



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

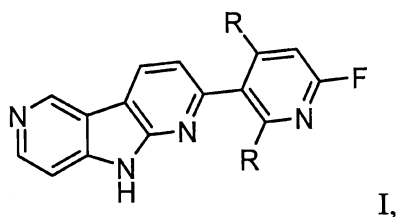
(11) 
1-0021289

(51)⁷ **C07D 471/04, A61K 31/44, A61P 25/28** (13) **B**

(21) 1-2016-01238 (22) 06.10.2014
(86) PCT/EP2014/071283 06.10.2014 (87) WO2015/052105 16.04.2015
(30) 13187764.9 08.10.2013 EP
(45) 25.07.2019 376 (43) 25.07.2016 340
(73) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)
Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel, Switzerland
(72) GOBBI, Luca (CH), KNUST, Henner (DE), KOERNER, Matthias (DE), MURI,
Dieter (CH)
(74) Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) **HỢP CHẤT DIAZACARBAZOL CÓ TÁC DỤNG LÀM PHỐI TỬ DÙNG TRONG
PHƯƠNG PHÁP CHỤP CẮT LỚP PHÁT XẠ POSITRON ĐỂ PHÁT HIỆN
PROTEIN TAU (TAU-PET) VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY**

(57) **Sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức chung:**



trong đó:

R là hydro hoặc triti;

F là flo hoặc ¹⁸flo;

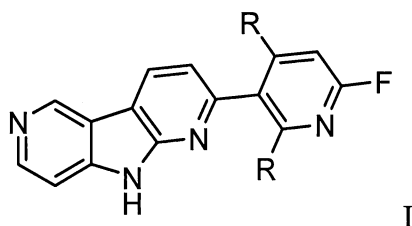
hoặc muối cộng axit được dụng.

Hợp chất có công thức I bao gồm 2-(6-flo-pyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrol, ³H-2-(6-flo-pyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrol và [18F]-2-(6-flo-pyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrol.

Hợp chất nêu trên có thể được sử dụng để gắn kết và chụp hình các kết tụ tau và các kết tụ dạng tấm beta có liên quan bao gồm, ngoài các kết tụ khác, kết tụ beta- amyloid hoặc kết tụ alpha-synuclein.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức chung:



trong đó:

R là hydro hoặc triti; và

F là flo hoặc ^{18}F ;

hoặc muối cộng axit được dụng.

Hợp chất có công thức I bao gồm 2-(6-flo-pyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrol, ^3H -2-(6-flo-pyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrol và $[^{18}\text{F}]$ -2-(6-flo-pyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrol.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các hợp chất có công thức cấu tạo chung tương tự đã được mô tả trong tài liệu WO2009/102498 dùng để chụp hình *in vivo* các chất lắng đọng amyloid để chẩn đoán bệnh Alzheimer. Tuy nhiên, tài liệu này không mô tả cụ thể hợp chất vòng ba vòng có 3 nguyên tử N.

Tài liệu US2011/0182812 mô tả hợp chất indol-5-yl-quinolin có khả năng gắn kết với các protein tau và các peptit beta-amyloid.

Đã biết rằng, các hợp chất này có thể được sử dụng để gắn kết và chụp hình các kết tụ tau và các kết tụ dạng tấm beta có liên quan bao gồm, ngoài các kết tụ khác dạng beta-amyloid hoặc kết tụ alpha-synuclein, đặc biệt là được sử dụng để gắn kết và chụp hình các kết tụ tau ở các bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer.

Bệnh Alzheimer (AD) là một dạng rối loạn thoái hóa thần kinh tiến triển đặc trưng bởi chứng suy giảm nhận thức, mất trí nhớ vĩnh viễn, mất phương hướng và suy giảm khả năng sử dụng ngôn ngữ (Arch. Neurol. 1985, 42(11), 1097-1105). Nghiên cứu trên khu vực lát cắt não bị chết ở người mắc AD phát hiện thấy có các mảng lão suy (senile plaque-SP) dư thừa, gồm có peptit beta-amyloid ($A\beta$), và nhiều đám rối sợi thần kinh (neurofibrillary tangle-NFT) được tạo ra từ các sợi protein tau được siêu phosphoryl hóa.

Tau thuộc họ protein liên quan đến cấu trúc vi ống và chủ yếu được biểu hiện trong các neuron nơi mà nó đóng vai trò quan trọng trong lắp ráp các monome tubulin thành cấu trúc vi ống để tạo nên mạng lưới cấu trúc vi ống thần kinh dưới dạng các đường để vận chuyển sợi trục (Brain Res. Rev. 2000, 33(1), 95-130). Tau được dịch mã từ đơn gen nằm trên nhiễm sắc thể 17 và mức biểu hiện được điều hòa tăng bằng cơ chế ghép thay thế tạo ra sáu dạng đồng chức năng khác nhau trong não người trưởng thành mà có thể phân biệt được nhờ số lượng miền gắn kết của chúng. Các cơ chế chủ yếu dẫn đến quá trình siêu phosphoryl hóa tau, gấp nếp sai và kết tụ chưa được biết rõ, nhưng quá trình lắng đọng các kết tụ tau thì tuân theo con đường không gian-thời gian có bản ở cả cấp độ nội bào cũng như ở cấp độ định khu não.

Phát hiện gần đây về các đột biến gen tau gây ra bệnh sa sút trí tuệ trán-thái dương (frontotemporal dementia-FTD) với hội chứng liệt rung Parkinson liên quan đến nhiễm sắc thể 17 đã củng cố thêm vai trò nổi bật được cho của tau trong quá trình phát sinh các rối loạn thoái hóa thần kinh và nhấn mạnh thực tế là các tập hợp khác nhau của các dạng đồng chức năng tau được biểu hiện trong các quần thể neuron khác nhau có thể gây ra các bệnh lý khác nhau (Biochim. Biophys. Acta 2005, 1739(2) 240-250). Các bệnh thoái hóa thần kinh đặc trưng bởi sự tích tụ tau bệnh lý được gọi là 'bệnh do protein tau' (Ann. Rev. Neurosci. 2001, 24, 1121-1159). Ngoài AD và FTD, các bệnh do protein tau khác bao gồm bệnh liệt trên nhân tiến triển (progressive supranuclear palsy-PSP), chứng sa sút trí tuệ đặc trưng bởi nhiều đám rối sợi thần kinh, bệnh Pick, bệnh suy thoái thùy trán-thái dương (frontotemporal lobar degeneration-FTLD), hội chứng Down và các bệnh khác.

Mối tương quan trực tiếp giữa các vùng vỏ não với sự gia tăng mức độ trầm trọng của chứng sa sút trí tuệ đã được biết đến, điều này gợi ý rằng các kết tụ tau sinh

bệnh như NFT là chỉ thị đáng tin cậy cho quy trình thoái hóa thần kinh. Mức độ rối loạn NFT trong AD được xác định bằng các giai đoạn Braak (Acta Neuropathol. 1991, 82, 239-259). Giai đoạn Braak I và II được xác định khi hạn chế rối loạn NFT chủ yếu đến vùng liên thùy trán thái dương của não, giai đoạn III và IV được chẩn đoán khi liên quan đến các vùng rìa như vùng hải mã, và giai đoạn V và VI khi phát hiện thấy rối loạn vỏ não mở rộng.

Hiện nay, chỉ có thể phát hiện các kết tụ tau nhờ phân tích mô học các nguyên liệu sinh thiết hoặc mô tử thi. Việc chụp hình *in vivo* bệnh do tau đem lại nhận thức mới về sự lắng đọng của các kết tụ tau trong não người và cho phép xác định không xâm lấn mức độ bệnh do tau gây ra, định lượng các thay đổi về sự lắng đọng tau theo thời gian, đánh giá mối tương quan của nó với việc nhận thức và phân tích độ hiệu lực của liệu pháp kháng tau. Các phối tử có thể dùng để phát hiện các kết tụ tau trong não sống phải đi qua hàng rào máu não và có ái lực và tính đặc hiệu cao đối với các kết tụ tau. Cuối cùng, các chất phóng xạ đánh dấu dùng để chụp hình thần kinh thành công phải có tính ưa mỡ thích hợp (logD 1-3) và trọng lượng phân tử thấp (<450), có sự thanh thải nhanh khỏi máu và tính gắn kết không đặc hiệu thấp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là tìm ra công cụ chụp hình để cải thiện việc chẩn đoán bằng cách nhận biết các bệnh nhân tiềm ẩn có lượng kết tụ tau trong não dư thừa mà chắc chắn phát triển bệnh Alzheimer. Công cụ này cũng hữu ích để theo dõi sự tiến triển của bệnh. Khi được chất kháng kết tụ tau trở nên sẵn có thì việc chụp hình các đám rối tau trong não có thể tạo ra một công cụ cơ bản để theo dõi quá trình điều trị.

Mục đích khác của sáng chế là mô tả phương pháp chụp hình các chất lắng đọng kết tụ tau, bao gồm:

- đưa lượng chế phẩm có thể phát hiện được vào động vật có vú
- để hợp chất có công thức I có đủ thời gian kết hợp với các chất lắng đọng kết tụ tau, và
- phát hiện hợp chất kết hợp với một hoặc nhiều chất lắng đọng kết tụ tau.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất được phẩm, chứa hợp chất có công thức I và chất mang được dùng, có thể được sử dụng để nhận biết các bệnh nhân tiềm ẩn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. A: Phóng xạ đồ tự ghi của ^3H -2-(6-flo-pyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrol được ủ với lát cắt vỏ não của người có nguồn gốc từ bệnh nhân mắc AD ở giai đoạn Braak V.

Fig. B: Chụp hình phóng xạ tự động *in vitro* bằng cách sử dụng các lát cắt não mắc bệnh Alzheimer (AD) ở người

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa về các thuật ngữ chung sau được sử dụng trong phần mô tả sẽ được áp dụng bất kể thuật ngữ đang nhắc đến xuất hiện một mình hay ở dạng kết hợp.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "alkyl thấp" chỉ nhóm hydrocarbon no, tức là nhóm hydrocarbon béo bao gồm mạch cacbon thẳng hoặc phân nhánh có 1 đến 7 nguyên tử cacbon. Các ví dụ về "alkyl" là metyl, etyl, n-propyl, và isopropyl.

^3H chỉ nguyên tử triti.

F chỉ nguyên tử flo hoặc nguyên tử ^{18}F .

Thuật ngữ "nhóm rời chuyên" chỉ halogen hoặc sulfonat. Các ví dụ về sulfonat là tosylat, mesylat, triflat, nosylat hoặc brosylat.

Thuật ngữ "muối được dùng" hoặc "muối cộng axit được dùng" bao gồm các muối với các axit vô cơ và axit hữu cơ, như axit clohydric, axit nitric, axit sulfuric, axit phosphoric, axit xitric, axit formic, axit fumaric, axit maleic, axit axetic, axit suxinic, axit tartric, axit metan-sulfonic, axit p-toluensulfonic và các axit tương tự.

Đã phát hiện được rằng hợp chất có công thức I có thể được sử dụng để gắn kết và chụp hình các kết tụ tau và các kết tụ dạng tấm beta có liên quan bao gồm, ngoài các kết tụ khác, các kết tụ beta-amyloid hoặc các kết tụ alpha-synuclein.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến hợp chất có công thức I, trong đó hợp chất này là 2-(6-flo-pyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrol, ^3H -2-(6-flo-pyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrol và $[^{18}\text{F}]$ -2-(6-flo-pyridin-3-yl)-9H-dipyrido [2,3-b;3',4'-d]pyrol.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến các hợp chất có công thức I khác, trong đó R là hydro, hợp chất này là 2-(6-flo-pyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrrol.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I, trong đó R là triti, ví dụ, hợp chất sau ^3H -2-(6-flo-pyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrrol.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức I, trong đó F là ^{18}F , ví dụ, $[^{18}\text{F}]$ -2-(6-flo-pyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrrol.

Vị trí cho R trong công thức I, nếu R là triti, là vị trí chắc chắn nhất. Nhưng triti cũng có thể được tìm thấy với lượng nhỏ trong các vị trí khác của phân tử. Thông thường, chỉ một trong số R là triti.

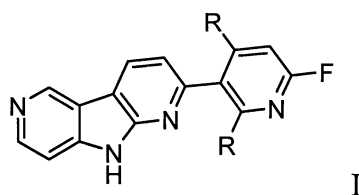
Hợp chất có công thức I có thể được sử dụng để gắn kết và chụp hình các kết tụ tau, kết tụ beta-amyloid, kết tụ alpha-synuclein hoặc kết tụ huntingtin.

Hợp chất có công thức I được ưu tiên để sử dụng để gắn kết và chụp hình kết tụ tau ở các bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer.

Ngoài ra, hợp chất có công thức I có thể được sử dụng trong nghiên cứu gắn kết tau.

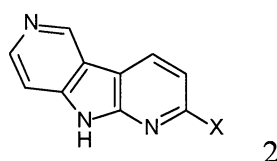
Hợp chất có công thức I thích hợp để chụp hình chẩn đoán các kết tụ tau trong não của động vật có vú.

Hợp chất có công thức I:

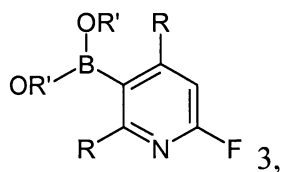


và các muối được dụng của nó có thể được điều chế bằng các quy trình được mô tả dưới đây, trong đó quy trình này bao gồm bước:

a) kết hợp hợp chất có công thức 2 (X = Cl, Br):

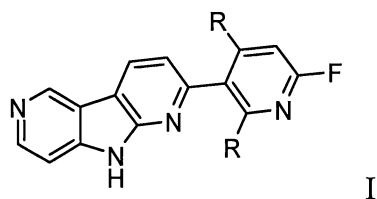


với axit boric hoặc este của axit boric thích hợp có công thức 3:



trong đó R' là hydro hoặc alkyl thấp,

để tạo ra hợp chất có công thức I:

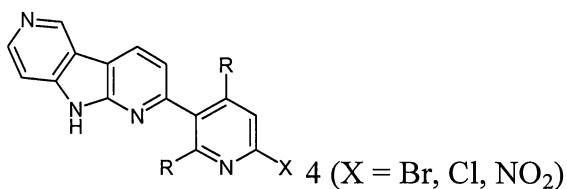


trong đó R là hydro,

và, nếu muốn, chuyển hóa hợp chất thu được thành muối cộng axit được dùng hoặc thành hợp chất có công thức I, trong đó R là triti

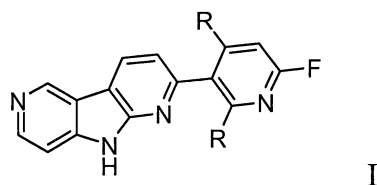
hoặc

b) kết hợp hợp chất có công thức 4:



với các chất phản ứng flo hóa thích hợp được chọn từ kali florua hoặc tetrabutylamoni florua,

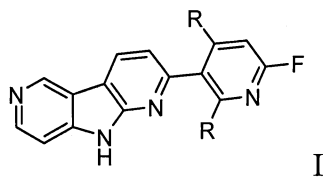
để tạo ra hợp chất có công thức I:



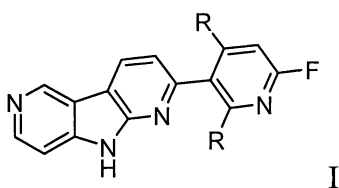
trong đó phần tử R là hydro

và, nếu muốn, chuyển hóa hợp chất thu được thành muối cộng axit được dùng hoặc thành hợp chất có công thức I, trong đó R là triti

c) cho hợp chất có công thức I:

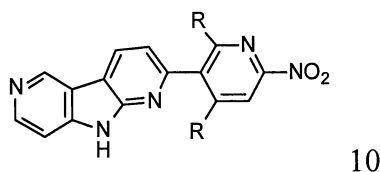


trong đó R là hydro, phản ứng với khí triti với sự có mặt của chất xúc tác, ví dụ, iridi, ruteni, rodi hoặc paladi chứa các phức chất trong dung môi thích hợp, ví dụ, diclometan, clobenzen, DMF, DMSO hoặc các hỗn hợp của chúng để tạo ra hợp chất có công thức I:

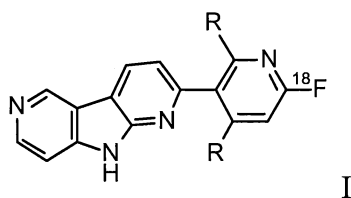


trong đó R là triti, và, nếu muốn, chuyển hóa các hợp chất thu được thành muối cộng axit được dùng, hoặc

d) hòa tan hợp chất có công thức:



trong dimetylsulfoxit và nghiền bằng sóng âm trước khi kết thúc quá trình bắn phá bằng nước ion [18]florua để tạo ra hợp chất có công thức:



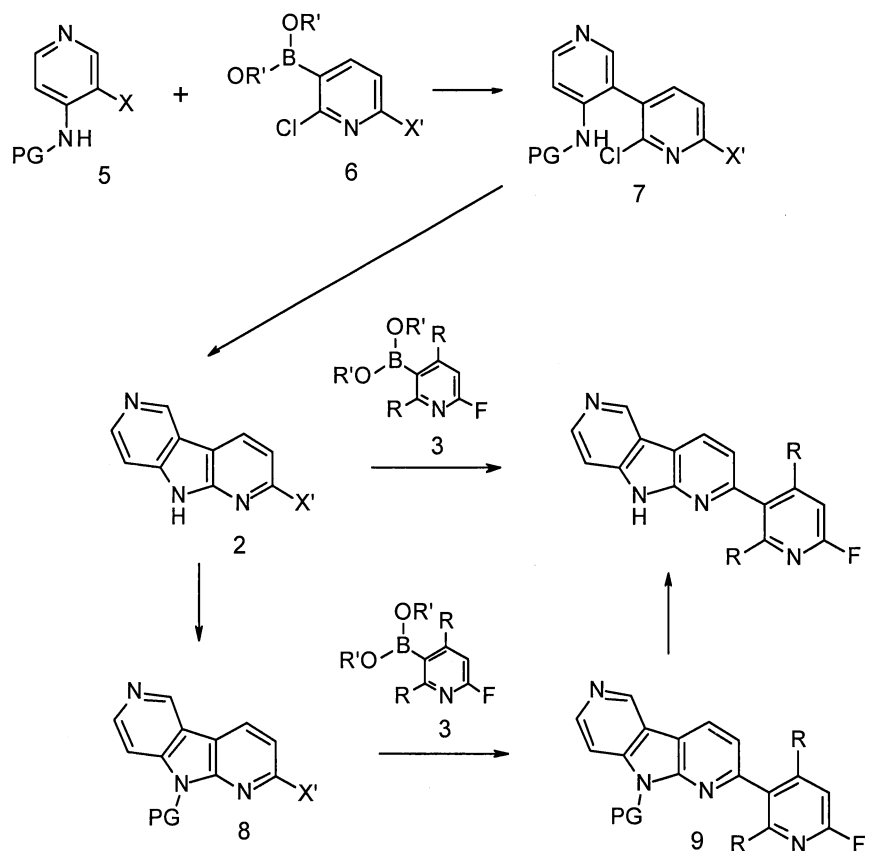
và, nếu muốn, chuyển hóa các hợp chất thu được thành các muối cộng axit được dùng.

Các sơ đồ 1-2 sau mô tả chi tiết hơn các quy trình điều chế hợp chất có công thức I. Các nguyên liệu ban đầu là các hợp chất đã biết hoặc có thể được điều chế theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Việc điều chế hợp chất có công thức I theo sáng chế có thể được tiến hành theo phương pháp tổng hợp tuần tự hoặc đồng thời. Các kỹ năng cần để tiến hành các phản ứng và tinh chế các sản phẩm thu được là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này. Các phần tử thế và các chỉ số được sử dụng trong phần mô tả các quy trình sau có ý nghĩa nêu trong bản mô tả ở trên trừ khi có quy định khác.

Cụ thể hơn là, các hợp chất có công thức I có thể được điều chế bằng các phương pháp nêu dưới đây, bằng các phương pháp nêu trong các ví dụ hoặc bằng các phương pháp tương tự. Các điều kiện phản ứng thích hợp cho các bước phản ứng riêng rẽ là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này. Trình tự phản ứng không chỉ giới hạn ở trình tự được thể hiện trong các sơ đồ 1-2, tuy nhiên, phụ thuộc vào các nguyên liệu ban đầu và khả năng phản ứng tương ứng của chúng, trình tự các bước phản ứng có thể thay đổi tự do. Các nguyên liệu ban đầu có thể mua được trên thị trường hoặc có thể được điều chế bằng các phương pháp tương tự với các phương pháp nêu dưới đây, bằng các phương pháp được mô tả trong tài liệu tham khảo trích dẫn trong bản mô tả hoặc trong các ví dụ, hoặc bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

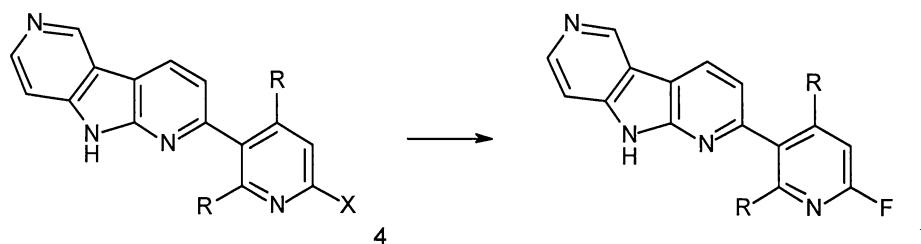
Sơ đồ 1



Theo sơ đồ 1, hợp chất có công thức I, trong đó R là hydro, có thể được điều chế bắt đầu từ 4-amino-pyridin được bảo vệ 5 ($X = \text{Cl}, \text{Br}$) và axit boric của 2,6-di-pyridin được halogen hóa 6 ($R' = \text{H}, \text{alkyl thấp}$). Các điều kiện kết hợp chéo được xúc tác bởi kim loại chuyển tiếp bằng cách sử dụng hệ chất xúc tác chẳng hạn như $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ và PPh_3 và bazơ chẳng hạn như triethylamin trong dung môi thích hợp như DMF thu được bipyridin 7. Việc loại nhóm bảo vệ và đóng vòng nội phân tử có thể được thực hiện là quy trình một bước bằng cách sử dụng bazơ chẳng hạn như kali cacbonat và chất hoạt hóa chẳng hạn như 18-crown-6 trong dung môi thích hợp như DMF và thu được hợp chất trung gian 1,6-diazacarbazol 2. Việc chuyển đổi cuối cùng thành hợp chất có công thức I có thể được hoàn thành bằng phản ứng kết hợp chéo được xúc tác bởi kim loại chuyển tiếp trực tiếp bằng cách sử dụng các axit pyridin boric thích hợp 3, chất xúc tác chẳng hạn như $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ và bazơ chẳng hạn như kali cacbonat trong dung môi thích hợp như DMF. Theo một cách khác, 1,6-diazacarbazol 2 trước tiên được chuyển hóa thành hợp chất trung gian được bảo vệ 8 thông qua phản ứng với chất phản ứng thích hợp, ví dụ, di-tert-butylidicacbonat, trong dung môi thích

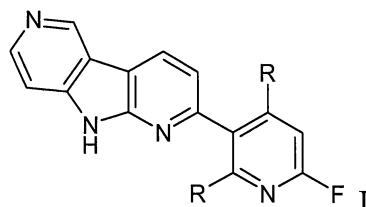
hợp chẳng hạn như DMF, sau đó là phản ứng kết hợp chéo được xúc tác bởi kim loại chuyển tiếp để tạo ra hợp chất trung gian 9 bằng cách sử dụng axit pyridin boric thích hợp 3, chất xúc tác chẳng hạn như Pd(dppf)Cl_2 và bazơ chẳng hạn như kali cacbonat trong dung môi như DMF. Việc loại nhóm bảo vệ sau đó tạo ra được hợp chất có công thức I.

Sơ đồ 2



Theo sơ đồ 2, hợp chất có công thức I, trong đó R là hydro, có thể được điều chế bằng cách xử lý hợp chất có công thức 4 ($\text{X} = \text{Br}, \text{Cl}, \text{nitro}$); được điều chế theo quy trình tổng hợp hợp chất có công thức I được mô tả trong sơ đồ 1, với chất phản ứng flo hóa thích hợp chẳng hạn như kali florua hoặc tetrabutylamoni florua trong dung môi thích hợp chẳng hạn như DMF hoặc DMSO.

Hợp chất có công thức I với R là triti hoặc F là ^{18}F :



có thể được điều chế theo cách thông thường như được mô tả trong các ví dụ cụ thể. Hợp chất có công thức I không đồng thời chứa triti và ^{18}F .

Phân lập và tinh chế hợp chất

Quá trình phân lập và tinh chế các hợp chất và hợp chất trung gian được mô tả ở đây có thể được tiến hành, nếu muốn, bằng quy trình tách hoặc tinh chế thích hợp bất kỳ như, ví dụ, lọc, chiết, kết tinh, sắc ký cột, sắc ký lớp mỏng, sắc ký lớp dày, sắc ký lỏng cao áp hoặc thấp áp điều chế hoặc sự kết hợp của các quy trình này. Các minh họa cụ thể về quy trình tách và phân lập thích hợp có thể được tìm thấy bằng cách tham khảo các quy trình điều chế và ví dụ nêu dưới đây. Tuy nhiên, các quy trình tách

và phân lập tương đương khác, tất nhiên, cũng có thể được sử dụng. Các hỗn hợp triệt quang của hợp chất không đối xứng có công thức I có thể được tách bằng cách sử dụng HPLC không đối xứng.

Muối của hợp chất có công thức I

Hợp chất có công thức I là bazơ và có thể được chuyển hóa thành muối cộng axit tương ứng. Quá trình chuyển hóa này được hoàn thành bằng cách xử lý bằng ít nhất một lượng tỷ lệ của axit thích hợp, như axit clohydric, axit bromhydric, axit sulfuric, axit nitric, axit phosphoric và các axit tương tự, và các axit hữu cơ như axit axetic, axit propionic, axit glycolic, axit pyruvic, axit oxalic, axit malic, axit malonic, axit succinic, axit maleic, axit fumaric, axit tartaric, axit citric, axit benzoic, axit cinnamic, axit mandelic, axit metansulfonic, axit etansulfonic, axit p-toluensulfonic, axit salicylic và axit tương tự. Cụ thể là, bazơ tự do được hòa tan trong dung môi hữu cơ không phản ứng như diethyl ete, etyl axetat, clorofom, etanol hoặc metanol và dung môi tương tự, và axit nêu trên được bổ sung trong dung môi tương tự. Nhiệt độ được duy trì nằm trong khoảng từ 0°C đến 50°C. Muối thu được kết tủa tự nhiên hoặc có thể được kết tủa bằng cách bổ sung dung môi ít phân cực hơn.

Các muối cộng axit của hợp chất bazơ có công thức I có thể được chuyển hóa thành bazơ tự do tương ứng bằng cách xử lý với ít nhất một đương lượng tỷ lệ của bazơ thích hợp như natri hoặc kali hydroxit, kali cacbonat, natri bicacbonat, amoniac, và bazơ tương tự.

Hợp chất được nghiên cứu theo thử nghiệm được nêu sau đây.

Thử nghiệm thay thế phối tử phóng xạ tau *in vitro*

Thử nghiệm gắn kết *in vitro* này dùng để đánh giá ái lực của hợp chất đối với các kết tụ tau tự nhiên. Hợp chất được ủ đồng thời với phối tử phóng xạ đặc hiệu của tau đã biết rõ [³H]T808 và khả năng thay thế [³H]T808 của hợp chất được xác định bằng kỹ thuật chụp hình phóng xạ tự động *in vitro* bằng cách sử dụng các lát cắt não mắc bệnh Alzheimer (AD) ở người (xem Fig. B).

Nguyên liệu

Não người mắc AD được mua của Banner Sun Health Research Institute (Sun City, AZ, USA). Quá trình chẩn đoán bệnh lý AD được thực hiện theo tiêu chí NIA-

Reagan Institute chuẩn dựa trên dữ liệu về bệnh thần kinh. Phôi tử phóng xạ [^3H]T808 được tổng hợp trong nhà ([^3H]-2-[4-(2-flo-etyl)-piperidin-1-yl]-benzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyrimidin, độ tinh khiết phóng xạ hóa học là 99,0%). T808 lạnh, dưới dạng chất chuẩn được sử dụng là (2-[4-(2-flo-etyl)-piperidin-1-yl]-benzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyrimidin). Để chụp hình phóng xạ tự động, các đĩa chụp hình FujiFilm (BAS-IP TR 2025) được cho tiếp xúc với các lát cắt não nêu trên và được đọc bằng máy đọc FujiFilm IP (BAS-5000).

Phương pháp

Các lát cắt não mắc AD của người có độ dày mười μm được tạo ra bằng máy điều lạnh (Leica CM3050) ở nhiệt độ buồng -17°C và nhiệt độ vật -15°C . Các lát cắt này được chuyển lên các vật kính hiển vi Histobond+ (Marienfeld Laboratory Glasware). Sau khi làm khô trong 3 giờ ở nhiệt độ trong phòng, các lát cắt này được bảo quản ở nhiệt độ -20°C . Các lát cắt này được ủ với phôi tử phóng xạ (10nM) và hợp chất lạnh tương ứng (ở các nồng độ khác nhau) trong 50mM dung dịch đệm Tris, độ pH = 7,4 ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút. Sau khi rửa 3 lần trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ 4°C trong 50mM dung dịch đệm Tris, độ pH = 7,4 và 3 lần nhúng nhanh trong nước cất ở nhiệt độ 4°C , các lát cắt này được làm khô ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 3 giờ. Các lát cắt này được đặt trong hộp chứa FujiFilm (BAS 2025), cho tiếp xúc với đĩa chụp hình trong năm ngày và sau đó được quét ở độ phân giải $25\mu\text{M}$ /điểm ảnh.

Phân tích dữ liệu

Cường độ tín hiệu (Dens - PSL/mm 2) trong vùng quan tâm (ROI) của phóng xạ đồ tự ghi được định lượng bằng phần mềm phân tích MCID (phiên bản 7.0, Imaging Research Inc.). Sự gắn kết đặc hiệu (SB) của [^3H]T808 khi không có hoặc có hợp chất được tính bằng cách trừ tín hiệu gắn kết không đặc hiệu trong mẫu trắng, nhờ đó thu được $\text{SB}_{\text{một mình } [^3\text{H}]T808}$ và $\text{SB}_{\text{hợp chất}}$. % thay thế theo các hợp chất khác nhau được tính như sau:

$$\% \text{ thay thế} = 100 - (\text{SB}_{\text{hợp chất}} / \text{SB}_{\text{một mình } [^3\text{H}]T808}) * 100.$$

Dữ liệu hợp lệ

Trong mỗi thử nghiệm, T808 lạnh được sử dụng để làm chất chuẩn nội dương. Việc ủ đồng thời các lượng đẳng mol của T808 nóng và T808 lạnh được mong đợi là làm giảm mức độ gắn kết đặc hiệu khoảng 50%.

Tài liệu tham khảo

A.K. Szardenings et al. 'Imaging agents for detecting neurological disorders'.
Đơn patent Mỹ số US20110182812

W. Zhang et al., 'A highly selective and specific PET tracer for imaging of tau pathologies'. *Journal of Alzheimer's Disease* 31 (2012) 601-612.

Bảng 1

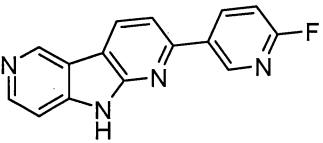
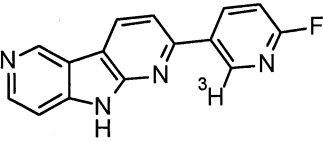
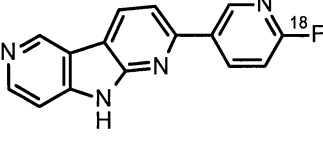
Cấu trúc	Tên hợp chất	% thay thế [³ H]T808 (10nM)	Ví dụ
	2-(6-flo-pyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrrol	43	1
	³ H-2-(6-flo-pyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrrol		2
	[18F]-2-(6-flo-pyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrrol		3

Fig. A:

Phóng xạ đồ tự ghi của ³H-2-(6-flo-pyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrrol được ủ với lát cắt vỏ não của người có nguồn gốc từ bệnh nhân mắc AD ở giai đoạn Braak V. Nồng độ phối tử phóng xạ là 3,2nM. Phối tử phóng xạ này thể hiện hiện tượng nhuộm đốm các kết tụ tau trong mô hình phân phối theo lớp.

Hợp chất có công thức I và các muối được dụng của nó có thể được sử dụng ở dạng chế phẩm được. Các chế phẩm được này có thể được sử dụng ở dạng các dung dịch tiêm.

Hợp chất có công thức I và các muối được dụng của nó có thể được xử lý BĂNG chất mang được lý không phản ứng, vô cơ hoặc hữu cơ để sản xuất chế phẩm được. Các chất mang thích hợp để pha chế dung dịch và sirô là, ví dụ, nước, rượu polyhydric, sucroza, đường khử, glucoza và chất mang tương tự. Các chất bổ trợ, như rượu, rượu polyhydric, glyxerol, dầu thực vật và chất tương tự, có thể được sử dụng cho dung dịch tiêm chứa nước chứa các muối hòa tan trong nước của hợp chất có công thức I, nhưng thường thì không cần thiết. Các chất mang thích hợp cho thuốc đạn, ví dụ, là dầu tự nhiên hoặc đã hóa rắn, sáp, chất béo, rượu polyhydric bán lỏng hoặc lỏng và chất mang tương tự.

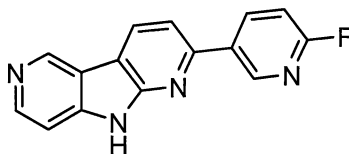
Ngoài ra, chế phẩm được có thể chứa các chất bảo quản, chất hòa tan, chất làm ổn định, chất thẩm ướt, chất nhũ hóa, chất làm ngọt, chất tạo màu, chất tạo hương vị, các muối làm thay đổi áp suất thẩm thấu, dung dịch đệm, chất che vị hoặc chất chống oxy hóa. Chúng cũng có thể còn chứa các chất có tác dụng điều trị bệnh khác.

Liều lượng có thể thay đổi trong giới hạn rộng và tất nhiên sẽ được điều chỉnh thích hợp theo từng yêu cầu trong từng trường hợp cụ thể.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

2-(6-fluoropyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrrol



Bước 1: tert-Butyl N-[3-(2,6-diclo-3-pyridyl)-4-pyridyl]carbamate

Hút chân không bình được gia nhiệt sơ bộ và làm đầy lại bằng khí argon vài lần và nạp tert-butyl 3-iodopyridin-4-ylcarbamate (4,56g, 14,2mmol), axit 2,6-diclopyridin-3-ylboric (5,46g, 28,4mmol), Pd(OAc)₂ (320mg, 1,42mmol) và triphenylphosphin (371mg, 1,41mmol) trong môi trường khí argon. Bổ sung triethylamin (4,32g, 5,94mL,

42,7mmol) trong DMF (137mL) và gia nhiệt hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ 100°C và khuấy trong 3 giờ. Làm bay hơi dung môi gần như hoàn toàn. Bổ sung nước và chiết sản phẩm thô dạng huyền phù hai lần bằng ethyl axetat. Rửa lớp hữu cơ được thu gom bằng nước (3 lần), làm khô bằng Na₂SO₄, lọc và làm bay hơi dung môi. Nghiền nhỏ sản phẩm thô với diclometan để tạo ra 1,92g sản phẩm mong muốn. Làm bay hơi pha diclometan và tinh chế bằng sắc ký nhanh sử dụng silica gel và gradien ethyl axetat/heptan) để tạo ra tổng cộng 3,39g (độ tinh khiết ~90%, hiệu suất 63%) tert-butyl N-[3-(2,6-diclo-3-pyridyl)-4-pyridyl]carbamate ở dạng chất rắn màu vàng nhạt.

MS: $m/z = 340,1$ (M+H)⁺.

Bước 2: 2-clo-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrrol

Gia nhiệt huyền phù chứa tert-butyl N-[3-(2,6-diclo-3-pyridyl)-4-pyridyl]carbamate (264mg, 776μmol), kali cacbonat (215mg, 1,55mmol) và 18-crown-6 (226mg, 854μmol) trong DMF (15,8mL) đến nhiệt độ 100°C và khuấy trong 3 giờ trong môi trường khí argon. Bổ sung nước và chiết sản phẩm thô dạng huyền phù bằng ethyl axetat hai lần. Rửa lớp hữu cơ được thu gom bằng nước (hai lần), nước muối, làm khô bằng Na₂SO₄, lọc và làm bay hơi dung môi. Nghiền nhỏ sản phẩm thô với lượng nhỏ metanol để tạo ra 2-clo-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrrol (105mg, hiệu suất 63%) ở dạng chất rắn màu vàng nhạt.

MS: $m/z = 204,3$ (M+H)⁺.

Bước 3: tert-butyl este của axit 2-clo-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrrol-9-carboxylic

Làm lạnh huyền phù của natri hydrua (26,5mg, 607μmol) trong DMF khô (1,5mL) đến nhiệt độ 0°C và trong điều kiện khí argon, bổ sung dung dịch chứa 2-clo-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrrol (103mg, 506μmol) trong DMF khô (3,0mL). Tiếp tục khuấy ở nhiệt độ 0°C trong thời gian 10 phút và ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút. Sau khi làm lạnh xuống nhiệt độ 0°C và bổ sung di-tert-butyl dicacbonat (132mg, 141μL) trong DMF khô (0,75mL) và tiếp tục khuấy ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Bổ sung nước và chiết hỗn hợp phản ứng hai lần bằng ethyl axetat. Rửa lớp hữu cơ được thu gom bằng nước (hai lần) và nước muối, làm khô bằng Na₂SO₄, lọc và làm bay hơi. Thu được tert-butyl este của axit 2-clo-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrrol-9-

carboxylic sau khi tinh chế bằng sắc ký nhanh sử dụng silica gel và gradien metanol/diclometan) ở dạng chất rắn màu trắng nhạt (113mg, 73,5%).

MS: $m/z = 304,1$ ($M+H$)⁺.

Bước 4: tert-butyl este của axit 2-(6-flo-pyridin-3-yl)-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrol-9-carboxylic

Bình vi sóng trong môi trường khí argon được nạp tert-butyl este của axit 2-clo-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrol-9-carboxylic (100mg, 329 μ mol), 2-flo-5-(4,4,5,5-tetrametyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)pyridin (147mg, 658 μ mol), kali cacbonat (137mg, 988 μ mol) và phức chất 1,1'-bis(diphenylphosphino)feroxen-paladi(II)diclorua diclometan (10,8mg, 13,2 μ mol) và bịt kín bình, hút chân không và làm đầy lại bằng argon. Bổ sung DMF (7mL) và gia nhiệt hỗn hợp phản ứng đến nhiệt độ 90°C và khuấy trong 17 giờ. Lọc hỗn hợp phản ứng. Bổ sung nước vào dịch lọc và chiết hỗn hợp phản ứng hai lần bằng etyl axetat. Rửa lớp hữu cơ được thu gom bằng nước (3 lần), làm khô bằng Na₂SO₄, lọc và làm bay hơi. Nghiền nhỏ hỗn hợp sản phẩm thô với lượng nhỏ metanol để tạo ra 2-(6-flo-pyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrol ($m/z = 265,1$ ($M+H$)⁺) ở dạng chất rắn màu đỏ nhạt (23mg với độ tinh khiết 80%, 21%). Làm bay hơi chất lỏng và tinh chế bằng sắc ký nhanh sử dụng silica gel và gradien metanol/diclometan) để tạo ra tert-butyl este của axit 2-(6-flo-pyridin-3-yl)-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrol-9-carboxylic ở dạng chất rắn màu trắng nhạt (12mg, 10%).

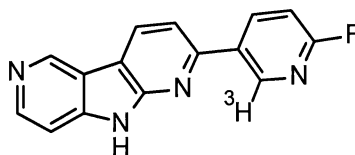
MS: $m/z = 365,2$ ($M+H$)⁺.

Bước 5: 2-(6-flo-pyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrol

Khuấy dung dịch màu vàng sáng chứa tert-butyl este của axit 2-(6-flo-pyridin-3-yl)-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrol-9-carboxylic (22mg, 60,4 μ mol) và axit trifloaxetic (33,3 μ L, 432 μ mol) trong diclometan (0,5mL) ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Sau khi làm lạnh đến nhiệt độ 0°C, bổ sung triethylamin (70 μ L, 503 μ mol) và loại bỏ tất cả các chất bay hơi. Tinh chế nguyên liệu thô bằng HPLC điều chế sử dụng cột Gemini C18 và nước với gradien triethylamin 0,1% /axetonitril) để tạo ra 2-(6-flo-pyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrol ở dạng chất rắn màu trắng nhạt (14mg, 88%).

MS: $m/z = 265,1$ ($M+H$)⁺.

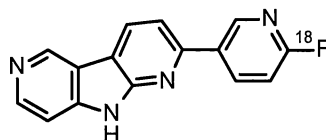
Ví dụ 2

³H-2-(6-fluoropyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrrol

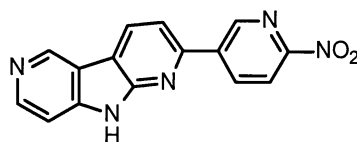
Trong bình triti hóa dung tích 2ml, hòa tan 2-(6-fluoropyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrrol (2,0mg, 7,6 μ mol; ví dụ 1) và chất xúc tác Crabtree (9,14mg, 11,4 μ mol) trong diclometan (0,8mL) và DMF (0,2mL). Gắn bình này vào ống góp triti (RC-TRITEC) và khử khí bằng cách làm đông-bơm-tan băng. Đưa khí triti vào, và khuấy mạnh dung dịch màu cam nhạt trong thời gian 4 giờ trong môi trường triti ở 450mbar. Làm nguội dung dịch bằng nitơ lỏng và hấp phụ lại khí triti dư trong bình phản ứng trên bề mặt urani dùng cho triti dư thừa. Làm khô lạnh hoàn toàn dung môi và loại bỏ triti không bền bằng cách làm khô lạnh với hỗn hợp của etanol và nước theo tỷ lệ 9:1 (3 x 1mL) và toluen (2 x 1mL). Hòa tan dầu nâu nhạt còn lại trong etanol (1,5mL) và truyền trên máy trao đổi cation SCX-2. Rửa giải chất xúc tác còn lại với MeOH (10mL) và xả, và rửa giải sản phẩm bằng NH₃ trong MeOH (3,5N, 10mL), gom riêng rẽ và cô trong môi trường áp suất giảm. Tinh chế sản phẩm thô bằng HPLC điều chế (XBridge Prep, 5 μ m, 10 x 250mm) bằng cách sử dụng axetonitril, nước, và dung dịch đệm có độ pH = 7 làm chất rửa giải. Thu được 37 MBq (1mCi) hợp chất nêu ở đề mục với độ tinh khiết hóa học phóng xạ là 99% và hoạt tính đặc hiệu là 936 GBq/mmol (25,3 Ci/mmol), được xác định bằng phép đo phổ MS. Hợp chất này được bảo quản để làm dung dịch đệm ở pH=7/dung dịch DMSO.

MS: m/z = 265,1 [M+H]⁺, 267,1 [M(³H₁)+H]⁺, 269,1 [M(³H₂)+H]⁺

Ví dụ 3

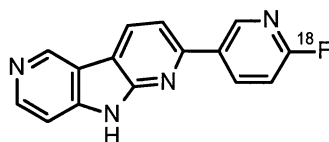
¹⁸F]-2-(6-fluoropyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrrol

a) 2-(6-nitropyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrrol



Trong bình dung tích 50mL (được làm bay hơi và làm sạch bằng Ar), kết hợp tert-butyl este của axit 2-clo-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrrol-9-carboxylic (285mg, 938 μ mol), pinacol este của axit 2-nitropyridin-5-boric (469mg, 1,88mmol), phức chất 1,1'-bis(diphenylphosphino)feroxen-paladi(II)diclorua diclometan (34,5mg, 42,2 μ mol) và K₂CO₃ (389mg, 2,81mmol). Bổ sung DMF (24mL) và bịt kín ống này, làm bay hơi và làm sạch bằng Ar. Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng đến 90°C và khuấy trong 18 giờ. Lọc qua Celite và sau đó thông qua tấm silica gel nhỏ (trung tính, 60A, mắt lưới 32-63), sau đó là rửa với DMF vừa đủ và làm bay hơi đến khô. Hòa tan chất rắn màu nâu trong DMF (20mL) và bổ sung DMSO vào cho đến khi thu được dung dịch gần như trong. Sau khi lọc, làm bay hơi các dung môi đến gần như khô. Tinh chế bằng HPLC điều chế để tạo ra hợp chất nêu ở đề mục (37mg, 13%) ở dạng chất rắn màu vàng. MS m/z: 292,2 [M+H]⁺

b) [18F]-2-(6-fluoropyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrrol



Hòa tan tiền chất, (0,7 $\pm$ 0,3mg) trong 400 μ L dimetylsulfoxit và nghiền bằng sóng âm trước khi kết thúc bắn phá (EOB). Khi EOB, ion [18F]florua trong nước, được tạo ra do bắn phá proton của nước được làm giàu [18O], được bẫy trên cột trao đổi ion. Rửa giải cột trao đổi ion bằng 150 μ L dung dịch gốc chứa Kryptofix 2.2.2/kali cacbonat (48mg Kryptofix 2.2.2 và 10mg kali cacbonat hòa tan trong 600 μ L axetonitril:nước theo tỷ lệ 1:1) vào bình phản ứng, sau đó là 250 μ L axetonitril. Làm bay hơi dung dịch florua đến khô ở nhiệt độ 110°C qua dòng nitơ và làm khô thêm theo phương pháp chung cất đồng sôi bằng cách bổ sung axetonitril hai lần (mỗi lần 250 μ L). Chuyển bình phản ứng từ xa vào khoang vi sóng (Resonance Instruments) và làm nguội bằng không khí nén trong thời gian 2 phút. Bổ sung tiền chất và sau đó chiếu vi sóng ở 50 oát trong thời gian 240 giây, sau đó làm nguội dung dịch bằng 1mL nước.

Pha loãng dung dịch phản ứng bằng 3mL dung dịch đệm triethylamin (TEA) (pH 7,2), sau đó phun lên trên cột HPLC bán điều chế (XBridge C18, 10 μ m, 10x150mm), rửa giải bằng metanol:dung dịch đệm TEA theo tỷ lệ 15:85 (độ pH = 7,2) ở tốc độ bằng 15mL/phút.

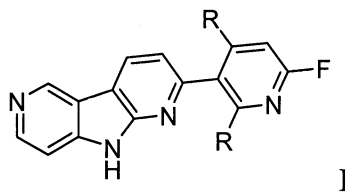
Theo dõi dòng chảy ra khỏi HPLC ở 254nm và dò hoạt tính phóng xạ nội tuyến. Quan sát sắc ký đồ bán điều chế và thu đỉnh sản phẩm [18F] trong 50mL nước và phối trộn lại bằng cách sử dụng mô đun SPE tự động. Rửa giải dung dịch sản phẩm thông qua Waters C-18 SepPak Plus, rửa bằng 10mL nước Milli-Q, sau đó rửa giải bằng 1mL etanol tuyệt đối, sau đó là 10mL nước muối thường vào lọ chứa sản phẩm cuối cùng thông qua bộ lọc vô trùng Millipore FG cỡ lỗ 0,22 μ m.

Lấy các phần phân ước ra khỏi chai cuối cùng để phân tích kiểm soát chất lượng. HPLC phân tích (XBridge C18, 3,5 μ m, 4,6x100mm) rửa giải bằng metanol:dung dịch đệm TEA theo tỷ lệ 40:60 (độ pH = 7,2) ở tốc độ bằng 2mL/phút được theo dõi ở 350nm để xác định độ tinh khiết hóa học phóng xạ và độ tinh khiết hóa học, hoạt tính đặc hiệu và định danh hóa học.

Việc tổng hợp phóng xạ 57 phút cho [18F]-2-(6-fluoropyridin-3-yl)-9H-dipyrido [2,3-b;3',4'-d]pyrrol tạo ra sản phẩm cuối cùng có hoạt tính phóng xạ trung bình là 330,5 mCi, hiệu suất 26,1% (n=2) được hiệu chỉnh không phân rã. Thành phẩm có hoạt tính phóng xạ riêng trung bình là 24,684 mCi/ μ mol và độ tinh khiết hóa học phóng xạ là 99%.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức:



trong đó:

R là hydro hoặc triti;

F là flo hoặc ^{18}flo ;

hoặc muối cộng axit được dùng.

2. Hợp chất có công thức I theo điểm 1, trong đó hợp chất này là:

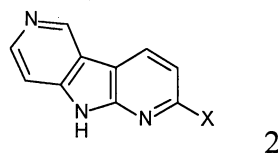
2-(6-flo-pyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrol;

^3H -2-(6-flo-pyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrol;

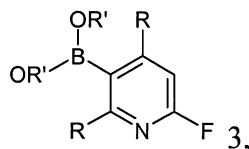
và $[^{18}\text{F}]$ -2-(6-flo-pyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrol.

3. Quy trình sản xuất hợp chất có công thức I như được xác định theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó quy trình này bao gồm bước:

a) kết hợp hợp chất có công thức 2 ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}$):

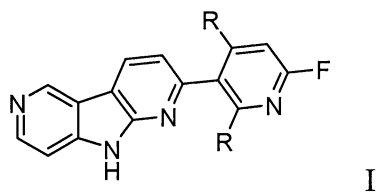


với axit boric hoặc este của axit boric thích hợp có công thức 3:



trong đó R' là hydro hoặc alkyl thấp,

để tạo ra hợp chất có công thức I:

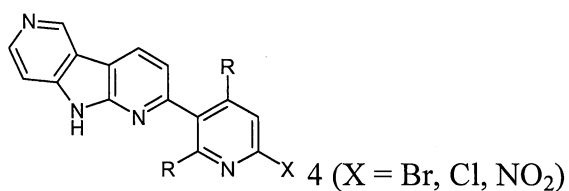


trong đó R là hydro,

và, nếu muốn, chuyển hóa hợp chất thu được thành muối cộng axit được dùng hoặc thành hợp chất có công thức I, trong đó R là triti,

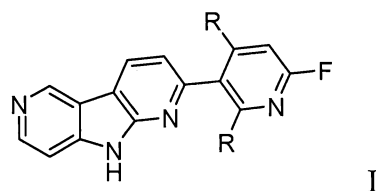
hoặc

b) kết hợp hợp chất có công thức 4:



với chất phản ứng flo hóa thích hợp được chọn từ kali florua hoặc tetrabutylamoni florua,

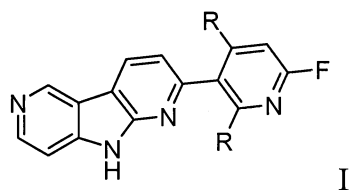
để tạo ra hợp chất có công thức I:



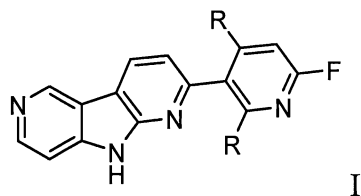
trong đó phần tử R là hydro

và, nếu muốn, chuyển hóa hợp chất thu được thành muối cộng axit được dùng hoặc thành hợp chất có công thức I, trong đó R là triti

c) cho hợp chất có công thức I:

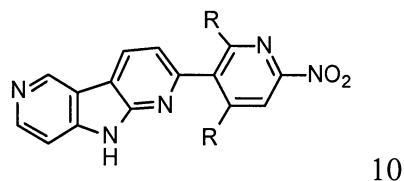


trong đó R là hydro, phản ứng với khí triti với sự có mặt của chất xúc tác iridi, ruteni, rodi hoặc paladi trong dung môi thích hợp, được chọn từ diclometan, clobenzen, DMF, DMSO hoặc các hỗn hợp của chúng để tạo ra hợp chất có công thức I:

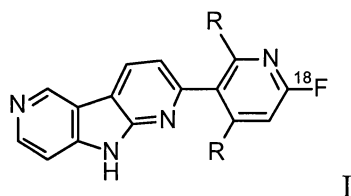


trong đó R là triti, và, nếu muốn, chuyển hóa các hợp chất thu được thành muối cộng axit được dùng hoặc

d) hòa tan hợp chất có công thức 10:



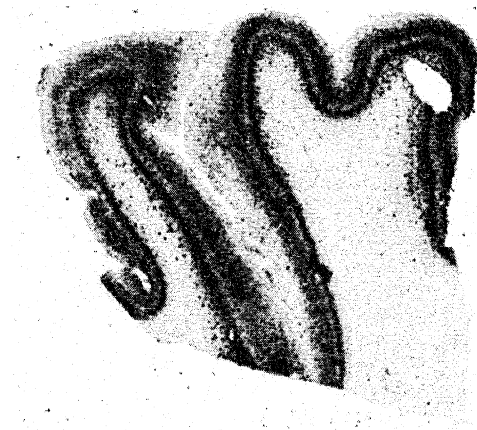
trong dimetylsulfoxit và nghiền bằng sóng âm trước khi kết thúc bắn phá bằng ion [18]florua trong nước vào hợp chất có công thức:



và, nếu muốn, chuyển hóa các hợp chất thu được thành các muối cộng axit được dùng.

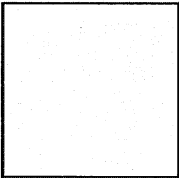
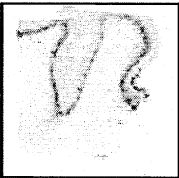
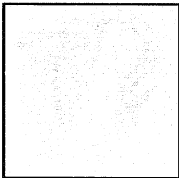
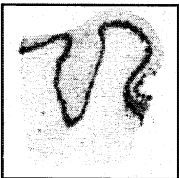
4. Dược phẩm chứa hợp chất có công thức I theo điểm 1 hoặc điểm 2 và chất mang được dùng.

1/1

Fig. A

Phóng xạ đồ tự ghi của ^3H -2-(6-flo-pyridin-3-yl)-9H-dipyrido[2,3-b;3',4'-d]pyrrol

Fig. B

$[^3\text{H}]\text{T808}$ [10 nM] + chất lạnh [1 μM]				
---	T808	Cpd A	Cpd B	Cpd C
				
	Đối chứng	Ái lực thấp	Ái lực cao	Không có ái lực