(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 039877 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.03.23

(21) Номер заявки
201990198

(22) Дата подачи заявки
2017.07.18

(51) Int. Cl. ***A61K 38/00*** (2006.01)
A61K 51/04 (2006.01)

(54) РАДИОЛИГАНДЫ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТА IDO1

(31) **62/364,020**
(32) **2016.07.19**
(33) **US**
(43) **2019.06.28**
(86) **PCT/US2017/042510**
(87) **WO 2018/017529 2018.01.25**

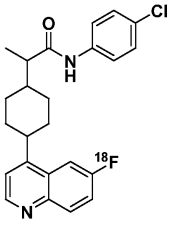
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БРИСТОЛ-МАЙЕРС СКВИББ КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
Доннелли Дэвид Дж., Коул Эрин Ли, Бёррелл Ричард Чарльз, Тёрли Уэсли А., Аллентофф Албан Дж., Уэллэйс Майкл Артур, Балог Джеймс Аарон, Хуанг Аудрис, Скинбджерг Метте (US)

(74) Представитель:
Глухарёва А.О., Лыу Т.Н., Угрюмов В.М., Дементьев В.Н., Строкова О.В., Христофоров А.А., Гизатуллина Е.М., Гизатуллин Ш.Ф., Костюшенкова М.Ю., Осипенко Н.В., Лебедев В.В., Парамонова К.В., Николаева О.А. (RU)

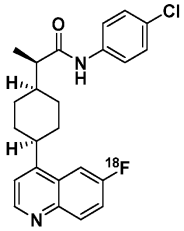
(56) WO-A1-2016073770
WO-A2-2016040458

(57) Изобретение относится к меченным радиоактивным изотопом соединениям, имеющим следующую формулу I:



I

или его фармацевтически приемлемым солям, в частности к соединению, имеющему следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемой соли. Изобретение также относится к фармацевтической композиции для визуализации тканей, которые экспрессируют индоламин-2,3-диоксигеназу (IDO1), где композиция содержит диагностически эффективное количество меченного радиоактивным изотопом соединения по п.2 и фармацевтически приемлемый носитель. Изобретение направлено на применение меченного радиоактивным изотопом соединения для обнаружения раковых клеток, которые экспрессируют IDO1; для получения изображения тканей, содержащих ферменты IDO1; для диагностики заболевания, опосредованного экспрессией IDO1, у субъекта. Дополнительно, изобретение включает в себя следующее: способ скрининга не меченного радиоактивным изотопом соединения для определения его аффинности в отношении занятости

039877 B1

039877 B1

сайта связывания фермента IDO1 в ткани млекопитающего; способ мониторинга лечения пациента с раком, которого лечат с помощью ингибитора IDO1; способ количественного определения пораженных клеток или тканей у субъекта.

039877 B1

039877 B1

Ссылка на родственные заявки

Согласно заявке на данное изобретение испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США с серийным номером 62/364020, поданной 19 июля 2016 г., полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к новым меченным радиоактивным изотопом ингибиторам IDO1 и их применению в мечении и диагностической визуализации ферментов IDO у млекопитающих.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) представляет собой неинвазивную технику визуализации, которая может предоставить функциональную информацию о биологических процессах у живых субъектов. Способность визуализировать и осуществлять мониторинг in vivo молекулярных событий очень важна, чтобы разобраться в биохимических и физиологических процессах в живых организмах. Это, в свою очередь, имеет важное значение для разработки новых подходов к лечению заболеваний, раннего обнаружения заболевания и разработки новых лекарственных средств. ПЭТ основана на разработке и синтезе молекул, меченных позитронно-активным радиоизотопом. Эти молекулы известны как радиоактивные метки или радиоактивные лиганды. Для получения изображений ПЭТ наиболее часто используемые позитронно-активные радионуклиды представляют собой ^{11}C, ^{18}F, ^{15}O и ^{13}N, все из которых произведены циклотроном и характеризуются периодом полураспада, составляющим 20, 110, 2 и 10 мин соответственно. После мечения позитронно-активным радионуклидом эти радиоактивные лиганды ПЭТ вводят млекопитающим, как правило, путем внутривенной (в/в) инъекции. Оказавшись внутри тела, по мере распада радиоактивного лиганда он испускает позитрон, который проходит небольшое расстояние, пока не соединится с электроном. Затем происходит событие, известное как событие аннигиляции, которое генерирует два коллинеарных фотона с энергией, составляющей 511 кэВ каждый. С использованием сканера визуализации ПЭТ, который способен обнаруживать гамма-излучение, испускаемое радиоактивным лигандом, планарные и томографические изображения выявляют распределение радиоактивной метки как функцию времени.

Радиоактивные лиганды ПЭТ предоставляют полезную информацию in vivo о связывании с мишенью и зависимой от дозы занятости сайта связывания для рецепторов и ферментов.

Индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO; также известная как IDO1) представляет собой ген - мишень IFN-γ, который играет роль в иммуномодуляции. IDO1 представляет собой оксидоредуктазу и один из двух ферментов, которые катализируют первую и ограничивающую скорость реакции стадию превращения триптофана в N-формил-кинуренин. Она существует в виде мономера 41 кДа, который обнаружен в нескольких клеточных популяциях, включая в себя иммунные клетки, эндотелиальные клетки и фибробласты. IDO1 является в относительно высокой степени консервативной между видами, причем мышь и человек характеризуются идентичностью последовательностей, составляющей 63% на уровне аминокислот. Данные, полученные из ее кристаллической структуры и сайт-направленного мутагенеза, показывают, что для активности необходимы как связывание субстрата, так и взаимосвязь между субстратом и связанной с железом диоксигеназой. Идентифицирован гомолог IDO1 (IDO2), который характеризуется 44% гомологии аминокислотной последовательности с IDO, но его функция в значительной степени отличается от функции IDO1 (см., например, Serafini, P. et al., Semin. Cancer Biol., 16(1):53-65 (Feb. 2006) и Ball, H.J. et al., Gene, 396(1):203-213 (Jul. 1, 2007)).

IDO1 играет главную роль в иммунной регуляции, и ее иммуносупрессивная функция проявляется несколькими способами. Важно отметить, что IDO1 регулирует иммунитет на уровне Т-клеток, и существует связь между IDO1 и продукцией цитокинов. Кроме того, опухоли часто управляют иммунной функцией путем положительной регуляции IDO1. Таким образом, модуляция IDO1 может оказывать терапевтическое воздействие на ряд заболеваний, нарушений и состояний.

Существует патофизиологическая связь между IDO1 и раком. Нарушение иммунного гомеостаза тесно связано с ростом и прогрессированием опухоли, и продукция IDO1 в микроокружении опухоли, по-видимому, способствует росту опухоли и метастазированию. Более того, повышенные уровни активности IDO1 ассоциированы со множеством различных опухолей. (Brandacher, G. et al., Clin. Cancer Res., 12(4): 1144-1151 (Feb. 15, 2006)).

Лечение рака, как правило, предусматривает хирургическую резекцию с последующей химиотерапией и лучевой терапией. Стандартные схемы лечения демонстрируют крайне изменчивые степени долгосрочного успеха из-за способности опухолевых клеток по существу ускользать путем восстановления роста первичной опухоли и, что более важно, диссеминирования отдаленных метастазов. Последние достижения в лечении рака и связанных с раком заболеваний, нарушений и состояний предусматривают использование комбинированной терапии, включая в себя иммунотерапию с более традиционной химиотерапией и лучевой терапией. В большинстве случаев иммунотерапия связана с меньшей токсичностью, чем традиционная химиотерапия, поскольку она использует собственную иммунную систему пациента для выявления и устранения опухолевых клеток.

В дополнение к раку, IDO1 вовлечена, среди прочих состояний, в иммуносупрессию, хронические инфекции и аутоиммунные заболевания или нарушения (например, ревматоидный артрит). Таким обра-

зом, подавление разложения триптофана путем ингибирования активности IDO1 имеет огромное терапевтическое значение. Более того, ингибиторы IDO1 можно использовать для усиления активации Т-клеток, когда Т-клетки подавлены беременностью, злокачественным новообразованием или вирусом (например, ВИЧ). Хотя их роли не так четко определены, ингибиторы IDO1 также могут найти применение при лечении пациентов с неврологическими или психоневрологическими заболеваниями или расстройствами (например, депрессией).

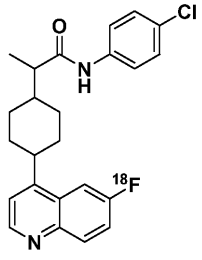
Использование специфического радиоактивного лиганда ПЭТ, характеризующегося высокой аффинностью к IDO1, в сочетании с обеспечивающей визуализацию технологией может обеспечить способ дальнейшего развития клинической картины относительно как связывания с мишенью, так и зависимостей занятости от дозы ингибиторов IDO1 в тканях, которые экспрессируют IDO1, таких как легкое, кишечник и дендритные клетки иммунной системы. Настоящее изобретение, описанное в настоящем документе, относится к меченным радиоактивным изотопом ингибиторам IDO1, которые были бы применимы для поисковой и диагностической визуализации как in vitro, так и in vivo, а также для исследований конкуренции с использованием меченных радиоактивным изотопом и немеченых ингибиторов IDO1.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее раскрытие частично основано на понимании того, что меченные радиоактивным изотопом ингибиторы IDO1 являются применимыми для обнаружения и/или количественного определения, и/или визуализации ферментов IDO1 и/или экспрессии IDO1, и/или аффинности соединения в отношении занятости сайта связывания фермента IDO1 в ткани вида млекопитающего. Было обнаружено, что меченные радиоактивным изотопом ингибиторы IDO1 при введении виду млекопитающих накапливаются в активном сайте фермента IDO1 или занимают его, и их можно обнаружить с помощью техник визуализации, обеспечивая тем самым ценные диагностические маркеры для присутствия белков IDO1, аффинности соединения в отношении занятости активного сайта фермента IDO1 и клинической оценки и выбора дозы ингибиторов IDO1. Кроме того, меченные радиоактивным изотопом ингибиторы IDO1, раскрытые в настоящем документе, можно использовать в качестве инструмента исследования для изучения взаимодействия немеченых ингибиторов IDO1 с ферментами IDO1 in vivo посредством конкуренции между немеченым лекарственным средством и меченным радиоактивным изотопом лекарственным средством за связывание с ферментом. Указанные типы исследований являются применимыми для определения взаимосвязи между занятостью активного сайта фермента IDO1 и дозой немеченого ингибитора IDO1, а также для изучения продолжительности блокады фермента различными дозами немеченых ингибиторов IDO1.

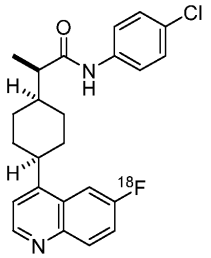
В качестве клинического инструмента можно использовать меченный радиоактивным изотопом ингибитор IDO1 для содействия в определении клинически эффективных доз ингибиторов IDO1. В экспериментах на животных меченный радиоактивным изотопом ингибитор IDO1 можно использовать для предоставления информации, которая является применимой для выбора между потенциальными кандидатами в лекарственные средства для отбора для клинической разработки. Меченный радиоактивным изотопом ингибитор IDO1 также можно использовать для исследования регионального распределения и концентрации ферментов IDO1 в живых тканях. Их можно использовать для исследования связанных с заболеванием или фармакологически связанных изменений концентраций фермента IDO1.

Согласно настоящему изобретению предусмотрено следующее соединение согласно формуле I



I

включая в себя его фармацевтически приемлемые соли и стереоизомеры, такие как



Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие диагностически эффективное количество меченного радиоактивным изо-

топом соединения согласно формуле I вместе с его фармацевтически приемлемым носителем.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрено применение меченного радиоактивным изотопом соединения для обнаружения раковых клеток, которые экспрессируют IDO1, причем такое применение включает:

(a) введение меченного радиоактивным изотопом соединения согласно формуле I, как описано в настоящем документе, субъекту; и

(b) визуализацию in vivo распределения меченного радиоактивным изотопом соединения с помощью сканирования позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ).

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения предусмотрен способ скрининга не меченного радиоактивным изотопом соединения для определения его аффинности в отношении занятости сайта связывания фермента IDO1 в ткани млекопитающего, предусматривающий следующие стадии:

(a) введение меченного радиоактивным изотопом соединения согласно формуле I субъекту;

(b) визуализация in vivo тканей с известной экспрессией IDO1 с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) для определения исходного накопления меченного радиоактивным изотопом соединения;

(c) введение не меченного радиоактивным изотопом соединения субъекту;

(d) введение второй дозы меченного радиоактивным изотопом соединения согласно формуле I субъекту;

(e) визуализация in vivo распределения меченного радиоактивным изотопом соединения согласно формуле I в тканях, которые экспрессируют фермент IDO1;

(f) сравнение сигнала из данных сканирования ПЭТ на исходном уровне в ткани, которая экспрессирует IDO1, с данными сканирования ПЭТ, полученными после введения не меченного радиоактивным изотопом соединения в ткани, которая экспрессирует IDO1,

где не меченное радиоактивным изотопом соединение представляет собой (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамид.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения предусмотрен способ мониторинга лечения пациента с раком, которого лечат с помощью ингибитора IDO1, предусматривающий следующие стадии:

(a) введение пациенту меченного радиоактивным изотопом соединения согласно формуле I,

(b) получение изображения тканей у пациента, которые экспрессируют IDO1, с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ); и

(c) обнаружение, в какой степени указанный меченный радиоактивным изотопом ингибитор IDO1 занимает активный сайт фермента IDO1.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения предусмотрено применение меченного радиоактивным изотопом соединения согласно формуле I для получения изображения тканей, содержащих ферменты IDO1, с использованием визуализации позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), причем указанное обнаружение можно выполнить in vitro или in vivo.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения предусмотрено применение меченного радиоактивным изотопом соединения согласно формуле I для диагностики наличия заболевания у субъекта, предусматривающий следующее:

(a) введение субъекту меченного радиоактивным изотопом соединения согласно формуле I, которое связывается с ферментом IDO1, ассоциированным с наличием заболевания; и

(b) получение радиологического изображения по меньшей мере части субъекта для обнаружения присутствия или отсутствия меченного радиоактивным изотопом соединения; причем присутствие и локализация меченного радиоактивным изотопом соединения выше фонового значения является показателем наличия или отсутствия заболевания.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения предусмотрен способ количественного определения пораженных клеток или ткани, предусматривающий следующее:

(a) введение субъекту, характеризующемуся наличием пораженных клеток или тканей, меченного радиоактивным изотопом соединения согласно формуле I, которое связывается с ферментом IDO1, находящимся в пораженных клетках или тканях; и

(b) обнаружение радиоактивных излучений меченного радиоактивным изотопом соединения в пораженных клетках или тканях, причем уровень и распределение радиоактивных излучений в пораженных клетках или тканях представляет собой количественный показатель пораженных клеток или тканей.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 представляет собой схему автоматизированного синтеза [^{18}F])R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида с использованием блока синтеза Synthera и специально разработанной системы очистки.

Фиг. 2 представляет собой гистограмму накопления радиоактивной метки, на которой показано следующее:

A) Накопление метки в опухолях M109 через 4-5 дней лечения с помощью несущей среды (n=10)

или нерадиоактивного (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида; 6 мг/кг (n=12), 60 мг/кг (n=12) и 150 мг/кг (n=11). Введение (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида приводило к зависимому от дозы смещению метки по сравнению с несущей средой. Пунктирная линия представляет среднее накопление метки в мышечной ткани.

B) Накопление метки в мышечной эталонной ткани через 4-5 дней лечения с помощью несущей среды (n=10) или нерадиоактивного (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида; 6 мг/кг (n=12), 60 мг/кг (n=12) и 150 мг/кг (n=11). Введение (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида не влияло на накопление в мышечной ткани.

C) В соответствии с результатами визуализации 5-6 дней лечения с помощью несущей среды (n=7) или нерадиоактивного (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида; 6 мг/кг (n=7), 60 мг/кг (n=8) и 150 мг/кг (n=8) вызывали зависимое от дозы ингибирование кинуренинового пути, что измеряли как соотношение кинуренина к триптофану.

D) 5-6 дней лечения с помощью 6 мг/кг (n=7), или 60 мг/кг (n=8), или 150 мг/кг (n=8) нерадиоактивного (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида приводило к зависимому от дозы увеличению концентрации (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида в сыворотке.

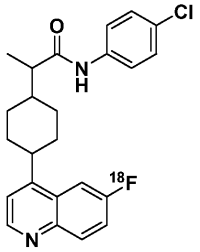
Фиг. 3 представляет собой гистограмму накопления радиоактивной метки, на которой показано накопление метки в опухолях M109 до (исходный уровень, сплошные столбцы) и после лечения с помощью несущей среды (n=4) или нерадиоактивного (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида; 6 мг/кг (n=4), 60 мг/кг (n=4) и 150 мг/кг (n=4) (получившие лечение, столбцы в полоску). Перед введением лечения (исходный уровень) накопление метки не различалось между группами. После лечения отсутствовало изменение в накоплении метки в группе несущей среды, но введение (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида приводило к зависимому от дозы смещению метки. Пунктирная линия представляет среднее накопление метки в мышечной эталонной ткани.

Фиг. 4 представляет собой гистограмму накопления радиоактивной метки, на которой показано, что накопление метки увеличивалось в опухолях M109 (n=10) с высокой экспрессией IDO1 по сравнению с опухолями CT26 (n=10) с низкой экспрессией IDO1.

Фиг. 5 представляет собой изображения МРТ и ПЭТ яванского макака, полученные с помощью ^{18}F-(R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида. В общей сложности получили пять последовательных изображений всего тела для оценки кинетики и биораспределения метки с течением времени. Метка накапливалась в ожидаемых органах осуществления элиминации, таких как печень и желчный пузырь, в то время как в остальном теле наблюдали незначительное фоновое значение или оно отсутствовало.

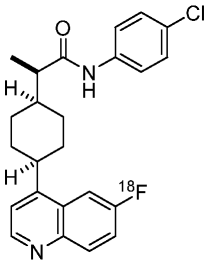
Подробное раскрытие настоящего изобретения

Согласно первому варианту осуществления настоящего изобретения предусмотрено соединение согласно следующей формуле I или его фармацевтически приемлемая соль:



I

Стереоизомеры согласно формуле I также включены в объем настоящего изобретения и включают в себя, например, следующее:



Соединение согласно формуле I представляет собой меченный радиоактивным изотопом ингибитор IDO1, для применения в качестве позитронно-активной молекулы, характеризующейся аффинностью к

ферменту IDO1.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения настоящее раскрытие относится к диагностической композиции для визуализации ферментов IDO1, которая включает в себя меченный радиоактивным изотопом ингибитор IDO1 и фармацевтически приемлемый носитель. Согласно другому варианту осуществления настоящее раскрытие относится к способу радиоавтографии тканей млекопитающего с известной экспрессией IDO1, предусматривающему стадии введения меченного радиоактивным изотопом ингибитора IDO1 пациенту, получения изображения тканей с помощью позитронно-эмиссионной томографии и обнаружения меченного радиоактивным изотопом соединения в тканях для определения связывания с мишенью IDO1 и занятости активного сайта фермента IDO1.

Меченные радиоактивным изотопом ингибиторы IDO1, когда их метят соответствующим радионуклидом, являются потенциально применимыми для различных применений в in vitro и/или in vivo визуализации, включая в себя диагностическую визуализацию, фундаментальные исследования и радиотерапевтические применения. Конкретные примеры возможной диагностической визуализации и радиотерапевтических применений включают в себя определение локализации, относительной активности и/или количественного определения ферментов IDO1; радиоиммунный анализ ингибиторов IDO1 и радиоавтографию для определения распределения ферментов IDO1 у пациента или в образце его органа или ткани.

В частности, меченный радиоактивным изотопом ингибитор IDO1 согласно настоящему изобретению является применимым для позитронно-эмиссионной томографической (ПЭТ) визуализации ферментов IDO1 в легких, кишечнике и дендритных клетках иммунной системы или других органах живых людей и экспериментальных животных. Меченный радиоактивным изотопом ингибитор IDO1 согласно настоящему изобретению можно использовать в качестве инструмента исследования для изучения взаимодействия немеченых ингибиторов IDO1 с ферментами IDO1 in vivo посредством конкуренции между немеченым лекарственным средством и меченным радиоактивным изотопом соединением за связывание с ферментом. Указанные типы исследований являются применимыми для определения взаимосвязи между занятостью фермента IDO1 и дозой немеченого ингибитора IDO1, а также для изучения продолжительности блокады фермента различными дозами немеченого ингибитора IDO1. В качестве клинического инструмента можно использовать меченный радиоактивным изотопом ингибитор IDO1 для содействия в определении клинически эффективной дозы немеченого ингибитора IDO1. В экспериментах на животных меченный радиоактивным изотопом ингибитор IDO1 можно использовать для предоставления информации, применимой для выбора между потенциальными кандидатами в лекарственные средства для отбора для клинической разработки. Ингибиторы IDO1 также можно использовать для исследования регионального распределения и концентрации IDO1 в легких, кишечнике и дендритных клетках иммунной системы и других экспрессирующих IDO1 тканях, а также в других органах живых экспериментальных животных и в образцах тканей. Меченные радиоактивным изотопом ингибиторы IDO1 также можно использовать для исследования связанных с заболеванием или фармакологически связанных изменений концентраций фермента IDO1.

Например, метки для позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), такие как меченный радиоактивным изотопом ингибитор IDO1 согласно настоящему изобретению, можно использовать с доступной в настоящее время технологией ПЭТ для получения следующей информации: взаимосвязь между уровнем занятости сайта связывания фермента кандидатными ингибиторами IDO1 и клинической эффективностью у пациентов; выбор дозы для клинических испытаний ингибиторов IDO1 до начала долгосрочных клинических исследований; сравнительные активности структурно новых ингибиторов IDO1; исследование влияния ингибиторов IDO1 на in vivo аффинность и плотность переносчиков во время обработки клинических мишеней ингибиторами IDO1; изменения в плотности и распределении IDO1 во время эффективного и неэффективного лечения рака или других опосредованных IDO1 заболеваний.

Меченный радиоактивным изотопом ингибитор IDO1 согласно настоящему изобретению характеризуется применимостью для визуализации ферментов IDO1 или для диагностической визуализации в отношении множества нарушений, ассоциированных с экспрессией IDO1.

Для применения соединений согласно настоящему изобретению в качестве средств для поисковой или диагностической визуализации меченное радиоактивным изотопом соединение можно вводить млекопитающим, предпочтительно людям, в фармацевтической композиции или отдельно или предпочтительно в комбинации с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями, необязательно с известными адъювантами, такими как квасцы, в фармацевтической композиции в соответствии со стандартной фармацевтической практикой. Такие композиции можно вводить перорально или парентерально, включая в себя внутривенный, внутримышечный, интраперитонеальный, подкожный, ректальный и местный пути введения. Предпочтительно введение является внутривенным. Ингибитор представляет собой радиоактивную метку, меченную короткоживущим позитронно-активным радионуклидом, и, таким образом, его, как правило, вводят путем внутривенной инъекции в пределах менее 1 ч после синтеза. Это необходимо из-за короткого периода полураспада используемого радионуклида.

Подходящий уровень дозировки для немеченого ингибитора IDO1 находится в диапазоне от 1 до 1500 мг и предпочтительно составляет от 25 до 800 мг в день. Когда меченный радиоактивным изотопом ингибитор IDO1 согласно настоящему изобретению вводят субъекту-человеку, количество, требуемое

для визуализации, как правило, будет определять лечащий врач, причем дозировка, как правило, варьируется в соответствии с количеством излучения радионуклида. Тем не менее в большинстве случаев эффективным количеством будет количество соединения, достаточное для получения излучений в диапазоне приблизительно 1-5 мКи.

Согласно одному иллюстративному применению введение происходит в количестве, составляющем 0,5-20 мКи от общей радиоактивности, вводимой пациенту, в зависимости от массы тела субъекта. Верхний предел устанавливают с помощью дозиметрии меченной радиоактивным изотопом молекулы или у грызунов, или у приматов, не являющихся человеком.

Следующую иллюстративную процедуру можно использовать при выполнении исследований визуализации ПЭТ пациентов в клинике. Пациенту предварительно проводят премедикацию с помощью немеченого ингибитора IDO1 за некоторое время до дня эксперимента, и пациент голодает в течение по меньшей мере 12 ч, при этом потребление воды позволяют производить по желанию. Двухдюймовый венозный катетер 20-го калибра вводят в контралатеральную локтевую вену для введения радиоактивной метки. Введение метки ПЭТ часто приурочено ко времени максимальной (T_{max}) или минимальной (T_{min}) концентрации ингибитора IDO1 в крови.

Пациента помещают в камеру ПЭТ и дозу метки ПЭТ меченного радиоактивным изотопом ингибитора IDO1, такого как пример 5A (<20 мКи), вводят внутривенно посредством в/в катетера. Образцы артериальной или венозной крови отбирают через соответствующие промежутки времени на протяжении сканирования ПЭТ, чтобы анализировать и количественно определять фракцию неметаболизированной метки ПЭТ в плазме. Изображения получают вплоть до 120 мин. В течение 10 мин после инъекции радиоактивной метки и в конце сеанса визуализации получают 1 мл образцы крови для определения концентрации в плазме любого немеченого ингибитора IDO1, который мог быть введен до введения метки ПЭТ.

Томографические изображения получают путем восстановления изображения. Для определения распределения радиоактивной метки на восстановленном изображении рисуют исследуемые области (ROI), включая в себя без ограничения легкие, кишечник и дендритные клетки иммунной системы, а также другие экспрессирующие IDO1 ткани или другие органы. Накопление радиоактивной метки с течением времени в этих областях используют для получения кривых активность-время (TAC), полученных при отсутствии какого-либо вмешательства или в присутствии немеченого ингибитора IDO1 в различных исследуемых моделях дозирования. Данные выражают в виде радиоактивности в единицу времени на единицу объема (вводимая с помощью инъекции доза мкКи/см^3/мКи). Данные TAC обрабатывают различными способами, хорошо известными в настоящей области техники, для получения количественных параметров, таких как связывающий потенциал (BP) или объем распределения (V_T), которые пропорциональны плотности незанятого сайта связывания IDO1. Затем рассчитывают ингибирование фермента IDO1 на основе изменения BP или V_T с помощью равновесного анализа в присутствии ингибиторов IDO1 при различных моделях дозирования по сравнению с BP или V_T в состоянии без применения лекарственных средств. Кривые ингибирования получают путем построения графиков вышеуказанных данных в зависимости от дозы (концентрации) ингибитора IDO1. Затем рассчитывают ингибирование IDO1 на основе максимального снижения V_T или BP радиоактивного лиганда ПЭТ, которое может быть достигнуто с помощью блокирующего лекарственного средства при E_{max}, T_{max} или T_{min} и изменения его неспецифического объема распределения (V_{ND}) и BP в присутствии ингибитора IDO1 в различных моделях дозирования по сравнению с BP или V_T в состоянии без применения лекарственных средств.

Значения ID_{50} получают путем подбора кривой зависимости мощности поглощенной дозы и ингибирования.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу диагностической визуализации сайта связывания IDO1 у пациента, который предусматривает стадию объединения меченного радиоактивным изотопом ингибитора IDO1 с фармацевтическим носителем или вспомогательным веществом.

Определения

Если не указано иное, следующие термины, используемые в настоящем документе, включая в себя описание и формулу изобретения, имеют определения, приведенные ниже. Следует отметить, что используемые в описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают в себя определяемые объекты в форме множественного числа, если контекст явно не предписывает иное. Если не указано иное, используют общепринятые способы масс-спектроскопии, ЯМР, ВЭЖХ, химии белка, биохимии, техник рекомбинантной ДНК и фармакологии. В настоящей заявке использование "или" или "и" означает "и/или", если не указано иное. Более того, использование термина "включая в себя", а также других форм, таких как "включают в себя", "включает в себя" и "включенный", не является ограничивающим. Используемые в настоящем документе заголовки разделов предназначены только для организационных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие описанный предмет.

Используемый в настоящем документе термин "приемлемый" в отношении состава, композиции или ингредиента означает отсутствие постоянного вредного воздействия на общее состояние здоровья подлежащего лечению субъекта.

Используемый в настоящем документе термин "ингибитор" относится к молекуле, такой как соеди-

нение, которое связывается со специфическим сайтом связывания на ферменте и запускает ответ в клетке.

Подразумевается, что используемые в настоящем документе термины "совместное введение" или тому подобное охватывают введение выбранных терапевтических средств одному пациенту и, как подразумевается, включают в себя схемы лечения, в которых средства вводят одним и тем же или другим путем введения или в одно и то же или разное время.

Подразумевается, что используемый в настоящем документе термин "композиция" включает в себя продукт, содержащий точно определенные ингредиенты в точно определенных количествах, а также любой продукт, который прямо или косвенно является результатом комбинации точно определенных ингредиентов в точно определенных количествах. Подразумевается, что такой термин в отношении фармацевтической композиции охватывает продукт, содержащий активный(е) ингредиент(ы), и инертный(е) ингредиент(ы), составляющий(е) носитель, а также любой продукт, который прямо или косвенно является результатом комбинации, комплексообразования или агрегации любых двух или более ингредиентов, или результатом диссоциации одного или нескольких ингредиентов, или результатом других типов реакций или взаимодействий одного или нескольких ингредиентов. Соответственно, фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению включают в себя любую композицию, полученную путем смешивания соединения согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемого носителя. Под "фармацевтически приемлемым" подразумевается, что носитель, разбавитель или вспомогательное вещество должны являться совместимыми с другими ингредиентами состава и не являться вредными для их реципиента. Термины "введение" и/или "осуществление введения" соединения следует понимать как означающие предоставление пациенту соединения согласно настоящему изобретению или пролекарственного средства соединения согласно настоящему изобретению.

Используемые в настоящем документе термины "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" относятся к достаточному количеству вводимого средства или соединения, которое в некоторой степени ослабит один или несколько симптомов заболевания или состояния, подлежащего лечению. Результатом может являться снижение и/или облегчение признаков, симптомов или причин заболевания или любое другое желательное изменение биологической системы. Например, "эффективное количество" для терапевтических применений представляет собой количество композиции, содержащей соединение, раскрытое в настоящем документе, необходимое для обеспечения клинически значимого уменьшения симптомов заболевания. Подходящее "эффективное" количество в любом отдельном случае можно определить с использованием техник, таких как исследование с повышением дозы.

Используемый в настоящем документе термин "диагностически эффективное" означает количество композиции для визуализации в соответствии с настоящим изобретением, достаточное для достижения требуемого эффекта концентрирования визуализирующего средства для визуализации тканей у субъекта, как того требует исследователь или врач. Количество композиции для визуализации согласно настоящему изобретению, которое составляет диагностически эффективное количество, может, как правило, определить средний специалист в настоящей области техники с учетом своих собственных знаний, способов, известных в настоящей области техники, и настоящего раскрытия.

Термин "субъект" или "пациент" включает в себя млекопитающих. Примеры млекопитающих включают в себя без ограничения людей, шимпанзе, человекообразных обезьян, обезьянообразных, крупный рогатый скот, лошадей, овец, коз, свиней, кроликов, собак, кошек, грызунов, крыс, мышей, морских свинок и т.п. Согласно одному варианту осуществления млекопитающее представляет собой человека.

Используемые в настоящем документе термины "лечить", "осуществление лечения" или "лечение" включают в себя облегчение, ослабление или уменьшение интенсивности по меньшей мере одного симптома заболевания или состояния, предотвращение дополнительных симптомов, ингибирование заболевания или состояния, например, прекращение развития заболевания или состояния, облегчение заболевания или состояния, вызванное регрессом заболевания или состояния, ослабление состояния, вызванного заболеванием или состоянием, или прекращение симптомов заболевания или состояния будь то профилактически и/или терапевтически.

Описанные в настоящем документе соединения могут содержать асимметричные центры. Такие соединения, содержащие асимметрично замещенный атом, можно выделить в оптически активных или рацемических формах. В настоящей области техники хорошо известно, как получить оптически активные формы, например, путем разделения рацемических форм или путем синтеза из оптически активных исходных материалов. Многие геометрические изомеры олефинов, C=N двойных связей и т.п. также могут присутствовать в описанных в настоящем документе соединениях, и все такие стабильные изомеры предусмотрены в настоящем изобретении. Описаны цис- и транс-геометрические изомеры раскрытых соединений, и их можно выделить в виде смеси изомеров или в виде разделенных изомерных форм. Предусмотрены все хиральные, диастереомерные, рацемические формы и все геометрические изомерные формы структуры, если конкретно не указана конкретная стереохимия или изомерная форма.

Фразу "фармацевтически приемлемый" используют в настоящем документе для обозначения тех

соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые в рамках здравого медицинского обоснования пригодны для использования в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соразмерно с разумным соотношением пользы/риска.

Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемые соли" относится к производным раскрытых соединений, в которых исходное соединение модифицировано путем получения его кислых или основных солей.

Термины "фармацевтически приемлемая соль и соли" могут относиться к основным солям, образованным с неорганическими и органическими основаниями. Такие соли включают в себя соли аммония; соли щелочных металлов, такие как соли лития, натрия и калия; соли щелочноземельных металлов, такие как соли кальция и магния; соли с органическими основаниями, такие как аминоподобные соли (например, соль дициклогексиламина, соли бензатина, N-метил-D-глюкамина и гидрабамина); и соли с аминокислотами, такими как аргинин, лизин и т.п.; и цвиттерионы, так называемые "внутренние соли". Нетоксичные фармацевтически приемлемые соли являются предпочтительными, хотя другие соли также являются применимыми, например, для выделения или очистки продукта.

Термин "фармацевтически приемлемая соль и соли" также включает в себя соли присоединения кислоты. Они образованы, например, с сильными неорганическими кислотами, такими как минеральные кислоты, например серная кислота, фосфорная кислота или галогенводородная кислота, такая как HCl или HBr, с сильными органическими карбоновыми кислотами, такими как алканкарбоновые кислоты с 1-4 атомами углерода, которые являются незамещенными или замещенными, например, галогеном, например уксусная кислота, такими как насыщенные или ненасыщенные дикарбоновые кислоты, например щавелевая, малоновая, янтарная, малеиновая, фумаровая, фталевая или терефталевая кислота, такими как гидроксикарбоновые кислоты, например аскорбиновая, гликолевая, молочная, яблочная, винная или лимонная кислота, такими как аминокислоты (например, аспарагиновая или глутаминовая кислота или лизин или аргинин), или бензойная кислота, или с органическими сульфокислотами, такими как (C_1-C_4)алкил- или арилсульфоновые кислоты, которые являются незамещенными или замещенными, например, галогеном, например метансульфоновая кислота или п-толуолсульфоновая кислота.

Фармацевтически приемлемые соли можно синтезировать из исходного соединения, которое содержит основный или кислотный фрагмент, с помощью общепринятых химических способов. Как правило, такие соли можно получить путем реакции этих соединений в формах свободной кислоты или основания со стехиометрическим количеством подходящего основания или кислоты в воде или в органическом растворителе или в их смеси; как правило, неводные среды, такие как простой эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил, являются предпочтительными. Перечни подходящих солей можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Edition, p. 1418, Mack Publishing Company, Easton, PA (1985), раскрытие которого настоящим включено в настоящий документ посредством ссылки.

На протяжении всего настоящего описания изобретения специалист в настоящей области техники может выбрать группы и их заместители для получения стабильных фрагментов и соединений, а также соединений, применимых в качестве фармацевтически приемлемых соединений и/или промежуточных соединений, применимых для получения фармацевтически приемлемых соединений.

Примеры

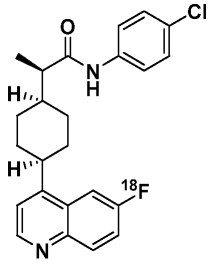
Синтез соединений согласно настоящему изобретению показан в следующих примерах.

Условия ВЭЖХ:

Способ A: Waters Acquity SDS с использованием следующего способа: линейный градиент, составляющий 2-98% растворителя B в течение 1,6 мин; УФ-визуализация при 220 нм; колонка: BEH C18 2,1×50 мм; 1,70 мкм частицы (нагретые до температуры 50°C); скорость потока: 1 мл/мин; подвижная фаза A: 100% воды, 0,05% TFA; подвижная фаза B: 100% ацетонитрила, 0,05% TFA.

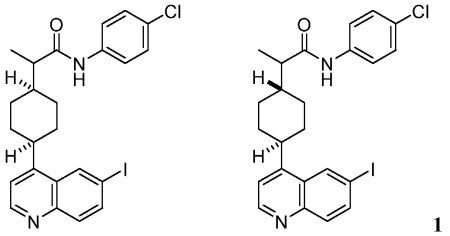
Способ B: колонка: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2,1×50 мм, 1,7 мкм частицы; подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетата аммония; температура: 50°C; градиент: 0-100% B в течение 3 мин, затем 0,75-минутное удерживание при 100% B; скорость потока: 1,00 мл/мин; обнаружение: УФ при 220 нм.

[^{18}F](R)-N-(4-Хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамид



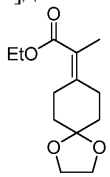
Пример 1.

(+/-)-цис- и транс-N-(4-Хлорфенил)-2-(4-(6-йодхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамид



1

Препарат 1A. Этил-2-(1,4-диоксаспиро[4.5]декан-8-илиден)пропаноат

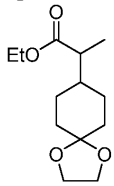


1A

К суспензии NaH (0,307 г, 7,68 ммоль) в THF (8 мл), охлажденной при 0°C, добавляли этил-2-(диэтоксифосфорил)пропаноат (1,830 г, 7,68 ммоль) медленно. Через 30 мин добавляли 1,4-диоксаспиро[4.5]декан-8-он (1 г, 6,40 ммоль). Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 2 ч, затем нагревали до комнатной температуры в течение ночи. Смесь гасили водой и THF удаляли при пониженном давлении. Остаток растворяли в EtOAc, отмывали водой, рассолом, высушивали на Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали. Сырой материал очищали с помощью ISCO (EtOAc/гексаны 0-30%). Фракции, содержащие продукт, концентрировали с получением на выходе препарата 1A (1,2 г, выход - 78%) в виде светло-желтого масла.

^{1}H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 4,19 (q, J=7,1 Гц, 2H), 4,03-3,89 (m, 4H), 2,68-2,53 (m, 2H), 2,46-2,28 (m, 2H), 1,89 (s, 3H), 1,78-1,66 (m, 4H), 1,30 (t, J=7,1 Гц, 3H).

Препарат 1B. Этил-2-(1,4-диоксаспиро[4.5]декан-8-ил)пропаноат

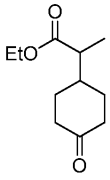


1B

Суспензию препарата 1A (500 мг, 2,081 ммоль) (307A) и 10% палладиевого катализатора на угле (25 мг, 0,024 ммоль) в EtOAc (5 мл) гидрогенизировали в смесителе Парра при 45 фунтов/кв. дюйм в течение 6 ч. Катализатор фильтровали, фильтрат концентрировали с получением на выходе препарата 1B (450 мг, выход - 89%) в виде светлого масла.

^{1}H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 4,12 (dtt, J=10,7, 7,1, 3,6 Гц, 2H), 3,98-3,81 (m, 4H), 2,35-2,17 (m, 1H), 1,83-1,68 (m, 3H), 1,66-1,45 (m, 4H), 1,43-1,28 (m, 2H), 1,27-1,22 (m, 3H), 1,14-1,07 (m, 3H).

Препарат 1C. Этил-2-(4-оксоциклогексил)пропаноат

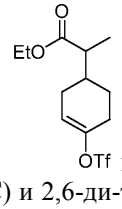


1C

К раствору препарата 1B (450 мг, 1,857 ммоль) в THF (5 мл) добавляли 1 M хлороводорода (водн.) (0,929 мл, 3,71 ммоль). Смесь нагревали до 50°C в течение 6 ч. Реакционную смесь концентрировали. Остаток растворяли в EtOAc, отмывали водой (2×), рассолом, высушивали на Na_2SO_4 и концентрировали. Сырой материал очищали с помощью ISCO (EtOAc/гексаны 0-30%). Фракции, содержащие продукт, концентрировали с получением на выходе препарата 1C (290 мг, выход - 79%) в виде прозрачного масла.

^{1}H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 4,22-4,06 (m, 2H), 2,46-2,30 (m, 5H), 2,13-1,91 (m, 3H), 1,56-1,42 (m, 2H), 1,31-1,24 (m, 3H), 1,18 (d, J=7,1 Гц, 3H).

Препарат 1D. Этил-2-(4-(((трифторметил)сульфонил)окси)циклогекс-3-ен-1-ил)пропаноат



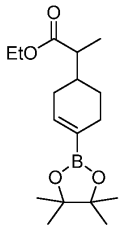
1D

Препарат 1C (200 мг, 1,01 ммоль) (307C) и 2,6-ди-трет-бутил-4-метилпиридин (238 мг, 1,16 ммоль)

растворяли в сухом DCM (10 мл). К реакционной смеси трифторметансульфоновый ангидрид (0,186 мл, 1,11 ммоль) добавляли по каплям и перемешивали в течение 2 ч. Суспензию фильтровали. Фильтрат разводили с помощью DCM, отмывали с помощью 1н. HCl (2×), насыщ. водн. раствора бикарбоната натрия, воды, рассола, высушивали на Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали с получением на выходе препарата 1D (320 мг, выход - 96%) в виде коричневого масла.

^{1}H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 5,73 (t, J=6,1 Гц, 1H), 4,28-4,05 (m, 2H), 2,52-2,17 (m, 4H), 2,08-1,79 (m, 3H), 1,49 (dt, J=11,1, 6,6 Гц, 1H), 1,31-1,20 (m, 3H), 1,19-1,04 (m, 3H).

Препарат 1E. Этил-2-(4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)циклогекс-3-ен-1-ил)пропаноат

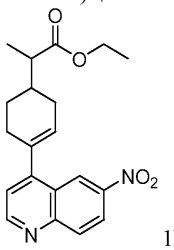


1E

К раствору препарата 1D (300 мг, 0,908 ммоль) (307D) в DMSO (5 мл) добавляли 4,4,4',4',5,5,5',5'-октаметил-2,2'-би(1,3,2-диоксаборолан) (230 мг, 0,908 ммоль) и ацетат калия (267 мг, 2,72 ммоль). После того, как смесь дегазировали с помощью N_2 в течение 10 мин, добавляли $PdCl_2$(dppf) (19,9 мг, 0,027 ммоль). Смесь нагревали при 80°C в течение ночи. Смесь разделяли между EtOAc и водой. Органическую фазу концентрировали и очищали с помощью ISCO. Фракции, содержащие продукт, концентрировали с получением на выходе препарата 1E (168 мг, выход - 60%) в виде коричневого масла.

^{1}H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 6,66-6,40 (m, 1H), 4,31-4,00 (m, 2H), 2,34-2,26 (m, 1H), 2,25-2,19 (m, 1H), 2,19-2,04 (m, 2H), 1,95-1,75 (m, 3H), 1,73-1,60 (m, 1H), 1,29-1,24 (m, 15H), 1,13 (dd, J=11,6, 7,0 Гц, 3H).

Препарат 1F. Этил-2-(4-(6-нитрохинолин-4-ил)циклогекс-3-ен-1-ил)пропаноат

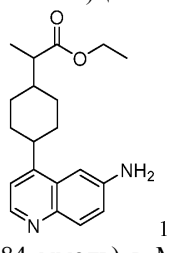


1F

350 мл запаянную пробирку заполняли смесью 4-хлор-6-нитрохинолина (2 г, 9,59 ммоль), препарата 1E (3,04 г, 9,88 ммоль), Na_2CO_3 (4,06 г, 38,4 ммоль) и $Pd(Ph_3P)_4$ (0,554 г, 0,479 ммоль) в диоксане (89 мл) и воде (29,6 мл). Реакцию нагревали при 100°C в течение ночи. Реакцию гасили водой и разводили с помощью EtOAc. Слои разделяли. Водную фазу экстрагировали с помощью EtOAc (3×). Органические слои объединяли, высушивали на Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали с получением коричневого остатка. Очистка сырого материала с помощью хроматографии на силикагеле с использованием аппарата ISCO (80 г колонка, 60 мл/мин, 0-45% EtOAc в гексанах в течение 19 мин, t_r=14 мин) давала препарат 1F (2,955 г, 8,34 ммоль, выход - 87%) в виде желтого остатка.

ESI MS $(M+H)^+$ = 355,2. t_r пика ВЭЖХ = 0,98 мин. Условия ВЭЖХ: A.

Препарат 1G. Этил-2-(4-(6-аминохинолин-4-ил)циклогексил)пропаноат

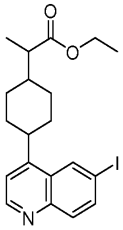


1G

К раствору препарата 1F (0,455 г, 1,284 ммоль) в MeOH (6,42 мл) добавляли формиат аммония (0,405 г, 6,42 ммоль) с последующим добавлением Pd/C (0,037 г, 0,347 ммоль). Реакцию нагревали при 70°C в течение 1 ч. Реакцию фильтровали через целит и осадок на фильтре отмывали с помощью CH_2Cl_2. Фильтрат концентрировали. Сырой материал помещали в EtOAc и отмывали с помощью насыщ. водн. раствора $NaHCO_3$ (2×). Органическую фазу высушивали на Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали с получением препарата 1G (379 мг, 90%) в виде коричневого остатка. ЯМР показал чистый требуемый продукт в соотношении диастереомеров 1,8:1.

ESI MS (масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением) $(M+H)^+$ = 327,3. t_r пика ВЭЖХ = 0,71 мин. Условия ВЭЖХ: A.

Препарат 1H. Этил-2-(4-(6-йодхинолин-4-ил)циклогексил)пропаноат



1H

Раствор препарата 1G (0,379 г, 1,161 ммоль) и водн. HCl (0,59 мл) в воде (2,1 мл) охлаждали до 0°C, затем к нему добавляли раствор нитрита натрия (0,096 г, 1,393 ммоль) в воде (2,1 мл). Раствор йодида калия (0,289 г, 1,742 ммоль) в воде (2,1 мл) добавляли по каплям к указанному выше раствору после полного растворения твердых веществ. После добавления смесь перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре, затем нагревали при 70°C в течение 1 ч. После охлаждения раствор нейтрализовали путем медленного добавления раствора $Na_2S_2O_3$ (1,81 мл), затем экстрагировали с помощью CH_2Cl_2 (2×). Органическую фазу отмывали водой, высушивали на Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали с получением коричневого остатка. Сырой материал растворяли в минимальном количестве CH_2Cl_2 и подвергали хроматографии. Очистка сырого материала с помощью хроматографии на силикагеле с использованием аппарата ISCO (40 г колонка, 40 мл/мин, 0-55% EtOAc в гексанах в течение 15 мин, t_r=10,5 мин) давала препарат 1H (92,7 мг, 0,212 ммоль, выход - 18,26%) в виде желтого остатка.

ESI MS $(M+H)^+$ = 438,1. t_r пика ВЭЖХ = 0,89 мин. Условия ВЭЖХ: A.

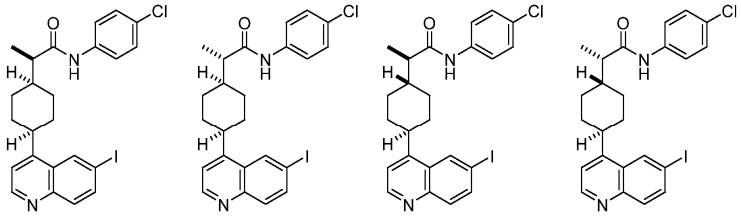
Пример 1A. (+/-)-цис- и транс-N-(4-Хлорфенил)-2-(4-(6-йодхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамид.

К раствору 4-хлоранилина (0,464 г, 3,64 ммоль) в THF (2,8 мл) при 0°C добавляли раствор хлорида изопропилмагния (1,820 мл, 3,64 ммоль). Полученный раствор нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 5 мин, затем по каплям добавляли препарат 1H (0,796 г, 1,820 ммоль) в THF (4,8 мл). Реакцию нагревали при 70°C в течение 2 ч, затем оставляли остывать до комнатной температуры. Добавляли дополнительный хлорид изопропилмагния (1,820 мл, 3,64 ммоль). Реакцию нагревали в течение дополнительных 2 ч. Реакцию гасили насыщ. водн. раствором NH_4Cl и разводили с помощью EtOAc. Слои разделяли. Водную фазу экстрагировали с помощью EtOAc (3×). Объединенные органические фазы высушивали на Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали с получением остатка. Очистка сырого материала с помощью хроматографии на силикагеле с использованием аппарата ISCO (80 г колонка, 60 мл/мин, 0-65% EtOAc в гексанах в течение 35 мин, t_r=27 мин) давала (+/-)-цис-изомер примера 1 (455 мг, 0,702 ммоль, выход - 39%) и (+/-)-транс-изомер примера 1 (111 мг, выход - 12%). Транс-диастереомер элюирует первым, а после него цис-диастереомер.

ESI MS $(M+H)^+$ = 519,1. t_r пика ВЭЖХ = 0,92 мин. Условия ВЭЖХ: A.

Пример 2.

N-(4-Хлорфенил)-2-(4-(6-йодхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамид



2

Приблизительно 65,1 мг диастереомерного и рацемического примера 1 разделяли. Изомерную смесь очищали с помощью препаративной SFC (сверхкритическая флюидная хроматография) со следующими условиями: колонка: OJ-H, внутренний диаметр 25×3 см, 5 мкм частицы; подвижная фаза A: 80/20 CO_2/MeOH; длина волны датчика: 220 нм; скорость потока: 150 мл/мин. Фракции ("Пик-1" t_r=4,64 мин, "Пик-2" t_r=5,35 мин, "Пик-3" t_r=6,43 мин) собирали в MeOH. Стереоизомерная чистота пика 1 и 2 по оценкам составляла больше чем 95% на основании хроматограмм препаративной SFC. Пик 3 повторно очищали с помощью препаративной SFC со следующими условиями с получением изомеров 3 и 4: колонка: Lux-Cellulose, внутренний диаметр 25×3 см, 5 мкм частицы; подвижная фаза A: 75/25 CO_2/MeOH; длина волны датчика: 220 нм; скорость потока: 180 мл/мин. Фракции ("Пик-1" t_r=7,63 мин и "Пик-2" t_r=8,6 мин) собирали в MeOH. Стереоизомерная чистота фракций по оценкам составляла больше чем 95% основании хроматограмм препаративной SFC. Каждый диастереомер или энантиомер дополнительно очищали с помощью препаративной ЖХ/МС (жидкостная хроматография с масс-спектрометрией):

Первый элюирующий изомер: Сырой материал очищали посредством препаративной ЖХ/МС со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм частицы; подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетата

аммония; градиент: 50-100% B за 20 мин, затем 5 мин удерживания при 100% B; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие требуемый продукт, объединяли и высушивали посредством испарения центрифугированием с получением изомера 1 (14,5 мг, 12%).

ESI MS $(M+H)^+$ = 519,2. t_r пика ВЭЖХ = 2,530 мин. Чистота = 92%. Условия ВЭЖХ: B. Абсолютная стереохимия не определена.

Второй элюирующий изомер: Сырой материал очищали посредством препаративной ЖХ/МС со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм частицы; подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 50-100% B за 20 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% B; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие требуемый продукт, объединяли и высушивали посредством испарения центрифугированием с получением изомера 2 (8,1 мг, 7,3%).

ESI MS $(M+H)^+$ = 519,1. t_r пика ВЭЖХ = 2,470 мин. Чистота = 100%. Условия ВЭЖХ: B. Абсолютная стереохимия не определена.

Третий элюирующий изомер: Сырой материал очищали посредством препаративной ЖХ/МС со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм частицы; подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 50-100% B за 20 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% B; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие требуемый продукт, объединяли и высушивали посредством испарения центрифугированием с получением изомера 3 (13,7 мг, 12%).

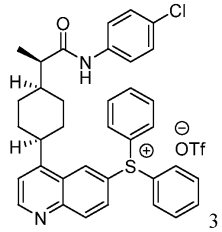
ESI MS $(M+H)^+$ = 519,1. t_r пика ВЭЖХ = 2,481 мин. Чистота = 97%. Условия ВЭЖХ: B. Абсолютная стереохимия не определена.

Четвертый элюирующий изомер: Сырой материал очищали посредством препаративной ЖХ/МС со следующими условиями: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм частицы; подвижная фаза A: 5:95 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза B: 95:5 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 50-100% B за 20 мин, затем 5-минутное удерживание при 100% B; скорость потока: 20 мл/мин. Фракции, содержащие требуемый продукт, объединяли и высушивали посредством испарения центрифугированием с получением изомера 4 (7,5 мг, 6,7%).

ESI MS $(M+H)^+$ = 518,9. t_r пика ВЭЖХ = 2,361 мин. Чистота = 99%. Условия ВЭЖХ: B. Абсолютная стереохимия не определена.

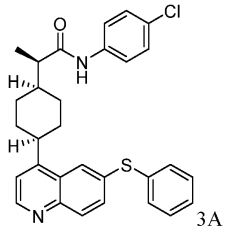
Пример 3.

(4-((1S,4S)-4-((R)-1-((4-Хлорфенил)амино)-1-оксопропан-2-ил)циклогексил)хинолин-6-ил)дифенилсульфонийтрифторметансульфонат



3

Препарат 3A. (R)-N-(4-Хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-(фенилтио)хинолин-4-ил)циклогексил)-пропанамид



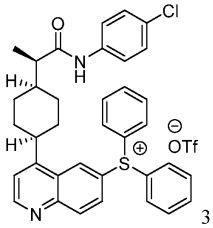
3A

Раствор трис-(дибензилиденацетон)дипалладия(0) (7,9 мг, 0,0086 ммоль) и (окси-бис-(2,1-фенилен)-бис=(дифенилфосфина) (14 мг, 0,026 ммоль) в толуоле (1,5 мл) перемешивали при окружающей температуре и дегазировали путем барботирования слабого потока азота через раствор в течение 5 мин. К раствору добавляли часть X (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-йодхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида (90 мг, 0,17 ммоль) и раствор дегазировали с помощью азота в течение дополнительных 3 мин. Тиофенол (0,20 мл, 0,21 ммоль) и трет-бутоксид калия (23,4 мг, 0,208 ммоль) добавляли и раствор нагревали при 100°C в течение 2 ч. Полученную смесь фильтровали через 0,2 мкм диск нейлоновой мембраны и загружали на 4 г кремнийдиоксидный картридж для очистки с использованием объединенной флэш-системы ISCO CombiFlash. УФ-обнаружение повергали мониторингу при 254 нм, и скорость потока этой очистки составляла 15 мл/мин. Используемые растворители нормальной фазы представляли собой растворитель A: гексан, растворитель B: этилацетат. С использованием линейного градиента: 0-25 мин от 0% B до 90% B, очищенный продукт элюировал при 17-24 мин. Объединенные фракции продукта испа-

ряли при пониженном давлении с получением требуемого продукта (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-(фенилтио)хинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида в виде желтого твердого вещества (промежуточное соединение 2) (80 мг, 0,16 ммоль).

ЖХ/МС m/z (M+H) теоретические значения: 501,17, 502,17, 503,17, 504,17; обнаруженные значения: 501,34, 502,30, 503,32, 504,34.

(4-((1S,4S)-4-((R)-1-((4-Хлорфенил)амино)-1-оксопропан-2-ил)циклогексил)хинолин-6-ил)дифенилсульфонийтрифторметансульфонат



3

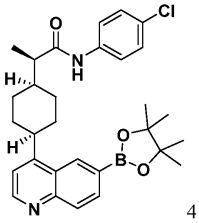
В 10 мл реакционную пробирку добавляли раствор (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-(фенилтио)хинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида из препарата 3A (80 мг, 0,16 ммоль) в хлорбензоле (1,5 мл). К раствору добавляли трифторметансульфоновую кислоту (0,028 мл, 0,32 ммоль), соль трифторметансульфонат дифенилйодония (172 мг, 0,399 ммоль) и бензоат меди (24,4 мг, 0,080 ммоль) и пробирку запаивали. Перемешанную смесь нагревали при 125°C в течение 1 ч. После концентрирования при пониженном давлении полученный остаток растворяли в ацетонитриле (2 мл) и подвергали очистке с помощью обращенно-фазовой полупрепаративной ВЭЖХ. Используемые условия очистки представляли собой следующее: скорость потока, составляющая 18 мл/мин с колонкой для ЖХ LUNA C18 21,1×250 мм, 5 мкм со следующими растворителями: растворители A: 0,1% трифторуксусная кислота в воде, растворители B: 0,1% трифторуксусная кислота в ацетонитриле, и УФ-обнаружение подвергали мониторингу при 254 нм. С использованием градиента: 0-12 мин, от 15% B до 95% B, очищенный продукт элюировал при 11,5 мин. Объединенные фракции продукта испаряли при пониженном давлении и полученный остаток растворяли в метиленхлориде (20 мл). Этот раствор отмывали последовательно водным 1н. раствором гидроксида натрия, насыщенным водным раствором трифторметансульфоната натрия (5 мл) и водой (15 мл). Органический слой высушивали на безводном сульфате магния. Удаление растворителя при пониженном давлении давало на выходе требуемый продукт (4-((1S,4S)-4-((R)-1-((4-хлорфенил)амино)-1-оксопропан-2-ил)циклогексил)хинолин-6-ил)дифенилсульфонийтрифторметансульфонат в виде бежевого твердого вещества (73 мг, 0,090 ммоль).

^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 10,09 (br s, 1H, N-H), 9,13 (d, 1H, J=4,7 Гц), 8,69 (d, 1H, J=2,0 Гц), 8,35 (d, 1H, J=9,1 Гц), 7,99 (dd, 1H, J=9,1, 2,0 Гц), 7,89 (m, 6H), 7,80 (m, 4H), 7,72 (d, 1H, J=4,7 Гц), 7,65 (d, 2H, J=8,9 Гц), 7,36 (d, 2H, J=8,9 Гц), 2,83 (m, 1H), 1,98-1,82 (m, 5H), 1,71-1,49 (m, 5H), 1,14 (d, 3H, J=6,7 Гц);

ЖХ/МС m/z (M+H,) теоретические значения: 577,21, 578,21, 579,20, 580,21; обнаруженные значения: 577,40, 578,40, 579,38, 580,36.

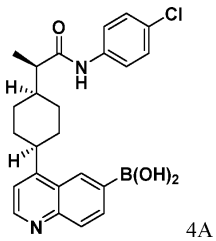
Пример 4.

(R)-N-(4-Хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)хинолин-4-ил)циклогексил)пропанамид



4

Препарат 4A. (4-((1S,4S)-4-((R-Хлорфенил)амино)-1-оксопропан-2-ил)циклогексил)хинолин-6-ил)бороновая кислота



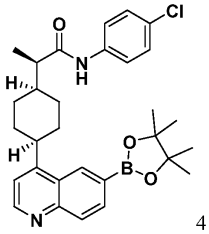
4A

(R)-N-(4-Хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-йодхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамид из примера 2 (55 мг, 0,106 ммоль) растворяли в этаноле (5 мл). Добавляли тетрагидроксибор (38 мг, 0,424 ммоль, 4 экв.), 2-(дициклогексилфосфино)-2',4',6'-триизопропилбифенил (20,2 мг, 0,042 ммоль, 0,4 экв.), ацетат

калия (52 мг, 0,530, 5 экв.) и хлор(2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил)[2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладий(II). Реакционную смесь дегазировали в течение 5 мин, герметично закрывали и нагревали до 55°C в течение 2 ч. Смесь концентрировали и повторно растворяли в смеси ацетонитрила и 0,1% TFA для препаративной ВЭЖХ. Очистка на колонке Luna C18 (2) с элюированием в 20-90% смеси ацетонитрила и 0,1% TFA давала на выходе, после сбора и объединения чистых фракций и лиофилизации, 22,4 мг (4-((1S,4S)-4-((R-хлорфенил)амино)-1-оксопропан-2-ил)циклогексил)хинолин-6-ил)бороновой кислоты (1A) в виде белого твердого вещества.

ЖХ/МС: расчетное значение (M+ 436, 437, 439); обнаруженное значение (M+ 436,5, 437,5, 439,4).

(R)-N-(4-Хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)хинолин-4-ил)циклогексил)пропанамид



4

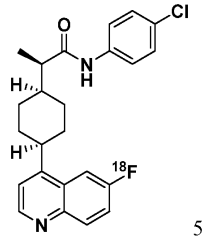
(4-((1S,4S)-4-((R-Хлорфенил)амино)-1-оксопропан-2-ил)циклогексил)хинолин-6-ил)бороновую кислоту (4A) (22,2 мг, 0,051 ммоль) растворяли в 7 мл метиленхлорида. 2,3-диметилбутан-2,3-диол (7,8 мг, 1,25 экв.) добавляли вместе с 12 молекулярными ситами. Реакцию перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакцию фильтровали и фильтр отмывали с помощью метиленхлорида (2 мл). Концентрирование давало на выходе 20,4 мг (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)хинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида.

ЖХ/МС: расчетное значение (M+ 518,0, 519,0, 521); обнаруженное значение (M+ 518,5, 519,5, 521,5).

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц), δ 8,9 (d, 1H), 8,65 (s, 1H), 8,1 (m, 2H), 7,6-7,5 (m, 3H), 7,4-7,3 (m, 2H), 3,5 (m, 1H), 2,7 (m, 1H), 2,2-2,1 (m, 1H), 1,9-1,8 (m, 6H), 1,4 (d, CH_3, 12H), 1,3 (d, CH_3, 3H), 1,3-1,2 (m, 2H).

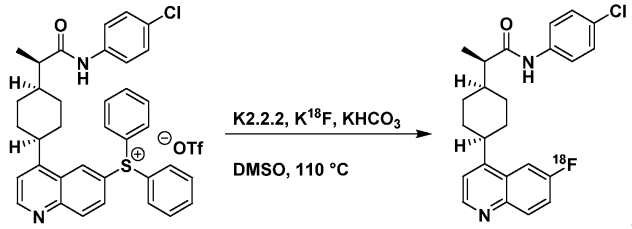
Пример 5.

[^{18}F](R)-N-(4-Хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамид



5

Пример 5A. [^{18}F](R)-N-(4-Хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамид посредством примера 3

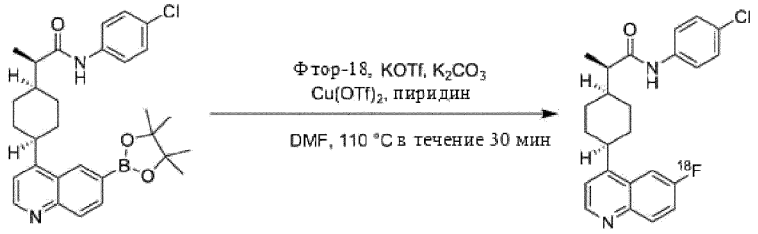


5A

Водный раствор [^{18}F]-фторида (2,0 мл, 28,7 ГБк/775 мКи) приобретали в Siemens' PETNET Solutions в Hackensack, NJ и напрямую переносили в QMA Sep-Pak [картридж Sep-Pak light QMA (Waters, партия № 186004540) предварительно подготовили последовательно с помощью 5 мл 8,4% раствора бикарбоната натрия, 5 мл стерильной воды и 5 мл ацетонитрила перед использованием] в специально разработанном дистанционно управляемом блоке синтеза на BMS в Wallingford, CT. По окончании этого переноса водный [^{18}F] фторид извлекали из QMA Sep-Pak путем добавления смеси 225 мл водного раствора, содержащего 30 мМ бикарбоната калия (4,5 мг, 0,045 ммоль) и 30 мМ 4,7,13,16,21,24-гексаокса-1,10-диазабицикло[8.8.8]гексакозана (17,0 мг, 0,045 ммоль) и 1,275 мл ацетонитрила. Растворитель испаряли при слабом потоке азота при 100°C и в условиях вакуума. Обезвоживание азеотропной перегонкой повторяли дважды с помощью 1 мл частей ацетонитрила для получения безводного комплекса K.2.2.2/K^{18}F. По окончании этого процесса криптанд дополнительно высушивали при полном вакууме в течение 20 мин периода. (4-((1S,4S)-4-((R)-1-((4-Хлорфенил)амино)-1-оксопропан-2-ил)циклогексил)хинолин-6-ил)дифенилсульфонийтрифторметансульфонат (2,1 мг, 2,8 мкмоль) растворяли в безводном DMSO (1 мл) и добавляли к высушенному криптанду. Этот раствор нагревали при 110°C в течение 15 мин. По

прошествии этого времени сырую реакционную смесь разводили с помощью 7 мл стерильной воды и 1 мл ацетонитрила. Все содержимое переносили на Sep-Pak tC18 (400 мг tC18, объемом 0,8 мл, Waters, № партии WAT036810). Sep-Pak промывали стерильной водой (2 мл) для удаления непрореагировавшего фторида и затем продукт элюировали из Sep-Pak с помощью 2 мл ацетонитрила. Ацетонитрил разводили с помощью стерильной воды (2 мл) и хорошо смешивали. Раствор переносили на петлевой дозатор для ВЭЖХ и очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (колонка ВЭЖХ: Agilent Zorbax SB-C18, 250×10 мм, 5 мкм. Растворитель А: вода с 0,05% TFA. Растворитель В: ацетонитрил с 0,05% TFA. Условия: 60% А, 0-15 мин; 60-0% А, 15-25 мин; 0% А, 25-30 мин. Скорость потока 4 мл/мин. УФ - 232 нм. Gamma-RAM использовали для радиохимического обнаружения). [^{18}F](R)-N-(4-Хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамид собирали в течение приблизительно 1 мин периода при 18,1 мин в хроматограмме. Этот продукт собирали в 50 мл колбу, которая содержала 25 мл стерильной воды, и все содержимое переносили на картридж Sep-Pack light C18 (130 мг C18, объем - 0,3 мл, Waters, № партии WAT023501). Sep-Pak промывали с помощью 1 мл стерильной воды и продукт извлекали с помощью 0,5 мл безводного этанола. Раствор [^{18}F](R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамид в этаноле анализировали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (колонка: Agilent Zorbax SB-C18, 250×4,6 мм, 5 мкм. Растворитель А: вода с 0,05% TFA. Растворитель В: ацетонитрил с 0,05% TFA. Условия: 58% А, 0-15 мин; 58-0% А, 15-25 мин; 0% А, 25-30 мин. Скорость потока 1 мл/мин. УФ - 232 нм. Gamma-RAM использовали для радиохимического обнаружения, время удерживания составляло 13,2 мин, радиохимическая чистота составляла 100%). Меченый продукт элюировал вместе с аутентичным стандартом - (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамидом. Хиральную чистоту анализировали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (колонка: Daicel ChiralCel OD-RH, 150×4,6 мм. 5 мкм. Растворитель А: вода. Растворитель В: ацетонитрил. Условия: 40% А, 0-13 мин; 40-20% А, 13-14 мин; 20% А, 14-16 мин; 20-40% А, 16-17 мин; 40% А, 17-20 мин. Скорость потока 1 мл/мин. УФ - 232 нм. Gamma-RAM использовали для радиохимического обнаружения, время удерживания составляло 7,7 мин, хиральная радиохимическая чистота составляла 100%). Меченый материал давал только один пик при совместном введении в качестве пробы с аутентичным стандартом - (R,S)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)-пропанамидом. Общая активность, выделенная в конце синтеза, составляла 4,78 мКи (176,9 МБк), и специфическая активность составляла 7,15 мКи/нмоль.

Пример 5В. [^{18}F](R)-N-(4-Хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамид посредством примера 4



5В

Автоматизированный синтез с использованием коммерческого модуля синтеза Synthera (IBA) и специально разработанной системы ВЭЖХ. Автоматизированный синтез [^{18}F](R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида проводили с использованием модуля синтеза IBA Synthera кассетного типа с соответствующим образом собранным комплектом жидкостного процессора интегратора для реакции с последующим переносом на специально разработанную автоматизированную систему для очистки ВЭЖХ и преобразования. Комплект жидкостного процессора интегратора (IFP) и специально разработанную систему загружали соответствующими предшественниками для этого синтеза и обобщали в таблице, схема этой системы показана на фиг. 1. Очистку проводили на блоке ВЭЖХ Varian с помощью заполнения петлевого дозатора, управляемого постоянным потоком азота.

Водный раствор [^{18}F] фторида (2,0 мл, 59,2 ГБк/1,6 Ки) доставляли на Sep-Pak light 46 мг QMA, который подготавливали предварительно. После завершения переноса водный [^{18}F] фторид извлекали из QMA Sep-Pak путем добавления смеси для элюирования (из "V1") в реактор. Растворитель испаряли при слабом потоке азота и под действием вакуума. Затем раствор предшественника (из "V2") добавляли к высушенному фториду-18 и нагревали при 110°C в течение 30 мин. После его разведения с помощью 2,5 мл дистиллированной воды и 1,5 мл ацетонитрила (из "V4") следовал перенос во флакон для промежуточного соединения (на "пре-ВЭЖХ").

Смесь затем загружали на 5 мл петлевой дозатор образцов, затем на колонку для полупрепаративной ВЭЖХ. Сильным напором струи смеси 40% ацетонитрила в водном 0,1% растворе трифторуксусной кислоты промывали колонку со скоростью, составляющей 4,0 мл/мин, при давлении 1850 фунтов/кв. дюйм, УФ - 220 нм. Продукт выделяли из 22-24 мин в колбу для разведения, которая содержала 30 мл дистиллированной воды. Все содержимое переносили на картридж для экстракции твердой фазы C18, который предварительно активировали, затем извлекали с помощью 1 мл этанола (из "V5") во флакон для продукта с 4 мл водного раствора хлорида натрия для получения 20% этанола в рас-

творе хлорида натрия для введения пробы. 31,2 мКи (1,15 ГБк) [^{18}F](R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида.

Этот продукт анализировали посредством обращенно-фазовой ВЭЖХ и химически идентифицировали с помощью совместного введения пробы нерадиоактивного эталонного стандарта - (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида радиохимическую чистоту, химическую чистоту и специфическую активность. Выделенный продукт, который совместно элюировали с нерадиоактивным эталонным стандартом при 16 мин, являлся на 99% радиохимически и 95% химически чистым, со специфической активностью, составляющей 0,38 ГБк/нмоль (10,47 мКи/нмоль). Продукт анализировали посредством хиральной ВЭЖХ: хиральная чистота с помощью совместного введения пробы нерадиоактивных эталонных стандартов (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида (10 мин) и (S)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида (11,5 мин). Выделенный продукт элюировал вместе с нерадиоактивным эталонным стандартом при 10 мин с ее: >99,5%.

Флакон 1 (V1)	6 мг трифторметансульфоната калия 1,5 мг карбоната калия 0,5 мл дистиллированной воды 1,0 мл ацетонитрила
QMA	Картридж Sep-Pak Accell Plus QMA Carbonate Plus Light Cartridge, 46 мг, 40 мкм частицы (Waters: PN 186004540) Предварительно подготовленный с помощью следующего: 1) 10 мл этанола 2) 900 мг трифторметансульфоната калия в 10 мл дистиллированной воды 3) 10 мл дистиллированной воды
Флакон 2 (V2)	2 мг (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)хинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида 7 мг трифторметансульфоната меди (II) 40 мкл пиридина 0,7 мл N,N-диметилформамида
Флакон 4 (V4)	2,5 мл дистиллированной воды 1,5 мл ацетонитрила
Колонка ВЭЖХ	Phenomenex Luna, 5 мкм C18(2) 100 Å, 250 × 10 мм (PN 00G-4252-N0)
Растворитель ВЭЖХ	40% ацетонитрила в водном 0,1% растворе трифторуксусной кислоты
Скорость потока ВЭЖХ	4,0 мл/мин
Колба для разведения	30 мл дистиллированной воды
Картридж	Phenomenex Strata C18-U (55 мкм, 70Å), 100 мг/1 мл пробирка (PN 8B-S002-EAK) Предварительно подготовленный с помощью следующего: 5 мл этанола 2) 10 мл дистиллированной воды
Флакон 5 (V5)	1 мл этанола
Флакон для продукта	4 мл водного раствора хлорида натрия

Пример 6.

In vivo визуализация ПЭТ с помощью [^{18}F](R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида в экспрессирующей IDO1 ксенотрансплантатной модели опухоли у мышей.

[^{18}F](R)-N-(4-Хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамид исследовали для подтверждения его свойств в качестве радиоактивного лиганда ПЭТ для IDOL [^{18}F](R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамид исследовали в отношении его специфичности и нацеливающего воздействия в отношении фермента IDO1 с использованием визуализации ПЭТ моделей опухоли мыши M109. Модель опухоли M109 создавали из клеточной линии карциномы легкого мыши, она экспрессирует высокие уровни IDOL Ксенотрансплантатные модели опухоли создавали, имплантируя 1×10^6 клеток M109 подкожно на правое плечо мышей BALB/c. После имплантации опухоли росли в течение 5 дней до начала исследований. 45 мышей с имплантированными ксенотрансплантатами M109 разделили на четыре группы.

В группе 1 - 12 животных получали 6 мг/кг (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида (n=12), в группе 2 - 12 животных получали 60 мг/кг (R)-N-(4-хлорфенил)-2-

((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида (n=12), в группе 3 - 11 животных получали 150 мг/кг (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида (n=11) и в группе 4 - 10 животных получали несущую среду - водный раствор хлорида натрия (n=10).

Дозирование и лечение устанавливали на основании известного фармакологического эффекта и лечение вводили PO, один раз в день, в течение 4 или 5 дней. Всех животных подвергали сканированию ПЭТ после лечения с помощью последней дозы (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида или несущей среды, введенных за 2 ч до визуализации ПЭТ. 150 мкКи 10% раствора этанола в стерильном водном растворе хлорида натрия для инъекции, содержащем [^{18}F](R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамид, вводили с помощью внутривенной инъекции за 1 ч до визуализации ПЭТ для обеспечения распределения метки и накопления в опухоли. Точную вводимую с помощью инъекции дозу рассчитывали путем вычитания скорректированной на радиоактивный распад активности остатка в шприце после инъекции из общей измеренной дозы в шприце до инъекции. Для визуализации ПЭТ мышей подвергали анестезии с помощью изофлурана и помещали в специальный держатель для животных, рассчитанный на 4 животных. Температуру тела поддерживали с помощью электрогрелки, а анестезию поддерживали с помощью 1,5% изофлурана в течение всего времени визуализации. Визуализацию ПЭТ выполняли на специализированном сканере microPET® F120™ и сканере F220™ (Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, TN). 10-минутную трансмиссионную сканограмму выполняли с использованием источника ^{57}Co для коррекции экранирования конечных изображений ПЭТ, после чего следовало 10-минутное сканирование статическим излучением. Либо до, либо после визуализации ПЭТ сканирование КТ (X-SPECT, Gamma Medica) или сканирование МРТ (Bruker) проводили для анатомической ориентации во время анализа изображений. Изображения ПЭТ восстанавливали с использованием алгоритма максимальной апостериорной гипотезы (MAP) с коррекцией экранирования с использованием собранных трансмиссионных изображений. Анализ изображений проводили с использованием программного обеспечения для анализа изображений AMIDE. Изображения ПЭТ регистрировали совместно с соответствующими им изображениями КТ или МРТ и исследуемые области (ROI) рисовали вручную вокруг границ опухоли и мышц с использованием изображений КТ или МРТ в качестве анатомических ориентиров. Процентное отношение критерия эффективности введенной дозы/г ткани (% ID/г) получали из объема ROI и рассчитанной введенной активности, скорректированной на радиоактивный распад на начало сканирования излучения. Накопление метки в опухолях из получивших лечение с помощью (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)-пропанамида групп сравнивали с накоплением метки в группах, получивших несущую среду, и мышечной тканью. Мышечную ткань использовали в качестве эталонной области для оценки неспецифического связывания, поскольку экспрессия IDO1 в этой ткани является незначительной. В группах 1-3, которые получали лечение с помощью (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)-пропанамида (6-150 мг/кг) перед визуализацией, получали зависимое от дозы уменьшение накопления метки по сравнению с получившей несущую среду группой (фиг. 2A). В мышечной эталонной ткани лечение не оказывало никакого эффекта на метку, что согласуется с отсутствием экспрессии IDO1 в этих тканях (фиг. 2B). В подгруппе животных (несущая среда; n=7, 6 мг/кг; n=7, 60 мг/кг; n=8, 150 мг/кг; n=8) опухоль и сыворотку собирали для измерения содержаний лекарственного средства (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида, триптофана и кинуренина в сыворотке и опухоли. Для этих исследований мыши получали одну дополнительную дозу (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида или несущей среды через день после визуализации. Через 7 ч после последней дозы (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида мышей умерщвляли и опухоли и сыворотку собирали и обрабатывали в отношении маркеров. Как показано на фиг. 2A, наблюдали корреляцию между сигналом метки в пределах опухолей M109 и концентрацией (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида. Поскольку концентрация в сыворотке (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида (фиг. 2D) увеличивается с повышением вводимой дозы, % ID/г в опухоли снижается зависимым от дозы образом. Ингибирование кинуренинового пути, измеряемое по соотношению кинуренина к триптофану (Kyn/Trp) в опухолях, показано на фиг. 2C. Зависимое от дозы снижение соотношения кинуренина к триптофану наблюдали в опухолях в группах, получивших лечение с помощью (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида, по сравнению с получившей несущую среду группой и следовало той же тенденции, что и % ID/г, измеренное из данных визуализации ПЭТ. Эти результаты подтверждают специфичность и нацеленное воздействие на IDO1 со стороны [^{18}F](R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)-пропанамида in vivo, а также демонстрируют применимость [^{18}F](R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида в качестве радиоактивного лиганда ПЭТ для этой мишени. Авторы настоящего изобретения продемонстрировали смещение метки с помощью (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида в зависимости от дозы в экспрессирующих IDO1 опухолях M109. Более того, полученные результаты визуализации коррелировали с зависимым от дозы фармакодинамическим эффектом в опухолях и фармакокинетикой в сыворотке, тем самым подтверждая как специфичность, так и связывание с мишенью [^{18}F](R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-

фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида in vivo.

Пример 7.

In vivo визуализация ПЭТ с помощью [^{18}F](R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида в экспрессирующей IDO1 ксенотрансплантатной модели опухоли у мышей на исходном уровне и после лечения с помощью ингибитора IDO1.

[^{18}F](R)-N-(4-Хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамид исследовали в модели опухоли мыши M109 на исходном уровне и после лечения с помощью ингибитора IDO1, (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида. Модель опухоли M109 создавали из клеточной линии карциномы легкого мыши, она экспрессирует высокие уровни IDO1. Ксенотрансплантатные модели опухоли создавали, имплантируя 1×10^6 клеток M109 подкожно на правое плечо мышей BALB/c. После имплантации опухоли росли в течение 5 дней до начала исследований. 16 мышей с имплантированными ксенотрансплантатами M109 разделили на четыре группы.

В группе 1 - 4 животных получали 6 мг/кг (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида (n=12), в группе 2 - 4 животных получали 60 мг/кг (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида (n=12), в группе 3 - 4 животных получали 150 мг/кг (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида (n=11) и в группе 4 - 4 животных получали несущую среду - водный раствор хлорида натрия (n=10).

Дозирование и лечение устанавливали на основании известного фармакологического эффекта и лечение вводили PO, один раз в день, в течение 4 или 5 дней. Всех животных подвергали двум отдельным сканированиям ПЭТ. Первое представляло собой сканирование ПЭТ на исходном уровне до начала лечения, и второе представляло собой сканирование после лечения либо с помощью ингибитора IDO1, либо несущей среды. Лечение вводили PO один раз в день в течение 5 дней с последней дозой, введенной за 2 ч до сканирования ПЭТ после лечения. 150 мкКи 10% раствора этанола в стерильном водном растворе хлорида натрия для инъекции, содержащем [^{18}F](R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамид, вводили с помощью внутривенной инъекции за 1 ч до визуализации ПЭТ для обеспечения распределения метки и накопления в опухоли. Точную вводимую с помощью инъекции дозу рассчитывали путем вычитания скорректированной на радиоактивный распад активности остатка в шприце после инъекции из общей измеренной дозы в шприце до инъекции. Для визуализации ПЭТ мышей подвергали анестезии с помощью изофлурана и помещали в специальный держатель для животных, рассчитанный на 4 животных. Температуру тела поддерживали с помощью электрогрелки, а анестезию поддерживали с помощью 1,5% изофлурана в течение всего времени визуализации. Визуализацию ПЭТ выполняли на специализированном сканере microPET® F120™ и сканере F220™ (Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, TN). 10-минутную трансмиссионную сканограмму выполняли с использованием источника ^{57}Co для коррекции экранирования конечных изображений ПЭТ, после чего следовало 10-минутное сканирование статическим излучением. Либо до, либо после визуализации ПЭТ сканирование КТ (X-SPECT, Gamma Medica) или сканирование МРТ (Bruker) проводили для анатомической ориентации во время анализа изображений. Изображения ПЭТ восстанавливали с использованием алгоритма максимальной апостериорной гипотезы (MAP) с коррекцией экранирования с использованием собранных трансмиссионных изображений. Анализ изображений проводили с использованием программного обеспечения для анализа изображений AMIDE. Изображения ПЭТ регистрировали совместно с соответствующими им изображениями КТ или МРТ и исследуемые области (ROI) рисовали вручную вокруг границ опухоли и мышц с использованием изображений КТ или МРТ в качестве анатомических ориентиров. Процентное отношение критерия эффективности введенной дозы/г ткани (% ID/г) получали из объема ROI и рассчитанной введенной активности, скорректированной на радиоактивный распад на начало эмиссионного сканирования. Накопление метки в опухолях из получивших лечение с помощью (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида групп сравнивали с группами, получившими лечение с помощью несущей среды, и мышечной тканью. Мышечную ткань использовали в качестве эталонной области для оценки неспецифического связывания, поскольку экспрессия IDO1 в этой ткани является незначительной. Не наблюдали никаких различий в накоплении метки на исходном уровне в опухолях M109 между любыми группами. Как показано на фиг. 3, зависимое от дозы снижение накопления метки наблюдали в получивших лечение с помощью (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида (6-150 мг/кг) группах по сравнению с получившей лечение с помощью несущей среды группой. Накопление метки не изменялось между визуализацией на исходном уровне и визуализацией после лечения в получившей лечение с помощью несущей среды группе. Накопление метки в мышечной эталонной ткани не подвергалось воздействию со стороны лечения и не различалось между визуализацией на исходном уровне и визуализацией после лечения для любой из групп. В совокупности эти результаты подтверждают нацеливающее воздействие на IDO1 со стороны [^{18}F](R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида in vivo, а также демонстрируют осуществимость дизайна исследования с использованием исходного уровня и состояния после лечения, который используют в клинической практике для оценки корреляции между воздействием лекарственного средства/занятости мишени in vivo и эффективностью терапевтического ле-

карственного средства.

Пример 8.

Сравнение накопления метки в экспрессирующей IDO1 на высоком и низком уровнях модели опухоли.

Для сравнения способности проводить различия в уровнях экспрессии IDO1 авторы настоящего изобретения представили дополнительную модель мыши с опухолями CT26. Модель опухоли CT26 создавали из клеточной линии карциномы толстой и прямой кишки мыши, и она экспрессирует более низкие уровни IDO1, чем модель M109. Ксенотрансплантатные модели опухоли создавали, имплантируя 1×10^6 клеток CT26 подкожно на правое плечо мышей BALB/c. После имплантации опухоли росли в течение 7 дней до начала исследований. Мыши получали дозу несущей среды в течение 5 дней перед визуализацией, и дозирование и визуализацию проводили точно так же, как описано в примере 6 для подтверждения того, что исследования M109 и CT26 являются сопоставимыми. Как показано на фиг. 4, повышенный показатель % ID/г наблюдали в ксенотрансплантатных опухолях мыши M109 по сравнению с % ID/г в ксенотрансплантатных опухолях мыши CT26, что согласуется с уровнем экспрессии IDO1 соответственно в указанных моделях.

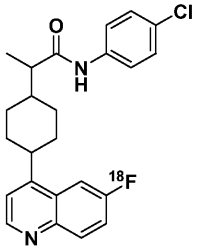
Пример 9.

Биораспределение у не являющего человеком примата.

Исследование визуализации ПЭТ проводили на яванском макаке для оценки биораспределения и фонового сигнала [^{18}F](R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида у не являющего человеком примата. Самцу яванского макака (3,5 кг) проводили анестезию посредством коктейля из 0,02 мг/кг атропина и 5 мг/кг телазола, 0,01 мг/кг бупренорфина и поддерживали ее с помощью 1-2% изофлурана в течение всего исследования. Температуру тела поддерживали при ~37°C с использованием водяной кровати с внешней циркуляцией для предотвращения гипотермии во время визуализации. Обезьяну интубировали и вводили катетер в подкожную вену для обеспечения инъекции радиоактивной метки. 1,2 мКи 10% этанола в стерильном водном растворе хлорида натрия для инъекции, содержащем [^{18}F](R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида, вводили с помощью внутривенной инъекции и обезьяну помещали в специальный держатель для животных, совместимый как со сканером МРТ, так и со сканером ПЭТ (сканер F220™, Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, TN). Обезьяну помещали в сканер МРТ для анатомической визуализации. Получали три осевых изображения МРТ высокого разрешения для полного охвата тела, начиная с головы и заканчивая задними лапами. После МРТ обезьяну переносили на сканер ПЭТ. Осевое поле изображения в системе ПЭТ составляет 7,6 см. С этим ограничением изображения получали в 7 различных положениях кровати, чтобы охватить все тело с перекрытием 1,5 см между положениями кровати. Перед эмиссионной сканограммой получали 10-минутную трансмиссионную сканограмму для каждого положения кровати для коррекции экранирования конечных изображений ПЭТ. Сразу после сбора конечной трансмиссионной сканограммы кровать возвращали в положение 1 и радиоактивную метку вводили с помощью инъекции через катетер в подкожной вене одновременно с началом первого эмиссионного сканирования. Для эмиссии получали в общей сложности пять сканирований всего тела с использованием 5-минутных измерений эмиссии для каждого положения кровати. Изображения восстанавливали с использованием алгоритма MAP с коррекцией экранирования. Положения кроватей объединяли для получения изображения всего тела с использованием программного обеспечения для объединения, разработанного самостоятельно, и изображения ПЭТ и МРТ регистрировали совместно с использованием программного обеспечения AMIDE. Окончательные изображения визуально проверяли, чтобы отметить области с высоким накоплением метки и оценить биораспределение и фоновый сигнал. Метка накапливалась в печени и желчном пузыре, что соответствует ожидаемому пути экскреции. В других областях не наблюдали заметное накопление [^{18}F](R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамида, и фоновый сигнал являлся минимальным, как показано на фиг. 5. Этот результат демонстрирует, что у не являющегося человеком примата обнаружен низкий фоновый сигнал, и должны генерироваться высокие соотношения сигнал/шум, когда экспрессия IDO1 увеличивается в микроокружении опухоли для визуализации у человека.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

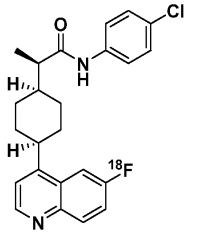
1. Меченное радиоактивным изотопом соединение, имеющее следующую формулу I:



I

или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Меченное радиоактивным изотопом соединение по п.1, имеющее следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Фармацевтическая композиция для визуализации тканей, которые экспрессируют индоламин-2,3-диоксигеназу (IDO1), содержащая диагностически эффективное количество меченного радиоактивным изотопом соединения по п.2 и фармацевтически приемлемый носитель.

4. Применение меченного радиоактивным изотопом соединения по п.2 для обнаружения раковых клеток, которые экспрессируют IDO1, путем визуализации in vivo распределения указанного меченного радиоактивным изотопом соединения с помощью сканирования позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ).

5. Способ скрининга не меченного радиоактивным изотопом соединения для определения его аффинности в отношении занятости сайта связывания фермента IDO1 в ткани млекопитающего, предусматривающий следующие стадии:

(a) введение меченного радиоактивным изотопом соединения по п.2 субъекту;

(b) визуализация in vivo тканей с известной экспрессией IDO1 с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) для определения исходного накопления меченного радиоактивным изотопом соединения;

(c) введение не меченного радиоактивным изотопом соединения указанному субъекту;

(d) введение второй дозы меченного радиоактивным изотопом соединения по п.2 указанному субъекту;

(e) визуализация in vivo распределения меченного радиоактивным изотопом соединения по п.2 в тканях, которые экспрессируют ферменты IDO1;

(f) сравнение сигнала из данных сканирования ПЭТ на исходном уровне в ткани, которая экспрессирует IDO1, с данными сканирования ПЭТ, полученными после введения не меченного радиоактивным изотопом соединения в ткани, которая экспрессирует ферменты IDO1,

где не меченное радиоактивным изотопом соединение представляет собой (R)-N-(4-хлорфенил)-2-((1S,4S)-4-(6-фторхинолин-4-ил)циклогексил)пропанамид.

6. Способ мониторинга лечения пациента с раком, которого лечат с помощью ингибитора IDO1, предусматривающий следующие стадии:

(a) введение пациенту меченного радиоактивным изотопом соединения по п.2;

(b) получение изображения тканей у пациента, которые экспрессируют ферменты IDO1, с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ); и

(c) обнаружение, в какой степени указанный меченный радиоактивным изотопом ингибитор IDO1 занимает активный сайт фермента IDO1.

7. Применение меченного радиоактивным изотопом соединения по п.2 для получения изображения тканей, содержащих ферменты IDO1, с использованием визуализации позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ).

8. Применение по п.7, при котором соединение обнаруживают in vitro.

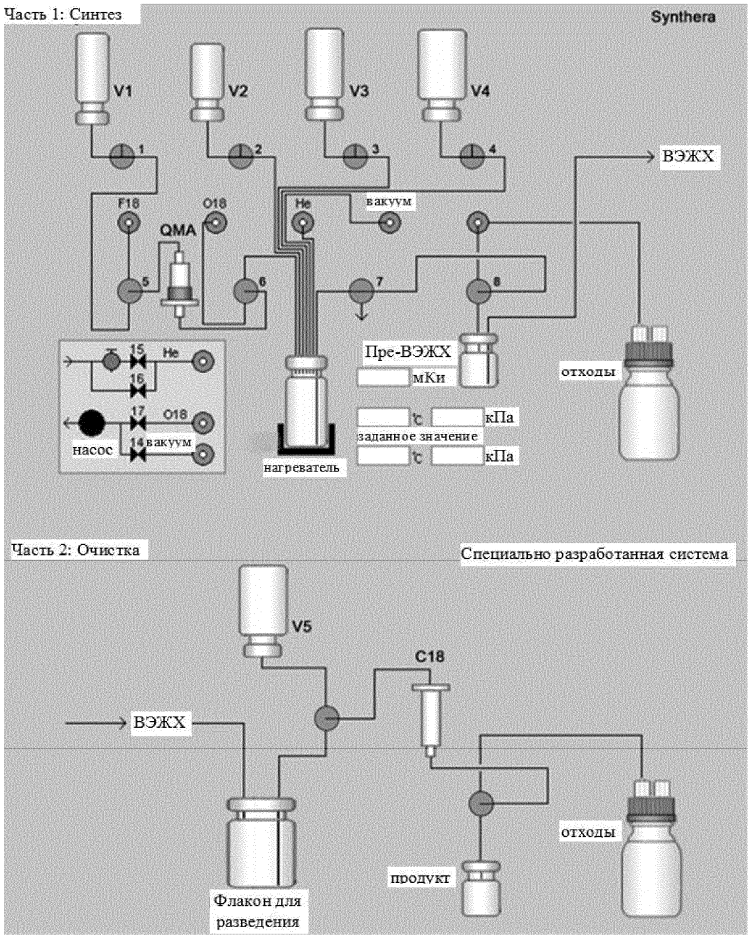
9. Применение по п.7, при котором соединение обнаруживают in vivo.

10. Применение меченного радиоактивным изотопом соединения по п.2 для диагностики заболевания, опосредованного экспрессией IDO1, у субъекта.

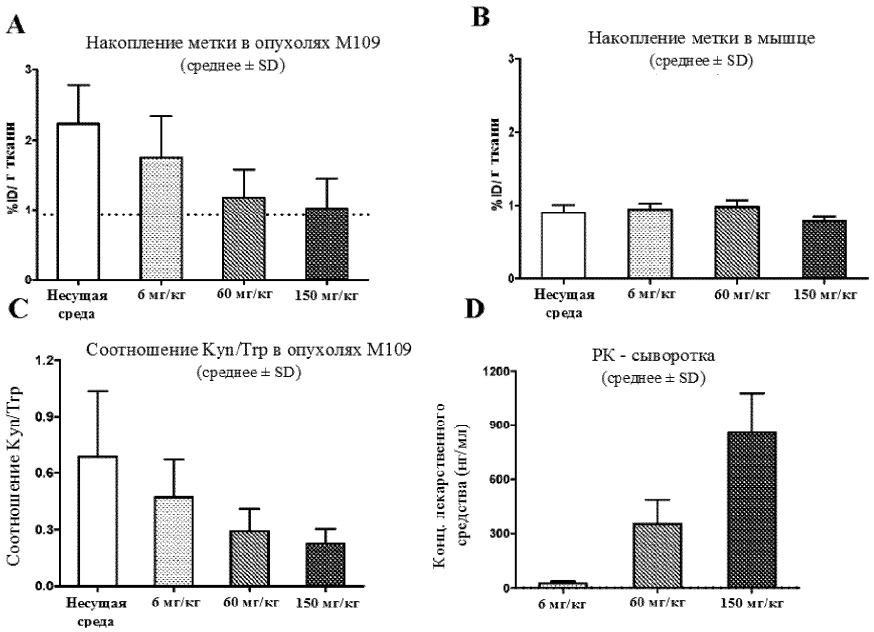
11. Способ количественного определения пораженных клеток или тканей у субъекта, предусматривающий следующие стадии:

(a) введение субъекту, характеризующемуся наличием пораженных клеток или тканей, меченного радиоактивным изотопом соединения по п.2, которое связывается с ферментом IDO1, находящимся в пораженных клетках или тканях; и

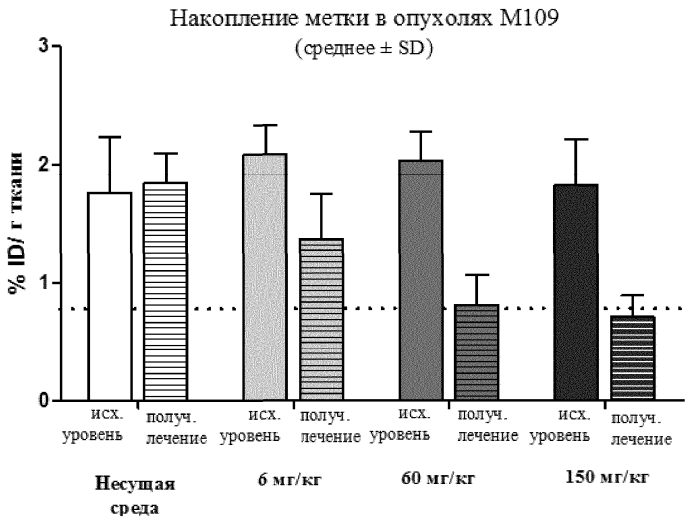
(b) обнаружение радиоактивных излучений указанного меченного радиоактивным изотопом соединения в пораженных клетках или тканях, причем уровень и распределение радиоактивных излучений в пораженных клетках или тканях представляет собой количественный показатель пораженных клеток или тканей.



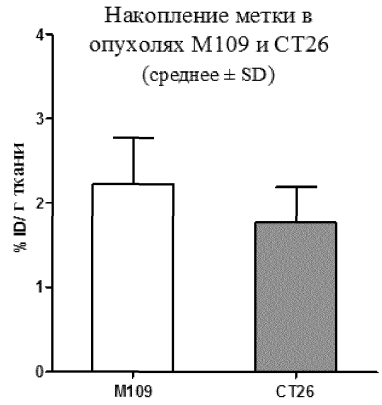
Фиг. 1



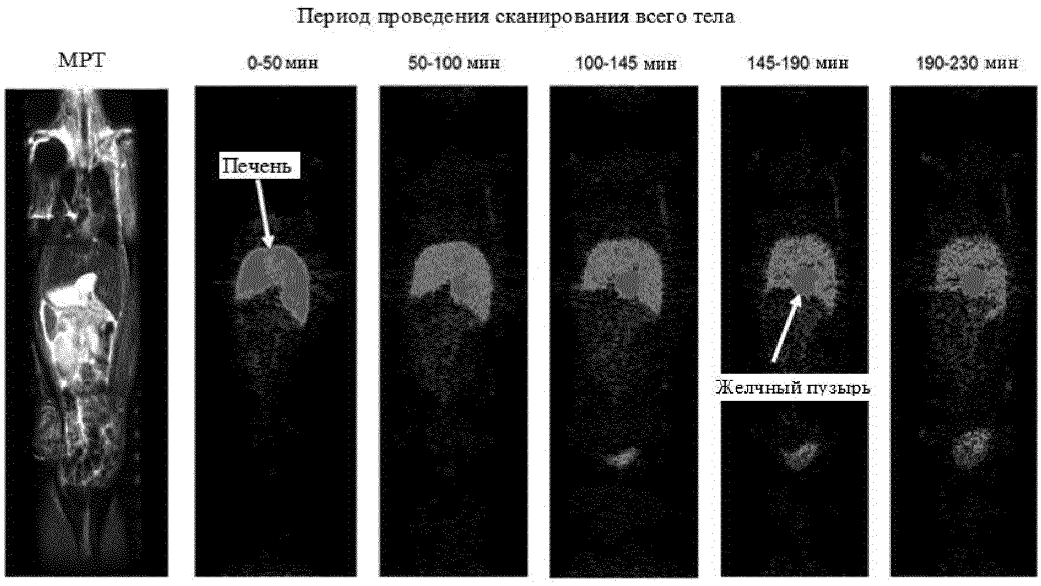
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4


Период проведения сканирования всего тела
МРТ
0-50 мин
50-100 мин
100-145 мин
145-190 мин
190-230 мин
Печень
Желчный пузырь

Фиг. 5