

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 042012

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.12.26

(21) Номер заявки
201892657

(22) Дата подачи заявки
2017.05.18

(51) Int. Cl. C07D 487/10 (2006.01)
A61K 31/407 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(54) СПИРОЛАКТАМОВЫЕ МОДУЛЯТОРЫ NMDA-РЕЦЕПТОРА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/338,767

(32) 2016.05.19

(33) US

(43) 2019.05.31

(86) PCT/US2017/033323

(87) WO 2017/201283 2017.11.23

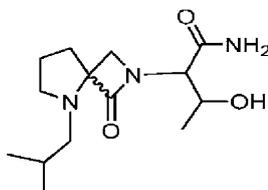
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АПТИНИКС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Хан М. Амин (US)

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

(56) WO-A1-2014120783
WO-A1-2010033757
WO-A1-2014120786

(57) Раскрыто соединение, имеющее формулу, представленную ниже, обладающее повышенной эффективностью при модулировании активности рецептора NMDA. Такое соединение может применяться при лечении состояний, таких как депрессивный синдром и родственные расстройства. Также раскрыта фармацевтическая композиция, предназначенная для перорального или внутривенного введения.



B1

042012

042012

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Эта заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 62/338767, зарегистрированной 19 мая 2016 г., содержание которой включено в настоящее изобретение путем ссылки на нее.

Уровень техники

Рецептор N-метил-D-аспартата (NMDA) представляет собой постсинаптический ионотропный рецептор, который реагирует, в частности, на возбуждающие аминокислоты глутамат и глицин и на синтетическое соединение NMDA. Рецептор NMDA регулирует поток двухвалентных и одновалентных ионов в постсинаптическую нервную клетку через ассоциированный с рецептором канал (Foster et al., *Nature*, 1987, 329:395-396; Mayer et al., *Trends in Pharmacol. Sci.*, 1990, 11:254-260). В процессе развития, рецептор NMDA вовлечен в определенную нейронную архитектуру и конфигурацию синаптических связей и может принимать участие в зависящих от опыта синаптических модификациях. Кроме того, считают, что рецепторы NMDA также вовлечены в продолжительное потенцирование и в расстройства центральной нервной системы.

Рецептор NMDA играет важную роль в синаптической пластичности, которая лежит в основе многих высших когнитивных функций, таких как запоминание, ретенция и обучение, а также в некоторых когнитивных путях и в восприятии боли (Collingridge et al., *The NMDA Receptor*, Oxford University Press, 1994). Кроме того, наличие у рецепторов NMDA некоторых свойств позволяет предположить, что они могут быть вовлечены в обработку информации в головном мозге, которая лежит в основе самосознания.

Рецептор NMDA вызывает особый интерес, так как, по-видимому, он принимает участие в широком спектре расстройств центральной нервной системы. Например, при ишемии головного мозга, вызванной инсультом или травматическим повреждением, из поврежденных или испытывающих кислородное голодание нейронов выделяются избыточные количества возбуждающей аминокислоты глутамата. Этот избыточный глутамат связывает рецепторы NMDA, что открывает их лиганд-управляемые ионные каналы, в свою очередь, приток кальция продуцирует высокую концентрацию внутриклеточного кальция, что активирует каскад биохимических реакций, приводящий к разрушению белка и гибели клетки. Считаю, что это явление, называемое эксайтотоксичностью, также ответственно за неврологическое повреждение, связанное с другими расстройствами, начиная от гипогликемии и остановки сердечной деятельности и до эпилепсии. Кроме того, имеются данные предварительных исследований, указывающие на такое же участие в хронической нейродегенерации при болезни Хантингтона, болезни Паркинсона и при связанных с болезнью Паркинсона состояниях, таких как дискинезия и вызванная приемом L-дopa дискинезия, и при болезни Альцгеймера. Было показано, что активация рецептора NMDA ответственна за постинсультные судороги, и в некоторых моделях эпилепсии было показано, что рецептор NMDA необходим для возникновения эпилептических припадков. Было также обнаружено психоневрологическое воздействие рецептора NMDA, поскольку блокада Ca^{++} канала рецептора NMDA с помощью анестетика для животных PCP (фенциклидина) вызывает у людей психотическое состояние, похожее на шизофрению (описано в обзоре Johnson, K. and Jones, S., 1990). Кроме того, рецепторы NMDA также принимают участие в некоторых типах пространственного обучения.

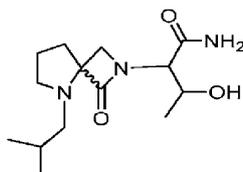
Считаю, что рецептор NMDA состоит из нескольких белковых цепей, встроенных в постсинаптическую мембрану. Первые два типа субъединиц, открытых к настоящему времени, образуют обширную внеклеточную область, которая, по-видимому, содержит большую часть из аллостерических сайтов связывания, несколько трансмембранных областей, образующих петли и складки, в результате чего формируются пора или канал, которые проницаемы для Ca^{++} , а также область с терминальными карбоксильными группами. Открытие и закрытие канала регулируется путем связывания различных лигандов с доменами (аллостерическими сайтами) белка, находящегося на внеклеточной поверхности. Считаю, что связывание этих лигандов приводит к конформационному изменению общей структуры белка, что, в конечном итоге, вызывает рефлекторное открытие, частичное открытие, частичное закрытие или закрытие канала.

Соединения, применяемые в отношении рецепторов NMDA, могут оказывать двойное (агонистическое/антагонистическое) действие на рецептор NMDA через аллостерические сайты. Эти соединения обычно называют "функциональными частичными агонистами". В присутствии лиганда основного сайта связывания частичный агонист вытесняет некоторую часть лиганда и за счет этого уменьшает поток Ca^{++} через рецептор. В отсутствие или при пониженном содержании лиганда основного сайта действие частичного агониста направлено на увеличение потока Ca^{++} через канал рецептора.

В настоящее время существует необходимость в новых и более специфических/активных соединениях, которые способны связывать глицин-связывающий сайт рецепторов NMDA и обеспечивать фармацевтический положительный эффект. Кроме того, существует необходимость в пероральных лекарственных формах таких соединений.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предлагаются соединения, которые могут являться модуляторами NMDA, например частичными агонистами NMDA. Более конкретно, в настоящем изобретении предлагается соединение, имеющее формулу



или его стереоизомер и/или фармацевтически приемлемая соль.

Кроме того, в изобретении предлагаются фармацевтические композиции, включающие раскрытое соединение и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Такая композиция может быть введена пациенту перорально или внутривенно.

В некоторых вариантах осуществления описанные в изобретении соединения связывают субтипы рецептора NMDA. В некоторых вариантах осуществления описанные в изобретении соединения связывают один субтип и не связывают другой.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 приведены в графическом виде усредненные данные по ультразвуковому звукообразованию с частотой 50 кГц в случае соединения А в модели эмоционально позитивного обучения (PEL).

На фиг. 2 показано потенцирование [³H]МК-801 связывания для немутантных NMDAR2 субтипов в случае соединения А.

На фиг. 3 приведена графическая зависимость средней концентрации в плазме соединения А от времени после введения разовой дозы внутривенно (2 мг/кг) и перорально (10 мг/кг) самцам крыс линии Sprague Dawley.

На фиг. 4 приведена графическая зависимость средней концентрации в плазме, головном мозге и спинномозговой жидкости (CSF) соединения А от времени после введения разовой дозы перорально (10 мг/кг) самцам крыс линии Sprague Dawley.

На фиг. 5 приведены в графическом виде усредненные данные по ультразвуковому звукообразованию с частотой 50 кГц в случае соединения В в модели эмоционально позитивного обучения (PEL).

На фиг. 6 показано потенцирование [³H]МК-801 связывания для немутантных NMDAR2 субтипов в случае соединения В.

На фиг. 7 приведена графическая зависимость средней концентрации в плазме соединения В от времени после введения разовой дозы внутривенно (2 мг/кг) и перорально (10 мг/кг) самцам крыс линии Sprague Dawley.

На фиг. 8 приведена графическая зависимость средней концентрации в плазме, головном мозге и спинномозговой жидкости (CSF) соединения В от времени после введения разовой дозы перорально (10 мг/кг) самцам крыс линии Sprague Dawley.

На фиг. 9 приведены результаты *in vitro* микроядерного теста (MN), теста на обратную мутацию бактерий (Ames) и исследования генспецифических калиевых каналов сердца (hERG) в случае соединения А.

На фиг. 10 приведены результаты *in vitro* микроядерного теста (MN), теста на обратную мутацию бактерий (Ames) и исследования генспецифических калиевых каналов сердца (hERG) в случае соединения В.

На фиг. 11 графически представлены вызванные ударной волной обратимые когнитивные расстройства, измеренные в модели PEL в случае соединения А.

На фиг. 12 графически представлены вызванные ударной волной обратимые когнитивные расстройства, измеренные в модели PEL в случае соединения В.

На фиг. 13 графически представлены результаты теста на вызванную новизной гипофагию (НИН) у крыс в случае соединения А.

На фиг. 14 графически представлены результаты теста на вызванную новизной гипофагию (НИН) у крыс в случае соединения В.

На фиг. 15 графически представлены обезболивающие действия соединения А.

На фиг. 16 графически представлены обезболивающие действия соединения В.

На фиг. 17 графически представлены результаты теста Портсолта на принудительное плавание в случае соединения А.

На фиг. 18 графически представлены результаты теста Портсолта на принудительное плавание в случае соединения В.

Подробное описание изобретения

Это изобретение в целом относится к соединениям, которые способны модулировать NMDA, например к антагонистам или частичным агонистам NMDA, и к композициям и/или способам применения раскрытых соединений. Следует иметь в виду, что раскрытые соединения могут модулировать другие белки-мишени и/или субтипы рецептора NMDA.

Используемый в изобретении термин "соединение" относится к самому соединению и к его фармацевтически приемлемым солям, в том числе к его различным стереоизомерам, если только из контекста описания изобретения не следует иное или в явной форме ограничивается только одна форма соедине-

ния, т.е. само соединение, его конкретный стереоизомер или его фармацевтически приемлемая соль. Следует иметь в виду, что термин "соединение" может относиться к фармацевтически приемлемой соли или стереоизомеру соединения.

Используемый в изобретении термин "фрагмент" относится к части соединения или молекулы.

Соединения по изобретению могут содержать один или более хиральных центров и/или двойных связей, и поэтому они могут существовать в форме стереоизомеров, таких как геометрические изомеры и энантиомеры или диастереомеры. Используемый в изобретении термин "стереоизомеры" включает в себя все геометрические изомеры, энантиомеры и/или диастереомеры соединения. Например, когда соединения показывают со специфическим хиральным центром (хиральными центрами), соединение, изображенное без такой хиральности на этом и другом хиральных центрах соединения, входит в объем настоящего изобретения, т.е. соединение, изображенное в двух измерениях с "плоскими" или "линейными" связями, а не в трех измерениях, например, с хиральными связями, изображенными сплошными или пунктирными линиями. Стереоспецифические соединения могут быть обозначены символами "R" или "S", в зависимости от конфигурации заместителей вокруг стереоцентрального углеродного атома. Настоящее изобретение охватывает все различные стереоизомеры этих соединений и их смеси. Смеси энантиомеров или диастереомеров могут быть обозначены с использованием номенклатуры "(±)", но для специалиста в этой области является очевидным, что структура может представлять хиральный центр в неявном виде. Следует иметь в виду, что графические представления химических структур, например общих химических структур, охватывает все стереоизомерные формы указанных соединений, если не заявлено иное.

Как было упомянуто выше, соединения по настоящему изобретению могут иметь множество хиральных центров. Каждый хиральный центр может представлять собой независимо R, S или любую смесь из R и S. Например, в некоторых вариантах осуществления хиральный центр может иметь соотношение R:S от приблизительно 100:0 до приблизительно 50:50 ("рацемат"), от приблизительно 100:0 до приблизительно 75:25, от приблизительно 100:0 до приблизительно 85:15, от приблизительно 100:0 до приблизительно 90:10, от приблизительно 100:0 до приблизительно 95:5, от приблизительно 100:0 до приблизительно 98:2, от приблизительно 100:0 до приблизительно 99:1, от приблизительно 0:100 до приблизительно 50:50, от приблизительно 0:100 до приблизительно 25:75, от приблизительно 0:100 до приблизительно 15:85, от приблизительно 0:100 до приблизительно 10:90, от приблизительно 0:100 до приблизительно 5:95, от приблизительно 0:100 до приблизительно 2:98, от приблизительно 0:100 до приблизительно 1:99, от приблизительно 75:25 до 25:75 или приблизительно 50:50. Составы раскрытых соединений, включающие большее соотношение одного или более изомеров (т.е. R и/или S), могут обладать улучшенной терапевтической характеристикой по сравнению с рацемическими составами раскрытых соединений или смесью соединений.

Индивидуальные энантиомеры и диастереомеры соединений по настоящему изобретению могут быть синтезированы из выпускаемых промышленностью исходных материалов, которые содержат центры асимметрии или стереоцентры, или путем получения рацемических смесей, которые затем разделяют методами, хорошо известными любому специалисту в этой области. Примерами этих методов разделения являются

- (1) присоединение смеси энантиомеров к хиральному вспомогательному веществу, разделение полученной смеси диастереомеров перекристаллизацией или хроматографией и выделение оптически чистого продукта из вспомогательного вещества,
- (2) образование соли с использованием оптически активного разделяющего реагента,
- (3) прямое разделение смеси оптических энантиомеров на колонках для хиральной жидкостной хроматографии, или
- (4) кинетическое разделение с использованием стереоселективных химических или ферментативных реагентов.

Рацемические смеси могут быть также разделены на составляющие их энантиомеры хорошо известными методами, такими как газовая хроматография с хиральной фазой или кристаллизация соединения в хиральном растворителе. Стереоселективные синтезы, представляющие собой химическую или ферментативную реакцию, в которой одно реагирующее вещество образует смесь стереоизомеров в неравном соотношении в процессе создания нового стереоцентра или в процессе трансформации уже существующего центра, являются хорошо известными. Стереоселективные синтезы охватывают как энантиоселективные, так и диастереоселективные трансформации. См., например, монографию Carreira and Kvaerno, *Classics in Stereoselective Synthesis*, Wiley-VCH: Weinheim, 2009.

Геометрические изомеры, полученные в результате перегруппировки заместителей вокруг двойной связи углерод-углерод или перегруппировки заместителей вокруг циклоалкильного или героциклического кольца, могут также существовать в соединениях по настоящему изобретению. Символ обозначает связь, которая может представлять собой одинарную, двойную или тройную связь, описанные в изобретении. Заместители вокруг двойной связи углерод-углерод обозначают как находящиеся в "Z" или "E" конфигурации, где термины "Z" и "E" используются в соответствии со стандартными обозначениями Международного союза теоретической и прикладной химии (IUPAC). Если не указано иначе, то структуры с изображенными двойными связями охватывают как the "E", так и "Z" изомеры.

Заместители вокруг двойной связи углерод-углерод альтернативно могут обозначаться как "цис" или "транс", где "цис" представляет заместители по одну сторону двойной связи, а "транс" представляет заместители по разные стороны двойной связи. Группировка заместителей вокруг карбоциклического кольца может также обозначаться как "цис" или "транс". Термин "цис" представляет заместители по одну сторону плоскости кольца, а термин "транс" представляет заместители по разные стороны плоскости кольца. Смеси соединений, в которых заместители расположены как по одну сторону плоскости кольца, так и по разные стороны плоскости кольца, обозначают "цис/транс".

Используемые в изобретении фразы "фармацевтически приемлемые" или "фармакологически приемлемые" относятся к соединениям, фрагментам молекул, композициям, материалам и/или лекарственным формам, которые не вызывают побочной аллергической или другой нежелательной реакции при введении животному или человеку, в соответствующих случаях. При введении человеку препараты должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты, установленным Отделом стандартов для биологических препаратов Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США.

Используемые в изобретении фразы "фармацевтически приемлемый носитель" и "фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество" относятся ко всем без исключения растворителям, дисперсионным средам, покрытиям, изотоническим средствам, замедляющим всасывание веществам и другим подобным веществам, которые совместимы с фармацевтическим применением. Фармацевтически приемлемые носители могут включать забуференный фосфатом физиологический раствор, воду, эмульсии (например, такие как эмульсии масло/вода или вода/масло) и различные типы смачивающих веществ. Композиции также могут включать стабилизаторы и консерванты.

Используемая в изобретении фраза "фармацевтическая композиция" относится к композиции, включающей по меньшей мере одно раскрытое в изобретении соединение, приготовленное вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями. Фармацевтические композиции могут также содержать другие активные соединения, обеспечивающие вспомогательные, дополнительные или расширенные терапевтические функции.

Применяемые в изобретении термины "индивидуум", "пациент" и "субъект" используются взаимозаменяемо и включают любой животных, в том числе млекопитающих, предпочтительно мышей, крыс, других грызунов, кроликов, собак, кошек, свиней, крупный рогатый скот, овец, лошадей или приматов и более предпочтительно людей. Описанные в изобретении соединения могут быть введены млекопитающему, такому как человек, но могут быть также введены другим млекопитающим, таким как животные, нуждающиеся в ветеринарной помощи, например домашние животные (например, собаки, кошки и другие подобные животные), сельскохозяйственные животные (например, коровы, овцы, свиньи, лошади и другие подобные животные) и лабораторные животные (например, крысы, мыши, морские свинки и другие подобные животные). Предпочтительно, чтобы млекопитающее, подвергаемое лечению описанными в изобретении способами, представляло собой млекопитающее, которому требуется лечение, например, болевого или депрессивного синдрома.

Используемый в изобретении термин "лечение" включает любой эффект, например ослабление, уменьшение, модулирование, улучшение или устранение, который приводит к улучшению состояния, заболевания, расстройства и других подобных нарушений, в том числе одного или более их симптомов. Лечение может приводить к излечению, улучшению или, по меньшей мере, частичному облегчению расстройства.

Применяемый в изобретении термин "расстройство" означает и используется взаимозаменяемо с терминами "заболевание", "состояние" или "болезнь", если не указано иначе.

Используемый в изобретении термин "модулирование" означает и включает антагонизм (например, ингибирование), агонизм, частичный антагонизм и/или частичный агонизм.

Используемые в изобретении фразы "фармацевтически эффективное количество" и "терапевтически эффективное количество" относятся к количеству соединения (например, раскрытого соединения), которое позволяет достигать биологического или лечебного ответа ткани, системы, животного или человека, которого пытаются добиться исследователь, ветеринар, врач или другой клиницист. Описанные в изобретении соединения могут быть введены в терапевтически эффективных количествах для лечения заболевания. Терапевтически эффективное количество соединения может представлять собой количество, необходимое для достижения требуемого терапевтического и/или профилактического эффекта, такое как количество, которое приводит к облегчению симптома заболевания или расстройства, такого как депрессивный синдром.

Используемая в изобретении фраза "фармацевтически приемлемая соль (фармацевтически приемлемые соли)" относится к соли(ям) групп с кислотными или основными свойствами, которые могут присутствовать в соединениях по изобретению и/или использоваться в композициях по изобретению. Фармацевтически приемлемая соль (например, присоединения кислоты или основания) соединения по настоящему изобретению после введения пациенту способны образовывать соединение по этому изобретению или его активный метаболит или его остаток.

Соединения, входящие в настоящие композиции, которые по природе своей обладают основными

свойствами, способны образовывать широкое разнообразие солей с различными неорганическими и органическими кислотами. Кислоты, которые могут быть использованы для получения фармацевтически приемлемых солей присоединения кислоты таких обладающих основными свойствами соединений, представляют собой кислоты, которые образуют нетоксичные соли присоединения кислоты, т.е. соли, содержащие фармакологически приемлемые анионы, включающие, но этим не ограничивающиеся, малатные, оксалатные, хлоридные, бромидные, йодидные, нитратные, сульфатные, бисульфатные, фосфатные, кислые фосфатные, изоникотинатные, ацетатные, лактатные, салицилатные, цитратные, тартратные, олеатные, таннатные, пантотенатные, битартратные, аскорбатные, сукцинатные, малеатные, гентизинатные, фумаратные, глюконатные, глюкаронатные, сахаратные, формиатные, бензоатные, глутаматные, метансульфонатные, этансульфонатные, бензолсульфонатные, п-сульфонатные и памоатные (т.е. 1,1'-метилен-бис-(2-гидрокси-3-нафтоатные)) соли. Соединения, входящие в настоящие композиции, которые по природе своей обладают кислотными свойствами, способны образовывать соли присоединения основания с различными фармакологически приемлемыми катионами. Примеры таких солей включают соли щелочных и щелочноземельных металлов и, в частности, соли кальция, магния, натрия, лития, цинка, калия и железа. Соединения, входящие в настоящие композиции, которые включают фрагмент с основными или кислотными свойствами, могут также образовывать фармацевтически приемлемые соли с различными аминокислотами. Соединения по изобретению могут содержать как кислотные, так и основные группы, например одну аминогруппу и одну группу карбоновой кислоты. В этом случае соединение может существовать в форме соли присоединения кислоты, цвиттер-иона или соли присоединения основания.

Раскрытые в изобретении соединения могут существовать в несольватированной форме, а также в сольватированной форме в виде сольватов с фармацевтически приемлемыми растворителями, такими как вода, этанол и другие подобные растворители, и предполагается, что изобретение охватывает как сольватированные, так и несольватированные формы. В некоторых вариантах осуществления соединение является аморфным. В конкретных вариантах осуществления соединение представляет собой индивидуальный полиморф. В различных вариантах осуществления соединение представляет собой смесь полиморфов. В конкретных вариантах осуществления соединение находится в кристаллической форме.

Если не определено иначе, то все используемые в изобретении технические и научные термины имеют значения, которые являются общепринятым для любого специалиста в области, к которой относится это изобретение.

В описании изобретения, в случаях когда композиции и фармацевтические наборы описывают как имеющие, включающие или содержащие конкретные компоненты или когда описывают процессы и способы как имеющие, включающие или содержащие конкретные стадии, предполагается, что кроме того, существуют композиции и фармацевтические наборы по настоящему изобретению, которые состоят в основном или состоят из перечисленных компонентов, и что существуют процессы и способы по настоящему изобретению, которые состоят в основном или состоят из перечисленных технологических стадий.

В описании изобретения, в случаях когда указывается, что элемент или компонент включен в список и/или выбран из списка перечисленных элементов или компонентов, следует иметь в виду, что элемент или компонент может представлять собой любой один из перечисленных элементов или компонентов или элемент или компонент может быть выбран из группы, состоящей из двух или более перечисленных элементов или компонентов.

Кроме того, следует иметь в виду, что элементы и/или характерные признаки описанных в изобретении композиции или способа могут быть объединены различным образом без отклонения от сущности и объема настоящего изобретения в прямой или косвенной форме. Например, когда ссылаются на конкретное соединение, то это соединение может быть использовано в различных вариантах осуществления композиций по настоящему изобретению и/или в способах по настоящему изобретению, если из контекста не следует иное. Другими словами, в этом изобретении варианты осуществления описаны и изображены так, что это позволяет четко и сжато описать и проиллюстрировать изобретение, и при этом предполагается и считается очевидным, что варианты осуществления могут быть объединены или разделены разными способами без отклонения от идеи и предмета настоящего изобретения. Например, следует иметь в виду, что характерные признаки, описанные и изображенные в изобретении, могут быть применимы ко всем описанным и изображенным аспектам изобретения.

Используемая в этом изобретении форма единственного числа обозначает один или более чем один (т.е. по меньшей мере один) из объектов, если это не противоречит контексту. Например, "элемент" обозначает один элемент или более чем один элемент.

Используемый в изобретении термин "и/или" означает либо "и", либо "или", если не указано иначе.

Следует иметь в виду, что выражение "по меньшей мере один из" включает в себя каждый в отдельности из перечисленных после этого выражения объектов и различные комбинации двух или более указанных объектов, если из контекста и применения не следует иное. Следует иметь в виду, что выражение "и/или" в отношении трех или более из перечисленных объектов имеет такое же значение, если из контекста не вытекает иное.

Использование термина "включать", "включает", "включающий", "иметь", "имеет", "имеющий", "содержать", "содержит" или "содержащий", в том числе их грамматические эквиваленты, следует понимать, в большинстве случаев, как открытые и не ограничивающие, например не исключающие дополнительные неуказанные элементы или стадии, если специально не заявлено иное или если из контекста не следует иное.

В случае когда термин "приблизительно" используют перед численным значением, настоящее изобретение также включает в себя само указанное численное значение, если не указано иначе. Используемый в изобретении термин "приблизительно" означает отклонение $\pm 10\%$ от номинальной величины, если не указано или не предполагается иное.

Следует иметь в виду, что когда количество компонента или материала в композиции выражено в процентах, то процент рассчитан по массе, если не заявлено иное или если из контекста не следует иное.

Когда приводится молекулярная масса, но не в форме абсолютной величины, например полимера, то следует иметь в виду, что молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, если не заявлено иное или если из контекста не следует иное.

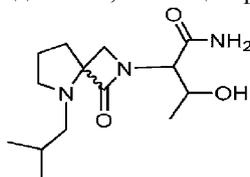
Следует иметь в виду, что порядок стадий или порядок выполнения определенных действий является несущественным, если при этом сохраняется возможность осуществления настоящего изобретения. Кроме того, две или более стадии или два или более действия могут выполняться одновременно.

Использование в изобретении любых примеров или иллюстративных формулировок, например "такой как" или "в том числе", предназначено только для того, чтобы лучше проиллюстрировать настоящее изобретение, и они не ограничивают объем изобретения за исключением тех случаев, когда об этом заявлено. Ни одну формулировку в изобретении не следует толковать как указание на то, что какой-либо не заявленный элемент является существенно важным для применения на практике настоящего изобретения.

Для наглядности различные аспекты изобретения представлены в описании изобретения в заголовках и/или разделах, однако, очевидно, что все аспекты, варианты осуществления или существенные признаки изобретения, описанные в одном конкретном разделе, не должны ограничиваться этим конкретным разделом, и, напротив, они могут применяться к любому аспекту, варианту осуществления или характерному признаку настоящего изобретения

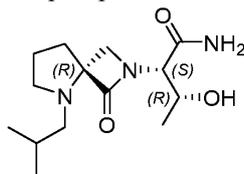
Соединения.

Раскрытые соединения включают соединение, имеющее формулу



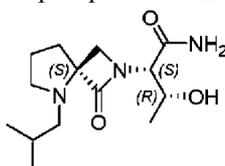
или его стереоизомер и/или фармацевтически приемлемая соль.

В конкретных вариантах осуществления раскрытое соединение имеет формулу



или его фармацевтически приемлемая соль.

В конкретных вариантах осуществления раскрытое соединение имеет формулу



или его фармацевтически приемлемая соль.

Раскрытые соединения могут обеспечивать эффективное открытие катионного канала в рецепторе NMDA, например могут связываться или взаимодействовать с глутаматным сайтом рецептора NMDA, для того чтобы способствовать открытию катионного канала. Раскрытые соединения могут применяться для регуляции (включения или выключения) рецептора NMDA в результате действия в качестве агониста.

Описанные в изобретении соединения в некоторых вариантах осуществления связывают конкретные субтипы рецептора NMDA. Например, раскрытое соединение может связывать один субтип NMDA и не связывать другой субтип. В конкретных вариантах осуществления раскрытое соединение может связывать один или более чем один субтип NMDA и/или, например, может обладать существенно меньшей

(или практически не обладать) связывающей активностью в отношении определенных субтипов NMDA. Например, в некоторых вариантах осуществления раскрытое соединение (например, соединение А) связывает NR2A, но практически не связывает NR2D. В некоторых вариантах осуществления раскрытое соединение (например, соединение В) связывает NR2В и NR2D, но обладает существенно более низкой связывающей активностью в отношении NR2A и NR2С.

Описанные в изобретении соединения могут представлять собой частичные агонисты глицинового сайта рецептора NMDA. Следует иметь в виду, что используемый в этом контексте термин "частичный агонист" означает, что при его низкой концентрации он действует как агонист, а при высокой концентрации он действует как антагонист. Связывание глицина не ингибируется глутаматом или конкурирующими ингибиторами глутамата, и он также не связывается на том же сайте, что и глутамат, на рецепторе NMDA. Второй и отдельный сайт связывания для глицина существует в рецепторе NMDA. Управляемый лигандами ионный канал рецептора NMDA находится, таким образом, под контролем по меньшей мере этих двух отличных друг от друга аллостерических сайтов. Раскрытые соединения способны связываться или взаимодействовать с сайтом связывания глицина рецептора NMDA. В некоторых вариантах осуществления раскрытые соединения могут обладать активностью, которая в 10 раз или более выше, чем активность известных на настоящий момент частичных агонистов глицинового сайта рецептора NMDA.

Раскрытые соединения могут характеризоваться высоким значением терапевтического индекса. Используемый в изобретении термин "терапевтический индекс" относится к отношению дозы, которая вызывает токсическое действие у 50% представителей популяции (т.е. TD_{50}), к минимальной эффективной дозе для 50% представителей популяции (т.е. ED_{50}). Таким образом, терапевтический индекс= $(TD_{50})/(ED_{50})$. В некоторых вариантах осуществления раскрытое соединение может иметь терапевтический индекс по меньшей мере приблизительно 10:1, по меньшей мере приблизительно 50:1, по меньшей мере приблизительно 100:1, по меньшей мере приблизительно 200:1, по меньшей мере приблизительно 500:1 или по меньшей мере приблизительно 1000:1.

Композиции.

В других аспектах предлагаются лекарственные формы и композиции, включающие раскрытое соединение и необязательно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма включает рацемическую смесь одного или более из раскрытых соединений.

Лекарственные формы могут быть приготовлены в любой из широкого разнообразия используемых форм. В качестве примера, но без ограничения соединения могут быть приготовлены в виде лекарственной формы, подходящей для перорального введения, подкожной инъекции или для других известных в фармацевтике способов введения активного средства пациенту, который может нуждаться в этом. Например, фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут применяться для доставки в глаз. Родственные способы могут включать введение фармацевтически эффективного количества раскрытого соединения или фармацевтической композиции, включающей раскрытое соединение, пациенту, нуждающемуся в этом, например, в глаз пациента, где введение может осуществляться местно, субконъюнктивально, субтеноново, интравитреально, ретробульбарно, околобульбарно, интракамерально и/или системно.

Количества описанного в изобретении соединения в лекарственной форме может изменяться в зависимости от таких факторов, как течение заболевания, возраст, пол и масса индивидуума. Режимы дозирования могут быть скорректированы для достижения оптимального терапевтического ответа. Например, может быть осуществлено разовое болюсное введение, может быть введены разделенные дозы в течение некоторого времени или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена в соответствии с возникшей терапевтической ситуацией. Особенно предпочтительно готовить парентеральные композиции в лекарственной форме с разовой дозой ввиду легкости введения и постоянства дозы. Используемый в изобретения термин "лекарственная форма с разовой дозой" относится к физически дискретным элементам, подходящим в качестве разовых доз для подвергаемых лечению млекопитающих, при этом каждый элемент содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное для достижения требуемого терапевтического эффекта, в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем.

Требования к лекарственным формам с разовой дозой обусловлены и непосредственно зависят от

- (а) характерных особенностей выбранного соединения и от конкретного терапевтического эффекта, который стремятся достигнуть; и
- (б) ограничений, присущих искусству компаундирования такого активного соединения для лечения сенситивности у индивидуумов.

Терапевтические композиции, как правило, должны быть стерильными и стабильными в условиях их производства и хранения. Композиция может быть приготовлена в форме раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для создания высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и другие подобные вещества) и подходящие их смеси. Соответствующая текучесть может

поддерживаться, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительно вводить в композицию изотонические средства, например сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъеклируемых композиций может быть достигнуто за счет введения в композицию реагента, который замедляет всасывание, например, моностеаратных солей и желатина.

Соединения могут быть введены в лекарственной форме с медленным высвобождением во времени, например, в композиции, которая включает полимер, обеспечивающий медленное высвобождение. Соединения могут быть приготовлены вместе с носителями, которые должны предотвращать быстрое высвобождение соединения, например, в виде лекарственной формы с контролируемым высвобождением, включающей имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Могут быть использованы био-разлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэферы, полимолочная кислота и сополимеры полимолочной и полигликолевой кислот (PLG). Многие методы получения таких лекарственных форм обычно хорошо известны специалистам в этой области.

Стерильные инъеклируемые растворы могут быть приготовлены путем введения соединения в требуемом количестве в соответствующий растворитель с одним или с комбинацией перечисленных выше ингредиентов, если это необходимо, и затем стерилизации методом фильтрации. Обычно дисперсии получают путем введения активного соединения в стерильную среду, которая содержит основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъеклируемых растворов предпочтительными методами приготовления являются сушка под вакуумом и лиофилизация, в результате чего получают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный требуемый ингредиент из его ранее стерилизованного с помощью фильтрования раствора.

В соответствии с альтернативным аспектом соединение может быть приготовлено с одним или более дополнительными соединениями, которые повышают растворимость соединения.

Способы.

Предлагаются способы лечения состояния у пациента, нуждающегося в этом, путем введения терапевтически эффективного количества или дозы описанного в изобретении соединения. В некоторых вариантах осуществления состояние может представлять собой психическое состояние. Например, может подвергаться лечению психиатрическое заболевание. В другом аспекте, может подвергаться лечению состояние нервной системы. Например, может подвергаться лечению состояние, которое негативно воздействует на центральную нервную систему, периферическую нервную систему и/или глаза. В некоторых вариантах осуществления могут подвергаться лечению нейродегенеративные заболевания.

В некоторых вариантах осуществления способы включают введение соединения с целью лечения пациентов, страдающих от аутизма, тревоги, депрессивного синдрома, биполярного расстройства, синдрома дефицита внимания, синдрома гиперактивности с дефицитом внимания (ADHD), шизофрении, психического расстройства, психотического синдрома, социального отчуждения, обсессивно-компульсивного расстройства (OCD), фобии, посттравматического стрессового расстройства, расстройства поведения, расстройства побуждений, расстройства, связанного со злоупотреблением психоактивными веществами (например, от абстинентного синдрома, зависимости от наркотика, зависимости от никотина и зависимости от этанола), расстройства сна, расстройства памяти (например, нарушения, потери или снижения способности создавать новые воспоминания), нарушения способности к обучению, непроизвольного мочеиспускания, множественной системной атрофии, прогрессирующего супрануклеарного паралича, атаксии Фридриха, синдрома Дауна, синдрома ломкой X-хромосомы, туберозного склероза, оливопонтocerebellарной атрофии, церебрального паралича, лекарственного неврита зрительного нерва, ишемической ретинопатии, диабетической ретинопатии, глаукомы, деменции, деменции при СПИДе, болезни Альцгеймера, хореи Хантингтона, мышечной спастичности, миоклонии, мышечного спазма, младенческих судорог, синдрома Туретта, эпилепсии, ишемии головного мозга, инсульта, опухоли головного мозга, травматического повреждения головного мозга, остановки сердечной деятельности, миелопатии, повреждения спинного мозга, периферической нейропатии, острой нейропатической боли и хронической нейропатической боли.

В некоторых вариантах осуществления предлагаются способы лечения возрастного расстройства памяти, шизофрении, особых нарушений способности к обучению, судорожных припадков, постинсультных судорог, ишемии головного мозга, гипогликемии, остановки сердечной деятельности, эпилепсии, деменции с тельцами Леви, мигрени, деменции при СПИДе, хореи Хантингтона, болезни Паркинсона, ранней стадии болезни Альцгеймера и болезни Альцгеймера.

В конкретных вариантах осуществления, предлагаются способы лечения шизофрении. Например, путем применения описанных в изобретении способов и композиций могут быть подвергнуты лечению параноидальный тип шизофрении, дезорганизованный тип шизофрении (т.е. гебефреническая шизофрения), кататонический тип шизофрении, недифференцированный тип шизофрении, остаточный тип шизофрении, постшизофренический депрессивный синдром и простой тип шизофрении. Применение опи-

санных в изобретении композиций позволяет также лечить психические расстройства, такие как шизоаффективные расстройства, бредовые расстройства, кратковременные психические расстройства, индуцированные психотические расстройства и психические расстройства с бредом или галлюцинациями.

Диагноз параноидной шизофрении может быть поставлен, когда присутствуют бредовые идеи или слуховые галлюцинации, но отсутствуют нарушение процессов мышления, дезорганизованное поведение или эмоциональная тупость. Бредовые идеи могут представлять собой манию преследования и/или манию величия, но кроме них, могут также присутствовать другие темы, такие как ревность, религиозность или соматизация. Диагноз дезорганизованного типа шизофрении может быть поставлен, когда вместе присутствуют нарушение процессов мышления и эмоциональная тупость. Диагноз кататонического типа шизофрении может быть поставлен, когда пациент может быть почти иммобильным или проявлять ажитированное, бесцельное движение. Симптомы могут включать кататонический ступор и восковую гибкость. Диагноз недифференцированного типа шизофрении может быть поставлен, когда присутствуют психотические синдромы, но они не удовлетворяют критериям для параноидного, дезорганизованного или кататонического типа. Диагноз остаточного типа шизофрении может быть поставлен, когда присутствуют позитивные симптомы только с очень низкой интенсивностью. Диагноз постшизофренического депрессивного синдрома может быть поставлен, когда депрессивный эпизод возникает после шизофренического заболевания, когда могут все еще присутствовать некоторые шизофренические симптомы с низкой активностью. Простой тип шизофрении может характеризоваться бессимптомным и прогрессирующим развитием заметных негативных симптомов без психотических эпизодов в анамнезе.

В некоторых вариантах осуществления предлагаются способы лечения психотических синдромов, которые могут присутствовать при других психических нарушениях, включающих, но этим не ограничивающихся, биполярное расстройство, пограничное личностное расстройство, наркотическая интоксикация и психотическое состояние, вызванное употреблением наркотических веществ. В конкретных вариантах осуществления, предлагаются способы лечения бредовых идей (например, "правдоподобных"), которые могут присутствовать, например, при бредовом расстройстве.

В различных вариантах осуществления предлагаются способы лечения социального отчуждения при состояниях, включающих, но этим не ограничивающихся, социальное тревожное расстройство, избегающее расстройство личности и шизотипическое расстройство личности.

В некоторых вариантах осуществления в изобретении предлагаются способы лечения нарушения неврологического развития, связанное с синаптической дисфункцией, у пациента, нуждающегося в этом, где способы обычно включают введение пациенту терапевтически эффективного количества раскрытого соединения или фармацевтической композиции, включающей раскрытое соединение. В конкретных вариантах осуществления нарушение неврологического развития, связанное с синаптической дисфункцией, может представлять собой синдром Ретта, также известный как цереброатрофическая гипераммониемия, синдром дупликации гена MECP2 (например, расстройство, вызванное мутацией в гене MECP2), синдром гена CDKL5, синдром ломкой X-хромосомы (например, расстройство, связанное с геном FMR1), туберозный склероз (например, нарушение в гене TSC1 и/или нарушение в гене TSC2), нейрофиброматоз (например, нейрофиброматоз 1 типа (NF1)), синдром Ангельмана (например, нарушения в гене UBE3A), PTEN-ассоциированный синдром гамартомных опухолей, синдром Фелан-МакДермид (например, нарушение в гене SHANK3) или младенческие судороги. В конкретных вариантах осуществления нарушение неврологического развития может быть вызвано мутациями в нейрוליгине (например, нарушение в гене NLGN3 и/или нарушение в гене NLGN2) и/или в нейрексине (например, нарушение в гене NRXN1).

В некоторых вариантах осуществления предлагаются способы лечения нейропатической боли. Нейропатическая боль может быть острой или хронической. В некоторых случаях нейропатическая боль может быть связана с состоянием, таким как герпес, ВИЧ, травматическое повреждение нерва, инсульт, постишемическая хроническая боль в спине, постгерпетическая невралгия, фибромиалгия, симпатическая рефлекторная дистрофия, комплексный региональный болевой синдром, повреждение спинного мозга, ишиалгия, фантомные боли в ампутированных конечностях, диабетическая нейропатия, такая как диабетическая периферическая нейропатия (DPN), и нейропатическая боль, вызванная противораковыми химиотерапевтическими препаратами. Также предлагаются способы более эффективного обезболивания и проведения обезболивания пациенту.

В различных вариантах осуществления способы по изобретению включают способ лечения аутизма и/или расстройства аутистического спектра у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества раскрытого соединения пациенту. В некоторых вариантах осуществления предлагается способ облегчения симптомов аутизма у пациента, нуждающегося в этом, где способ включает введение эффективного количества раскрытого соединения пациенту. Например, после введения, соединение снижает частоту возникновения одного или более симптомов аутизма, таких как избегание визуального контакта, неспособность к социализации, отсутствие концентрации внимания, плохое настроение, гиперактивность, атипичное восприятие звука, неадекватная речь, прерванный сон и персерверация. Такая пониженная частота возникновения может быть измерена относительно частоты возникновения у этого индивидуума до проведения лечения или какого-либо индивидуума(ов), не подвергавшего(их)ся лечению.

Кроме того, в изобретении предлагается способ модулирования экспрессии гена-мишени аутизма в клетке, включающий контактирование клетки с эффективным количеством описанного в изобретении соединения. Экспрессия гена аутизма может быть выбрана, например, из экспрессии генов AVAT, APOE, CHRNA4, GABRA5, GFAP, GRIN2A, PDYN и PENK. В конкретных вариантах осуществления предлагается способ модулирования синаптической пластичности у пациента, страдающего от расстройства, связанного с синаптической пластичностью, включающий введение пациенту эффективного количества соединения.

В некоторых вариантах осуществления предлагается способ лечения болезни Альцгеймера или, например, лечения потери памяти, которая, например, сопровождает болезнь Альцгеймера на ранней стадии, у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение соединения. Кроме того, в изобретении раскрывается способ модулирования амилоидного белка при болезни Альцгеймера (например, бета-амилоидного пептида, например, изоформы A β ₁₋₄₂), *in vitro* или *in vivo* (например, в клетке), включающий контактирование белка с эффективным количеством соединения. Например, в некоторых вариантах осуществления соединение может блокировать способность такого амилоидного белка ингибировать продолжительное потенцирование в гиппокампальных срезах, а также апоптотическую гибель нейронной клетки. В некоторых вариантах осуществления раскрытое соединение может обеспечить защиту от нейронального повреждения страдающему от болезни Альцгеймера пациенту, нуждающемуся в этом, например обеспечить терапевтическое воздействие на гибель нейронной клетки, связанной с последней стадией болезни Альцгеймера.

В конкретных вариантах осуществления раскрытые способы включают лечение психоза или аффективной лабильности ("РВА"), которые вызваны другим состоянием, таким как инсульт, амиотрофический боковой склероз (ALS или болезнь Лу Герига), множественный склероз, травматическое повреждение головного мозга, болезнь Альцгеймера, деменция и/или Болезнь Паркинсона. Такие способы, также как и другие способы по изобретению, включают введение фармацевтически эффективного количества раскрытого соединения пациенту, нуждающемуся в этом.

В различных вариантах осуществления предлагается способ лечения депрессивного синдрома, включающий введение описанного в изобретении соединения. В некоторых вариантах осуществления лечение может облегчить депрессивный синдром или симптом депрессивного синдрома без аффективного поведения или моторной координации и без стимулирования или промотирования судорожной активности. Примеры состояний депрессивного синдрома, которые, как ожидается, могут быть подвергнуты лечению в соответствии с этим аспектом, включают, но этим не ограничиваются, большое депрессивное расстройство, дистимическое расстройство, психотический депрессивный синдром, постнатальный депрессивный синдром, предменструальный синдром, предменструальное дисфорическое расстройство, сезонное аффективное расстройство (SAD), биполярное расстройство (или маниакально-депрессивный психоз), расстройство настроения и депрессивные синдромы, вызванные хроническими медицинскими состояниями, такими как рак или хроническая боль, химиотерапия, хронический стресс и расстройства после травматического стресса. Кроме того, пациенты, страдающие от любой формы депрессивного синдрома, часто испытывают тревогу. Различные симптомы, связанные с тревогой, включают страх, панику, учащенное сердцебиение, одышку, усталость, тошнота и головные боли наряду с прочими симптомами. Тревога или любой из ее симптомов могут быть подвергнуты лечению путем введения описанного в изобретении соединения.

Кроме того, в изобретении предлагаются способы лечения состояния у резистентных к лечению пациентов, например пациентов, страдающих от психического состояния или состояния центральной нервной системы, которое не отвечает и/или которое не ответило на адекватные курсы лечения с помощью по меньшей мере одного или по меньшей мере двух других соединений или терапевтических средств. Например, предлагается способ лечения депрессивного синдрома у резистентного к лечению пациента, включающий

- a) необязательно идентификацию пациента как резистентного к лечению; и
- b) введение эффективной дозы соединения указанному пациенту.

В некоторых вариантах осуществления описанное в изобретении соединение может применяться для оказания неотложной помощи пациенту. Например, соединение может быть введено пациенту для лечения конкретного приступа (например, тяжелого приступа) описанного в изобретении состояния.

Изобретение также включает в себя комбинированные терапии, включающие раскрытое соединение в комбинации с одним или более другими активными средствами. Например, раскрытое соединение может быть объединено с одним или более антидепрессантами, такими как трициклические антидепрессанты, ингибиторы моноаминоксидазы (MAO-I), ингибиторы обратного захвата серотонина (SSRI) и ингибиторы захвата двойного или тройного действия и/или анксиолитические лекарственные средства. Примеры лекарств, которые могут быть использованы в комбинации с соединением, включают анафранил, адапин, авентил, элавил, норпрамин, памелор, пертофран, синекван, сурмонтил, тофранил, вивактил, парнат, нардил, марплан, лексапро, лувокс, паксил, прозак, золофт, веллбутрин, эффескор, ремерон, симбалта, дезирел (тразодон) и лудиомил. В других примерах соединение может быть объединено с антипсихотическим лекарственным препаратом. Неограничивающие примеры антипсихотических средств

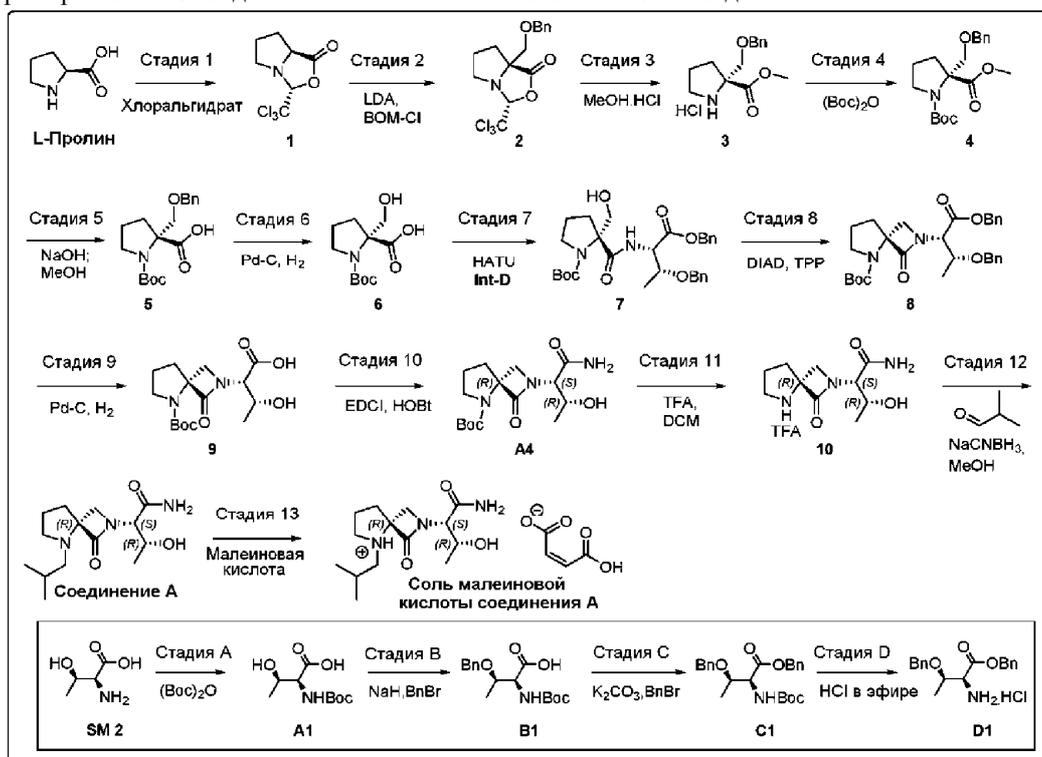
включают бутирофеноны, фенотиазины, тиоксантены, клозапин, оланзапин, рисперидон, кветиапин, zipрасидон, амисульприд, азеналин, палиперидон, илоперидон, зотепин, сертиндол, луразидон и арипипразол. Следует иметь в виду, что комбинации соединения и одного или более из приведенных выше терапевтических средств могут быть использованы для лечения любого подходящего состояния и эти комбинации не ограничиваются использованием антидепрессантов или антипсихотических средств.

Примеры

Далее приводятся примеры только с целью иллюстрации, и они никоим образом не ограничивают объем изобретения.

В изобретении могут быть использованы следующие условные сокращенные обозначения, и они имеют указанные определения: Ac обозначает ацетил (-C(O)CH₃), СПИД обозначает синдром приобретенного иммунодефицита, Boc и BOc обозначают трет-бутоксикарбонил, Boc₂O обозначает дитретбутилдидкарбонат, Bn обозначает бензил, BOM-Cl обозначает бензилоксиметилхлорид, CAN обозначает аммоний-церия нитрат, Cbz обозначает карбоксибензил, DCM обозначает дихлорметан, DIAD обозначает диизопропил-азодикарбоксилат, DIPEA обозначает N,N-диизопропилэтиламин, DMAP обозначает 4-диметиламинопиридин, DMF обозначает N,N-диметил-формамид, DMSO обозначает диметилсульфоксид, EDC и EDCI обозначают 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорид, ESI обозначает электрораспылительную ионизацию, EtOAc обозначает этилацетат, Gly обозначает глицин, ch обозначает час, HATU обозначает 2-(7-аза-1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуриония гексафторфосфат, ВИЧ обозначает вирус иммунодефицита человека, HOBT обозначает гидроксibenзотриазол, ВЭЖХ обозначает высокоэффективную жидкостную хроматографию, LCMS обозначает жидкостную хроматографию/масс-спектрометрию, LDA обозначает диизопропиламид лития, LiHMDS обозначает гексаметилдисилазан лития, MTBE обозначает метилтретбутиловый эфир, NMDAR обозначает N-метил-d-аспартатный рецептор, NMP обозначает N-метил-2-пирролидон, ЯМР обозначает ядерный магнитный резонанс, Pd/C обозначает палладий на угле, PMB обозначает пара-метоксибензил, RT обозначает комнатную температуру (например, от приблизительно 20°C до приблизительно 25°C), TBS и TBDMS обозначают третбутилдиметилсиллил, TEA обозначает триэтиламин, ТСХ обозначает тонкослойную хроматографию, TFA обозначает трифторуксусную кислоту, THF обозначает тетрагидрофуран, TMS обозначает триметилсиллил, TMSCN обозначает триметилсиллилцианид и TPP обозначает трифенилфосфин.

Пример 1. Синтез соединения A и соли maleиновой кислоты соединения A.



Синтез (3R,7aS)-3-(трихлорметил)тетрагидро-1H,3H-пирроло[1,2-c]оксазол-1-она (1).

К суспензии L-пролина (2,0 кг, 0,017 моль) в хлороформе (50 л) добавляли хлоральгидрат (5,7 кг, 0,034 моль) при комнатной температуре. Реакционную смесь нагревали до 60°C в аппарате Дина-Старка и полученную воду собирали. Через 16 ч летучие компоненты испаряли при пониженном давлении. Нечистое твердое вещество промывали холодным этанолом, фильтровали и сушили с получением соединения 1 (2,2 кг, 57%) в виде белого твердого вещества.

¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 5,82 (с, 1H), 4,11-4,08 (м, 1H), 3,33-3,27 (м, 2H), 3,19-3,14 (м, 1H), 2,15-2,10 (м, 1H), 1,96-1,91 (м, 1H), 1,80-1,74 (м, 1H), 1,65-1,58 (м, 1H).

Синтез (3R,7aR)-7a-((бензилокси)метил)-3-(трихлорметил)тетрагидро-1H,3H-пирроло[1,2-c]оксазол-1-она (2).

К раствору диизопропиламина (221,2 мл, 1,533 моль) в THF (870 мл) добавляли по каплям n-BuLi (1,6 M в гексане) (958,5 мл, 1,533 моль) при -78°C в атмосфере азота. После завершения добавления температуру реакционной смеси повышали до -20°C и перемешивали в течение 1 ч. Снова охлаждали до -78°C, добавляли соединение 1 (250 г, 1,022 моль) в THF (1 л) и перемешивали в течение 30 мин. Затем добавляли по каплям бензилхлорметиловый эфир (208 мл, 1,329 моль) и продолжали перемешивание в течение 1 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) реакционную смесь гасили ледяной водой (100 мл) и экстрагировали с помощью Et₂O (2×100 мл). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (100 мл), сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного соединения, которое очищали колоночной хроматографией, элюируя с помощью 10% EtOAc/н-гексан с получением соединения 2 (220 г, неочищенное) в виде коричневого густого сиропа.

¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 7,42-7,26 (м, 5H), 5,60 (с, 1H), 4,59-4,53 (д, 2H), 3,67-3,61 (м, 2H), 3,37-3,33 (м, 1H), 3,31-3,10 (м, 1H), 2,12-1,99 (м, 2H), 1,87-1,75 (м, 2H).

LCMS (ESI): m/z 363,9 [M⁺+1].

Синтез гидрохлорида метил (R)-2-((бензилокси)метил)пирролидин-2-карбоксилата (3).

К раствору соединения 2 (400 г, 1,096 моль) в метаноле (1 л) добавляли 2N HCl в MeOH (1,64 л, 3,29 моль) при комнатной температуре и перемешивали при 80°C в течение 16 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) летучие компоненты испаряли при пониженном давлении. Полученное неочищенное вещество промывали гексанами (3×750 мл) и сушили при пониженном давлении с получением соединения 3 (358 г, неочищенное) в виде красноватого густого сиропа.

¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 10,40 (уш. с, 1H), 7,40-7,21 (м, 5H), 4,64-4,50 (д, 2H), 4,49-4,3 (д, 2H), 3,76 (с, 3H), 3,33-3,22 (м, 2H), 2,22-2,15 (с, 1H), 2,02-1,9 (м, 2H), 1,95-1,83 (м, 1H).

Синтез 1-(третбутил) 2-метил (R)-2-((бензилокси)метил)пирролидин-1,2-дикарбоксилата (4).

К перемешиваемой суспензии соединения 3 (313 г, неочищенное 1,096 моль) в DCM (2,19 л) добавляли по каплям Et₃N (458,4 мл, 3,288 моль) при 0°C в атмосфере азота и перемешивали в течение 10 мин. Затем добавляли по каплям Вос ангидрид (358,4 г, 1,644 моль) при 0°C. Температуру реакционной смеси доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение 16 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) реакционную смесь разбавляли водой (2×1 л) и экстрагировали с помощью CH₂Cl₂ (2×500 мл). Объединенный органический слой промывали 10% раствором лимонной кислоты (pH~7) и солевым раствором (1 л). Органический слой сушили над Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного соединения, которое очищали колоночной хроматографией, элюируя с помощью 20% EtOAc/н-гексан с получением соединения 4 (215 г, 56%) в виде бесцветного густого сиропа.

¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 7,37-7,26 (м, 5H), 4,56-4,48 (м, 2H), 4,03-3,87 (дд, 1H), 3,69-3,67 (д, 1H), 3,62 (с, 3H), 3,53-3,47 (м, 1H), 3,33-3,30 (м, 1H), 2,27-2,20 (м, 1H), 2,03-1,89 (м, 2H), 1,88-1,79 (м, 1H), 1,46-1,24 (2s, 9H).

LCMS (ESI): m/z 250,1 [(M⁺+1)-Вос].

Синтез (R)-2-((бензилокси)метил)-1-(третбутоксикарбонил)пирролидин-2-карбоновой кислоты (5).

К раствору соединения 4 (215 г, 0,616 моль) в смеси MeOH:THF:H₂O (3 л, 5:5:3) добавляли NaOH (73,9 г, 1,848 моль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин. Реакционную смесь нагревали до 80°C и перемешивали в течение 16 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) температуру реакционной смеси доводили до комнатной температуры, летучие компоненты испаряли. Неочищенный материал разбавляли водой (1 л) и экстрагировали с помощью Et₂O (2×500 мл). Отделенный водный слой подкисляли, используя 2 N растворы HCl (pH~3), и экстрагировали с помощью DCM (2×750 мл). Объединенные органические слои промывали солевым раствором, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением соединения 5 (170 г, 82,4%) в виде желтовато-белого твердого вещества.

¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 12,66 (уш. с, 1H), 7,36-7,26 (м, 5H), 4,54-4,47 (м, 2H), 4,05-3,90 (дд, 1H), 3,88-3,63 (д, 1H), 3,63-3,44 (м, 1H), 3,34-3,27 (м, 1H), 2,27-2,01 (м, 1H), 2,02-1,8 (м, 2H), 1,79-1,76 (м, 1H), 1,17-1,14 (2s, 9H).

LCMS (ESI): m/z 235,1 [(M⁺+1)-Вос].

Синтез (R)-1-(третбутоксикарбонил)-2-(гидроксиметил)пирролидин-2-карбоновой кислоты (6).

К перемешиваемому раствору соединения 5 (170 г, 0,507 моль) в CH₃OH (1 л) добавляли 10% Pd-C (68 г), содержащего 50% влаги, при комнатной температуре и перемешивали в течение 16 ч в атмосфере H₂. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) реакционную смесь фильтровали через слой целита и слой целита промывали с помощью CH₃OH (1 л). Полученный фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением соединения 6 (110 г, 88%) в виде белого твердого вещества.

¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 12,66 (уш. с, 1H), 3,96-3,83 (дд, 1H), 3,63-3,60 (м, 1H), 3,49-3,46 (м,

¹H), 3,34-3,25 (м, 2H), 2,30-2,15 (м, 1H), 1,95-1,72 (м, 3H), 1,38-1,33 (2s, 9H).

LCMS (ESI): m/z 244 [M⁺-1].

Хиральная ВЭЖХ: 95,88%.

Синтез третбутил (R)-2-(((2S,3R)-1,3-бис(бензилокси)-1-оксобутан-2-ил)карбамоил)-2-(гидроксиметил)пирролидин-1-карбоксилата (7).

К перемешиваемому раствору соединения 6 (110 г, 0,448 моль) в DCM (20 мл), охлажденному до 0°C, в атмосфере N₂ добавляли диизопропилэтиламин (206 мл, 1,12 моль), промежуточное соединение D1 (150 г, 0,448 моль) и HATU (204 г, 0,537 моль). Температуру реакционной смеси доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение 4 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) реакционную смесь разбавляли с помощью DCM (1 л) и промывали водой (2×500 мл), 10% раствором лимонной кислоты (500 мл) и соевым раствором (500 мл). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного соединения, которое очищали колоночной хроматографией, элюируя с помощью 30% EtOAc/н-гексан, с получением соединения 7 (143 г, 60%) в виде бесцветного густого сиропа.

¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 8,20-8,12 (д, 1H), 7,29-7,18 (м, 10H), 5,83-5,59 (м, 1H), 5,08 (с, 2H), 4,50-4,44 (м, 2H), 4,30-4,26 (м, 1H), 4,08-4,00 (м, 2H), 3,42-3,40 (м, 2H), 3,39-3,29 (м, 1H), 2,19-2,08 (м, 1H), 1,96-1,87 (м, 1H), 1,68-1,63 (м, 2H), 1,23-1,15 (2s, 9H), 1,14-1,13 (д, 3H).

LCMS (m/z): 525,2 [M⁺-1].

ВЭЖХ: 76,2%.

Хиральная ВЭЖХ: 69,47%.

Синтез третбутил (R)-2-(((2S,3R)-1,3-бис(бензилокси)-1-оксо-бутан-2-ил)-1-оксо-2,5-диазапиро[3,4]октан-5-карбоксилата (8).

К раствору трифенилфосфина (161,4 г, 0,612 моль) в THF (430 мл) добавляли по каплям DIAD (123,8 г, 0,612 моль) при комнатной температуре в атмосфере азота и перемешивали в течение 15 мин. Добавляли по каплям раствор соединения 7 (215 г, 0,408 моль) в THF (860 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ), летучие компоненты испаряли при пониженном давлении. Полученное неочищенное вещество очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя смесью 20% EtOAc/гексан, с получением соединения 8 (180 г, смесь с побочным продуктом DIAD) в виде желтого сиропа.

¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 7,31-7,18 (м, 10H), 5,18-5,10 (м, 2H), 4,61-4,54 (м, 2H), 4,27-4,18 (м, 2H), 3,78-3,77 (д, 1H), 3,45-3,43 (д, 1H), 3,35-3,31 (д, 1H), 3,27-3,23 (м, 1H), 2,03-1,98 (м, 2H), 1,78-1,76 (м, 2H), 1,39-1,31 (2s, 9H), 1,23-1,22 (д, 3H) (пики побочного продукта DIAD не обнаруживали).

LCMS (ESI): m/z 509,4 [M⁺+1].

Синтез (2S,3R)-2-((R)-5-(третбутоксикарбонил)-1-оксо-2,5-диазапиро[3,4]октан-2-ил)-3-гидроксибутановой кислоты (9).

Раствор соединения 8 (85 г, 0,167 моль) в метаноле (850 мл) подвергали дегазации в атмосфере N₂. Затем добавляли 10% Pd-C (40 г), содержащий 50% влаги, при комнатной температуре и перемешивали в течение 24 ч в атмосфере H₂. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ), реакционную смесь фильтровали через слой целита, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Полученное неочищенное твердое вещество разбавляли с помощью Et₂O (1 л) и интенсивно перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Полученный твердый материал отфильтровывали и сушили с получением соединения 9 (75 г, 68%) в виде белого твердого вещества.

¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 12,86 (уш. с, 1H), 5,24 (уш. с, 1H), 4,06-4,00 (м, 2H), 3,88-3,82 (м, 1H), 3,51-3,50 (м, 1H), 3,43-3,34 (м, 1H), 3,31-3,23 (м, 1H), 2,15-2,09 (м, 2H), 1,82-1,78 (м, 2H), 1,39-1,31 (с, 9H), 1,10-1,08 (д, 3H).

LCMS (m/z): 329,1 [M⁺+1].

ВЭЖХ: 93,97%.

Синтез третбутил (R)-2-(((2S,3R)-1-амино-3-гидрокси-1-оксо-бутан-2-ил)-1-оксо-2,5-диазапиро[3,4]октан-5-карбоксилата (A4).

К перемешиваемому раствору соединения 9 (150 г, 0,457 моль) в CH₂Cl₂ (2 л) при 0°C добавляли диизопропилэтиламин (176,85 г, 1,37 моль), NH₄Cl (48,8 г, 0,914 моль) и HATU (208,3 г, 0,548 моль) в атмосфере азота. Температуру реакционной смеси доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение 12 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ), реакционную смесь разбавляли водой (2×750 мл) и экстрагировали с помощью CH₂Cl₂ (2×1 л). Объединенный органический слой промывали 2N раствором HCl и насыщенным раствором хлорида натрия (750 мл). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенное соединение очищали колоночной хроматографией, чистое соединение элюировали смесью 3% MeOH/CH₂Cl₂. Полученный материал разбавляли с помощью DCM (2 л) и промывали насыщенным водным раствором лимонной кислоты (5×500 мл), насыщенным водным раствором бикарбоната, затем соевым раствором и сушили над Na₂SO₄. Материал растирали с эфиром (2×500 мл) с получением соединения A4 (80 г, 53%) в виде белого твердого вещества.

¹H-ЯМР (400 МГц, D₂O): δ 4,36-4,21 (м, 2H), 4,03-3,98 (м, 1H), 3,76-3,67 (м, 1H), 3,56-3,37 (м, 2H), 2,32-2,23 (м, 2H), 1,97-1,93 (м, 2H), 1,49-1,47 (с, 9H), 1,33-1,32 (д, 3H).

LCMS (ESI): m/z 328,3 [M⁺+1].

ВЭЖХ: 99,30%.

Хиральная ВЭЖХ: 98,97%.

Удельное оптическое вращение (с=1, CH₃OH): -11,08.

Синтез (2S,3R)-3-гидрокси-2-((R)-1-оксо-2,5-дiazаспиро[3,4]октан-2-ил)бутанамида (10).

К перемешиваемому раствору соединения А4 (10 г, 0,030 моль) в CH₂Cl₂ (50 мл) добавляли TFA (24 мл, 0,3058 моль) при 0°C в атмосфере азота. Температуру реакционной смеси доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение 4 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) летучие компоненты испаряли при пониженном давлении. Полученный густой сироп промывали эфиром (2×100 мл) и гексаном (1×100 мл), сушили под вакуумом с получением соединения 10 (3,5 г, TFA соль) в виде густого сиропа, которое использовали на следующей стадии. Предшествующее неочищенное исходное вещество использовали без очистки.

LCMS (ESI): m/z 228,1 [M⁺+1].

Синтез (2S,3R)-3-гидрокси-2-((R)-5-изобутил-1-оксо-2,5-дiazаспиро[3,4]октан-2-ил)бутанамида (соединения А).

К перемешиваемому раствору соединения 10 (10 г, TFA соль 0,028 моль) в метаноле (50 мл) добавляли изобутиральдегид (10 мл, 0,115 ммоль), затем AcOH (12 мл) при комнатной температуре в атмосфере азота и перемешивали в течение 10 мин. Затем добавляли порциями NaCNBH₃ (7,2 г, 11,5 ммоль) и продолжали перемешивание в течение 16 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) реакционную смесь разбавляли с помощью CH₂Cl₂ (10 мл) и концентрировали при пониженном давлении. Аналогичную реакцию проводили с количеством исходного материала 5 г. Объединяли обе партии полученного вещества и полученное неочищенное вещество очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя с помощью 4% MeOH/DCM с получением смеси (2S,3R)-3-гидрокси-2-((R)-5-изобутил-1-оксо-2,5-дiazаспиро[3,4]октан-2-ил)бутанамида. Полученную смесь затем подвергали колоночной хроматографии, чистое соединение элюировали в 100% этилацетат с получением (2S,3R)-3-гидрокси-2-((R)-5-изобутил-1-оксо-2,5-дiazаспиро[3,4]октан-2-ил)бутанамида (8 г) в виде густого сиропа.

¹H-ЯМР (500 МГц, CD₃OD): δ 4,16-4,12 (м, 1H), 4,09 (д, J=7,0 Гц, 1H), 3,60 (д, J=6,0 Гц, 1H), 3,54 (д, J=6,0 Гц, 1H), 2,97-2,93 (м, 1H), 2,75 (кв, J=8,0 Гц, 1H), 2,47-2,45 (м, 2H), 2,22-2,18 (м, 1H), 2,16-2,10 (м, 1H), 1,92-1,83 (м, 2H), 1,76-1,73 (м, 1H), 1,24 (д, J=6,0 Гц, 3H), 0,92-0,89 (м, 6H).

LCMS (ESI): m/z 284,1 [M⁺+1].

ВЭЖХ: 97,65%.

Хиральная ВЭЖХ: 98,25%.

Удельное оптическое вращение (с=1, CH₃OH): 1,6.

Синтез (4R)-2-((2S,3R)-1-амино-3-гидрокси-1-оксобутан-2-ил)-5-изобутил-1-оксо-2,5-дiazаспиро[3,4]октан-5-ия (Z)-3-карбоксии-акрилата (соли малеиновой кислоты соединения А).

К раствору (2S,3R)-3-гидрокси-2-((R)-5-изобутил-1-оксо-2,5-дiazаспиро[3,4]октан-2-ил)бутанамида (400 мг, 1,41 ммоль) в H₂O (4 мл) добавляли малеиновую кислоту (148 мг, 1,27 ммоль) при комнатной температуре и перемешивали в течение 16 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) удаляли воду при пониженном давлении. Полученное неочищенное вещество растирали с пентаном и гексаном, сушили под вакуумом с получением (4R)-2-((2S,3R)-1-амино-3-гидрокси-1-оксобутан-2-ил)-5-изобутил-1-оксо-2,5-дiazаспиро[3,4]октан-5-ия (Z)-3-карбоксии-акрилата (530 мг, 94%) в виде белого твердого вещества.

¹H ЯМР (500 МГц, CD₃OD): δ 6,29 (с, 2H), 4,21-4,12 (м, 2H), 3,91-3,85 (м, 1H), 3,83-3,79 (м, 1H), 3,61-3,51 (м, 1H), 3,29-3,19 (м, 1H), 3,04 (дд, J=9,0, 12,5 Гц, 1H), 2,90 (дд, J=5,8, 12,2 Гц, 1H), 2,52-2,43 (м, 1H), 2,40-2,31 (м, 1H), 2,25-1,97 (м, 3H), 1,28 (д, J=5,8 Гц, 3H), 1,04 (дд, J=6,4, 9,9 Гц, 6H).

LCMS (ESI): m/z 284,3 [M⁺+1-малеиновая кислота].

ВЭЖХ: 96,83%.

Температура плавления: 113,4-117,5°C.

Получение промежуточного соединения D.

Синтез (третбутоксикарбонил)-L-треонина (A1).

К раствору SM-2 (50 г, 0,420 моль) в смеси 1,4-диоксан:вода (500 мл, 1:1) добавляли порциями NaHCO₃ (133 г, 1,255 моль) при комнатной температуре и перемешивали в течение 15 мин. Затем в реакционную смесь добавляли по каплям Вос-ангидрид (144 мл, 0,629 моль) и продолжали перемешивание при комнатной температуре в течение 16 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении, полученный остаток разбавляли водой (200 мл) и подкисляли 1N раствором HCl (pH~2). Водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (2×300 мл). Объединенный органический слой промывали солевым раствором (1×200 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением

ем А1 (80 г, 87%) в виде бесцветного сиропа.

$^1\text{H-NMR}$ (500 МГц, DMSO-d_6): δ 12,5 (уш. с, 1H), 6,30 (д, $J=8,5$ Гц, 1H), 4,50 (уш. с, 1H), 4,05-4,02 (м, 1H), 3,88-3,86 (м, 1H), 1,39 (с, 9H), 1,08 (д, $J=6,0$ Гц, 3H).

LCMS (m/z): 218,1 [M^+-1].

Синтез О-бензил-N-(третбутоксикарбонил)-L-треонина (B1).

К перемешиваемому раствору соединения А1 (80 г, 0,365 моль) в DMF (800 мл) добавляли порциями 60% NaH (22 г, 0,913 моль) при -20°C в атмосфере N_2 и перемешивали в течение 2 ч. Добавляли по каплям бензилбромид (52 мл, 0,438 моль) и реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 4 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) реакционную смесь гасили ледяной водой и экстрагировали диэтиловым эфиром (2×500 мл). Водный слой подкисляли 1N раствором HCl (pH~2). Водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (2×1 л). Отделенный органический слой промывали солевым раствором, сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении с получением соединения B1 (84 г, неочищенное) в виде густого сиропа.

$^1\text{H-NMR}$ (500 МГц, DMSO-d_6): δ 12,64 (уш. с, 1H), 7,34-7,25 (м, 5H), 6,46 (д, $J=8,5$ Гц, 1H), 4,53 (д, $J=11,5$ Гц, 1H), 4,39 (д, $J=12,0$ Гц, 1H), 4,00-3,98 (м, 2H), 1,39 (с, 9H), 1,15 (д, $J=6,0$ Гц, 3H).

Синтез бензил О-бензил-N-(третбутоксикарбонил)-L-треонината (C1).

К перемешиваемому раствору соединения B1 (78 г, 0,252 моль) в DMF (780 мл) добавляли K_2CO_3 (87 г, 0,631 моль) при комнатной температуре в атмосфере N_2 и перемешивали в течение 30 мин. Добавляли по каплям бензилбромид (45 мл, 0,378 моль) при комнатной температуре и перемешивали в течение 16 ч. Реакционную смесь гасили водой (2 л) и экстрагировали диэтиловым эфиром (2×1 л). Отделенный органический слой промывали солевым раствором, сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя смесью 10% EtOAc/н-гексан с получением соединения C1 (68 г, 68%) в виде желтого сиропа.

$^1\text{H-NMR}$ (500 МГц, DMSO-d_6): δ 7,37-7,18 (м, 10H), 6,81 (д, $J=9,0$ Гц, 1H), 5,08 (с, 2H), 4,49 (д, $J=12,0$ Гц, 1H), 4,32 (д, $J=12,0$ Гц, 1H), 4,25-4,22 (м, 1H), 4,01-3,98 (м, 1H), 1,38 (с, 9H), 1,15 (д, $J=6,0$ Гц, 3H).

Масса (ESI): m/z 399,4 [M^+].

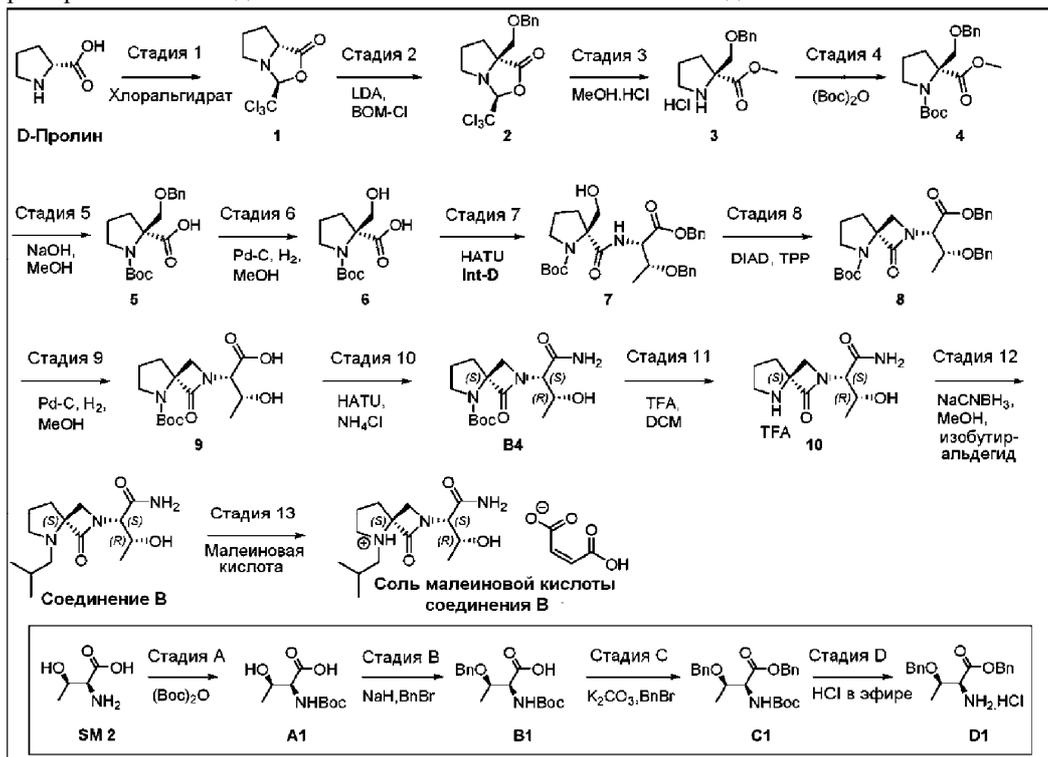
Синтез бензил О-бензил-L-треонината гидрохлорида (D1).

К раствору соединения C1 (68 г, 0,170 моль) в диэтиловом эфире (500 мл) добавляли 4N HCl в 1,4-диоксане (130 мл, 0,511 моль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный материал растворяли в диэтиловом эфире (1 л) и интенсивно перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Полученное твердое вещество отфильтровывали и сушили при пониженном давлении с получением соединения D1 (50 г, 87%) в виде белого твердого вещества (HCl соль).

$^1\text{H-NMR}$ (400 МГц, DMSO-d_6): δ 8,59 (с, 2H), 7,50-7,25 (м, 10H), 5,23 (д, $J=12,5$ Гц, 1H), 5,16 (д, $J=12,5$ Гц, 1H), 4,54 (д, $J=12,0$ Гц, 1H), 4,36 (д, $J=12,0$ Гц, 1H), 4,12-4,09 (м, 1H), 4,09-3,99 (м, 1H), 1,29 (д, $J=6,5$ Гц, 3H).

Масса (ESI): m/z 336,4 [M^++1].

Пример 2. Синтез соединения В и соли малеиновой кислоты соединения В.



Синтез (3*S*,7*aR*)-3-(трихлорметил)тетрагидро-1*H*,3*H*-пирроло[1,2-*c*]оксазол-1-она (1).

К суспензии D-пролина (3 кг, 2 6,057 моль) в хлороформе (60 л) добавляли хлоральгидрат (8,62 кг, 52,115 моль) при комнатной температуре. Реакционную смесь нагревали до 80°C в аппарате Дина-Старка и полученную воду собирали. После перемешивания в течение 24 ч реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и добавляли солевой раствор (25 л). Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин и давали возможность отстояться в течение 30 мин. Отделенный органический слой сушили над Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении с удалением летучих компонентов в результате их испарения. Полученное неочищенное твердое вещество суспендировали в холодном этаноле (5 л), фильтровали и сушили с получением соединения 1 (4,7 кг, 74%) в виде желтовато-белого твердого вещества.

¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 5,82 (с, 1H), 4,11-4,09 (м, 1H), 3,33-3,28 (м, 1H), 3,19-3,14 (м, 1H), 2,17-2,10 (м, 1H), 1,97-1,91 (м, 1H), 1,80-1,74 (м, 1H), 1,65-1,58 (м, 1H).

Синтез (3*S*,7*aS*)-7*a*-((бензилокси)метил)-3-(трихлорметил)тетрагидро-1*H*,3*H*-пирроло[1,2-*c*]оксазол-1-она (2).

К раствору диизопропиламина (442 мл, 3,067 моль) в THF (1 л) добавляли по каплям *n*-BuLi (1,6 М в гексане) (1,91 л, 3,067 моль) при -78°C в атмосфере азота. После завершения добавления температуру реакционной смеси повышали до -20°C и перемешивали в течение 45 мин. Снова охлаждали до -78°C, добавляли по каплям соединение 1 (500 г, 2,044 моль) в THF (2 л) и перемешивали в течение 4 5 мин. Затем добавляли по каплям бензилхлорметиловый эфир (425 мл, 3,067 моль) и продолжали перемешивание в течение 2 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) реакционную смесь гасили ледяной водой (2 л) и экстрагировали с помощью Et₂O (2×1 л). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (3 л), сушили над Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного соединения, которое очищали колоночной хроматографией, элюируя с помощью 10% EtOAc/*n*-гексан с получением соединения 2 (425 г, 57%) в виде желтой жидкости.

¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 7,35-7,26 (м, 5H), 5,60 (с, 1H), 4,59-4,53 (д, 2H), 3,67-3,62 (м, 2H), 3,71-3,31 (м, 1H), 3,16-3,11 (м, 1H), 2,12-1,99 (м, 2H), 1,86-1,72 (м, 2H).

LCMS (ESI): *m/z* 363,8 [M⁺-1].

Синтез метил (S)-2-((бензилокси)метил)пирролидин-2-карбоксилата гидрохлорида (3).

К раствору соединения 2 (1 кг, 2,742 моль) в метаноле (2 л) добавляли 2*N* HCl в метаноле (4,1 л, 8,227 моль) при комнатной температуре и перемешивали в течение 30 мин. Реакционную смесь перемешивали при 60°C в течение 16 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) летучие компоненты испаряли при пониженном давлении. Полученное неочищенное вещество в виде сиропа разбавляли деминерализованной водой (3 л) и промывали с помощью EtOAc (2×1 л). Доводили величину pH водного слоя до 8-9 раствором NaHCO₃. Водный слой экстрагировали смесью 5%

MeOH/DCM (2×2 л). Объединенный органический слой промывали соевым раствором, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении с получением соединения 3 (600 г, 88%) в виде коричневого сиропа. Повторно проводили реакцию 1 кг исходного вещества и получали 600 г соединения 3.

¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 10,54 (уш. с, 1H), 9,44 (уш. с, 1H), 7,40-7,30 (м, 5H), 4,68-4,62 (д, 1H), 4,51-4,46 (д, 1H), 4,00-3,90 (м, 2H), 3,76 (с, 3H), 3,33-3,16 (м, 2H), 2,20-2,14 (с, 1H), 2,01-1,85 (м, 3H).

Синтез 1-(третбутил)-2-метил (S)-2-((бензилокси)метил)пирролидин-1,2-дикарбоксилата (4).

К перемешиваемой суспензии соединения 3 (1,2 кг, 4,819 моль) в DCM (6 л) добавляли по каплям Et₃N (1,35 л, 9,638 моль) при 0°C в атмосфере азота и перемешивали в течение 20 мин. Затем добавляли по каплям Вос-ангидрид (1,65 л, 7,228 моль) при 0°C. Температуру реакционной смеси доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение 8 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) реакционную смесь разбавляли деминерализованной водой (3 л) и экстрагировали с помощью DCM (2 л). Объединенный органический слой промывали 10% раствором лимонной кислоты (2 л) и соевым раствором (2 л). Органический слой сушили над Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении с получением соединения 4 (2 кг, неочищенного) в виде коричневого сиропа.

¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 7,37-7,28 (м, 5H), 4,57-4,50 (м, 2H), 4,03-3,88 (дд, 1H), 3,71-3,69 (д, 1H), 3,63 (с, 3H), 3,52-3,47 (м, 1H), 3,36-3,31 (м, 1H), 2,32-2,23 (м, 1H), 2,05-1,88 (м, 2H), 1,82-1,77 (м, 1H), 1,38-1,26 (с, 9H).

LCMS (ESI): m/z 350,2 [(M⁺+1)].

Синтез (S)-2-((бензилокси)метил)-1-(третбутоксикарбонил)пирролидин-2-карбоновой кислоты (5).

К раствору соединения 4 (1 кг, 2,865 моль) в MeOH:THF (3 л, 1:1) добавляли NaOH (343,84 г, 8,595 моль) в H₂O (1,5 л) при комнатной температуре, перемешивали при 70°C в течение 6 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) температуру реакционной смеси доводили до комнатной температуры, летучие компоненты испаряли при пониженном давлении. Неочищенный материал разбавляли водой (5 л) и экстрагировали с помощью EtOAc (2×2 л). Отделенный водный слой подкисляли 6N раствором HCl (pH=2) и экстрагировали с помощью DCM (3×2 л). Объединенные органические слои промывали соевым раствором, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением соединения 5 (550 г, 58%) в виде коричневого сиропа. Повторно проводили реакцию с еще 1 кг исходного вещества и получали 550 г соединения 5.

¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 12,68 (уш. с, 1H), 7,36-7,28 (м, 5H), 4,56-4,49 (м, 2H), 4,07-3,90 (дд, 1H), 3,66-3,64 (д, 1H), 3,50-3,44 (м, 1H), 2,29-2,20 (м, 1H), 2,03-1,75 (м, 3H), 1,39-1,28 (2s, 9H).

LCMS (ESI): m/z 236,0 [M⁺+1-Вос].

ВЭЖХ: 7 6,79%.

Хиральная ВЭЖХ: 96,26%

Синтез (S)-1-(третбутоксикарбонил)-2-(гидроксиметил)пирролидин-2-карбоновой кислоты (6).

К перемешиваемому раствору соединения 5 (1,1 кг, 32,835 моль) в метаноле (10 л) добавляли 10% Pd-C (500 г), который имел влажность 50%, при комнатной температуре и перемешивали в течение 8 ч в атмосфере H₂ (3 кг). После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) реакционную смесь фильтровали через слой целита и слой промывали метанолом (50 мл). Полученный фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного вещества, которое растирали с помощью Et₂O с получением соединения 6 (650 г, 81%) в виде желтовато-белого твердого вещества.

¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 3,92-3,80 (дд, 1H), 3,64-3,61 (м, 1H), 3,49-3,34 (м, 1H), 3,32-3,26 (м, 1H), 2,29-2,16 (м, 1H), 1,95-1,71 (м, 3H), 1,38-1,33 (с, 9H).

LCMS (ESI): m/z 243,8 [M⁺-1].

Синтез третбутил (S)-2-(((2S,3R)-1,3-бис(бензилокси)-1-оксобутан-2-ил)карбамоил)-2-(гидроксиметил)пирролидин-1-карбоксилата (7).

К раствору соединения 6 (450 г, 0,836 моль) в DCM (4,5 л) добавляли N,N-диизопропилэтиламин (84 6 мл, 4,591 моль) при 0-5°C в атмосфере азота. После перемешивания в течение 10 мин добавляли промежуточное соединение D1 (615 г, 1,836 моль). После перемешивания в течение 10 мин добавляли HATU (701 г, 2,204 моль). Температуру реакционной смеси доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение 6 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) реакционную смесь разбавляли с помощью DCM (1 л) и промывали водой (2×2 л), 10% раствором лимонной кислоты (2 л) и соевым раствором (2 л). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного соединения, которое очищали колоночной хроматографией, элюируя с помощью 40% EtOAc/н-гексан, с получением соединения 7, которое растворяли в Et₂O (1,5 л) и перемешивали в течение 1 ч. Полученный осадок фильтровали и сушили под вакуумом с получением соединения 7 (630 г, 65%) в виде белого твердого вещества.

¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 7,91-7,89 (д, 0,5H), 7,53-7,51 (д, 0,5H), 7,32-7,19 (м, 10H), 5,64 (уш. с, 1H), 5,16-5,04 (м, 2H), 4,62-4,49 (м, 2H), 4,31-4,28 (м, 1H), 4,09-4,02 (м, 1,5H), 3,87 (уш. с, 1H), 3,57-3,56 (м, 0,5H), 3,43-3,37 (м, 1H), 3,29-3,25 (м, 1H), 2,32-2,14 (м, 1H), 1,98-1,90 (м, 1H), 1,75-1,69 (м, 2H),

1,33-1,26 (с, 9H), 1,14-1,12 (д, 3H).

LCMS (m/z): 527,6 [M⁺+1].

ВЭЖХ: 96,60%.

Синтез третбутил (S)-2-((2S,3R)-1,3-бис(бензилокси)-1-оксо-бутан-2-ил)-1-оксо-2,5-диазапиро[3,4]октан-5-карбоксилата (8).

К раствору трифенилфосфина (295 г, 1,125 моль) в THF (846 мл) добавляли по каплям DIAD (227 г, 1,125 моль) при комнатной температуре в атмосфере азота и перемешивали в течение 30 мин. Реакционную смесь охлаждали до 15°C, добавляли по каплям раствор соединения 7 (423 г, 0,804 моль) в THF (1,2 л) и перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Полученное неочищенное вещество промывали гексаном, затем перемешивали со смесью 50% Et₂O/гексан в течение 30 мин. Образовавшийся осадок отфильтровывали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Полученное неочищенное вещество очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя смесью 40% EtOAc/гексан, с получением соединения 8 (425 г, неочищенное) в виде коричневого сиропа.

¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 7,38-7,21 (м, 10H), 5,17-5,10 (м, 2H), 4,56-4,50 (м, 2H), 4,31-4,28 (д, 1H), 4,06-3,99 (м, 2H), 3,89-3,88 (д, 0,5H), 3,48-3,47 (д, 0,5H), 3,36-3,34 (м, 1H), 3,25-3,19 (м, 1H), 2,10-2,02 (м, 2H), 1,79-1,77 (м, 2H), 1,40-1,25 (с, 9H), 1,15-1,12 (д, 3H).

LCMS (ESI): m/z 509,4 [M⁺+1].

ВЭЖХ: 92,31%.

Хиральная ВЭЖХ: 86,47%.

Синтез (2S,3R)-2-((S)-5-(третбутоксикарбонил)-1-оксо-2,5-диазапиро[3,4]октан-2-ил)-3-гидроксибутановой кислоты (9).

Раствор соединения 8 (283 г, 0,557 моль) в метаноле (1,2 л) подвергали дегазации в атмосфере N₂. Затем добавляли 10% Pd-C (140 г), содержащий 50% влаги, при комнатной температуре и перемешивали в течение 24 ч в атмосфере H₂. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) реакционную смесь фильтровали через слой целита и фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Полученное неочищенное твердое вещество разбавляли с помощью Et₂O (500 мл) и интенсивно перемешивали при 0°C в течение 1 ч. Полученный твердый материал отфильтровывали и сушили с получением соединения 9 (140 г, 76%) в виде белого твердого вещества.

¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 12,86 (уш. с, 1H), 5,24 (уш. с, 1H), 4,06-4,00 (м, 2H), 3,88-3,82 (м, 1H), 3,51-3,50 (м, 1H), 3,43-3,34 (м, 1H), 3,31-3,23 (м, 1H), 2,15-2,09 (м, 2H), 1,82-1,78 (м, 2H), 1,39-1,31 (с, 9H), 1,10-1,08 (д, 3H).

LCMS (m/z): 327,1 [M⁺-1].

ВЭЖХ: 95,44%.

Хиральная ВЭЖХ: 100,00%.

Синтез третбутил (S)-2-((2S,3R)-1-амино-3-гидрокси-1-оксо-бутан-2-ил)-1-оксо-2,5-диазапиро[3,4]октан-5-карбоксилата (B4).

К перемешиваемому раствору соединения 9 (420 г, 1,28 моль) в CH₂Cl₂ (4,2 л) добавляли NATU (584 г, 1,536 моль), NH₄Cl (137 г, 2,56 моль) и диизопропилэтиламин (708 мл, 3,841 моль) при 0°C в атмосфере азота. Температуру реакционной смеси доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение 8 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) реакционную смесь распределяли между водой (2 л) и CH₂Cl₂ (2 л) и перемешивали в течение 15 мин. Органический слой отделяли, промывали 2N раствором HCl (2×1 л) и насыщенным раствором NaHCO₃ (2 л) и соевым раствором (2 л). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении. Полученное неочищенное вещество очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя смесью 5% MeOH/CH₂Cl₂, с получением соединения B4 (320 г, смесь) в виде желтовато-белого твердого вещества. Смесь соединения B4 (87 г) растворяли в DCM и повторно осаждали с помощью Et₂O при интенсивном перемешивании при комнатной температуре в течение 1 ч. Продукт фильтровали и сушили под вакуумом с получением соединения B4 (82 г) в виде белого твердого вещества.

¹H-ЯМР (400 МГц, D₂O): δ 4,53-4,10 (м, 2H), 4,08-3,96 (м, 1H), 3,80-3,72 (м, 1H), 3,60-3,39 (м, 2H), 2,53-2,31 (м, 2H), 2,02-1,93 (м, 2H), 1,51-1,45 (с, 9H), 1,31-1,29 (д, 3H).

LCMS (ESI): m/z 326,1 [M⁺-1].

ВЭЖХ: 99,66%.

Хиральная ВЭЖХ: 99,76%.

Удельное оптическое вращение (с=1, MeOH): -49,61.

Синтез (2S,3R)-3-гидрокси-2-((S)-1-оксо-2,5-диазапиро[3,4]октан-2-ил)бутанамида (10).

К перемешиваемому раствору соединения B4 (10 г, 0,031 моль) в CH₂Cl₂ (40 мл) добавляли TFA (23 мл, 0,305 моль) при 0°C в атмосфере азота. Температуру реакционной смеси доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение 3 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) летучие компоненты испаряли при пониженном давлении. Полученный материал в виде густого сиропа промывали эфиром (2×50 мл) и сушили под вакуумом с получением соединения 10 (10 г, TFA соль, неочищенная) в виде густого сиропа, которое использовали на следующей стадии.

^1H -ЯМР (400 МГц, D_2O): δ 4,38-4,10 (м, 2H), 4,11-3,94 (м, 2H), 3,56-3,44 (м, 2H), 2,52-2,38 (м, 2H), 2,24-2,16 (м, 2H), 1,39-1,27 (д, 3H).

LCMS (ESI): m/z 228,2 [M^++1].

Синтез (2S,3R)-3-гидрокси-2-((S)-5-изобутил-1-оксо-2,5-дiazаспиро[3,4]октан-2-ил)бутанамида (соединение В).

К перемешиваемому раствору неочищенного соединения 10 (10 г, TFA соль, 0,029 моль) в метаноле (50 мл) добавляли изобутиральдегид (6,5 мл, 0,073 моль), затем АсОН (2,5 мл) при комнатной температуре в атмосфере азота и перемешивали в течение 10 мин. Затем добавляли порциями NaCNBH_3 (5,4 г, 0,087 моль) и продолжали перемешивание в течение 16 ч. Исходный материал не был полностью израсходован (контролировали методом ТСХ). Опять добавляли изобутиральдегид (3,2 мл, 0,036 моль) и АсОН (1 мл) и продолжали перемешивание в течение 2 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) реакционную смесь разбавляли с помощью CH_2Cl_2 (20 мл) и концентрировали при пониженном давлении. Полученное неочищенное вещество очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя смесью 4% MeOH/DCM, с получением (2S,3R)-3-гидрокси-2-((S)-5-изобутил-1-оксо-2,5-дiazаспиро[3,4]октан-2-ил)бутанамида (6 г) в виде густого сиропа.

^1H -ЯМР (500 МГц, CD_3OD): δ 4,10-4,07 (м, 2H), 3,63 (д, $J=5,5$ Гц, 1H), 3,49 (д, $J=6,0$ Гц, 1H), 2,97-2,93 (м, 1H), 2,74 (кв, $J=8,0$ Гц, 1H), 2,41-2,34 (м, 2H), 2,26-2,20 (м, 1H), 2,17-2,11 (м, 1H), 1,94-1,81 (м, 2H), 1,73-1,69 (м, 1H), 1,21 (д, $J=6,0$ Гц, 3H), 0,91-0,89 (м, 6H).

LCMS (ESI): m/z 284,1 [M^++1].

ВЭЖХ: 99,53%.

Хиральная ВЭЖХ: 100,00%.

Удельное оптическое вращение ($c=0,5$, MeOH): -60,25.

Синтез (4S)-2-((2S,3R)-1-амино-3-гидрокси-1-оксобутан-2-ил)-5-изобутил-1-оксо-2,5-дiazаспиро[3,4]октан-5-ия (Z)-3-карбокси-акрилата (соли малеиновой кислоты соединения В).

К раствору (2S,3R)-3-гидрокси-2-((S)-5-изобутил-1-оксо-2,5-дiazаспиро[3,4]октан-2-ил)бутанамида (180 мг, 0,636 ммоль) в H_2O (2 мл) добавляли малеиновую кислоту (59 мг, 0,508 ммоль) при комнатной температуре и перемешивали в течение 16 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) удаляли воду при пониженном давлении. Полученное неочищенное вещество растирали с пентаном и гексаном, сушили под вакуумом с получением (4S)-2-((2S,3R)-1-амино-3-гидрокси-1-оксобутан-2-ил)-5-изобутил-1-оксо-2,5-дiazаспиро[3,4]октан-5-ия (Z)-3-карбокси-акрилата (210 мг, 86%) в виде бледно-желтого твердого вещества.

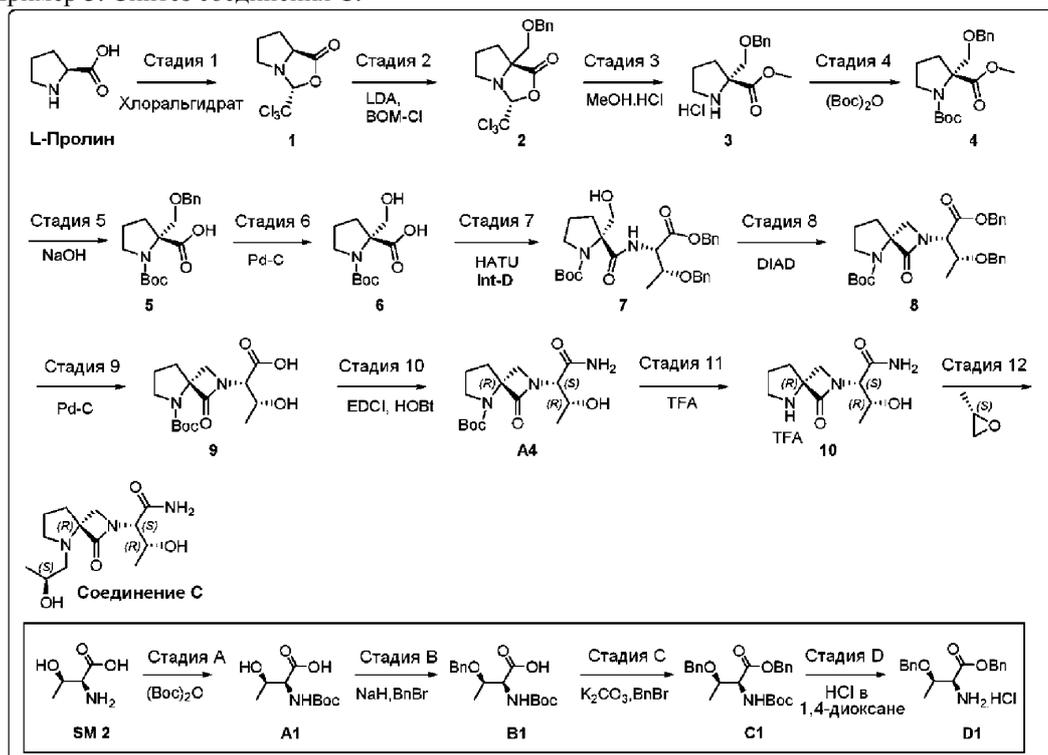
^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD): δ 6,28 (с, 2H), 4,21-4,11 (м, 2H), 3,90 (д, $J=7,0$ Гц, 1H), 3,71 (д, $J=7,0$ Гц, 1H), 3,47-3,36 (м, 1H), 3,20-3,09 (м, 1H), 2,92-2,82 (м, 1H), 2,81-2,71 (м, 1H), 2,48-2,38 (м, 1H), 2,36-2,26 (м, 1H), 2,20-1,88 (м, 3H), 1,24 (д, $J=6,0$ Гц, 3H), 1,00 (т, $J=7,0$ Гц, 6H).

LCMS (ESI): m/z 284,2 [M^++1 -малеиновая кислота].

ВЭЖХ: 97,98%.

Температура плавления: 114,8-118,3°C.

Пример 3. Синтез соединения С.



Синтез (3*R*,7*aS*)-3-(трихлорметил)тетрагидро-1*H*,3*H*-пирроло[1,2-*c*]оксазол-1-она (1).

К суспензии L-пролина (2,0 кг, 0,017 моль) в хлороформе (50 л) добавляли хлоральгидрат (5,7 кг, 0,034 моль) при комнатной температуре. Реакционную смесь нагревали при 60°C в аппарате Дина-Старка и собирали полученную воду. Через 16 ч летучие компоненты концентрировали при пониженном давлении. Неочищенное твердое вещество промывали холодным этанолом, фильтровали и сушили с получением соединения 1 (2,2 кг, 57%) в виде белого твердого вещества.

¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-*d*₆): δ 5,82 (с, 1H), 4,11-4,08 (м, 1H), 3,33-3,27 (м, 2H), 3,19-3,14 (м, 1H), 2,15-2,10 (м, 1H), 1,96-1,91 (м, 1H), 1,80-1,74 (м, 1H), 1,65-1,58 (м, 1H).

Синтез (3*R*,7*aR*)-7*a*-((бензилокси)метил)-3-(трихлорметил)тетрагидро-1*H*,3*H*-пирроло[1,2-*c*]оксазол-1-она (2).

К раствору диизопропиламина (221,2 мл, 1,533 моль) в THF (870 мл) добавляли по каплям *n*-BuLi (1,6 М в гексане) (958,5 мл, 1,533 моль) при -78°C в атмосфере азота. После завершения добавления температуру реакционной смеси повышали до -20°C и перемешивали в течение 1 ч. Снова охлаждали до -78°C, добавляли соединение 1 (250 г, 1,022 моль) в THF (1 л) и перемешивали в течение 30 мин. Затем добавляли по каплям бензилхлорметиловый эфир (208 мл, 1,329 моль) и продолжали перемешивание в течение 1 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) реакционную смесь гасили ледяной водой (100 мл) и экстрагировали с помощью Et₂O (2×100 мл). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (100 мл), сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении с получением материала, который очищали колоночной хроматографией, элюируя смесью 10% EtOAc/*n*-гексан, с получением соединения 2 (220 г, неочищенное) в виде коричневого густого сиропа.

¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-*d*₆): δ 7,42-7,26 (м, 5H), 5,60 (с, 1H), 4,59-4,53 (д, 2H), 3,67-3,61 (м, 2H), 3,37-3,33 (м, 1H), 3,31-3,10 (м, 1H), 2,12-1,99 (м, 2H), 1,87-1,75 (м, 2H).

LCMS (ESI): *m/z* 363,9 [*M*⁺+1].

Синтез метил (R)-2-((бензилокси)метил)пирролидин-2-карбоксилата гидрохлорида (3).

К раствору соединения 2 (400 г, 1,096 моль) в метаноле (1 л) добавляли 2*N* HCl в MeOH (1,64 л, 3,29 моль) при комнатной температуре и перемешивали при 80°C в течение 16 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) летучие компоненты испаряли при пониженном давлении. Полученное неочищенное вещество промывали гексанами (3×750 мл) и сушили при пониженном давлении с получением соединения 3 (358 г, неочищенное) в виде красноватого густого сиропа.

¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-*d*₆): δ 10,40 (уш. с, 1H), 7,40-7,21 (м, 5H), 4,64-4,50 (д, 2H), 4,49-4,3 (д, 2H), 3,76 (с, 3H), 3,33-3,22 (м, 2H), 2,22-2,15 (с, 1H), 2,02-1,9 (м, 2H), 1,95-1,83 (м, 1H).

Синтез 1-(третбутил) 2-метил (R)-2-((бензилокси)метил)пирролидин-1,2-дикарбоксилата (4).

К перемешиваемой суспензии соединения 3 (313 г, неочищенное 1,096 моль) в DCM (2,19 л) добавляли по каплям Et₃N (458,4 мл, 3,288 моль) при 0°C в атмосфере азота и перемешивали в течение 10 мин.

Затем добавляли по каплям Вос-ангидрид (358,4 г, 1,644 моль) при 0°C. Температуру реакционной смеси доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение 16 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ), реакционную смесь разбавляли водой (2×1 л) и экстрагировали с помощью CH₂Cl₂ (2×500 мл). Объединенный органический слой промывали 10% раствором лимонной кислоты (pH~7) и соевым раствором (1 л). Органический слой сушили над Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного соединения, которое очищали колоночной хроматографией, элюируя смесью 20% EtOAc/н-гексан, с получением соединения 4 (215 г, 56%) в виде бесцветного густого сиропа.

¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 7,37-7,26 (м, 5H), 4,56-4,48 (м, 2H), 4,03-3,87 (дд, 1H), 3,69-3,67 (д, 1H), 3,62 (с, 3H), 3,53-3,47 (м, 1H), 3,33-3,30 (м, 1H), 2,27-2,20 (м, 1H), 2,03-1,89 (м, 2H), 1,88-1,79 (м, 1H), 1,46-1,24 (2s, 9H).

LCMS (ESI): m/z 250, 1 [(M⁺+1)-Вос].

Синтез (R)-2-((бензилокси)метил)-1-(третбутоксикарбонил)пирролидин-2-карбоновой кислоты (5).

К раствору соединения 4 (215 г, 0,616 моль) в MeOH:THF:H₂O (3 л, 5:5:3) добавляли NaOH (73,9 г, 1,848 моль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин. Реакционную смесь нагревали до 80°C и перемешивали в течение 16 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) температуру реакционной смеси доводили до комнатной температуры, летучие компоненты испаряли. Неочищенный материал разбавляли водой (1 л) и экстрагировали с помощью Et₂O (2×500 мл). Отделенный водный слой подкисляли 2N раствором HCl (pH~3) и экстрагировали с помощью DCM (2×750 мл). Объединенные органические слои промывали соевым раствором, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали с получением соединения 5 (170 г, 82,4%) в виде желтовато-белого твердого вещества.

¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 12,66 (уш. с, 1H), 7,36-7,26 (м, 5H), 4,54-4,47 (м, 2H), 4,05-3,90 (дд, 1H), 3,88-3,63 (д, 1H), 3,63-3,44 (м, 1H), 3,34-3,27 (м, 1H), 2,27-2,01 (м, 1H), 2,02-1,8 (м, 2H), 1,79-1,76 (м, 1H), 1,17-1,14 (2s, 9H).

LCMS (ESI): m/z 235,1 [(M⁺+1)-Вос].

Синтез (R)-1-(третбутоксикарбонил)-2-(гидроксиметил)пирролидин-2-карбоновой кислоты (6).

К перемешиваемому раствору соединения 5 (170 г, 0,507 моль) в CH₃OH (1 л) добавляли 10% Pd-C (68 г), содержащий 50% влаги, при комнатной температуре и перемешивали в течение 16 ч в атмосфере H₂. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) реакционную смесь фильтровали через слой целита и слой промывали с помощью CH₃OH (1 л). Полученный фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением соединения 6 (110 г, 88%) в виде белого твердого вещества.

¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 12,66 (уш. с, 1H), 3,96-3,83 (дд, 1H), 3,63-3,60 (м, 1H), 3,49-3,46 (м, 1H), 3,34-3,25 (м, 2H), 2,30-2,15 (м, 1H), 1,95-1,72 (м, 3H), 1,38-1,33 (с, 9H).

LCMS (ESI): m/z 244 [M⁺-1].

Хиральная ВЭЖХ: 95,88%.

Синтез третбутил (R)-2-(((2S,3R)-1,3-бис(бензилокси)-1-оксо-бутан-2-ил)карбамоил)-2-(гидроксиметил)пирролидин-1-карбоксилата (7).

К перемешиваемому в атмосфере N₂ раствору соединения 6 (110 г, 0,448 моль) в DCM (20 мл), охлажденному до 0°C, добавляли в атмосфере азота диизопропилэтиламин (206 мл, 1,12 моль), промежуточное соединение D1 (150 г, 0,448 моль), NATU (204 г, 0,537 моль). Температуру реакционной смеси доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение 4 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) реакционную смесь разбавляли с помощью DCM (1 л) и промывали водой (2×500 мл), 10% раствором лимонной кислоты (500 мл) и соевым раствором (500 мл). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного соединения, которое очищали колоночной хроматографией, элюируя смесью 30% EtOAc/н-гексан, с получением соединения 7 (143 г, 60%) в виде бесцветного густого сиропа.

¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 8,20-8,12 (д, 1H), 7,29-7,18 (м, 10H), 5,83-5,59 (м, 1H), 5,08 (с, 2H), 4,50-4,44 (м, 2H), 4,30-4,26 (м, 1H), 4,08-4,00 (м, 2H), 3,42-3,40 (м, 2H), 3,39-3,29 (м, 1H), 2,19-2,08 (м, 1H), 1,96-1,87 (м, 1H), 1,68-1,63 (м, 2H), 1,23-1,15 (с, 9H), 1,14-1,13 (д, 3H).

LCMS (m/z): 525,2 [M⁺-1].

ВЭЖХ: 76,2%.

Хиральная ВЭЖХ: 69,47%.

Синтез третбутил (R)-2-(((2S,3R)-1,3-бис(бензилокси)-1-оксо-бутан-2-ил)-1-оксо-2,5-диазапиро[3,4]октан-5-карбоксилата (8).

К раствору трифенилфосфина (161,4 г, 0,612 моль) в THF (430 мл) добавляли по каплям DIAD (123,8 г, 0,612 моль) при комнатной температуре в атмосфере азота и перемешивали в течение 15 мин. Добавляли по каплям раствор соединения 7 (215 г, 0,408 моль) в THF (860 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) летучие компоненты испаряли при пониженном давлении. Полученное неочищенное вещество

очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя смесью 20% EtOAc/гексан, с получением соединения 8 (180 г, смесь с побочным продуктом DIAD) в виде желтого сиропа.

$^1\text{H-NMR}$ (400 МГц, DMSO- d_6): δ 7,31-7,18 (м, 10H), 5,18-5,10 (м, 2H), 4,61-4,54 (м, 2H), 4,27-4,18 (м, 2H), 3,78-3,77 (д, 1H), 3,45-3,43 (д, 1H), 3,35-3,31 (д, 1H), 3,27-3,23 (м, 1H), 2,03-1,98 (м, 2H), 1,78-1,76 (м, 2H), 1,39-1,31 (2s, 9H), 1,23-1,22 (д, 3H) (пики побочного продукта DIAD не обнаруживали).

LCMS (ESI): m/z 509,4 [M^++1].

Синтез (2S,3R)-2-((R)-5-(третбутоксикарбонил)-1-оксо-2,5-дiazаспиро[3,4]октан-2-ил)-3-гидроксипутановой кислоты (9).

Раствор соединения 8 (85 г, 0,167 моль) в метаноле (850 мл) подвергали дегазации в атмосфере N_2 . Затем добавляли 10% Pd-C (40 г), содержащий 50% влаги, при комнатной температуре и перемешивали в течение 24 ч в атмосфере H_2 . После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) реакционную смесь фильтровали через слой целита и фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Полученное неочищенное твердое вещество разбавляли с помощью Et_2O (1 л) и интенсивно перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Полученный твердый материал отфильтровывали и сушили с получением соединения 9 (75 г, 68%) в виде белого твердого вещества.

$^1\text{H-NMR}$ (400 МГц, DMSO- d_6): δ 12,86 (уш. с, 1H), 5,24 (уш. с, 1H), 4,06-4,00 (м, 2H), 3,88-3,82 (м, 1H), 3,51-3,50 (м, 1H), 3,43-3,34 (м, 1H), 3,31-3,23 (м, 1H), 2,15-2,09 (м, 2H), 1,82-1,78 (м, 2H), 1,39-1,31 (с, 9H), 1,10-1,08 (д, 3H).

LCMS (m/z): 329,1 [M^++1].

ВЭЖХ: 93,97%.

Синтез третбутил (R)-2-((2S,3R)-1-амино-3-гидрокси-1-оксо-бутан-2-ил)-1-оксо-2,5-дiazаспиро[3,4]октан-5-карбоксилата (A4).

К перемешиваемому раствору соединения 9 (150 г, 0,457 моль) в CH_2Cl_2 (2 л), охлажденному до 0°C , добавляли диизопропилэтиламин (176,85 г, 1,37 моль), NH_4Cl (48,8 г, 0,914 моль) и HATU (208,3 г, 0,548 моль) в атмосфере азота. Температуру реакционной смеси доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение 12 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) реакционную смесь разбавляли водой (2×750 мл) и экстрагировали с помощью CH_2Cl_2 (2×1 л). Объединенный органический слой промывали 2N раствором HCl и насыщенный раствором хлорида натрия (750 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенное соединение очищали колоночной хроматографией, чистое соединение элюировали смесью 3% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$. Полученный материал разбавляли с помощью DCM (2 л) и промывали насыщенным водным раствором лимонной кислоты (5×500 мл), насыщенным раствором бикарбоната, затем соевым раствором и сушили над Na_2SO_4 . Материал растирали с эфиром (2×500 мл) с получением соединения A4 (80 г, 53%) в виде белого твердого вещества.

$^1\text{H-NMR}$ (400 МГц, D_2O): δ 4,36-4,21 (м, 2H), 4,03-3,98 (м, 1H), 3,76-3,67 (м, 1H), 3,56-3,37 (м, 2H), 2,32-2,23 (м, 2H), 1,97-1,93 (м, 2H), 1,49-1,47 (2s, 9H), 1,33-1,32 (д, 3H).

LCMS (ESI): m/z 328,3 [M^++1].

ВЭЖХ: 99,30%.

Хиральная ВЭЖХ: 98,97%.

Удельное оптическое вращение ($c=1$, CH_3OH): -11,08.

Синтез (2S,3R)-3-гидрокси-2-((R)-1-оксо-2,5-дiazаспиро[3,4]октан-2-ил)бутанамида (10).

К перемешиваемому раствору соединения A4 (2 г, 6,16 ммоль) в CH_2Cl_2 (10 мл) добавляли TFA (1,0 мл, 12,2 ммоль) при 0°C в атмосфере азота. Температуру реакционной смеси доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ) летучие компоненты испаряли при пониженном давлении. Полученный материал в виде густого сиропа промывали с эфиром (2×50 мл) и сушили под вакуумом с получением неочищенного соединения 10 (2,5 г, TFA соль) в виде густого сиропа, который использовали на следующей стадии.

$^1\text{H-NMR}$ (500 МГц, CD_3OD): δ 4,24-4,17 (м, 2H), 3,99-3,89 (м, 2H), 3,52-3,39 (м, 2H), 2,46-2,32 (м, 2H), 2,26-2,10 (м, 2H), 1,28 (д, $J=6,1$ Гц, 3H).

LCMS (ESI): m/z 228,1 [M^++1].

Синтез (2S,3R)-3-гидрокси-2-((R)-5-((S)-2-гидроксипропил)-1-оксо-2,5-дiazаспиро[3,4]октан-2-ил)бутанамида (соединение C).

К перемешиваемому раствору соединения 10 (TFA соль, 2 г, 5,86 ммоль) в метаноле (10 мл) добавляли NaOMe (630 мг, 11,7 ммоль), затем (S)-2-метилоксиран (510 мг, 8,79 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере азота. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. После израсходования исходного материала (контролировали методом ТСХ), реакционную смесь разбавляли с помощью CH_2Cl_2 (10 мл) и концентрировали при пониженном давлении. Полученное неочищенное вещество очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя смесью 5% MeOH/DCM , с получением (2S,3R)-3-гидрокси-2-((R)-5-((S)-2-гидроксипропил)-1-оксо-2,5-дiazаспиро[3,4]октан-2-ил)бутанамида (185 мг, 12%) в виде густого сиропа.

$^1\text{H-NMR}$ (400 МГц, CD_3OD): δ 4,18-4,07 (м, 2H), 3,90-3,81 (м, 1H), 3,63 (д, $J=6,1$ Гц, 1H), 3,58 (д,

J=6,1 Гц, 1Н), 3,11 (дт, J=4,2, 8,2 Гц, 1Н), 2,83-2,67 (м, 2Н), 2,62-2,54 (м, 1Н), 2,26-2,12 (м, 2Н), 1,98-1,83 (м, 2Н), 1,24 (д, J=6,1 Гц, 3Н), 1,14 (д, J=6,3 Гц, 3Н).

LCMS (ESI): m/z 285,9 [M⁺+1].

ВЭЖХ: 97,20%.

Пример 4.

В этом примере описан тест на эмоционально позитивное обучение (PEL). Эксперименты проводили в соответствии с методикой, описанной в публикации Burgdorf et al., "The effect of selective breeding for differential rates of 50-kHz ultrasonic vocalizations on emotional behavior in rats", *Devel. Psychobiol.*, 51:34-46 (2009). Ультразвуковая вокализация крыс с частотой 50 кГц (гедонические ультразвуковые вокализации) является обоснованной моделью для изучения позитивного аффективного состояния и лучше всего проявляется в жесткой контактной игре. Ранее было показано, что ультразвуковые вокализации 50 кГц положительно коррелируют с ожиданием вознаграждения и групповым аппетитивным поведением у крыс и отражают их позитивное аффективное состояние.

В тесте PEL измеряют регистрируемые позитивные (гедонистические) 50 кГц ультразвуковые вокализации (USV) в ответ на стимул взаимного общения, гетероспецифическую стимуляцию жесткой контактной игры. Гетероспецифическую стимуляцию жесткой контактной игры осуществляли правой рукой экспериментатора. Животным предоставляли 3 мин гетероспецифической жесткой контактной игры, которая состояла из чередующихся блоков по 15 с гетероспецифической игры и 15 с без стимуляции. Высокочастотные ультразвуковые вокализации (USV) регистрировали и анализировали с помощью сонограммы, используя программное обеспечение Avasoft SASlab Pro (Germany), в соответствии с методикой, ранее описанной в публикации Burgdorf et al., "Positive emotional learning is regulated in the medial prefrontal cortex by GluN2B-containing receptor NMDAs", *Neuroscience*, 192:515-523 (2011). Для измерения PEL количественно определяли частотно-модулированные 50 кГц высокочастотные ультразвуковые вокализации, которые возникали во время каждого из периодов отсутствия стимуляции. Животных не приучали к стимуляции для игр перед тестированием. Эмоционально позитивное обучение оценивали во время испытаний на воздействие условного стимула (CS), предшествующих испытаниям на воздействие безусловного стимула (UCS). Животных подвергали испытаниям продолжительностью по 15 с каждое, сессия включала 6 испытаний CS и 6 испытаний UCS (суммарно 3 мин). Также измеряли скорость передвижения животных для самостоятельного почесывания в конце трехминутной сессии.

На фиг. 1 приведены результаты теста PEL для крыс. Результаты показывают, что соединение А, вводимое за один час до проведения теста PEL, улучшает эмоционально позитивное обучение, оцениваемое по высокочастотным ультразвуковым вокализациям крыс, тем самым указывая на антидепрессивное действие соединения А.

Пример 5.

Исследовали микросомальную стабильность соединения А и стабильность соединения А в плазме. В следующей таблице указана доля соединения А, оставшегося через 60 мин.

	Человек	Крыса
В микросомах	86%	65%
В плазме	100%	92%

Также определяли концентрацию несвязанного лекарственного средства в головном мозге и проводили анализы на связывание с белками плазмы. В следующей таблице приведены результаты для соединения А (% связывания).

Челове	Крыса
к	
25,9%	29,95%

Исследовали биодоступность соединения А после перорального введения. После дозирования соединения А (10 мг/кг) проводили анализ образцов спинномозговой жидкости (CSF), головного мозга и плазмы. В следующей таблице приведены биодоступность и отношения концентраций соединения А в CSF/плазма и головной мозг/плазма.

Биодоступность (%F)	42
Отношение CSF/плазма	0,65
Отношение головной мозг/плазма	0,19

Пример 6.

Исследования проводили в соответствии с методикой, описанной в публикации Moskal et al., "GLYX-13: a monoclonal antibody-derived peptide that acts as an N-метил-D-аспартат receptor modulator", *Neuropharmacology*, 49, 1077-87, 2005. Измеряли потенцирование [³H]МК-801 связывания (5 нМ; 22,5 кюри/ммоль) с тщательно отмытыми кортикальными мембранами крысы (200 мкг) в неравновесных условиях (15 мин и 25°C) в присутствии возрастающих концентраций соединения А.

На фиг. 2 изображено потенцирование [³H]МК-801 связывания для немутантных субтипов NMDAR2 при использовании соединения А. Как показано на фиг. 2, соединение А характеризуется вы-

сокой селективностью связывания с NR2A и не связывает NR2D.

Пример 7.

Крысам линии Sprague Dawley вводили внутривенно 2 мг/кг соединения А. Второй группе крыс линии Sprague Dawley вводили перорально 10 мг/кг соединения А. Собирали образцы плазмы в течение 24 ч и определяли в них концентрацию соединения А.

На фиг. 3 представлена зависимость среднего значения концентрации соединения А в плазме от времени в течение 24 ч после введения разовой дозы соединения А внутривенно (2 мг/кг) и перорально (10 мг/кг) самцам крыс линии Sprague Dawley.

В другом эксперименте крысам линии Sprague Dawley вводили перорально 10 мг/кг соединения А. В течение 24 ч в разные моменты времени проводили анализ образцов плазмы, головного мозга и спинномозговой жидкости (CSF) на содержание соединения А.

На фиг. 4 представлена зависимость среднего значения концентрации соединения А в плазме, головном мозге и CSF от времени в течение 24 ч после перорального введения разовой дозы соединения А (10 мг/кг) самцам мышей линии Sprague Dawley.

Пример 8.

Этот пример относится к эксперименту PEL, описанному выше в примере 3. Тест на ультразвуковые вокализации крыс (USV).

Эмоционально позитивное обучение оценивали во время испытаний на воздействие безусловного стимула (CS), предшествующих испытаниям на воздействие безусловного стимула почесывания (UCS). Животных подвергали испытаниям продолжительностью по 15 с каждое, которые включали 6 CS испытаний и 6 UCS испытаний (суммарно 3 мин).

На фиг. 5 приведены результаты теста PEL для крыс. Результаты показывают, что соединение В улучшает эмоционально позитивное обучение у крыс в тесте высокочастотных ультразвуковых вокализаций, тем самым указывая на антидепрессивное действие соединения В.

Пример 9.

Исследовали микросомальную стабильность соединения В и стабильность соединения В в плазме. В следующей таблице указана доля соединения В, оставшегося через 60 мин.

	Человек	Крыса
В микросомах	87%	81%
В плазме	100%	89%

Также определяли концентрацию несвязанного лекарственного средства в головном мозге и проводили анализы на связывание с белками плазмы. В следующей таблице приведены результаты для соединения В (% связывания).

Челове	Крыса
к	
28,8%	19,8%

Исследовали биодоступность соединения В. После дозирования соединения В проводили анализ образцов спинномозговой жидкости (CSF), головного мозга и плазмы. В следующей таблице приведены биодоступность и отношения концентраций соединения В в CSF/плазма и головной мозг/плазма.

Биодоступность (%F)	38
Отношение CSF/плазма	0,70
Отношение головной мозг/плазма	0,18

Соединение А и соединение В оба характеризуются более низкой пероральной биодоступностью, но они в относительно более высоких количествах проникают в спинномозговую жидкость (CSF) и головной мозг.

Пример 10.

Исследования проводили так же, как описано в примере 5, в соответствии с методикой, приведенной в публикации Moskal et al. (2005). Измеряли потенцирование [³H]МК-801 связывания (5 нМ; 22,5 кюри/ммоль) с тщательно отмытыми кортикальными мембранами крысы (200 мкг) в неравновесных условиях (15 мин и 25°C) в присутствии возрастающих концентраций соединения В.

На фиг. 6 изображено потенцирование [³H]МК-801 связывания для немутантных субтипов NMDAR2 при использовании соединения В. Соединение В характеризуется высокой селективностью связывания с NR2B и NR2D и более низкой активностью в отношении NR2A и NR2C.

Пример 11.

Крысам линии Sprague Dawley вводили внутривенно 2 мг/кг соединения В. Второй группе крыс линии Sprague Dawley вводили перорально 10 мг/кг соединения В. Собирали образцы плазмы в течение 24 ч и определяли в них концентрацию соединения В.

На фиг. 7 представлена зависимость среднего значения концентрации соединения В в плазме от времени в течение 24 ч после введения разовой дозы соединения В внутривенно (2 мг/кг) и перорально (10 мг/кг) самцам крыс линии Sprague Dawley.

В другом эксперименте крысам линии Sprague Dawley вводили перорально 10 мг/кг соединения В. В течение 24 ч в разные моменты времени проводили анализ образцов плазмы, головного мозга и спинномозговой жидкости (CSF) на содержание соединения А.

На фиг. 8 представлена зависимость среднего значения концентрации соединения В в плазме, головном мозге и CSF от времени в течение 24 ч после перорального введения разовой дозы соединения В (10 мг/кг) самцам мышей линии Sprague Dawley.

Пример 12.

Для соединения А проводили исследование MN (микроядер) *in vitro*. Исследование проводили также для соединения В.

Цитотоксичность представлена как % от контрольного роста. Значение цитотоксичности менее 60% помечают и соединение считают токсичным при соответствующей его концентрации. Результаты исследования MN *in vitro* для соединения А представлены на фиг. 9. Результаты исследования MN *in vitro* для соединения В представлены на фиг. 10.

Тест Эймса проводили для каждого из соединения А и соединения В. В случае результатов для теста Эймса, дефисы (-) указывают на отрицательные результаты. Слабо положительные, если $p < 0,05$, обозначают как "+". Сильно положительные, если $p < 0,01$, обозначают как "++". Очень сильно положительные, если $p < 0,001$, обозначают как "+++". Результаты теста Эймса для соединения А показаны на фиг. 9. Результаты теста Эймса для соединения В показаны на фиг. 10.

Исследование гена специфических калиевых каналов сердца (hERG) проводили с использованием соединения А для выявления потенциальных взаимодействий канала hERG. Кроме того, исследование hERG проводили с использованием соединения В. Для hERG считается, что результаты, показывающие ингибирование или стимуляцию выше 50%, говорят о значительных эффектах испытуемого соединения. Результаты исследования hERG в случае соединения А показаны на фиг. 9, и результаты исследования hERG в случае соединения В показаны на фиг. 10.

Пример 13.

Вызывали травматическое повреждение головного мозга/когнитивные расстройства в результате одноразового воздействия ударной волны, модифицированного для использования на крысах, в соответствии с методикой, опубликованной в статье Goldstein et al., "Chronic traumatic encephalopathy in blast-exposed military veterans and a blast neurotrauma mouse model," *Science Translational Medicine*, vol. 4, Issue 134, p. 134ra60, 2012. Использовали самцов крыс линии Sprague Dawley в возрасте 2-3 месяцев. Крыс содержали в клетках Lucite с подстилкой из осиновых щепок, на протяжении всего исследования поддерживали цикл дня и ночи 12:12 (свет включали в 5 утра) и обеспечивали неограниченный доступ к лабораторному корму Purina (USA) и водопроводной воде. Сначала крыс анестезировали с использованием 3,5-4% изофлурана, затем их уши защищали вкладышами из поролона размером 1,5×1,5 мм (Pura-Fit®, Moldex-Metric Inc., Culver City, California) и крысу помещали в обеспечивающее доступ к голове животного приспособление для торакальной фиксации грызунов (Stoelting, USA), которое защищает тело, но позволяет свободное движение головой. Алюминиевую аэродинамическую трубу (183×61 см, л-3 Applied Technologies, USA) устанавливали в 10 см от головы крысы. Крыс подвергали воздействию ударной волны гелия при давлении ~0,29 МПа, полученной путем прокалывания полиэфирной пленки толщиной 0,36 мм. Плацебо-контролируемые исследования проводили вне пределов радиуса воздействия ударной волны. Животным вводили дозу соединения А (10 мг/кг перорально), соединения В (10 мг/кг перорально) или 0,5% натрий-карбоксиметилцеллюлозы в 0,9% стерильном физиологическом растворе (1 мл/кг перорально) через 1 ч после воздействия ударной волны.

PEL (эмоционально позитивное обучение) проводили через 48 ч после воздействия ударной волны. Гетероспецифическую жесткую контактную игру проводили, как описано ранее в публикации Burgdorf et al., "The long-lasting antidepressant effects of rapastinel (GLYX-13) are associated with a metaplasticity process in the medial prefrontal cortex and hippocampus", *Neuroscience*, 308:202-211, 2015. Стимуляцию гетероспецифической жесткой контактной игры осуществляли правой рукой экспериментатора. Животных подвергали трехминутной гетероспецифической игре, которая состояла из чередующихся 15-секундных блоков гетероспецифической игры и 15-секундного отсутствия стимуляции. Высокочастотные ультразвуковые вокализации (USV) регистрировали и анализировали с помощью сонограммы с использованием программного обеспечения Avasoft SASlab Pro (Germany) в соответствии с методикой, описанной ранее в публикации Burgdorf et al., "Positive emotional learning is regulated in the medial prefrontal cortex by GluN2B-containing receptor NMDAs", *Neuroscience*, 192:515-523, 2011. Для измерения PEL количественно определяли частотно-модулированные USV 50 кГц, которые возникали в течение каждого периода без стимуляции. Животных не приучали к стимуляции игры перед испытанием.

Результаты исследования PEL для соединений А и В представлены на фиг. 11 и 12.

Пример 14.

В этом примере проводится оценка седативного эффекта лечения вызванной новизной гипопофагии в модели стресс-индуцированной тревоги. Это исследование также позволяет проводить анализ быстродействующих антидепрессантов кетамина и GLYX-13 (Li et al., "mTOR-dependent synapse formation under-

lies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists", *Science*, 329:959-964, 2010; and Burgdorf et al., 2013). См. также публикацию Bodnoff et al., "A comparison of the effects of diazepam versus several typical and atypical anti-depressant drugs in an animal model of anxiety", *Psychopharmacology*, 97:277-279, 1989.

Испытания проводили в соответствии с методикой, описанной в публикации Burgdorf et al., 2013. Использовали версию испытания на вызванную новизной гипофагию (NIH), которое, как было показано ранее, обнаруживает сильный подобный седативному эффект кетамина (Li et al., 2010). Животных лишали пищи в течение ночи перед испытанием и лабораторный корм помещали в центральную камеру открытого поля (40×40×20 см) на 10 мин при тусклом красном освещении. Между испытаниями каждого животного из аппарата удаляли фекалии и мочу. После испытания на вызванную новизной гипофагию (NIH) определяли латентный период перед поеданием корма в домашней клетке животного в качестве контрольного значения, для того чтобы гарантировать, что новая окружающая среда оказывает специфическое воздействие на момент начала поедания корма. Животных снимали видеочамерой и для животного определяли вручную в режиме офлайн латентный период (с) до первого прикосновения животного к корму.

Одно значение на подвергаемую дозированию группу, которое составляла 2 или более стандартных отклонения от среднего значения, считали выпадающим значением и исключали его при анализе данных. Величину ED₅₀ определяли как дозу (или логарифмическую линейную интерполяцию дозы), которая характеризовалась половинным максимальным эффектом (средним значением для плацебо и максимально эффективной дозы) из линейного графика величины вызванной новизной гипофагии (NIH) от логарифмической величины дозы. Максимально эффективную дозу определяли как самую низкую дозу, которая статистически значимо отличалась от плацебо, но была статистически эквивалентна (по наименьшему достоверному различию Фишера (PLSD)); а установлено на 0,05) более высоким дозам.

Результаты представлены на фиг. 13 и 14. Как показано на фиг. 13, соединение А вызывает седативный эффект в тесте на вызванную новизной гипофагию (NIH) у крыс. Средняя величина±SEM латентного периода для приема корма в тесте вызванной новизной гипофагии (NIH) у самцов крыс линии SD в возрасте 2-3 месяцев, получавших соединение А (10-1000 мкг/кг перорально; синие кружки) или стерильный физиологический раствор+носитель 0,5% натрий-карбоксиметилцеллюлоза (1 мл/кг перорально; черный кружок) за 1 ч до единственного 10-минутного сеанса испытаний. Животных лишали пищи в течение ночи перед испытанием и лабораторный корм помещали в центральную камеру открытого поля во время испытания.

Как показано на фиг. 14, соединение В вызывает седативный эффект в тесте на вызванную новизной гипофагию (NIH) у крыс. Средняя величина±SEM латентного периода для приема корма в тесте вызванной новизной гипофагии (NIH) у самцов крыс линии SD в возрасте 2-3 месяцев, получавших соединение В (0,0001-1 мкг/кг перорально; синие кружки) или стерильный физиологический раствор+носитель 0,5% натрий-карбоксиметилцеллюлоза (1 мл/кг перорально; черный кружок) за 1 ч до единственного 10-минутного сеанса испытаний. Животных лишали пищи в течение ночи перед испытанием и лабораторный корм помещали в центральную камеру открытого поля во время испытания.

Пример 15.

Модель механической анальгезии Беннета используют для оценки обезболивающего действия соединений путем измерения порога отдергивания лапы (Bennett G.J., Xie YK, "A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man", *Pain*, 33:87-107, 1988). На животных проводят операцию по восстановлению поврежденного нерва и потом исследуют ответную реакцию анальгезии после того, как животные восстановились после операции, но все еще проявляют низкий порог отдергивания лапы после использования нитей фон Фрея. Животных для контроля подвергают хирургической операции, но затем им вводят плацебо, а не испытуемое соединение. Животных подвергали испытаниям через 1 ч, 24 ч и через 1 неделю после введения соединения или введения плацебо.

Использовали самцов крыс линии Sprague Dawley в возрасте 2-3 месяцев. Поставщиком крыс для всех исследований была лаборатория Harlan. Крыс содержали в клетках Lucite с подстилкой из осиновых щепок, на протяжении всего исследования поддерживали цикл дня и ночи 12:12 (свет включали в 5 утра) и обеспечивали неограниченный доступ к лабораторному корму Purina (USA) и водопроводной воде. Крыс анестезировали, используя ингаляционный изофлуран (2,5%). Операцию по восстановлению поврежденного нерва проводили в соответствии с методикой, описанной ранее в публикации Bennett and Xie, 1988. Лезвием скальпеля делали дорсальный разрез (~1,5 см в длину) через кожу на правой задней конечности, параллельно и постериально бедренной кости. Используя малый остроконечный гемостат, отделяли друг от друга бицепс бедра и ягодичные поверхностные мышцы. Используя изогнутые щипцы с тупыми концами, отделяли и обнажали полностью седалищный нерв. Для исследований механической анальгезии, лигировали весь седалищный нерв. Используя гемостаты/щипцы и хромированный кетгут (5-0), нерв не туго лигировали с помощью двойного узла, на нерв накладывали 3 лигатуры на расстояние 1 мм друг от друга. Лигатуры затягивали до такой степени, чтобы кетгут не скользил вверх или вниз по нерву. Эта методика позволяла достигать частичной потери функции нерва. В случае исследований термической анальгезии лигировали и рассекали общие малоберцовые и большеберцовые ветви седалищно-

го нерва, а икроножную ветвь сохраняли. См. Decosterd I., Woolf C.J., "Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain", *Pain*, 87:149-158, 2000. Испытание проводили через 1-2 недели после операции.

Во время испытаний, крысам давали возможность привыкнуть к поверхности подвесной проволочной сетки (1×1 см с диаметром проволоки 0,3 см) в течение 15-20 мин. Начиная с самой маленькой нити, каждую нить фон Фрея прижимали перпендикулярно к подошвенной поверхности пораженной (ипсилатеральной) задней лапы до тех пор, пока нить слегка не сгибалась, и затем удерживали в течение 6 с. Если не наблюдалось очевидного отдергивания задней лапы или вздрагивания сразу после удаления нити, то таким же образом использовали следующую более крупную нить. В случае обнаружения ответной реакции, использовали нить меньшего размера. Это повторяли до тех пор, пока не было зарегистрировано шесть ответных реакций.

Испытание проводили через 1 ч после введения доз соединения А и соединения В (0,1-10 мг/кг перорально), габапентина (150 мг/кг перорально) или 0,5% натрий-карбоксиметилцеллюлозы в 0,9% стерильном физиологическом растворе. Животных повторно подвергали испытаниям через 24 ч и через 1 неделю после дозирования. Результаты для соединения А показаны на фиг. 15, и результаты для соединения В показаны на фиг. 16. Для обоих соединений однократная доза 10 мг/кг перорально вызывала механический анальгезирующий эффект в модели Беннета через 1 ч, 24 ч и через 1 неделю после дозирования, тогда как габапентин вызывал анальгезирующий эффект только через 1 ч после дозирования.

Пример 16.

Для оценки антидепрессантподобных эффектов проводили неклиническое фармакологическое исследование *in vivo* (тест Порсолта). Для сравнения с соединением А и соединением В использовали отрицательный контроль (0,5% натрий-карбоксиметилцеллюлозы в 0,9% стерильном физиологическом растворе) и положительный контроль (соединение D). Исследование позволило построить кривую зависимости эффекта от дозы для каждого соединения в тесте принудительного плавания Порсолта, оцениваемого по ответной реакции крыс (уменьшению времени плавания) в течение 5-минутного теста на плавание.

Использовали самцов крыс линии Sprague Dawley в возрасте 2-3 месяцев (Harlan, Indianapolis, IN). Крыс содержали в клетках Lucite с подстилкой из осиновых щепок, на протяжении всего исследования поддерживали цикл дня и ночи 12:12 (свет включали в 5 утра) и обеспечивали неограниченный доступ к лабораторному корму Purina (USA) и водопроводной воде.

Тест принудительного плавания Порсолта, адаптированный для использования на крысах, проводили, как описано в публикации Burgdorf et al., *The long-lasting antidepressant effects of rapastinel (GLYX-13) are associated with a metaplasticity process in the medial prefrontal cortex and hippocampus*, *Neuroscience* 308:202-211, 2015. Животных помещали на 15 мин в первый день (привыкание) и на 5 мин в последующий день испытания в прозрачный стеклянный цилиндр высотой 46 см и диаметром 20 см, заполненный на высоту 30 см водопроводной водой ($23 \pm 1^\circ\text{C}$). Животных подвергали тесту через 1 ч после введения дозы соединений (соединения А и соединения В), положительного контроля (соединения D, 10 мкг/кг) или плацебо (0,5% карбоксиметилцеллюлозы натрия (Na-СМС) в 0,9% стерильном физиологическом растворе). Воду заменяли для каждого следующего животного. Животных снимали на видеокамеру, и в режиме онлайн экспериментаторами анонимно оценивалось с межэкспертной надежностью (с остатками Пирсона $r > 0,9$) время плавания, определяемое как минимальное усилие, необходимое для того, чтобы животное могло держать голову над водой.

Величину ED_{50} определяли как дозу (или логарифмическую линейную интерполяцию дозы), которая характеризовалась половинным максимальным эффектом (средним значением для плацебо и максимально эффективной дозы) из линейного графика от логарифма величины дозы. Максимально эффективную дозу определяли как самую низкую дозу, которая статистически значимо отличалась от плацебо, но была статистически эквивалентна (по наименьшему достоверному различию Фишера (PLSD)) более высоким дозам.

Результаты для соединения А показаны на фиг. 17. Взрослым самцам крыс линии Sprague Dawley вводили соединение А (10-1000 мкг/кг перорально; синие кружки или точки экспериментальных данных, соединенные линией), положительный контроль соединение D (10 мкг/кг перорально; зеленый кружок или точка экспериментальных данных при 10 мкг/кг перорально) или 0,5% карбоксиметилцеллюлозы натрия в 0,9% стерильном физиологическом растворе (1 мл/кг перорально; черный кружок или точка экспериментальных данных при 1 мл/кг перорально) за 1 ч до проведения тестирования. Приведено среднее значение \pm SEM времени плавания в тесте Порсолта на крысах. Животным предоставляли пятнадцатиминутный сеанс для адаптации за 1 день до проведения пятиминутного теста. $N=6-18$ животных в группе. Как показано, соединение А вызывает антидепрессант-подобный эффект, измеряемый по уменьшению времени плавания в тесте Порсолта по сравнению с группой плацебо через 1 ч после дозирования.

Результаты для соединения В показаны на фиг. 18. Взрослым самцам крыс линии Sprague Dawley вводили соединение В (0,1-10 мкг/кг перорально; синие кружки или точки экспериментальных данных,

соединенные линией), положительный контроль соединение D (10 мкг/кг перорально; зеленый кружок или точка экспериментальных данных при 10 мкг/кг перорально) или 0,5% карбоксиметилцеллюлозы натрия в 0,9% стерильном физиологическом растворе (1 мл/кг перорально; черный кружок или точка экспериментальных данных при 1 мл/кг перорально) за 1 ч до проведения тестирования. Приведено среднее значение \pm SEM времени плавания в тесте Порсолта на крысах. Животным предоставляли пятнадцатиминутный сеанс для адаптации за 1 день до проведения пятиминутного теста. N=6-18 животных в группе. Как показано, соединение В вызывает антидепрессант-подобный эффект, измеряемый по уменьшению времени плавания в тесте Порсолта по сравнению с группой плацебо через 1 ч после дозирования.

Пример 17.

В таблице ниже приводятся сравнительные данные по связыванию *in vivo* для немутантных субтипов NMDAR2 в присутствии соединения А, соединения В, третбутил (R)-2-((2S,3R)-1-амино-3-гидрокси-1-оксобутан-2-ил)-1-оксо-2,5-дiazаспиро[3,4]октан-5-карбоксилата (соединения W), третбутил (S)-2-((2S,3R)-1-амино-3-гидрокси-1-оксобутан-2-ил)-1-оксо-2,5-дiazаспиро[3,4]октан-5-карбоксилата (соединения X), (2S,3R)-3-гидрокси-2-((R)-5-изобутирил-1-оксо-2,5-дiazаспиро[3,4]октан-2-ил)бутанамида (соединения Y) или (2S,3R)-3-гидрокси-2-((S)-5-изобутирил-1-оксо-2,5-дiazаспиро[3,4]октан-2-ил) бутанамида (соединения Z).

Соединение	ХАРАКТЕРИСТИКИ СВЯЗЫВАНИЯ NMDAR2A			ХАРАКТЕРИСТИКИ СВЯЗЫВАНИЯ NMDAR2B		
	-logEC ₅₀	% 1 мМ глицин	Вывод	-logEC ₅₀	% 1 мМ глицин	Вывод
Соединение W	-11,35	18,33	WT2A агонист	-8,976	53,09	WT2B агонист
Соединение X	-12,01	41,04	WT2A агонист	-9,833	59,55	WT2B агонист
Соединение Y	-11,05	61,76	WT2A агонист	-13,36	70,74	WT2B агонист
Соединение Z	-10,06	42,5	WT2A агонист	-13	70,49	WT2B агонист
Соединение А	-11,34	47,42	WT2A агонист	-8,51	68,22	WT2B агонист
Соединение В	-9,01	24,48	WT2A агонист	-13,11	49,02	WT2B агонист
Соединение	ХАРАКТЕРИСТИКИ СВЯЗЫВАНИЯ NMDAR2C			ХАРАКТЕРИСТИКИ СВЯЗЫВАНИЯ NMDAR2D		
	-logEC ₅₀	% 1 мМ глицин	Вывод	-logEC ₅₀	% 1 мМ глицин	Вывод
Соединение W	-9,839	67,5	WT2C агонист	-11,15	66,72	WT2D агонист
Соединение X	-12,9	59,73	WT2C агонист	-11,88	93,58	WT2D агонист
Соединение Y	-11,44	64,24	WT2C агонист	-9,999	54,85	WT2D агонист
Соединение Z	-11,5	47,76	WT2C агонист	-11,22	65,32	WT2D агонист
Соединение А	-8,822	66,21	WT2C агонист	0	0	WT2D активность отсутствует
Соединение В	-13,02	85,37	WT2C агонист	-8,4	66,21	WT2D агонист

Эквиваленты.

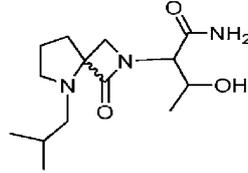
Для специалистов в этой области является очевидным, или они способны убедиться в результате проведения всего лишь стандартных экспериментов, что существуют много эквивалентов для описанных в изобретении вариантов осуществления. Предполагается, что такие эквиваленты входят в объем приведенных далее пунктов формулы изобретения.

Включение в изобретение содержания публикации путем ссылки на нее.

Полное содержание всех патентов, опубликованных патентных заявок, сайтов в интернете и других цитируемых в изобретении публикаций включено в изобретение путем ссылки на них.

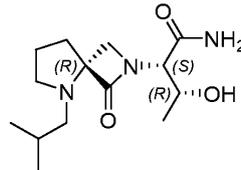
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, имеющее формулу



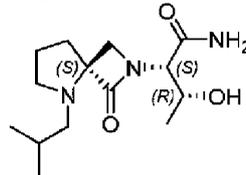
или его стереоизомер и/или фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п.1, имеющее формулу



или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Соединение по п.1, имеющее формулу

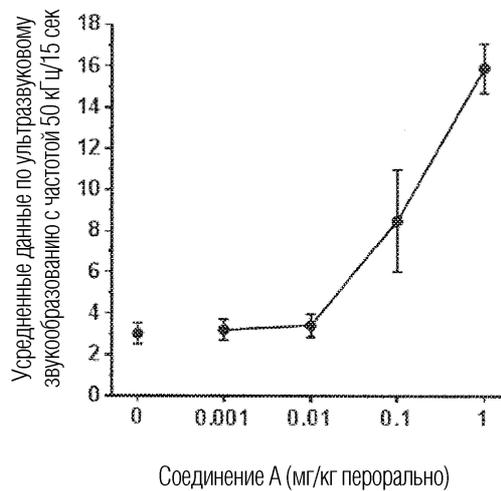


или его фармацевтически приемлемая соль.

4. Фармацевтическая композиция, включающая соединение по любому одному из пп.1-3 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

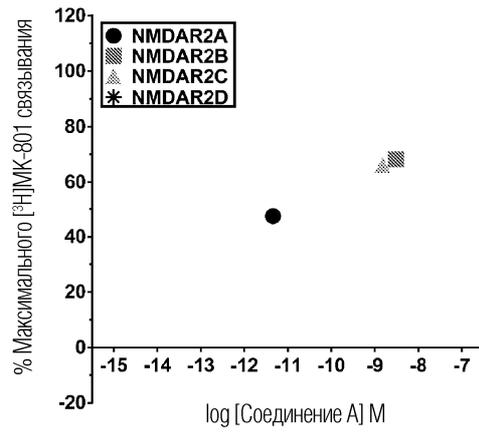
5. Фармацевтическая композиция по п.4, предназначенная для перорального введения.

6. Фармацевтическая композиция по п.4, предназначенная для внутривенного введения.



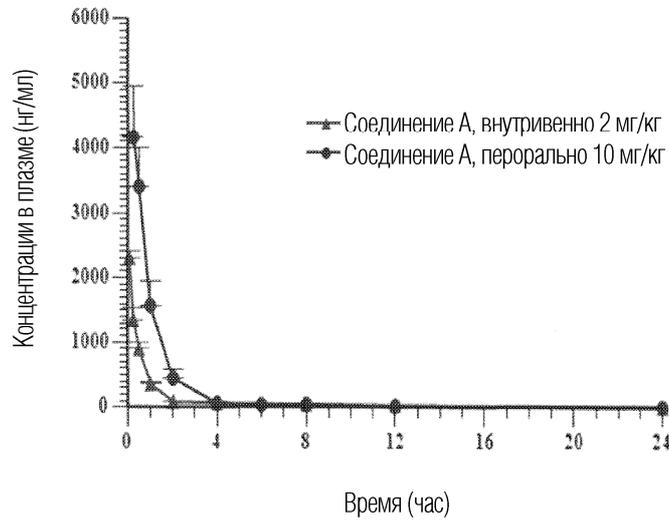
Фиг. 1

Скрининг немутантных NMDAR2 субтипов



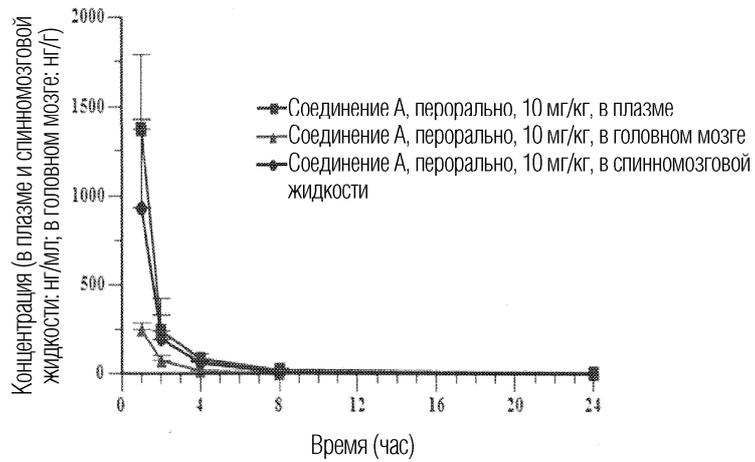
Фиг. 2

Линеаризованная

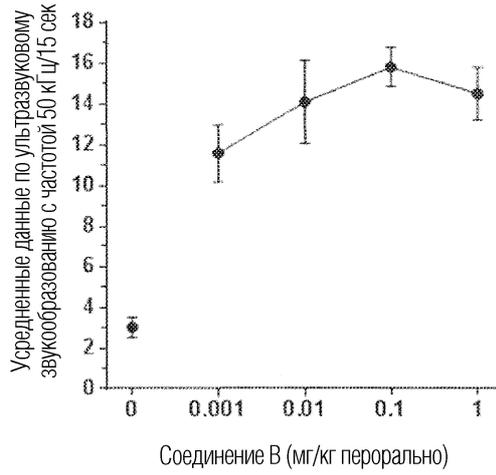


Фиг. 3

Линеаризованная

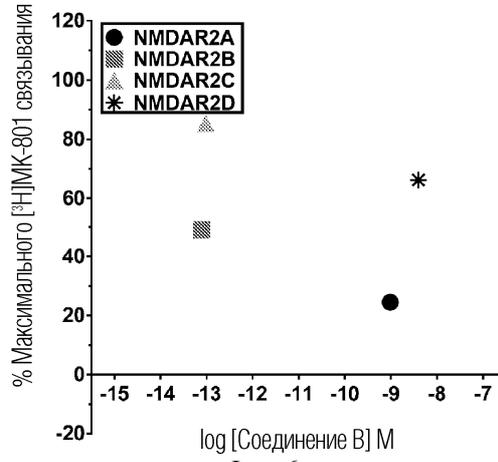


Фиг. 4



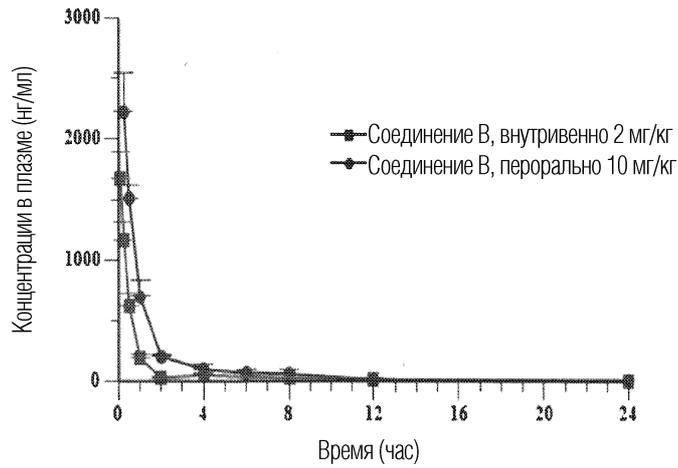
Фиг. 5

Скрининг немутантных NMDAR2 субтипов



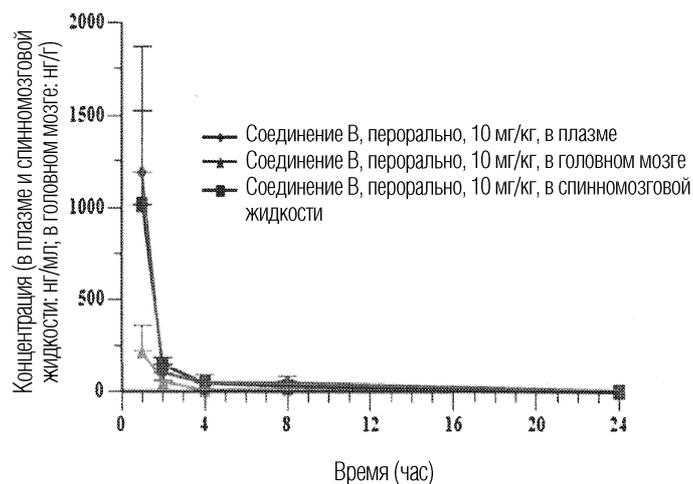
Фиг. 6

Линеаризованная



Фиг. 7

Линеаризованная



Фиг. 8

IN VITRO МИКРОЯДЕРНЫЙ ТЕСТ		ТЕСТ НА ОБРАТНУЮ МУТАЦИЮ БАКТЕРИЙ	
Испытуемая концентрация	Цитотоксичность (% от контроля)	Испытуемая концентрация	Значимость положительного эффекта (от - до ++)
6.00 E-07	88%	5.00 E-06	-
1.20 E-06	88%	1.00 E-05	-
2.50 E-06	77%	5.00 E-05	-
5.00 E-06	86%	1.00 E-04	-
1.00 E-05	87%	5.00 E-04	-
2.50 E-05	86%	1.00 E-05	-
5.00 E-05	88%	5.00 E-05	-
1.00 E-04	90%	1.00 E-04	-
6.00 E-07	104%	5.00 E-06	-
1.20 E-06	104%	1.00 E-05	-
2.50 E-06	103%	5.00 E-05	-
5.00 E-06	101%	1.00 E-04	-
1.00 E-05	99%	5.00 E-06	-
2.50 E-05	98%	1.00 E-05	-
5.00 E-05	99%	5.00 E-05	-
1.00 E-04	99%	1.00 E-04	-
6.00 E-07	97%	5.00 E-06	-
1.20 E-06	93%	1.00 E-05	-
2.50 E-06	93%	5.00 E-05	-
5.00 E-06	95%	1.00 E-04	-
1.00 E-05	96%	5.00 E-06	-
2.50 E-05	94%	1.00 E-05	-
5.00 E-05	98%	5.00 E-05	-
1.00 E-04	99%	1.00 E-04	-
6.00 E-07	108%	5.00 E-06	-
1.20 E-06	99%	1.00 E-05	-
2.50 E-06	102%	5.00 E-05	-
5.00 E-06	96%	1.00 E-04	-
1.00 E-05	96%	5.00 E-06	-
2.50 E-05	115%	1.00 E-05	-
5.00 E-05	118%	5.00 E-05	-
1.00 E-04	104%	1.00 E-04	-

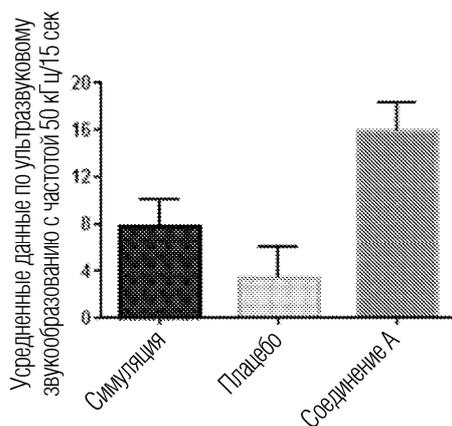
ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНСПЕЦИФИЧЕСКИХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ СЕРДЦА
% Ингибирования контрольного специфического связывания
-7.3%

Фиг. 9

IN VITRO МИКРОЯДЕРНЫЙ ТЕСТ		ТЕСТ НА ОБРАТНУЮ МУТАЦИЮ БАКТЕРИЙ	
Испытуемая концентрация	Цитотоксичность (% от контроля)	Испытуемая концентрация	Значимость положительного эффекта (от - до ++)
6.00 E-07	88%	5.00 E-06	-
1.20 E-06	83%	1.00 E-05	-
2.50 E-06	73%	5.00 E-05	-
5.00 E-06	95%	1.00 E-04	-
1.00 E-05	78%	5.00 E-05	-
2.50 E-05	86%	1.00 E-05	-
5.00 E-05	86%	5.00 E-05	-
1.00 E-04	91%	1.00 E-04	-
6.00 E-07	104%	5.00 E-06	-
1.20 E-06	104%	1.00 E-05	+
2.50 E-06	102%	5.00 E-05	-
5.00 E-06	106%	1.00 E-04	-
1.00 E-05	97%	5.00 E-06	-
2.50 E-05	98%	1.00 E-05	-
5.00 E-05	103%	5.00 E-05	-
1.00 E-04	96%	1.00 E-04	-
6.00 E-07	90%	5.00 E-06	-
1.20 E-06	91%	1.00 E-05	-
2.50 E-06	96%	5.00 E-05	-
5.00 E-06	96%	1.00 E-04	-
1.00 E-05	103%	5.00 E-06	-
2.50 E-05	99%	1.00 E-05	-
5.00 E-05	98%	5.00 E-05	-
1.00 E-04	103%	1.00 E-04	-
6.00 E-07	110%	5.00 E-06	-
1.20 E-06	101%	1.00 E-05	-
2.50 E-06	109%	5.00 E-05	-
5.00 E-06	107%	1.00 E-04	-
1.00 E-05	101%	5.00 E-06	-
2.50 E-05	102%	1.00 E-05	-
5.00 E-05	107%	5.00 E-05	-
1.00 E-04	123%	1.00 E-04	-

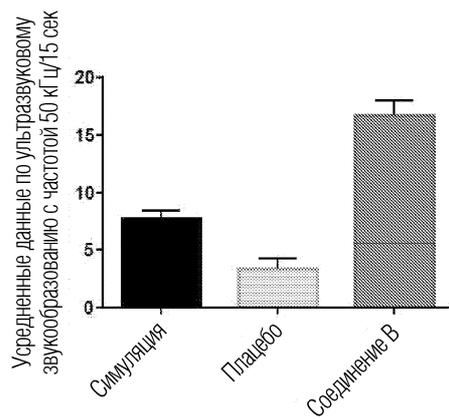
ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНСПЕЦИФИЧЕСКИХ
КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ СЕРДЦА
% Ингибирования контрольного
специфического связывания
-4.6%

Фиг. 10



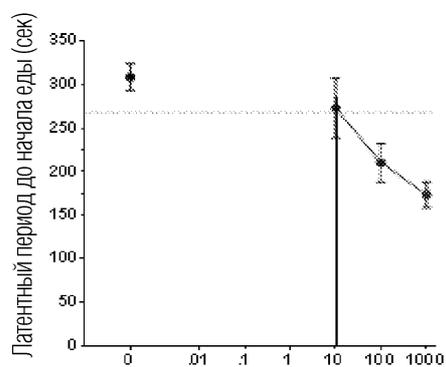
Соединение А (10 мг/кг перорально)

Фиг. 11



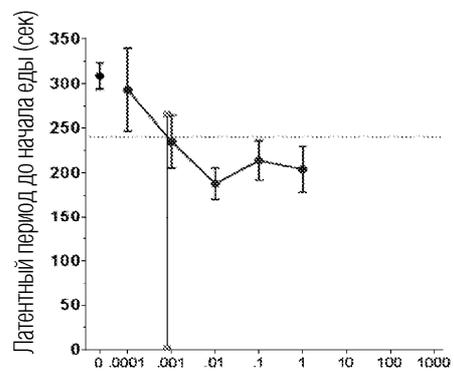
Соединение В (10 мг/кг перорально)

Фиг. 12



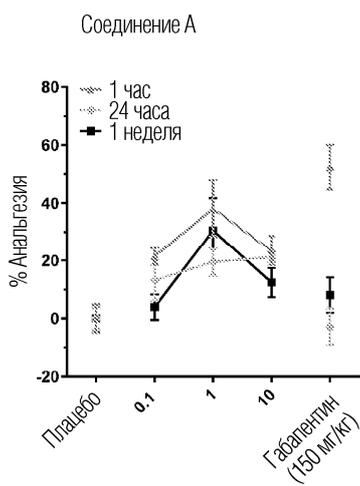
Соединение А (10 мг/кг перорально)

Фиг. 13

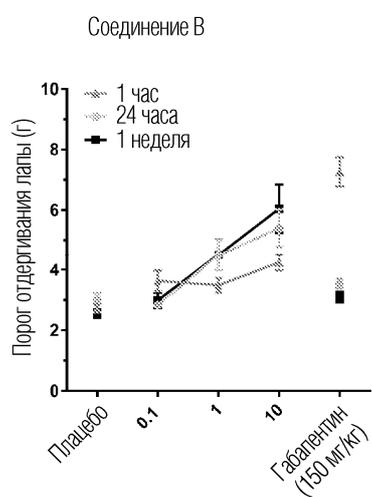


Соединение В (10 мг/кг перорально)

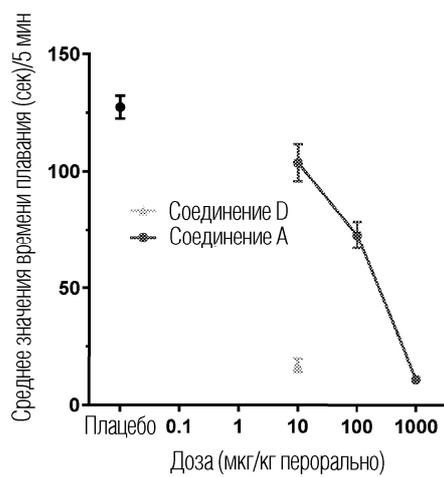
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

