(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202091323 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.10.09

(22) Дата подачи заявки
2018.11.27

(51) Int. Cl. ***A61K 51/04*** (2006.01)
C07B 59/00 (2006.01)
C07D 491/048 (2006.01)
A61K 101/00 (2006.01)
A61K 101/02 (2006.01)

(54) ВИЗУАЛИЗИРУЮЩИЕ СРЕДСТВА

(31) **17204896.9**
(32) **2017.12.01**
(33) **EP**
(86) **PCT/EP2018/082649**
(87) **WO 2019/105913 2019.06.06**

(71) Заявитель:
ЮСБ БАЙОФАРМА СРЛ (BE)

(72) Изобретатель:
Мерсье Жоэль, Валад Анна, Вермейрен Селина, Вуд Мартин, Магуайр Ральф (BE)

(74) Представитель:
Веселицкая И.А., Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(57) В заявке описаны меченые радиоактивным изотопом производные 4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-ила) и их применение в качестве радиоактивных индикаторов и, в частности, их применение в качестве визуализирующих средств.

202091323 A1

202091323 A1

ВИЗУАЛИЗИРУЮЩИЕ СРЕДСТВА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к меченым радиоактивным изотопом производным 4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-ила) и к их применению в качестве радиоактивных индикаторов, и, в частности, в качестве визуализирующих средств.

В частности, настоящее изобретение относится к меченым радиоактивным изотопом 6-[2-(фторметил)-4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил]-1,5-диметилпиримидин-2,4(1H,3H)дионам и к их применению в качестве радиоактивных индикаторов, и, в частности, в качестве визуализирующих средств.

Точнее, настоящее изобретение относится к применению меченых радиоактивным изотопом 6-[2-(фторметил)-4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил]-1,5-диметилпиримидин-2,4(1H,3H)дионам в качестве визуализирующих средств для ПЭТ (позитронная эмиссионная томография).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Находящиеся в головном мозге допаминергические нейроны играют главную роль в здоровье и функции головного мозга. Допаминергическая нейротрансмиссия важна для движения, познавательной способности и процессов, связанных с поощрением. Идентифицированы пять постсинаптических допаминергических нейрорецепторов (D1-D5).

Относящийся к моноаминам допамин воздействует на GPCR (рецепторы, связанные с G-белком) двух семейств и модулирует двигательную функцию, механизмы, связанные с поощрением, познавательные процессы и другие физиологические функции. В частности, допамин воздействует на нейроны посредством D1-подобных рецепторов, включающих допаминовые рецепторы D1 и D5, которые в основном сопряжены с G-белком G_S, и поэтому стимулируют продуцирование цАМФ (циклический аденозинмонофосфат), и посредством D2-подобных рецепторов, которые включают рецепторы D2, D3 и D4, которые сопряжены с G-белками $G_{i/q}$ и которые подавляют продуцирование цАМФ. Эти рецепторы широко экспрессируются в разных областях головного мозга.

Лекарственные средства, обладающие антагонистическим и агонистическим типом воздействия на допаминергические рецепторы, разработаны для лечения болезни Паркинсона, синдрома беспокойных ног при шизофрении и СДВГ (синдром дефицита внимания с гиперактивностью), как это описано в публикациях Stocchi, F. et al. Advances in dopamine receptor agonists for the treatment of Parkinson's disease. Expert Opin Pharmacother 2016, 17(14), 1889-1902; Buckley, P. F. Broad therapeutic uses of atypical antipsychotic medications. Biol Psychiatry 2001, 50(11), 912-924; and Davidson, M. A. ADHD in adults: a review of the literature. J Atten Disord 2008, 11(6), 628-641.

Однако показано, что для некоторых GPCR затруднительно разработать малые молекулы или обеспечить достаточную селективность вследствие высокой степени гомологии центров связывания лиганда у подтипов рецептора, например, допаминовых рецепторов D1 и D5 (D1-подобный) или D2 и D3, и поэтому у существующих лекарственных средств не полностью отсутствуют побочные эффекты.

Несмотря на предпринятые в течение последних 15 лет многочисленные попытки уменьшить степень отсева при разработке лекарственных средств, вероятность того, что испытывающееся в клинических исследованиях лекарственное средство поступит в продажу, все еще составляет менее 10%. Наибольшая степень отсева наблюдается при разработке лекарственных средств для лечения онкологических заболеваний и заболеваний ЦНС (центральная нервная система), в особенности, с учетом новых мишеней, для которых понимание биологических процессов является ограниченным. Для уменьшения степени отсева лекарственных средств в клинических исследованиях необходимо разработать надежные трансляционные средства исследования, которые обеспечивают более быстрое принятие лучших решений, как это описано в публикации Woodcock, J. and al. The FDA critical path initiative and its influence on new drug development. Annu Rev Med 2008, 59, 1-12.

Поскольку невозможно обеспечить доступ к тканям головного мозга живого человека, разработка таких трансляционных средств, предназначенных для поддержки разработки лекарственных средств для ЦНС, основана, в частности, на неинвазивных методиках, такие как визуализация *in vivo*. В последние годы разработано много методик использования визуализации с помощью позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ) для поддержки разработки лекарственных средств для ЦНС.

ПЭТ является точной и сложной методикой, в которой используются изотопы, производящиеся на циклотроне. Испускающий позитроны радиоактивный изотоп вводят, например, путем инъекции, и он накапливается в ткани-мишени. При его распаде происходит испускание позитрона, который быстро соединяется с соседним электроном, что приводит к одновременному испусканию двух поддающихся регистрации гамма-лучей в противоположных направлениях. Их детектируют в камере ПЭТ и получают чрезвычайно точную информацию о их происхождении. ПЭТ является чрезвычайно чувствительной методикой и поэтому требуются небольшие количества меченых радиоактивным изотопом соединений, которые называются индикаторами для ПЭТ или визуализирующими средствами для ПЭТ, или лигандами для ПЭТ.

Визуализация с помощью ПЭТ является особенно хорошо изученной методикой, поскольку она основана на включении радиоактивных изотопов атомов, которые содержатся в большинстве малых молекул кандидатов в лекарственные средства. Она может обеспечить количественные данные для поддержки при процедуре принятия решения на разных стадиях доклинического и клинического исследования при разработке лекарственных средств.

Так, например, визуализация с помощью ПЭТ может предоставить информацию о фармакокинетике в головном мозге живых субъектов. Посредством прямого введения радиоактивной метки в кандидат в лекарственные средства можно получить информацию о прохождении через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) у здоровых и страдающих заболеванием субъектов.

Разработка утвержденных визуализирующих средств для ПЭТ, предназначенных для белка/рецептора, для которых предназначена программа разработки лекарственных средств, также обеспечивает возможность изучения, путем исследования блокирования, занятости мишени кандидатом в лекарственные средства или его связывания с ней. Такие исследования могут предоставить чрезвычайно важную информацию, например, о зависимости занятости мишени от вводимой дозы, а также о кинетике связывания с мишенью. Если такая информация получена при проведении фазы I клинического исследования, то она может являться определяющим решение фактором при выборе наиболее подходящего диапазона доз и режимов для проведения фазы II исследований по ПРК (проверки концепции).

Получение изображений с помощью ПЭТ также может обеспечить некоторое представление о механизме действия кандидата в лекарственные средства и предоставить возможность стратификации пациентов, слежения за развитием заболевания, или его можно использовать для проверки фармакологических характеристик или в качестве объективных конечных точек при проведении фазы II исследований по ПРК.

Для разработки визуализирующих средств для ПЭТ необходимы соединения, обладающие особыми характеристиками, которые не обязательно совпадают с характеристиками кандидатов в лекарственные средства.

Идеальные характеристики, которыми должны обладать соединения, чтобы являться подходящими для использования в качестве визуализирующих средств для ПЭТ, описаны в публикациях Zhang, L et al. Strategies to facilitate the discovery of novel CNS PET ligands. EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry 2016, 1 (13), 1-12; Need, A et al. Approaches for the discovery of novel positron emission tomography radiotracers for brain imaging. Clin. Transl. Imaging 2017, 5 (3), 265-274; Pike, V. W. Considerations in the development of reversibly binding PET radioligands for brain imaging. Curr Med Chem. 2016, 23 (18), 1818-1869; Zhang, L. et al. Design and selection parameters to accelerate the discovery of novel central nervous system PET ligands and their application in the development of a novel phosphodiesterase 2A PET ligand. J Med Chem. 2013, 56 (11), 4568-4579. Однако часто затруднительно обеспечить соответствующую комбинацию этих характеристик.

Кроме того, помимо визуализации *in vivo* в равной степени важными для принятия решения при разработке лекарственных средств являются радиоактивные индикаторы, которые можно использовать *in vitro* или *ex vivo*, например, при ауторадиографии тканей животных. Эти исследования способствуют пониманию механизма действия соединений, модулирующих определенный рецептор, связанный с одним или большим количеством заболеваний, или пониманию изменений плотности мишени, возникающих вследствие фармакологического действия соединения.

D1-Подобные рецепторы участвуют во многих физиологических функциях и поведенческих процессах. Так, например, они участвуют в синаптической пластичности, когнитивной функции и направленных на достижение цели двигательных функциях, а также в процессах, связанных с поощрением. Вследствие их роли в нескольких физиологических/неврологических процессах D1-подобные рецепторы участвуют в различных нарушениях, включая связанные с познавательной способностью и негативные симптомы шизофрении, нарушения познавательной способности, связанные с классическим лечением нейролептическим средством, импульсивность, синдром дефицита внимания с гиперактивностью (СДВГ), болезнь Паркинсона и связанные с ней нарушения движения, дистонию, болезнь Гентингтона, слабоумие, связанное с тельцами Леви, болезнь Альцгеймера, возрастное ухудшение познавательной способности, слабое нарушение познавательной способности (СНП), привыкание к чрезмерному употреблению лекарственного средства или наркотика, нарушения сна и апатию.

Разработаны некоторые визуализирующие средства для ПЭТ, предназначенные для подтипов допаминергических нейрорецепторов, описанные в публикации Prante, O., et al. Radioligands for the dopamine receptor subtypes. J Labelled Comp Radiopharm 2013, 56(3-4), 130-148.

Однако эти визуализирующие средства для ПЭТ обладают определенными недостатками, такими как отсутствие селективности по отношению к D1-подобным рецепторам, в частности, в новой коре головного мозга, неподходящие фармакокинетические характеристики или образование радиоактивных метаболитов, которые проходят через гематоэнцефалический барьер и могут ухудшать результаты количественных исследований.

Большинство этих визуализирующих средств для ПЭТ также являются антагонистами, а не агонистами.

Поэтому необходимо разработать визуализирующие средства - ортостерические агонисты D1-подобных рецепторов, в частности, визуализирующие средства для ПЭТ, поскольку они будут более чувствительными по отношению к ортостерическим модуляторам D1, а также к концентрации допамина, эндогенному лиганду D1. Это может обеспечить более точное исследование воздействия лекарственных средств, воздействующих на этот активный центр рецептора, и исследование изменений в стимулировании рецептора при патологических состояниях.

В последние годы произошло возобновление интереса к разработке не являющихся пирокатехинами селективных ортостерических агонистов D1-подобного рецептора или аллостерических модуляторов, которые модулируют активность допаминовых рецепторов, в частности, рецептора D1, и которые можно использовать для лечения опосредуемых рецептором D1 нарушений.

Не являющимися пирокатехинами ортостерическими лигандами D1 являются, например, описанные в заявке на международный патент, опубликованной под номером WO 2014/072881.

Аллостерическими модуляторами D1-подобного рецептора являются, например, описанные в заявках на международные патенты, опубликованных под номерами WO 2014/193781 и WO2016/055479.

Принимая во внимание возобновление такого интереса, необходимы селективные визуализирующие средства для D1-подобного рецептора, в частности, визуализирующие средства для ПЭТ для D1-подобного рецептора, которые можно использовать в проводимых *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo* исследования, а также в клинических исследованиях с участием людей, для содействия разработке кандидатов в лекарственные средства или для изучения роли рецептора D1 в исследуемых патологиях.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Поэтому одной задачей настоящего изобретения является получение соединений, которые являются селективными агонистами D1-подобного рецептора и которые применимы в качестве радиоактивных индикаторов, в частности в качестве визуализирующих средств для ПЭТ.

Задачей настоящего изобретения также является разработка способа визуализации и количественного анализа экспрессии рецептора D1 с использованием соединений, предлагаемых в настоящем изобретении.

Другой задачей настоящего изобретения является разработка проводимых *in vitro* или *ex vivo* способов обнаружения и количественного анализа плотности доступного D1-подобного рецептора в тканях головного мозга, в присутствии или при отсутствии эндогенного или экзогенного лиганда, этот способ включает обработку ткани меченым радиоактивным изотопом соединением, предлагаемым в настоящем изобретении, и исследование степени связывания указанного меченого радиоактивным изотопом соединения.

Другой задачей настоящего изобретения является разработка проводимых *in vitro* способов обнаружения и количественного анализа плотности доступного D1-подобного рецептора в головном мозге, в присутствии или при отсутствии эндогенного или экзогенного лиганда, этот способ включает введение субъекту меченого радиоактивным изотопом соединения, предлагаемого в настоящем изобретении, в эффективном количестве и исследование степени накопления указанного меченого радиоактивным изотопом соединения в соответствующей исследуемой области.

Другой задачей настоящего изобретения является разработка проводимого *in vitro* или *ex vivo* способа обнаружения и количественного анализа воздействия ПАМ D1 (ПАМ - позитивный аллостерический модулятор) на доступность рецептора D1 в тканях головного мозга, этот способ включает обработку ткани меченым радиоактивным изотопом соединением, предлагаемым в настоящем изобретении, в комбинации с ПАМ D1 и обнаружение увеличенной степени связывания указанного меченого радиоактивным изотопом соединения в присутствии ПАМ.

Еще одной задачей настоящего изобретения является разработка проводимого *in vivo* способа обнаружения и количественного анализа воздействия ПАМ D1 на доступность рецептора D1 в головном мозге субъекта, этот способ включает введение субъекту меченого радиоактивным изотопом соединения, предлагаемого в настоящем изобретении, в эффективном количестве в комбинации с введением ПАМ D1 и обнаружение увеличенной по сравнению с базовым значением степени накопления в головном мозге указанного меченого радиоактивным изотопом соединения в соответствующей исследуемой области.

Другие объекты настоящего изобретения станут понятны из подробного описания.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг. 1 представлен результат функционального исследования рецептора D1 с использованием клеток и с использованием соединения формулы (I), которое описано ниже в настоящем изобретении.

На фиг. 2 представлены результаты, полученные *in vivo* путем визуализации с помощью ПЭТ головного мозга обезьяны с использованием меченого радиоактивным изотопом соединения формулы (I), как это описано ниже в настоящем изобретении.

На фиг. 3 представлены результаты проводимых *in vitro* экспериментов по связыванию меченого радиоактивным изотопом соединения формулы (I), описанного ниже в настоящем изобретении, и меченого радиоактивным изотопом антагониста D1 с рекомбинантным рецептором D1 человека при отсутствии или в присутствии ПАМ D1.

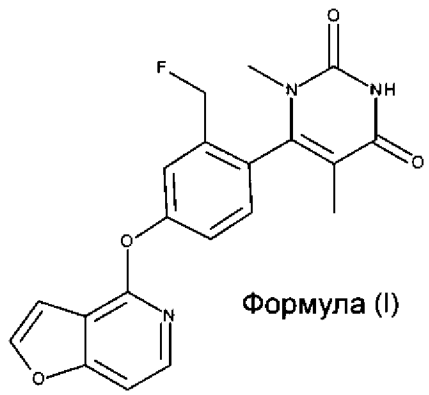
На фиг. 4 представлены результаты проводимых *ex vivo* экспериментов по связыванию с использованием ауторадиографии меченого радиоактивным изотопом соединения формулы (I) в тканях головного мозга не являющегося человеком примата (НЧП) при отсутствии или в присутствии ПАМ D1.

На фиг. 5 представлены полученные *in vivo* с помощью ПЭТ изображения головного мозга, полученное с использованием обезьян в присутствии меченого радиоактивным изотопом соединения формулы (I), в присутствии или при отсутствии ПАМ D1, и относящиеся к ним зависимости стандартизированного уровня накопления (СУН), радиоактивности, от времени.

На фиг. 6 представлена зависимость усиливающего действия, показывающая увеличенный объем распределения (V_T) меченого радиоактивным изотопом соединения формулы (I) в разных областях головного мозга после проводимого *in vivo* введения дозы ПАМ D1.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

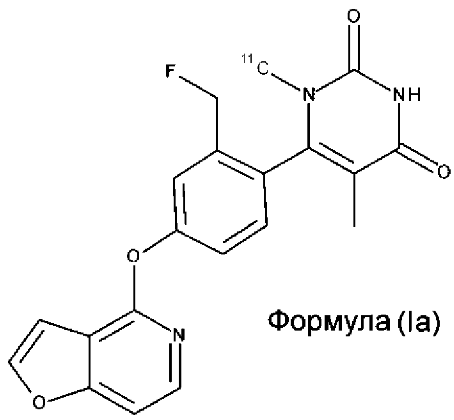
Настоящее изобретение относится к соединению формулы (I), которое является меченым радиоактивным изотопом, или его фармацевтически приемлемой соли.



Формула (I)

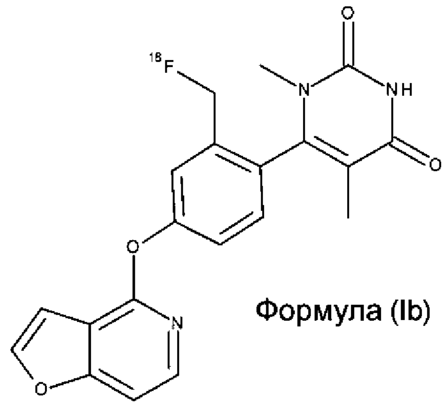
В частности, настоящее изобретение относится к соединению формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли, в которой по меньшей мере один из атомов водорода представляет собой ^{3}H или по меньшей мере один из атомов углерода представляет собой ^{11}C; или атом фтора представляет собой ^{18}F.

Одним объектом настоящего изобретения является соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, в которой один из атомов углерода представляет собой ^{11}C, ниже в настоящем изобретении называющееся соединением формулы (Ia).



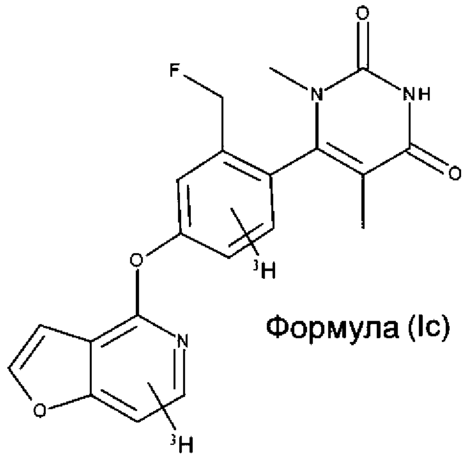
Формула (Ia)

Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, в которой атом фтора представляет собой ^{18}F, ниже в настоящем изобретении называющееся соединением формулы (Ib).



Формула (Ib)

Другим объектом настоящего изобретения является соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, в которой один или большее количество атомов водорода представляют собой ^{3}H, ниже в настоящем изобретении называющееся соединением формулы (Ic),



Формула (Ic)

Термин "меченое радиоактивным изотопом" при использовании в настоящем изобретении в отношении конкретного соединения означает соединение, меченое радиоактивным изотопом.

Радиоактивные изотопы представляют собой любые разновидности атома химического элемента, обладающие разными массами, ядра которых являются нестабильными и рассеивают избыток энергии путем самопроизвольного испускания излучения в форме альфа-, бета- и гамма-излучения. Конкретными примерами радиоактивных изотопов, предлагаемых в настоящем изобретении, являются ^{3}H, ^{18}F и ^{11}C.

В объем настоящего изобретения входят фармацевтически приемлемые соли соединений формулы (I), приведенной выше. Для применения в медицине соли соединений формулы (I) должны являться фармацевтически приемлемыми солями. Однако для получения соединений, предназначенных для применения в настоящем изобретении, или их фармацевтически приемлемых солей можно использовать другие соли. Стандартные принципы, лежащие в основе выбора и получения фармацевтически приемлемых солей описаны, например, в публикации Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, ed. P.H. Stahl & C.G. Wermuth, Wiley-VCH, 2002.

В настоящем изобретении указание на соединение или соединения включает указание на это соединение во всех его возможных изомерных формах и их смеси, если специально не указана конкретная изомерная форма.

В частности, указание на соединение или соединения включает указание на это соединение в виде всех его возможных атропоизомеров.

Атропоизомеры представляют собой стереоизомеры, возникающие вследствие заторможенного вращения вокруг ординарных связей, причем различия энергии вследствие стерического напряжения или других факторов, вносящих вклад в создание барьера вращения, являются достаточно большими для того, чтобы можно было выделить отдельные конформационные изомеры (см., например, Bringmann G. et al. Atroposelective Synthesis of Axially Chiral Biaryl Compounds. Angewandte Chemie International Edition. (2005) 44 (34): 5384–5427). Атропоизомеры обычно идентифицируют, как изомер (+) и (−), и их конфигурацию определяют путем исследования оптического вращения $[\alpha]_D$ соединения с помощью поляриметра по методикам, хорошо известным специалистам в данной области техники.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к меченому радиоактивным изотопом соединению формулы (I), которое представляет собой смесь атропоизомеров (+) и (−) состава 50:50. В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к меченому радиоактивным изотопом соединению формулы (I) которое в основном состоит из атропоизомера (−).

Термин "в основном состоит" применительно к атропоизомеру означает, что атропоизомер содержится при отношении его количества к количеству другого атропоизомера, составляющем не менее 95:5.

Меченые радиоактивным изотопом соединения формулы (I), предлагаемые в настоящем изобретении, являются ортостерическими агонистами рецептора D1. Они являются особенно предпочтительными, поскольку они являются селективными по отношению к D1-подобным рецепторам, в отличие от существующих радиоактивных индикаторов для рецептора D1, которые также связываются с рецептором серотонина 5-HT2A.

Поэтому в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединениям формулы (I), описанным в настоящем изобретении, которые являются селективными ортостерическими агонистами D1-подобного рецептора.

Обычно соединения формулы (I), описанные в настоящем изобретении, обладают сродством к D1-подобным рецепторам, выраженном в виде значения pKi, которое составляет не менее примерно 8, предпочтительно не менее примерно 9. Это означает, что соединения формулы (I), описанные в настоящем изобретении, обладают сродством к этим рецепторам, находящимся в диапазоне нескольких наномолей. Конкретные значения приведены в экспериментальном разделе.

Для специалиста в данной области техники должно быть очевидно, что значения pKi, полученные для не меченых радиоактивным изотопом соединений формулы (I), применимы к соответствующим меченым радиоактивным изотопом соединениям.

Для определения сродства соединений формулы (I) к рецептору D1 и определения селективности радиолиганда по отношению к представителям большой группы, включающей 80 родственных и неродственных биологических мишеней, проводили исследования конкурентного связывания радиолиганда. Показано, что соединения формулы (I) связываются с рецепторами D1 и D5 (ниже в настоящем изобретении называющиеся "D1-подобными рецепторами") при сродстве, находящемся в субнаномолярном диапазоне, и не связываются в значительной степени с другими исследованными мишенями.

Кроме того, как показано на фиг. 1 и дополнительно подробно описано в экспериментальном разделе, проводили исследование активности и эффективности соединений формулы (I) в функциональном исследовании рецептора D1 с использованием клеток и результаты сопоставляли с результатами для допамина, эндогенного лиганда-агониста рецептора рецептор D1. В этом исследовании показано, что рецептор D1 активируется *in vitro* соединением формулы (I), вероятно, допамином. Кроме того соединения, предлагаемые в настоящем изобретении, обладают более высокой эффективностью (значение pEC_{50} равно не менее 8), чем эндогенный лиганд - допамин. Конкретные значения и условия дополнительно подробно описаны в экспериментальном разделе.

Доказательства, приведенные выше в настоящем изобретении и в экспериментальном разделе, подтверждают тот факт, что меченые радиоактивным изотопом соединения формулы (I) являются селективными лигандами-агонистами D1-подобных рецепторов.

Это делает меченые радиоактивным изотопом соединения формулы (I), описанные в настоящем изобретении, особенно подходящими для применения для получения изображений с помощью ПЭТ, по отдельности или в комбинации с ортостерическими или аллостерическими модуляторами рецептора D1, разработанных для лечения опосредуемых рецептором D1 заболеваний.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению меченых радиоактивным изотопом соединений формулы (I), описанных в настоящем изобретении, для исследований *in vitro* или *ex vivo*.

В предпочтительном воплощении этого варианта осуществления настоящее изобретение относится к применению соединений формулы (Ic) для исследований *in vitro* или *ex vivo*.

Настоящее изобретение также относится к способу обнаружения экспрессии рецептора D1 в головном мозге, который включает инкубирование *in vitro* или *ex vivo* меченого радиоактивным изотопом соединения формулы (I), описанного в настоящем изобретении, в обнаруживаемом количестве и обнаружение указанного меченого радиоактивным изотопом соединения.

Такие способы обеспечивают количественный анализ плотности доступного рецептора D1 при заболеваниях, в которых играют роль рецепторы D1.

Диаграмма на фиг. 4 показывает, что соединение формулы (Ic) в значительной степени связывается в хвостатой скорлупе, что находится в соответствии с наиболее высокими степенями экспрессии рецептора D1, обнаруженной в области полосатого тела ткани головного мозга.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению формулы (I), предназначенному для применения для получения изображений *in vivo* с помощью ПЭТ. В одном воплощении этого варианта осуществления настоящее изобретение относится к соединению формулы (Ia) или (Ib), предназначенному для применения для получения изображений *in vivo* с помощью ПЭТ.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению формулы (I), предназначенному для применения для получения изображений *in vivo* с помощью ПЭТ.

На фиг. 2 представлены результаты, полученные путем визуализации с помощью ПЭТ с использованием соединения формулы (Ia) для макака-крабоеда, и которые показывают картину накопления, находящуюся в соответствии с описанным распределением D1-подобных рецепторов в головном мозге.

В предпочтительном воплощении этого варианта осуществления настоящее изобретение относится к соединениям формулы (I), предназначенным для применения в проводимом *in vivo* способе диагностики опосредуемых рецептором D1 нарушений.

В другом предпочтительном воплощении этого варианта осуществления настоящее изобретение относится к соединениям формулы (I), описанным в настоящем изобретении, предназначенным для применения в проводимом *in vivo* способе количественного анализа плотности доступного рецептора D1 при заболеваниях, в которых играют роль рецепторы D1.

В объем настоящего изобретения также входит проводимый *in vivo* способ визуализации и обнаружения неврологических нарушений, опосредуемых рецептором D1, который включает введение нуждающемуся в нем субъекту меченого радиоактивным изотопом соединения формулы (I), описанного в настоящем изобретении, или его фармацевтически приемлемой соли в обнаруживаемом количестве и обнаружение меченого радиоактивным изотопом соединения, связанного с рецептором D1.

Проведены некоторые исследования *in vivo* с использованием меченого радиоактивным изотопом соединения формулы (I) и, в частности, соединения формулы (Ia), в которых показано, что отсутствует ассоциативный липофильный метаболит, который может проходить через гематоэнцефалический барьер и вследствие этого влиять на результаты количественного анализа плотности рецептора D1 при получении изображений *in vivo* с помощью ПЭТ.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению соединений формулы (I) для проводимого *in vitro* или *ex vivo* количественного анализа степени связывания с мишенью ортостерических лигандов рецептора D1.

Настоящее изобретение также относится к проводимому *in vitro* или *ex vivo* способу исследования связывания с мишенью эндогенных или экзогенных ортостерических лигандов рецептора D1.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединениям формулы (I), описанным в настоящем изобретении, предназначенным для применения в проводимом *in vivo* способе визуализации и определения связывания с мишенью ортостерических агонистов D1-подобного рецептора. В предпочтительном воплощении этого варианта осуществления настоящее изобретение относится к соединению формулы (Ia) или (Ib), предназначенному для применения в проводимом *in vivo* способе визуализации и определения связывания с мишенью ортостерического агониста D1-подобный рецептор.

Термин "связывание с мишенью" при использовании в настоящем изобретении означает, что эндогенная или экзогенная молекула взаимодействует с предназначенным для нее белком-мишенью (D1-подобный рецептор) по ортостерическому или аллостерическому механизму и обеспечивает биологическое воздействие в прямом направлении.

Кроме того, согласно настоящему изобретению было установлено, что некоторые меченые радиоактивным изотопом соединения формулы (I), описанные в настоящем изобретении, являются подходящими для проводимого *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* количественного анализа воздействия соединений, которые являются позитивными аллостерическими модуляторами рецептора D1.

Термин "аллостерические модуляторы" означает соединение, которое связывается с активными центрами мишени по механизму, отличающемуся от механизма связывания ортостерического природного агониста, но которые вызывает изменение конформации GPCR, обеспечивая тем самым аллостерическое модулирование функции рецептора.

Позитивные аллостерические модуляторы (ПАМ) увеличивают активность эндогенного лиганда или активность экзогенного ортостерического агониста.

Поскольку ПАМ D1 воздействуют на рецептор D1 со стороны центра связывания, отличающегося от ортостерического активного центра эндогенного/экзогенного лиганда, желательна методика количественного анализа фактического воздействия этих соединений на рецептор D1, чтобы, например, обеспечить возможность оптимизации эффективной дозы соединения - ПАМ D1, которая необходима для обеспечения необходимого терапевтического воздействия на опосредуемые рецептором D1 заболевания.

Поэтому в предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению соединений формулы (I), описанных в настоящем изобретении, для количественного анализа *in vitro* или *ex vivo* воздействия ПАМ D1 на рецептор D1.

В одном воплощении этого варианта осуществления настоящее изобретение относится к применению соединения формулы (Ic) для количественного анализа *in vitro* воздействия ПАМ D1 на рецептор D1. Как показано на фиг. 3, соединение - ПАМ D1 существенно улучшает характеристики связывания соединения формулы (Ic).

В одном воплощении этого варианта осуществления настоящее изобретение относится к применению соединения формулы (Ic) для количественного анализа *ex vivo* воздействия ПАМ D1 на рецептор D1. В частности, настоящее изобретение относится к применению соединения формулы (Ic) для проводимого с помощью ауторадиографии количественного анализа воздействия ПАМ D1 на рецептор D1.

Полученные с помощью ауторадиографии результаты, представленные на фиг. 4, показывают, что в присутствии соединения - ПАМ D1 степень специфического связывания соединения (−)-Ic, определенная в срезах головного мозга НЧП, существенно увеличена.

Поэтому в объем настоящего изобретения также входит проводимый *in vitro* или с помощью ауторадиографии способ обнаружения и количественного анализа экспрессии D1-подобных рецепторов, и воздействия аллостерического модулятора D1 в линии клеток, экспрессирующих рецептор D1, или в тканях головного мозга.

Методики исследования связывания радиолиганда *in vitro* или с помощью ауторадиографии включают обработку биологического образца меченым радиоактивным изотопом соединением, предлагаемым в настоящем изобретении, в присутствии или при отсутствии ортостерического или аллостерического лиганда D1-подобного рецептора или рецептора D1 и количественный анализ экспрессии D1-подобного рецептора или воздействия аллостерических модуляторов путем измерения количества полученного связанного меченого радиоактивным изотопом соединения, предлагаемого в настоящем изобретении.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению формулы (Ia) или (Ib), предназначенному для количественного анализа *in vivo* воздействия ПАМ D1 на рецептор D1.

Поэтому в объем настоящего изобретения также входят соединения формулы (Ia) или (Ib), предназначенные для применения для проводимых *in vivo* обнаружения и количественного анализа экспрессии D1-подобных рецепторов и воздействия аллостерического модулятора D1.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению формулы (Ib), предназначенному для применения для проводимых *in vivo* обнаружения и количественного анализа экспрессии D1-подобных рецепторов и воздействия аллостерического модулятора D1.

Как показано на фиг. 5, соединение - ПАМ D1 существенно улучшает характеристики связывания соединения формулы (Ib), в частности, соединения формулы (−)-(Ib). Усиливающее воздействие такого ПАМ D1 представлено на фиг. 6.

Если в настоящем изобретении приведено указание на "субъект", это означает указание на человека, крысу, кошку, собаку, лошадь, овцу, корову, человека или не являющихся людьми приматов, птиц или амфибий. Предпочтительным является указание на мышь, человека или не являющегося человеком примата, или человека.

При использовании для получения изображений и, в частности, для получения изображений *in vivo* с помощью ПЭТ меченые радиоактивным изотопом соединения формулы (I) или их фармацевтически приемлемые соли можно вводить в форме фармацевтической композиции.

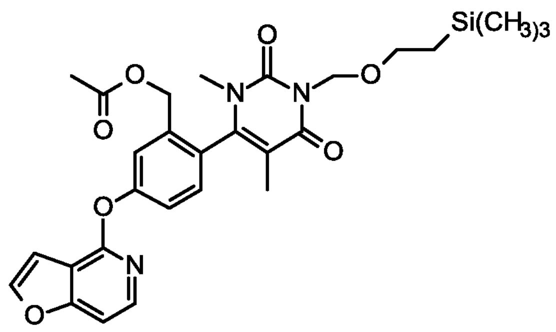
Поэтому в другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль в обнаруживаемом количестве в комбинации с фармацевтически приемлемым разбавителем или носителем.

Термин "обнаруживаемое количество" при использовании в настоящем изобретении означает количество соединения, необходимое для обнаружения с помощью выбранной методики обнаружения. Обычно такое обнаруживаемое количество определяет специалист в данной области техники на основании природы соединения и использующейся методики обнаружения.

Поэтому в объем настоящего изобретения также входят соединения формулы (I) и содержащие их фармацевтические композиции, предназначенные для применения для диагностики *in vivo* опосредованных рецептором D1 нарушений.

Меченые радиоактивным изотопом соединения формулы (I), описанные в настоящем изобретении, получали по методикам, которые дополнительно подробно описаны в экспериментальном разделе.

Соединения формулы (Ia) и (Ib) получали по многостадийной методике синтеза из 2-(3,5-диметил-2,6-диоксо-1-((2-(триметилсилил)этокси)метил)-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-4-ил)-5-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)бензилацетата,



a13

ниже в настоящем изобретении обозначенного, как промежуточный продукт a13. Условия проведения реакций дополнительно подробно описаны в экспериментальном разделе.

Соединения формулы (Ic) получали путем тритирования 6-[2-(фторметил)-4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил]-1,5-диметилпиримидин-2,4(1H,3H)диона (I) в присутствии катализатора Керра по методикам, известным специалисту в данной области техники, и так, как дополнительно подробно описано ниже в настоящем изобретении в экспериментальном разделе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ

Синтез соединения формулы (I)

Аббревиатуры/многократно использовавшиеся реагенты

Ac: ацетил

Boc: трет-бутилоксикарбонил

Рассол: насыщенный водный раствор хлорида натрия

Bz: бензоил

цАМФ: циклический аденозинмонофосфат

ДАТС: диметиламинотрифторид серы

ДХМ: дихлорметан

ДЭА: диэтиламин

ДМАП: 4-диметиламинопиридин

ДМСО: диметилсульфоксид

dppf: 1,1’-бис(дифенилфосфино)ферроцен

pEC_{50}: концентрация, при которой обеспечивается 50% от максимального значения ответа

$E_{отн.}$: относительная эффективность

$ЭР^{+}$: ионизация электрораспылением в режиме положительных ионов

ИЭР: ионизация электрораспылением

Et: этил

EtOH: этанол

Et_2O: диэтиловый эфир

EtOAc: этилацетат

ч: час(ы)

(h)D1R: допаминовый рецептор D1 (человека)

(h)D5R: допаминовый рецептор D5 (человека)

ПЭЧ: клетки почек эмбриона человека

HEPES: 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

ВЭЖХ: высокоэффективная жидкостная хроматография

ОФРВ: однородная флуоресценция с разрешением по времени

ЖХ: жидкостная хроматография

ЖХМС: жидкостная хроматография - масс-спектрометрия

ДАЛ: диизопропиламид лития

MeOH: метанол

мин. минута (минуты)

НЧП: не являющийся человеком примат

ЯМР: ядерный магнитный резонанс

ПАМ: позитивный аллостерический модулятор

iPrOH: изопропанол

КТ: комнатная температура

РС: реакционный сосуд

СЭМ: 2-(триметилсилил)этоксиметил

НЖХ: надкритическая жидкостная хроматография

ТФЭ: твердофазная экстракция

СУН: стандартизированный уровень накопления

ЗРВ: зависимость радиоактивности от времени

ТЭА: триэтиламин

ТФК: трифторуксусная кислота

ТГФ: тетрагидрофуран

ТСХ: тонкослойная хроматография

ВДИ: вода для инъекций

Методики анализа

Все реакции, в которых использовали реагенты, чувствительные к воздействию воздуха или влаги, проводили в атмосфере азота или аргона с использованием высушенных растворителей и стеклянной посуды. Эксперименты, для которых необходимо микроволновое излучение, проводили в микроволновой печи Biotage Initiator Sixty с обновленным рабочим программным обеспечением Version 2.0. Эксперименты проводили так, чтобы установить необходимую температуру как можно быстрее (максимальная мощность излучения: 400 Вт, без наружного охлаждения). Имеющиеся в продаже растворители и реагенты обычно использовали без дополнительной очистки, включая безводные растворители, когда это являлось целесообразным (обычно продукты Sure-Seal™, выпускающиеся фирмой Aldrich Chemical Company, или AcroSeal™, выпускающиеся фирмой ACROS Organics). Обычно за протеканием реакций следили с помощью тонкослойной хроматографии, ВЭЖХ или масс-спектрометрии

i) Анализ с помощью ВЭЖХ проводили следующим образом.

Методика А: кислая среда

Анализ с помощью ВЭЖХ поводили с использованием системы для ВЭЖХ Shimadzu, снабженной модулем LC-2010 CHT, детектором с фотодиодной матрицей SPD-M20A (210-400 нм), с использованием колонки YMC Triart C-18 (150×4,6) мм, 3 мкм. Элюирование в градиентном режиме проводили с использованием 5 мМ формиата аммония в воде + 0,1% муравьиной кислоты (фаза А) и ацетонитрила + 5% растворителя А + 0,1% муравьиной кислоты (фаза В), с использованием следующего градиентного режима: 5-95% В за 8,0 мин, выдерживание до 13,0 мин, 5% В при 15,0 мин, выдерживание до 18,0 мин. скорость потока при проведении ВЭЖХ: 1,0 мл/мин, инжектируемый объем: 10 мкл.

Методика В: щелочная среда

Анализ с помощью ВЭЖХ поводили с использованием системы для ВЭЖХ Shimadzu, снабженной модулем LC-2010 CHT, детектором с фотодиодной матрицей SPD-M20A (210-400 нм), с использованием колонки YMC Triart C-18 (150×4,6) мм, 3 мкм. Элюирование в градиентном режиме проводили с использованием 5 мМ формиата аммония в воде + 0,1% аммиака (фаза А) и ацетонитрила + 5% растворителя А + 0,1% аммиака (фаза В), с использованием следующего градиентного режима: 5-95% В за 8,0 мин, выдерживание до 13,0 мин, 5% В при 15,0 мин, выдерживание до 18,0 мин. скорость потока при проведении ВЭЖХ: 1,0 мл/мин, инжектируемый объем: 10 мкл.

Для специалиста в данной области техники должно быть очевидно, что при использовании разных условий анализа с помощью ЖХ можно получить разные значения времен удерживания (ВУ).

ii) Масс-спектрометрические исследования в режиме ЖХМС проводили следующим образом:

Для анализа с помощью ЖХ-МС использовали масс-спектрометр с одной квадрупольной линзой Shimadzu 2010EV. Этот спектрометр снабжен источником ИЭР и насосом для подачи двух компонентов в градиентном режиме LC-20AD, детектором с фотодиодной матрицей SPD-M20A (210-400 нм). Сбор данных проводили в режиме полного сканирования в МС от 70 до 1200 m/z в режиме положительных и отрицательных ионов. Анализ с использованием обращенной фазы проводили с использованием колонки Waters XBridge C 18 (30×2,1) мм, 2,5 мкм. Элюирование в градиентном режиме проводили с использованием 5 мМ формиата аммония в воде + 0,1% муравьиной кислоты (фаза A) и ацетонитрила + 5% растворителя A + 0,1% муравьиной кислоты (фаза B), с использованием следующего градиентного режима: 5-95% B за 4,0 мин, выдерживание до 5,0 мин, 5% B при 5,1 мин, выдерживание до 6,5 мин. скорость потока при проведении ВЭЖХ: 1,0 мл/мин, инжектируемый объем: 5 мкл.

Параметры МС: Напряжение на детекторе равно 1,5 кВ. Температура блока источника равна 200°C. Температура десольватации равна 240°C. Скорость потока распыляющего газа равна 1,2 л/мин (азот). Сбор данных проводили в режиме полного сканирования в МС от 70 до 1200 m/z в режиме положительных и отрицательных ионов.

Методика B: щелочная среда

Для анализа с помощью ЖХ-МС использовали масс-спектрометр с одной квадрупольной линзой Shimadzu 2010EV. Этот спектрометр снабжен источником ИЭР и насосом для подачи двух компонентов в градиентном режиме LC-20AD, детектором с фотодиодной матрицей SPD-M20A (210-400 нм). Сбор данных проводили в режиме полного сканирования в МС от 70 до 1200 m/z в режиме положительных и отрицательных ионов. Анализ с использованием обращенной фазы проводили с использованием колонки Waters XBridge C 18 (30×2,1) мм, 2,5 мкм. Элюирование в градиентном режиме проводили с использованием 5 мМ формиата аммония в воде + 0,1% аммиака (растворитель A) или ацетонитрила + 5% растворителя A + 0,1% аммиака (растворитель B), с использованием следующего градиентного режима: 5-95% B за 4,0 мин, выдерживание до 5,0 мин, 5% B при 5,1 мин, выдерживание до 6,5 мин. скорость потока при проведении ВЭЖХ: 1,0 мл/мин, инжектируемый объем: 5 мкл.

Параметры МС: Напряжение на детекторе равно 1,5 кВ. Температура блока источника равна 200°C. Температура десольватации равна 240°C. Скорость потока распыляющего газа равна 1,2 л/мин (азот). Сбор данных проводили в режиме полного сканирования в МС от 70 до 1200 m/z в режиме положительных и отрицательных ионов.

Спектры ЯМР снимали на спектрометре ЯМР Varian MR, 400 МГц, снабженном программным обеспечением Linux 3.2, операционной системой Redhat Enterprise Linux 5.1 и измерительным датчиком 5 мм с обратной геометрией $^{1}H/^{13}C$, или на спектрометре ЯМР Varian VNMR, 400 МГц, снабженном программным обеспечением Linux 3.2, операционной системой Redhat Enterprise Linux 6.3 и тройным измерительным датчиком 5 мм с обратной геометрией $^{1}H/^{13}C/^{19}F$. Соединения исследовали в дейтерированных растворителях, таких как ДМСО-d_6, $CDCl_3$, MeOD или D_2O, при температуре датчика, равной 300 K, и при концентрации, равной примерно 4-5 мг/мл. Прибор фиксировали на сигнал дейтерия использующегося дейтерированного растворителя. Химические сдвиги приведены в част./млн в слабопольную сторону от ТМС (тетраметилсилан), использующегося в качестве внутреннего стандарта

Оптическое вращение ($[\alpha]_D$) исследовали с помощью поляриметра PERKIN-ELMER 341 и кюветы (l=1 дм) при концентрации, равной 10 мг/мл, при температуре, указанной в конкретных примерах, при 589 нм (натриевая лампа).

iii) Препаративную очистку проводили с использованием следующих систем в кислой, щелочной и нейтральной среде:

Система А. Система для препаративной ВЭЖХ Waters:

Система для препаративной ВЭЖХ снабжена модулем с насосом для подачи двух компонентов 2545, ДФМ (детектор с фотодиодной матрицей) 2998 и пробоотборником 2767. Детектор с одной квадрупольной линзой Waters 3100 использовали для запуска детектирования и сбора данных.

Система для препаративной Shimadzu состояла из насоса для подачи двух компонентов LC8A и детектора ДФМ SPD M20A, инжектирование образцов и сбор фракций проводили вручную.

Очистку проводили с использованием следующих колонок, предназначенных для двух указанных выше систем:

Phenomenex, Synergy Fusion C18, (100×30) мм, 4 мкм

YMC ODS (500×30) мм, 10 мкм

YMC Triart (250×30) мм, 10 мкм

Система B. Очистка с помощью НЖХ

Система для препаративной НЖХ Thar SFC 100 включала насос для подачи сорастворителя 2545 и насос для подачи CO_2, печь для колонки, автоматический пробоотборник 2767 и устройство для сбора фракций, АРОД (автоматический регулятор обратного давления) для поддержания давления в системе, детектор ДФМ 2998. Системой управляли с помощью программного обеспечения Masslynx V4.1. Колонки для проведения НЖХ выбирали из числа перечисленных ниже:

Virdis, 2-этилпиридин, (250×30) мм, 5 мкм

Virdis, CSH, фторфенил, (250×30) мм, 5 мкм

Phenomenex Luna Hilic (250×30) мм, 5 мкм

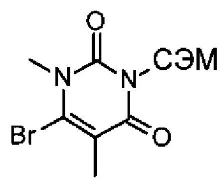
YMC, цианид, (250×19) мм, 5 мкм

YMC, диол, (250×30) мм, 10 мкм

Chiralpak IA (250×30) мм, 5 мкм

C. Синтез промежуточных продуктов

C.1. Синтез 6-бром-1,5-диметил-3-(2-триметилсилилэтоксиметил)пиримидин-2,4-диона a1

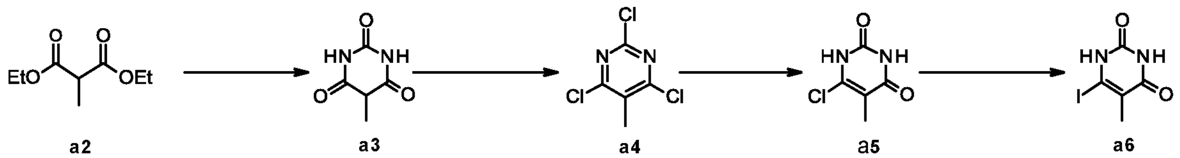


a1

Соединение a1 раскрыто в заявке на международный патент, опубликованный под номером WO 2014/072881, и его получали так, как описано в этой публикации.

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 5,21 (s, 2H), 3,56 (t, J=7,83 Гц, 2H), 3,52 (s, 3H), 1,99 (s, 3H), 0,83 (t, J=7,83 Гц, 2H), -0,04 (s, 9H).

C.2. Синтез 6-йод-5-метилпиримидин-2,4(1H,3H)диона a6.



C.2.1. Синтез 5-метилпиримидин-2,4,6(1H,3H,5H)триона a3

К раствору Na (3,18 г, 137 ммолей) в MeOH (500 мл) добавляли мочевину (8,28 г, 137 ммолей), затем добавляли диэтил-2-метилпропандиоат a2 (20,0 г, 114 ммолей). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 16 ч. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ и ЖХМС. После завершения реакции реакционную смесь концентрировали в вакууме. Остаток подкисляли до pH=3 с помощью 2 н. водного раствора HCl, затем охлаждали до -10°C и перемешивали при такой же температуре в течение 3 ч. Реакционную смесь фильтровали, промывали холодной водой (50 мл), с помощью Et_2O (100 мл) и гексанами (100 мл). Полученное неочищенное вещество сушили в вакууме и получали 15 г 5-метилпиримидин-2,4,6(1H,3H,5H)триона a3 в виде белого твердого вещества.

Выход (неочищенное соединение): 92%.

ЖХМС (ЭР$^+$): 143 $(M+H)^+$.

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 11,07 (s, 2H), 3,63 (q, J=6,80 Гц, 1H), 1,29 (d, J=6,80 Гц, 3H).

C.2.2. Синтез 2,4,6-трихлор-5-метилпиримидина a4

К раствору 5-метилпиримидин-2,4,6(1H,3H,5H)триона a3 (15,0 г, 105 ммолей) в $POCl_3$ (158 г, 1035 ммолей) добавляли H_3PO_4 (2 мл) и реакционную смесь нагревали при 100°C в течение 45 мин. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ. После завершения реакции реакционную смесь выливали на лед, фильтровали и сушили в вакууме и получали 8 г неочищенного 2,4,6-трихлор-5-метилпиримидина a4 в виде белого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки.

С.2.3. Синтез 6-хлор-5-метилпиримидин-2,4(1Н,3Н)диона а5

При перемешивании раствор неочищенного 2,4,6-трихлор-5-метилпиримидина а4 (8,00 г, 40,8 ммоля) в 10% водном растворе NaOH (75 мл) кипятили с обратным холодильником в течение 1,5 ч. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ и ЖХМС. После завершения реакции реакционную смесь подкисляли до pH 2 с помощью 2 н. водного раствора HCl, фильтровали и сушили в вакууме и получали 4,8 г 6-хлор-5-метилпиримидин-2,4(1Н,3Н)диона а5 в виде белого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки.

Выход (неочищенное соединение): 21%.

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 11,78 (s, 1H), 11,29 (s, 1H), 1,80 (s, 3H).

С.2.4. Синтез 6-йод-5-метилпиримидин-2,4(1Н,3Н)диона а6

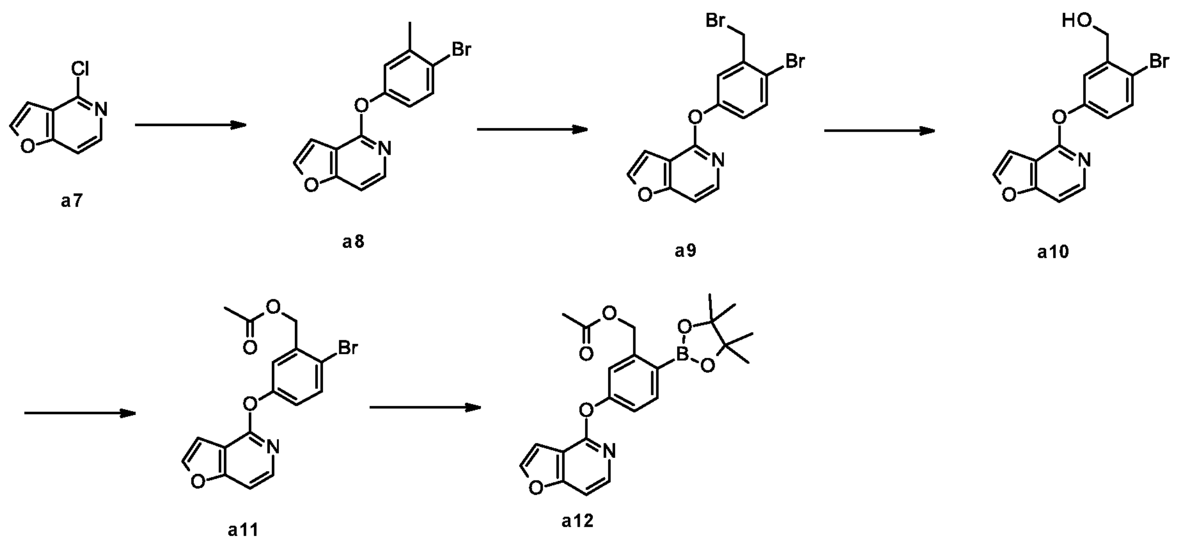
Раствор 6-хлор-5-метилпиримидин-2,4(1Н,3Н)диона а5 (4,80 г, 0,30 ммоля) и NaI (23,4 г, 150 ммолей) в HI (60 мл) перемешивали в герметизированной пробирке при комнатной температуре в течение 66 ч. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ и ЖХМС. После завершения реакции реакционную смесь фильтровали и промывали холодной водой (50 мл) и сушили в вакууме и получали 2,1 г 6-йод-5-метилпиримидин-2,4(1Н,3Н)диона а6 в виде коричневого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки.

ЖХМС (ЭР$^+$): 253 $(M+H)^+$.

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 11,21 (s, 1H), 1,90 (s, 3H).

С.3. Синтез 5-(фуро[3,2-с]пиридин-4-илокси)-2-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)бензилацетата а12

Соединение а12 получали из соединения а7 по многостадийной методике синтеза в соответствии с процедурами, аналогичными описанным в заявке на международный патент WO 2014/072881, и так, как это специально описано ниже в настоящем изобретении.



C.3.1.Синтез 4-(4-бром-3-метилфенокси)фуро[3,2-c]пиридина a8

К раствору 4-хлорфуро[3,2-c]пиридина a7 (12 г, 78,1 ммоля) и 4-бром-3-метилфенола (17,5 г, 93,7 ммоля) в ДМСО (300 мл) добавляли Cs_2CO_3 (63,4 г, 195 ммолей) и реакционную смесь нагревали при 125°C в течение 16 ч. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ и ЖХМС. После завершения реакции реакционную смесь выливали на лед и фильтровали. Остаток растворяли в EtOAc (100 мл) и промывали рассолом (2×100 мл). Органический слой отделяли, сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Полученное неочищенное вещество очищали путем растирания с 1% Et_2O в пентане (100 мл) и получали 12,6 г 4-(4-бром-3-метилфенокси)фуро[3,2-c]пиридина a8 в виде бежевого твердого вещества.

Выход: 53%.

ЖХМС (ЭР$^+$): 304 (M+H)$^+$.

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 8,14 (s, 1H), 7,96 (d, J=6,00 Гц, 1H), 7,61 (d, J=8,80 Гц, 1H), 7,46 (d, J=5,60 Гц, 1H), 7,25 (d, J=1,20 Гц, 1H), 7,10 (s, 1H), 7,04-6,98 (m, 1H), 2,34 (s, 3H).

C.3.2. Синтез 4-(4-бром-3-(бромметил)фенокси)фуро[3,2-c]пиридина a9

К раствору 4-(4-бром-3-метилфенокси)фуро[3,2-c]пиридина a8 (12,5 г, 41,1 ммоля) в CCl_4 (250 мл) добавляли NBS (N-бромсукцинимид, 8,05 г, 45,2 ммоля) и Bz_2O_2 (1,99 г, 8,22 ммоля). Реакционную смесь нагревали при 80°C в течение 12 ч. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ и ЖХМС. После завершения реакции реакционную смесь разбавляли с помощью ДХМ (100 мл) и водой (100 мл). Органический слой промывали 1 н. водным раствором NaOH (50 мл) и рассолом (50 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме и получали 22 г 4-(4-бром-3-(бромметил)фенокси)фуро[3,2-c]пиридина a9 в виде коричневого полужидкого вещества, которое использовали на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки.

ЖХМС ($ЭР^+$): 284 $(M+H)^+$.

C.3.3. Синтез (2-бром-5-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)метанола a10

К раствору 4-(4-бром-3-(бромметил)фенокси)фуро[3,2-c]пиридина a9 (22,0 г, 57,4 ммоля) в ДМФ (N,N-диметилформамид, 80 мл) добавляли NaOAc (23,0 г, 287 ммолей) и реакционную смесь нагревали при 80°C в течение 3 ч. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ и ЖХМС. После завершения реакции реакционную смесь разбавляли с помощью ДХМ (100 мл) и водой (50 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Остаток растворяли в MeOH (50 мл) затем добавляли 1 н. водный раствор NaOH (20 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь концентрировали в вакууме. Остаток разбавляли водой (100 мл) и экстрагировали с помощью EtOAc (3×40 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии с использованием в качестве элюента от 20% EtOAc в гексанах и получали 3,5 г (2-бром-5-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)метанола a10 в виде белого твердого вещества.

Выход: 19%.

ЖХМС ($ЭР^+$): 320 $(M+H)^+$.

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 8,14 (d, J=2,40 Гц, 1H), 7,96 (d, J=5,60 Гц, 1H), 7,61 (d, J=8,80 Гц, 1H), 7,48 (d, J=6,00 Гц, 1H), 7,32 (d, J=2,80 Гц, 1H), 7,12-7,08 (m, 2H), 5,51 (t, J=5,60 Гц, 1H), 4,51 (d, J=5,60 Гц, 2H).

C.3.4. Синтез 2-бром-5-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)бензилацетата a11

К раствору (2-бром-5-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)метанола a10 (3,50 г, 11,0 ммоля) в ТГФ (50 мл) при 0°C добавляли пиридин (2,60 г, 33,0 ммоля) и реакционную смесь перемешивали при такой же температуре в течение 10 мин. При 0°C по каплям добавляли ацетилхлорид (1,73 г, 22,0 ммоля) и реакционную смесь нагревали при 100°C в течение 16 ч. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ и ЖХМС. После завершения реакции реакционную смесь нейтрализовывали насыщенным водным раствором $NaHCO_3$ и экстрагировали с помощью EtOAc (50 мл). Органический слой последовательно промывали водой (50 мл) и рассолом (10 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии с использованием в качестве элюента от 2 до 5% EtOAc в гексанах и получали 4 г 2-бром-5-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)бензилацетата a11 в виде бесцветной жидкости.

Выход: 98%.

ЖХМС ($ЭР^+$): 362 $(M+H)^+$.

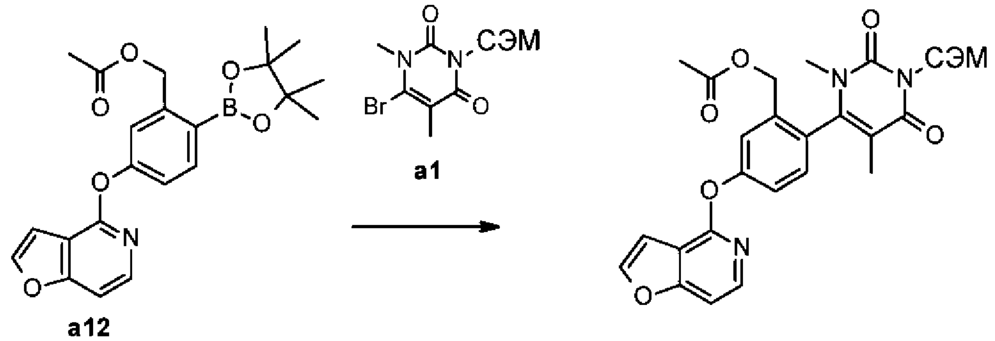
^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 8,14 (d, J=2,00 Гц, 1H), 7,95 (d, J=6,00 Гц, 1H), 7,69 (d, J=8,80 Гц, 1H), 7,49-7,45 (m, 1H), 7,35 (d, J=2,80 Гц, 1H), 7,20-7,17 (m, 1H), 7,14-7,11 (m, 1H), 5,10 (s, 2H), 2,07 (s, 3H).

C.3.5. Синтез 5-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)-2-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)бензилацетата a12

К раствору 2-бром-5-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)бензилацетата a11 (4 г, 11,1 ммоля) и 4,4,5,5-тетраметил-2-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1,3,2-диоксаборолана (3,66 г, 14,4 ммоля) в диоксане (50 мл) добавляли KOAc (3,26 г, 33,3 ммоля). Реакционную смесь продували аргоном в течение 30 мин, затем добавляли $PdCl_2(dppf)$·ДХМ (2,70 г, 3,33 ммоля) и реакционную смесь повторно продували аргоном в течение 5 мин. Реакционную смесь нагревали при 110°C в течение 16 ч. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ и ЖХМС. После завершения реакции реакционную смесь разбавляли с помощью EtOAc (50 мл) и фильтровали через целит®. Фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии с использованием от 10 до 12% EtOAc в гексанах и получали 4,1 г 5-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)-2-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)бензилацетата a12 в виде почти белого твердого вещества.

ЖХМС ($ЭР^+$): 410 $(M+H)^+$.

С.4. Синтез 2-(3,5-диметил-2,6-диоксо-1-((2-(триметилсилил)этокси)метил)-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-4-ил)-5-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)бензилацетата а13, а13_атропоизомер 1 и а13_атропоизомер 2



К раствору 5-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)-2-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)бензилацетата а12 (200 мг, 0,49 ммоля) и 6-бром-1,5-диметил-3-(2-триметилсилилэтоксиметил)пиримидин-2,4-диона а1 (130 мг, 0,38 ммоля) в диоксане (9 мл) и воде (1 мл) добавляли K_2CO_3 (160 мг, 1,13 ммоля). Реакционную смесь продували аргоном в течение 30 мин. Добавляли $PdCl_2$(dppf)·ДХМ (90 мг, 0,11 ммоля) и реакционную смесь повторно продували аргоном в течение 5 мин. Реакционную смесь нагревали микроволновым излучением при 120°C в течение 2 ч. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ и ЖХМС. Реакцию повторяли с использованием 13×0,20 г и неочищенные смеси, полученные при проведении 14 реакций, объединяли. Реакционную смесь разбавляли с помощью EtOAc (150 мл), фильтровали через целит® и промывали с помощью EtOAc (250 мл). Фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии с использованием в качестве элюента от 20 до 40% EtOAc в гексанах и получали 827 мг 2-(3,5-диметил-2,6-диоксо-1-((2-(триметилсилил)этокси)метил)-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-4-ил)-5-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)бензилацетата а13 в виде почти белого твердого вещества, которое являлось рацемической смесью атропоизомеров (+) и (−).

Выход: 31%.

ЖХМС (ЭР$^+$): 494 (M+H-$SiMe_3$)$^+$.

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 8,18 (d, J=1,96 Гц, 1H), 8,05 (d, J=5,87 Гц, 1H), 7,54 (dd, J=5,87, 0,98 Гц, 1H), 7,49 (s, 1H), 7,44 (s, 2H), 7,14-7,12 (m, 1H), 5,76 (s, 2H), 5,32 (s, 2H), 3,68-3,59 (m, 2H), 2,97 (s, 3H), 1,95 (s, 3H), 1,55 (s, 3H), 1,17 (t, J=7,09 Гц, 2H), -0,01 (s, 9H).

Хиральное разделение (ЖХ, YMC Chiralart Cellulose-SC, 250×4,6 мм, 1 мл/мин, 252 нм, 25°C, элюент: 50% н-гексаны (с добавлением 0,1% ДЭА), 50% iPrOH) 500 мг рацемата 2-(3,5-диметил-2,6-диоксо-1-((2-(триметилсилил)этокси)метил)-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-4-ил)-5-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)бензилацетата a13 давало:

- 151 мг 2-(3,5-диметил-2,6-диоксо-1-((2-(триметилсилил)этокси)метил)-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-4-ил)-5-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)бензилацетата (a13_атропоизомер 1) в виде белого твердого вещества.

Выход: 30%.

ЖХМС (ЭР$^+$): 494 $(M+H\text{-}SiMe_3)^+$.

Хиральный анализ (ЖХ, YMC Chiralart Cellulose-SC, 250×4,6 мм, 1 мл/мин, 252 нм, элюент: 50% н-гексаны (с добавлением 0,1% ДЭА), 50% iPrOH): ВУ 28,93 мин, ЭИ (энантиомерный избыток) 98,5%.

- 152 мг 2-(3,5-диметил-2,6-диоксо-1-((2-(триметилсилил)этокси)метил)-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-4-ил)-5-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)бензилацетата (a13_атропоизомер 2) в виде белого твердого вещества.

Выход: 30%.

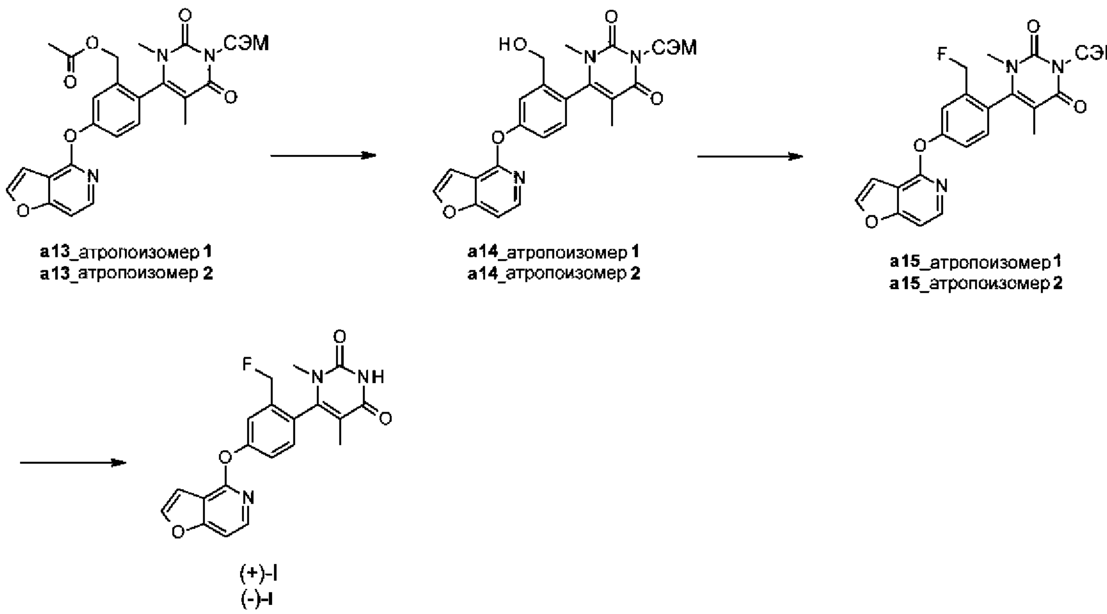
ЖХМС (ЭР$^+$): 494 $(M+H\text{-}SiMe_3)^+$.

Хиральный анализ (ЖХ, YMC Chiralart Cellulose-SC, 250×4,6 мм, 1 мл/мин, 252 нм, элюент: 50% н-гексаны (с добавлением 0,1% ДЭА), 50% iPrOH): ВУ 31,28 мин, ЭИ 92,5%.

На этой стадии не устанавливали конкретную конфигурацию, (+) или (−), соответствующих атропоизомеров.

D. Синтез соединений формулы (I)

D.1. Синтез 6-(2-(фторметил)-4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)-1,5-диметилпиримидин-2,4(1H,3H)диона, (+)-(I) и (−)-(I).



D.1.1. Синтез 6-(4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)-2-(гидроксиметил)фенил)-1,5-диметил-3-((2-(триметилсилил)этокси)метил)пиримидин-2,4(1H,3H)диона, a14_атропоизомер 1 и a14_атропоизомер 2

К раствору 2-(3,5-диметил-2,6-диоксо-1-((2-(триметилсилил)этокси)метил)-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-4-ил)-5-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)бензилацетата, a13_атропоизомер 1 (151 мг, 0,27 ммоля), в ТГФ (7,71 мл) и воде (860 мкл) добавляли NaOH (50 мг, 1,36 ммоля). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ и ЖХМС. После завершения реакции реакционную смесь концентрировали в вакууме. Остаток разбавляли водой (15 мл) и экстрагировали с помощью EtOAc (2×50 мл). Органический слой промывали рассолом (10 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме и получали 124 мг 6-(4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)-2-(гидроксиметил)фенил)-1,5-диметил-3-((2-(триметилсилил)этокси)метил)пиримидин-2,4(1H,3H)диона, a14_атропоизомер 1, в виде светло-коричневой жидкости, которую использовали на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки.

Выход (неочищенное соединение): 90%.

ЖХМС (ЭР$^+$): 510 (M+H)$^+$.

6-(4-(Фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)-2-(гидроксиметил)фенил)-1,5-диметил-3-((2-(триметилсилил)этокси)метил)пиримидин-2,4(1H,3H)дион, a14_атропоизомер 2

Соединение a14_атропоизомер 2 можно синтезировать по такой же методике с использованием в качестве исходного вещества 2-(3,5-диметил-2,6-диоксо-1-((2-(триметилсилил)этокси)метил)-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-4-ил)-5-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)бензилацетата, a13_атропоизомер 1.

Выход (неочищенное соединение): 93%.

ЖХМС (ЭР$^+$): 510 (M+H)$^+$.

На этой стадии не устанавливали конкретную конфигурацию, (+) или (−), соответствующих атропоизомеров.

D.1.2. Синтез 6-(2-(фторметил)-4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)-1,5-диметил-3-((2-(триметилсилил)этокси)метил)пиримидин-2,4(1H,3H)диона, a15_атропоизомер 1 и a15_атропоизомер 2

К раствору 6-(4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)-2-(гидроксиметил)фенил)-1,5-диметил-3-((2-(триметилсилил)этокси)метил)пиримидин-2,4(1H,3H)диона, a14_атропоизомер 1 (0,13 г, 0,25 ммоля), в ДХМ (3 мл) при 0°C добавляли ДАТС (0,20 г, 1,23 ммоля). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ и ЖХМС. После завершения реакции реакцию останавливали насыщенным водным раствором $NaHCO_3$ (2 мл) и смесь экстрагировали с помощью EtOAc (2×10 мл). Органический слой последовательно промывали водой (10 мл) и рассолом (5 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии с использованием в качестве элюента от 20 до 30% EtOAc в гексанах и получали 74 мг 6-(2-(фторметил)-4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)-1,5-диметил-3-((2-(триметилсилил)этокси)метил)пиримидин-2,4(1H,3H)диона, a15_атропоизомер 1, в виде почти белого твердого вещества.

Выход: 59%.

ЖХМС (ЭР$^+$): 512 (M+H)$^+$.

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 8,18 (d, J=2,45 Гц, 1H), 8,05 (d, J=5,87 Гц, 1H), 7,58-7,53 (m, 2H), 7,48 (s, 2H), 7,16-7,12 (m, 1H), 5,39 (d, J=2,45 Гц, 1H), 5,32 (s, 2H), 5,27 (s, 1H), 3,69-3,62 (m, 2H), 2,93 (s, 3H), 1,54 (s, 3H), 0,92-0,84 (m, 2H), 0,03 (s, 9H).

6-(2-(Фторметил)-4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)-1,5-диметил-3-((2-(триметилсилил)этокси)метил)пиримидин-2,4(1H,3H)дион a15_атропоизомер 2

Соединение a15_атропоизомер 2 можно синтезировать по такой же методике с использованием в качестве исходного вещества 6-(4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)-2-(гидроксиметил)фенил)-1,5-диметил-3-((2-(триметилсилил)этокси)метил)пиримидин-2,4(1H,3H)диона, a14_атропоизомер 2. Выход: 58%.

ЖХМС (ЭР$^{+}$): 512 $(M+H)^{+}$.

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 8,18 (d, J=2,45 Гц, 1H), 8,05 (d, J=5,87 Гц, 1H), 7,58-7,53 (m, 2H), 7,48 (s, 2H), 7,16-7,12 (m, 1H), 5,39 (d, J=2,45 Гц, 1H), 5,32 (s, 2H), 5,27 (s, 1H), 3,69-3,62 (m, 2H), 2,93 (s, 3H), 1,54 (s, 3H), 0,92-0,84 (m, 2H), 0,03 (s, 9H).

На этой стадии не устанавливали конкретную конфигурацию, (+) или (−), соответствующих атропоизомеров.

D.1.3. Синтез 6-(2-(фторметил)-4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)-1,5-диметилпиримидин-2,4(1H,3H)диона, (+)-(I) и (−)-(I)

К раствору 6-(2-(фторметил)-4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)-1,5-диметил-3-((2-(триметилсилил)этокси)метил)пиримидин-2,4(1H,3H)диона, a15_атропоизомер 1 (0,07 г, 0,15 ммоля), в ДХМ (1 мл) при 0°C добавляли ТФК (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ и ЖХМС. После завершения реакции реакционную смесь концентрировали в вакууме. Остаток растворяли в CH_3CN (1 мл) и 25% водном растворе аммиака (1 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин, затем фильтровали, промывали холодной водой (2 мл) и сушили в вакууме. Остаток очищали путем растирания со смесью ДХМ:пентан (1:4, 2,5 мл) и сушили в вакууме и получали 20 мг атропоизомера (+) 6-(2-(фторметил)-4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)-1,5-

диметилпиримидин-2,4(1H,3H)диона, (+)-(I), в виде почти белого твердого вещества.

Выход: 36%.

Чистота по данным ВЭЖХ: 97,5%.

ЖХМС ($ЭР^+$): 382 $(M+H)^+$.

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 11,48 (s, 1H), 8,16-8,19 (m, 1H), 8,05 (d, J=5,87 Гц, 1H), 7,56-7,52 (m, 2H), 7,49-7,44 (m, 2H), 7,13 (d, J=1,47 Гц, 1H), 5,39 (d, J=3,42 Гц, 1H), 5,27 (d, J=2,93 Гц, 1H), 2,86 (s, 3H), 1,48 (s, 3H).

$[\alpha]_D$ (MeOH, 30°C) = +14,7.

6-(2-(Фторметил)-4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)-1,5-диметилпиримидин-2,4(1H,3H)дион (I), атропоизомер (−), ((−)-(I))

Соединение (−)-(I) можно синтезировать по такой же методике с использованием в качестве исходного вещества 6-(2-(фторметил)-4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)-1,5-диметил-3-((2-(триметилсилил)этокси)метил)пиримидин-2,4(1H,3H)диона, a15_атропоизомер 2.

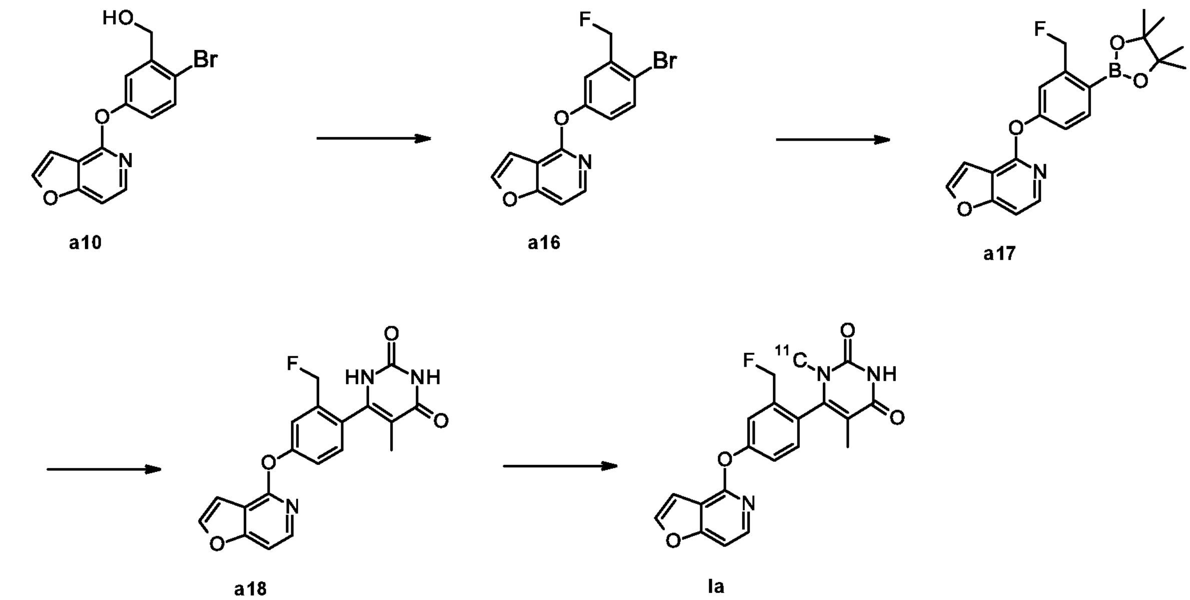
Чистота по данным ВЭЖХ: 99,8%.

ЖХМС ($ЭР^+$): 382 $(M+H)^+$.

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 11,48 (s, 1H), 8,19-8,16 (m, 1H), 8,05 (d, J=5,87 Гц, 1H), 7,56-7,52 (m, 2H), 7,46 (brs, 2H), 7,13 (d, J=1,47 Гц, 1H), 5,39 (d, J=3,42 Гц, 1H), 5,27 (d, J=2,93 Гц, 1H), 2,86 (s, 3H), 1,48 (s, 3H).

$[\alpha]_D$ (MeOH, 30°C) = -8,3.

D.2. Синтез атропоизомера (−) [^{11}C]-6-(2-(фторметил)-4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)-1,5-диметилпиримидин-2,4(1H,3H)диона (Ia), (−)-(Ia)



D.2.1. Синтез 4-(4-бром-3-(фторметил)фенокси)фуро[3,2-c]пиридина a16

К раствору (2-бром-5-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)метанола a10 (5 г, 15,7 ммоля) в ДХМ (100 мл) при 0°C добавляли ДАТС (10 г, 62,8 ммоля), затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ и ЖХМС. После завершения реакции реакцию останавливали насыщенным водным раствором $NaHCO_3$ (20 мл) и смесь экстрагировали с помощью ДХМ (100 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии с использованием в качестве элюента от 10 до 15% EtOAc в гексанах и получали 2,1 г 4-(4-бром-3-(фторметил)фенокси)фуро[3,2-c]пиридина a16 в виде почти белого твердого вещества.

Выход: 41%.

ЖХМС (ЭР$^+$): 322 (M+H)$^+$.

^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7,99 (d, J=6,00 Гц, 1H), 7,68-7,64 (m, 1H), 7,59 (d, J=8,80 Гц, 1H), 7,38-7,36 (m, 1H), 7,22 (d, J=5,60 Гц, 1H), 7,14 - 7,10 (m, 1H), 6,91 (s, 1H), 5,46 (d, J=46,8 Гц, 2H).

D.2.2. Синтез 4-(3-(фторметил)-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенокси)фуро[3,2-c]пиридина a17

К раствору 4-(4-бром-3-(фторметил)фенокси)фуро[3,2-c]пиридина a16 (2 г, 6,23 ммоля) и 4,4,5,5-тетраметил-2-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1,3,2-диоксаборолана (2,05 г, 8,09 ммоля) в диоксане (50 мл) добавляли KOAc (1,83 г, 18,6 ммоля), затем реакционную смесь продували аргоном в течение 30 мин. Добавляли $PdCl_2$(dppf) (1,52 г, 1,86 ммоля) и реакционную смесь повторно продували аргоном в течение 5 мин. Реакционную смесь нагревали при 100°C в течение 12 ч. За протеканием реакции следили с помощью TCX и ЖХМС. После завершения реакции реакционную смесь фильтровали через целит® и промывали с помощью EtOAc (100 мл). Фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии с использованием в качестве элюента 10% EtOAc в гексанах и получали 2,1 г 4-(3-(фторметил)-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенокси)фуро[3,2-c]пиридина a17 в виде почти белого твердого вещества.

Выход: 91%.

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 8,16-8,14 (m, 1H), 7,98 (d, J=5,20 Гц, 1H), 7,79 (d, J=8,40 Гц, 1H), 7,49 (d, J=6,00 Гц, 1H), 7,32-7,28 (m, 1H), 7,24-7,20 (m, 1H), 7,09 (s, 1H), 5,65 (d, J=47,6 Гц, 2H), 1,31 (s, 12H).

D.2.3. Синтез 6-(2-(фторметил)-4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)-5-метилпиримидин-2,4(1H,3H)диона a18

К раствору 4-(3-(фторметил)-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенокси)фуро[3,2-c]пиридина a17 (100 мг, 0,27 ммоля) и 6-йод-5-метилпиримидин-2,4(1H,3H)диона a6 (130 мг, 0,54 ммоля) в диоксане (10 мл) и воде (1 мл) добавляли K_2CO_3 (110 мг, 0,81 ммоля) и реакционную смесь продували аргоном в течение 30 мин. Добавляли $PdCl_2$(dppf) (60 мг, 0,08 ммоля) и реакционную смесь повторно продували аргоном в течение 5 мин. Реакционную смесь нагревали при 80°C в течение 1 ч. За протеканием реакции следили с помощью TCX и ЖХМС. После завершения реакции реакционную смесь фильтровали через целит®. Фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии с использованием в качестве элюента от 50 до 60% EtOAc в гексанах и получали 20 мг 6-(2-(фторметил)-4-

(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)-5-метилпиримидин-2,4(1H,3H)диона a18 в виде почти белого твердого вещества.

Выход: 21%.

Чистота по данным ВЭЖХ: 98,4%

ЖХМС (ЭР$^+$): 368 $(M+H)^+$.

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 11,18 (s, 1H), 10,85 (s, 1H), 8,17 (d, J=2,00 Гц, 1H), 8,02 (d, J=6,00 Гц, 1H), 7,52 (d, J=6,00 Гц, 1H), 7,45-7,37 (m, 3H), 7,11 (d, J=1,60 Гц, 1H), 5,36 (d, J=46,8 Гц, 2H), 1,51 (s, 3H).

D.2.4. Синтез атропоизомера (−) [^{11}C]-6-(2-(фторметил)-4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)-1,5-диметилпиримидин-2,4(1H,3H)диона (Ia), (−)-(Ia).

[^{11}C]-(6-(2-(Фторметил)-4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)-1,5-диметилпиримидин-2,4(1H,3H)дион) получали в виде смеси двух атропоизомеров с использованием в качестве исходного вещества предшественника a18 и [^{11}C]метана. [^{11}C]Метан получали в циклотроне GE PETtrace путем облучения газовой мишени, содержащей смесь 10% водорода в азоте, с использованием протонного пучка при 16,5 МэВ, [^{11}C]метан получали путем ядерной реакции $^{14}N(p, \alpha)^{11}C$ и последующей реакции в мишени углерода-11 с азотом с получением метана.

Затем полученный [^{11}C]метан примерно при -180°C улавливали в ловушке HayeSep, которую затем продували гелием для удаления следовых количеств водорода и азота. Затем уловленный [^{11}C]метан при нагревании выпускали в рециркуляционную систему, в которой его примерно при 720°C вводили в реакцию с парами йода и получали [^{11}C]метилйодид. После рециркуляции [^{11}C]метилйодид в потоке гелия пропускали через колонку, содержащую нагреваемый трифлат серебра на инертном носителе, и получали метящий реагент, [^{11}C]метилтрифлат. Его, в свою очередь, улавливали в растворе, содержащем немеченый предшественник a18, 0,2-0,4 мг, 4-5 мкл 0,5M водного раствора NaOH и 600-700 мкл ацетона.

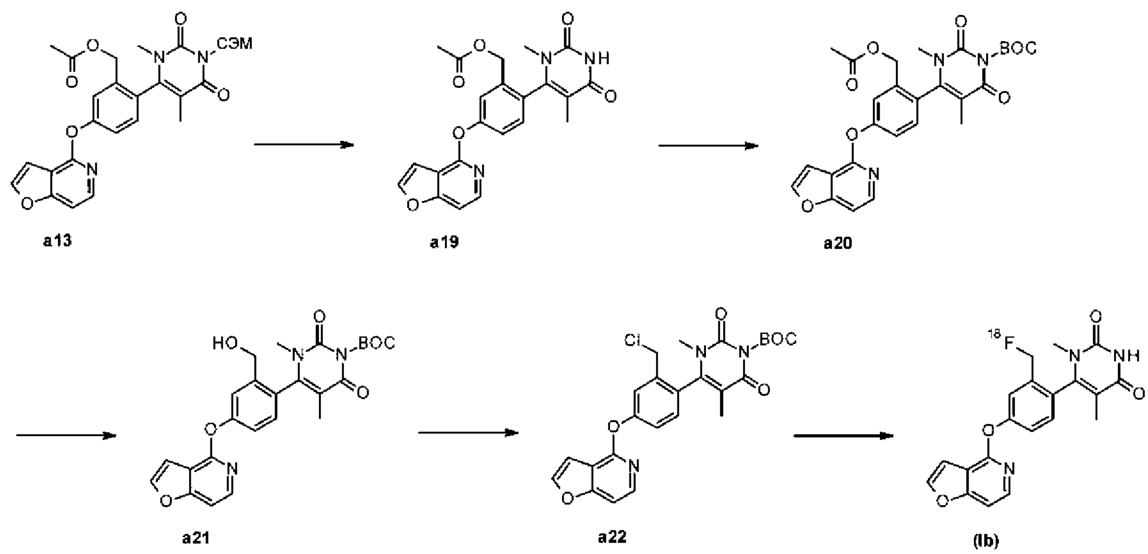
Примерно через 120 с реакционную смесь разбавляли водой и переносили в полупрепаративную колонку XBridge C18 (200×10 мм, 5 мкм) и элюировали смесью ацетонитрила и водного раствора NH_4OH (0,15%) состава 29:71 при скорости потока, равной 7 мл/мин. Выходящий поток анализировали с помощью соединенных последовательно детектора радиоактивности и УФ (ультрафиолетовый) детектора, причем УФ детектор настраивали на длину волны, равную 254 нм. Фракцию, содержащую меченый радиоактивным изотопом продукт, собирали, разбавляли с помощью примерно 50 мл стерильной воды и пропускали через картридж для ТФЭ Waters Oasis 3cc для улавливания продукта. Затем картридж промывали с помощью 8 мл стерильной воды и продукт элюировали с помощью примерно 1,1 мл 96% этанола в сосуд, содержащий 12 мл физиологического раствора. Затем продукт фильтровали через стерильный фильтр, обладающий порами размером 0,22 мкм (Millex GV). После фильтрования из содержащего продукт сосуда отбирали образец для контроля качества. Радиохимическую чистоту определяли с использованием стандартной системы для ВЭЖХ, снабженной соединенных последовательно детектором радиоактивности и УФ детектором, с использованием аналитической колонки XBridge C18 (150×4,6 мм, 5 мкм), с использованием в качестве подвижной фазы смеси ацетонитрил/водный раствор NH_4OH (0,15%) состава 25:75, и УФ детектор настраивали на длину волны, равную 254 нм.

Поскольку два атропоизомера невозможно разделить с помощью обычной колонки C18 для ВЭЖХ, для их разделения разрабатывали методику хирального разделения.

Для выделения атропоизомера (−) (Ia) проводили полупрепаративную ВЭЖХ с использованием колонки Chiralpak IA (250×10 мм, 5 мкм), с использованием в качестве подвижной фазы смеси ацетонитрил/этанол состава 7:93 при скорости потока, равной 5 мл/мин, и УФ детектор настраивали на длину волны, равную 254 нм. Саму реакцию и получение содержащего продукт препарата проводили так, как описано выше.

Радиохимическую и атропоизомерную чистоту определяли с использованием стандартной системы для ВЭЖХ, снабженной аналитической колонкой Chiralpak IA-3, элюирование проводили с помощью подвижной фазы, смеси MeCN/EtOH состава 7:93, при скорости потока, равной 1 мл/мин, и УФ детектор настраивали на длину волны, равную 254 нм (время удерживания соединения (–)-(Ia) = 7,2 мин, ЭИ>99%).

D.3. Синтез атропоизомера (−) $[^{18}F]$-6-(2-(фторметил)-4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)-1,5-диметилпиримидин-2,4(1H,3H)диона (Ib), (−)-(Ib)



D.3.1. Синтез 2-(3,5-диметил-2,6-диоксо-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-4-ил)-5-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)бензилацетата a19

К раствору 2-(3,5-диметил-2,6-диоксо-1-((2-(триметилсилил)этокси)метил)-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-4-ил)-5-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)бензилацетата a13 (2,60 г, 4,71 ммоля) в ДХМ (50 мл) при 0°C добавляли ТФК (26,0 мл, 350 ммолей), затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ и ЖХМС. После завершения реакции реакционную смесь концентрировали в вакууме. Остаток растворяли в смеси ацетонитрил:аммиак (1:1, 10 мл) и перемешивали в течение 30 мин. Реакционную смесь фильтровали, промывали холодной водой (20 мл) и пентаном (20 мл) и сушили в вакууме и получали 1,6 г 2-(3,5-диметил-2,6-диоксо-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-4-ил)-5-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)бензилацетата a19 в виде почти белого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки.

Выход (неочищенное соединение): 81%.

ЖХМС (ЭР$^+$): 422 (M+H)$^+$.

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 11,47(s, 1H), 8,18 (d, J=1,96 Гц, 1H), 8,05 (d, J=5,87 Гц, 1H), 7,54 (dd, J=5,87, 0,98 Гц, 1H), 7,48 (s, 1H), 7,45-7,41 (m, 2H), 7,13 (s, 1H), 5,02-4,97 (m, 1H), 4,97-4,91 (m, 1H), 2,90 (s, 3H), 1,97 (s, 3H), 1,50 (s, 3H).

D.3.2. Синтез трет-бутил-4-(2-(ацетоксиметил)-4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)-3,5-диметил-2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-карбоксилата a20

2-(3,5-Диметил-2,6-диоксо-1,2,3,6-тетрагидропиримидин-4-ил)-5-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)бензилацетат a19 (1,60 г, 3,80 ммоля), $(Boc)_2O$ (1,57 мл, 6,83 ммоля), триэтиламин (0,64 мл, 4,56 ммоля) и ДМАП (0,05 г, 0,38 ммоля) растворяли в ТГФ (33,3 мл) и реакционную смесь нагревали при 70°C в течение 16 ч. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ и ЖХМС. После завершения реакции реакционную смесь концентрировали в вакууме. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии с использованием в качестве элюента от 70 до 80% EtOAc в гексанах и получали 1,1 г трет-бутил-4-(2-(ацетоксиметил)-4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)-3,5-диметил-2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-карбоксилата a20 в виде почти белого твердого вещества.

Выход: 56%.

ЖХМС (ЭР$^+$): 522 $(M+H)^+$.

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 8,17 (d, J=1,96 Гц, 1H), 8,04 (d, J=5,87 Гц, 1H), 7,52 (d, J=5,87 Гц, 1H), 7,40 (d, J=8,31 Гц, 2H), 7,34-7,30 (m, 1H), 7,10 (d, J=1,47 Гц, 1H), 4,33-4,38 (m, 2H), 2,94 (s, 3H), 1,95 (s, 3H), 1,55 (s, 9H), 1,52 (s, 3H).

D.3.3. Синтез трет-бутил-4-(4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)-2-(гидроксиметил)фенил)-3,5-диметил-2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-карбоксилата a21

К раствору трет-бутил-4-(2-(ацетоксиметил)-4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)-3,5-диметил-2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-карбоксилата a20 (1,1 г, 2,11 ммоля) в ТГФ (15 мл) и воде (2 мл) добавляли NaOH (90 мг, 2,32 ммоля), затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ и ЖХМС. После завершения реакции реакционную смесь концентрировали в вакууме. Остаток экстрагировали с помощью EtOAc (2×50 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии с использованием в качестве элюента 50% EtOAc в гексанах и получали 300 мг трет-бутил-4-(4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)-2-(гидроксиметил)фенил)-3,5-диметил-2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-карбоксилата a21 в виде белого твердого вещества.

Выход: 30%.

ЖХМС ($ЭР^+$): 480 $(M+H)^+$.

^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 8,14 (s, 1H), 8,01 (d, J=5,87 Гц, 1H), 7,50 (d, J=5,87 Гц, 1H), 7,40-7,34 (m, 2H), 7,32-7,27 (m, 1H), 7,08 (s, 1H), 5,37 (t, J=5,62 Гц, 1H), 4,36-4,29 (m, 2H), 2,91 (s, 3H), 1,52 (s, 9H), 1,49 (s, 3H).

D.3.4. Синтез трет-бутил-4-(2-(хлорметил)-4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)-3,5-диметил-2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-карбоксилата a22

К раствору трет-бутил-4-(4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)-2-(гидроксиметил)фенил)-3,5-диметил-2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-карбоксилата a21 (300 мг, 0,63 ммоля) в ДХМ (5 мл) при 0°C добавляли раствор $SOCl_2$ (0,09 г, 0,75 ммоля) ДХМ (1 мл), затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ и ЖХМС. После завершения реакции реакцию останавливали насыщенным водным раствором $NaHCO_3$ (5 мл) и смесь экстрагировали с помощью ДХМ (2×20 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии с использованием в качестве элюента от 50 до 55% EtOAc в гексанах и получали 150 мг трет-бутил-4-(2-(хлорметил)-4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)-3,5-диметил-2,6-диоксо-3,6-дигидропиримидин-1(2H)-карбоксилата a22 в виде белого твердого вещества.

Выход: 48%.

Чистота по данным ВЭЖХ: 98,4%.

ЖХМС ($ЭР^+$): 498 $(M+H)^+$.

^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d_6) δ 8,18 (d, J=1,96 Гц, 1H), 8,05 (d, J=5,87 Гц, 1H), 7,57 (d, J=1,96 Гц, 1H), 7,54 (d, J=5,38 Гц, 1H), 7,51-7,48 (m, 1H), 7,46-7,43 (m, 1H), 7,13 (d, J=1,47 Гц, 1H), 4,72 (s, 2H), 2,93 (s, 3H), 1,56 (s, 9H), 1,55 (brs, 3H).

D.3.5. Синтез атропоизомера (−) [^{18}F]-6-(2-(фторметил)-4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)-1,5-диметилпиримидин-2,4(1H,3H)диона (Ib), (−)-(Ib)

В типичной методике находящийся в сосуде для транспортировки [^{18}F]фторид (водяная мишень, полученная из циклотронного устройства), переносили в ионообменный картридж и улавливали в нем. Затем его элюировали раствором карбоната калия и Kryptofix 222 в реакционный сосуд (РС1) модуля TRACERlab®. Раствор сначала выпаривали путем нагревания в вакууме и в токе гелия при 95°C в течение 4 мин. В РС1 добавляли ацетонитрил (1 мл) и выпаривание продолжали при таких же условиях в вакууме в течение 2 мин. После второго добавления ацетонитрила (1 мл) проводили заключительное выпаривание в вакууме и в токе гелия при 95°C в течение 2 мин. Затем реактор охлаждали до 50°C.

В реакционный сосуд добавляли раствор предшественника a22 (0,7 мг) в безводном ацетонитриле и реакционную смесь нагревали при 80°C в течение 5 мин. Через 5 мин реактор охлаждали до 70°C, добавляли хлористоводородную кислоту (1M) и нагревали при 70°C в течение 4 мин, затем охлаждали до 40°C и разбавляли с помощью ВДИ. Смесь переносили из РС1 в картридж для промежуточной твердофазной экстракции (ТФЭ, Oasis HLB Light). РС1 промывали метанолом и промывочный раствор пропускали через ТФЭ для элюирования продукта в РС2, предварительно заполненный с помощью ВДИ. Все содержимое РС2 переносили в контур для инжектирования ВЭЖХ для очистки.

Выделение соединения (−)-Ib проводили с помощью ВЭЖХ с использованием полупрепаративной колонки Chiralcel OJ-H (5 мкм, 250×10 мм) и Phenomenex Luna C18 (2) (10 мкм, 250×10 мм) при элюировании смесью ацетонитрил/раствор ацетата аммония (5 мМ) (40/60, об./об.) при скорости потока, равной 4 мл/мин. Содержащие продукт фракции собирали в колбу 1, содержащую раствор 25 мл аскорбиновой кислоты в ВДИ. Разбавленную содержащую продукт смесь пропускали через картридж для твердофазной экстракции tC18 и картридж промывали раствором 10 мл аскорбиновой кислоты в ВДИ. Меченый радиоактивным изотопом продукт элюировали из картриджа для ТФЭ с помощью 1 мл этанола, обладающего крепостью 200 в соответствии с ФСША (Фармакопея США), в колбу для приготовления содержащего продукт препарата, в которую предварительно помещали 10 мл основы для приготовления препарата. Картридж промывали с помощью 4 мл основы для приготовления препарата и промывочный раствор смешивали с содержимым колбы для приготовления препарата. Полученный раствор пропускали через стерилизующий мембранный фильтр, обладающую порами размером 0,2 мкм, в стерильный снабженный продувочным фильтром сосуд (сосуд для конечного продукта, СКП).

Радиохимическую чистоту определяли с использованием стандартной системы для ВЭЖХ, снабженной соединенных последовательно детектором радиоактивности и УФ детектором, с использованием аналитической колонки Kinetex EVO C18 (250×4,6 мм, 5 мкм), элюирование проводили с помощью подвижной фазы, смеси MeOH/5 мМ NH_4OAc состава 50/50, с увеличением до состава 80/20 за 15 мин, и УФ детектор настраивали на длину волны, равную 254 нм (время удерживания соединения (–)-(Ib) = 9,7 мин, радиохимическая чистота >99%)

Атропоизомерную чистоту определяли с использованием стандартной системы для ВЭЖХ, снабженной соединенных последовательно детектором радиоактивности и УФ детектором, с использованием аналитической колонки Chiralpak OJ-H (250×4,6 мм, 5 мкм), элюирование проводили с помощью подвижной фазы, смеси MeOH/5 мМ NH_4OAc состава 40/60, при скорости потока, равной 1 мл/мин, и УФ детектор настраивали на длину волны, равную 254 нм (время удерживания соединения (–)-1a = 10,1 мин, ЭИ>99%).

D.4. Синтез атропоизомера (–) [^{3}H]-6-(2-(фторметил)-4-(фуро[3,2-c]пиридин-4-илокси)фенил)-1,5-диметилпиримидин-2,4(1H,3H)диона (Ic), (–)-(Ic)

Соединение формулы (–)-(I) (2 мг), катализатор Керра (2 мг) и дихлорметан (1 мл) объединяли в колбе для тритирования и перемешивали при количестве газообразного трития, соответствующем 5 Ки, в течение 2,5 ч. Подвижный тритий удаляли путем проводимого несколько раз выпаривания досуха с использованием этанола. Остатки растворяли в этаноле (20 мл). Неочищенное соединение (−)-(Ic) очищали с помощью ВЭЖХ с использованием колонки Gemini C18, 5 мкм, 250×10 мм, воду + ТФК (0,1%) использовали в качестве элюента A, ацетонитрил + ТФК (0,1%) использовали в качестве элюента B, градиентный режим: от 20% B до 100% B за 60 мин при скорости потока, равной 3 мл/мин. Соединение (−)-(Ic) собирали, выпаривали досуха в роторном испарителе и растворяли в этаноле (20 мл).

Радиохимическую чистоту соединения (−)-(Ic) определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием аналитической колонки Inertsil ODS3 (150×4,6 мм, 5 мкм), элюирование проводили с использованием смеси вода/ТФК в качестве элюента A и смеси CH_3CN/ТФК в качестве элюента B при скорости потока, равной 1 мл/мин (градиентный режим: от 20% B при t=0 до 100% B при t = 20 мин) и с использованием детектора радиоактивности (время удерживания соединения (−)-(Ic) = 12,9 мин, радиохимическая чистота = 99,4%).

ЖХМС ($ЭР^+$): Главный ион при 384 $(M+H)^+$, в соответствии с включением преимущественно 1 атома трития и удельной радиоактивности, по данным измерения равной 18 Ки/ммоль.

Е. БИОЛОГИЯ

Для исследования активности соединения (I) по отношению к рецептору D1 в настоящем изобретении проводили функциональное исследование. В функциональном исследовании определяли стимулирование продуцирования циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) по методике однородной флуоресценции с разрешением по времени (ОФРВ), при этом максимальное увеличение количества цАМФ, обеспеченное путем увеличения концентраций эндогенного агониста, допамина, определено, как активация рецептора D1, составляющая 100%. По данным исследования соединение (±)-(I) оказывает существенное прямое подобное агонистическому воздействие.

Для исследования сродства и селективности соединения (I) по отношению к рецептору D1 проводили исследования конкурентного связывания радиолиганда. Затем исследования конкурентного связывания радиолиганда использовали для определения сродства соединения (±)-I к рецептору D1 и оценки его селективности по отношению к представителям большой группы, включающей

80 родственных и неродственных мишеней. Соединение (±)-(I) связывается с рецепторами D1 и D5 при сродстве, находящемся в субнаномолярном диапазоне, и не связываются в значительной степени с другими исследованными мишенями.

Затем соединение (−)-(I) тритировали для определения и сопоставления: 1) характеристик связывания радиолиганда, известного антагониста рецептора D1 - [^{3}H]SCH23390 и агониста рецептора D1 - соединения формулы (−)-(Ic), и 2) способности позитивных аллостерических модуляторов рецептора D1 (ПАМ) усиливать связывание агониста или антагониста с рецептором D1 (D1R). В настоящем изобретении определяли вызванное ПАМ D1 усиление, как увеличение степени связывания радиолиганда в клеточной мембране, экспрессирующей D1R человека, или в срезах головного мозга не являющегося человеком примата (НЧП) с помощью ауторадиографии.

Конкретные условия, при которых исследовали соединение, приведены ниже в настоящем изобретении.

E.1. Материалы и методики

Временную трансфекцию допамина D1R человека проводили с помощью вектора pcDNA3.1 в клетках почек эмбриона человека (ПЭЧ hD1R).

Срезы головного мозга не являющегося человеком примата (НЧП), макака-резуса приобретали у фирмы Motac (Bordeaux, France), где все эксперименты с использованием животных проводили в соответствии с европейскими нормативами и законодательством по этике при использовании животных.

Соединением-антагонистом D1 являлся [^{3}H]SCH23390 (удельная радиоактивность равна 73 Ки/ммоль), который приобретали у фирмы Perkin Elmer (Zaventem, Belgium).

Набор для динамического исследования цАМФ с помощью ОФРВ, клетки эпендимоглиомы человека SK-N-MC и другие реагенты являлись чистыми для анализа, их получали из обычных коммерческих источников и использовали в соответствии с рекомендациями изготовителей.

Результаты анализировали с помощью программного обеспечения Excel и Graphpad Prism®. Значения K_D, $B_{макс.}$, pIC_{50} и pEC_{50}, и $E_{отн.}$ рассчитывали с помощью компьютера путем аппроксимации кривой в соответствии с уравнениями, описанными в различных моделях конкурентного и аллостерического связывания и функциональной активности.

E.2.Функциональное исследование D1 с использованием цАМФ с помощью ОФРВ

Допамин D1R связан с G-белком типа G_s, его активация вызывает увеличение концентрации внутриклеточного цАМФ ([цАМФ]$_i$). Изменение концентрации [цАМФ]$_i$ определяли по методике ОФРВ в клетках эпендимоглиомы человека SK-N-MC, эндогенно экспрессирующих D1R. Клетки при плотности, равной 20000 клеток/лунка, инкубировали в 384-луночном планшете при комнатной температуре в течение 1 ч при конечном объеме в сбалансированном солевом растворе Хенкса, забуференного с помощью 20 мМ HEPES (CCPX-буфер HEPES, pH 7,4), равном 20 мкл, содержащем 0,1 мМ изобутилметилксантина и допамин или соединение формулы (I) при 10 увеличивающихся концентрациях (от 10^{-5} до 10^{-12} М). Реакции останавливали путем последовательного добавления 10 мкл реагента для детектирования d2 и содержащего криптат реагента, оба разведенные в буфере для лизиса. После выдерживания при комнатной температуре в течение 60 мин определяли изменение сигналов испускания флуоресценции в ОФРВ и их преобразовывали в значения [цАМФ]$_i$ с использованием стандартной зависимости. Все инкубирования проводили дважды и результаты сравнивали с полученной для допамина зависимостью концентрация-эффект. Значение активности pEC_{50} соединения равно –log10 концентрации соединения, которая обеспечивает увеличение концентрации цАМФ на 50%, и $E_{отн}$ обозначает относительную эффективность, определенную, как выраженное в % максимальное значение увеличения активности, обеспечиваемое соединением, по сравнению с максимальным ответом, полученным при увеличивающихся концентрациях допамина ($E_{отн}$, равное 1, - максимальный ответ на допамин).

По данным исследования с использованием клеток нейробластомы человека SK-N-MC соединение (-)-I обладает частичным подобным агонистическому воздействием на рецептор D1 при значении pEC_{50}, равном 8,3, и значении $E_{отн.}$, равном 53% от значения для допамина. Результаты сравнительного функционального исследования для соединения (-)-1 и допамина приведены в таблице 1 и дополнительно представлены на фиг. 1.

Таблица 1: Значения pEC_{50} и $E_{отн.}$ для соединения (-)-I и допамина, полученные для hD1R в клетках SK-N-MC

Исследуемое соединение	pEC_{50} (-logM)	$E_{отн.}$ (%)
Соединение (-)-(I)	8,3 ± 0,1	53 ± 13
Допамин	5,8 ± 0,1	100 ± 13

Значения pEC_{50} и $E_{отн.}$ получали в 2-4 независимых экспериментах (среднее значение ± СО (стандартное отклонение)).

Е.3.Сродство соединения (±)-I к D1R человека и профиль селективности

Сродство (pKi) соединения формулы (±)-(I) по отношению к рекомбинантному D1R человека исследовали на фирме CEREP (Celle l'Evescault, France) путем проведения экспериментов по конкурентному связыванию радиолиганда [^{3}H]SCH23390. В случае D1R человека соединение (±)-I обладало значением pKi, равным 9,2.

Селективность соединения по отношению к D1R человека исследовали на фирме CEREP путем сопоставления селективности при концентрации, равной 10 мкМ, с селективностью по отношению к представителям группы, включающей 80 мишеней (n=1, исследования проводили дважды), включая рецепторы, переносчики, ферменты и ионные каналы. Идентифицировали возможное соответствующее сродство только к 3 мишеням: допаминовому рецептору D5 (D5R), тахикининовым рецепторам NK1 и переносчику аденозина (ADET) при степени ингибирования, составляющей >60% при концентрации соединения (±)-(I), равной 10 мкМ. Затем определяли сродство (pKi) соединения формулы (±)-I к D5R человека, рецептору NK1 и ADET. Соединение формулы (±)-I представляет собой селективный лиганд D1-подопного рецептора (D1R и D5R) (в случае D5R человека значение pKi равно 9,4), поскольку оно обладает селективностью, более, чем в 1000 раз превышающей селективность по отношению к другим 79 исследованным мишеням (pKi≤6,0).

Е.4. Исследование связывания радиолиганда

Для исследования связывания радиолиганда использовали мембраны клеток ПЭЧ hD1R. Через 48 ч после трансфекции клетки осаждали центрифугированием при 1500×g и при 4°C в течение 10 мин. Полученный после центрифугирования осадок один раз промывали охлажденным льдом забуференным фосфатом физиологическим раствором (ЗФФ) и центрифугировали так, как описано выше.

Затем полученный после центрифугирования осадок гомогенизировали в буфере, содержащем 15 мМ Tris-HCl (Tris - трис(гидроксиметиламинометан)), 0,3 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты, 1 мМ этиленгликольтетрауксусной кислоты, 2 мМ $MgCl_2$ (pH 7,5) и добавляли смесь ингибитора протеазы. Гомогенат дважды замораживали-оттаивали и приводили в равновесие при 25°C, затем обрабатывали с помощью DNAse (дезоксирибонуклеаза, 10 МЕ/мл, МЕ – международная единица) в течение10 мин. Затем раствор центрифугировали при 40000×g и при 4°C в течение 30 мин. В заключение полученный после центрифугирования осадок повторно суспендировали в 20 мМ буфера Tris-HCl (pH 7,4), содержащего 250 мМ сахарозы, и хранили при -80°C до проведения исследования связывания радиолиганда с рецептором D1. Образцы мембран ПЭЧ hD1R (5 мкг белков для каждого исследования) инкубировали при 25°C в течение 120 мин с соединением (-)-(Ic) или с [^{3}H]SCH23390 в 0,2 мл связывающего буфера, содержащего 1% ДМСО. После завершения инкубирования связанный с белком радиолиганд извлекали фильтрованием через предварительно намоченные стекловолоконные фильтры GF/B. Фильтры промывали охлажденным льдом 50 мМ буфером Tris-HCl (pH 7,4) при объеме, по меньшей мере в 4 раза превышающем объем при исследовании. Продолжительность всей стадии фильтрования не превышала 10 с. Фильтры сушили и радиоактивность определяли с помощью жидкостной сцинтилляции. Исследование связывания при насыщении проводили с использованием увеличивающихся концентраций соединения (-)-(Ic) или [^{3}H]SCH23390 (от 0,5 до 50 нМ) при отсутствии и в присутствии 10 мкМ ПАМ D1, соединения a (регистрационный № CAS: 1900706-51-5) и соединения b (регистрационный № CAS: 1904661-53-5), также называющегося соединением B в параграфе E.7 и на фиг. 5 и 6.

Эксперименты по изучению конкурентного связывания/усиления связывания проводили при постоянной концентрации соединения (-)-(Ic) (1 - 4 нМ) и с использованием 10 увеличивающихся концентраций соединения (-)-(Ic) или соединения b (от 10^{-10} до 10^{-5}М). Во всех экспериментах неспецифическое связывание (НСС) определяли, как остаточное связывание радиолиганда, наблюдающееся в присутствии 10 мкМ соответствующего немеченого соединения.

Соединение - ПАМ D1 не оказывает воздействие на связывание радиолиганда-антагониста рецептора D1, [^{3}H]SCH23390 (фиг. 3А), однако обеспечивает существенное улучшение связывания радиолиганда-агониста рецептора D1, соединения (-)-(Ic), при этом значение $B_{макс.}$ увеличивается на 45% и значение K_D уменьшается на 20% (фиг. 3Б).

Способность соединения - ПАМ D1 усиливать связывание радиолиганда-агониста D1R, соединения (-)-(Ic), при концентрациях, равных несколько наномолей (подходящих для использования в качестве радиоактивного индикатора для ПЭТ) представлена фиг. 3В (усиление связывания соединения (-)-(Ic) >50%).

Полученные зависимости представлены на фиг. 3.

Е.5. Ауторадиография

Срезы головного мозга толщиной 12 мкм готовили с использованием свежезамороженного полушария мозга НЧП и их помещали на предметное стекло для микроскопа. Эксперимент помощью ауторадиографии проводили при комнатной температуре в CCPX-буфер HEPES (pH 7,4). Срезы головного мозга НЧП сначала приводили в равновесие в течение 30 мин, затем их инкубировали в течение 1 ч с [^{3}H]соединением в 1% ДМСО. Затем предметные стекла промывали охлажденным льдом 50 мМ буфером Tris-HCl (pH 7,4) в течение 5 мин, затем их два раза промывали охлажденной льдом дистиллированной водой. Срезы сушили при атмосферном давлении при комнатной температуре. Радиоактивность срезов определяли косвенным путем после обработки предметных стекол с помощью люминесцентного экрана или прямым путем с использованием считывающего устройства. Во всех экспериментах помощью ауторадиографии для количественного анализа включали результаты для [^{3}H]стандарта и НСС определяли, как остаточное связывание [^{3}H]соединения, наблюдающееся в присутствии 10 мкМ соответствующего немеченого соединения.

По данным исследования с помощью ауторадиографии с использованием срезов головного мозга НЧП, по аналогии с известным радиоактивным индикатором D1-подобного рецептора (см. Cadet JL et al. Dopamine D1 receptors, regulation of gene expression in the brain, and neurodegeneration. CNS Neurol Disord Drug Targets. (2010) 9(5): 526–538), соединение (-)-Ic обладает существенной степенью связывания (полное связывание) в хвостатой скорлупе, что находится в соответствии с наиболее высокими уровнями экспрессии рецептора D1 в этих структурах (Cadet et al.). Это связывание является заменяемым и установлено, что оно на 20% является неспецифическим связыванием (определяли в присутствии 10 мкМ соединения (I)).

В присутствии 10 мкМ ПАМ D1, соединения b, существенно усиливается специфическое связывание соединения (-)-Ic (>150%), это указывает на существенное усиливающее воздействие.

На фиг. 4 представлены результаты, полученные в ауторадиографических исследованиях. На включенном изображении показана область, использовавшаяся для получения количественных значений. Результаты представлены, как среднее значение двух экспериментов ± стандартное отклонение.

Е.6. Получение изображений *in vivo* с помощью ПЭТ с использованием макак-крабоедов

Эксперимент проводили с использованием макака-крабоеда (самка, масса тела = 6,02 кг). Обезьян усыпляли путем внутримышечной инъекции кетамина и во время эксперимента анестезию поддерживали с использованием смеси севофлурана, кислорода и медицинского воздуха. Сканирование при исходном состоянии проводили после внутривенного введения 141 МБк соединения (–)-(Ia) при удельной радиоактивности, равной 795 ГБк/мкмоль, и с помощью ПЭТ получали изображения головного мозга с использованием сканера Siemens HRRT PET (Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, TN).

Сбор данных проводили в течение 123 мин и их сохраняли в виде рентгенограмм венозных синусов при следующих временных интервалах: 9×20 с; 3×1 мин; 5×3 мин и 17×6 мин. Исследуемыми областями в этом исследовании являлись хвостатое ядро, скорлупа, мозжечок, лобная кора, затылочная кора, бледный шар, средний мозг, полосатое тело, таламус и височная доля. Получали параметры регистрации для применения исследуемых областей к полученному с помощью ПЭТ изображению и получали зависимости радиоактивности от времени (ЗРВ) для областей. Образцы венозной крови отбирали через 4, 15, 30, 60, 90, 120 мин после введения соединения (–)-(Ia) для анализа метаболита.

Зависимости стандартизированного уровня накопления (СУН), радиоактивности, от времени для соединения (–)-Ia

Зависимости стандартизированного уровня накопления (СУН), радиоактивности, от времени для соединения (–)-Ia получали для нескольких исследуемых областей. Максимальное значение накопления соединения (–)-Ia обеспечивается через 5-10 мин после введения при значении СУН, равном примерно 3,5-4, в разных областях головного мозга и затем происходит быстрое вымывание из мозжечка при значении СУН, равном примерно 1, через 60 мин, как это и предполагалось для эталонной области, не содержащей рецептор D1.

Вымывание из исследуемых областей хвостатого ядра и скорлупы происходит существенно медленнее при значении СУН, равном примерно 2, через 60 мин, что можно было ожидать из описанного распределения рецептора D1 в этих областях. С использованием мозжечка в качестве эталонной области и эталонной модели ткани Логана рассчитывали значения связывающего потенциала (BP_{ND}), равные 0,94 и 0,87 для хвостатого ядра и скорлупы соответственно, это означает, что соединение формулы (-)-(Ia) обладает специфическим связыванием, которое можно надежно количественно определить путем визуализации с помощью ПЭТ.

На итоговых изображениях для СУН, полученных через 33-63 мин, видна картина накопления, находящаяся в соответствии с результатами исследования тканей головного мозга с помощью ауторадиографии и описанным распределением рецептора D1, при высоком уровне накопления в структурах полосатого тела.

Профиль метаболитов соединений формулы (I)

Профиль метаболитов соединения (–)-Ia определяли с помощью радио-ВЭЖХ путем анализа образцов венозной крови, отобранных в разные моменты времени после введения. Содержание исходной фракции в плазме составляло 85% через 15 мин, 60% через 30 мин и все еще примерно 45% через 60 мин. В отличие от этого с использованием ранее описанных агонистов-радиоактивных индикаторов рецептора D1 обнаружено, что только гидрофильные метаболиты с малой вероятностью проходят через гематоэнцефалический барьер.

Е.7. Исследования усиливающего воздействия *in vivo* с помощью ПЭТ с использованием макак-крабоедов

Двух макак-крабоедов (*Macaca fascicularis*), находящиеся в MPI Research (Mattawan, MI), использовали в качестве субъектов для исследования усиливающего воздействия *in vivo* с помощью ПЭТ.

Е.7.1. Введение соединений и получение изображений

Каждое животное анестезировали пропофолом путем внутривенного болюсного введения (2,5-5,0 мг/кг) и им продолжали внутривенно вводить пропофол при постоянной скорости вливания (ПСВ, 0,1-0,6 мг/кг/мин).в течение не менее 30 мин, затем внутривенно вводили дозу соединения-B. Вводили несколько доз. Для дозы, равной 20 мг/кг (полная доза) соединение-B вводили путем вливания дозы, равной 8,54 мг/кг; вводимой при ПСВ, равной 34,2 мг/кг/ч в течение примерно 15 мин, затем вводили поддерживающую дозу, равную 11,45 мг/кг; вводимую при ПСВ, равной 17,2 мг/кг/ч в течение примерно 40 мин. Введение соединения-B прекращали после полного времени вливания, равного примерно 55 мин. Соединение (-)-Ib вводили путем внутривенной болюсной инъекции, причем введение начинали через 10 мин после начала вливания соединения-B. Изображения головного мозга получали сразу после начала введения радиоактивного изотопа с помощью сканера microPET Focus 220 (Siemens Medical Systems, Knoxville, TN). Сбор данных динамической эмиссии проводили в режиме списка в течение 120 мин сразу после инъекции соединения (-)-Ib, затем их преобразовывали в многокадровое динамическое изображение (кадры: 6×0,5 мин, 3×1 мин, 2×2 мин и 22×5 мин). Полученные с помощью ПЭТ изображения корректировали с учетом нормирования детектора, времени запаздывания, неоднородного радиального сканирования образца, ослабления, рассеяния и радиоактивного распада с использованием программного обеспечения и методологий, предоставленных производителем камеры для ПЭТ.

Е.7.2. Отбор образцов артериальной крови

После введения соединения (-)-Ib из общей подвздошной артерии отбирали образцы артериальной крови до введения дозы соединения (-)-Ib и в 13 моментов времени в течение вплоть до 120 мин после инъекции соединения (-)-Ib. Все образцы крови собирали в пробирки с антикоагулянтом и хранили на льду до проведения количественного анализа радиоактивности с использованием счетчика гамма-излучения, определения изменения доли исходной фракции соединения (-)-Ib в плазме с течением времени с помощью ВЭЖХ и стабильности *ex vivo* соединения (-)-Ib в крови.

Е.7.3. Обработка и анализ изображений

Преобразованные полученные с помощью ПЭТ динамические изображения головного мозга переносили и анализировали с использованием пакета программного обеспечения PMOD (PMOD Technologies, Zurich, Switzerland). Полученные с помощью ПЭТ изображения при исходном состоянии сравнивали с предварительно полученными с помощью структурной магнитно-резонансной визуализации (МРВ) изображениями головного мозга животного. Проводили пространственное нормирование полученных с помощью МРВ изображений головного мозга животного на обычное полученное с помощью МР шаблонное изображение головного мозга макака-крабоеда и полученное нормированное преобразование применяли к полученным с помощью ПЭТ изображениями. Последующие полученные с помощью ПЭТ изображения во время исследований лекарственного средства сначала сравнивали с изображениями в исходном состоянии и затем их преобразовывали в обычное шаблонное пространство МР с использованием уже рассчитанного преобразования с применением изображений в исходном состоянии.

Исследуемые области (ИСО), определенные в шаблонном пространстве, применяли к полученным с помощью ПЭТ изображениям для построения зависимостей радиоактивности от времени (ЗРВ). Определяли среднюю радиоактивную концентрацию (кБк/см^3) в каждой ИСО и получали ЗРА, представляющие собой зависимость радиоактивной концентрации в области головного мозга от времени. ЗРВ и изображения для головного мозга представляли в единицах СУН (г/мл) путем нормирования на массу тела животного и вводимую дозу.

Методику графического анализа Логана (ГАЛ) с использованием плазмы применяли для полученных для областей ЗРВ и определяли полный объем распределения (V_T) для каждой области головного мозга. Использующуюся для моделирования артериальную исходную функцию получали путем корректирования активности метаболитов в плазме с использованием результатов, полученных для исходной фракции.

Использовали зависимость усиливающего действия, сходную с концепцией для зависимости общего заполнения Лассена, где по оси у отложено $V_T^{\text{лечение}}$-$V_T^{\text{исходное состояние}}$ и по оси x отложено $V_T^{\text{лечение}}$. Затем усиливающее действие, определенное, как увеличение интенсивности специфического сигнала, усиление = $V_s^{\text{лечение}}/V_T^{\text{исходное состояние}}$, где V_S обозначает удельный объем распределения, можно вывести из графика зависимости усиливающего действия в виде наклон/(1-наклон), при этом незамещаемый объем распределения (V_{ND}) задан отрезком, отсекаемым на графике на оси x.

E.7.4. Результаты

Полученные в течение 40-90 мин с помощью ПЭТ усредненные изображения для СУН (средневзвешенные по времени) при исходном состоянии и после введения дозы соединения-B, равной 20 мг/кг, и соответствующие зависимости радиоактивности от времени представлены на фиг. 5. На обоих изображениях видно влияние соединения-B на уровень накопления соединения-B, где увеличенный уровень накопления наблюдали вследствие усиливающего действия соединения (-)-Ib путем связывания соединения-B с аллостерическим активным центром рецептора D1.

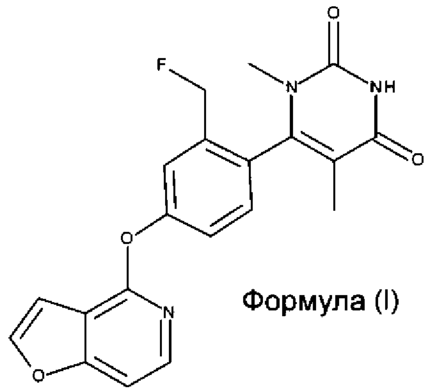
Для количественной оценки усиливающего действия из зависимостей радиоактивности от времени с использованием ГАЛ определяли объем распределения (V_T) при исходном состоянии и после введения соединения-B. При введении 20 мг/кг у макака-крабоеда наблюдали составляющее в среднем ~100% усиление в хвостатом ядре и скорлупе.

На фиг. 6 представлена зависимость усиливающего действия для хвостатого ядра, скорлупы, полосатого тела, бледного шара, черной субстанции, островковой доли, поясной коры и мозжечка.

С помощью зависимости усиливающее действие рассчитано, как составляющее примерно 136% при полной дозе соединения-B, равной 20 мг/кг, введенного вливанием в течение 55 мин.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I),

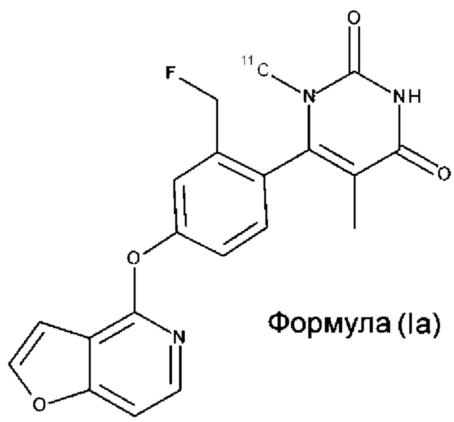


Формула (I)

которое является меченым радиоактивным изотопом соединением, или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение формулы (I) по п. 1 или его фармацевтически приемлемая соль, в котором по меньшей мере один из атомов водорода представляет собой ^{3}H; или по меньшей мере один из атомов углерода представляет собой ^{11}C; или атом фтора представляет собой ^{18}F.

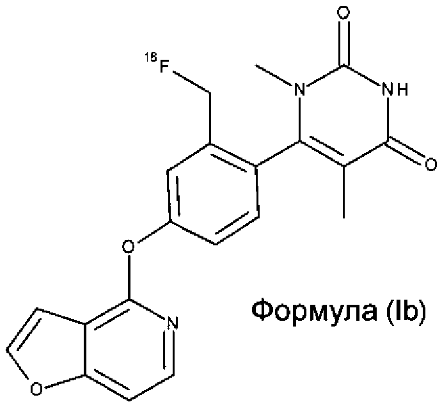
3. Соединение формулы (I) по п. 1, описывающееся формулой (Ia), или его фармацевтически приемлемая соль,



Формула (Ia)

в которой один из атомов углерода представляет собой ^{11}C.

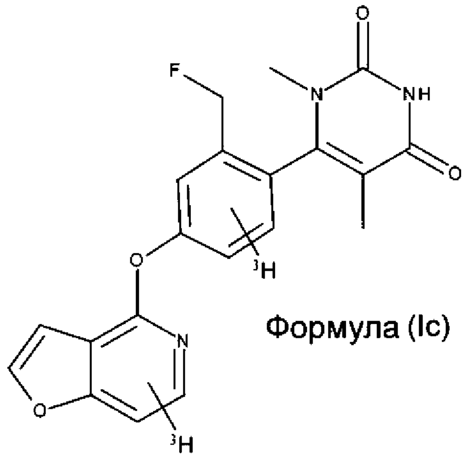
4. Соединение формулы (I) по п. 1, описывающееся формулой (Ib), или его фармацевтически приемлемая соль,



Формула (Ib)

в которой атом фтора представляет собой ^{18}F.

5. Соединение формулы (I) по п. 1, описывающееся формулой (Ic), или его фармацевтически приемлемая соль,



Формула (Ic)

в которой один или большее количество атомов водорода представляют собой ^{3}H.

6. Соединение формулы (I) по любому из предыдущих пунктов, которое в основном состоит из атропоизомера (-).

7. Фармацевтическая композиция, содержащая в обнаруживаемом количестве соединение формулы (I) по п. 1 или его фармацевтически

приемлемую соль в комбинации с фармацевтически приемлемым разбавителем или носителем.

8. Соединение формулы (I) по любому из п.п. 1-6, для применения в качестве радиоактивного индикатора.

9. Соединение формулы (I) по п. 8, для применения в способе количественного анализа плотности D1-подобных рецепторов.

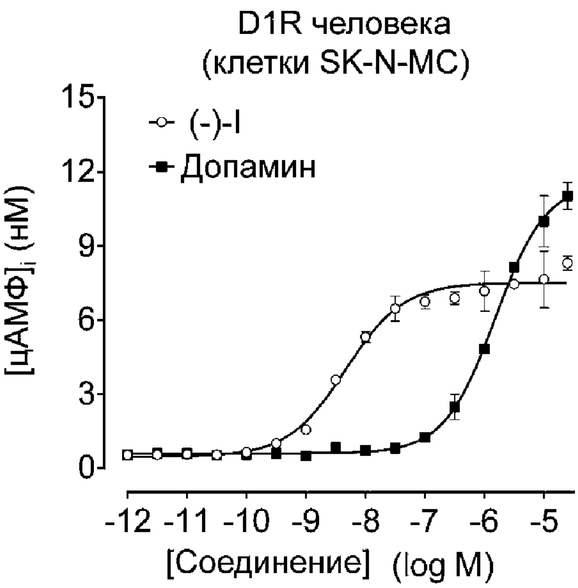
10. Соединение формулы (Ia) по п. 3 или соединение формулы (Ib) по п. 4, или фармацевтическая композиция по п. 7, для применения в способе визуализации *in vivo* с помощью ПЭТ.

11. Соединение формулы (Ia) по п. 3 или соединение формулы (Ib) по п. 4, для применения в способе визуализации *in vivo* с помощью ПЭТ и определения степени накопления в мишени ортостерического агониста - модулятора D1-подобных рецепторов.

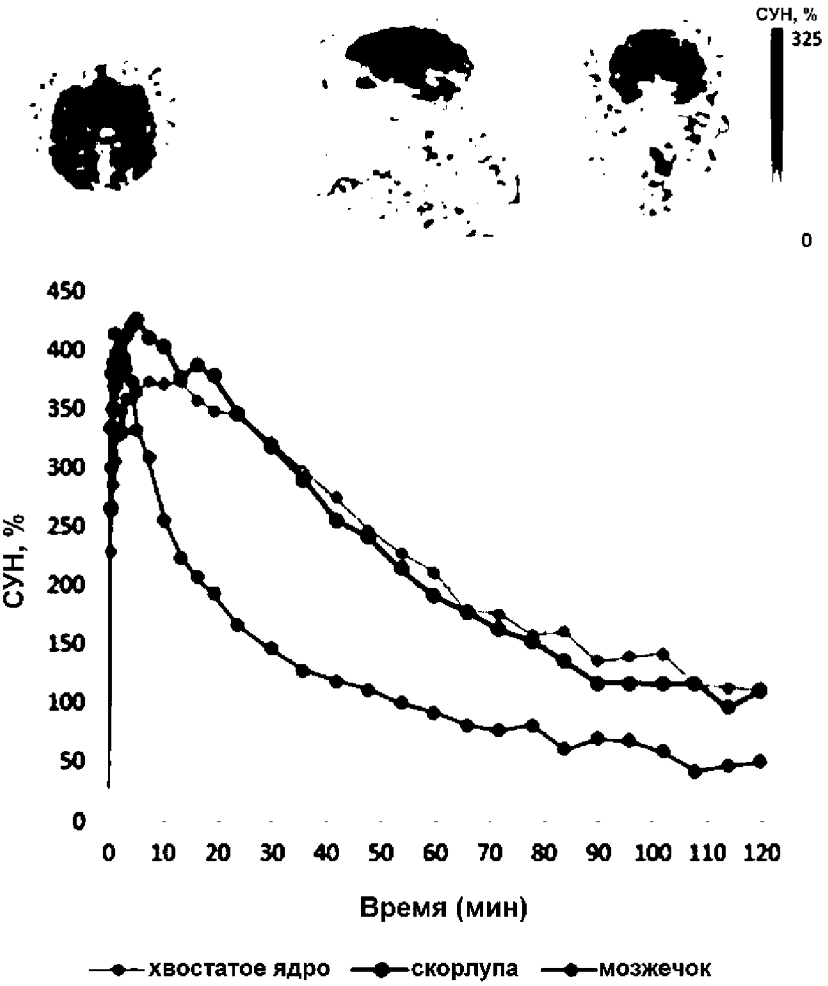
12. Соединение формулы (Ia) по п. 3 или соединение формулы (Ib) по п. 4, для применения для количественного анализа *in vivo* воздействия аллостерических модуляторов D1 на рецептор D1.

13. Применение соединения формулы (Ic) по п. 5 для определения *in vitro* или *ex vivo* степени накопления в мишени ортостерического агониста - модулятора D1-подобных рецепторов.

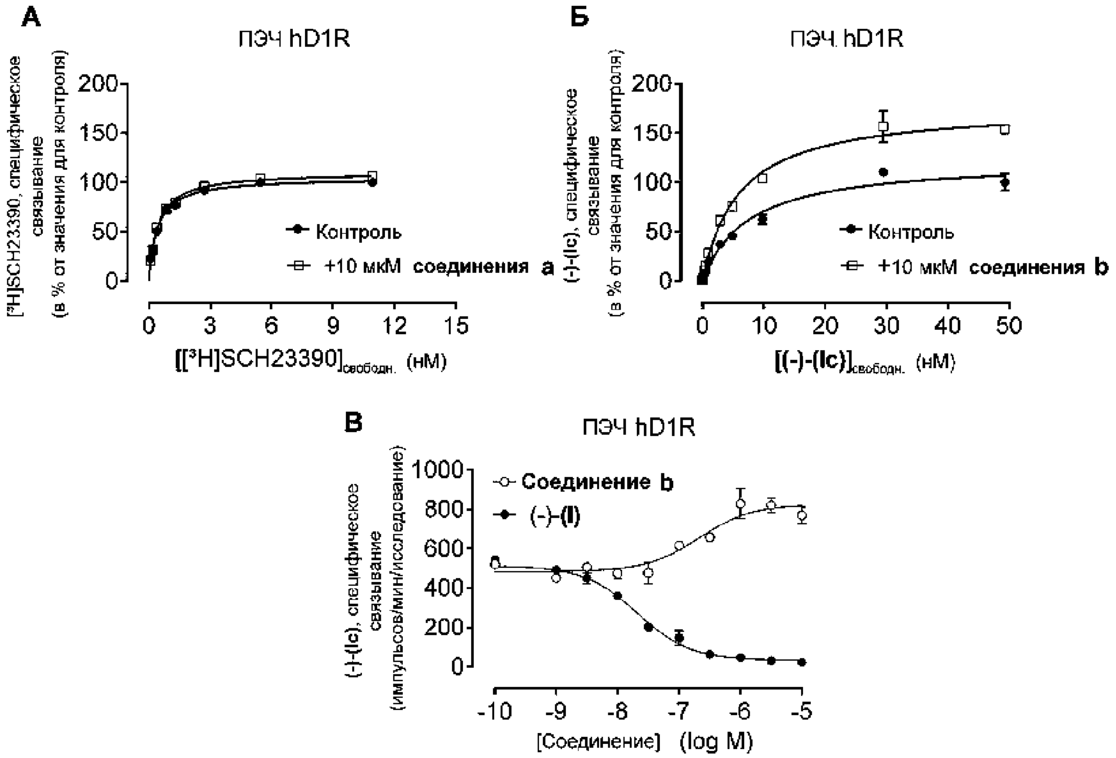
14. Применение соединения формулы (Ic) по п. 5 для количественного анализа *in vitro* или *ex vivo* воздействия аллостерических модуляторов D1 на рецептор D1.


D1R человека
(клетки SK-N-MC)
15
12
9
6
3
0
[цАМФ]i (нМ)
(-)-I
Допамин
-12 -11 -10 -9 -8 -7 -6 -5
[Соединение] (log M)

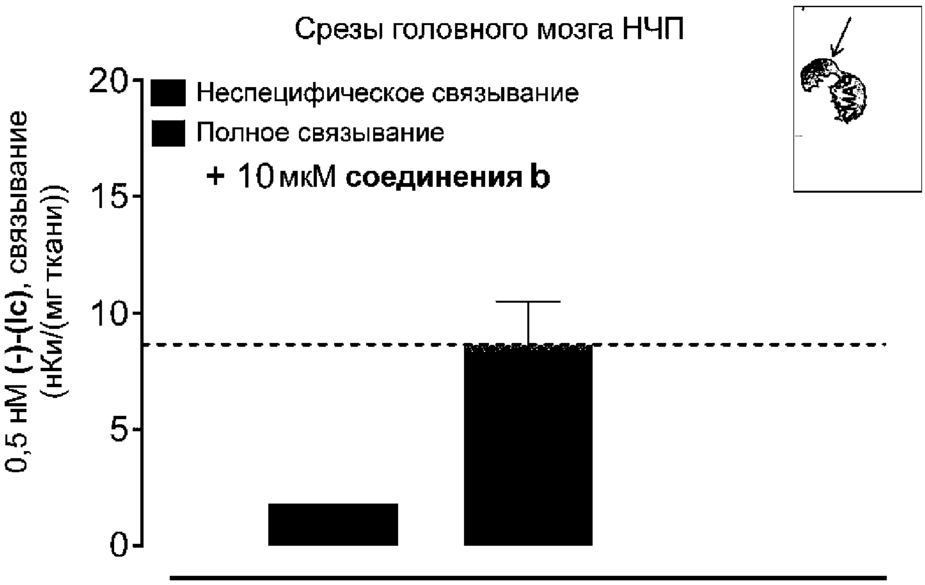
Фиг. 1

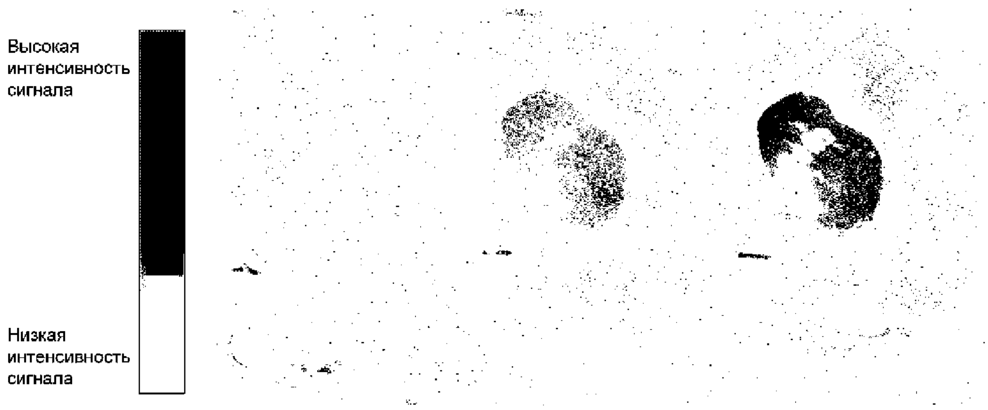

СУН, %
325
0
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
Время (мин)
СУН, %
хвостатое ядро
скорлупа
мозжечок

Фиг. 2

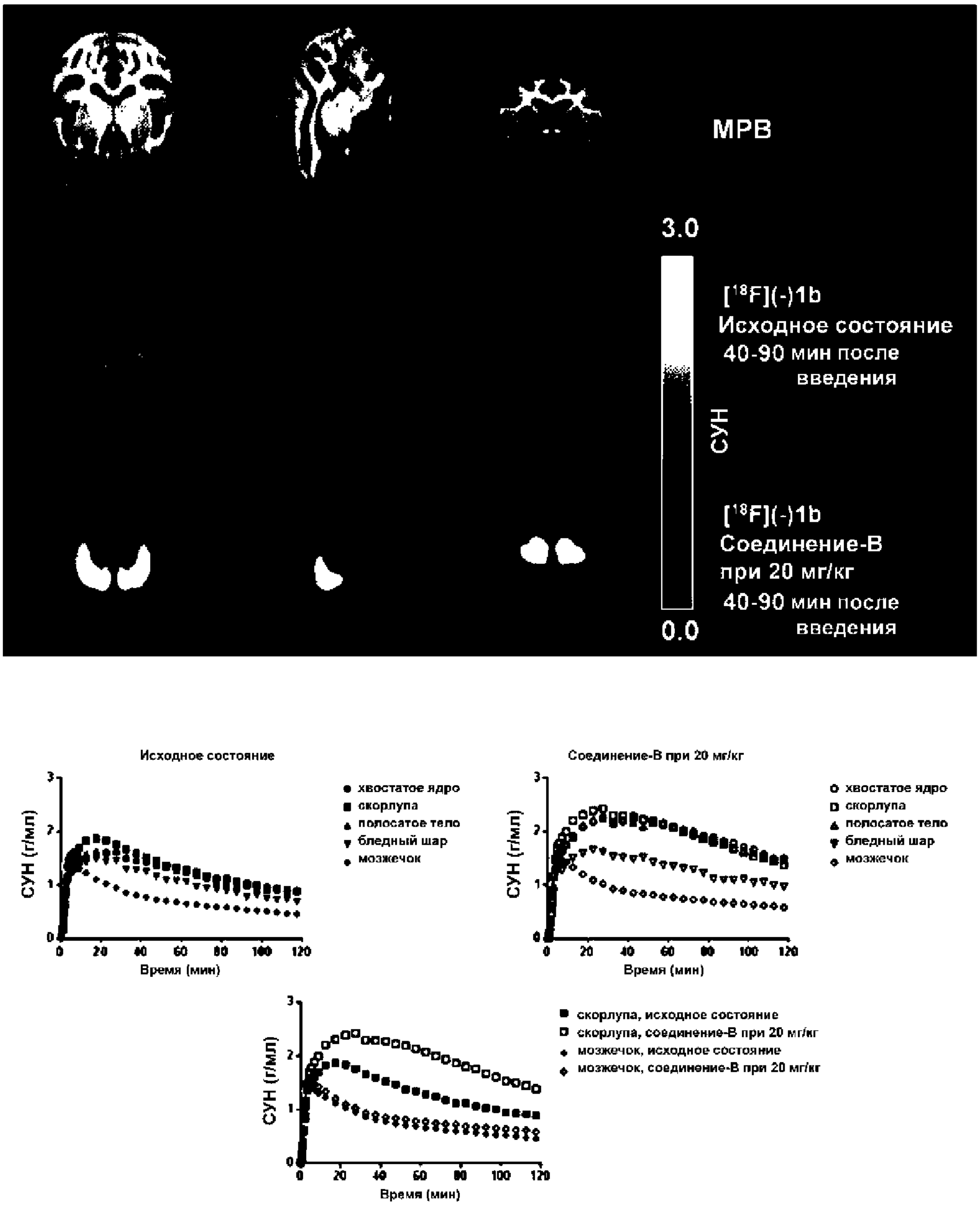

А
ПЭЧ hD1R
[³H]SCH23390, специфическое связывание (в % от значения для контроля)
200
150
100
50
0
Контроль
+10 мкМ соединения a
0 3 6 9 12 15
[[³H]SCH23390]свободн. (нМ)
Б
ПЭЧ hD1R
(-)-(Ic), специфическое связывание (в % от значения для контроля)
200
150
100
50
0
Контроль
+10 мкМ соединения b
0 10 20 30 40 50
[(-)-(Ic)]свободн. (нМ)
В
ПЭЧ hD1R
(-)-(Ic), специфическое связывание (импульсов/мин/исследование)
1000
800
600
400
200
0
Соединение b
(-)-(I)
-10 -9 -8 -7 -6 -5
[Соединение] (log M)

Фиг. 3

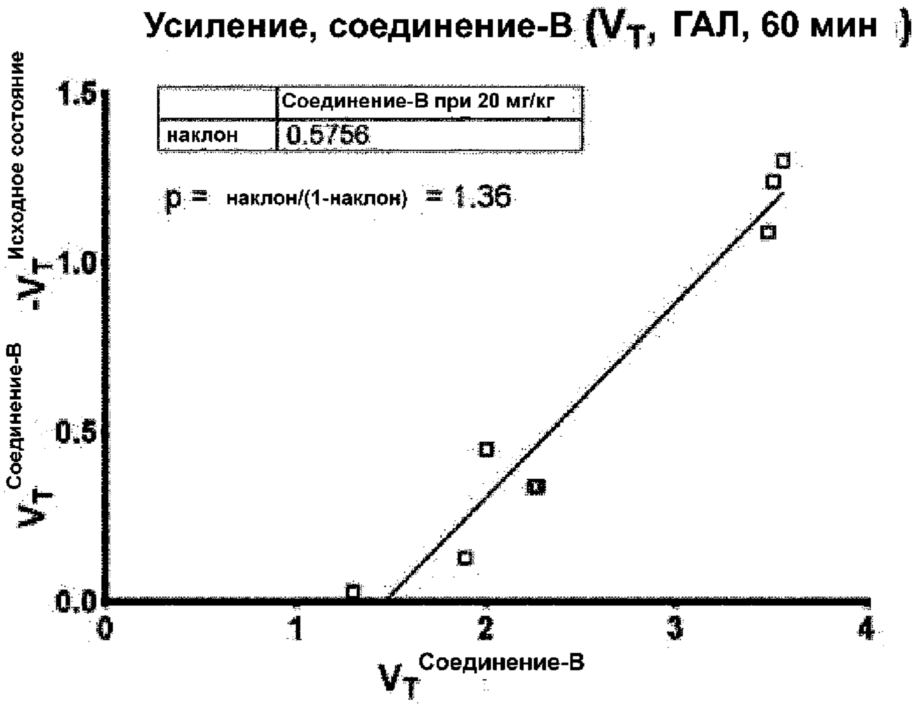

Срезы головного мозга НЧП
Неспецифическое связывание
Полное связывание
+ 10 мкМ **соединения b**
0,5 нМ (-)-(Ic), связывание
(нКи/(мг ткани))
20
15
10
5
0


Высокая интенсивность сигнала
Низкая интенсивность сигнала

Фиг. 4


МРВ
3.0
[18F](-)1b
Исходное состояние
40-90 мин после
введения
СУН
[18F](-)1b
Соединение-В
при 20 мг/кг
40-90 мин после
введения
0.0
Исходное состояние
хвостатое ядро
скорлупа
полосатое тело
бледный шар
мозжечок
СУН (г/мл)
Время (мин)
Соединение-В при 20 мг/кг
хвостатое ядро
скорлупа
полосатое тело
бледный шар
мозжечок
СУН (г/мл)
Время (мин)
скорлупа, исходное состояние
скорлупа, соединение-В при 20 мг/кг
мозжечок, исходное состояние
мозжечок, соединение-В при 20 мг/кг
СУН (г/мл)
Время (мин)

Фиг. 5


Усиление, соединение-В (V_T, ГАЛ, 60 мин)
Соединение-В при 20 мг/кг
наклон
0.5756
p = наклон/(1-наклон) = 1.36
$V_T^{Соединение-B}$ $-V_T^{Исходное\ состояние}$
$V_T^{Соединение-B}$
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
4

Фиг. 6