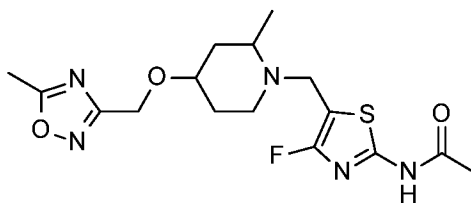
20. Способ по п. 19, в котором антитело к N3pG A β содержит легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC), причем аминокислотная последовательность:

5 i) LC задана SEQ ID NO: 3, а аминокислотная последовательность HC задана SEQ ID NO: 4; или

ii) LC задана SEQ ID NO: 13, а аминокислотная последовательность HC задана SEQ ID NO: 14.

21. Способ лечения пациента, имеющего заболевание, характеризующееся
10 отложениями бета-амилоида (A β) и агрегацией aberrантного тау-белка, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела к N3pG A β в комбинации с эффективным количеством ингибитора OGA,

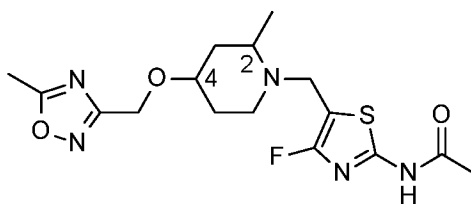
причем ингибитор OGA представляет собой соединение формулы:



15 или его фармацевтически приемлемую соль.

22. Способ по п. 21, в котором заболевание, характеризующееся отложениями
амилоида бета (A β) и агрегацией aberrантного тау-белка, выбрано из группы, состоящей
из доклинической болезни Альцгеймера (БА), клинической БА, продромальной БА,
20 легкой деменции при БА, умеренной деменции при БА, тяжелой деменции при БА,
синдрома Дауна, клинической церебральной амилоидной ангиопатии и доклинической
церебральной амилоидной ангиопатии.

23. Способ по п. 21, в котором метил в положении 2 ингибитора OGA находится в *цис*-
25 конфигурации относительно кислорода в положении 4 пиперидинового кольца:



24. Способ по п. 23, в котором ингибитор OGA представляет собой N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамид.

5 25. Способ по п. 24, в котором ингибитор OGA имеет кристаллическую форму.

26. Способ по п. 25, в котором соединение характеризуется пиком на спектре рентгеновской порошковой дифрактометрии при угле дифракции 2-тета $12,1^\circ$ в комбинации с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из $15,3^\circ$, $21,6^\circ$,
10 $22,2^\circ$, $22,7^\circ$, $23,5^\circ$, $24,3^\circ$ и $26,8^\circ$, с допуском на углы дифракции 0,2 градуса.

27. Способ по п. 21, в котором антитело к N3pG A β содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR) и вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), причем LCVR содержит определяющие комплементарности области (CDR) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, а
15 HCVR содержит CDR HCDR1, HCDR2 и HCDR3, при этом аминокислотная последовательность:

i) LCDR1 задана SEQ ID NO: 5, аминокислотная последовательность LCDR2 задана SEQ ID NO: 6, аминокислотная последовательность LCDR3 задана SEQ ID NO: 7, аминокислотная последовательность HCDR1 задана SEQ ID NO: 8, аминокислотная
20 последовательность HCDR2 задана SEQ ID NO: 9, а аминокислотная последовательность HCDR3 задана SEQ ID NO: 10; или

ii) LCDR1 задана SEQ ID NO: 15, аминокислотная последовательность LCDR2 задана SEQ ID NO: 16, аминокислотная последовательность LCDR3 задана SEQ ID NO: 17, аминокислотная последовательность HCDR1 задана SEQ ID NO: 18, аминокислотная
25 последовательность HCDR2 задана SEQ ID NO: 19, а аминокислотная последовательность HCDR3 задана SEQ ID NO: 20.

28. Способ по п. 27, в котором антитело к N3pG A β содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR) и вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), причем
30 аминокислотная последовательность:

i) LCVR задана SEQ ID NO: 1, а аминокислотная последовательность HCVR задана SEQ ID NO: 2; или

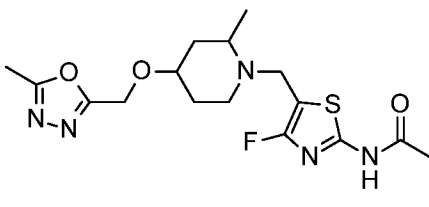
ii) LCVR задана SEQ ID NO: 11, а аминокислотная последовательность HCVR задана SEQ ID NO: 12.

29. Способ по п. 28, в котором антитело к N3pG A β содержит легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC), причем аминокислотная последовательность:

i) LC задана SEQ ID NO: 3, а аминокислотная последовательность HC задана SEQ ID NO: 4; или

5 ii) LC задана SEQ ID NO: 13, а аминокислотная последовательность HC задана SEQ ID NO: 14.

30. Способ лечения пациента, имеющего заболевание, характеризующееся отложениями бета-амилоида (A β) и агрегацией aberrантного тау-белка, включающий
10 введение нуждающемуся в таком лечении пациенту эффективного количества антитела к N3pG A β в комбинации с эффективным количеством ингибитора OGA, причем ингибитор OGA представляет собой соединение формулы:

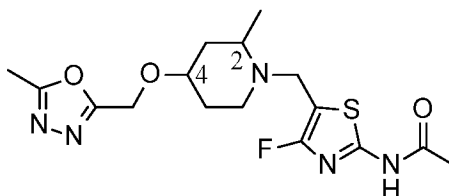


или его фармацевтически приемлемую соль.

15

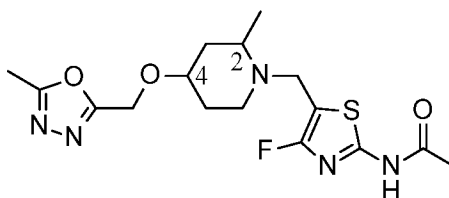
31. Способ по п. 30, в котором заболевание, характеризующееся отложениями амилоида бета (A β) и агрегацией aberrантного тау-белка, выбрано из группы, состоящей из доклинической болезни Альцгеймера, клинической БА, продромальной БА, легкой деменции при БА, умеренной деменции при БА, тяжелой деменции при БА, синдрома
20 Дауна, клинической церебральной амилоидной ангиопатии и доклинической церебральной амилоидной ангиопатии.

32. Способ по п. 30, в котором метил в положении 2 ингибитора OGA находится в *cis*-конфигурации относительно кислорода в положении 4 пиперидинового кольца:



25

33. Способ по п. 30, в котором метил в положении 2 ингибитора OGA находится в *trans*-конфигурации относительно кислорода в положении 4 пиперидинового кольца:



34. Способ по п. 32, в котором ингибитор OGA представляет собой N-[4-фтор-5-
5 [[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-
2-ил]ацетамид.
35. Способ по п. 33, в котором ингибитор OGA представляет собой N-[4-фтор-5-
10 [[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-
2-ил]ацетамид.
36. Способ по п. 34, в котором ингибитор OGA имеет кристаллическую форму.
37. Способ по п. 35, в котором ингибитор OGA характеризуется пиком на спектре
15 рентгеновской порошковой дифрактометрии при угле дифракции 2-тета $13,5^\circ$ в
комбинации с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из $5,8^\circ$, $13,0^\circ$,
 $14,3^\circ$, $17,5^\circ$, $20,4^\circ$, $21,4^\circ$ и $22,2^\circ$, с допуском на углы дифракции 0,2 градуса.
38. Способ по п. 30, в котором антитело к N3pG A β содержит вариабельную область
20 легкой цепи (LCVR) и вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), причем LCVR
содержит определяющие комплементарности области (CDR) LCDR1, LCDR2 и LCDR3, а
HCVR содержит CDR HCDR1, HCDR2 и HCDR3, при этом аминокислотная
последовательность:
- i) LCDR1 задана SEQ ID NO: 5, аминокислотная последовательность LCDR2
задана SEQ ID NO: 6, аминокислотная последовательность LCDR3 задана SEQ ID NO: 7,
25 аминокислотная последовательность HCDR1 задана SEQ ID NO: 8, аминокислотная
последовательность HCDR2 задана SEQ ID NO: 9, а аминокислотная последовательность
HCDR3 задана SEQ ID NO: 10; или
- ii) LCDR1 задана SEQ ID NO: 15, аминокислотная последовательность LCDR2
задана SEQ ID NO: 16, аминокислотная последовательность LCDR3 задана SEQ ID NO:
30 17, аминокислотная последовательность HCDR1 задана SEQ ID NO: 18, аминокислотная
последовательность HCDR2 задана SEQ ID NO: 19, а аминокислотная последовательность
HCDR3 задана SEQ ID NO: 20.

39. Способ по п. 38, в котором антитело к N3pG A β содержит переменную область легкой цепи (LCVR) и переменную область тяжелой цепи (HCVR), причем аминокислотная последовательность

5 i) LCVR задана SEQ ID NO: 1, а аминокислотная последовательность HCVR задана SEQ ID NO: 2; или

 ii) LCVR задана SEQ ID NO: 11, а аминокислотная последовательность HCVR задана SEQ ID NO: 12.

10 40. Способ по п. 39, в котором антитело к N3pG A β содержит легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC), причем аминокислотная последовательность:

 i) LC задана SEQ ID NO: 3, а аминокислотная последовательность HC задана SEQ ID NO: 4; или

15 ii) LC задана SEQ ID NO: 13, а аминокислотная последовательность HC задана SEQ ID NO: 14.