

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037941**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.06.09

(21) Номер заявки
201891444

(22) Дата подачи заявки
2016.12.16

(51) Int. Cl. **A61K 51/04** (2006.01)
C07B 59/00 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
A61K 101/02 (2006.01)

(54) ЛИГАНДЫ mGluR2/3 ДЛЯ ПЕТ, МЕЧЕННЫЕ РАДИОАКТИВНЫМИ ИЗОТОПАМИ

(31) 15201239.9

(32) 2015.12.18

(33) EP

(43) 2018.12.28

(86) PCT/EP2016/081537

(87) WO 2017/103179 2017.06.22

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН ФАРМАЦЕВТИКА НВ (BE)

(72) Изобретатель:
Андрес-Хиль Хосе Игнасио, Ван Гол
Михиль Люк Мария (ES), Борман Ги
Мориц Р, Вербек Йост (BE)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2012062752

LYNNE GILFILLAN ET AL.: "Synthesis and biological evaluation of novel 2,3-dihydro-1H-1,5-benzodiazepin-2-ones; potential imaging agents of the metabotropic glutamate 2 receptor", MEDCHEMCOMM, vol. 4, no. 7, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 1118-1123, XP055190194, ISSN: 2040-2503, DOI: 10.1039/C3MD00110E, abstract, figure 1, tables 1, 2, page 1122, column 2, paragraph 2 WO-A1-2016016395

(57) Настоящее изобретение относится к новым меченым радиоактивными изотопами лигандам mGluR2/3, избирательным по сравнению с другими mGlu-рецепторами, которые являются применимыми для визуализации и количественного определения метаботропных глутаматных рецепторов mGlu2 и mGlu3 в тканях с помощью позитронно-эмиссионной томографии (PET). Настоящее изобретение также направлено на композиции, содержащие такие соединения, на способы получения таких соединений и композиций, на применение таких соединений и композиций для визуализации ткани, клеток или млекопитающего in vitro или in vivo и на предшественников указанных соединений.

B1

037941

037941

B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к новым меченым радиоактивными изотопами лигандам mGluR2/3, избирательным по сравнению с другими mGlu-рецепторами, которые являются применимыми для визуализации и количественного определения метаболитных глутаматных рецепторов mGlu2 и mGlu3 в тканях с помощью позитронно-эмиссионной томографии (PET). Настоящее изобретение также направлено на композиции, содержащие такие соединения, на способы получения таких соединений и композиций, на применение таких соединений и композиций для визуализации ткани, клеток или млекопитающего *in vitro* или *in vivo* и на предшественников указанных соединений.

Предпосылки изобретения

Глутаматергическая система в CNS является одной из нейромедиаторных систем, играющих ключевую роль в некоторых функциях головного мозга. Метаболитные глутаматные рецепторы (mGluR) принадлежат к семейству рецепторов, сопряженных с G-белком, и к настоящему времени было идентифицировано восемь различных подтипов, распределенных в различных участках головного мозга (Ferraguti & Shigemoto, *Cell & Tissue Research*, 326:483-504, 2006). mGluR участвуют в модулировании синаптической передачи и возбуждаемости нейронов в CNS посредством связывания глутамата. Это активирует рецептор, вовлекающий участников внутриклеточной передачи сигнала, что приводит к клеточным событиям (Niswender & Conn, *Annual Review of Pharmacology & Toxicology* 50:295-322, 2010).

mGluR дополнительно подразделяют на три подгруппы на основе их фармакологических и структурных свойств: группу I (mGluR1 и mGluR5), группу II (mGluR2 и mGluR3) и группу III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 и mGluR8). Лиганды рецепторов группы II, являющиеся как ортостерическими, так и аллостерическими модуляторами, считаются потенциально применимыми в лечении различных неврологических расстройств, в том числе психоза, расстройств настроения, болезни Альцгеймера и форм когнитивного дефицита или дефицита памяти. Это соответствует их первичной локализации в таких областях головного мозга как кора головного мозга, гиппокамп и полосатое тело (Ferraguti & Shigemoto, *Cell & Tissue Research* 326:483-504, 2006). В частности сообщается, что антагонисты и отрицательные аллостерические модуляторы обладают потенциалом для лечения расстройств настроения и когнитивной дисфункции или нарушения памяти. Это основано на полученных данных для антагонистов и отрицательных аллостерических модуляторов рецепторов группы II, тестируемых на лабораторных животных, подвергаемых воздействию ряда экспериментальных условий, считающихся соответствующими этим клиническим синдромам (Goeldner et al., *Neuropharmacology* 64:337-346, 2013). В настоящее время, например, продолжаются клинические испытания с антагонистом mGluR2/3 RO4995819 (F. Hoffmann-La Roche Ltd.) в ходе вспомогательной терапии у пациентов с большим депрессивным расстройством, у которых отсутствует адекватный ответ на ведущееся лечение антидепрессантами (идентификатор NCT01457677 в ClinicalTrials.gov, загружено 19 февраля 2014 г.).

В WO 2013066736 (Merck Sharp & Dohme Corp.) описаны хинолинкарбоксамидные и хинолинкарбонитрильные соединения в качестве NAM mGluR2. В WO2013174822 (Domain Therapeutics) описаны 4Н-пиразоло[1,5-а]хиназолин-5-оны и 4Н-пирроло-[1,2-а]хиназолин-5-оны, а также их активность *in vitro* в качестве NAM mGluR2. В WO 2014064028 (F. Hoffman-La Roche AG) раскрыты отбор отрицательных аллостерических модуляторов mGlu2/3 и их возможное применение в лечении расстройств аутистического спектра (ASD). В WO 2014195311 (Janssen Pharmaceutica NV) раскрыты 6,7-дигидропиразоло[1,5-а]пиразин-4(5Н)-оновые соединения и их применение в качестве NAM mGluR2.

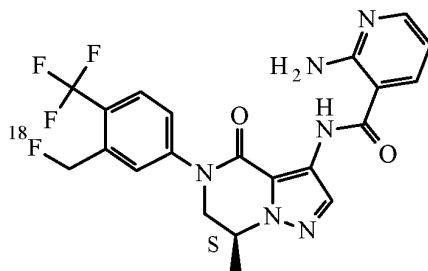
Рецепторы группы II расположены главным образом на пресинаптических нервных окончаниях, где они влияют на высвобождение глутамата в синапсы по механизму отрицательной обратной связи (Kelmendi et al., *Primary Psychiatry* 13:80-86, 2006). Функциональное ингибирование этих рецепторов антагонистами или отрицательными аллостерическими модуляторами, таким образом, отключает торможение высвобождения глутамата, что приводит в результате к усилению глутаматергической передачи сигнала. Полагают, что данный эффект лежит в основе антидепрессантоподобных и прокогнитивных эффектов, наблюдаемых для различных молекул, исследуемых в доклинических исследованиях ингибиторов рецепторов группы II. В дополнение было показано, что обработка мышей с помощью ортостерических антагонистов рецепторов группы II усиливает передачу сигнала факторами роста, такими как нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) (Koike et al., *Behavioural Brain Research* 238:48-52, 2013). Поскольку было показано, что BDNF и другие факторы роста вовлечены в опосредование синаптической пластичности, являясь критически важными для нее, то данный механизм, вероятно, способствует как антидепрессантным, так и прокогнитивным свойствам этих соединений. Таким образом, считается, что ингибирование рецепторов группы II из семейства mGluR представляет собой возможный механизм терапии неврологических расстройств, в том числе депрессии и когнитивной дисфункции или нарушения памяти.

Позитронно-эмиссионная томография (PET) представляет собой неинвазивную методику визуализации, которая предлагает наивысшее пространственное и временное разрешение среди всех методик радионуклидной визуализации и обладает дополнительным преимуществом, заключающимся в том, что она может обеспечивать возможность правильного количественного определения концентраций индикаторов в тканях. В ней для выявления применяются позитронно-активные радионуклиды, такие как, например, ^{15}O , ^{13}N , ^{11}C и ^{18}F . К настоящему времени сообщалось о нескольких радиоизотопных индикато-

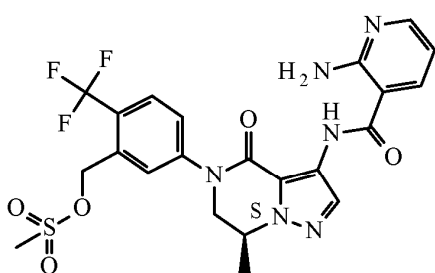
рах для позитронно-эмиссионной томографии для визуализации mGluR *in vivo*. По-прежнему существует потребность в получении улучшенных радиоизотопных индикаторов для позитронно-эмиссионной томографии для визуализации mGlu-рецепторов группы II.

Краткое описание изобретения

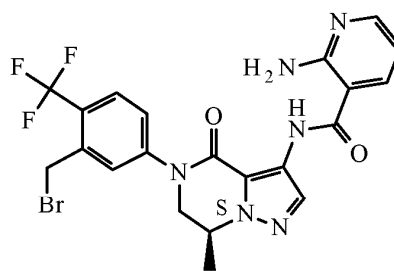
Настоящее изобретение относится к меченному радиоактивным изотопом соединению формулы



или его фармацевтически приемлемой соли или сольвату. Настоящее изобретение также относится к соединениям-предшественникам для синтеза заявленного соединения. Таким образом, настоящее изобретение также относится к соединениям формул P-2 и P-3



P-2,



P-3,

или их фармацевтически приемлемой соли или сольвату.

Конкретной фармацевтически приемлемой солью P-2 является метилсульфонатная соль.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции для визуализации или количественного определения рецепторов mGlu2 и mGlu3, содержащей заявленное соединение или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В частности, указанная фармацевтическая композиция представляет собой стерильный раствор. Таким образом, иллюстрацией настоящего изобретения служит стерильный раствор, содержащий заявленное соединение формулы.

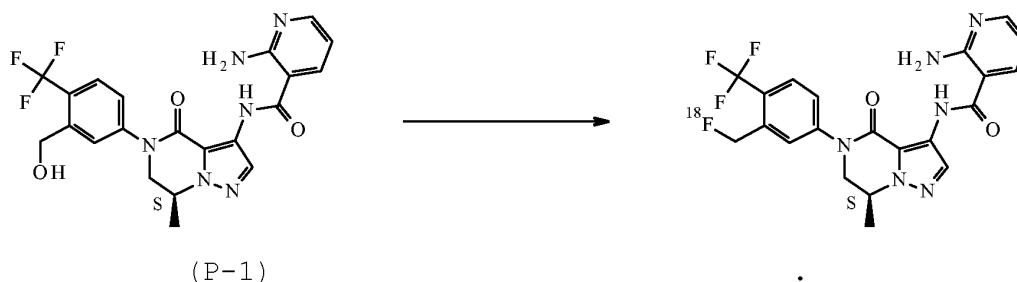
Настоящее изобретение дополнительно относится к применению соединения формулы в качестве средства визуализации. Таким образом, в качестве примера настоящего изобретения представлены применение соединения формулы, описанного в данном документе, для визуализации ткани, клеток или млекопитающего *in vitro* или *in vivo* или способ такой визуализации. В частности, настоящее изобретение относится к соединению формулы, описанному в данном документе, для применения в качестве контрастного средства для визуализации ткани, клеток или млекопитающего *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей соединение формулы, для применения в качестве контрастного средства для визуализации ткани, клеток или млекопитающего *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*.

Настоящее изобретение также относится к способу визуализации ткани, клеток или млекопитающего, включающему приведение выявляемого количества заявленного соединения или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата в контакт с тканью, клетками или млекопитающим и выявление меченого соединения, связанного с рецепторами mGlu2 и mGlu3.

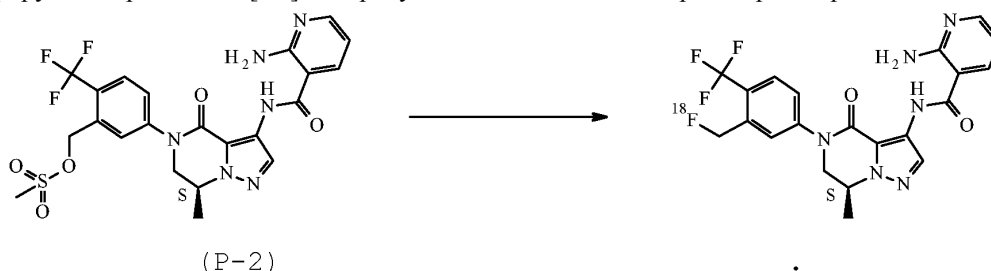
Дополнительно в качестве примера настоящего изобретения представлен способ визуализации ткани, клеток или млекопитающего, включающий приведение выявляемого количества заявленного соединения или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата в контакт с тканью, клетками или млекопитающим и выявление меченого соединения, связанного с рецепторами mGlu2 и mGlu3 с помощью системы визуализации с использованием позитронно-эмиссионной томографии. Настоящее изобретение дополнительно относится к способу получения заявленного соединения, включающему:

стадии (a-1) осуществления реакции соединения формулы (P-1) с ангидридом метансульфоновой кислоты в присутствии основания и инертного растворителя, например триметиламина или триэтиламина и дихлорметана, и (a-2) осуществления реакции соединения, полученного на стадии (a-1), с нуклеофильным радиоактивным фторирующим реагентом [^{18}F] F^- в присутствии основания в

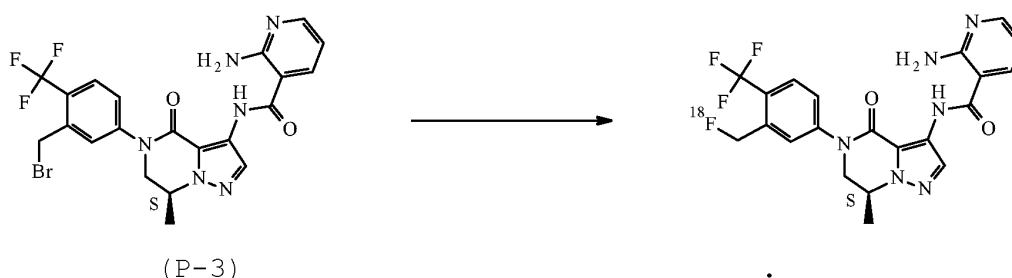
инертном растворителе



Настоящее изобретение дополнительно относится к способу получения заявленного соединения, включающему стадию осуществления реакции соединения формулы (P-2) с нуклеофильным радиоактивным фторирующим реагентом $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ в присутствии основания в инертном растворителе



Настоящее изобретение дополнительно относится к способу получения заявленного соединения, включающему стадию осуществления реакции соединения формулы (P-3) с нуклеофильным радиоактивным фторирующим реагентом $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ в присутствии основания в инертном растворителе



Подходящими нуклеофильными радиоактивными фторирующими реагентами на указанных выше стадиях являются, например, $\text{K}[^{18}\text{F}]/\text{Kryptofix 222}$ или соли тетраалкиламмония, содержащие в своем составе радиоактивный фторид $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$. Подходящими основаниями на указанных выше стадиях являются, например, K_2CO_3 или Cs_2CO_3 . Подходящими растворителями на указанных выше стадиях являются, например, DMSO, CH_3CN или DMF, необязательно с добавлением небольшого количества воды.

Описание графических материалов

На фиг. 1A показано биораспределение $[^{18}\text{F}]\text{-1}$ в головном мозге крыс SD.

На фиг. 1B показано биораспределение $[^{18}\text{F}]\text{-1}$ в периферических органах крыс SD.

На фиг. 2 показаны кривые зависимости активности от времени для поглощения $[^{18}\text{F}]\text{-1}$ при наличии и в отсутствие предварительной обработки 10 мг/кг соединения А (NAM-соединения, избирательно в отношении mGlu2/3 (в ~20 раз более избирательного в отношении mGlu2, чем в отношении mGlu3) по сравнению с другими mGluR), указанного на фигуре как NAM mGlu2/3, у крыс SD, где

- | | | |
|---|--|--|
| ◆ Предварительно обработанный варолиев мост | ◆ Варолиев мост | ✕ Лобная доля коры |
| ✕ Гиппокамп | ○ Полосатое тело | ◇ Предварительно обработанная лобная доля коры |
| □ Предварительно обработанный гиппокамп | △ Предварительно обработанное полосатое тело | |

На фиг. 3 показаны кривые зависимости активности от времени в ходе микро-PET для поглощения $[^{18}\text{F}]\text{-1}$ при наличии и в отсутствие предварительной i.v. обработки 2,5 мг/кг соединения А у макака-резуса; во всех участках головного мозга, за исключением варолиева моста, наблюдался значительный блокирующий эффект.

- | | | |
|--|---|---|
| ■ Лобная доля | ■ Гиппокамп | ✕ Мозжечок |
| ◆ Варолиев мост | ◆ Предварительно обработанная лобная доля | — Предварительно обработанный гиппокамп |
| ● Предварительно обработанный мозжечок | ◆ Предварительно обработанный варолиев мост | |

На фиг. 4 показаны SUV в участках головного мозга, деленные на исходное значение, которые подтверждают блокирующий эффект во всех участках головного мозга, за исключением варолиева моста, у макака-резуса.

◆ Головной мозг в целом

■ Лобная доля

▲ Мозжечок

✕ Гиппокамп

* Варолиев мост

На фиг. 5 показаны расчеты потенциала связывания с использованием варолиева моста в качестве эталона в SRTM-модели в течение первых 60 мин у макака-резуса; блокирующий эффект наблюдался во всех участках головного мозга при использовании варолиева моста в качестве эталона.

Подробное описание изобретения

Как уже упоминалось, заявленное соединение и композиции, содержащие заявленное соединения, можно применять для визуализации ткани, клеток или млекопитающего *in vitro* или *in vivo*. В частности, настоящее изобретение относится к способу визуализации или количественного определения рецепторов mGlu2 и mGlu3 в ткани, клетках или у млекопитающего *in vitro* или *in vivo*.

Клетки и ткани предпочтительно представляют собой клетки и ткани центральной нервной системы, в которых широко распространены рецепторы mGlu2 и mGlu3. Как уже упоминалось, рецепторы mGlu2 и mGlu3 широко распространены в ткани центральной нервной системы, более конкретно ткани центральной нервной системы, образующей головной мозг; более конкретно образующей кору больших полушарий, таламические участки, дополнительную обонятельную луковицу, гиппокамп, миндалевидное тело, хвостатое ядро и скорлупу, а также прилежащее ядро.

Если способ осуществляют *in vivo*, то заявленное соединение можно вводить внутривенно, например, путем инъекции с помощью шприца или посредством периферической внутривенной трубки, такой как короткий катетер.

Если млекопитающим является человек, то заявленное соединение или стерильный раствор, содержащий заявленное соединение, можно, в частности, вводить путем внутривенного введения в руку в любую различимую вену, в частности с тыльной стороны кисти руки или в срединную локтевую вену в локтевой области.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу визуализации ткани или клеток у млекопитающего, включающему внутривенное введение млекопитающему заявленного соединения, определенного в данном документе, или композиции, содержащей заявленное соединение, и визуализацию ткани или клеток с помощью системы визуализации с использованием позитронно-эмиссионной томографии.

Таким образом, в дополнительном конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу визуализации ткани или клеток у человека, включающему внутривенное введение человеку заявленного соединения, определенного в данном документе, или стерильного состава, содержащего заявленное соединение, и визуализацию ткани или клеток с помощью системы визуализации с использованием позитронно-эмиссионной томографии.

В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу визуализации или количественного определения рецепторов mGlu2 и mGlu3 у млекопитающего, включающему внутривенное введение млекопитающему заявленного соединения или композиции, содержащей заявленное соединение, и визуализацию с помощью системы визуализации с использованием позитронно-эмиссионной томографии.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению заявленного соединения для визуализации ткани, клетки или млекопитающего *in vitro* или *in vivo*, или настоящее изобретение относится к соединению формулы для применения в визуализации ткани, клетки или млекопитающего *in vitro* или *in vivo* с помощью позитронно-эмиссионной томографии.

Настоящее изобретение также относится к способу визуализации или количественного определения рецепторов mGlu2 и mGlu3 у млекопитающего, при этом способ включает предоставление млекопитающему выявляемого количества заявленного соединения и выявление заявленного соединения, связанного с рецепторами mGlu2 и mGlu3.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу оценивания нарушения, связанного с рецепторами mGlu2 и mGlu3, или предрасположенности к нему у субъекта, при этом способ включает предоставление выявляемого количества заявленного соединения или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, где заявленное соединение проходит через гематоэнцефалический барьер и связывается преимущественно с рецепторами mGlu2 и mGlu3 в ткани головного мозга, обеспечивая возможность распределения соединения в ткани головного мозга и визуализацию ткани головного мозга.

Соединение предоставляют субъекту в выявляемом количестве и после прохождения достаточного количества времени для того, чтобы соединение связалось с рецепторами mGlu2 и mGlu3, меченое соединение выявляют неинвазивным способом.

Определения

Подразумевается, что используемый в данном документе термин "композиция" охватывает продукт, содержащий определенные ингредиенты в определенных количествах, а также любой продукт, ко-

торый получают прямо или опосредованно из комбинаций определенных ингредиентов в определенных количествах.

Термин "выявляемое количество" относится к концентрации соединения, превышающей низший предел выявления устройства для визуализации, в частности сканирующего устройства для ПЕТ.

Абсолютную конфигурацию определяют согласно системе Кана-Ингольда-ПРЕЛОГА.

Подразумевается, что соли присоединения соединений согласно настоящему изобретению также охватываются объемом настоящего изобретения.

Приемлемыми солями соединений по настоящему изобретению являются те, в которых противоион является фармацевтически приемлемым. Однако соли кислот и оснований, которые не являются фармацевтически приемлемыми, также могут находить применение, например, при получении или очистке фармацевтически приемлемого соединения. Все соли, независимо от того, являются ли они фармацевтически приемлемыми или нет, включены в объем настоящего изобретения. Фармацевтически приемлемые соли определяют как включающие в себя терапевтически активные нетоксичные формы солей присоединения кислоты, которые могут быть образованы соединениями согласно настоящему изобретению. Указанные соли можно получить путем обработки соединений согласно настоящему изобретению в форме основания подходящими кислотами, например неорганическими кислотами, например галогеноводородной кислотой, в частности хлористоводородной кислотой, бромистоводородной кислотой, серной кислотой, азотной кислотой и фосфорной кислотой; органическими кислотами, например уксусной кислотой, гидроксидом уксусной кислоты, пропановой кислотой, молочной кислотой, пировиноградной кислотой, щавелевой кислотой, малоновой кислотой, янтарной кислотой, малеиновой кислотой, фумаровой кислотой, яблочной кислотой, винной кислотой, лимонной кислотой, метансульфоновой кислотой, этансульфоновой кислотой, бензолсульфоновой кислотой, п-толуолсульфоновой кислотой, цикламовой кислотой, салициловой кислотой, п-аминосалициловой кислотой и палмовой кислотой.

И наоборот, упомянутые формы солей можно превратить в форму свободного основания путем обработки соответствующим основанием.

В дополнение некоторые из соединений по настоящему изобретению могут образовывать сольваты с водой (т.е. гидраты) или обычными органическими растворителями, и подразумевается, что такие сольваты также охватываются объемом настоящего изобретения.

Термин "субъект", используемый в данном документе, относится к животному, предпочтительно к млекопитающему, наиболее предпочтительно к человеку, которое является или являлось объектом лечения, наблюдения или эксперимента. Если не указано иное, "субъект" включает в себя как здоровых животных, так и животных, пораженных различными заболеваниями или нарушениями.

Термин "млекопитающее" относится, в частности, к людям, мышам, собакам и крысам.

Термин "клетка" относится к клетке, экспрессирующей или содержащей в своем составе рецепторы mGlu2 и/или mGlu3.

Названия соединений согласно настоящему изобретению были образованы согласно правилам номенклатуры, принятым Химической реферативной службой (CAS), с использованием программного обеспечения Advanced Chemical Development, Inc. (продукт ACD/Name, версия 10.01; текущая сборка 15494, 1 декабря 2006 г.).

Пути применения

Соединения согласно настоящему изобретению находят различные пути применения при визуализации тканей, клеток или млекопитающего как *in vitro*, так и *in vivo*. Таким образом, например, их можно применять для картирования дифференциального распределения mGluR2/3 у субъектов разного возраста и пола. Кроме того, они позволяют специалисту исследовать дифференциальное распределение mGluR2/3 у субъектов, пораженных различными заболеваниями или нарушениями. Таким образом, аномальное распределение может быть полезным в диагностике, выявлении случаев заболевания, стратификации групп субъектов и при отслеживании прогрессирования заболевания у отдельных субъектов. Радиоактивные лиганды могут дополнительно находить полезность в определении занятости активных центров mGluR2/3 другими лигандами. Поскольку радиоактивный лиганд вводят в следовых количествах, т.е. в выявляемых количествах, например для ПЕТ-визуализации, то терапевтический эффект не может объясняться введением радиоактивных лигандов согласно настоящему изобретению.

Экспериментальная часть

Получение промежуточных соединений, [^{19}F]-меченного соединения 1 и соединений-предшественников.

Общая информация

Как используется в данном документе, термин "водн." означает водный, "DCM" означает дихлорметан, "DIPE" означает диизопропиловый эфир, "DMF" означает N,N-диметилформамид, "DMSO" означает диметилсульфоксид, "DSC" означает дифференциальную сканирующую калориметрию, "Et₃N/TEA" означает триэтиламин, "EtOH" означает этанол, "EtOAc" означает этилацетат, "экв." означает эквивалент(ы), "ч" означает часы, "HPLC" означает высокоэффективную жидкостную хроматографию, "LCMS" означает жидкостную хроматографию с масс-спектрометрией, "[M+H]⁺" означает массу протонированной молекулы соединения в форме свободного основания, "[M-H]" означает массу депротонированной

молекулы соединения в форме свободного основания, "мин" означает минуты, "т. пл." означает точку плавления, "mw/MW" означает микроволновой, "колич." означает количественный, "р.с." означает реакционную смесь, "к.т./КТ" означает комнатную температуру, "R_t" означает время удерживания (в минутах), "насыщ." означает насыщенный, "раств." означает раствор, "THF" означает тетрагидрофуран, "UV" означает ультрафиолетовый.

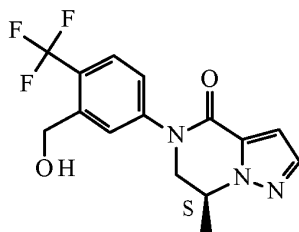
Реакции под действием микроволнового излучения осуществляли в одномодовом реакторе: микроволновом реакторе Biotage Initiator™ Sixty (Biotage).

Тонкослойную хроматографию (TLC) проводили на пластинах со слоем диоксида кремния 60 F254 (Merck) с применением растворителей, степени чистоты для анализа. Хроматографию на открытых колонках осуществляли на диоксиде кремния с размером частиц 230-400 меш и размером пор 60 Å (Merck) в соответствии со стандартными методиками. Автоматизированную колоночную флэш-хроматографию осуществляли с применением готовых к подключению картриджей от Merck на диоксиде кремния с частицами неправильной формы с размером частиц, составляющим 15-40 мкм (одноразовые колонки для нормально-фазовой флэш-хроматографии), в системе SPOT или LAFLASH от Armen Instrument.

Некоторые способы получения соединений по настоящему изобретению проиллюстрированы в следующих примерах, которые предназначены для иллюстрации, а не ограничения объема настоящего изобретения. Если не указано иное, то все исходные материалы получали от коммерческих поставщиков и применяли без дополнительной очистки.

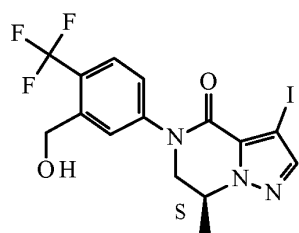
Получение промежуточных соединений

Промежуточное соединение 1 (I-1)



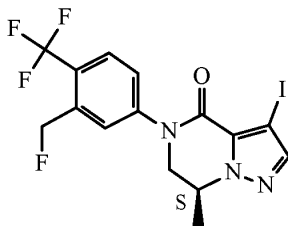
К перемешиваемой суспензии (7S)-6,7-дигидро-7-метилпиразоло[1,5-а]пиразин-4(5H)она ([1639901-79-3], WO 2014195311, 50,00 г, 330,76 ммоль), 5-бром-2-(трифторметил)бензилового спирта (84,35 г, 330,76 ммоль), K₂CO₃ (91,43 г, 661,52 ммоль) и N,N'-диметилендиамин (16,73 мл, 132,30 ммоль) в толуоле (439 мл) в атмосфере азота добавляли йодид меди (25,20 г, 132,30 ммоль). Смесь перемешивали при 105°C в течение 18 ч. Затем смесь разбавляли водой и NH₃ (32%) и экстрагировали с помощью DCM. Органический слой отделяли, высушивали (Na₂SO₄), фильтровали и растворители выпаривали in vacuo. Неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на открытых колонках (диоксид кремния; EtOAc/гептан от 30/70 до 75/25). Необходимые фракции собирали и концентрировали in vacuo. Продукт осаждали в смеси EtOAc/гептан. В результате фильтрации и высушивания получали I-1 (72,7 г, 68%) в виде белого твердого вещества.

Промежуточное соединение 2 (I-2)

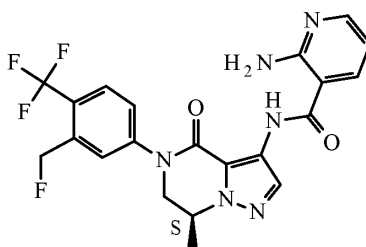


К раствору I-1 (72,60 г, 223,19 ммоль) и нитрата аммония-церия (IV) (85,65 г, 156,23 ммоль) в CH₃CN (750 мл) добавляли йод (39,65 г, 156,23 ммоль) и смесь перемешивали при 75°C в течение 45 мин. Затем смесь охлаждали до к.т., разбавляли с помощью EtOAc и промывали разбавленным Na₂S₂O₃. Органический слой отделяли, высушивали (Na₂SO₄), фильтровали и растворители выпаривали in vacuo. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (диоксид кремния; EtOAc/гептан от 20/80 до 40/60). Необходимые фракции собирали и выпаривали in vacuo с получением I-2 (85,50 г, 85%) в виде белой пены.

Промежуточное соединение 3 (I-3)

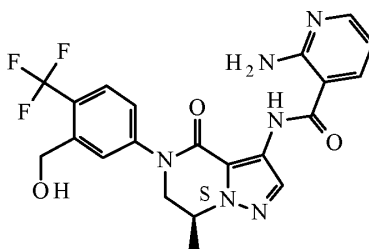


К перемешиваемому раствору промежуточного соединения I-2 (40,00 г, 88,66 ммоль) в DCM (400 мл) при 0°C и в атмосфере азота добавляли трифторид бис(2-метоксиэтил)аминосеры (55,57 мл, 150,71 ммоль). Смеси давали нагреться до к.т. и перемешивали при к.т. в течение 1 ч. Затем ее обрабатывали насыщ. водн. раств. NaHCO₃ при 0°C, а затем при к.т. и экстрагировали с помощью DCM. Органический слой отделяли, высушивали (Na₂SO₄), фильтровали и концентрировали in vacuo. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (диоксид кремния; элюент DCM). Необходимые фракции собирали и концентрировали in vacuo с получением промежуточного соединения I-3 (25,00 г, 62%) в виде белого твердого вещества.

Получение соединения [¹⁹F]-1

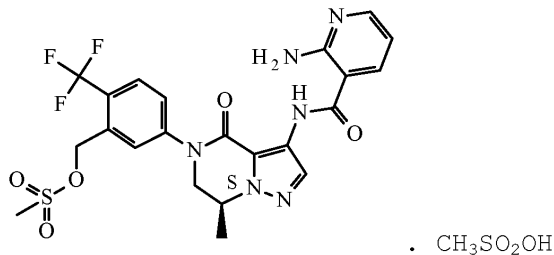
К дезоксигенированной перемешиваемой суспензии I-3 (24,50 г, 54,06 ммоль), 2-аминопиридин-3-карбоксамид (11,12 г, 81,09 ммоль) и K₃PO₄ (34,43 г, 162,19 ммоль) в 1,4-диоксане (600 мл) в атмосфере азота добавляли йодид меди (4,12 г, 21,63 ммоль). Затем добавляли (+/-)-транс-1,2-циклогександиамин (2,60 мл) и смесь перемешивали в течение 16 ч при 100°C. После охлаждения до КТ р.с. фильтровали и промывали с помощью EtOAc. Фильтрат промывали разбавленным водн. раствором NH₃, отделяли, высушивали (Na₂SO₄), фильтровали и растворители выпаривали in vacuo. Неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на открытых колонках (диоксид кремния; EtOAc в гептане от 50/50 до 100/0). Необходимые фракции собирали и концентрировали in vacuo. Фракции с примесями дополнительно очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (диоксид кремния; MeOH/DCM от 0/100 до 2/98). Все необходимые фракции из обеих колонок объединяли и выпаривали in vacuo. Этот продукт кристаллизовали в изопропанол (20 объемов). В результате фильтрации и высушивания in vacuo при 50°C получали [¹⁹F]-1 (14,48 г, 58%) в виде грязно-белого твердого вещества.

Получение соединения-предшественника 1 (P-1)



К дезоксигенированной перемешиваемой суспензии I-2 (30 г, 66,49 ммоль), 2-аминопиридин-3-карбоксамид (13,68 г, 99,74 ммоль) и K₃PO₄ (42,34 г, 199,47 ммоль) в 1,4-диоксане (600 мл) в атмосфере азота добавляли йодид меди (5,07 г, 26,60 ммоль). Затем добавляли (+/-)-транс-1,2-циклогександиамин (3,20 мл, 26,60 ммоль) и смесь перемешивали в течение 18 ч при 100°C. Смесь фильтровали и прополаскивали с помощью DCM. Раствор дополнительно разбавляли с помощью DCM и промывали разбавленным раствором NH₃. Органическую фазу высушивали (Na₂SO₄), фильтровали и выпаривали in vacuo. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (диоксид кремния; EtOAc/гептан от 50/50 до 80/20). Необходимые фракции собирали и выпаривали in vacuo с получением продукта, который дополнительно очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (диоксид кремния; 7 н. NH₃ в MeOH/DCM от 0/100 до 1,5/98,5). Необходимые фракции собирали и выпаривали in vacuo с получением в результате продукта, который осаждали в DIPE. Осадок фильтровали и высушивали in vacuo при 50°C с получением P-1 (20,51 г, 67%) в виде белого твердого вещества.

Получение соединения-предшественника 2 (P-2)

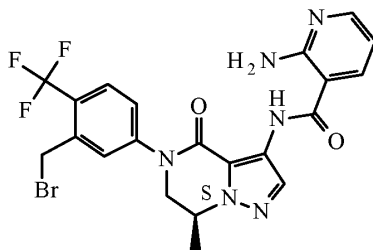


К смеси P-1 (15,00 г, 32,58 ммоль) и DCM (400 мл) добавляли TEA (7,25 мл, 52,13 ммоль). Смесь охлаждали до 0°C и затем добавляли ангидрид метансульфоновой кислоты (8,51 г, 48,87 ммоль) в DCM (50 мл). Смесь перемешивали при 0°C в течение 3 ч.

Затем добавляли метансульфоновую кислоту (2,54 мл) в воде (300 мл) и перемешивали в течение 30 мин. Затем DCM частично выпаривали *in vacuo*. Затем добавляли NaHCO₃ (7,5 г) и смесь экстрагировали с помощью EtOAc. Водный слой удаляли и органический слой промывали насыщ. NaHCO₃, затем высушивали (Na₂SO₄) и фильтровали. Затем добавляли метансульфоновую кислоту (2,54 мл, 3 9,10 ммоль) и смесь выпаривали досуха. Остаток обрабатывали диэтиловым эфиром и осажденный продукт фильтровали.

Полученное в результате твердое вещество кристаллизовали в CH₃CN (15 объемов). Соединение фильтровали и высушивали в течение ночи *in vacuo* при 50°C с получением в результате P-2 (12,9 г, 62%) в виде светло-желтого твердого вещества.

Получение соединения-предшественника 3 (P-3)



К перемешиваемому раствору P-1 (61,8 мг, 0,13 ммоль) в DCM (2,4 мл) в атмосфере азота добавляли трибромид фосфора (1M в DCM, 0,40 мл, 0,40 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 1 ч. Затем смесь перемешивали при 80°C в течение 5 мин под действием микроволнового излучения. Затем добавляли дополнительное количество трибромида фосфора (1M в DCM, 0,08 мл, 0,08 ммоль) и смесь перемешивали при 80°C в течение 5 мин под действием микроволнового излучения. Смесь затем разбавляли DCM, охлаждали до 0°C и обрабатывали насыщ. NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали (Na₂SO₄), фильтровали, разбавляли гептаном и выпаривали *in vacuo* с получением P-3 (39 мг, 56%) в виде белого твердого вещества.

Получение соединения [¹⁸F]-1

Общая информация

Химические вещества получали от Sigma-Aldrich (Сент-Луис, США) и применяли без дополнительной очистки. [¹⁸F]F⁻ получали на циклотроне IBA Cyclone 18/9 (Лувен-ла-Нев, Бельгия).

Препаративную HPLC осуществляли на колонке Xbridge C18 (4,6×250 мм, 5 мкм; Waters, Милфорд, США) с применением EtOH/0,01 М фосфатного буфера в воде с pH 7,4 (39/61 об./об.) при скорости потока 1 мл·мин⁻¹ и длине волны 254 нм (способ А).

Идентичность радиоизотопных индикаторов подтверждали с помощью тех же способов аналитической HPLC, что описаны выше, после совместного введения с их нерадиоактивным аналогом.

Фильтры Millex GV получали от Millipore (Амстердам, Нидерланды). Радиоактивность подсчитывали с помощью автоматического счетчика гамма-излучения Wizard 1480 (Perkin Elmer, Уолтем, США).

Радиохимический синтез соединения 1 ([¹⁸F]-1)Синтез [¹⁸F]-1 с использованием спиртового соединения-предшественника (P-1)

Для синтеза [¹⁸F]-1 согласно данной процедуре соответствующее спиртовое соединение-предшественника мезилировали непосредственно перед радиохимическим синтезом согласно следующему протоколу:

~7,5 мг P-1 (1 экв.) растворяли в DCM (2 мл), затем добавляли триметиламин (2,5 мкл, 1,1 экв.) с последующим добавлением ангидрида метансульфоновой кислоты (3,5 мг, 1,1 экв.) и смесь инкубировали в течение 60 мин при к.т. Затем р.с. промывали водой (2×) и высушивали над MgSO₄, фильтровали и выпаривали досуха при 30°C *in vacuo*. После этого продукт подвергали азеотропной сушке с применением CH₃CN (3×2 мл) также при 30°C *in vacuo*. После выпаривания последней порции CH₃CN мезилированное соединение-предшественник было готовым к применению. Для проверки чистоты соответствующего

шего предшественника применяли TLC (элюировали с помощью 95% DCM и 5% MeOH на пластинах с диоксидом кремния).

$[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ собирали путем продувания целевого содержимого, облученного протонами (98% $^{18}\text{O}-\text{H}_2\text{O}$), через картридж QMA (Waters, Милфорд, США). Затем содержимое картриджа QMA элюировали с применением смеси $\text{CH}_3\text{CN}/\text{вода}$ (700 мкл, 95/5 об./об.) содержащей Kryptofix 222 (26 мг) и K_2CO_3 (2,5 мг), в реакционный флакон. Раствор высушивали под медленным потоком гелия при 110°C в течение 6 мин с последующим двукратным добавлением CH_3CN (1 мл) и высушиванием в атмосфере гелия при 110°C в течение 5 мин каждый раз. Что касается стандартных условий: добавляли мезилированное соединение-предшественника (2 мг, 3,7 мкмоль) в сухом DMSO (0,5 мл) и осуществляли реакцию в течение 10 мин при 120°C . Р.с. разбавляли и $[^{18}\text{F}]\text{-1}$ затем очищали с помощью способа А HPLC. Собранную фракцию затем пропускали через стерильный фильтр Millex-GV и дополнительно разбавляли солевым раствором до концентрации EtOH 10%.

Синтез $[^{18}\text{F}]\text{-1}$ с использованием мезилированной соли (P-2. $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{OH}$) или с использованием бромсодержащего соединения-предшественника (P-3)

$[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ собирали путем продувания облученного целевого содержимого через картридж QMA (Waters, Милфорд, США). Затем содержимое картриджа QMA элюировали с применением смеси $\text{CH}_3\text{CN}/\text{вода}$ (700 мкл, 95/5 об./об.), содержащей Kryptofix 222 (26 мг) и K_2CO_3 (2,5 мг), в реакционный флакон. Раствор высушивали под медленным потоком гелия при 110°C в течение 6 мин с последующим двукратным добавлением CH_3CN (1 мл) и высушиванием в атмосфере гелия при 110°C в течение 5 мин каждый раз. Что касается стандартных условий, добавляли мезилированное или бромсодержащее соединение-предшественника (2 мг) в сухом DMSO (0,5 мл) и осуществляли реакцию в течение 10 мин при 120°C . Р.с. разбавляли и $[^{18}\text{F}]\text{-1}$ затем очищали на колонке Xbridge C18 (4,6×250 мм, 5 мкм; Waters, Милфорд, США) с применением EtOH/0,01 М фосфатного буфера в воде с pH 7,4 (39/61 об./об.) при скорости потока 1 мл·мин⁻¹ и длине волны 254 нм. $[^{18}\text{F}]\text{-1}$ затем собирали (время удерживания ~26 мин), собранную фракцию затем пропускали через стерильный фильтр Millex-GV и дополнительно разбавляли солевым раствором так, чтобы продукт содержал 10% EtOH. Выход продукта радиохимического синтеза составлял 35-60%

$[^{18}\text{F}]\text{-1}$ (N=4) (с поправкой на распад) при получении из мезилированного соединения-предшественника и ~35% (N=2) (с поправкой на распад) при получении из бромсодержащего соединения-предшественника.

Аналитическая часть

Точки плавления

Значения представляют собой пиковые значения, и их получают с экспериментальными погрешностями, которые обычно связаны с данным аналитическим способом.

DSC823e (A): для ряда соединений точки плавления определяли с помощью прибора DSC823e (Mettler-Toledo). Точки плавления измеряли при градиенте температуры $10^\circ\text{C}/\text{мин}$. Максимальная температура составляла 300°C . Значения представляют собой пиковые значения.

Прибор Mettler Toledo Mettler FP 81HT/FP90 (B): для ряда соединений точки плавления определяли в открытых капиллярных трубках на приборе Mettler FP 81HT/FP90. Точки плавления измеряли при градиенте температуры 1, 3, 5 или $10^\circ\text{C}/\text{мин}$.

Максимальная температура составляла 300°C . Точку плавления считывали с цифрового дисплея.

LCMS

Общая процедура

Измерения в ходе проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) осуществляли с помощью насоса для LC, детектора на диодной матрице (DAD) или UV-детектора и колонки, как указано в соответствующих способах. При необходимости включали дополнительные детекторы (см. приведенную ниже таблицу способов).

Поток из колонки направляли в масс-спектрометр (МС), который был оснащен источником ионизации при атмосферном давлении. В компетенции специалиста в данной области находится установка настраиваемых параметров (например, диапазона сканирования, минимального времени измерения и т.п.) с целью получения ионов, обеспечивающих определение номинального моновалентного молекулярного веса (MW) соединения и/или точного моновалентного молекулярного веса соединения. Сбор данных осуществляли с помощью соответствующего программного обеспечения.

Соединения описывали по их значениям экспериментального времени удерживания (R_t) и ионам. Если не указано иное, то в таблице данных указываемый молекулярный ион соответствует $[\text{M}+\text{H}]^+$ (протонированная молекула) и/или $[\text{M}-\text{H}]^-$ (депротонированная молекула). В случае если соединение не было способно к прямой ионизации, указан тип аддукта (т.е. $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$, $[\text{M}+\text{CH}_3\text{COO}]^-$ и т.п.). Для молекул со сложными изотопными распределениями (Br, Cl и т.д.) указываемое значение является значением, полученным для наименьшей массы изотопа. Все результаты получали с экспериментальными погрешностями, которые обычно связаны с применяемым способом.

В дальнейшем в данном документе "SQD" обозначает одноквадрупольный детектор, "MSD" обо-

значает масс-селективный детектор, "QTOF" обозначает квадрупольный времяпролетный, "к.т" обозначает комнатную температуру, "БЕН" обозначает мостиковый гибрид этилсилоксана/диоксида кремния, "CSH" обозначает гибрид с заряженной поверхностью, "UPLC" обозначает сверхэффективную жидкостную хроматографию, "DAD" обозначает детектор на диодной матрице.

Таблица 1. Способы LC-MS (скорость потока выражена в мл/мин; температура колонки (Т) в °C; время анализа в мин)

Способ	Прибор	Колонка	Подвижная фаза	Градиент	Скорость потока -----Т колонки	Время анализа
1	Waters: Acquity® UPLC® - DAD/SQD	Waters: CSH™ C18 (1,7 мкм, 2,1×50 мм)	А: 95% 6,5 мМ CH ₃ COONH ₄ +5 % CH ₃ CN, В: CH ₃ CN	От 95% А до 40% А за 1,2 мин, до 5% А за 0,6 мин, удерживание в течение 0,2 мин	1 ----- 50	5
2	Waters: Acquity® UPLC®, I- класс - DAD/Xevo G2-S QTOF	Waters: БЕН C18 (1,7 мкм, 2,1×50 мм)	А: 95% 6,5 мМ CH ₃ COONH ₄ +5 % CH ₃ CN, В: CH ₃ CN	От 95% А до 5% А за 4,6 мин, удерживание в течение 0,4 мин	1 ----- 50	5

(*) Различные настраиваемые параметры MS (из-за низкой чувствительности или режима ионизации)

Таблица 2. Аналитические данные - точка плавления (т.пл.) и LCMS; [M+H]⁺ означает массу протонированной молекулы соединения в форме свободного основания, [M-H]⁻ означает массу депротонированной молекулы соединения в форме свободного основания или указанный тип аддукта [M+CH₃COO]⁻. R_t означает время удерживания (в мин) Для некоторых соединений определяли точную массу

№ соед.	Т. пл. (°C)	[M+H] ⁺	R _t	Способ LCMS
[¹⁹ F]- 1	150,62 (А) *	463	2,22	2
P-1	н. о.	461	1,76	2
P-3	н. о.	523	1,33	1
P-2	н. о.	539	1,98	2

н.о. означает не определено

*выявлена другая второстепенная кристаллическая форма, указано только наивысшее значение

Углы оптического вращения

Углы оптического вращения измеряли на поляриметре Perkin-Elmer 341 с натриевой лампой и обозначали следующим образом: [α]^Т (λ, свг/100 мл, растворитель, Тв°C).

[α]_λ^Т=(100α)/(l×с): здесь l означает длину пробега в дм, а с означает концентрацию в г/100 мл для образца при температуре Т (°C) и длине волны λ (в нм). Если используемая длина волны света составляет 589 нм (D-линия натрия), то вместо нее может применяться символ D. Всегда должен приводиться знак направления вращения (+ или -). При применении данного уравнения концентрация и растворитель всегда приводятся в круглых скобках после угла вращения. Угол вращения указывают в градусах, а единицы концентрации не приводят (принято, что они представлены в г/100 мл).

Таблица 3. Данные об оптическом вращении

№ соед.	α_D (°)	Длина волны (нм)	Концентрация, % вес/об.	Растворитель	Температура (°C)
[^{19}F]-1	+31,3	589	0,51	DMF	20
P-1	+29,2	589	0,63	DMF	20

ЯМР

Для ряда соединений спектры ^1H -ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker DPX-400, работающем при 400 МГц, или на спектрометре Bruker Avance I, работающем при 500 МГц, с применением ХЛРОРОФОРМА-d (дейтерированного хлороформа, CDCl_3) или DMSO-d_6 (дейтерированного DMSO, диметилсульфоксида-d₆) в качестве растворителя. Химические сдвиги (δ) указаны в частях на миллион (ppm) относительно тетраметилсилана (TMS), который применяли в качестве внутреннего стандарта.

Таблица 4. Результаты определения спектров ^1H -ЯМР

№ соед.	Результат определения спектра ^1H -ЯМР
P-1	^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ ppm 1,71 (d, $J=6,5$ Гц, 3 H) 2,90 (br s, 1 H) 4,01 (dd, $J=12,6$, 8,2 Гц, 1 H) 4,20 (dd, $J=12,7$, 4,2 Гц, 1 H) 4,64-4,74 (m, 1 H) 4,96 (s, 2 H) 6,56 (dd, $J=7,9$, 4,9 Гц, 1 H) 6,58 (br s, 2 H) 7,39 (dd, $J=8,3$, 1,4 Гц, 1 H) 7,72 (d, $J=8,6$ Гц, 1 H) 7,76 (dd, $J=7,9$, 1,6 Гц, 1 H) 7,79-7,82 (m, 1 H) 8,15 (dd, $J=4,9$, 1,6 Гц, 1 H) 8,38 (s, 1 H) 9,71 (s, 1 H)
P-2	^1H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6) δ ppm 1,58 (d, $J=6,4$ Гц, 3 H) 2,37 (s, 3 H) 3,31 (s, 3 H) 4,16 (dd, $J=12,7$, 8,4 Гц, 1 H) 4,38 (dd, $J=12,7$, 4,0 Гц, 1 H) 4,77-4,85 (m, 1 H) 5,41 (s, 2 H) 7,01 (dd, $J=7,7$, 6,2 Гц, 1 H) 7,73 (dd, $J=8,5$, 1,3 Гц, 1 H) 7,87 (d, $J=1,7$ Гц, 1 H) 7,93 (d, $J=8,7$ Гц, 1 H) 8,20 (dd, $J=6,1$, 1,4 Гц, 1 H) 8,31 (br s, 4 H) 8,34 (dd, $J=7,7$, 1,6 Гц, 1 H) 10,15 (s, 1 H)
P-3	^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ ppm 1,74 (d, $J=6,5$ Гц, 3 H) 4,04 (dd, $J=12,6$, 8,2 Гц, 1 H) 4,22 (dd, $J=12,6$, 4,3 Гц, 1 H) 4,67 (s, 2 H) 4,68-4,78 (m, 1 H) 6,57 (br s, 2 H) 6,61 (dd, $J=7,9$, 4,9 Гц, 1 H) 7,45 (dd, $J=8,3$, 1,2 Гц, 1 H) 7,64 (d, $J=1,6$ Гц, 1 H) 7,76 (d, $J=8,6$ Гц, 1 H) 7,79 (dd, $J=7,9$, 1,6 Гц, 1 H) 8,20 (dd, $J=4,6$, 1,6 Гц, 1 H) 8,42 (s, 1 H) 9,70 (s, 1 H)
[^{19}F]-1	^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ ppm 1,72 (d, $J=6,4$ Гц, 3 H) 4,03 (dd, $J=12,4$, 8,1 Гц, 1 H) 4,22 (dd, $J=12,4$, 4,3 Гц, 1 H) 4,64-4,76 (m, 1 H) 5,66 (d, $J=46,5$ Гц, 2 H) 6,55-6,62 (m, 3 H) 7,49 (dd, $J=8,4$, 0,9 Гц, 1 H) 7,68 (s, 1 H) 7,77 (d, $J=7,8$ Гц, 1 H) 7,78 (d, $J=7,8$ Гц, 1 H) 8,18 (dd, $J=4,9$, 1,7 Гц, 1 H) 8,41 (s, 1 H) 9,70 (s, 1 H).

Анализ связывания

Для связывания [^3H]-меченного соединения А (NAM-соединения, избирательного в отношении mGlu2/3 (в ~20 раз более избирательного в отношении mGlu2, чем в отношении mGlu3) по сравнению с другими mGluR) применяли мембраны клеток НЕК293 человека, экспрессирующих mGlu2 и mGlu3, а также мембраны клеток коры головного мозга крыс. После размораживания мембраны гомогенизира-

ли с помощью гомогенизатора Ultra Turrax и суспендировали в ледяном буфере для связывания, содержащем 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂.

Исследования вытеснения выполняли с применением 6 нМ радиоактивного лиганда, за исключением мембран клеток человека, экспрессирующих mGlu3, где применяли 25 нМ. Анализируемые смеси инкубировали в течение 60 мин при КТ в объеме 0,5 мл, содержащем соответственно 7,5 мг, 75-100 мг или 75 мкг мембранного белка mGlu2 человека, mGlu3 человека или коры головного мозга крысы. Неспецифическое связывание оценивали в присутствии 10 mM соединения В (НАМ с IC₅₀ ~10 нМ в отношении hmGlu2 и IC₅₀ ~200 нМ в отношении hmGlu3). Фильтрацию осуществляли с помощью фильтровальных листов Whatman GF/C, предварительно пропитанных 0,1% PEI, и коллектора Brandel для 96 образцов.

Фильтры из фильтровальных листов набирали во флаконы. После добавления сцинтилляционной жидкости радиоактивность на фильтрах подсчитывали в жидкостном сцинтилляционном анализаторе от Perkin Elmer.

Данные о конкурентном связывании радиоактивных лигандов рассчитывали в виде процентной доли от величины общего связывания, измеренной в отсутствие тестируемого соединения. Кривые ингибирования, отображающие процентную долю от величины общего связывания в зависимости от логарифма концентрации тестируемого соединения, строили с помощью программного обеспечения Lexis. Сигмоидные кривые ингибирования анализировали с помощью нелинейного регрессионного анализа.

Таблица 5. Данные о связывании для соединения 1

	pIC ₅₀	Кривая эффекта
mGlu2, HEK293	8,54	85
mGlu3, HEK293	8,3	96
mGlu2-3, кора головного мозга крыс	8,7	103

Исследования биораспределения - крысы линии Sprague-Dawley

PET-визуализацию животных осуществляли на томографе с детектором на основе оксифторосиликата лютеция (MicroPET FOCUS-220; Siemens Medical Solutions USA, Ноксвилл, Теннесси), который имел трансаксиальное пространственное разрешение 1,35 мм (полная ширина на уровне половины максимума). Данные собирали в виде матрицы размером 128×128×95 с шириной пикселя 0,475 мм и толщиной среза 0,796 мм. В ходе PET-визуализации крыс выдерживали под газовой анестезией (2,5% изофлурана в кислороде при скорости потока 1 л/мин) и их температуру тела поддерживали на уровне от 36,5 до 37°C с помощью подушки-грелки. Данные PET анализировали с помощью программного обеспечения Pmod версии 3.2 (Pmod, Цюрих, Швейцария).

Крыс Sprague-Dawley, полученных от Harlan (Нидерланды), содержали в группах по четыре-шесть особей на клетку до обработки. Их выдерживали при постоянной температуре 21°C и цикле чередования 12 ч света и темноты, в котором свет включали в 8:00 утра. Животные имели неограниченный доступ к пище (рацион для грызунов Teklad Global с содержанием белка 16%, Harlan, Мэдисон, Висконсин, США) и воде. Все эксперименты на животных осуществляли в соответствии с бельгийским законодательством о проведении экспериментов над животными и после одобрения местным комитетом по контролю этических норм обращения с животными.

Общий способ

Биораспределение ex vivo

Биораспределение [¹⁸F]-1 определяли в моменты времени 2, 10, 30 и 60 мин после инъекции крысам Sprague-Dawley (n=3 на каждый момент времени). Крысам внутривенно инъецировали 0,7-1,1 МБк в хвостовую вену и их подвергали эвтаназии в моменты времени, указанные выше, под анестезией изофлураном. Все ткани иссекали, взвешивали и в них подсчитывали радиоактивность с помощью счетчика гамма-излучения.

Исследование биораспределения [¹⁸F]-1 демонстрировало высокое первоначальное поглощение в печени, почках, поджелудочной железе и сердце с последующим быстрым вымыванием. Поглощение в крови было низким с медленным вымыванием. Поглощение в костях незначительно возрастало с течением времени, при этом за низким поглощением в мышцах, достигавшим пика через 10 мин, следовало медленное вымывание.

Поглощение [¹⁸F]-1 в головном мозге было высоким, при этом наиболее высокое поглощение наблюдалось в коре больших полушарий, а наиболее низкое поглощение - в варолиевом мосту.

Все области головного мозга, за исключением варолиева моста, демонстрировали наиболее высокое поглощение примерно через 10 мин с последующим быстрым вымыванием, тогда как в варолиевом мосту пик достигался через 2 мин с последующим быстрым вымыванием.

Таблица 6. Поглощение [^{18}F]-1 в SUV $\pm$ SD

Орган	Среднее значение SD		Среднее значение SD		Среднее значение SD		Среднее значение SD	
	2 мин		10 мин		30 мин		60 мин	
Почки	6,59	0,51	2,76	0,15	2,24	0,56	1,87	0,06
Печень	8,81	0,34	5,70	0,17	3,90	0,71	2,42	0,05
Селезенка	3,71	0,37	1,64	0,15	1,13	0,27	0,87	0,08
Поджелудочная железа	6,47	1,02	3,07	0,29	2,84	0,55	2,75	0,04
Легкие	4,70	1,23	2,27	0,09	2,01	0,50	1,77	0,14
Сердце	4,73	0,36	2,16	0,07	1,49	0,39	1,14	0,34
Полосатое тело	3,21	0,10	3,56	0,61	3,03	0,74	1,14	0,28
Гиппокамп	2,49	0,17	2,83	0,10	1,94	0,52	0,80	0,13
Варолиев мост	2,65	0,08	2,13	0,13	1,29	0,35	0,56	0,03
Кора головного мозга	5,42	0,58	5,98	0,25	3,87	1,35	1,36	0,44
Остальная часть больших полушарий	3,24	0,20	3,74	0,45	2,45	0,92	0,91	0,17
Большие полушария в целом	3,11	0,11	3,43	0,23	2,31	0,77	0,87	0,15
Мозжечок	3,42	0,14	3,33	0,33	1,90	0,57	0,72	0,16
Кровь	0,72	0,08	0,50	0,02	0,39	0,08	0,28	0,02
Большие полушария + мозжечок	3,19	0,08	3,45	0,25	2,28	0,74	0,85	0,15
Кости	0,61	0,07	0,52	0,02	0,73	0,44	0,67	0,11
Мышцы	0,57	0,11	1,07	0,12	0,87	0,23	0,65	0,05

РЕТ-сканирование

Исследование [^{18}F]-1 с использованием микро-РЕТ демонстрировало высокое поглощение во всех участках головного мозга, в особенности в лобной доле коры и гиппокампе, тогда как варолиев мост демонстрировал более низкое поглощение. Пиковое поглощение в лобной доле коры в ходе сканирования на исходном уровне наблюдалось примерно через 15 мин после инъекции индикатора. После предварительной обработки поглощение в различных областях головного мозга снижалось и находилось на том же уровне, что и в варолиевом мосту, при этом поглощение в варолиевом мосту, однако, также снижалось.

На фиг. 2 показаны кривые зависимости активности от времени для поглощения [^{18}F]-1 при наличии и в отсутствие предварительной обработки 10 мг/кг соединения А (NAM-соединения, избирательно-го в отношении mGlu2/3 (в ~20 раз более избирательного в отношении mGlu2, чем в отношении mGlu3) по сравнению с другими mGluR) у крыс SD.

Обсуждение

Анализ поглощения в периферических органах в рамках исследования биораспределения ex vivo демонстрировал наиболее высокое поглощение в печени, а также высокое поглощение в почках с после-

дующим выведением с мочой. Поглощение в костях вначале было низким, однако с течением времени незначительно возрастало, что наталкивало на мысль о некотором дефторировании.

Из исследования биораспределения *ex vivo* видно высокое поглощение [^{18}F]-1 в головном мозге и его быстрое вымывание из различных областей головного мозга. Варолиев мост считается эталонным участком, в котором отсутствует экспрессия mGluR2 или mGluR3, тогда как во всех других участках присутствуют как mGluR2, так и mGluR3, при этом наиболее высокий уровень экспрессии наблюдается в коре больших полушарий (Farinha A, et al., BJPharmacol, 2015, 172, 2383-2396). [^{18}F]-1 демонстрировал наиболее высокое поглощение в коре при низком поглощении в варолиевом мосту в сочетании с более быстрым вымыванием из варолиева моста по сравнению с другими участками, что позволяет предположить хорошую специфичность в отношении mGluR2/3, поскольку поглощение в головном мозге отражает описанную картину распределения mGluR2/3.

При ПЕТ-сканировании поглощение [^{18}F]-1 было наиболее высоким в лобной доле коры и полосатом теле с близко следующим за ними гиппокампом с пиками поглощения примерно через 15 мин после инъекции. Варолиев мост демонстрировал намного более низкое поглощение, находившееся в том же диапазоне, что и в других участках головного мозга после предварительной обработки соединением А, что указывало на хорошую специфичность в отношении mGluR2/3. Полное блокирование наблюдалось при совпадении кривых зависимости активности от времени для лобной доли коры и полосатого тела с кривыми для варолиева моста.

Визуализирующие исследования с использованием микро-ПЕТ макак-резус

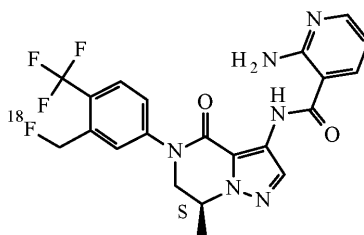
Изображения, получаемые с помощью динамического 120-минутного сканирования с использованием микро-ПЕТ с использованием [^{18}F]-1, собирали с помощью микро-ПЕТ-сканера Focus 220 от макака-резуса (восьмилетней самки Macaca mulatta, 5,8 кг), подвергнутого воздействию седативных препаратов кетамина (Ketalar®) и ксилазина (Rompun®) посредством внутримышечной (i.m.) инъекции. В ходе сканирования обезьяна несколько раз получала дополнительную дозу кетамина/ксилазина посредством i.v. инъекции. В ходе всего эксперимента отслеживали насыщенность крови O_2 , частоту дыхательных движений и частоту сердечных сокращений. Голову животного помещали по центру в поле обзора микро-ПЕТ-сканера. Изображения, получаемые с помощью сканирования, собирали в режиме списка и подвергали редискретизации Фурье в 27 временных интервалах (4×15 с, 4×60 с, 5×180 с, 8×300 с, 6×600 с). Данные реконструировали посредством итеративной 3D-реконструкции по критерию максимальной апостериорной вероятности (3D-MAP). ТАС для головного мозга в целом строили с использованием VOI с помощью программного обеспечения PMOD. Концентрация радиоактивных веществ в головном мозге выражается в виде SUV в зависимости от времени после инъекции индикатора. В дополнение определяли потенциал невытесняемого связывания (BPnd) с помощью кинетического моделирования на основе упрощенной модели эталонной ткани (SRTM) с использованием варолиева моста в качестве эталонного участка (0-60 мин). Сканирование начинали непосредственно после i.v. инъекции 185 МБк [^{18}F]-1 в подкожную вену правой ноги. Для исследования предварительной обработки не содержащее радиоактивных веществ аутентичное эталонное соединение А растворяли в основе, содержащей 20% (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрина и 2 эквивалента HCl, фильтровали через мембранный фильтр на 0,22 мкм (Millex-GV, Millipore) перед инъекцией. Предварительную обработку выполняли посредством i.v. инъекции 2,5 мг/кг не содержащего радиоактивных веществ аутентичного эталонного соединения А за 30 мин до инъекции 185 МБк [^{18}F]-1. Микро-ПЕТ-изображения сравнивали с изображениями, полученными в ходе сканирования на исходном уровне, собранными от необработанной обезьяны. Образцы крови собирали в ходе как сканирования на исходном уровне, так и сканирования после предварительной обработки в моменты времени 10, 30 и 60 мин после инъекции через катетер в подкожной вене левой ноги и плазму крови анализировали в отношении радиоактивных метаболитов согласно той же процедуре, что и для крыс.

Результаты визуализирующих исследований с использованием микро-ПЕТ у макака-резуса

Результаты 120-минутного сканирования [^{18}F]-1 на исходном уровне и после предварительной обработки показаны на фиг. 3. ТАС при сканировании на исходном уровне с использованием [^{18}F]-1 демонстрируют быстрое поглощение в головном мозге (SUV ~3 в головном мозге в целом, время до достижения пика поглощения: 3,5 мин) с высокими SUV в лобной доле коры и мозжечке. Для варолиева моста регистрировали низкие и сравнимые SUV при сканировании как на исходном уровне, так и после предварительной обработки, тогда как в других участках головного мозга поглощение снижается после предварительной обработки соединением А. Соотношения показателей при сканировании после предварительной обработки и на исходном уровне для головного мозга в целом, лобной доли, мозжечка и гиппокампа подтверждали этот блокирующий эффект (фиг. 4). Кроме того, как в лобной доле коры, так и в префронтальной коре был обнаружен высокий BPnd, тогда как в таламусе BPnd был низким (фиг. 5). После предварительной обработки 2,5 мг/кг соединения А BPnd во всех участках головного мозга снижался до нуля или почти до нуля. Поглощение в костях, связанное с присутствием [^{18}F]-фторида или потенциального радиоактивного метаболита, не наблюдалось ни на одном из изображений, полученных с помощью микро-ПЕТ-сканирования.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Меченное радиоактивным изотопом соединение формулы



или его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

2. Фармацевтическая композиция для визуализации или количественного определения рецепторов mGlu2 и mGlu3, содержащая соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемую соль или сольват и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

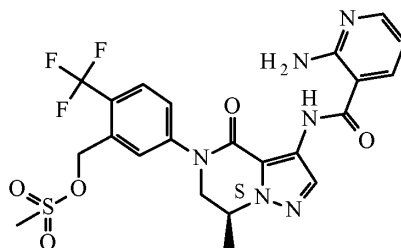
3. Фармацевтическая композиция по п.2, где такая композиция представляет собой стерильный раствор.

4. Фармацевтическая композиция по п.2 или 3 в качестве контрастного средства для визуализации ткани, клеток или млекопитающего.

5. Способ визуализации ткани, клеток или млекопитающего, включающий приведение выявляемого количества соединения или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата по п.1 в контакт с тканью, клетками или млекопитающим и выявление меченого соединения, связанного с рецепторами mGlu2 и mGlu3.

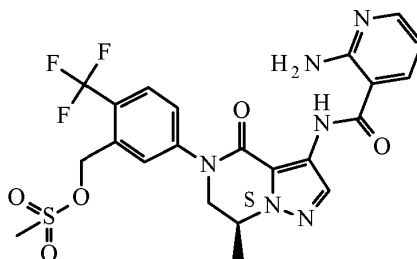
6. Способ по п.5, где методика визуализации представляет собой позитронно-эмиссионную томографию.

7. Соединение, имеющее формулу



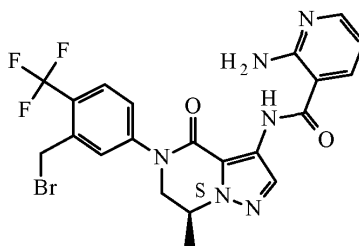
или его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

8. Соединение по п.7, имеющее формулу



$\text{CH}_3\text{SO}_2\text{OH}$.

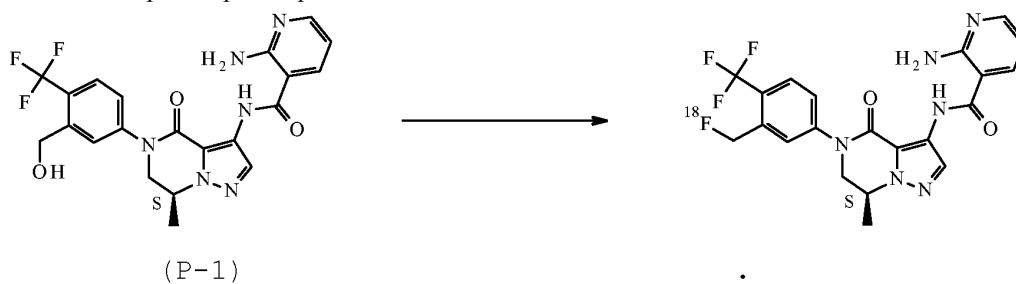
9. Соединение, имеющее формулу



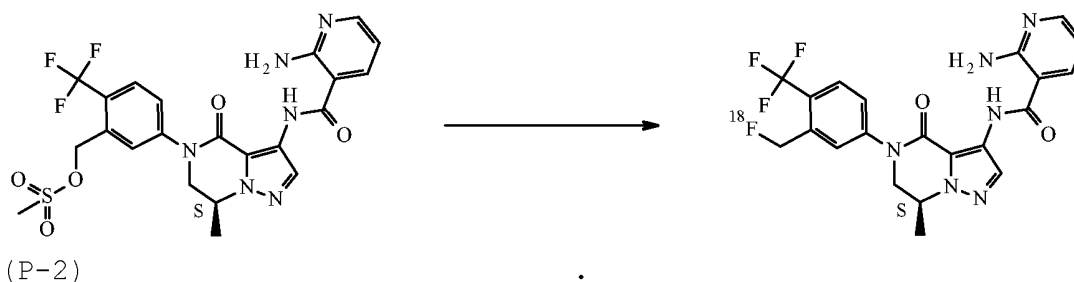
или его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

10. Способ синтеза соединения по п.1, включающий стадии (a-1) осуществления реакции соединения формулы (P-1) с ангидридом метансульфоновой кислоты в присутствии основания и инертного растворителя и (a-2) осуществления реакции соединения, полученного на стадии (a-1), с $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ в присутствии

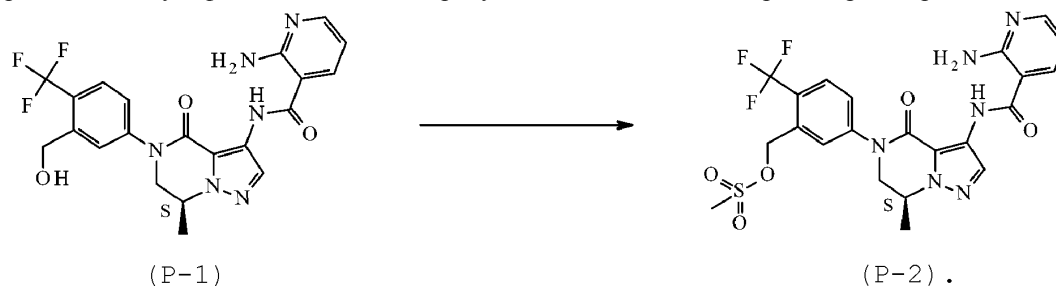
вии основания в инертном растворителе



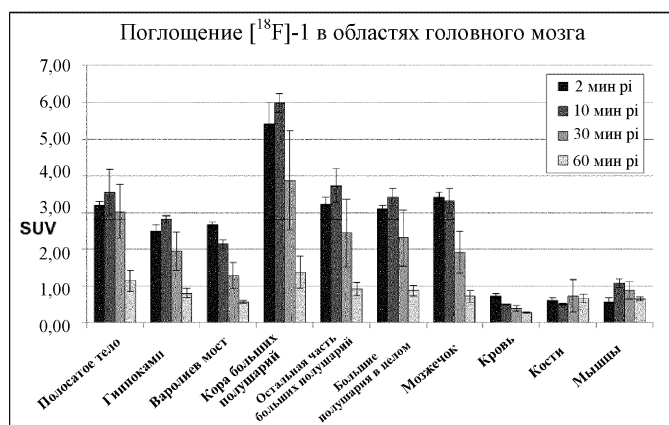
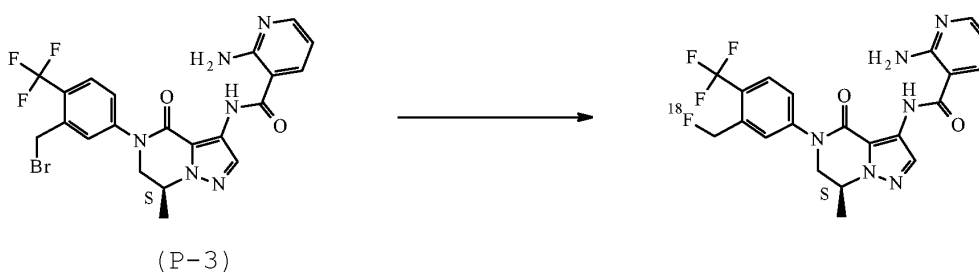
11. Способ синтеза соединения по п.1, включающий стадию осуществления реакции соединения формулы (P-2) с $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ в присутствии основания в инертном растворителе



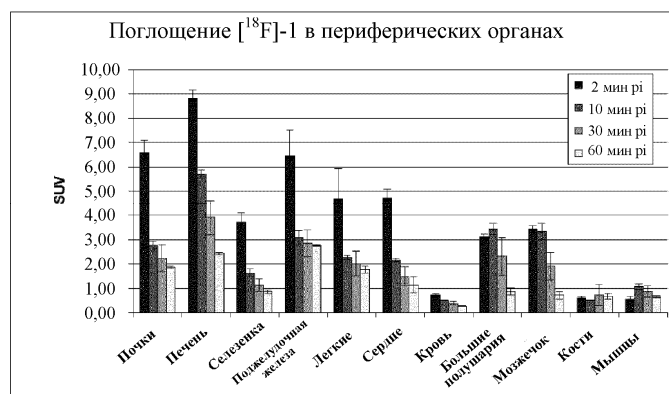
12. Способ по п.11, где соединение (P-2) получают взаимодействием соединения формулы (P-1) с ангидридом метансульфоновой кислоты в присутствии основания и инертного растворителя



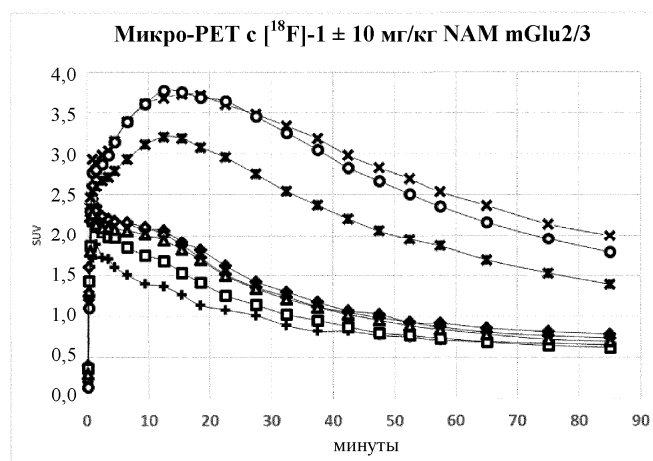
13. Способ синтеза соединения по п.1, включающий стадию осуществления реакции соединения формулы (P-3) с $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ в присутствии основания в инертном растворителе



Фиг. 1А

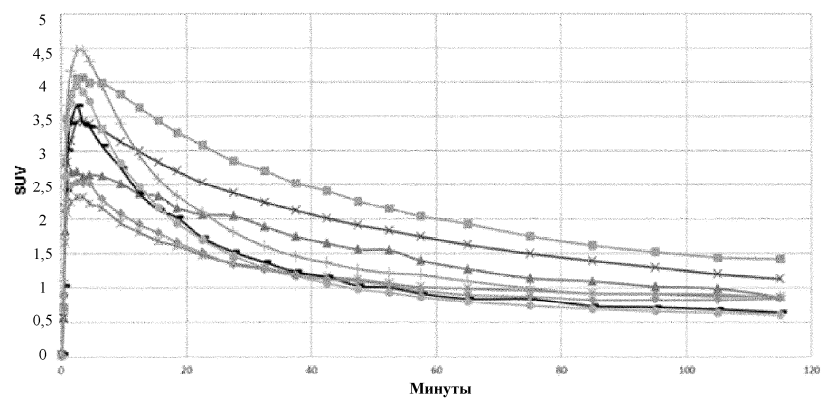


Фиг. 1В



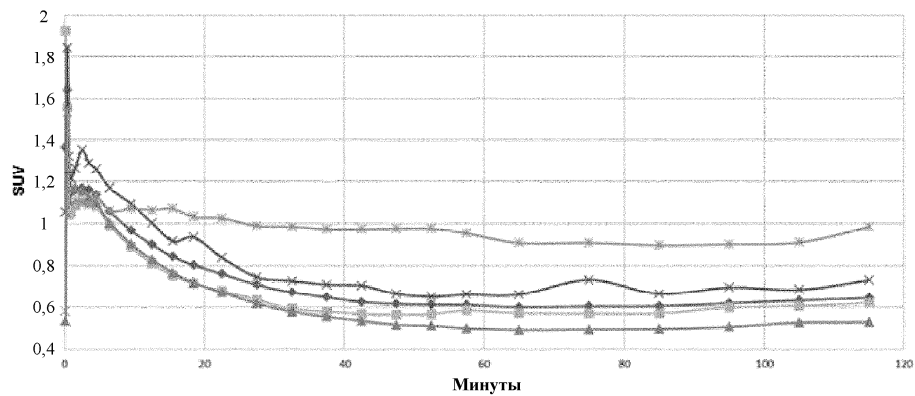
Фиг. 2

Поглощение в головном мозге [^{18}F]-меченного соединения № 1 $\pm$ 2,5 мг/кг соединения А

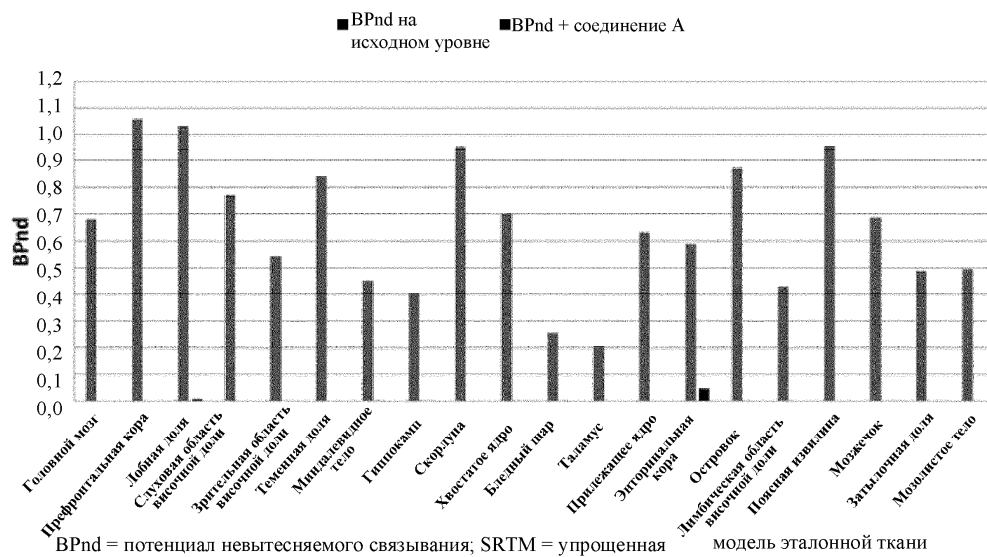


Фиг. 3

Показатели в участках головного мозга после предварительной обработки, деленные на показатели на исходном уровне



Фиг. 4



Фиг. 5



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2