

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2023年6月15日 (15.06.2023)



(10) 国际公布号  
**WO 2023/104148 A1**

(51) 国际专利分类号:  
*A61K 51/04* (2006.01) *C07D 417/14* (2006.01)  
*A61K 49/00* (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)  
*C07D 401/06* (2006.01) *G01N 30/02* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/137518

(22) 国际申请日: 2022年12月8日 (08.12.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
202111498028.9 2021年12月9日 (09.12.2021) CN

(71) 申请人: 复旦大学 (FUDAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国上海市杨浦区邯郸路220号, Shanghai 200433 (CN)。

(72) 发明人: 楚勇(CHU, Yong); 中国上海市杨浦区邯郸路220号, Shanghai 200433 (CN)。王坚(WANG, Jian); 中国上海市杨浦区邯郸路220号, Shanghai 200433 (CN)。边江(BIAN, Jiang); 中国上海市杨浦区邯郸路220号, Shanghai 200433 (CN)。刘逸奇(LIU, Yiqi); 中国上海市杨浦区邯郸路220号, Shanghai 200433 (CN)。林欣(LIN, Xin); 中国上海市杨浦区邯郸路220号, Shanghai 200433 (CN)。

邱辰昶(QIU, Chenyang); 中国上海市杨浦区邯郸路220号, Shanghai 200433 (CN)。何洁(HE, Jie); 中国上海市杨浦区邯郸路220号, Shanghai 200433 (CN)。叶德泳(YE, Deyong); 中国上海市杨浦区邯郸路220号, Shanghai 200433 (CN)。

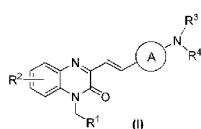
(74) 代理人: 上海元好知识产权代理有限公司 (SUNSHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 中国上海市浦东新区浦东大道555号裕景国际商务广场B座703-704室, Shanghai 200120 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW,

(54) Title: SMALL MOLECULE PROBE BINDING TO  $\alpha$ -SYNUCLEIN AGGREGATE AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 结合 $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的小分子探针及其用途



AA 化合物结合的路易小体 BB 化合物结合的路易神经突

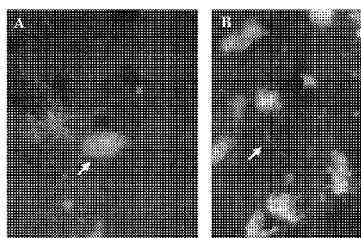


图 2

AA Compound-bound Lewy body  
BB Compound-bound Lewy neurite

(57) Abstract: Disclosed are a compound shown in following general formula I, and a pharmaceutically acceptable salt thereof, or a solvate thereof, wherein R<sup>1</sup> is preferably a pyridyl group; R<sup>2</sup> is preferably a halogen group, and halogenated C<sub>1-4</sub> alkoxy groups; R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup> are preferably a methyl group; and a ring A is preferably a benzene ring and a thiazole ring. The compound of the present invention can specifically strongly bind to an  $\alpha$ -synuclein aggregate, can act as a small molecule probe of the  $\alpha$ -synuclein aggregate, and is used for optical imaging of the  $\alpha$ -synuclein aggregate in a biological sample or an organism (such as brain). A radioactive label thereof can act as an imaging tracer probe for imaging inspection technologies such as PET and SPECT, so as to implement non-invasive imaging visualization detection of an  $\alpha$ -synuclein lesion in vivo (such as brain). The compound of the present invention is also used for preparing the imaging tracer probe of the radioactive label or a composition thereof. Diseases related to the  $\alpha$ -synuclein lesion comprise Parkinson's disease, Parkinson's disease dementia, Alzheimer's disease, multiple system atrophy, dementia with Lewy bodies, etc.

MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE,  
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR,  
HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO,  
PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,  
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG)。

本国际公布：

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

**(57) 摘要：**本发明公开了如下通式I所示的化合物、其在医药上可接受的盐、或其溶剂化物，其中， $R^1$ 优选为吡啶基； $R^2$ 优选为卤素基、卤代的 $C_{1-4}$ 烷氧基； $R^3$ 、 $R^4$ 优选为甲基；环A优选为苯环、噻唑环。本发明化合物能特异地强结合 $\alpha$ -突触核蛋白聚集体，可作为 $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的小分子探针，用于生物样本或生物体内(如脑)中的 $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的光学显像；其放射标记物可用作PET、SPECT等影像检查技术所用的显像示踪探针，实现对活体内(如脑)的 $\alpha$ -突触核蛋白病变的非侵入性的成像可视化检测。本发明化合物还用于制备上述放射标记的显像示踪探针或其组合物。所述 $\alpha$ -突触核蛋白病变的疾病包括帕金森病、帕金森病性失智症、阿尔茨海默症、多系统萎缩、路易体痴呆症等。

102322CT

结合  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的小分子探针及其用途技术领域

本发明属于医药技术领域，涉及结合  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的小分子探针及其用途。

背景技术

$\alpha$ -突触核蛋白( $\alpha$ -synuclein,  $\alpha$ -Syn)病变是神经变性疾病的重要发病机制(Vekrellis, 2010)。帕金森病(PD)、帕金森病性失智症(PDD)、路易体痴呆症(DLB)、多系统萎缩(MSA)及多种神经变性病的重要病理特征均为  $\alpha$ -突触核蛋白的异常聚集，进而形成以其为主要成分的路易体和路易神经突并导致发病。从  $\alpha$ -突触核蛋白沉积形成到出现临床症状的过程较为漫长，通常持续数年甚至十年以上，而当病人已经出现临床症状时再行干预则为时已晚。越早的临床干预对延缓病程进展、改善患者的生活质量和预后都极为重要。因此，发展可靠的早期检测方法对神经变性疾病早期诊断、预防和治疗十分重要。同时，调节  $\alpha$ -突触核蛋白的聚集进程也是治疗这些神经疾病的重要策略。

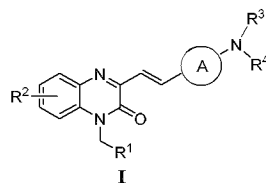
基于在上述多种神经退行性疾病发病及病程进展中的重要作用， $\alpha$ -突触核蛋白已成为针对这些疾病进行早期诊断的重要生物标志物和药物治疗的重要靶点。但目前对  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的检测只能基于尸检材料的组织学分析，还不能针对活体进行非侵入性的检测，运用分子影像学是解决这一难题的最佳方法。

分子影像学是基于分子示踪探针(例如放射性示踪探针、荧光示踪探针等)对生物标志物(例如，受体、酶、离子通道、错误折叠的蛋白质)的特异性结合，再通过 PET、SPECT、核磁共振、近红外或其他方法对其进行可视化成像，从而提供活体的诊断信息。要实现分子影像其关键是必须具有能对给定分子靶标特异结合的小分子化合物作为显像示踪探针。由于神经退行性病人脑中常常共沉积  $\alpha$ -突触核蛋白、 $A\beta$  和 Tau 蛋白的病理改变，因此，某一特定蛋白的显像探针不仅需要对该靶蛋白聚集体有足够强的亲和力，还必须对其他蛋白的异常聚集体具有足够高的选择性，才能实现选择性成像。迄今为止，鲜见报道能显像病人脑内  $\alpha$ -突触核蛋白沉积的小分子示踪探针。

发明的公开

本发明的目的是提供一类能够显像  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的小分子示踪探针、以及用于  $\alpha$ -突触核蛋白积聚性疾病的成像诊断的被放射核素标记的小分子示踪探针，以及这些示踪探针的制备方法，以实现帕对金森病、路易体痴呆症、多系统萎缩等神经退行性疾病患者活体非侵入性的早期诊断、疾病监测和药物疗效评估。

为达到上述目的，本发明提供了如下通式 I 所示的化合物、其盐或其溶剂化物。该化合物对  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体具有强亲和力，且对  $A\beta$  和 Tau 蛋白具有良好的选择性，并具有良好的血脑屏障透过性，尤其能良好且特异性地结合并染色病人脑组织中的路易体和路易神经突，可用作荧光成像示踪剂；或经放射标记后用作 PET、SPECT 等影像技术所需的放射显像示踪剂，对体内（如脑中） $\alpha$ -突触核蛋白病理进行成像。



其中，

$R^1$  为 5~6 元芳杂基, 优选地取为吡啶基;

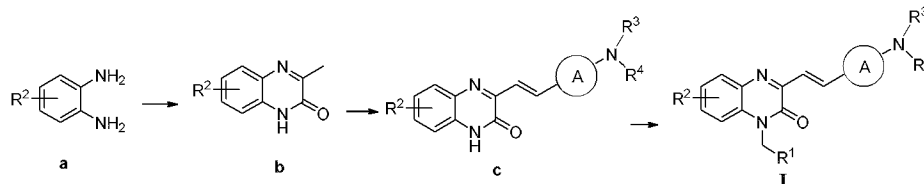
$R^2$  选自卤素基、硝基、羟基、 $C_{1-4}$  烷氧基、卤代的  $C_{1-4}$  烷氧基, 其中, 所述的卤素原子选自氟、氯、溴或碘;

$R^3$ 、 $R^4$  各自独立地选自氢,  $C_{1-3}$  烷基, 优选地取自甲基;

环 A 选自苯环、5~6 元芳杂环, 优选地取自苯环、噻唑环。

其中, 式 I 化合物的 1 个或 1 个以上原子是该原子的放射性同位素, 该放射性同位素优选取自  $^{11}C$ 、 $^{13}N$ 、 $^{15}O$ 、 $^{18}F$ 、 $^{76}Br$ 、 $^{123}I$ 、 $^{125}I$ 、 $^{131}I$ 。

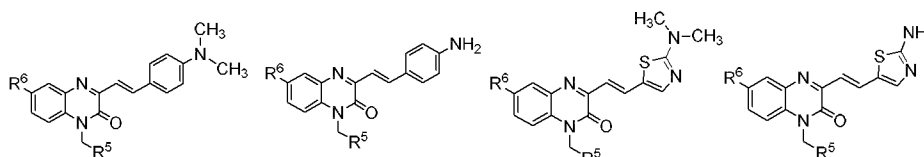
本发明还提供了式 I 化合物的制备方法, 该方法包括以下合成路线:



式 a 化合物在室温条件下关环生成式 b 化合物。反应所用溶剂包括但不限于甲醇、乙醇、二氯甲烷、氯仿、三乙胺、二甲基甲酰胺、四氢呋喃、二氧六环。酸性条件下, 并以浓硫酸为催化剂, 式 b 化合物与环 A 的醛加热生成式 c 化合物。所用溶剂选自甲醇、乙醇、三乙胺、二甲基甲酰胺、四氢呋喃、二氧六环、醋酸、二氯甲烷、氯仿; 所用酸选自有机酸 (包括但不限于草酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、乙酸) 和无机酸 (盐酸、硫酸、硝酸、三氟乙酸); 反应温度范围为  $20^{\circ}C$ - $150^{\circ}C$ , 优选反应温度为  $80^{\circ}C$ - $130^{\circ}C$ 。式 c 化合物在碱的作用下进行氮取代反应得到式 I 化合物。所用碱包括有机碱和无机碱, 所述的有机碱类包括但不限于六甲基二硅基氨基钠、三乙胺、 $N,N$ -二异丙基乙胺、正丁基锂、叔丁醇钾, 四丁基溴铵, 所述的无机碱类包括但不限于氯化钠、碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸钾、碳酸氢钾或碳酸铯; 所用溶剂选自二氯甲烷、四氢呋喃、二甲亚砜、二氧六环、二甲基甲酰胺; 反应可在  $20$ - $120^{\circ}C$  温度范围内发生, 优选反应温度为  $20^{\circ}C$ - $40^{\circ}C$ 。

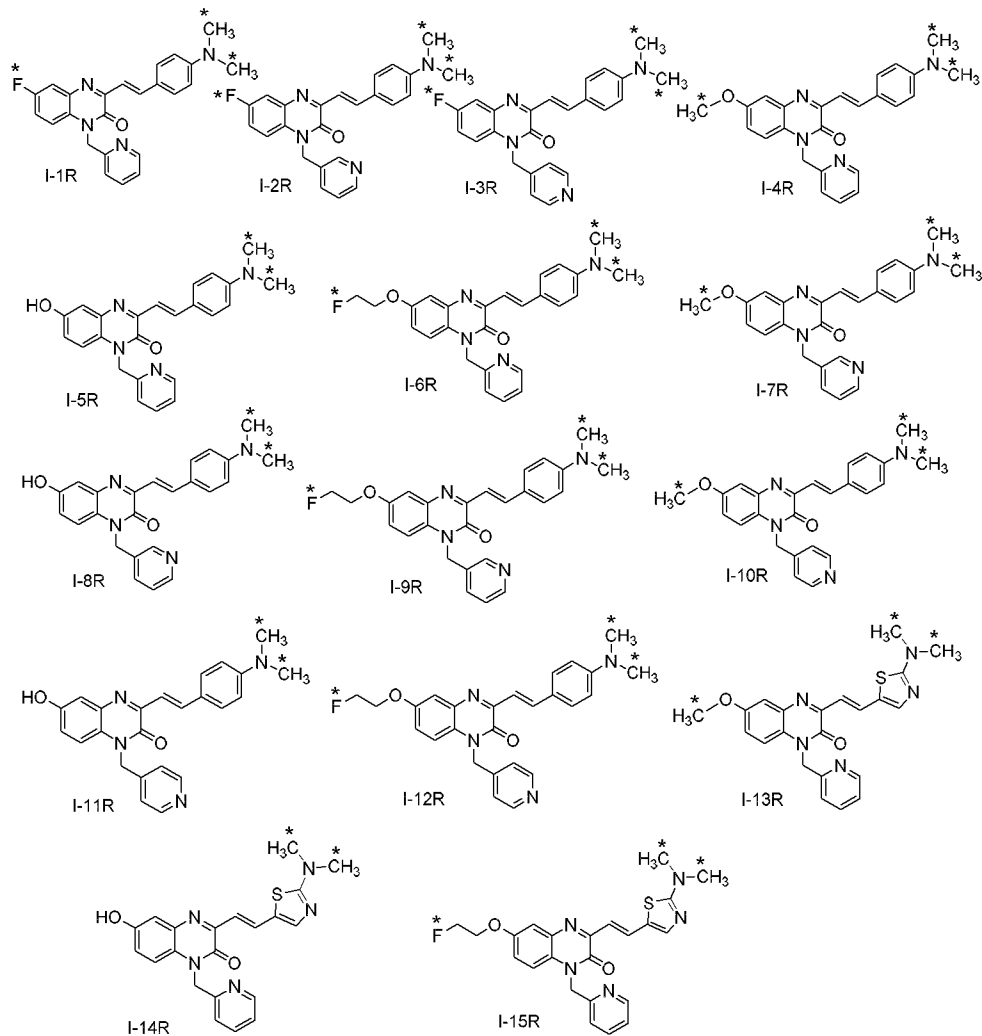
进一步地,  $R^2$  为甲氧基的式 I 化合物脱除甲基生成  $R^2$  为羟基的式 I 化合物, 该羟基进一步进行氧烷基化反应, 生成  $R^2$  为卤代烷氧基的式 I 化合物。

本发明还提供了用于制备被标记的式 I 化合物的前体化合物, 其结构如下所示:



其中,  $R^5$  为吡啶基;  $R^6$  独立地取自羟基、氟、溴、碘、硝基、硼酸酯基、 $TsO-(CH_2)_m-O-$ 、 $MsO-(CH_2)_m-O-$ , 其中,  $m$  为 2~4 的整数。

通过上述前体化合物, 可将式 I 化合物中的 1 个或多个原子标记为放射性核素。因此, 本发明还提供了被标记的式 I 化合物, 优选地取自如下结构:



其中，具有\*的原子中至少有一个是该原子的放射性同位素。

本发明还提供了式 I 所示能特异性结合  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的化合物的用途。该化合物具有自发荧光，可用作荧光显像示踪剂；当该化合物中 1 个或多个原子被放射性原子取代后可用作多种影像技术所需的放射性显像示踪探针，例如该化合物中 1 个或多个氟原子或碳原子被取代为放射性核素  $^{18}\text{F}$  或  $^{11}\text{C}$  后，可用作 PET 影像技术的放射性显像示踪探针，或用于制备该显像示踪探针，以及制备包括该显像示踪探针的组合物。这些显像示踪剂可用于检测与  $\alpha$ -突触核蛋白错误折叠和聚集相关的神经疾病、或用于筛选与脑内  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体相关的疾病的治疗或预防药物，或用于对脑内  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的积聚进行定量或判定。

### 本发明的有益效果

正电子发射计算机断层显像(PET)和单光子发射计算机断层显像(SPECT)技术是当前最先进的非侵入性的三维显像技术。运用对给定分子靶标特异结合的 PET、SPECT 放射性示踪探针，能够实时提供活体最接近于病理学的诊断信息，证明和量化由于疾病产生的病理生理变化，是临床早期诊断，疾病进展监测及治疗药物开发的最有力工具。用于 PET 的放射性核素通常包括  $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$  和  $^{18}\text{F}$ ，其放射性半衰期分别为 20 分钟、10 分钟、2 分钟和 110 分钟。由于  $^{18}\text{F}$  具有相对最长的半衰期，使用最为方便，故通常最优选择  $^{18}\text{F}$  作为 PET 的放射性核素。此外， $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$  是最常用于 SPECT 的放射性核素。原则上，可以使用这些核素

替换靶标配体分子中的任一对应的非放射性同位素原子，以使其具有放射性用于放射成像。

因此，当标记上放射性核素后， $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的特异结合配体就可以对其进行标记，用作体外放射自显影和体内 PET 或 SPECT 显像的示踪探针，实现体内外  $\alpha$ -突触核蛋白的病理学成像，极大促进对  $\alpha$ -突触核蛋白错误折叠和聚集相关的神经病症的诊断、管理、机制研究和治疗药物的发展。显然，实现显像的关键在于发现对  $\alpha$ -突触核蛋白具有高亲和力和高选择性的配体小分子，进一步地，将其标记上放射性核素作为 PET、SPECT 的显像探针。本发明提供了一类对  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体具有强亲和力和高度特异性、并能透过血脑屏障的化合物。这些化合物具有自发荧光，能对细胞模型中聚集的  $\alpha$ -突触核蛋白纤维，以及病人脑组织中的路易体和路易神经突（其主要成分为  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体）发生高度特异性结合并显示出清晰的荧光染色，可用作  $\alpha$ -突触核蛋白的荧光成像显像剂。当将本发明化合物中的 1 个或多个氟原子、或 1 个或多个碳原子替换为放射性核素  $^{18}\text{F}$  或  $^{11}\text{C}$ ，可用作放射自显影或 PET 的显像示踪探针进行体外、体内（尤其是脑中） $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的成像。当将本发明化合物中的卤素原子替换为放射性的同位素或其他核素时，可用作 SPECT 的示踪探针以显像  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体。

本发明还提供了式 I 化合物及其放射标记化合物的制备方法，以及用于制备放射标记化合物的前体化合物及其制备方法。进一步地，还提供了式 I 化合物或其组合物的成像诊断方法、用于预防或治疗  $\alpha$ -突触核蛋白积聚性疾病的药物的筛选方法，及对脑内  $\alpha$ -突触核蛋白的积聚进行定量或判定的方法。

### 附图的简要说明

图 1 为本发明示踪探针对 SH-SY5Y 细胞模型中  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的免疫荧光染色结果的激光共聚焦显微镜拍照。图中，白色三角表示与  $\alpha$ -突触核蛋白抗体共定位的化合物信号，白色箭头表示化合物的非特异性染色信号，红色箭头表示化合物未能结合的  $\alpha$ -突触核蛋白抗体信号，黄色箭头表示未能溶解的化合物信号。

图 2 为本发明示踪探针对路易体痴呆症(DLB)病人脑片的染色结果的荧光显微镜拍照。图中，白色箭头表示路易体（左图）或路易神经突（右图）。该结果表明本发明示踪探针能与病人脑中的  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体病变发生强结合。

图 3 为本发明示踪探针对阿尔茨海默(AD)病人脑片的染色结果荧光显微镜拍照。图中白色箭头表示  $\text{A}\beta$  原始斑块，白色三角表示  $\text{A}\beta$  致密核心斑块，黄色三角表示 Tau 神经纤维缠结。该结果表明本发明示踪探针对病人脑中的  $\text{A}\beta$  和 Tau 病变结合很弱，具有良好的组织靶标选择性。

### 实现本发明的最佳方式

在本说明书中，“ $\alpha$ -突触核蛋白积聚性疾病”是指  $\alpha$ -突触核蛋白在大脑内异常折叠和积聚的疾病，包括但不限于帕金森病（PD）、帕金森病性失智症（PDD）、多系统萎缩（MSA）、路易体痴呆症（DLB）等。本发明通过在  $\alpha$ -突触核蛋白积聚性疾病患者体内外使用通式 I 化合物、其盐或其溶剂化物，作为显像示踪探针对  $\alpha$ -突触核蛋白进行显像，以提供对这些疾病的诊断、评估信息。

本发明可被用作成像诊断  $\alpha$ -突触核蛋白积聚性疾病的示踪探针是通式 I 所示的化合物，或其盐，或其溶剂化物。本发明化合物在两个环之间具有双键，因此通式 I 化合物可以具有顺式和反式异构体。优选的化合物为 I-1、I-2、I-3、I-6、I-12、I-15。其中，尤其是 I-15 能良好标记路易体痴呆症病人（DLB）脑组织中的  $\alpha$ -突触核蛋白病变路易体和路易神经突，且对阿尔茨海默病人（AD）脑组织中的  $\text{A}\beta$  病变和 Tau 病变显示出低的结合，表现出了良好的特异性。

本发明还包括通式 I 化合物的盐。通式 I 化合物中的氮原子可用于形成医药上可接受的

盐。

本发明给出的任何化学式还旨在表示该化合物的同位素标记的形式。其同位素标记化合物具有由本发明给出的式I化学式所示结构，不同之处仅为其中的一个或多个原子被其放射性同位素替代。可以掺入本发明化合物的同位素包括氢、碳、氮、氧、氟、氯和碘的同位素，分别诸如 $^2\text{H}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{18}\text{O}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{36}\text{Cl}$ 、 $^{123}\text{I}$ 和 $^{125}\text{I}$ 和 $^{131}\text{I}$ 。用较重的同位素(诸如氘， $^2\text{H}$ )取代可以提供某些由更大的代谢稳定性(例如增加的体内半衰期或降低的剂量需求)产生的优势。用 $^2\text{H}$ 取代可以特别地用于防止形成不希望的放射代谢物或者阻断放射脱氟。用于标记本发明化合物时，在正电子放射性核素中优选 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{18}\text{F}$ 用于PET显像，最优选使用 $^{18}\text{F}$ ，次优选使用 $^{11}\text{C}$ 进行标记；在 $\gamma$ 射线放射性核素中优选 $^{123}\text{I}$ 用于SPECT显像。

本发明还包含通式I的放射标记的化合物。理论上，通式I化合物的任何位置都可被放射性核素替换，但优选对实施例中所示的卤素基、硝基进行取代，或对烷基进行标记。例如，当用 $^{18}\text{F}$ 标记本发明的化合物时，可以用 $^{18}\text{F}$ 标记化合物的任何位置，优选 $^{18}\text{F}$ 替换化合物中的硝基或氟原子。

本发明经放射标记的化合物及其制备所需的前体化合物通常可以通过常规方案，或实施例中公开的方案，或下述制备方法(通过用易得的同位素标记试剂替代非同位素标记试剂)而制备。已报道了诸多方法可将 $^{11}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{18}\text{O}$ 、 $^{18}\text{F}$ 或其他同位素标记到化合物中(Angew. Chem. Int. Ed. Miller, Philip W, 2008, 47, 8998-9033; Peter J. H. Scott, 2009, 48, 6001-6004; Chem. Rev., Sean Preshlock, 2016, 116, 719-766; Frederic Dollé, Fluorine-18 chemistry for molecular imaging with positron emission tomography. Fluorine and Health: Molecular Imaging, Biomedical Materials and Pharmaceuticals (Tressaud, A. Haufe, G.), 2008, pp.3-66, Elsevier)。经过放射性核素标记后的式I化合物可用作PET或SPECT的示踪探针进行活体中 $\alpha$ -突触核蛋白积聚体的显像。

本发明还提供了前体化合物以用于制备放射核素标记的式I化合物。本领域技术人员可以根据本发明所示结构设计并合成该前体化合物。即，该前体化合物可以通过对市售化合物或对本发明化合物进行结构修饰而得到。

本发明的放射标记化合物可以通过不同的前体化合物制备。通常地，前体化合物的标记位置含有羟基或硝基、溴、碘、硼酸酯或其他易离去基团(如 $\text{MsO-}$ 、 $\text{TsO-}$ 等)，从而可以分别被 $^{11}\text{C}$ 或 $^{18}\text{F}$ 所标记。特别地，本发明式I化合物中所含的甲氧基可通过脱除甲基获得含有羟基的前体化合物，然后用 $^{11}\text{C}$ 进行标记；或用已被 $^{18}\text{F}$ 标记的溴代烷烃，如 $^{18}\text{F-CH}_2\text{CH}_2\text{-Br}$ 进行氧烷基化反应，生成 $^{18}\text{F-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-}$ 取代产物，实现放射标记。同样地，前体化合物中也可以含有溴、碘、硼酸酯或 $\text{TsO-}$ 、 $\text{MsO-}$ ，这些基团按已知的常规方法可被 $^{18}\text{F}$ 替换。例如，可用于制备放射示踪探针的化合物包括I-5(I-4和I-6的前体)，I-8(I-7和I-9的前体)，I-11(I-10和I-12的前体)，I-14(I-13和I-15的前体)等。在合成如I-6、I-9、I-12、I-15等化合物时，通常优先将前体化合物中需标记的位置转变成含易离去的 $\text{TsO-}$ 、 $\text{MsO-}$ 等基团。

通常，用于标记的核素由回旋加速器产生，本领域熟练的技术人员可以根据所要制造的核素来选择相应方法和仪器。使用这些放射性核素进行化合物标记的方法在本领域是已知的，主要包括化学合成法、同位素交换法和生物合成法。放射标记的本发明化合物可以局部地或者全身性地给予患者，经过与 $\alpha$ -突触核蛋白结合和解离的充分时间后，通过PET、SPECT即可对检测部位进行可视化成像。给药途径可采用皮下、腹腔、静脉、动脉或脊髓液内的注射或输液或经口服，并充分关注患者的暴露剂量，具体使用方式取决于疾病类型、所使用的核素、所使用的化合物、患者状况、检测部位等因素。

本发明还提供用于成像诊断 $\alpha$ -突触核蛋白积聚性疾病的组合物，其包含本发明的化合物、其在医药上可接受的盐、或其溶剂化物及医药上可接受的载体。优选组合物中的本发明

化合物已被标记,其中使用放射性核素(尤其是正电子放射性核素 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{18}\text{F}$ 等)进行标记对于体内成像诊断是优选的。根据其用途,优选本发明化合物或其组合物的形态是一种允许用于注射的形态。因此,医药上可接受的载体优选为液体,包括(但不限于)含水溶剂(如磷酸钾缓冲剂、盐水、林格氏溶液和蒸馏水)或无水溶剂(例如聚乙二醇、植物油、乙醇、甘油、二甲基亚砷和丙二醇)。可以适当选择载体和本发明化合物的配制比例,其取决于作用的部位、检测手段等。此外,本发明组合物可以包含常用的抗微生物剂(如抗菌素等)、局部麻醉剂(如盐酸普鲁卡因、盐酸待布卡因等)、缓冲液(如三盐酸缓冲液、HEPES缓冲液等)、渗透压调节剂(如葡萄糖、山梨糖醇、氯化钠等)等。

本发明化合物可以是标记的或未被标记的。当未被标记时,可以在使用前通过以上描述的常用方法对本发明化合物进行标记。

本发明化合物具有与 $\alpha$ -突触核蛋白高度特异性结合的能力,因此可通过标记或未标记的本发明化合物,用于在体外对 $\alpha$ -突触核蛋白的染色和定量。例如,由于本发明化合物具有自发荧光特性,因此可被直接用于染色标本中的 $\alpha$ -突触核蛋白并通过激光共聚焦或荧光显微镜观察,或用于样本中 $\alpha$ -突触核蛋白的比色定量;或经放射标记后使用闪烁计数器用于 $\alpha$ -突触核蛋白的定量。共核蛋白病如帕金森病、路易体痴呆症、多系统萎缩等的早期病理基础都是形成路易体,其主要成分是异常积聚的 $\alpha$ -突触核蛋白,通过对路易体的检测可以提供这些疾病的早期发病信息。由于本发明化合物能清晰染色路易体和路易神经突,因此可用于研究相关病理机制及患者死亡前后的诊断。使用本发明化合物对大脑切片进行染色可以通过常用方法来进行。如上所述,本发明化合物,即通式I所示的化合物或盐或其溶剂化物可以用作 $\alpha$ -突触核蛋白积聚体的显像探针,优选使用经放射性核素标记的显像探针。

因此,本发明提供了:

用作显像 $\alpha$ -突触核蛋白积聚体的示踪探针的通式I化合物、或其医药上可接受的盐或其溶剂化物;

用作成像诊断 $\alpha$ -突触核蛋白积聚性疾病的的光学及放射性示踪探针,特别是使用正电子放射性核素标记的显像示踪探针;

用作制备放射性同位素标记的式I化合物的前体化合物;

用作成像诊断 $\alpha$ -突触核蛋白积聚性疾病的组合物,其包含通式I的化合物、或其医药上可接受的盐或其溶剂化物,及医药上可接受的载体;

通式I的化合物、其医药上可接受的盐或其溶剂化物用于诊断 $\alpha$ -突触核蛋白积聚性疾病的用途;

使用通式I的化合物、其医药上可接受的盐或其溶剂化物在生产用于诊断 $\alpha$ -突触核蛋白积聚性疾病的组合物中的用途。

此外,本发明还提供了:

用于例如大脑样本中的 $\alpha$ -突触核蛋白聚集体、患者大脑中的路易体和路易神经突的检测/染色方法,该方法可用于提供 $\alpha$ -突触核蛋白积聚性疾病的早期诊断和进展评估信息;

用于对脑内 $\alpha$ -突触核蛋白的积聚进行定量或判定的方法;用于 $\alpha$ -突触核蛋白积聚性疾病的预防和/或治疗药物的筛选方法;

以上所述方法均包含使用通式I的化合物、或其医药上可接受的盐或其溶剂化物,及医药上可接受的载体。

以下,针对式I化合物的取代基进行解释,进而对通式I化合物的盐、溶剂化物和衍生物、以及标记方法进行说明。

### **【定义】**

除非另有指明,本发明的各种术语的含义和范围按如下定义进行说明和限定。

术语“式I的化合物”、“式I化合物”、“本发明的化合物”或“本发明化合物”是指



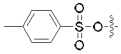
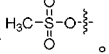
选自式I所限定的一类化合物的任意化合物，包括其立体异构体、顺反异构体、互变异构体、溶剂化物和盐(例如药用盐)。

除非另有指明，“或”或“和”的使用意指“和/或”。

当指示取代基的数目时，术语“一个或多个”意指从一个取代基到最大的化学上可能的取代数，即由取代基替代一个氢至替代所有氢。

术语“取代基”是指替代母体分子上的氢原子的原子或原子团。

术语“卤素”或“卤”是指氟(-F)、氯(-Cl)、溴(-Br)、及碘(-I)。

术语“TsO-”是指 , “MsO-”是指 .

术语“C<sub>1-4</sub>烷氧基”表示式-O-R'的基团，其中R'是指包含1至4个碳原子的一价直链或支链的饱和烷基。其实例包括甲氧基。

术语“卤代的C<sub>1-4</sub>烷氧基”表示这样的烷氧基，其中所述烷氧基的一个或多个氢原子已被相同或不同的卤素原子(特别是氟原子)替代。其实例包括1-氟代乙氧基。

术语“C<sub>1-3</sub>烷基”表示1至3个碳原子的一价直链或支链饱和烃基。其实例包括甲基。

术语“5~6元芳杂环”表示5或6个环原子的芳族单杂环，其包含1、2、3或4个选自N、O和S的杂原子，其余的环原子是碳。其实例包括噻吩环。

术语“芳族”表示例如在文献(特别是IUPAC-化学术语目录第2版, A. D. McNaught & A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford(1997))中限定的芳香性的常规概念。

术语“在医药上可接受的盐”是指对哺乳动物、尤其是对人体无害的盐。可以使用包含无机酸或无机碱,或者包含有机酸或有机碱的、无毒性的酸或碱来形成在医药上可接受的盐。在医药上可接受的盐包括例如用铝、钙、锂、镁、钾、钠及锌等形成的金属盐;或用赖氨酸、N, N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、甲葡胺(即N-甲基葡糖胺)及普鲁卡因等形成的有机盐等。另外,在医药上可接受的盐包含酸加成盐及碱加成盐。

术语“在医药上可接受的载体”是指生理盐水溶液;液态或固态的填充剂、稀释剂、溶剂、或封包材料等在医药上可接受的材料、组合物、或赋形剂。在医药上可接受的载体包括但不限于:水、食盐水、生理盐水或磷酸缓冲食盐水(PBS)、氯化钠注射液、林格氏注射液、葡萄糖注射液、无菌水注射液、葡萄糖、及乳酸林格氏注射液等。

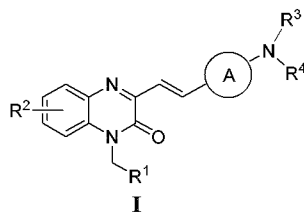
术语“溶剂化物”是指,1个或多个溶剂分子与化合物缔合而形成的含溶剂化合物。例如可包含一溶剂化物、二溶剂化物、三溶剂化物、及四溶剂化物。另外,溶剂化物也包括水合物。

术语“水合物”是指,含有被非共价性分子间力所束缚的水的化合物或其盐,所含水的量可以是化学计量或非化学计量。例如包含一水合物、二水合物、三水合物以及四水合物等。

#### 【 $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的示踪探针】

本发明提供的 $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的示踪探针(以下,也记作示踪探针),即下式I所示的化合物、其在医药上可接受的盐、或其溶剂化物。

另外,下式I所示的化合物具有自发荧光。其中,化合物的1个或多个原子可以是该原子的放射性同位素。因此,本发明的化合物可作为小分子示踪探针用于 $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的光学成像,或经放射标记后的PET、SPECT成像。



其中，

R<sup>1</sup> 为 5~6 元芳杂基，优选地取为吡啶基；

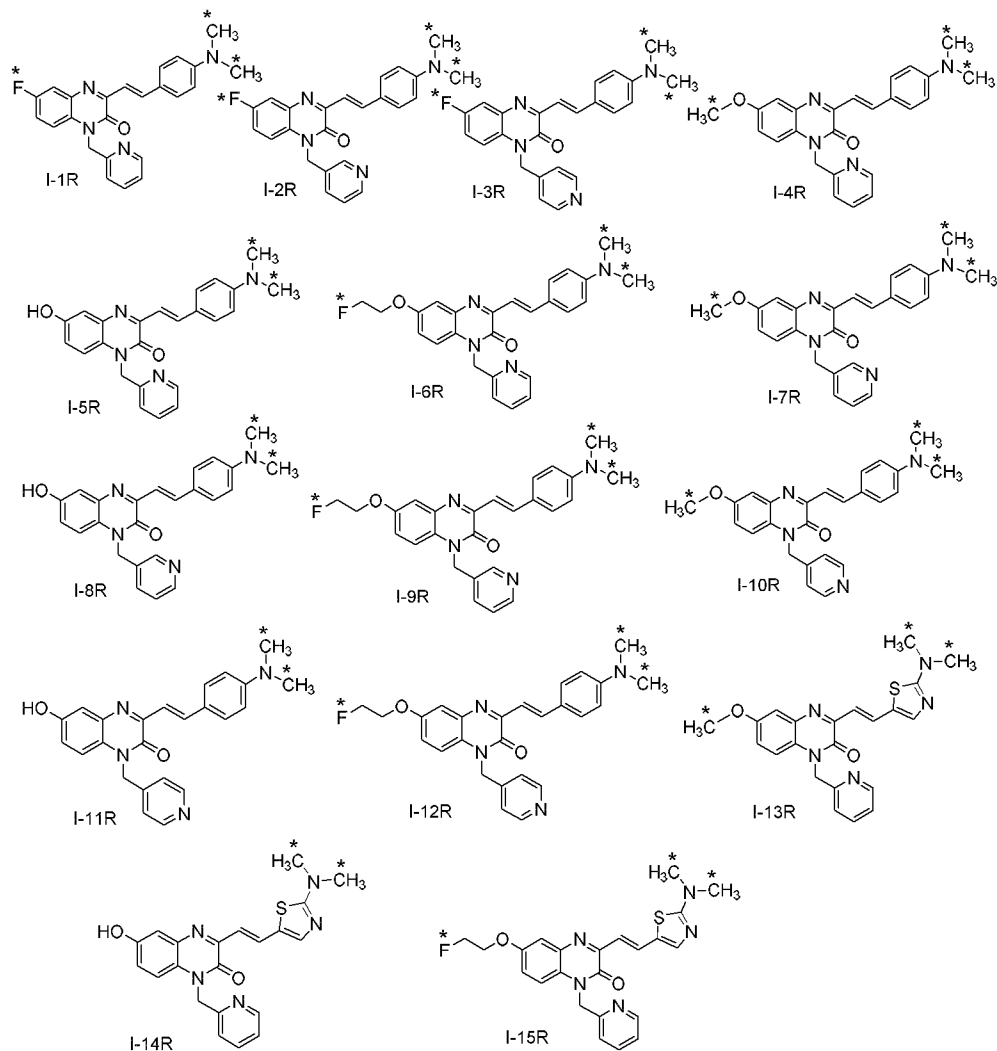
R<sup>2</sup> 选自卤素基、硝基、羟基、C<sub>1-4</sub> 烷氧基、卤代的 C<sub>1-4</sub> 烷氧基，所述的卤素原子选自氟、氯、溴或碘；

R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup> 各自独立地选自氢，C<sub>1-3</sub> 烷基，优选地取自甲基；

环 A 选自苯环、5~6 元芳杂环，优选地取自苯环、噻唑环。

其中，式 I 化合物的 1 个或 1 个以上原子是该原子的放射性同位素，该放射性同位素优选取自 <sup>11</sup>C、<sup>13</sup>N、<sup>15</sup>O、<sup>18</sup>F、<sup>76</sup>Br、<sup>123</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I。

作为式 I 所示的化合物的具体例子，例如可举出以下的化合物：



上述具体的化合物结构式中所示的\*标记的原子(结构式中若有2个\*标记，则指其中任意1个或2个)可以是该原子的放射性同位素，例如<sup>11</sup>C或<sup>18</sup>F。优选地，上述具体化合物中的F是放射性同位素<sup>18</sup>F；优选地，与芳基连接的甲氧基或二甲氨基的碳原子是放射性同位素<sup>11</sup>C。

本说明书中，(<sup>18</sup>F)I-15等名称的含义是指：编号为I-15等的结构式中的具有\*标记的原子是<sup>18</sup>F；同理，(<sup>11</sup>C)I-15等名称的含义是指：编号为I-15等的结构式中的具有\*标记的原子是<sup>11</sup>C。

#### 【 $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的光学成像用组合物】

本发明的  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的光学成像用组合物(以下也记作光学成像用组合物)包含上述式 I 化合物，其在药学上可接受的盐、或其溶剂化物。该光学成像包括试管内成像、生物体外成像、及生物体内成像。所述光学成像方法包括但不限于荧光显微镜测定法、多

光子成像法、双光子成像法、近红外荧光成像法。

#### 【 $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的放射成像用组合物】

本发明的  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的放射成像用组合物(以下也记作放射成像用组合物)包含经放射标记后的式 I 化合物,其在药学上可接受的盐、或其溶剂化物。该放射成像包括试管内成像、生物体外成像、及生物体内成像。所述放射成像方法包括但不限于 PET、SPECT、放射自显影法(autoradiography)。

上述光学成像用组合物和放射成像用组合物均可包含于前述医药上可接受的载体中。其中所含的式 I 化合物、其在医药上可接受的盐、或其溶剂化物、以及在医药上可接受的载体的含量并无特别限定,可根据:所使用的化合物;被给予的哺乳动物的年龄、体重、健康状态、性别及餐食内容;给予的次数和途径;治疗期;同时使用的其他药剂等因素进行调整。

#### 【 $\alpha$ -突触核蛋白聚集体相关疾病的诊断药、或所述疾病的治疗或预防上的伴随诊断药】

本发明所述  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体相关疾病的诊断药、或所述疾病的治疗或预防上的伴随诊断药(以下也称为伴随诊断药)包含本发明的化合物。治疗上的伴随诊断药是指:在判明了所述疾病的情况下,用于判断是否有望实施治疗的诊断药。另外,预防上的伴随诊断药是指:在判明了所述疾病的前兆症状的情况下,用于预测今后的发病或者用于判断是否有望实施预防性发病抑制的诊断药。

将使用上述诊断药或伴随诊断药获得的受试者体内(如脑) $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的量及/或分布量的相关数据,与预先已获知的上述疾病与  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的量及/或分布量之间的相关性进行对照,则能够对受试者进行上述疾病的相关诊断(具体而言,如是否罹患上述疾病、危重度、发作可能性等);或了解受试者的上述疾病状态,基于此来制定上述疾病的预防/治疗计划(预防性给予/治疗药的种类及其组合、用量、用法等)。

#### 【光学成像方法】

本发明所述的光学成像方法包含以下步骤,以下用检测脑中  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的方法进行示例说明,检测其他部位时方法类似。

向受试生物体给予有效量的本发明示踪探针,到达生物体脑的示踪探针会与脑内的  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体结合。然后从脑外照射用于激发示踪探针的第 1 波长的光,并检测从脑内示踪探针发出的第 2 波长的光(例如荧光),从而实现对  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的光学成像(图像化)。其中,所述示踪探针包含式 I 所示的化合物、或其在医药上可接受的盐、或其溶剂化物。

#### 【放射成像方法】

本发明所述的放射成像方法包含以下步骤,以下用检测脑中  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的方法进行示例说明,检测其他部位时方法类似。

向受试生物体给予有效量的经放射标记的本发明示踪探针,到达生物体脑的示踪探针会与脑内的  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体结合。然后检测从该脑内的示踪探针发出的放射线,从而实现对  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的放射成像(图像化)。其中,所述示踪探针包含式 I 所示的化合物、或其在医药上可接受的盐、或其溶剂化物,其中式 I 化合物的 1 个或 1 个以上原子是该原子的放射性同位素。

上述光学成像和放射成像受试生物体包括哺乳动物,例如人类、大鼠、小鼠、兔、豚鼠、仓鼠、猴、狗、貂、或小型猪等。优选地,哺乳动物是人类。所述示踪探针的给予方法无特别限定,可经口、静脉或腹腔给予。优选静脉或腹腔注射,最优选静脉注射。

#### 【对脑内 $\alpha$ -突触核蛋白的积聚进行定量或判定的方法】

通过上述成像方法,计算对受试生物体内(如脑内)所检测出的光或放射线的量及/或分布相比于其它正常哺乳动物的差值,则可对体内(如脑内) $\alpha$ -突触核蛋白的积聚进行定

量，并判断体内（如脑内）是否存在  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的积聚。

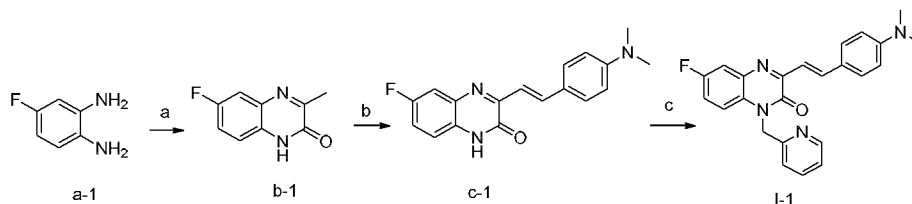
#### 【用于预防或治疗 $\alpha$ -突触核蛋白积聚相关疾病的治疗或预防药物的筛选方法】

基于使用以上【光学成像方法】或【放射成像方法】中所述成像方法，检测受试生物体在给予了筛选药物前、后所发出的光或放射线，根据其强度及/或分布的差异判断  $\alpha$ -突触核蛋白积聚的变化，以此筛选治疗或预防药物。例如，给予筛选药物后，如果来自示踪探针的光(如荧光)或放射线的量(强度)比给予筛选药物前减少，则该筛选药物可能用作该疾病或症状的治疗或预防用药物。进一步地，将来自所检测的受试生物体的光或放射线的量及/或分布与其它正常的哺乳动物进行比较，如果给予筛选药物后的结果比给予前更接近正常的哺乳动物，则该筛选药物可能用作该疾病或症状的治疗或预防用药物。

受试生物体种类及给予方法与以上【光学成像方法】及【放射成像方法】中所述相同。

本发明的化合物可以由已知的材料（例如市售的材料）通过公知的方法合成。本领域熟练的技术人员可以根据所需要的本发明的化合物适当选择原材料和合成方法。以下结合实施例进一步描述本发明，应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的保护范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常采用常规条件或按照制造厂商所建议的条件。本发明的已知的起始原料可以采用或按照本领域已知的方法制备，或购自于市售品。化合物的结构是通过核磁共振谱(NMR)和/或质谱来确定的。

实施例 1：化合物 **I-1** 的制备，如下所示：



步骤 a：制备中间体 **b-1**

将 1.26 g (10 mmol) 4-氟-邻苯二胺(a-1)溶于 10 ml 无水乙醇中，加入 2.32g (20 mmol) 丙酮酸乙酯，室温反应 4h。反应结束后蒸干溶剂，甲醇重结晶，得到产物为白色固体，产率 86%。ESI-MS (positive): 179.0 (M+1)<sup>+</sup>。

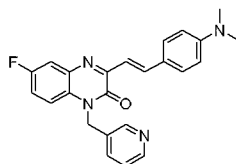
步骤 b：制备中间体 **c-1**

将 1.78 g (10 mmol) 中间体 **b-1** 和 1.49g (10 mmol) 4-二甲氨基苯甲醛溶于 5 ml 冰醋酸中，加入催化量浓硫酸，氮气保护，加热回流反应 8 小时。反应结束后将反应液倒入冰水中，EA 萃取 3 遍，饱和食盐水洗涤有机相并用无水硫酸镁干燥，经硅胶柱层析（石油醚：乙酸乙酯=6：1）纯化，得到产物为红色固体，产率 65%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12.20 (s, 1H), 7.80 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.47-7.35 (m, 4H), 7.18-7.03 (m, 3H), 2.98 (s, 6H)。ESI-MS (positive): 310.1 (M+1)<sup>+</sup>。

步骤 c：制备化合物 **I-1**

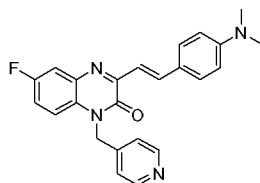
将 0.31 g (1 mmol) 化合物 **c-1** 溶于 3ml DMF，加入 0.28 g (2 mmol) 碳酸钾和 0.71 g (2 mmol) 2-溴甲基吡啶，室温反应 8h。结束后将反应液倒入水中，EA 萃取 3 遍，无水硫酸镁干燥，经硅胶柱层析（石油醚：乙酸乙酯=4：1）分离纯化，得到产物为砖红色固体，产率 18%。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>-*d*)  $\delta$  8.59 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.79 (dd, *J* = 8.9, 5.9 Hz, 1H), 7.65-7.54 (m, 4H), 7.25 (s, 1H), 7.23-7.14 (m, 2H), 7.04-6.96 (m, 1H), 6.71 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 5.58 (s, 2H), 3.03 (s, 6H)。<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>-*d*)  $\delta$  161.83 (d, *J* = 249.5 Hz), 154.54, 151.39 (d, *J* = 3.4 Hz), 150.59, 148.92, 138.12, 136.54, 132.75 (d, *J* = 11.6 Hz), 130.39 (d, *J* = 10.2 Hz), 130.08, 128.97, 123.91, 122.26, 121.42, 116.16, 111.37, 111.22, 111.07, 101.18, 47.77, 39.60。ESI-MS (positive): 401.2 (M+1)<sup>+</sup>。

实施例 2: 化合物 **I-2** 的制备, 其结构如下所示:



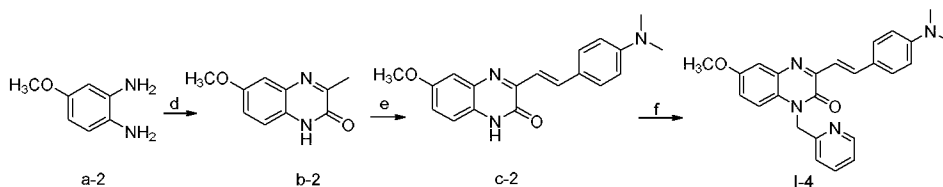
其制备方法同化合物 **I-1**, 只是在步骤 c 中将 2-溴甲基吡啶替换为 3-溴甲基吡啶, 获得砖红色固体, 产率 20%。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d) δ 8.66 (s, 1H), 8.56 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.82 (dd, *J* = 8.9, 5.9 Hz, 1H), 7.62-7.49 (m, 4H), 7.25 (s, 1H), 7.08-6.97 (m, 1H), 6.88 (dd, *J* = 10.0, 2.5 Hz, 1H), 6.71 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.48 (s, 2H), 3.04 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d) δ 161.79 (d, *J* = 250.0 Hz), 154.51, 151.40, 150.66, 148.79, 148.10, 138.44, 134.19, 132.17 (d, *J* = 11.2 Hz), 130.84 (d, *J* = 10.0 Hz), 130.17, 130.12, 129.05, 123.78, 123.25, 115.83, 111.37, 111.22, 100.27, 100.09, 43.28, 39.59. ESI-MS (positive): 401.2 (M+1)<sup>+</sup>.

实施例 3: 化合物 **I-3** 的制备, 其结构如下所示:



其制备方法同化合物 **I-1**, 只是在步骤 c 中将 2-溴甲基吡啶替换为 4-溴甲基吡啶, 获得砖红色固体, 产率 20%。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d) δ 8.58 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 7.83 (dd, *J* = 8.9, 5.9 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.55 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 7.05-7.01 (m, 1H), 6.75 - 6.69 (m, 3H), 5.46 (s, 2H), 3.04 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d) δ 161.77 (d, *J* = 250.3 Hz), 154.40, 151.38, 150.69, 149.85, 143.31, 138.57, 132.13 (d, *J* = 11.1 Hz), 130.84 (d, *J* = 10.0 Hz), 130.08, 129.07, 123.74, 120.97, 115.79, 111.46, 111.36, 111.31, 100.31, 100.13, 44.66, 39.58. ESI-MS (positive): 401.2 (M+1)<sup>+</sup>.

实施例 4: 化合物 **I-4** 的制备, 如下所示:



步骤 d: 制备中间体 **b-2**

其制备方法同化合物 **b-1**, 只是将 4-氟-邻苯二胺(**a-1**)替换为 4-甲氧基-邻苯二胺(**a-2**)。得灰色固体, 产率 81%。ESI-MS (positive): 191.0 (M+1)<sup>+</sup>。

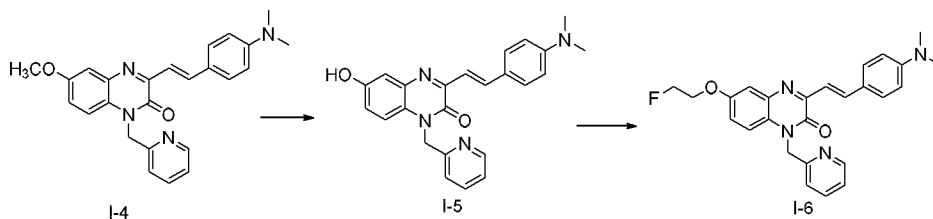
步骤 e: 制备中间体 **c-2**

其制备方法同化合物 **c-1**, 只是将中间体 **b-1** 替换为中间体 **b-2**, 得红色固体, 产率 55%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.29 (s, 1H), 7.86 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.73 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 2.96 (s, 6H)。ESI-MS (positive): 322.1 (M+1)<sup>+</sup>。

步骤 f: 制备化合物 **I-4**

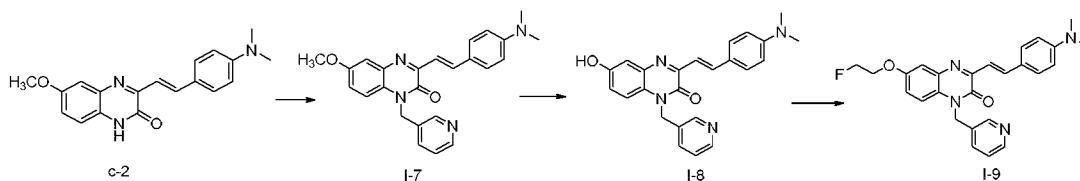
其制备方法同化合物 **I-1**，只是将中间体 **c-1** 替换为反应物 **c-2**，获得砖红色固体，产率 17%。ESI-MS (positive): 413.2 (M+1)<sup>+</sup>。

实施例 5: 化合物 **I-6** 的制备，如下所示:



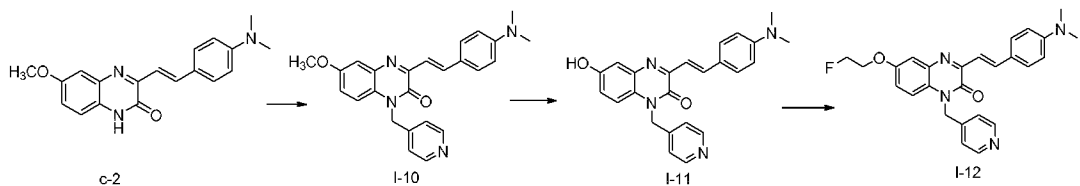
将 0.40 g 化合物 **I-4** 溶于 2 mL 三溴化硼溶液中，室温反应 3 小时，反应结束后蒸干溶剂得 **I-5**。随后加入 3 mL *N,N*-二甲基甲酰胺，加入 0.08 g 碳酸钾和 0.25 g 1-溴-2-氟乙烷，室温反应 8 小时。反应结束后加入 20 mL 水，用乙酸乙酯萃取并用无水硫酸镁干燥，硅胶柱层析（乙酸乙酯：石油醚=1:1）纯化，得淡黄色固体，产率 9%。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>-*d*) δ 8.59 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 8.00 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.70-7.49 (m, 3H), 7.12 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 6.97 (d, 4.4 Hz, 1H), 6.71 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.54 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 5.50 (s, 2H), 4.70 (d, *J* = 22.9 Hz, 2H), 4.28 (d, *J* = 16.7 Hz, 2H), 3.03 (s, 6H)。ESI-MS (positive): 445.2 (M+1)<sup>+</sup>。

实施例 6: 化合物 **I-9** 的制备，如下所示:



**I-7** 的制备方法同化合物 **I-4**，只是将 2-溴甲基吡啶替换为 3-溴甲基吡啶。后续步骤的制备方法同 **I-6**。获得砖红色固体，产率 12%。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>-*d*) δ 8.55 (d, *J* = 5.1 Hz, 2H), 8.02 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H), 7.73-7.52 (m, 4H), 7.02 (d, 6.95 (m, 3H), 6.75-6.66 (m, 3H), 5.50 (s, 2H), 4.70 (d, *J* = 37.2 Hz, 2H), 4.11 (d, *J* = 30.5 Hz, 2H), 3.00 (s, 6H)。ESI-MS (positive): 445.2 (M+1)<sup>+</sup>。

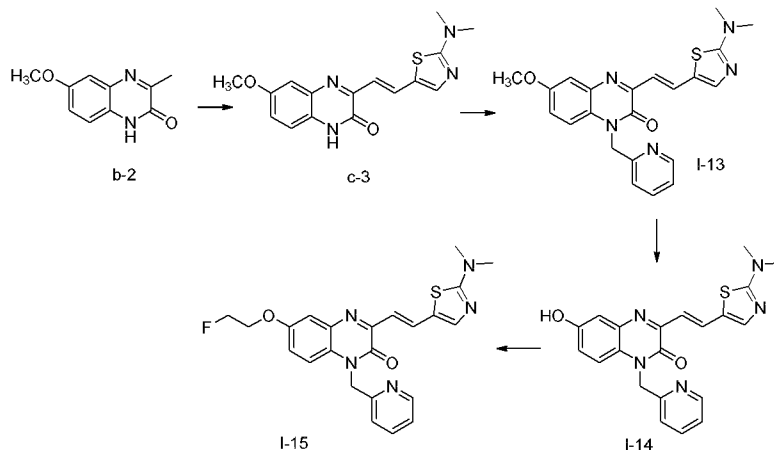
实施例 7: 化合物 **I-12** 的制备，如下所示:



**I-10** 的制备方法同化合物 **I-4**，只是将 2-溴甲基吡啶替换为 4-溴甲基吡啶。后续步骤的制备方法同 **I-6**。获得砖红色固体，产率 14%。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>-*d*) δ 8.57 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 8.04 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.69-7.51 (m, 3H), 7.15 (d, *J* = 5.1 Hz, 2H), 6.91 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 6.71 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.54 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 5.48 (s, 2H), 4.72 (d, *J* = 47.4 Hz, 2H), 4.18 (d, *J* = 28.1 Hz, 2H), 3.03 (s, 6H)。<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>-*d*) δ 158.39, 154.70, 150.49, 149.72, 143.83, 137.42, 132.30, 130.44, 128.83, 128.52, 124.03, 121.04, 116.37, 111.40, 110.28, 99.22, 80.98 (d, *J* = 171.7 Hz), 66.92 (d, *J* = 20.4 Hz),

44.47, 39.60。ESI-MS (positive): 445.2 (M+1)<sup>+</sup>。

实施例 8: 化合物 I-15 的制备, 如下所示:



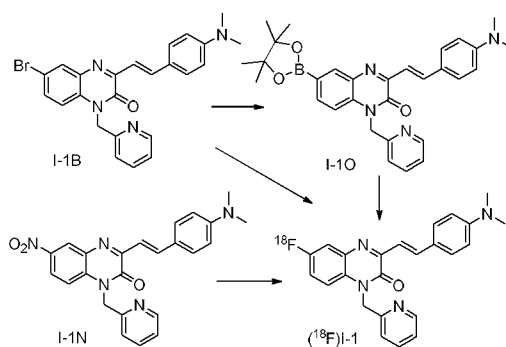
其中 I-13 的制备方法同 I-4, 只是在步骤 e 中将 4-二甲氨基苯甲醛替换为 2-二甲氨基噻唑-5-甲醛, 后续步骤同 I-6 制备方法。获得红色固体, 产率 21%。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.02 (dd, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.81-7.67 (m, 2H), 7.39-7.27 (m, 2H), 7.01-6.85 (m, 4H), 5.61 (s, 2H), 4.71 (m, 2H), 4.26 (m, 2H), 3.13 (s, 6H)。<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 170.38, 158.67, 154.97, 154.23, 149.02, 145.42, 136.96, 133.32, 130.04, 127.99, 127.49, 125.45, 122.50, 121.73, 117.35, 111.32, 99.83, 81.69 (d, J = 166.9 Hz), 67.49, 55.53, 46.61。ESI-MS (positive): 451.2 (M+1)<sup>+</sup>。

#### 【放射性核素的标记】

可采用常规已知的方法进行各种放射性核素的标记。以下用 (<sup>18</sup>F)I-1, (<sup>18</sup>F)I-15 和 (<sup>11</sup>C)I-13 的制备为例, 分别说明标记 <sup>18</sup>F 和 <sup>11</sup>C 的方法, 其他放射性示踪探针可按相同方法制备。

实施例 9: 放射性示踪探针 (<sup>18</sup>F)I-1 的合成

如下图所示, 多种不同的前体化合物均可进行放射性核素 <sup>18</sup>F 的标记。以下通过三种前体化合物(含硝基的前体、含溴的前体、含硼酸酯的前体)的合成方法进行示例说明, 但不限于此。



按实施例 1 的方法, 将 4-氟-邻苯二胺分别替换为 4-硝基-邻苯二胺和 4-溴-邻苯二胺, 分别制备含硝基的前体化合物 I-1N 和含溴的前体化合物 I-1B。进一步地, 含溴前体 I-1B 在钯催化下与频哪醇硼酸酯偶联制备活性更高的含硼酸酯的前体化合物 I-10。以上三种前体化合物都能够与放射性 K<sup>18</sup>F 反应生成放射性示踪探针 (<sup>18</sup>F)I-1。

方法 1: 由含硼酸酯的前体化合物 I-10 合成。<sup>18</sup>F-由回旋加速器生产, 然后经过 QMA 吸附, 由 1 号瓶压出 K<sub>222</sub>/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 洗脱液洗脱 <sup>18</sup>F 离子至反应管中, 在 116°C 及氮气流下蒸干。2 号瓶溶液(2 mL 乙腈)注入反应管, 在 116°C 及氮气流下共沸蒸干除水。反应管冷却 60 s。3

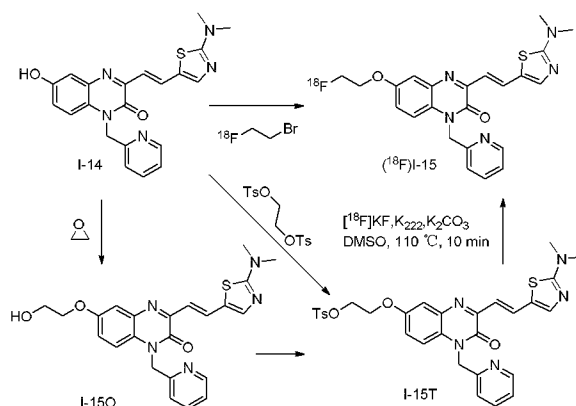
号瓶溶液(8 mg 前体化合物 **I-10** 溶于 1 mL DMF)注入反应管, 反应温度 115°C, 反应时间 30 min。冷却 100 s ( $\leq 40^\circ\text{C}$ )。4 号瓶溶液注入反应管(10 mL 注射用水)稀释, 传至 C-18 柱富集, 注射用水 20 mL, 将 C-18 柱用 2.5 mL 无水乙醇洗脱备用。用生理盐水稀释产物的乙醇溶液至乙醇含量低于 10%。并用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤获得可用于注射的( $^{18}\text{F}$ )**I-1** 溶液。所得产物与非放射性化合物 **I-1** 进行 HPLC 图谱比对, 两者保留时间一致, 证明放射标记探针制备成功。

方法 2: 由含硝基的前体化合物 **I-1N** 合成。使( $^{18}\text{F}$ )氟化物离子溶入到包含  $\text{K}_{222}$ (Kryptofix 222) (7.5 mg)及碳酸钾(2.77 mg)的 50% 乙腈溶液(0.4 mL)中, 将该溶液引入到反应容器中之, 在氮气流下加热, 使溶剂干燥固化。然后添加无水乙腈(0.1 mL)共沸蒸馏, 使反应容器内充分干燥。将溶有含硝基的前体化合物 **I-1N**(1 mg)的 DMSO(300  $\mu\text{L}$ )溶液添加到反应容器中, 在 110°C 下加热 10 分钟。冷却后, 经 HPLC 分离纯化, 获得( $^{18}\text{F}$ )**I-1** 纯品。

同理, 含溴的前体化合物 **I-1B** 也可用上述方法 2 的类似条件进行  $^{18}\text{F}$  标记, 合成( $^{18}\text{F}$ )**I-1**。

实施例 10: 放射性示踪探针( $^{18}\text{F}$ )**I-15** 的合成

如下图所示, 放射性示踪探针( $^{18}\text{F}$ )**I-15** 可用其前体化合物 **I-14** 与已被  $^{18}\text{F}$  标记的溴代烷烃  $^{18}\text{F}\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-Br}$  直接进行氧烷基化制备。或将 **I-14** 与 1,2-双(甲苯磺酰氧基)乙烷反应生成含离去基 TsO-的前体化合物 **I-15T**; 也可将 **I-14** 与环氧乙烷反应先生成含末端羟基的化合物 **I-15O**, 再与对甲基苯磺酰氯 (TsCl) 或甲烷磺酰氯 (MsCl) 等在碱性条件下反应, 生成标记位点含易离去基团 (如 TsO-或 MsO-) 的前体化合物 (如 **I-15T**); 最后将 **I-15T** 与放射性  $\text{K}^{18}\text{F}$  反应生成放射性示踪探针( $^{18}\text{F}$ )**I-15**。



前体化合物 **I-15T** 的制备示例: 0.16g 化合物 **I-14** 溶于 5 mL *N,N*-二甲基甲酰胺, 加入 0.11g 碳酸钾 (2 eq) 和 0.3 g 化合物 1,2-双(甲苯磺酰氧基)乙烷 (2 eq), 室温搅拌过夜。反应结束后加入 20 mL 水, 乙酸乙酯萃取, 无水硫酸镁干燥, 粗品用硅胶柱层析 (PE:EA=1:1), 分离得目标产物。

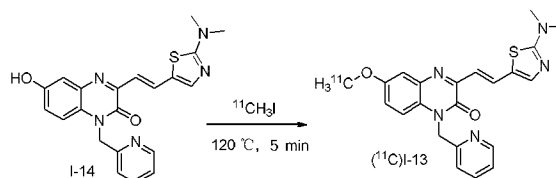
由含 TsO-基的前体化合物 **I-15T** 制备( $^{18}\text{F}$ )**I-15** 的示例如下。

将( $^{18}\text{F}$ )氟化物离子溶入到包含  $\text{K}_{222}$ (Kryptofix 222) (7.5mg)及碳酸钾(2.77mg)的 50% 乙腈溶液(0.4mL)中, 将该溶液引入到反应容器中之, 在氮气流下加热, 使溶剂干燥固化。然后添加无水乙腈(0.1mL)共沸蒸馏, 使反应容器内充分干燥。将溶有前体 **I-15T** (1.0 mg)的 DMSO(300  $\mu\text{L}$ )溶液添加到反应容器中, 在 110°C 下加热 10 分钟。冷却后经 HPLC (C18 柱) 分离纯化获得( $^{18}\text{F}$ )**I-15**。

实施例 11: 放射性示踪探针( $^{11}\text{C}$ )**I-13** 的合成, 如下图所示, 该合成需避光进行。室温下将碘( $^{11}\text{C}$ )甲烷添加到溶有 **I-14** (2 mg)的二甲基亚砷(DMSO) (300  $\mu\text{L}$ )溶液中。将反应混合液在 120°C 下加热 5 分钟。反应容器冷却后, 用 HPLC 纯化分离。将( $^{11}\text{C}$ )**I-13** 组分回收至含有乙醇(300  $\mu\text{L}$ )、25% 抗坏血酸(100  $\mu\text{L}$ )及 Tween80(75  $\mu\text{L}$ )的烧瓶中, 减压蒸馏除去溶剂。



将残余物溶解在生理盐水(3 mL, pH 7.4)中, 获得作为注射溶液的( $^{11}\text{C}$ )I-13。



### 【对 $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的结合力测试】

通过以下所述的荧光法测定本发明化合物对人源  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的结合活性。

#### (1) $\alpha$ -突触核蛋白单体制备

取 1  $\mu\text{L}$  测序正确的载有  $\alpha$ -突触核蛋白表达序列的氨苄青霉素抗性质粒与 100  $\mu\text{L}$  BL21(DE3)感受态细胞混合均匀, 冰浴冷却, 加入 600  $\mu\text{L}$  LB 培养液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ , 220 rpm 摇床培养 90 min。将培养好的菌液 150  $\mu\text{L}$  加至有氨苄培养基的灭菌培养皿涂布均匀, 挑取阳性克隆菌落加入配置好的氨苄培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养。将培养好的阳性克隆菌液倾入 1 L 的 2 $\times$ YT 培养基中, 在 220 rpm 摇床中以 37 $^{\circ}\text{C}$  培养至 OD 600 为 0.6 时降温至 18 $^{\circ}\text{C}$ , 每瓶培养基加入 500 mM IPTG 1ml 诱导培养 16 小时。

离心收集菌体, 超声破碎后高速离心 30 min, 收集上清液, 经 Ni-NTA 亲和柱层析去除 DNA 和杂蛋白, 再通过分子排阻层析纯化得到  $\alpha$ -突触核蛋白单体, 以 SDS-PAGE 不连续电泳验证纯度。

#### (2) $\alpha$ -突触核蛋白聚集体制备

将  $\alpha$ -突触核蛋白单体配置成含 1 $\times$ PBS 的 Buffer 溶液, 其中蛋白终浓度 100  $\mu\text{M}$ (约 5 mg/mL), 置于 37 $^{\circ}\text{C}$  下 1000 rpm 摇床中孵育 7 天获得  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体。初始蛋白单体浓度和终浓度均以 BCA 法精确测定。

制备的  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体也称为预制纤维(preformed fibrils, PFFs), 用于本发明所述的蛋白亲和力测试、细胞模型的构建及测试。

#### (3) 化合物结合活性测试

称取约 1 mg 化合物, 用 DMSO 配置成 10 mM 母液, 随后用 PBS 稀释成 20  $\mu\text{M}$ , 并进行 7 次梯度稀释(每次稀释三倍); 将 30  $\mu\text{L}$  待测化合物加入 384 孔板, 实验组加入 30  $\mu\text{L}$   $\alpha$ -突触核蛋白聚集体(3  $\mu\text{M}$ ), 对照组加入等量 PBS, 将 384 孔板于室温中震荡(50 rpm)孵育 1 小时; 随后将孔板取出, 用酶标仪检测化合物的最大吸收、发射波长, 并在该波长下检测荧光值。用实验组扣减对照组计算出分子不同浓度的荧光变化值, 用 GraphPad Prism 的 Saturation binding 模块计算化合物对蛋白的结合力。

本发明式 I 化合物对  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的结合活性通过以上方法测定, 所得解离平衡常数  $K_d$  结果如表 1 所示。

表 1 本发明部分式 I 化合物对人源  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的结合活性( $K_d$ )

实施例化合物	$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )	实施例化合物	$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )	实施例化合物	$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )
I-1	***	I-6	**	I-15	***
I-2	*	I-9	*		
I-3	*	I-12	**		

\*: 1.0~0.5  $\mu\text{M}$ ; \*\*: 0.5~0.2  $\mu\text{M}$ ; \*\*\*: 0.2~0.1  $\mu\text{M}$ 。

### 【细胞模型的免疫荧光成像】

SH-SY5Y 细胞属于 SK-N-SH 细胞系, 是人源神经母细胞瘤细胞的一种。该细胞可以表达多种神经元的重要蛋白, 例如多巴胺转运体、多巴胺羟化酶、酪氨酸羟化酶等, 因此常被用于研究帕金森病的机制和药效评估。本发明将制备好的  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体(PFFs)与 SH-SY5Y 细胞共孵育, 通过胞吞作用, 12 小时后  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体可被内吞至细胞内。然后将该模型细胞分别与  $\alpha$ -突触核蛋白抗体和化合物进行孵育, 经 PBS 洗涤后在显微镜下观察。具体操作如下。

将 SH-SY5Y 细胞培养于高糖 DMEM 培养基中(含有 10% Gibco 胎牛血清), 当复苏传代 5 次后, 细胞状态趋于稳定, 随后在培养基中加入 PFFs, 培养 48 h 后进行荧光染色实验。吸干细胞培养液, 用 PBS 清洗三次后, 加入 0.3% Triton X-100 孵育 10 min; PBS 清洗后加入 10%山羊血清封闭 1 h; PBS 清洗后加入一抗 (1:1000, 610786, BD Biosciences) 在 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜; PBS 清洗后加入二抗 (1:1000, goat-anti rabbit Alex Fluor 594 and goat-anti-mouse Alex Fluor 488, Invitrogen) 在室温孵育 2 h; 最后加入本发明化合物室温孵育 1 h, PBS 清洗后封片并用激光共聚焦显微镜拍照。

结果如图 1 所示, 表明所测试的式 I 化合物均能对 SH-SY5Y 细胞模型中的  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体进行良好结合, 尤其化合物 **I-6**、**I-12**、**I-15** 同时表现出了优秀的靶点结合活性和特异性, 基本未发生非特异性结合。

### 【病人脑的光学成像】

#### 路易小体痴呆患者 (DLB) 脑片的染色及成像

路易小体痴呆病人脑片取自一位 75 岁男性逝者的脑杏仁核组织, 生前患有 2 期路易小体痴呆症。对富含  $\alpha$ -突触核蛋白病变的杏仁核组织进行冰冻切片, 切片厚度为 20  $\mu\text{m}$ 。

将待测化合物 **I-15** 用含 50% EtOH 的 PBS 溶液稀释成 30  $\mu\text{M}$ , 室温下与获得的新鲜冷冻脑切片孵育 30 分钟, 随后用 50%乙醇溶液洗涤 5 分钟, 再用超纯水洗涤 2 次, 每次 3 分钟。使用封埋剂(VECTASHIELD H-1000, Vector Laboratories)封埋切片后, 通过荧光显微镜拍照, 获得切片上的病变积聚区域的图像。使用分析软件(Image J)对病变区域及病变非形成区域(背景)的荧光辉度进行定量, 以评估结合选择性。

附图 2 的荧光图像结果显示化合物 **I-15** 能清晰地染色路易体痴呆病人脑片中的路易体和路易神经突, 表明其能与病人脑中的  $\alpha$ -突触核蛋白病变发生强结合。

#### 阿尔茨海默患者 (AD) 脑片的染色及成像

阿尔茨海默病人脑片取自一位 3 期患者逝后的脑颞上回组织。将脱蜡后的脑组织在 10% 中性缓冲福尔马林液中固定, 石蜡包埋后切片, 切片厚度为 6  $\mu\text{m}$ 。检测方法同上述对路易小体痴呆患者 (DLB) 脑片的染色方法一样。荧光图像结果如附图 3 所示, 化合物 **I-15** 也能探测到 AD 病人脑片中的  $\text{A}\beta$  原始斑块、 $\text{A}\beta$  致密核心斑块、Tau 神经纤维缠结, 不与 Tau 神经纤维丝结合。很明显地, 在 AD 病人脑片中, 化合物的染色信号远弱于对 DLB 病人脑片的染色信号, 表明 **I-15** 对  $\text{A}\beta$  和 Tau 病理组织的结合都很弱。

由附图 2、图 3 结果可知, 化合物 **I-15** 对  $\alpha$ -突触核蛋白病理组织的结合明显强于对  $\text{A}\beta$ 、Tau 病理组织的结合, 表明其对  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体具有非常好的选择性。

### 【血脑屏障渗透性测试】

根据下列方法, 对大鼠尾静脉注射本发明化合物以测定其体内的血脑屏障渗透性。

将待测化合物溶解于 DMSO 中, 加入蓖麻油和 PBS 进行稀释 (DMSO: 蓖麻油: PBS = 1: 1: 8); 对 SD 大鼠进行称重, 以 5 mg/kg 进行尾静脉给药; 用异氟烷麻醉, 给药 20 min 后取血 500  $\mu\text{L}$ 。随后用 200 mL PBS 进行心脏灌流, 待器官褪色后停止灌流, 取出脑组织, 用 PBS 冲洗表面。

取出的血液用 9000 rpm 离心 5 min，取 200  $\mu$ L 上清液，加入 800  $\mu$ L 甲醇，14000 rpm 离心 10 min，取上清液过 0.22  $\mu$ m 滤膜，保存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。

取约 0.5 g 脑组织，加入 2 mL PBS 和 2 mL 甲醇进行组织匀浆，取出 1 mL 匀浆液加入 2 mL 甲醇，14000 rpm 离心 10 min，取 1 mL 上清液过 0.22  $\mu$ m 滤膜并保存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。对上述血液样本和脑匀浆上清液样本分别用 LC-MS/MS 检测其中的化合物浓度。

当脑/血比值 <0.1, 0.1~0.3 或 >0.3 分别表示化合物透过血脑屏障程度为难、适中或良好。测试结果表明本发明化合物 **I-6**、**I-12**、**I-15** 的脑/血比接近 1.0 或大于 1.0，证明它们都具有很好的血脑屏障渗透能力。由于本发明化合物结构相似，且 clogP 值多在 1.0~3.0 之间，因此可以预测本发明其它化合物也应具有可接受的血脑屏障渗透能力。

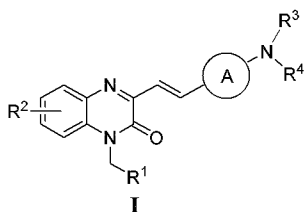
### 工业实用性

本发明的能够结合/染色  $\alpha$ -突触核蛋白积聚体的探针化合物及其组合物对于当前十分重要的医疗难点之一的帕金森病等疑难病症的早期发现、医疗和预防都极为重要，并且具有用于医疗领域的极高的可能性。本发明化合物可以作为显像示踪剂用于显像  $\alpha$ -突触核蛋白的积聚，从而能对多种神经退行性疾病，例如帕金森病 (PD)、帕金森病性失智症 (PDD)、路易体痴呆症 (DLB)、多系统萎缩 (MSA) 等提供早期诊断和疾病进展的信息。

102322CT

## 权利要求

1. 通式 I 所示的化合物、其在医药上可接受的盐、或其溶剂化物，其用作诊断  $\alpha$ -突触核蛋白积聚性疾病的示踪探针，



通式 I 中，

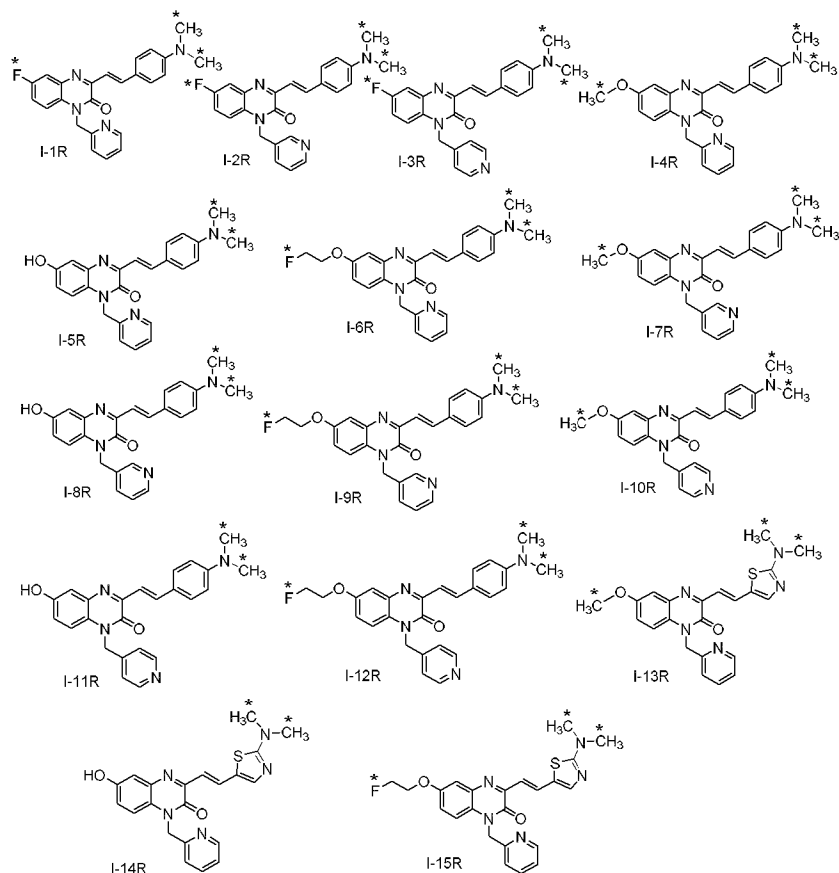
$R^1$  为 5~6 元芳杂基；

$R^2$  选自卤素基、硝基、羟基、 $C_{1-4}$  烷氧基、卤代的  $C_{1-4}$  烷氧基，其中，所述的卤素原子选自氟、氯、溴或碘；

$R^3$ 、 $R^4$  各自独立地选自氢， $C_{1-3}$  烷基；

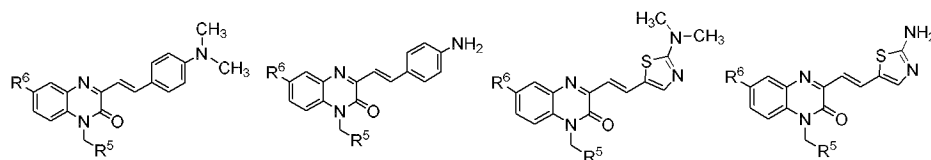
环 A 选自苯环、5~6 元芳杂环。

2. 根据权利要求 1 所述的通式 I 所示的化合物、其在医药上可接受的盐、或其溶剂化物，其特征在于，所述  $R^1$  为吡啶基。
3. 根据权利要求 1 所述的通式 I 所示的化合物、其在医药上可接受的盐、或其溶剂化物，其特征在于，所述  $R^3$ 、 $R^4$  为甲基。
4. 根据权利要求 1 所述的通式 I 所示的化合物、其在医药上可接受的盐、或其溶剂化物，其特征在于，所述环 A 为苯环或噻唑环。
5. 根据权利要求 1-4 中任意一项所述的通式 I 所示的化合物、其在医药上可接受的盐、或其溶剂化物，其特征在于，所述化合物的 1 个或 1 个以上原子是该原子的放射性同位素，其中，所述的放射性同位素选自  $^{11}C$ 、 $^{13}N$ 、 $^{15}O$ 、 $^{18}F$ 、 $^{76}Br$ 、 $^{123}I$ 、 $^{125}I$ 、 $^{131}I$ 。
6. 根据权利要求 5 所述的通式 I 所示的化合物、其在医药上可接受的盐、或其溶剂化物，其特征在于，所述化合物选自以下结构：



其中，具有\*的原子中至少有一个是该原子的放射性同位素。

7. 下式所示的前体化合物，其特征在于，所述前体化合物用于合成权利要求6所述的化合物，



其中， $R^5$ 为吡啶基； $R^6$ 独立地取自羟基、氟、溴、碘、硝基、硼酸酯基、 $TsO-(CH_2)_m-O-$ 、 $MsO-(CH_2)_m-O-$ ，其中， $m$ 为2~4的整数。

8.  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的光学显像用组合物，其特征在于，包含权利要求1~4中所述的通式I所示的化合物、其在医药上可接受的盐、或其溶剂化物，及医药上可接受的载体。
9.  $\alpha$ -突触核蛋白聚集体的放射显像用组合物，其特征在于，包含权利要求5~6所述的通式I所示的化合物、其在医药上可接受的盐、或其溶剂化物，及医药上可接受的载体。
10. 权利要求1所述的通式I所示的化合物、其在医药上可接受的盐、或其溶剂化物的用途，其特征在于，所述化合物、其在医药上可接受的盐、或其溶剂化物能与 $\alpha$ -突触核蛋白聚集体结合，用作诊断 $\alpha$ -突触核蛋白积聚性疾病的显像示踪探针。

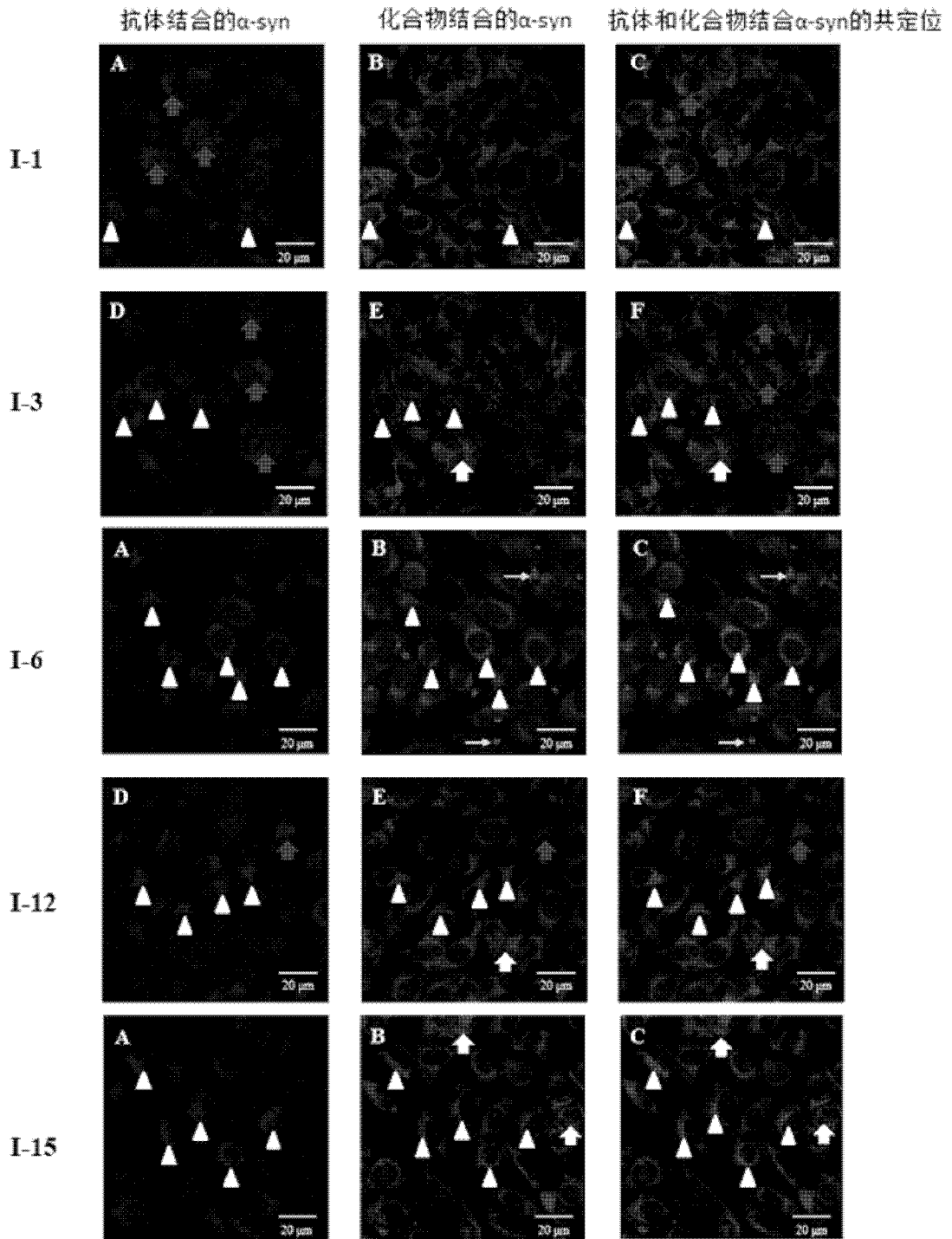


图 1

化合物结合的路易小体 化合物结合的路易神经突

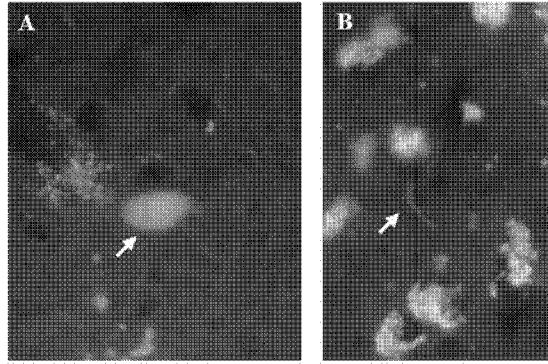


图 2

化合物结合的  $A\beta$  沉积和 Tau 神经纤维缠结

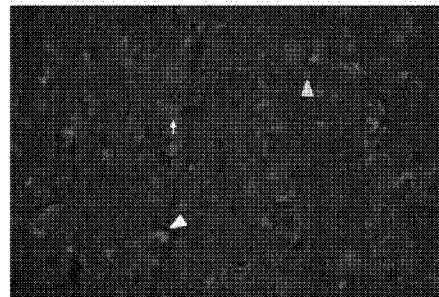


图 3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/137518

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
A61K 51/04(2006.01)i;A61K 49/00(2006.01)i;C07D 401/06(2006.01)i;C07D 417/14(2006.01)i;G01N 21/64(2006.01)i;G01N 30/02(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: A61K C07D G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS; CNTXT; DWPI; VEN; ENTXTC; ENTXT; WPABS; CNKI; VCN; CJFD; 万方, WANFANG; ISI Web of Science; 读秀学术, DUXIU ACADEMIC; Springer; STNext: 复旦大学, $\alpha$ -突触核蛋白聚集体, 示踪剂, 唑啉, 探针, 化合物结构式检索, search for structural formula of compound, Fudan University, alpha-synuclein aggregation, Tracer, Quinoxalin, probe		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 112645891 A (FUDAN UNIVERSITY) 13 April 2021 (2021-04-13) description, paragraphs [0011] and [0024]	1-10
A	CN 112110829 A (FUDAN UNIVERSITY) 22 December 2020 (2020-12-22) entire document	1-10
A	XU, Mingming et al. "Advances in the Development of Imaging Probes and Aggregation Inhibitors for Alpha-synuclein" <i>Acta Pharmacologica Sinica</i> , 04 October 2019 (2019-10-04), pp. 483-498	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>14 February 2023</b>		Date of mailing of the international search report <b>03 March 2023</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088</b> Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer  Telephone No.



**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: **10**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
The subject matter of claim 10 relates to the use of the compound represented by general formula I of claim 1, a pharmaceutically acceptable salt thereof, or a solvate thereof. However, the ultimate purpose of the above-mentioned use is to diagnose a disease of a living animal body, which falls within the scope of disease diagnosis and treatment methods as defined by PCT Rule 39.1(4).  
  
The reasonably expected amendment for claim 10 is as follows:  
  
10. The use of the compound represented by general formula I of claim 1, a pharmaceutically acceptable salt thereof, or a solvate thereof in the preparation of an imaging tracer probe for diagnosing diseases in which  $\alpha$ -synuclein accumulates, characterized in that the compound, the pharmaceutically acceptable salt thereof, or the solvate thereof can bind to  $\alpha$ -synuclein aggregates.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2022/137518**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	112645891	A	13 April 2021	CN	112645891	B	08 November 2022
CN	112110829	A	22 December 2020	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/137518

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>A61K 51/04(2006.01)i;A61K 49/00(2006.01)i;C07D 401/06(2006.01)i;C07D 417/14(2006.01)i;G01N 21/64(2006.01)i;G01N 30/02(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>														
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>IPC: A61K C07D G01N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称,和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS;CNTXT;DWPI;VEN;ENTXTC;ENTXT;WPABS;CNKI;VCN;CJFD;万方; ISI Web of Science;读秀学术;Springer;STNext; 复旦大学, <math>\alpha</math>-突触核蛋白聚集体, 示踪剂, 啮啉, 探针, 化合物结构式检索, Fudan University, alpha-synuclein aggregation, Tracer, Quinoxalin, probe</p>														
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件,必要时,指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 112645891 A (复旦大学) 2021年4月13日 (2021 - 04 - 13) 说明书第[0011]、[0024]段</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 112110829 A (复旦大学) 2020年12月22日 (2020 - 12 - 22) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>XU, Ming ming 等. "Advances in the Development of Imaging Probes and Aggregation Inhibitors for Alpha-synuclein" Acta Pharmacologica Sinica, 2019年10月4日 (2019 - 10 - 04), 第483-498页</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件,必要时,指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 112645891 A (复旦大学) 2021年4月13日 (2021 - 04 - 13) 说明书第[0011]、[0024]段	1-10	A	CN 112110829 A (复旦大学) 2020年12月22日 (2020 - 12 - 22) 全文	1-10	A	XU, Ming ming 等. "Advances in the Development of Imaging Probes and Aggregation Inhibitors for Alpha-synuclein" Acta Pharmacologica Sinica, 2019年10月4日 (2019 - 10 - 04), 第483-498页	1-10
类型*	引用文件,必要时,指明相关段落	相关的权利要求												
A	CN 112645891 A (复旦大学) 2021年4月13日 (2021 - 04 - 13) 说明书第[0011]、[0024]段	1-10												
A	CN 112110829 A (复旦大学) 2020年12月22日 (2020 - 12 - 22) 全文	1-10												
A	XU, Ming ming 等. "Advances in the Development of Imaging Probes and Aggregation Inhibitors for Alpha-synuclein" Acta Pharmacologica Sinica, 2019年10月4日 (2019 - 10 - 04), 第483-498页	1-10												
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>														
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"D" 申请人在国际申请中引证的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&amp;" 同族专利的文件</p>														
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2023年2月14日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2023年3月3日</p>												
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>杨凤娇</p> <p>电话号码 (+86) 0512-88995733</p>												

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1.  权利要求： 10  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：  
权利要求10主题涉及权利要求1所述的通式I所示的化合物、其在医药上可接受的盐、或其溶剂化物的用途。但上述用途是以诊断有生命的动物体的疾病为最终目的，属于PCT细则39.1(4)条规定的疾病诊断和治疗方法范畴。  
针对权利要求10合理预期的修改如下：  
10. 权利要求1所述的通式I所示的化合物、其在医药上可接受的盐、或其溶剂化物在制备用作诊断 $\alpha$ -突触核蛋白积聚性疾病的显像示踪探针中的用途，其特征在于，所述化合物、其在医药上可接受的盐、或其溶剂化物能与 $\alpha$ -突触核蛋白聚集体结合。
2.  权利要求：  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3.  权利要求：  
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
PCT/CN2022/137518

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 112645891 A	2021年4月13日	CN 112645891 B	2022年11月8日
CN 112110829 A	2020年12月22日	无	