

Настоящее изобретение относится к меченым радиоактивными изотопами производным хинолина, проявляющим антагонистическую активность по отношению к метаботропному глутаматному рецептору, в частности активность по отношению к mGlu1-рецептору, и к получению таких производных; изобретение, кроме того, относится к композициям, содержащим такие производные, а также к их применению для диагностики, в частности для маркировки и идентификации сайтов метаботропного глутаматного рецептора и для визуализации органа.

Введение

Нейромедиатор глутамат считается главным возбуждающим нейромедиатором в центральной нервной системе млекопитающего. Связывание указанного нейромедиатора с метаботропными глутаматными рецепторами (mGluR), которые представляют собой подсемейство рецепторов, связанных с G-белком, и которые включают 8 отдельных подтипов mGluR, а именно подтипы от mGluR1 до mGluR8, активирует ряд внутриклеточных систем вторичных мессенджеров. Подсемейство mGlu-рецепторов на основе гомологии аминокислотных последовательностей, системы вторичных мессенджеров, используемой рецепторами, и фармакологических характеристик можно разделить на 3 группы. mGlu-рецепторы группы I, которая включает подтипы 1 и 5 mGluR, связываются с фосфолипазой C, и их активация приводит к внутриклеточной активации ионов кальция. mGlu-рецепторы группы II (mGluR2 и 3) и mGlu-рецепторы группы III (mGluR4, 6, 7 и 8) связываются с аденилциклазой, и их активация вызывает снижение (количества) вторичного мессенджера цАМФ, а также торможение нейрональной активности. Как было показано, лечение антагонистами mGluR группы I переводит в парасинапсисе на сниженное высвобождение нейромедиатора глутамата и снижение опосредованного глутаматом нейронального возбуждения через постсинаптические механизмы. Так как различные патофизиологические процессы и болезненные состояния, затрагивающие центральную нервную систему, считаются следствием возбуждения нервных клеток центральной нервной системы, индуцированного избытком глутамата, антагонисты mGluR группы I, в частности антагонисты mGluR1, могли бы быть терапевтически полезны для лечения заболеваний центральной нервной системы, в частности психиатрических и неврологических заболеваний.

Однако вплоть до настоящего времени не было специфических mGluR1-лигандов, отсутствие которых значительно затрудняет изучение mGlu1-рецепторов, в частности автордиографические исследования однозначного распределения и распространенности таких рецепторов в отделах мозга. В группе I пока был доступен только [^3H]глутамат, применяемый для крысиных (Thomsen и др., Brain Res. 619: 22-28, 1993) или человеческих mGlu1a-рецепторов (Kingston и др., Neuropharmacology 37:277-287, 1998). Для mGlu1a-рецептора и mGlu5-рецептора доступен [^3H]квисквалат, однако указанный рецептор не является специфическим для mGlu1-рецептора (он также связывается с AMPA-рецептором) и является конкурентным, то есть вытесняет глутамат (Mutel и др., J.Neurochem. 75: 2590-2601, 2000).

Целью настоящего изобретения является получение подходящих специфических, в частности, неконкурентных лигандов mGlu1-рецепторов.

В настоящее время авторы обнаружили особую группу соединений, которые в виде меченой радиоактивным изотопом формы обеспечивают подходящие, специфические, в частности, неконкурентные лиганды mGlu1-рецептора, а также способ маркировки и идентификации сайтов метаботропного глутаматного рецептора и визуализации органа.

В рамках настоящей заявки термин «специфический» означает, что лиганд избирательно связывается с сайтом mGlu1-рецептора. Термин «неконкурентный» означает, что лиганд не вытесняет или только незначительно вытесняет глутамат, связанный с сайтом mGlu1-рецептора.

Нерadioактивные соединения согласно настоящему изобретению описаны в заявке WO 02/28837.

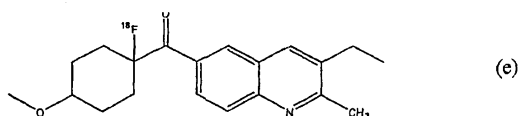
В заявке WO 99/26927 описаны антагонисты рецепторов mGluR группы I для лечения неврологических заболеваний и расстройств, основанные - среди прочего - на структуре хинолина.

В заявке WO 99/03822 описаны бициклические лиганды метаботропного глутаматного рецептора, ни один из которых не основан на структуре хинолина или хинолинона.

В заявке WO 94/27 605 описаны 1,2,3,4-тетрагидрохинолин-2,3,4-трион-3 или 4-оксими и их применение для лечения и профилактики нейрональной потери, нейродегенеративных заболеваний, неблагоприятных последствий гиперактивности аминокислот, вызывающих возбуждение и тревогу, а также их меченные радиоактивными изотопами соединения.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к меченому радиоактивными изотопами соединению формулы (e)



Одно из воплощений настоящего изобретения относится к радиоактивной композиции для маркировки и идентификации сайтов метаботропного глутаматного рецептора и для визуализации органа для введения млекопитающим, содержащая терапевтически эффективное количество меченого радиоактив-

ным изотопом соединения и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения оно касается применения меченного радиоактивным изотопом соединения в качестве диагностического средства.

Вариантом предпочтительного воплощения настоящего изобретения является применение радиоактивной композиции в качестве диагностического средства, в частности для маркировки или идентификации mGlu1-рецептора в биологическом материале.

Другим частным воплощением изобретения является способ диагностики, включающий маркировку или идентификацию mGlu1-рецептора в биологическом материале меченным изотопом соединением, причем маркировку осуществляют путем введения меченного изотопом соединения в биологический материал, и идентификацию осуществляют путем обнаружения эмиссии от указанного меченного радиоактивным изотопом соединения.

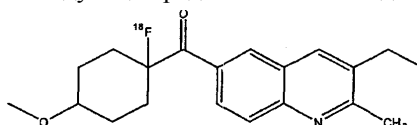
К одному из предпочтительных воплощений настоящего изобретения является способ диагностики, включающий маркировку или идентификацию mGlu1-рецептора в биологическом материале радиоактивной композицией, причем способ диагностики по любому включает оценку того, способно ли тестируемое соединение располагаться на mGlu1-рецепторе или связываться с mGlu1-рецептором в биологическом материале.

Другой вариант осуществления изобретения заключается в способе диагностики путем визуализации органа, заключающийся в том, что в биологический материал в составе соответствующей композиции вводят меченное радиоактивным изотопом соединение, в количестве, достаточном для связывания указанного меченного радиоактивным изотопом соединения с сайтами mGlu1-рецептора в биологическом материале; и обнаруживают эмиссию от меченного радиоактивным изотопом соединения.

Еще один частный вариант осуществления изобретения относится к способу диагностики, где биологический материал выбран из группы, включающей образцы ткани, жидкости плазмы, жидкости организма, части тела и органов, полученных от теплокровных животных и от теплокровных животных как таковых (*per se*), в частности от человека.

Другое воплощение изобретения относится к применению меченного радиоактивным изотопом соединения для получения диагностического средства для оценки того, обладает ли тестируемое соединение способностью располагаться на mGlu1-рецепторе или связываться с mGlu1-рецептором в биологическом материале.

Особый интерес представляют следующие радиоактивные соединения:



Все соединения согласно изобретению показывают по отношению к mGluR1 активность от умеренной до сильной. Такая активность, среди прочего, объясняется специфическим связыванием указанного соединения с mGlu1-рецептором, что делает соединения применимыми для диагностики, например для введения меченых атомов и обнаружения сайтов mGlu1-рецепторов. Следовательно, изобретение также относится к меченному радиоактивным изотопом соединению согласно изобретению, применяемому для диагностики.

Первое предпочтительное воплощение (радиоактивные изотопы, испускающие гамма-излучение)

Согласно первому предпочтительному воплощению меченное радиоактивным изотопом соединение содержит, по меньшей мере, один [^3H]-атом или один [^{125}I]-атом. [^3H]-атом удобно вводить путем частичного или полного замещения одного или нескольких нерадиоактивных [^1H]-атомов водорода в молекуле их радиоактивными изотопами. Выбор того, будет ли применяться [^3H]- или [^{125}I]-меченный лиганд, может зависеть частично от доступности жидкостных сцинтилляционных счетчиков (LSC), которые довольно дороги. [^{125}I]-лиганды можно определить количественно с применением либо γ -счетчика, либо LSC, в то время как для [^3H]-лигандов требуется применение LSC.

Меченное радиоактивным изотопом соединение, содержащее по меньшей мере один [^3H]-атом или один [^{125}I]-атом, успешно применяют в способах, связанных с мечеными лигандами, в частности, при анализах мембранных рецепторов *in vitro* для маркировки или идентификации mGlu1-рецептора в биологическом материале.

Меченные радиоактивным изотопом соединения, содержащие, по меньшей мере, один [^3H]-атом или один [^{125}I]-атом, также успешно применяют *in vivo* в авторадииграфии mGlu1-рецепторов мозга, так как соединения согласно изобретению обладают полезной и неожиданной способностью легко пересекать гематоэнцефалический барьер.

Следовательно, изобретение также относится к меченному радиоактивным изотопом соединению согласно изобретению, применяемому для диагностики, которая заключается в маркировке или идентификации mGlu1-рецептора в биологическом материале, а также к применению соединений согласно изобретению для производства диагностического средства для маркировки или идентификации mGlu1-рецептора в биологическом материале либо *in vivo*, либо *in vitro*.

В рамках настоящей заявки термин «биологический материал» означает любой материал, имеющий биологическое происхождение. В частности, он относится к образцам тканей, жидкостей плазмы, жидкостей организма, частей тела и органов, получаемых от теплокровных животных и от теплокровных животных как таковых (*per se*), в частности от человека.

Основные эксперименты, которые проводили с применением системы мембранного анализа для маркировки или идентификации mGlu1-рецептора в биологическом материале, представляют собой: эксперименты по изучению насыщения, эксперименты по изучению ингибирования, эксперименты по изучению кинетики ассоциации и эксперименты по изучению кинетики диссоциации. Такие методики применимы для большинства рецепторных систем нейромедиаторов и гормонов, включая mGluR1-систему (Methods for Neurotransmitter Receptor Analysis, под редакцией Henry I. Yamamura и др., Raven Press Ltd., Нью-Йорк, 1990). С этой целью меченное радиоактивным изотопом соединение вводят в биологический материал для маркировки mGlu1-рецепторов и регистрируют эмиссии меченного радиоактивным изотопом соединения, чтобы идентифицировать количество или локализацию mGlu1-рецепторов, например, путем автордиографии рецептора *ex vivo*.

Меченные радиоактивным изотопом соединения согласно изобретению, содержащие по меньшей мере один [^3H]-атом или один [^{125}I]-атом, также применяются в качестве агентов для скрининга, обладает ли тестируемое соединение способностью занимать сайт mGlu1-рецептора или связываться с ним. Степень, с которой тестируемое соединение заместит соединение согласно изобретению на сайте mGlu1-рецептора, покажет способность тестируемого соединения занимать сайт mGlu1-рецептора или связываться с ним и, следовательно, действовать в качестве либо агониста, антагониста, либо смешанного агониста/антагониста mGlu1-рецептора.

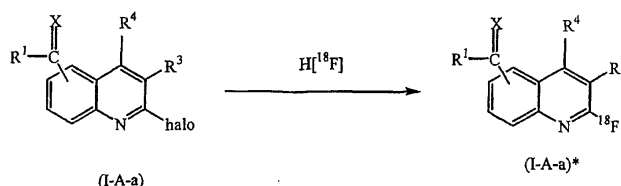
Меченные радиоактивным изотопом соединения согласно изобретению, содержащие, по меньшей мере, один [^3H]-атом или один [^{125}I]- атом преимущественно получают путем замещения атома галогена атомом трития, как описано в экспериментальном разделе.

Второе предпочтительное воплощение (радиоактивный изотоп, испускающий позитрон)

При втором предпочтительном воплощении меченное радиоактивным изотопом соединение содержит, по меньшей мере, один радиоактивный атом углерода или галогена. В принципе, любое соединение формулы (I), содержащее атом углерода или галогена, подходит для введения радиоизотопного ядра путем замены атома углерода или галогена на подходящий радиоактивный изотоп или путем получения соединения формулы (I) с помощью меченных радиоактивными изотопами реагентов. Подходящие для этой цели радиоактивные изотопы галогенов представляют собой радиоактивный углерод, например, [^{11}C]; радиоактивные йодиды, например [^{122}I], [^{123}I], [^{131}I]; радиоактивные бромиды, например [^{75}Br], [^{76}Br], [^{77}Br] и [^{82}Br]; и радиоактивные фториды, например [^{18}F]. Предпочтительные меченные радиоактивными изотопами соединения представляют собой такие соединения формулы (I-A)* и (I-B)*, в которых R^1 содержит радиоактивный атом углерода или галогена, в частности [^{11}C], [^{18}F], [^{123}I], [^{75}Br], [^{76}Br] или [^{77}Br].

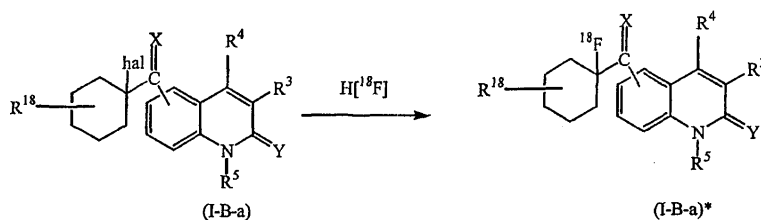
Получение радиоактивных соединений

Введение радиоактивного атома галогена можно проводить с помощью подходящей реакции, такой как приведена ниже



в которой все заместители в формуле (I-A-a) и (I-A-a)* являются такими же, как в формуле (I-A)*, а галоген представляет собой атом галогена. Подходящее соединение (I-A-a) вступает в реакцию с $\text{H}[^{18}\text{F}]$ таким образом, что атом галогена, находящийся на хинолиновом кольце, заменяется путем реакции нуклеофильной замены на радиоактивный [^{18}F]-атом.

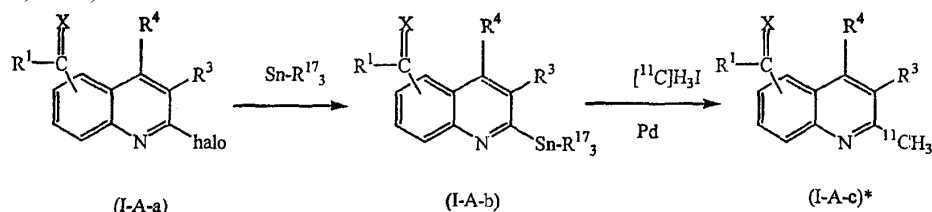
Для получения меченных радиоактивным изотопом соединений согласно формуле (I-B)* введение радиоизотопного ядра можно проводить таким же способом, например, согласно схеме взаимодействия, представленной ниже. Очевидно, что соединения формулы (I-A)* также можно получать таким способом, то есть с участием меченого заместителя R^1 .



Другие способы введения меченых атомов трития описаны, например, в публикациях: Peng и др.

Fusion Technology, American Nuclear Society, 21(2):307- 311, 1992 и Brundish и др., Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals 25 (12): 1361-1369 (1988).

Введение радиоактивного [^{11}C]-атома можно проводить согласно схеме взаимодействия, приведенной ниже, по которой подходящее соединение (I-A-a) сначала стanniлируют (вводят станильную группу), после чего вводят радиоактивный [^{11}C], применяя, например реакцию конденсации "Stille-типа", катализируемую палладием с применением [^{11}C]метилйодида (Scott W.J.; Crisp G. T.; Stille J.K., J.Am.Chem. Soc, 1984, 106, 4630).



В формуле (I-A-a), (I-A-b) и (I-A-c)* все заместители имеют такие же значения, как указано для формулы (I-A)*, галоген представляет собой атом галогена, и R^{17} представляет собой метил или бутил.

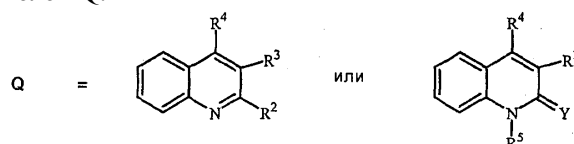
Благодаря неожиданной способности легко проникать через гематоэнцефалический барьер меченные радиоактивным изотопом соединения, содержащие радиоактивный атом галогена, в составе соответствующей композиции применяют преимущественно *in vivo* для животного, особенно теплокровного животного, и регистрируют локализацию указанных меченных радиоактивным изотопом соединений с помощью методов визуализации, таких как, например, однофотонная эмиссионная компьютерная томография (Single Photon Emission Computered Tomography) (SPECT) или позитронно-эмиссионная томография (Positron Emission Tomography) (PET) и т.п. Таким способом можно регистрировать распределение сайтов mGlu1-рецепторов в организме, и с помощью упомянутых выше способов визуализации можно визуализировать органы, содержащие сайты mGlu1-рецепторов, такие как, например, мозг. Такой способ визуализации органа путем введения меченного радиоактивным изотопом соединения формулы (I-A)* или (I-A)*, которое связывается с сайтами mGlu1-рецепторов, и регистрации эмиссии радиоактивного соединения, также составляет аспект настоящего изобретения.

Применение соединений формулы (I-A)* и (I-B)* в описанных выше способах составляет еще один аспект настоящего изобретения. Изобретение, в частности, относится к применению соединений согласно изобретению для производства диагностического средства для применения в методе PET. Для применения в методе PET наиболее предпочтительными являются меченные радиоактивным изотопом соединения согласно изобретению, в которые входит ^{18}F (патент США 4931270, Horn и др., опубликованный 5 июня 1990).

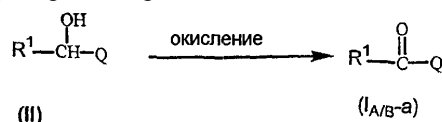
Получение нерадиоактивных соединений

Нерадиоактивные соединения согласно изобретению могут быть получены с помощью ряда способов.

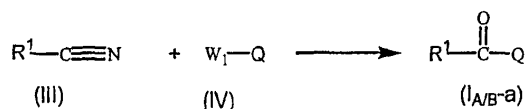
Чтобы упростить структурное представление некоторых присутствующих соединений и промежуточных соединений, в последующих методиках получения хинолиновая или хинолиноновая группа будут обозначаться далее символом Q.



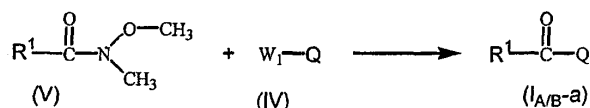
Соединения формулы (I-A) или (I-B), где X представляет собой O, обозначаются формулой (I_{A/B}-a), указанные соединения могут быть получены окислением промежуточного соединения формулы (II) в присутствии подходящего окислителя, такого как перманганат калия, и подходящего катализатора фазового переноса, такого как трис(диокса-3,6-гептил)амин, в подходящем инертном по отношению к реакции растворителе, таком как, например, дихлорметан.



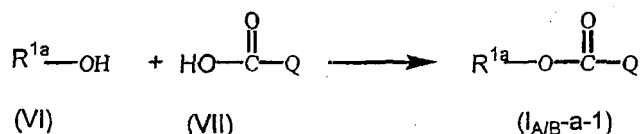
Соединения формулы (I_{A/B}-a) могут быть также получены при взаимодействии промежуточного соединения формулы (III) с промежуточным соединением формулы (IV), где W_1 представляет собой атом галогена, например бром, в присутствии бутиллития и подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, такого как, например, тетрагидрофуран.



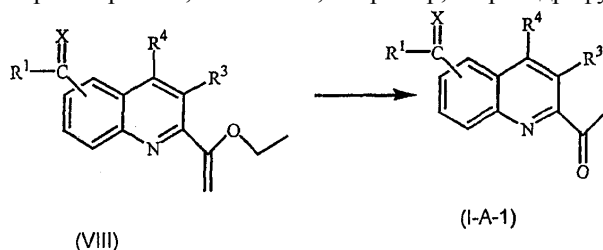
С другой стороны, соединения формулы (I_{A/B}-a) могут быть также получены при взаимодействии промежуточного соединения формулы (V) с промежуточным соединением формулы (IV) в присутствии бутиллития и подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, такого как, например, тетрагидрофуран.



Соединения формулы (I_{A/B}-a), в которых заместитель R¹ связан с карбонильной группой через атом кислорода [указанный заместитель R¹ обозначается как -O-R^{1a}, а указанные соединения формулой (I_{A/B}-a-1)], могут быть получены при взаимодействии промежуточного соединения формулы (VI) с промежуточным соединением формулы (VII) в присутствии подходящей кислоты, такой как серная кислота.



Соединения формулы (I-A), где R² представляет собой метилкарбонил [указанные соединения обозначаются формулой (I-A-1)], могут быть получены при взаимодействии промежуточного соединения формулы (VIII) в присутствии подходящей кислоты, такой как соляная кислота, и подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, такого как, например, тетрагидрофуран.



Соединения формулы (I) можно также преобразовывать друг в друга посредством известных в данной области преобразований.

Соединения формулы (I-A), где R² представляет собой атом галогена, такой как хлор, могут быть преобразованы в соединение формулы (I-A), где R² представляет собой другой атом галогена, такой как фтор или иод, путем взаимодействия с подходящим галогенирующим агентом, таким как, например, фторид калия или иодид натрия, в присутствии подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, например диметилсульфида или ацетонитрила, и, необязательно, в присутствии ацетилхлорида.

Соединения формулы (I-A), где R² представляет собой подходящую удаляемую группу, такую как атом галогена, например хлор, йод [указанная удаляемая группа обозначается как W², а указанные соединения как (I-A-2)], могут быть преобразованы в соединение формулы (I-A), где R² представляет собой циано [указанное соединение представлено формулой (I-A-3)], путем взаимодействия с подходящим агентом для ввода цианогруппы, таким как, например, триметилсиланкарбонитрил, в присутствии подходящего основания, такого как N,N-диэтилэтанамин, и подходящего катализатора, такого как, например, тетраakis(трифенилфосфин)палладий.

Соединения формулы (I-A-2) могут быть также преобразованы в соединения формулы (I-A-4) при взаимодействии с C₂₋₆-алкинилтри (C₁₋₆-алкил)силаном в присутствии CuI, соответствующего основания, такого как, например, N,N-диэтилэтанамин, и соответствующего катализатора, такого как, например, тетраakis(трифенилфосфин)палладий. В свою очередь, соединения формулы (I-A-4) могут быть преобразованы в соединения формулы (I-A-5) при взаимодействии с фторидом калия в присутствии подходящей кислоты, такой как уксусная кислота, или при взаимодействии с подходящим основанием, таким как гидроксид калия, в присутствии подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, такого как спирт, например метанол и т.п.

Соединения формулы (I-A-2) могут быть также преобразованы в соединения формулы (I-A-6) при взаимодействии с промежуточным соединением формулы (IX) в присутствии CuI, подходящего основания, такого как, например, N,N-диэтилэтанамин, и подходящего катализатора, такого как тетраakis(трифенилфосфин)палладий.

Соединения формулы (I-A-2) могут быть также преобразованы в соединение, где R² представляет собой C₁₋₆-алкил [указанное соединение представлено формулой (I-A-8)], в присутствии подходящего алкилирующего агента, такого как, например, Sn (C₁₋₆-алкил)₄, или в соединение, где R² представляет

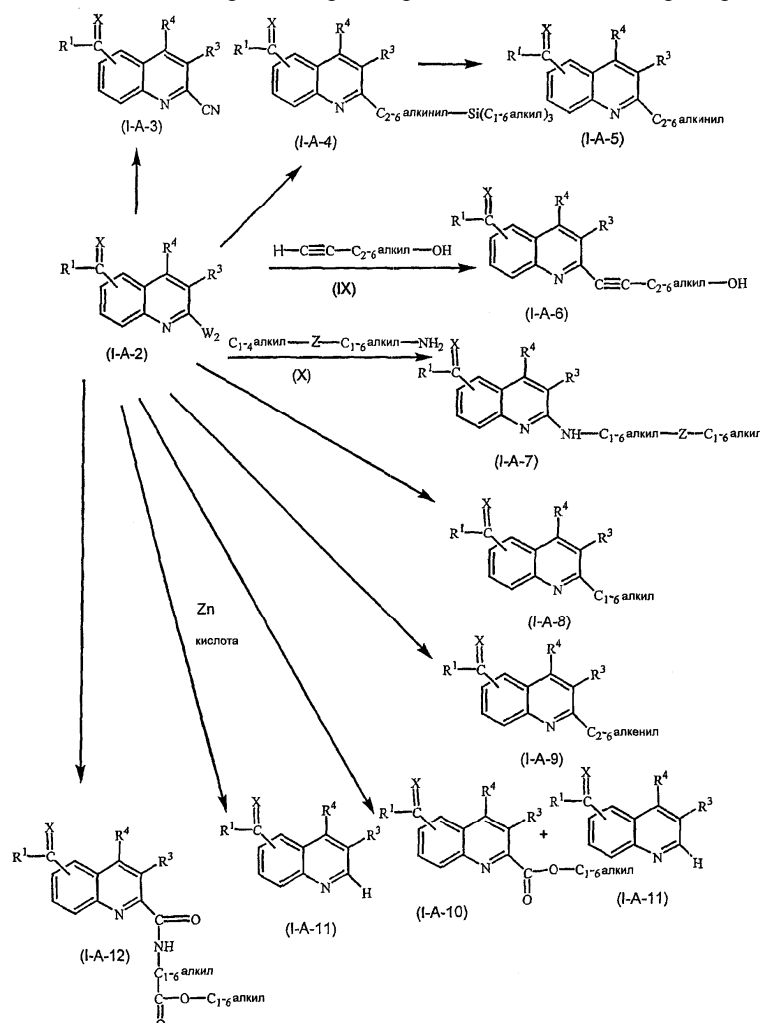
собой C_{2-6} -алкенил [указанное соединение представлено формулой (I-A-9)], в присутствии подходящего алкенилирующего агента, такого как, например, $Sn(C_{2-6}\text{-алкенил})(C_{1-6}\text{-алкил})_3$, оба вступают в реакцию в присутствии подходящего катализатора, такого как, например, тетраakis(трифенилфосфин)палладий, и инертного по отношению к реакции растворителя, такого как, например, толуол или диоксан.

Соединения формулы (I-A-2) могут быть также преобразованы в соединение формулы (I-A-7), где Z представляет собой O или S, при взаимодействии с промежуточным соединением формулы (X) необязательно в присутствии подходящего основания, такого как карбонат калия, и инертного по отношению к реакции растворителя, такого как N, N-диметилформамид.

Соединения формулы (I-A-2) могут быть также преобразованы в соединение формулы (I-A), где R^2 представляет собой C_{1-6} -алкилоксикарбонил [указанное соединение представлено формулой (I-A-10)], и соединение формулы (I-A), где R^2 представляет собой водород [указанное соединение представлено формулой (I-A-11)], при взаимодействии с подходящим спиртом формулы C_{1-6} -алкил-OH и CO в присутствии подходящего катализатора, такого как, например, ацетат палладия (II), трифенилфосфин, подходящего основания, такого как карбонат калия, и инертного по отношению к реакции растворителя, такого как N, N-диметилформамид.

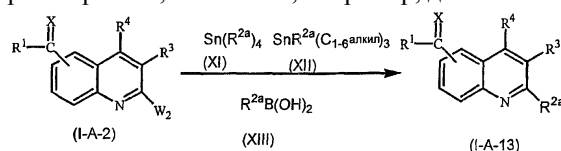
Соединения формулы (I-A-11) могут быть также получены при взаимодействии соединения формулы (I-A-2) с Zn в присутствии подходящей кислоты, такой как уксусная кислота.

Соединения формулы (I-A-2) могут быть также преобразованы в соединение формулы (I-A), где R^2 представляет собой аминокарбонил, замещенный C_{1-6} -алкилоксикарбонил- C_{1-6} -алкилом [указанное соединение представлено формулой (I-A-12)], при взаимодействии с промежуточным соединением формулы $H_2N-C_{1-6}\text{-алкил}-C(=O)-O-C_{1-6}\text{-алкил}$ в присутствии CO, подходящего катализатора, такого как тетраakis(трифенилфосфин)палладий, подходящего основания, такого как, например, N,N-диэтилэтанамин, и подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, такого как, например, толуол.

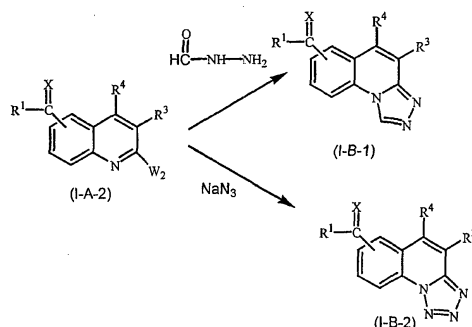


Соединения формулы (I-A-2) могут быть также преобразованы в соединение формулы (I-A), где R^2 представляет собой арил или гетероцикл, выбранный из группы, описанной выше при определении R^2 [указанный R^2 обозначается как R^{2a} , а указанное соединение представлено формулой (I-A-13)], путем взаимодействия с промежуточным соединением формулы (XI), (XII) или (XIII) в присутствии подходящего катализатора, такого как, например, тетраakis(трифенилфосфин)палладий, и подходящего инертного

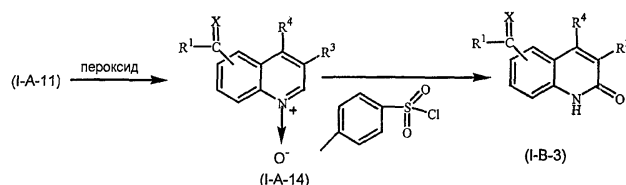
го по отношению к реакции растворителя, такого как, например, диоксан.



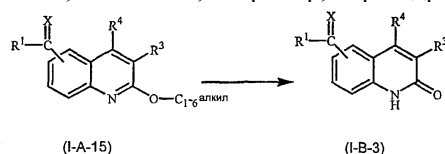
Соединения формулы (I-A-2) могут быть также преобразованы в соединение формулы (I-B), где Y и R⁵ объединены с образованием радикала формулы (b-1) или (b-2) [указанное соединение представлено формулой (I-B-1) или (I-B-2)], путем взаимодействия с гидразинкарбоксальдегидом или азидом натрия в подходящем инертном по отношению к реакции растворителе, таком как спирт, например бутанол, или N, N- диметилформамид.



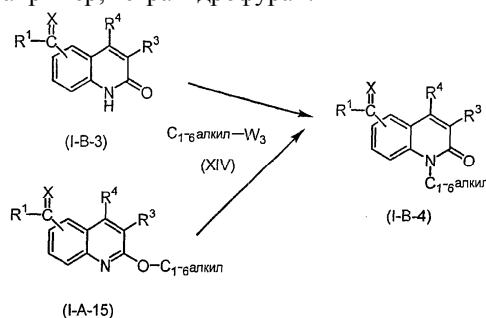
Соединения формулы (I-A-11) могут быть преобразованы в соответствующий N-оксид, представленный формулой (I-A-14), путем взаимодействия с подходящим пероксидом, таким как 3-хлорбензол-надкарбоновая кислота, в подходящем инертном по отношению к реакции растворителе, таком как, например, метилхлорид. Указанное соединение формулы (I-A-14) может быть далее преобразовано в соединение формулы (I-B), где R⁵ представляет собой водород [указанное соединение представлено формулой (I-B-3)], путем взаимодействия с 4-метилбензолсульфонилхлоридом в присутствии подходящего основания, такого как, например, дикарбонат калия, и подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, такого как, например, метилхлорид.



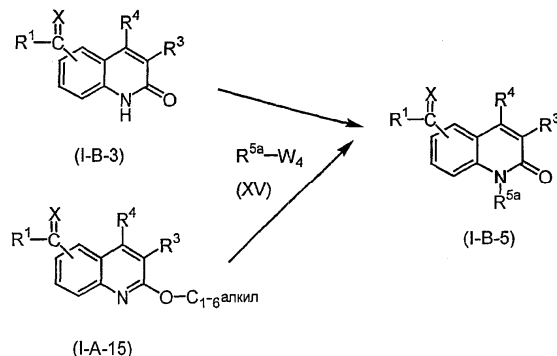
Соединения формулы (I-B-3) могут быть также получены из соединения формулы (I-A), где R² представляет собой C₁₋₆-алкокси [указанное соединение представлено формулой (I-A-15)], путем взаимодействия с подходящей кислотой, такой как соляная кислота, в присутствии подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, такого как, например, тетрагидрофуран.



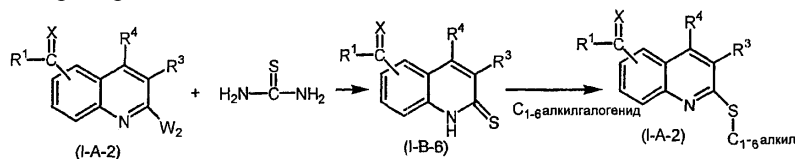
Соединения формулы (I-B-3) могут быть преобразованы в соединение формулы (I-B), где R⁵ представляет собой C₁₋₆-алкил [указанное соединение представлено формулой (I-B-4)], путем взаимодействия с соответствующим алкилирующим агентом, таким как, например промежуточное соединение формулы (XIV), где W₃ представляет собой подходящую удаляемую группу, такую как атом галогена, например йод, в присутствии трет-бутилата калия и в присутствии подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, такого как, например, тетрагидрофуран.



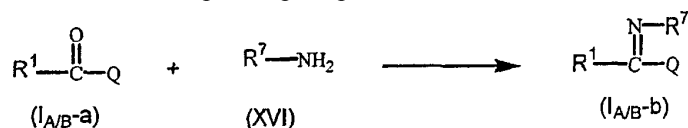
Соединения формулы (I-B-3) могут быть также преобразованы в соединение формулы (I-B), где R^5 представляет собой C_{1-6} -алкилоксикарбонил- C_{1-6} -алкил или арил- C_{1-6} -алкил [указанный R^5 обозначается как R^{5a} , и указанное соединение представлено формулой (I-B-5)], путем взаимодействия с промежуточным соединением формулы (XV), где W_4 представляет собой подходящую удаляемую группу, такую как атом галогена, например бром, хлор и т.п., в присутствии подходящего основания, такого как, например, гидрид натрия, и подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, такого как, например, N,N-диметилформамид.



Соединения формулы (I-A-2) может быть также преобразовано в соединение формулы (I-B), где R^5 представляет собой водород, и Y представляет собой S [указанное соединение представлено формулой (I-B-6)], путем взаимодействия с $H_2N-C(=S)-NH_2$ в присутствии подходящего основания, такого как гидроксид калия, и подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, такого как спирт, например этанол, или вода. Соединение формулы (I-B-6) может быть далее преобразовано в соединение формулы (I-A), где R^2 представляет собой C_{1-6} -алкилтио [указанное соединение представлено формулой (I-A-16)], путем взаимодействия с подходящим C_{1-6} -алкилгалогенидом, таким как, например, C_{1-6} -алкилиодид, в присутствии подходящего основания, такого как карбонат калия, и подходящего растворителя, такого как, например, ацетон.



Соединения формулы (I_{A/B}-a) могут быть преобразованы в соединения формулы (I-A) или (I-B), где X представляет собой $N-R^7$ [указанное соединение представлено формулой (I_{A/B}-b)], путем взаимодействия с промежуточным соединением формулы (XVI) необязательно в присутствии подходящего основания, такого как, например, N,N-диэтилэтанамин, и в присутствии подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, такого как спирт, например этанол.



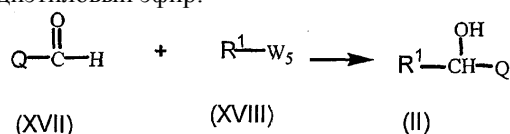
Как уже указывалось в методике получения описанных выше соединений формулы (I-A-13), соединения формулы (I) могут быть также преобразованы в соответствующие N-оксидные формы посредством известных в данной области процедур преобразования трехвалентного азота в его N-оксидную форму. Указанную реакцию N-окисления можно в общем случае проводить путем взаимодействия исходного соединения формулы (I) с соответствующим органическим или неорганическим пероксидом. Соответствующие неорганические пероксиды включают, например, перекись водорода, пероксиды щелочных металлов или щелочно-земельных металлов, например пероксид натрия, пероксид калия; соответствующие органические пероксиды могут включать надкислоты, такие как, например, бензолнадкарбоновая кислота или галогензамещенная бензолнадкарбоновая кислота, например 3-хлорбензолнадкарбоновая кислота, надалкановые кислоты, например надуксусная кислота, алкилгидропероксиды, например трет-бутилгидропероксид.

Подходящими растворителями являются, например, вода, низшие спирты, например этанол и т.п., углеводороды, например толуол, кетоны, например 2-бутанон, галогенированные углеводороды, например дихлорметан, и смеси таких растворителей.

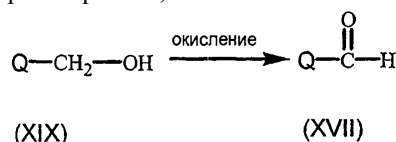
Некоторые из промежуточных соединений и исходных продуктов, применяемых в описанных выше методиках, имеются в продаже или могут быть синтезированы согласно методикам, уже описанным в литературе.

Промежуточные соединения формулы (II) могут быть получены путем взаимодействия промежуточного соединения формулы (XVII) с промежуточным соединением формулы (XVIII), где W_5 представ-

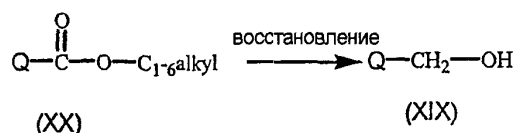
ляет собой подходящую удаляемую группу, такую как атом галогена, например хлор, бром и т.п., в присутствии магния, простого диэтилового эфира и подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, такого как простой диэтиловый эфир.



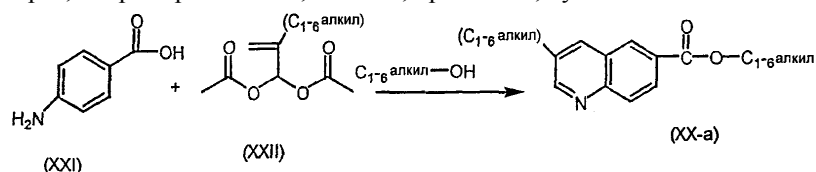
Промежуточные соединения формулы (XVII) могут быть получены окислением промежуточного соединения формулы (XIX) в присутствии подходящего окислителя, такого как MnO_2 , и подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, такого как метиленхлорид.



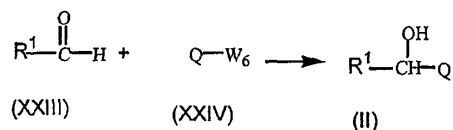
Промежуточные соединения формулы (XIX) могут быть получены восстановлением промежуточного соединения формулы (XX) в присутствии подходящего восстановителя, такого как алюмогидрид лития, и подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, такого как тетрагидрофуран.



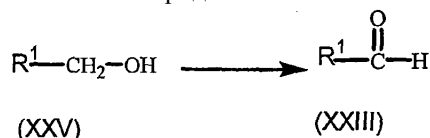
Промежуточные соединения формулы (XX), где Q представляет собой хинолиновую группу, необязательно замещенную в положении 3 C_{1-6} -алкилом, и где карбонильная группа находится в положении 6 [указанные промежуточные соединения представлены формулой (XX-a)], могут быть получены путем взаимодействия промежуточного соединения формулы (XXI) с промежуточным соединением формулы (XXII) в присутствии 3-нитробензолсульфоната натрия, подходящей кислоты, такой как серная кислота, и подходящего спирта, например метанола, этанола, пропанола, бутанола и т.п.



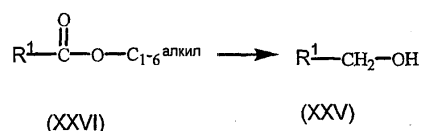
С другой стороны, промежуточные соединения формулы (II) могут быть также получены путем взаимодействия промежуточного соединения формулы (XXIII) с промежуточным соединением формулы (XXIV), где W_6 представляет собой подходящую удаляемую группу, такую как атом галогена, например бром, хлор и т.п., в присутствии подходящего агента, такого как бутиллитий, и подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, такого как тетрагидрофуран.



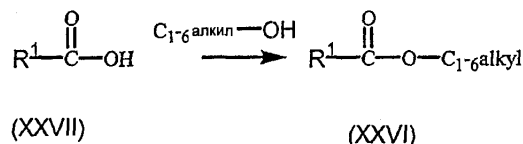
Промежуточные соединения формулы (XXIII) могут быть получены окислением промежуточного соединения формулы (XXV) с помощью окисления Пфизнера-Моффата или Сверна (аддукты диметилсульфоксида с дегидратирующими агентами, например, DCC, Ac_2O , SO_3 , P_4O_{10} , COCl_2 или Cl-CO-COCl) в инертном растворителе, таком как метиленхлорид.



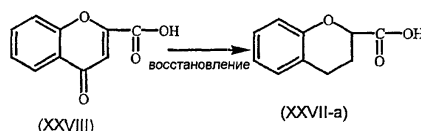
Промежуточные соединения формулы (XXV) могут быть получены восстановлением промежуточного соединения формулы (XXVI) в присутствии подходящего восстановителя, такого как, например, алюмогидрид лития, и подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, такого как бензол.



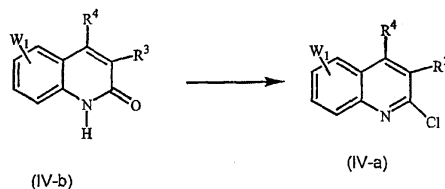
Промежуточные соединения формулы (XXVI) могут быть получены из промежуточного соединения формулы (XXVII) этерификацией в присутствии подходящего спирта, такого как метанол, этанол, пропанол, бутанол и т.п., и подходящей кислоты, такой как серная кислота.



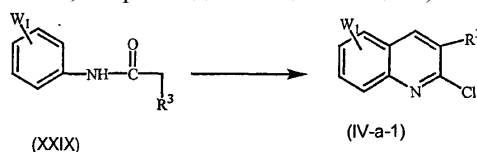
Промежуточные соединения формулы (XXVII), где R^1 представляет собой радикал формулы (a-1), где Z_1 представляет собой O, Z_2 представляет собой CH_2 , и n равным 1 [указанные промежуточные соединения представлены формулой (XXVII-a)], могут быть получены восстановлением промежуточного соединения формулы (XXVIII) в присутствии подходящего восстановителя, такого как водород, и подходящего катализатора, такого как палладий на активированном угле, и подходящей кислоты, такой как уксусная кислота. Когда R^1 промежуточного соединения (XXVII) представляет собой необязательно замещенную фенильную группу, ее можно также преобразовывать в необязательно замещенную циклогексильную группу путем восстановления в присутствии подходящего восстановителя, такого как родий на Al_2O_3 , и подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, такого как тетрагидрофуран.



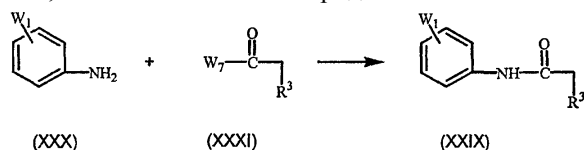
Промежуточные соединения формулы (IV), где Q представляет собой хинолиновую группу, замещенную в положении 2 галогеном, например хлором [указанные промежуточные соединения представлены формулой (IV-a)], могут быть получены путем взаимодействия промежуточного соединения формулы (IV), где Q представляет собой хинолиновую группу, где R^5 представляет собой водород [указанное промежуточное соединение представлено формулой (IV-b)], в присутствии POCl_3 .



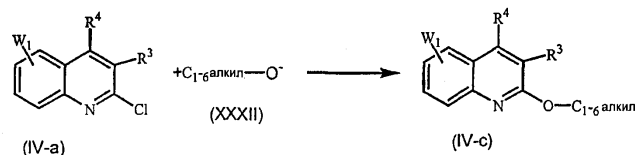
Промежуточные соединения формулы (IV-a), где R^4 представляет собой водород [указанные промежуточные соединения представлены формулой (IV-a-1)], могут быть также получены путем взаимодействия промежуточного соединения формулы (XXIX) с POCl_3 в присутствии N, N-диметилформамида (формилирование Вильсмайера-Хаака, сопровождаемое циклизацией).



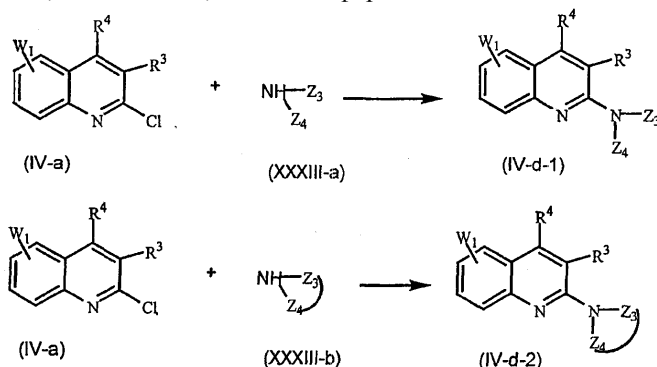
Промежуточные соединения формулы (XXIX) могут быть получены путем взаимодействия промежуточного соединения формулы (XXX) с промежуточным соединением формулы (XXXI), где W_7 представляет собой подходящую удаляемую группу, такую как атом галогена, например хлор, в присутствии подходящего основания, такого как, например, N,N-диэтилэтанамин, и подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, такого как метиленхлорид.



Промежуточные соединения формулы (IV-a) могут быть преобразованы в промежуточное соединение формулы (IV-c) путем взаимодействия с промежуточным соединением формулы (XXXII) в присутствии подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, такого как спирт, например метанол и т.п.

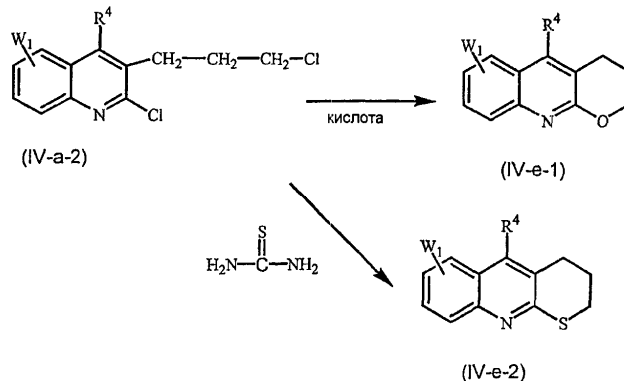


Промежуточные соединения формулы (IV-a) могут быть также преобразованы в промежуточное соединение формулы (IV-d-1) путем взаимодействия с подходящим амином формулы (XXXIII-a), где каждый из Z_3 и Z_4 независимо представляет собой водород, C_{1-6} -алкил, C_{1-6} -алкилокси- C_{1-6} -алкил, C_{1-6} -алкилтио- C_{1-6} -алкил, или в промежуточное соединение формулы (IV-d-2) путем взаимодействия с подходящим амином формулы (XXXIII-b), где Z_3 и Z_4 объединены с образованием гетероцикла, как описано выше в определении R^2 , при условии, что гетероцикл содержит, по меньшей мере, один атом азота, в присутствии подходящего основания, такого как, например, дикарбонат калия, и инертного по отношению к реакции растворителя, такого как N,N-диметилформамид.

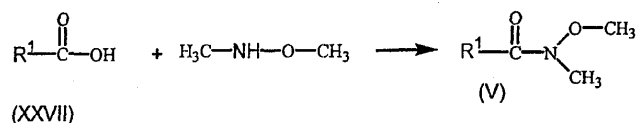


Промежуточные соединения формулы (IV-a), где R^3 представляет собой $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl}$ [указанные промежуточные соединения представлены формулой (IV-a-2)], могут быть также преобразованы в промежуточное соединение формулы (IV), где R^2 и R^3 объединены с образованием двухвалентного радикала формулы $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$ [указанное промежуточное соединение представлено формулой (IV-e-1)], путем взаимодействия с подходящей кислотой, такой как соляная кислота и т.п.

Промежуточные соединения формулы (IV-a-2) также могут быть преобразованы в промежуточное соединение формулы (IV), где R^2 и R^3 объединены с образованием двухвалентного радикала формулы $-\text{S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$ [указанное промежуточное соединение представлено формулой (IV-e-2)], путем взаимодействия с $\text{H}_2\text{N-C(=S)-NH}_2$ в присутствии подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, такого как спирт, например этанол.

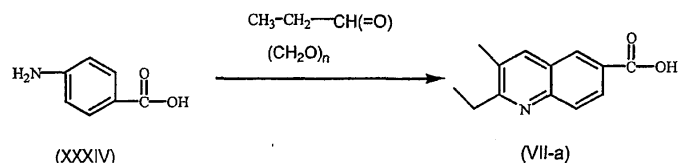


Промежуточные соединения формулы (V) могут быть получены путем взаимодействия промежуточного соединения формулы (XXVII) с промежуточным соединением формулы $\text{CH}_3\text{-NH-O-CH}_3$ в присутствии 1,1'-карбонилдиимидазола и подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, такого как метиленхлорид.

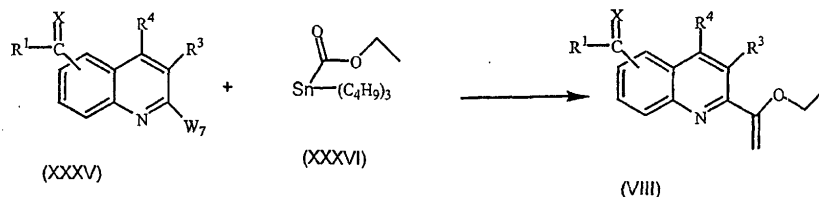


Промежуточные соединения формулы (VII), где Q представляет собой хинолиновую группу, в частности, хинолиновую группу, где R^2 представляет собой этил, R^3 представляет собой метил и R^4 представляет собой водород, а карбоксильная группа находится в положении 6 [указанные промежуточные соединения представлены формулой (VII-a)], могут быть получены путем взаимодействия промежуточ-

ного соединения формулы (XXXIV) в присутствии подходящего альдегида, такого как $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH(=O)}$, $(\text{CH}_2\text{O})_n$, ZnCl_2 , FeCl_3 , и подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, такого как спирт, например этанол.



Промежуточные соединения формулы (VIII) могут быть получены путем взаимодействия промежуточного соединения формулы (XXXV) с промежуточным соединением формулы (XXXVI) в присутствии подходящего катализатора, такого как, например, тетраakis(трифенилфосфин)палладий и подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, такого как диоксан.



Кроме того, можно разработать некоторые другие способы получения, некоторые из которых описаны далее в примерах настоящей заявки.

С помощью известных в данной области методик могут быть получены стереоизомерно чистые формы соединений и промежуточных соединений настоящего изобретения. Диастереомеры можно разделить с помощью физических способов разделения, таких как селективная кристаллизация, и хроматографических методов, например с помощью жидкостной хроматографии с применением хиральных стационарных фаз. Энантиомеры можно отделить друг от друга путем селективной кристаллизации солей их диастереомеров с оптически активными кислотами. С другой стороны, энантиомеры можно разделить хроматографическими методами с применением хиральных стационарных фаз. Указанные стереоизомерно чистые формы могут быть также получены из соответствующих стереоизомерно чистых форм соответствующих исходных продуктов при условии, что реакция происходит стереоселективно или стереоспецифически. Если требуется определенный стереоизомер, предпочтительно синтезировать указанное соединение с помощью стереоселективных или стереоспецифических способов синтеза. При таких способах применяют преимущественно хирально чистые исходные продукты. Очевидно, что стереоизомерные формы соединений формулы (I) включены в объем изобретения.

Сtereoизомер соединения формулы (I-A) или (I-B), соответствующий цис-форме, может быть преобразован в другой стереоизомер, соответствующий транс-форме, путем взаимодействия соединения с подходящей кислотой, такой как соляная кислота, в присутствии подходящего инертного по отношению к реакции растворителя, такого как, например тетрагидрофуран.

Антагонистическую активность настоящих соединений по отношению к mGluR1 можно продемонстрировать при проведении теста по передаче сигнала клонированных крысиных mGluR1 в СНО-клетках, и теста на холодовую аллодению (болевого теста) у крыс с лигатурой Беннета, как описано в дальнейшем.

Благодаря их антагонистической активности по отношению к mGluR, более конкретно, их антагонистической активности по отношению к mGluR группы I, и еще более конкретно, их антагонистической активности по отношению к mGluR1, соединения формулы (I-A) или (I-B), их N-оксиды, фармацевтически приемлемые аддитивные соли, четвертичные амины и стереохимически изомерные формы применимы для лечения или профилактики индуцированных глутаматом заболеваний центральной нервной системы. Заболевания, в которых установлена роль глутамата, включают лекарственное привыкание (наркоманию) или абстиненцию (зависимость, толерантность к опиоидам, воздержание от опиоидов), гипоксические, аноксические и ишемические повреждения (ишемический удар, остановку сердечной деятельности), боль (невропатическую боль, боль при воспалении, гипералгезию), гипогликемию, заболевания, связанные с неврональным повреждением, травму мозга, травму головы, повреждение спинного мозга, миелопатию, деменцию, тревогу, шизофрению, депрессию, ослабление когнитивной деятельности, амнезию, биполярные расстройства, расстройства поведения, болезнь Альцгеймера, сосудистую деменцию, смешанную (Альцгеймера и сосудистую) деменцию, заболевание тельца Леви, бредовое состояние или спутанность сознания, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, синдром Дауна, эпилепсию, старение, амиотрофический латеральный склероз, рассеянный склероз, СПИД (синдром приобретенного иммунодефицита) и СПИД-ассоциированный комплекс (ARC).

Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим терапевтически эффективное количество меченого изотопом соединения формулы (I-A)* или (I-B)* и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, для введения животным, в частности, человеку, в частности, в связи с диагно-

стикой, более конкретно, для визуализации органа.

Следовательно, соединения по настоящему изобретению или любой их подгруппы для введения можно получать в различных фармацевтических формах. В качестве соответствующих композиций можно упомянуть все композиции, обычно используемые для системного введения лекарственных средств. Для получения фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению терапевтически эффективное количество конкретного соединения, в форме основания или аддитивной соли, в виде активного ингредиента объединяют при тщательном перемешивании с фармацевтически приемлемым носителем, который можно выбрать в зависимости от формы препарата, необходимого для введения, из большого разнообразия форм. Желательно, чтобы такие фармацевтические композиции находились в виде стандартной лекарственной формы, предпочтительно для перорального, ректального, местного введения, через кожу или с помощью парентеральной инъекции. Например, в случае жидких препаратов для орального введения, таких как суспензии, сиропы, эмульсии, эликсиры и растворы, для получения композиции в дозированной форме для перорального введения можно использовать любую обычно применяемую фармацевтическую среду, такую как, например, вода, гликоли, масла, спирты и т.п.; или в случае порошков, пилюль, капсул и таблеток можно использовать твердые носители, такие как крахмалы, сахара, каолин, смазки, связующие компоненты, дезинтеграторы и т.п. Благодаря простоте введения таблетки и капсулы представляют собой наиболее выгодную стандартную лекарственную форму для перорального введения, в которой, безусловно, используются твердые фармацевтические носители. Носитель для парентеральной композиции обычно будет содержать стерилизованную воду, по меньшей мере, в значительной степени, хотя могут быть включены и другие ингредиенты, например вспомогательное средство для растворимости. Например, могут быть получены растворы для инъекции, в которых носитель содержит физиологический раствор, раствор глюкозы или смесь раствора глюкозы и физиологического раствора. Можно также получить суспензии для инъекций, в которых можно использовать соответствующие жидкие носители, суспендирующие агенты и т.п. Также включены препараты в твердой форме, которые незадолго перед использованием переводятся в препараты в жидкой форме. В качестве соответствующих композиций для местного нанесения можно упомянуть все композиции, обычно используемые для местного введения лекарственных средств, например кремы, гель, повязки, шампуни, тинктуры, пасты, мази, бальзамы, порошки и т.п. В композициях, подходящих для введения через кожу, носитель необязательно содержит агент, усиливающий проникновение, и/или подходящее смачивающее вещество, необязательно объединенное в незначительных пропорциях с подходящими добавками любой природы, которые не оказывают значительного вредного воздействия на кожу. Указанные добавки могут способствовать введению через кожу и/или могут быть полезны для получения требуемых композиций. Такие композиции можно вводить различными способами, например в виде трансдермального пластыря, в виде точечных мазков, в виде мази.

Для простоты введения и равномерности дозировки особенно удобно получать вышеупомянутые фармацевтические композиции в виде стандартной лекарственной формы. Применяемая здесь в описании и формуле изобретения стандартная лекарственная форма относится к физически дискретным формам, подходящим в качестве стандартных лекарственных форм, каждая единица которых содержит определенное количество активного ингредиента, рассчитанного для получения требуемого терапевтического эффекта, совместно с необходимым фармацевтическим носителем. Примерами таких стандартных лекарственных форм являются таблетки (включая таблетки с шероховатой поверхностью или таблетки, покрытые оболочкой), капсулы, пилюли, суппозитории, упаковки порошков, облатки, растворы или суспензии для инъекции, дозировки в виде чайной ложки лекарства, столовой ложки и т.п. и сегрегированных кратных количеств.

Как известно специалисту в данной области, эффективная диагностическая доза или частота введения зависят от конкретного применяемого соединения формулы (I-A)* или (I-B)* и конкретного состояния животного, которое подвергается лечению.

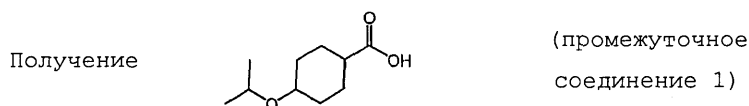
Следующие примеры предназначены для иллюстрации и не ограничивают объем настоящего изобретения.

Экспериментальная часть

В дальнейшем N,N-диметилформамид обозначается как ДМФ, простой диизопропиловый эфир обозначается как DIPE, диметилсульфоксид обозначается как ДМСО, 2, 6-бис-(1,1-диметилэтил)-4-метилфенол обозначается как ВНТ и тетрагидрофуран обозначается как ТГФ.

Получение промежуточных соединений

Пример A1.



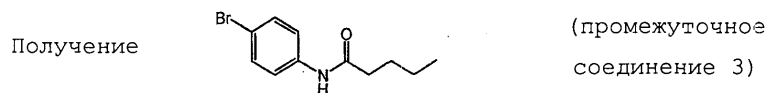
Смесь 4-(1-метилэтокси)бензойной кислоты (0,083 моль) и Rh/Al₂O₃ 5% (10 г) в ТГФ (220 мл) подвергают гидрированию при 50°C (при давлении H₂ 3 бар) в течение 1 ночи. Смесь фильтруют через целит, промывают ТГФ и упаривают. Выход: 16 г промежуточного соединения 1 (100%).

Пример А2.

Получение 2-этил-3-метил-6-хинолинкарбоновой кислоты (промежуточное соединение 2).

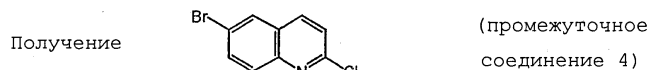
Смесь 4-аминобензойной кислоты (0,299 моль) в этаноле (250 мл) перемешивают при комнатной температуре. Добавляют ZnCl_2 (0,0367 моль) и $(\text{CH}_2\text{O})_n$ (10 г). По частям добавляют $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,5 моль) и повышают температуру до 60-65°C. По каплям в течение более 2 ч добавляют пропаналь (30 мл). Смесь кипятят с обратным холодильником в течение 2 ч и сохраняют при комнатной температуре в течение 12 ч. Смесь выливают в воду и фильтруют через целит. Фильтрат подкисляют до pH=7 с помощью 6N HCl и смесь упаривают досуха. Остаток применяют без дальнейшей очистки. Выход: 56,1 г 2-этил-3-метил-6-хинолинкарбоновой кислоты (промежуточное соединение 2).

Пример А3.



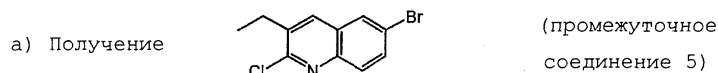
К смеси 4-бромбензоламина (0,232 моль) и N,N-диэтилэтанамина (0,2784 моль) в CH_2Cl_2 (400 мл) при 5°C добавляют пентаноилхлорид (0,2784 моль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи, выливают в воду и экстрагируют CH_2Cl_2 . Органический слой отделяют, промывают концентрированным раствором NH_4OH и водой, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (60 г) кристаллизуют из диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Остаток (35 г, 63%) переносят в CH_2Cl_2 . Органический слой отделяют, промывают 10%-ным раствором K_2CO_3 , промывают водой, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Выход: 30 г промежуточного соединения (3) (54%).

Пример А4.

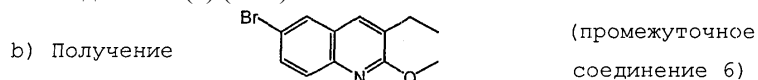


Смесь 6-бром-2(1H)-хинолинона (0,089 моль) в POCl_3 (55 мл) перемешивают при 60°C в течение ночи, затем при 100°C в течение 3 ч и выпаривают растворитель. Остаток переносят в CH_2Cl_2 , выливают в воду со льдом, подщелачивают концентрированным NH_4OH , фильтруют через целит и экстрагируют CH_2Cl_2 . Органический слой отделяют, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Выход: 14,5 г промежуточного соединения (4) (67%).

Пример А5.

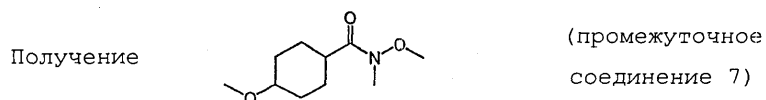


К POCl_3 (108 мл) при 10°C в токе N_2 добавляют по каплям ДМФ (37 мл). После завершения добавления смеси дают нагреться до комнатной температуры. По частям добавляют N-(4-бромфенил)бутанамид (0,33 моль). Смесь перемешивают при 85°C в течение ночи, затем дают охладиться до комнатной температуры и выливают на лед (экзотермическая реакция). Осадок отфильтровывают, промывают небольшим количеством воды и сушат (вакуум). Остаток промывают EtOAc/диэтиловым эфиром и сушат. Выход: 44,2 г промежуточного соединения (5) (50%).



Смесь промежуточного соединения (5) (0,162 моль) в метаноле (600 мл) и раствора метилата натрия (метанолнатриевой соли) в метаноле при концентрации 35% (154 мл) перемешивают и кипятят с обратным холодильником в течение ночи. Смесь выливают на лед. Осадок отфильтровывают, промывают небольшим количеством воды и переносят в CH_2Cl_2 . Добавляют 10%-ный K_2CO_3 и смесь экстрагируют CH_2Cl_2 . Органический слой отделяют, промывают водой, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Выход: 31,9 г промежуточного соединения (6) (74%).

Пример А6.



К смеси 4-метоксициклогексанкарбоновой кислоты (0,063 моль) в CH_2Cl_2 (200 мл) по частям добавляют 1,1'-карбонил-бис-1H-имидазол (0,074 моль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем добавляют N-метоксиметанамин (0,074 моль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи, выливают в H_2O и экстрагируют CH_2Cl_2 . Органический слой отделяют, промывают несколько раз H_2O , сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Выход: 12,6 г промежуточного соединения 7.

Пример А7.

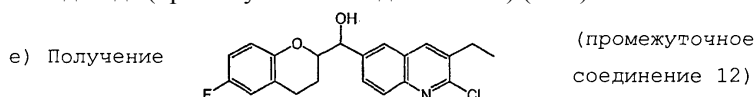
а) Смесь 6-фтор-4-оксо-4Я-1-бензопиран-2-карбоновой кислоты (0,30 моль) в уксусной кислоте (400 мл) гидрируют в присутствии Pd/C (3 г) в качестве катализатора. После поглощения H_2 (3 экв.) катализатор отфильтровывают. Фильтрат упаривают. Остаток перемешивают в петролейном эфире. Осадок отфильтровывают и сушат (вакуум; 70°C). После перекристаллизации из $CHCl_3/CH_3OH$ осадок отфильтровывают и сушат (вакуум; 80°C и высокий вакуум; 85°C).

Выход: 8,8 г 6-фтор-3,4-дигидро-2Н-1-бензопиран-2-карбоновой кислоты (промежуточное соединение 8) (15,0%).

б) Смесь промежуточного соединения (8) (0,255 моль) в этаноле (400 мл) и H_2SO_4 (5 мл) перемешивают и кипятят с обратным холодильником в течение 8 ч. Выпаривают растворитель досуха. Остаток растворяют (разжижают) в CH_2Cl_2 . Органический слой отделяют, промывают 10%-ным K_2CO_3 , сушат ($MgSO_4$), фильтруют и выпаривают растворитель. Выход: 45 г этил-6-фтор-3,4-дигидро-2Н-1-бензопиран-2-карбоксилата (промежуточное соединение 9) (79%).

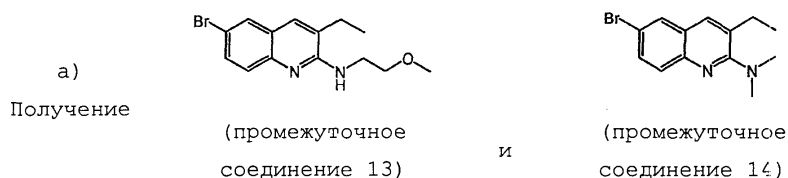
с) Реакция в атмосфере N_2 . Смесь 70%-ного по массе раствора бис-(2-метоксиэтокси)алюмогидрида натрия в метилбензоле 3,4 М (0,44 моль) и бензола (150 мл) (кипение с обратным холодильником) добавляют по каплям в течение 1 часа к кипящей с обратным холодильником смеси промежуточного соединения 9 (0,22 моль) и бензола (600 мл). После перемешивания в течение 2,5 ч при температуре флегмы смесь охлаждают до $\pm 15^\circ C$. Смесь растворяют (разлагают), добавляя по каплям этанол (30 мл) и воду (10 мл). Полученную смесь выливают в лед/воду и полученную смесь подкисляют концентрированной соляной кислотой. Полученную смесь экстрагируют диэтиловым эфиром (500 мл). Отделенный органический слой промывают водой, сушат, фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: $CHCl_3$). Отбирают нужную фракцию и выпаривают элюент. Выход: 34 г 6-фтор-3,4-дигидро-2Н-1-бензопиран-2-метанол (промежуточное соединение 10) (85%).

д) Реакция в атмосфере N_2 . К смеси этандионилдихлорида (0,1 моль) в CH_2Cl_2 (350 мл) при перемешивании и охлаждении ($-60^\circ C$; на бане 2-пропанон/ CO_2) в течение 10 мин добавляют сульфинил-бис[метан] (30 мл). После перемешивания в течение 10 мин добавляют смесь промежуточного соединения 10 в CH_2Cl_2 (90 мл) в течение 5 мин. После перемешивания в течение 15 мин добавляют N,N-диэтилэтанамин (125 мл). Когда смесь нагреется до комнатной температуры, ее выливают в воду. Продукт экстрагируют CH_2Cl_2 . Органический слой промывают водой, HCl (1М), водой, $NaHCO_3$ (10%) и водой, сушат и упаривают. Остаток разжижают (растворяют) в диэтиловом эфире, промывают водой, сушат, отфильтруют и упаривают. Остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: $CHCl_3$). Нужную фракцию отбирают и элюент выпаривают. Выход: 21,6 г 6-фтор-3,4-дигидро-2Н-1-бензопиран-2-карбоксальдегида (промежуточное соединение 11) (67%).

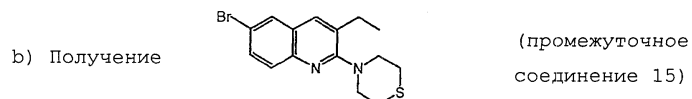


1,6 М н-бутиллитий (0,056 моль) медленно добавляют при $-70^\circ C$ к раствору промежуточного соединения (5) (0,046 моль) в ТГФ (100 мл). Смесь перемешивают при $-70^\circ C$ в течение 30 мин. Медленно добавляют суспензию промежуточного соединения 11 (0,056 моль) в ТГФ (100 мл). Смесь перемешивают при $-70^\circ C$ в течение 1 ч, затем доводят температуру до комнатной, выливают в H_2O и экстрагируют EtOAc. Органический слой отделяют, сушат ($MgSO_4$), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (21 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/EtOAc 80/10; 15-35 мкм). Очищенные фракции отбирают и выпаривают растворитель. Выход: 9,5 г промежуточного соединения 12 (55%).

Пример А8



Смесь промежуточного соединения (5) (0,1127 моль), 2-метоксиэтанамина (0,2254 моль) и K_2CO_3 (0,2254 моль) в ДМФ (500 мл) перемешивают при $120^\circ C$ в течение 15 ч и затем охлаждают. Выпаривают растворитель. Остаток переносят в CH_2Cl_2 и H_2O . Органический слой отделяют, сушат ($MgSO_4$), фильтруют и досуха выпаривают растворитель. Остаток (33,53 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: CH_2Cl_2/CH_3OH 99,5/0,5; 15-40 мкм). Две фракции отбирают и выпаривают из них растворители. Выход: 5,7 г промежуточного соединения 14 (38%) и промежуточного соединения 13 (34%).



Смесь промежуточного соединения (5) (0,0751 моль), тиоморфолина (0,0891 моль) и K_2CO_3 (0,15 моль) в ДМФ (200 мл) перемешивают при 120°C в течение 12 ч. Выпаривают растворитель досуха. Остаток переносят в CH_2Cl_2 и H_2O . Органический слой отделяют, сушат ($MgSO_4$), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (26 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/ $EtOAc$ 80/20; 20-45 мкм). Две фракции отбирают и выпаривают из них растворители. Две полученные фракции объединяют. Выход: 9,4 г промежуточного соединения 15 (37%); т.пл. 82°C.

Пример А9.

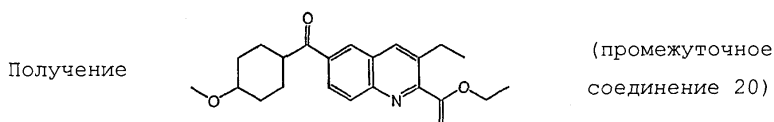
а) 4-аминобензойную кислоту (0,219 моль) добавляют к раствору 3-нитробензолсульфоната натрия (0,118 моль) в 70%-ной H_2SO_4 (230 мл) и кипятят смесь с обратным холодильником при перемешивании. Добавляют по каплям 2-пропен-1,1-диол-2-метилдиацетат (0,216 моль) и кипятят смесь с обратным холодильником в течение 4 ч. Добавляют этанол (200 мл) и перемешивают смесь при 80°C в течение 48 ч. Смесь упаривают, остаток выливают в воду со льдом/ NH_4OH и экстрагируют CH_2Cl_2 . Органический слой сушат ($MgSO_4$) и упаривают. Остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: CH_2Cl_2 /2-пропанол 99/1). Очищенные фракции отбирают и упаривают. Выход: 21 г этил-3-метил-6-хинолинкарбоксилата (промежуточное соединение 16) (45%).

б) Промежуточное соединение 16 (0,098 моль) в ТГФ (270 мл) добавляют при 0°C к раствору $LiAlH_4$ (0,098 моль) в ТГФ в атмосфере N_2 . Когда добавление завершится, добавляют воду (10 мл). Осадок отфильтровывают и промывают CH_2Cl_2 . Органический слой сушат ($MgSO_4$), фильтруют и упаривают. Продукт применяют без дальнейшей очистки. Выход: 16,71 г 3-метил-6-хинолинметанол (промежуточное соединение 17).

в) К раствору промежуточного соединения 17 (0,096 моль) в CH_2Cl_2 (200 мл) добавляют MnO_2 (0,237 моль) и смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 12 ч. Смесь фильтруют через целит и фильтрат снова перемешивают с MnO_2 (20 г) в течение 12 ч. Снова добавляют MnO_2 (10 г). Смесь перемешивают в течение 12 ч. Смесь фильтруют через целит и упаривают. Продукт применяют без дальнейшей очистки. Выход: 11,71 г 3-метил-6-хинолинкарбоксальдегида (71%) (промежуточное соединение 18).

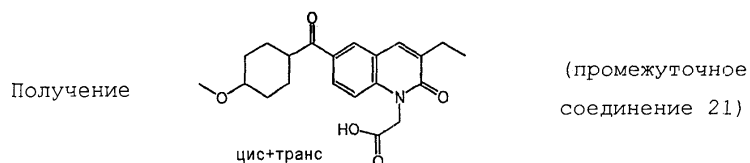
г) Раствор бромциклогексила (0,14 моль) в 1,1'-окси-бис-этаноле (50 мл) и в присутствии Mg -стружки (50 мл) добавляют при 10°C к смеси ТГФ (0,14 моль) в 1,1'-окси-бис-этаноле (10 мл). Осторожно добавляют раствор промежуточного соединения 18 (0,07 моль) в присутствии Mg -стружки (100 мл) при 5°C, смесь выливают в воду со льдом и экстрагируют $EtOAc$. Выход: 11,34 г ($\pm$)- α -циклогексил-3-метил-6-хинолинметанола (63%) (промежуточное соединение 19).

Пример А10.



Смесь соединения (5) (0,001507 моль), трибутил-(1-этоксипентил)олова (0,00226 моль) и $Pd(PPh_3)_4$ (0,000151 моль) в 1,4-диоксане (5 мл) перемешивают при 80°C в течение 3 ч. Добавляют воду. Смесь экстрагируют $EtOAc$. Органический слой отделяют, сушат ($MgSO_4$), фильтруют и выпаривают растворитель. Полученный продукт применяют без дальнейшей очистки. Выход: 1,4 г промежуточного соединения 20.

Пример А11.

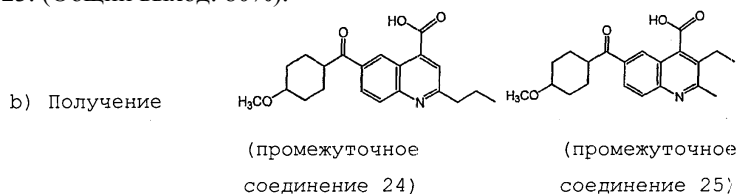


Смесь соединения (45) (полученного согласно способу В6) (0,00125 моль) в 3н $NaOH$ (5 мл) и $iPrOH$ (1,7 мл) перемешивают при комнатной температуре в течение ночи, затем выливают в H_2O , подкисляют 3н. HCl и экстрагируют $EtOAc$. Органический слой отделяют, сушат ($MgSO_4$), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток переносят в простой диэтиловый эфир. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,26 г промежуточного соединения 21 (56%). (Т.пл.: 232°C)

Пример А12.

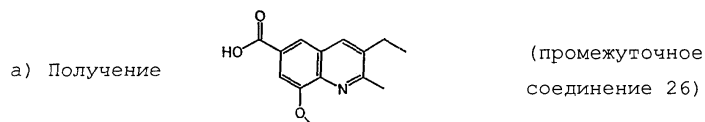


Смесь 5-бром-1Н-индол-2,3-диона (0,221 моль) в 3н. NaOH (500 мл) перемешивают при 80°C в течение 30 мин, доводят температуру до комнатной и добавляют 2-пентанон (0,221 моль). Смесь перемешивают и кипятят с обратным холодильником в течение 1 ч 30 мин и подкисляют AcOH до pH=5. Осадок отфильтровывают, промывают водой и сушат. Выход: 52,3 г промежуточного соединения 22 и промежуточного соединения 23. (Общий выход: 80%).

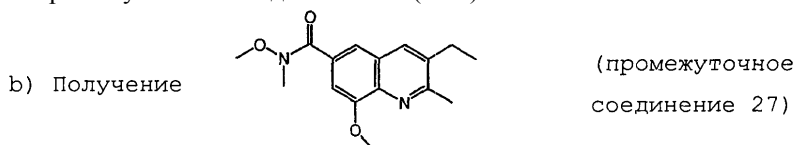


1,6 М n-BuLi (0,0816 моль) добавляют по каплям при -78°C к суспензии промежуточного соединения 22 (0,034 моль) и промежуточного соединения 23 (0,034 моль) в ТГФ (300 мл) в токе N₂. Смесь перемешивают при -78°C в течение 30 мин. Добавляют по каплям 1,6 М n-BuLi (0,0816 моль). Смесь перемешивают в течение 1 ч. Медленно добавляют смесь промежуточного соединения 9 (0,102 моль) в ТГФ (250 мл). Смесь перемешивают в интервале температур от -78 до -20°C, выливают в смесь H₂O/HCl (3н) и экстрагируют EtOAc. Органический слой отделяют, сушат (MgSO₄), фильтруют и выпаривают растворитель досуха. Выход: 20,89 г промежуточного соединения 24 и промежуточного соединения 25 (86%).

Пример A13.



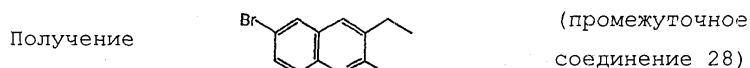
К раствору 3-хлор-2-этил-2-бутеналя (0,065 моль) в AcOH (100 мл) при комнатной температуре по частям добавляют 4-амино-3-метоксибензойную кислоту (0,054 моль). Смесь перемешивают, кипятят с обратным холодильником в течение 8 часов и упаривают досуха. Остаток переносят в CH₂Cl₂, добавляют воду и подщелачивают раствор с помощью Et₃N. Органический слой отделяют, сушат (MgSO₄), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток кристаллизуют из 2-пропанона. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 2,5 г промежуточного соединения 26 (18%).



К раствору промежуточного соединения 26 (0,011 моль) в CH₂Cl₂ (30 мл) при комнатной температуре добавляют CDI (0,012 моль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч. Добавляют метоксиаминометил (0,012 моль) и перемешивают смесь при комнатной температуре в течение 8 ч. Добавляют H₂O. Осадок отфильтровывают. Фильтрат экстрагируют CH₂Cl₂.

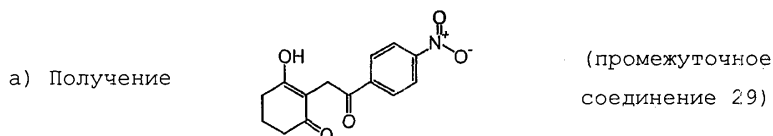
Органический слой отделяют, сушат (MgSO₄), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток перекристаллизовывают из простого диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,95 г промежуточного соединения 27 (31%) (т.пл.: 148°C).

Пример A14.



К раствору 3-хлор-2-этил-2-бутеналя (0,041 моль) в AcOH (60 мл) добавляют при комнатной температуре 4-бромбензоламик (0,034 моль). Смесь перемешивают и кипятят с обратным холодильником в течение 8 ч, доводят до комнатной температуры и упаривают досуха. Продукт кристаллизуют из EtOAc. Осадок отфильтровывают, промывают 10%-ным K₂CO₃ и переносят в CH₂Cl₂. Органический слой отделяют, сушат (MgSO₄), фильтруют и выпаривают растворитель. Выход: 4,6 г промежуточного соединения 28 (54%).

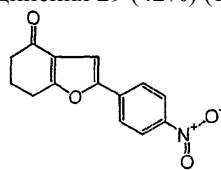
Пример A15.



К раствору 1,3-циклогександиона (0,268 моль) в H₂O (150 мл) медленно добавляют при 5°C раствор KOH (0,326 моль) в H₂O (150 мл). Температура не должна превышать 12°C. Добавляют KI (2 г), затем по частям 2-бром-1-(4-нитрофенил)этанон (0,294 моль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 48 ч. Осадок отфильтровывают, промывают H₂O, затем простым диэтиловым эфиром и сушат.

Выход: 63 г (85%). Часть полученной фракции (1 г) кристаллизуют из EtOH. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,5 г промежуточного соединения 29 (42%) (т.пл.: 100°C).

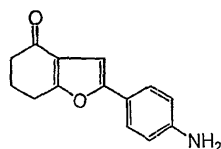
b) Получение



(промежуточное
соединение 30)

Смесь промежуточного соединения 29 (0,145 моль) и H_2SO_4 (40 мл) перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч, выливают на лед, подщелачивают NH_4OH и экстрагируют CH_2Cl_2 . Органический слой отделяют, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток кристаллизуют из EtOH. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 31 г (58%). Часть полученной фракции (1 г) кристаллизуют из EtOH. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,7 г промежуточного соединения 30 (58%) (т.пл.: 200°C).

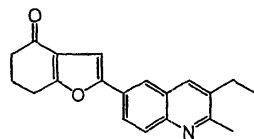
c) Получение



(промежуточное
соединение 31)

Смесь промежуточного соединения 30 (0,039 моль) и никеля Ренея (10 г) в EtOH (100 мл) гидрируют в течение 1 ч при комнатной температуре под давлением 3 бар. Смесь фильтруют через целит и промывают CH_2Cl_2 . Органический слой отделяют, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (9,5 г) кристаллизуют из простого диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 4,6 г (52%). Фильтрат упаривают. Остаток (2,7 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$; 99/1; 15-40 мкм). Отбирают две фракции и выпаривают растворитель. Выход: 1,6 г F_1 и 1,2 г F_2 . F_2 кристаллизуют из EtOH. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,24 г промежуточного соединения 31 (2%) (т.пл.: 202°C).

d) Получение

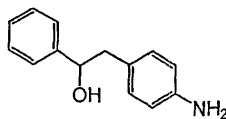


(промежуточное
соединение 32)

К раствору 3-хлор-2-этил-2-бутенала (0,04 моль) в AcOH (50 мл) добавляют при комнатной температуре промежуточное соединение 30 (0,02 моль). Смесь перемешивают и кипятят с обратным холодильником в течение 4 ч. Растворитель выпаривают досуха. Остаток кристаллизуют из EtOAc. Осадок отфильтровывают и сушат. Остаток переносят в CH_2Cl_2 . Смесь подщелачивают 10%-ным K_2CO_3 и экстрагируют CH_2Cl_2 . Органический слой отделяют, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток кристаллизуют из EtOH. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 2,5 г промежуточного соединения 32 (40%).

Пример A16.

Получение

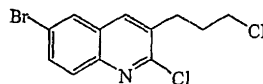


(промежуточное
соединение 33)

Смесь 2-(4-нитрофенил)-1-фенилэтанола (0,083 моль) и никеля Ренея (20 г) в EtOH (200 мл) гидрируют при комнатной температуре в течение 1 ч под давлением 3 бар, затем фильтруют через целит, промывают $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ и сушат. Выход: 17,5 г промежуточного соединения 33 (97%).

Пример A17.

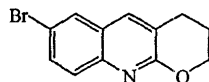
a) Получение



(промежуточное
соединение 34)

К POCl_3 (0,7536 моль) добавляют по каплям при 5°C ДМФ (12,4 мл). Добавляют 4'-бром-5-хлорвалеранилид (0,1032 моль) и перемешивают смесь при 75°C в течение 6 ч, охлаждают до комнатной температуры и выливают в воду со льдом. Нерастворимое вещество отфильтровывают, промывают водой и сушат. Выход: 25,7 г промежуточного соединения 34 (78%).

b) Получение



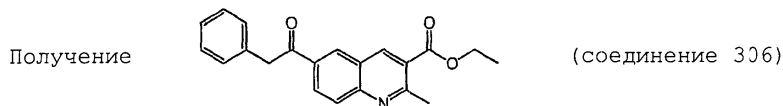
(промежуточное
соединение 35)

Смесь промежуточного соединения 34 (0,094 моль) и бн. HCl (250 мл) перемешивают и кипятят с обратным холодильником в течение 2 дней, охлаждают, выливают в воду (100 мл) и нейтрализуют

NH_4OH (концентрированный). Нерастворимое вещество фильтруют и промывают водой, затем EtOH . Выход: 19 г. Фильтрат упаривают. Остаток (9,4 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 99,25/0,75; 15-35 мкм). Отбирают одну фракцию и выпаривают растворитель. Выход: 8 г промежуточного соединения 35 (32%).

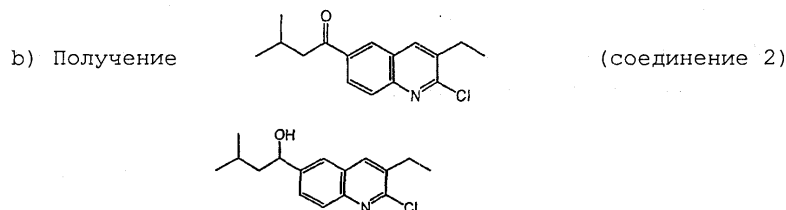
Получение нерадиоактивных соединений

Пример В1.



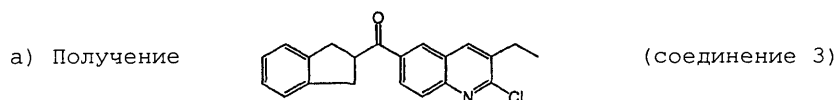
К ДМФ (0,024 моль) медленно добавляют POCl_3 (0,024 моль) при 5°C . Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 30 мин, затем охлаждают до 5°C . Медленно добавляют сложный эфир 3-оксобутановой кислоты (0,024 моль). Смесь перемешивают при 5°C в течение 30 мин. По частям добавляют 1-(4-аминофенил)-2-фенилэтанон (0,024 моль). Смесь перемешивают при 90°C в течение 3 ч и растворяют в CH_2Cl_2 . Добавляют воду со льдом. Смесь подщелачивают NH_4OH и экстрагируют CH_2Cl_2 . Органический слой отделяют, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток кристаллизуют из 2-пропанона/диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,9 г соединения 306 (11%) (т.пл.: 136°C).

Пример В2

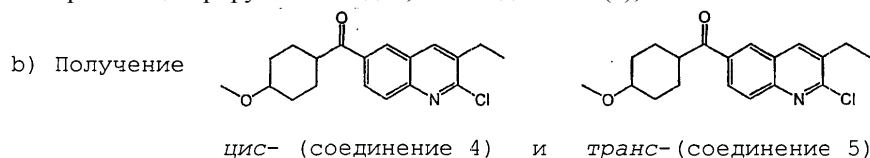


К раствору (полученному согласно примеру А7.е) (0,022 моль) в трис(диокса-3,6-гептил)амине (1 мл) и CH_2Cl_2 (100 мл) при комнатной температуре по частям добавляют KMnO_4 (10 г). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 8 ч, фильтруют через целит, промывают CH_2Cl_2 и сушат. Остаток (6 г, 100%) кристаллизуют из диэтилового эфира/петroleumного эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 2 г соединения (2) (33%); т.пл. 82°C .

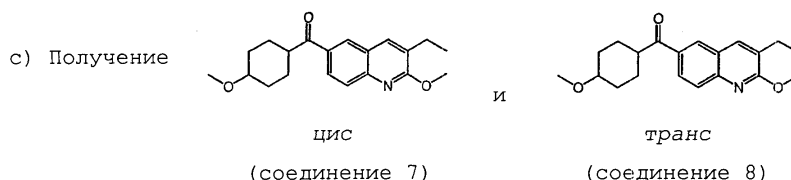
Пример В3



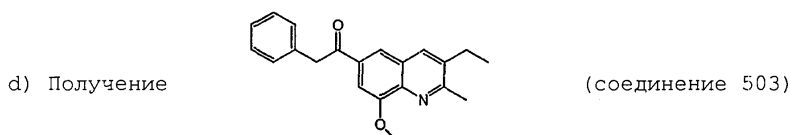
1,6 М $n\text{-BuLi}$ (0,07 моль) медленно добавляют при -70°C к раствору промежуточного соединения (5) (0,058 моль) в ТГФ (150 мл). Смесь перемешивают при -70°C в течение 30 мин. Медленно добавляют раствор 2,3-дигидро-1Н-инден-2-карбонитрила (0,07 моль) в ТГФ (100 мл). Смесь перемешивают при -70°C в течение 1 ч, медленно доводят до комнатной температуры, подвергают гидролизу с H_2O и экстрагируют EtOAc . Органический слой отделяют, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (22 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: CH_2Cl_2 /циклогексан, от 80/20 до 100; 15-35 мкм). Очищенные фракции отбирают и выпаривают растворитель. Вторую фракцию кристаллизуют из 2-пропанона/диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,11 г соединения (3). Фильтрат концентрируют. Выход: 0,55 г соединения (3); т.пл. 145°C .



1,6 М $n\text{-BuLi}$ (0,022 моль) при -70°C медленно добавляют к раствору промежуточного соединения (5) (0,018 моль) в ТГФ (50 мл). Смесь перемешивают при -70°C в течение 1 ч, доводят температуру до -40°C , затем охлаждают до -70°C . Медленно добавляют раствор промежуточного соединения 7 (0,018 моль) в ТГФ (40 мл). Смесь перемешивают при -70°C в течение 1 ч, затем доводят температуру до -20°C , подвергают гидролизу с H_2O и экстрагируют EtOAc . Органический слой отделяют, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (6,5 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: толуол/ EtOAc 90/10; 15-40 мкм). Отбирают две фракции (F_1 и F_2) и выпаривают растворитель. F_1 (2,4 г) кристаллизуют из простого диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 1,8 г соединения (4) (29%); т.пл. 123°C . F_2 (0,9 г) кристаллизуют из простого диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,2 г соединения (5) (3%); т.пл. 120°C .

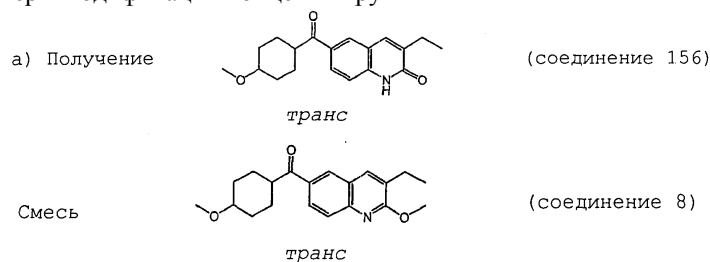


По каплям при -78°C в токе N_2 добавляют 1,6 М н-BuLi в оксане (exane) (0,107 моль) к смеси промежуточного соединения (6) (0,089 моль) в ТГФ. Смесь перемешивают при -78°C в течение 1 ч. При -78°C в токе N_2 добавляют смесь промежуточного соединения 7 (150 мл). Смесь перемешивают при -78°C в течение 2 ч, доводят температуру до 0°C , выливают в H_2O и экстрагируют EtOAc. Органический слой отделяют, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (31 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/EtOAc 85/15; 20-45 мкм). Отбирают две очищенные фракции и выпаривают из них растворители. Выход: 11 г соединения (7) (38%) и 8,2 г соединения (8) (28%).

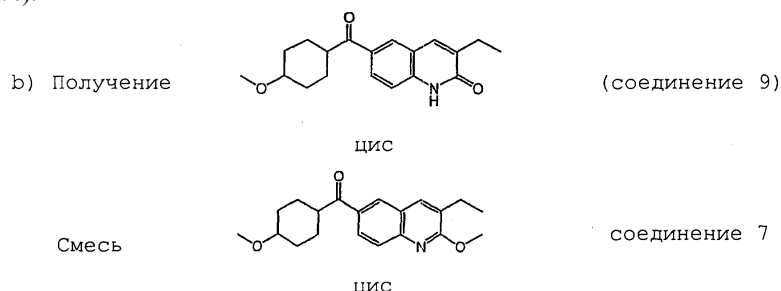


К суспензии Mg (0,0069 моль) в небольшом количестве простого диэтилового эфира медленно добавляют раствор хлорметилбензола (0,0069 моль) в простом диэтиловом эфире (8 мл). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 30 мин (распределение Mg), затем охлаждают до 5°C . Медленно добавляют раствор промежуточного соединения 27 (0,0027 моль) в ТГФ (8 мл). Смесь перемешивают при 5°C в течение 15 мин, затем при комнатной температуре в течение 2 ч, выливают в H_2O и фильтруют через целит. Осадок промывают EtOAc. Фильтрат экстрагируют EtOAc. Органический слой отделяют, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (1 г) очищают колоночной хроматографией на кромасиле (элюент: от 100 CH_2Cl_2 до 99/1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$; 15-40 мкм). Очищенные фракции отбирают и выпаривают растворитель. Остаток (0,5 г, 56%) кристаллизуют из диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,14 г соединения 503 (15%).

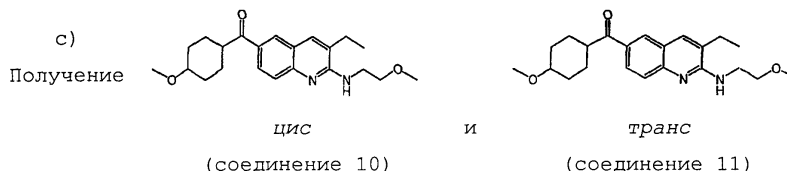
Пример В4. Примеры модификаций концевых групп



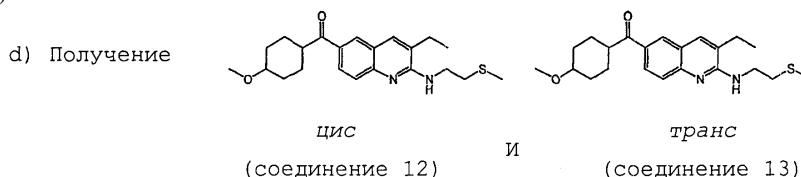
(полученную согласно примеру В3.с) (0,018 моль) в 3н. HCl (60 мл) и ТГФ (60 мл) перемешивают при 60°C в течение ночи. Смесь подщелачивают 10%-ым раствором K_2CO_3 и экстрагируют CH_2Cl_2 . Органический слой отделяют, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Выход: 4,6 г соединения (156) (82%).



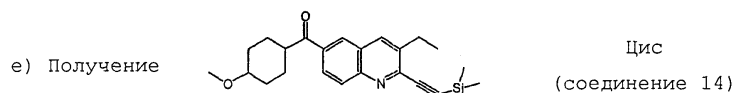
(полученную согласно примеру В3.с) (0,0122 моль) 3н. HCl (40 мл) и ТГФ (40 мл) перемешивают и кипятят с обратным холодильником в течение ночи, выливают в воду, подщелачивают 10%-ным K_2CO_3 и экстрагируют CH_2Cl_2 . Органический слой отделяют, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/EtOAc 40/60; 15-40 мкм). Очищенные фракции отбирают и выпаривают растворитель. Выход: 2 г соединения (9) (52%); т.пл. 226°C .



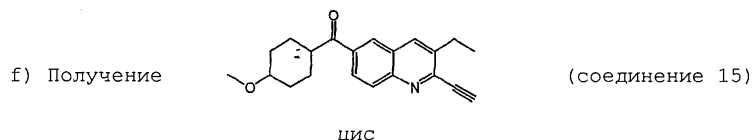
Смесь соединения (4) (0,0015 моль), 2-метоксиэтанамина (0,003 моль) и K_2CO_3 (0,003 моль) в ДМФ (5 мл) перемешивают при 140°C в течение 48 ч. Добавляют H_2O . Смесь экстрагируют EtOAc. Органический слой отделяют, сушат ($MgSO_4$), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (1 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/EtOAc 60/4 0; 15-40 мкм). Отбирают две фракции и выпаривают растворитель. Обе фракции по отдельности кристаллизуют из пентана. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,05 г соединения (10) (9%; т.пл. 115°C) и 0,057 г соединения (11) (10%; т.пл. 107°C).



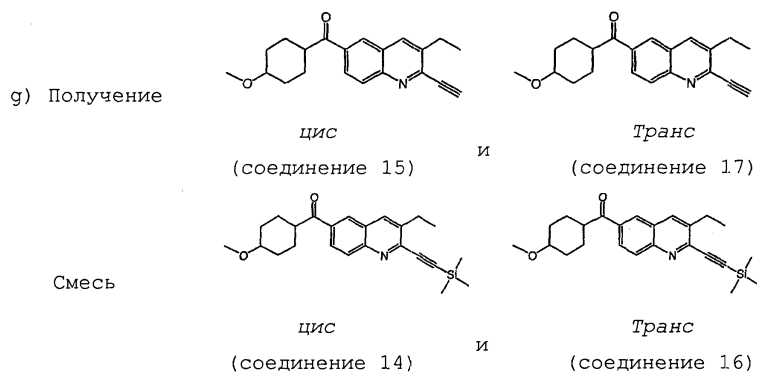
Смесь соединения (4) (0,0015 моль) в 2-(метилтио)этанамине (2 мл) перемешивают при 120°C в течение 8 ч. Добавляют 10%-ный K_2CO_3 . Смесь экстрагируют CH_2Cl_2 . Органический слой отделяют, сушат ($MgSO_4$), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (2,2 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/EtOAc 70/30; 15-40 мкм). Отбирают две фракции и выпаривают растворитель. Первую фракцию кристаллизуют из простого диэтилового эфира/петroleumного эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,08 г соединения (12) (14%; т.пл. 120°C). Вторую фракцию кристаллизуют из простого диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,18 г соединения (13) (31%; т.пл. 125°C).



Смесь соединения (4) (0,001507 моль), этилнитриметилсилана (0,003013 моль), CuI (0,000151 моль) и $Pd(PPh_3)_4$ (0,000151 моль) в N,N -диэтилэтанамине (5 мл) перемешивают при 100°C в течение 24 ч. Добавляют воду. Смесь фильтруют через целит, промывают EtOAc и фильтрат экстрагируют EtOAc. Органический слой отделяют, сушат ($MgSO_4$), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (1,3 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/EtOAc 85/15; 15-40 мкм). Очищенные фракции отбирают и выпаривают растворитель. Остаток (0,3 г) кристаллизуют из пентана. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,11 г соединения (14) (18%; т.пл. 114°C).



Смесь соединения (14) (0,013 моль) и KF (0,038 моль) в уксусной кислоте (50 мл) перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч. Добавляют H_2O и экстрагируют смесь простым диэтиловым эфиром. Органический слой отделяют, сушат ($MgSO_4$), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (4,4 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/EtOAc 70/30; 15-40 мкм). Отбирают одну фракцию и выпаривают растворитель. Полученную фракцию (3 г, 73%) кристаллизуют из простого диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 2,45 г соединения (15) (60%; т.пл. 132°C).



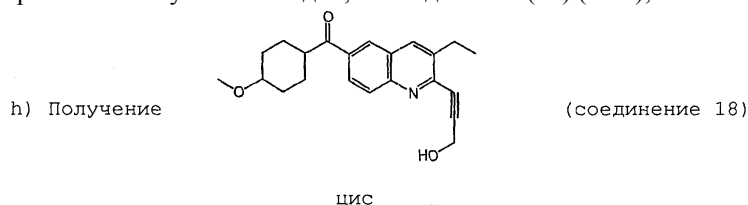
полученное согласно примеру В.7.а) (0,0056 моль) в KOH^{II} [1М, H_2O] (10 мл) и метаноле (30 мл) перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч, выливают в воду и экстрагируют EtOAc . Органический слой отделяют, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (2,2 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/ EtOAc от 85/15 до 70/30; 15-40 мкм). Отбирают две фракции и выпаривают растворитель.

Первую фракцию кристаллизуют из простого диэтилового эфира.

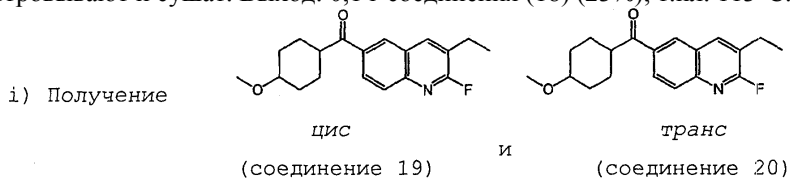
Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,2 г соединения (15) (11%); т.пл. 133°C.

Вторую фракцию кристаллизуют из простого диэтилового эфира.

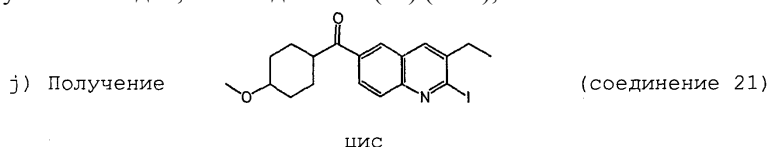
Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,3 г соединения (17) (16%); т.пл. 128°C.



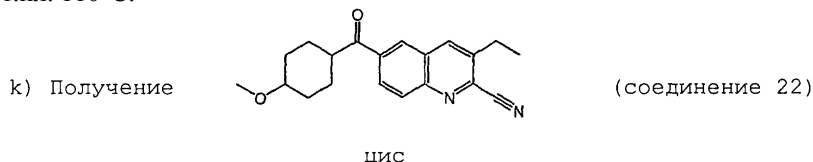
Смесь соединения (4) (0,001205 моль), 2-пропин-1-ола (0,002411 моль), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0,000121 моль) и CuI (0,000121 моль) в N,N -диэтилэтаноamine (5 мл) перемешивают при 100°C в течение 2 ч. Добавляют воду. Смесь фильтруют через целит, промывают EtOAc и экстрагируют EtOAc . Органический слой отделяют, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (0,7 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 98/2; 15-40 мкм). Очищенные фракции отбирают и выпаривают растворитель. Остаток кристаллизуют из петролейного эфира и простого диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,1 г соединения (18) (23%); т.пл. 113°C.



Смесь соединения (4) (0,006027 моль) и KF (0,024108 моль) в DMF (20 мл) перемешивают при 140°C. Выпаривают растворитель досуха. Остаток подвергают загустению в воде и простом диэтиловом эфире. Смесь экстрагируют простым диэтиловым эфиром. Органический слой отделяют, промывают простым диэтиловым эфиром, промывают насыщенным раствором NaCl , сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (1,7 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/ EtOAc 85/15; 15-40 мкм). Отбирают три фракции и выпаривают из них растворители. Первую фракцию кристаллизуют из петролейного эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,21 г соединения (19) (11%); т.пл. 92°C. Вторую фракцию кристаллизуют из петролейного эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,33 г соединения (20) (17%); т.пл. 114°C.

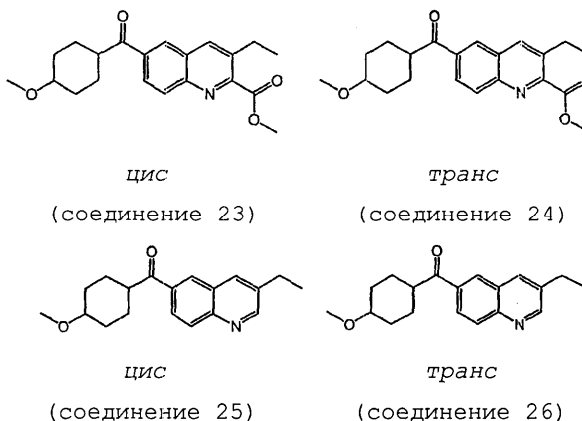


Смесь соединения (4) (0,003013 моль), ацетилхлорида (0,003315 моль) и йодида натрия (0,006027 моль) в CH_3CN (10 мл) перемешивают и кипятят с обратным холодильником в течение 1 часа. Добавляют 10%-ный K_2CO_3 . Смесь экстрагируют CH_2Cl_2 . Органический слой отделяют, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (1 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/ EtOAc 80/20; 15-40 мкм). Отбирают две фракции и выпаривают из них растворители. Первую фракцию кристаллизуют из петролейного эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,12 г соединения (21); т.пл. 110°C.



Смесь соединения (21) (0,000898 моль), триметилсиланкарбонитрила (0,001347 моль) и $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0,00009 моль) в N,N -диэтилэтаноamine (5 мл) перемешивают при 100°C в течение 2 ч. Добавляют воду. Смесь экстрагируют EtOAc . Органический слой отделяют, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (0,4 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/ EtOAc 80/20; 15-40 мкм). Очищенные фракции отбирают и выпаривают растворитель. Остаток (0,18 г, 62%) кристаллизуют из петролейного эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,13 г соединения (22) (45%); т.пл. 138°C.

1) Получение

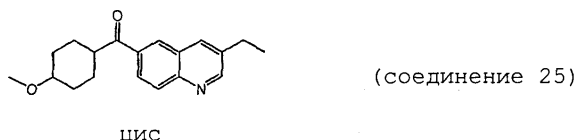


Смесь соединения (4) (0,00603 моль), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,000603 моль), PPh_3 (0,00904 моль) и K_2CO_3 (0,012054 моль) в атмосфере CO (газ) и метаноле (40 мл) перемешивают при 90°C в течение 8 ч под давлением CO 5 бар. Добавляют H_2O . Смесь экстрагируют EtOAc . Органический слой отделяют, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (6 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, от 100/0 до 98/2; 15-35 мкм). Отбирают четыре фракции (F_1 - F_4) и выпаривают растворитель. Выход: 0,13 г (цис) F_1 ; 0,02 г F_2 (цис, соединение 25); 0,055 г F_3 (транс, 3%) и 0,11 г F_4 (транс; соединение 26).

F_1 кристаллизуют из петролейного эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,03 г соединения (23) (1%); т.пл. 91°C.

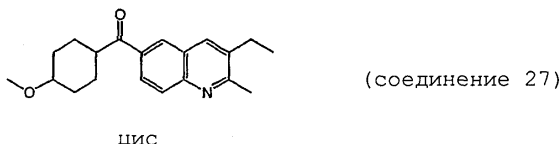
F_3 кристаллизуют из петролейного эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,035 г соединения (24) (1%); т.пл. 99°C.

m) Получение



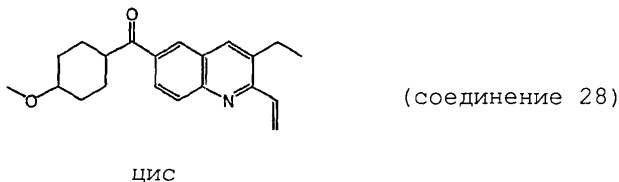
Смесь соединения (4) (0,009 моль) и Zn (0,027 моль) в уксусной кислоте (30 мл) перемешивают при 60°C в течение 4 ч, фильтруют через целит, промывают CH_2Cl_2 , упаривают досуха, растворяют в CH_2Cl_2 и промывают 10%-ным K_2CO_3 . Органический слой отделяют, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (4 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/ EtOAc 75/25; 15-40 мкм). Отбирают одну фракцию и выпаривают растворитель. Полученную фракцию (1 г, 37%) кристаллизуют из петролейного эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: соединение (25); т.пл. 88°C.

n) Получение



Смесь соединения (4) (0,001502 моль), $\text{Sn}(\text{CH}_3)_4$ (0,003004 моль) и $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0,00015 моль) в метилбензоле (5 мл) перемешивают и кипятят с обратным холодильником в течение 3 ч. Добавляют 10%-ный K_2CO_3 . Смесь экстрагируют EtOAc . Органический слой отделяют, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (0,7 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/ EtOAc , 85/15; 15-40 мкм). Отбирают две фракции (F_1 и F_2) и выпаривают из них растворители. Выход: 0,27 г (F_1 исходный продукт) и 0,14 г (F_2). F_2 кристаллизуют из пентана и петролейного эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,08 г соединения (27) (17%); т.пл. 110°C.

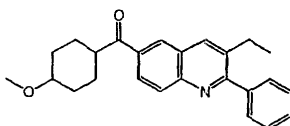
o) Получение



Смесь соединения (4) (0,001507 моль), трибутилэтиленолова (0,002260 моль) и $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0,000151 моль) в диоксане (5 мл) перемешивают при 80°C в течение 8 ч. Добавляют воду. Смесь фильтруют через целит, промывают EtOAc и экстрагируют EtOAc . Органический слой отделяют, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (0,65 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/ EtOAc , 90/10; 15-40 мкм).

Очищенные фракции отбирают и выпаривают растворитель. Остаток кристаллизуют из петролейного эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,07 г соединения (28) (14%); т.пл. 108°C.

р) Получение

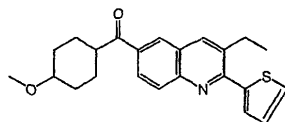


(соединение 29)

транс

Смесь соединения (5) (0,001507 моль), трифенил(фенилметил)олова (0,002260 моль) и Pd (PPh₃)₄ (0,000151 моль) в диоксане (5 мл) перемешивают при 80°C в течение 8 ч. Добавляют воду. Смесь экстрагируют EtOAc. Органический слой отделяют, сушат (MgSO₄), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (1,4 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: CH₂Cl₂/EtOAc, 96/4; 15-40 мкм). Очищенные фракции отбирают и выпаривают растворитель. Остаток (0,38 г) кристаллизуют из петролейного эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,16 г соединения (29) (28%); т.пл. 112°C.

q) Получение

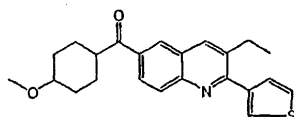


(соединение 30)

цис

Смесь соединения (4) (0,001507 моль), трибутил-2-тиенилолова (0,00226 моль) и Pd(PPh₃)₄ (0,0001507 моль) в диоксане (5 мл) перемешивают при 80°C в течение 8 ч. Добавляют 10%-ный K₂CO₃. Смесь экстрагируют EtOAc. Органический слой отделяют, сушат (MgSO₄), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (1,7 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/EtOAc, 85/15; 15-40 мкм). Очищенные фракции отбирают и выпаривают растворитель. Остаток (0,65 г) кристаллизуют из простого диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,35 г соединения (30) (61%); т.пл. 142°C.

r) Получение

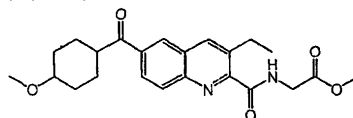


(соединение 31)

цис

Смесь соединения (4) (0,0015 моль), 3-тиенилбороновой кислоты (0,00226 моль), Pd (PPh₃)₄ (0,00015 моль) и диоксана перемешивают и кипятят с обратным холодильником в течение 24 ч. Добавляют 10%-ный K₂CO₃. Смесь экстрагируют EtOAc. Органический слой отделяют, сушат (MgSO₄), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (0,8 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/EtOAc, 80/20; 15-40 мкм). Очищенные фракции отбирают и выпаривают растворитель. Остаток (0,4 г, 70%) кристаллизуют из петролейного эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,39 г соединения (31) (68%); т.пл. 113°C.

s) Получение

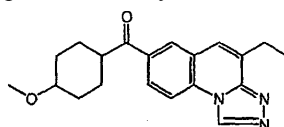


(соединение 32)

цис

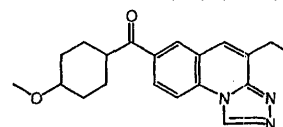
Смесь соединения (4) (0,003 моль), моногидрохлорид сложного метилового эфира глицина (0,0066 моль) и Pd(PPh₃)₄ (0,0003 моль) в Et₃N (2 мл) и толуоле (10 мл) перемешивают при 100°C под давлением CO 5 бар в течение 8 ч, фильтруют через целит, промывают CH₂Cl₂ и упаривают. Остаток (2 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/EtOAc, 80/20; 75-35 мкм). Отбирают одну фракцию и выпаривают растворитель. Полученную фракцию (1 г, 80%) кристаллизуют из простого диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,46 г соединения (32) (37%).

t) Получение



цис

(соединение 33)



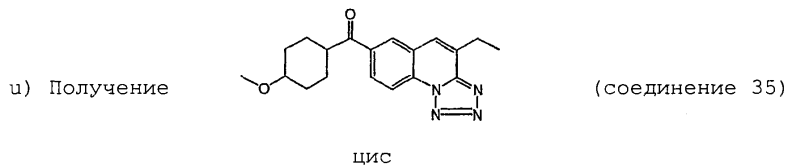
транс

(соединение 34)

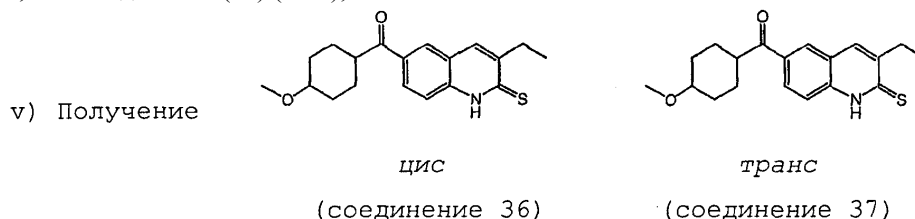
Смесь соединения (4) (0,003 моль) и гидразинкарбоксальдегида (0,0045 моль) в 1-бутаноле (15 мл) перемешивают и кипятят с обратным холодильником в течение ночи, выливают в воду и экстрагируют CH₂Cl₂. Органический слой отделяют, сушат (MgSO₄), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: CH₂Cl₂/CH₃OH/NH₄OH, 95/5/0,1; 15-40 мкм). Отбирают две фракции (F₁ и F₂) и выпаривают из них растворители. Выход: 0,3 г F₁ и 0,3 г F₂.

F₁ кристаллизуют из CH₃CN и простого диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,102 г соединения (33); т.пл. 224°C.

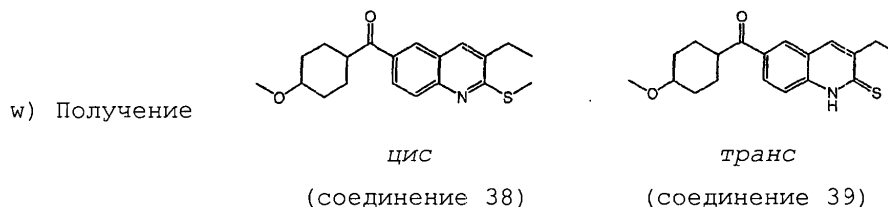
F₂ кристаллизуют из CH₃CN и простого диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,2 г соединения (34); т.пл. 185°C.



Смесь соединения 4 (0,015 моль) и NaN₃ (0,045 моль) в ДМФ (50 мл) перемешивают при 140°C в течение 2 ч. Добавляют 10%-ный K₂CO₃ и смесь экстрагируют EtOAc. Органический слой отделяют, сушат (MgSO₄), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (6 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/EtOAc, 60/40; 15-40 мкм). Отбирают первую фракцию и выпаривают растворитель. Остаток кристаллизуют из простого диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 1,26 г соединения (35) (24%); т.пл. 160°C.



Смесь соединения (4) (0,009 моль) и тиомочевины (0,0099 моль) в этиловом спирте (30 мл) перемешивают и кипятят с обратным холодильником в течение 12 ч, медленно добавляют раствор KOH (0,0149 моль) в H₂O (5 мл). Смесь перемешивают и кипятят с обратным холодильником в течение 1 ч, выливают в воду и экстрагируют CH₂Cl₂. Органический слой отделяют, сушат (MgSO₄), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле (циклогексан/EtOAc, 70/30; 15-40 мкм). Очищенные фракции отбирают и выпаривают растворитель. Выход: 1,1 г F₁₁₁₁ (37%) и 0,4 г F₂ (13%). F₁ кристаллизуют из 2-пропанона. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: соединение (36). F₂ кристаллизуют из 2-пропанона. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: соединение (37).



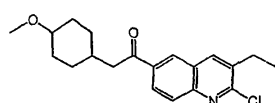
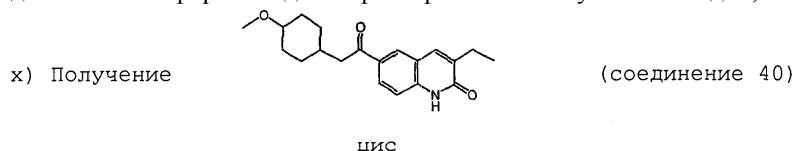
К раствору соединения (36) (0,0015 моль), соединения (37) (0,0015 моль) и K₂CO₃ (0,0034 моль) в ацетоне (15 мл) при комнатной температуре медленно добавляют CH₃I (0,0034 моль).

Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 8 ч.

Добавляют воду и смесь экстрагируют CH₂Cl₂. Органический слой отделяют, сушат (MgSO₄), фильтруют и выпаривают растворитель.

Остаток (1,2 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/EtOAc, 85/15; 15-40 мкм). Очищенные фракции отбирают и выпаривают растворитель. Выход: 0,6 г F₁ (57%) и 0,18 г F₂ (17%). F₁ кристаллизуют из простого диэтилового эфира.

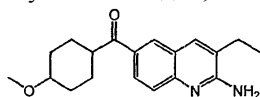
Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,28 г соединения (38) (27%). F₂ кристаллизуют из простого диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,065 г соединения (39) (6%).



Смесь соединения (41), полученного согласно примеру В3.б (0,0014 моль), в 3н. HCl (5 мл) и ТГФ (5 мл) перемешивают и кипятят с обратным холодильником в течение 2-х дней (уикэнда), затем выливают в H₂O, подщелачивают K₂CO₃ и экстрагируют CH₂Cl₂. Органический слой отделяют, сушат (MgSO₄), фильтруют и выпаривают растворитель. Выход: 0,5 г F. Полученную фракцию F кристаллизуют из 2-

пропанона. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,35 г соединения (40) (74%).

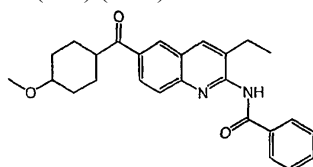
y) Получение



(соединение 188)

Смесь соединения (5) (0,045 моль), ацетамид (0,90013 моль) и K_2CO_3 (0,225 моль) перемешивают и кипятят с обратным холодильником при 200°C в течение 2 ч, охлаждают до комнатной температуры, выливают в H_2O/CH_2Cl_2 и экстрагируют CH_2Cl_2 . Органический слой отделяют, сушат ($MgSO_4$), фильтруют и досуха выпаривают растворитель. Остаток (14,4 г) кристаллизуют из CH_3OH . Осадок отфильтровывают и сушат. Фильтрат упаривают. Остаток (11,27 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: $CH_2Cl_2/CH_3OH/NH_4OH$, 96/4/0,1; 15-35 мкм). Очищенные фракции отбирают и выпаривают растворитель. Выход: 4,2 г соединения (188) (65%).

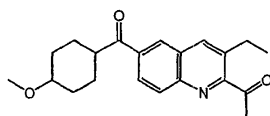
z) Получение



(соединение 248)

Смесь соединения (188) (0,00032 моль), бензойной кислоты (1,5 эквивалента, 0,00048 моль), 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил) карбодиимид·HCl (1:1) (1,5 эквив. алента, 0,00048 моль), N-гидроксibenзотриазола (1,5 эквивалента, 0,00048 моль) и Et_3N (1 эквивалент, 0,00032 моль) в CH_2Cl_2 (2мл) перемешивают при комнатной температуре в течение 15 ч. Растворитель выпаривают. Остаток очищают ВЭЖХ, фракции продукта отбирают и выпаривают растворитель. Выход: 0,066 г соединения (205) (49,50%).

aa) Получение

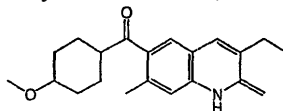


(соединение 6)

транс

Смесь промежуточного соединения 20 (0,001507 моль) в 3н. HCl (10 мл) и ТГФ (10 мл) перемешивают при комнатной температуре в течение 8 ч, подщелачивают 10%-ным K_2CO_3 и экстрагируют CH_2Cl_2 . Органический слой отделяют, сушат ($MgSO_4$), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (1,2 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/ $EtOAc$, 85/15; 15-40 мкм). Очищенные фракции отбирают и выпаривают растворитель. Остаток (0,4 г) кристаллизуют из петролейного эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,3 г соединения (6) (58%); т.пл. 108°C.

ab) Получение



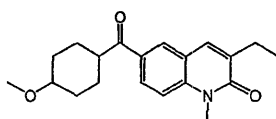
(соединение 419)

цис

Смесь соединения 213 (полученного согласно B4) (0,00305 моль) и CH_3ONa (30% в CH_3OH) (0,00916 моль) в CH_3OH (25 мл) перемешивают и кипятят с обратным холодильником в течение 15 ч, затем охлаждают до комнатной температуры, выливают в H_2O и экстрагируют $EtOAc$. Органический слой отделяют, сушат ($MgSO_4$), фильтруют и досуха выпаривают растворитель. Остаток (1,1 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/ $EtOAc$; 40/60; 15-40 мкм). Отбирают две фракции и выпаривают растворитель. Выход: 0,3 г F_1 и 0,5 г F_2 (50%). F_2 кристаллизуют из простого диэтилового эфира/петролейного эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,26 г. F_1 кристаллизуют из пентана. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,19 г. Данную фракцию очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: CH_2Cl_2/CH_3OH ; 98/2; 15-40 мкм). Очищенные фракции отбирают и выпаривают растворитель. Выход: 0,11 г. Данную фракцию очищают колоночной хроматографией на кромасиле (элюент: CH_3OH/H_2O ; 70/30). Очищенные фракции отбирают и выпаривают растворитель. Выход: 0,09 г (9%). Полученную фракцию кристаллизуют из простого диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,08 г соединения 419 (8%).

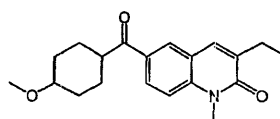
Пример B5.

Получение



цис

(соединение 42)

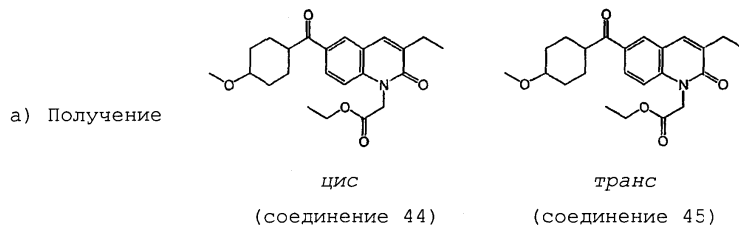


транс

(соединение 43)

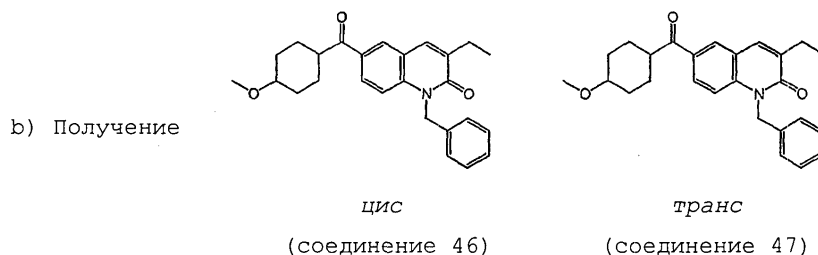
К смеси соединения (9) (0,0019 моль), соединения (8) (0,0019 моль) и *t*-BuOK (0,00456 моль) в ТГФ (30 мл) в токе N_2 при 5°C добавляют йодметан (0,00456 моль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи, выливают в H_2O и экстрагируют CH_2Cl_2 . Органический слой отделяют, сушат ($MgSO_4$), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/ $EtOAc$, 65/35; 15-40 мкм). Отбирают две фракции и выпаривают растворитель. Выход: 0,35 г соединения (42) (30%; т.пл. 125°C) и 0,35 г соединения (43) (30%; т.пл. 116°C).

Пример В6.



К смеси соединения (8) и соединения (9) (0,0089 моль) при 0°C в токе N_2 добавляют 60% NaH (0,01068 моль). Смесь перемешивают в течение 30 мин. При 0°C добавляют этилбромацетат (0,01068 моль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч, подвергают гидролизу с водой и экстрагируют $EtOAc$. Органический слой отделяют, сушат ($MgSO_4$), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/ $EtOAc$, 60/40; 15-40 мкм). Требуемые фракции (F_1 - F_4) отбирают и выпаривают растворитель. Выход: 0,11 г F_1 ; 0,13 г F_2 ; 0,75 г F_3 и 0,8 г F_4 . F_3 кристаллизуют из простого диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: соединение (44); т.пл. 152°C.

F_4 кристаллизуют из диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: соединение (45); т.пл. 147°C.



К раствору соединения (8) и соединения (9) (0,0064 моль) и 60% NaH (0,007 моль) в ДМФ (40 мл) добавляют по каплям при 0°C в токе N_2 бромметилбензол (0,007 моль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч, подвергают гидролизу с водой и экстрагируют $EtOAc$. Органический слой отделяют, промывают водой, сушат ($MgSO_4$), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/ $EtOAc$, 70/30; 15-40 мкм). Требуемые фракции (F_1 - F_4) отбирают и выпаривают растворитель. Выход: 0,15 г F_1 , 0,1 г F_2 , 0,6 г F_3 (23%) и 0,8 г F_4 .

F_3 кристаллизуют из простого диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,13 г соединения (46); т.пл. 137°C.

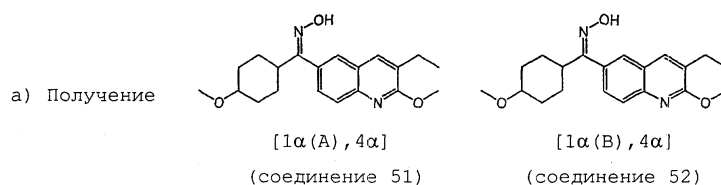
F_4 кристаллизуют из DIPE и петролейного эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: соединение (47); т.пл. 130°C.

Пример В7.

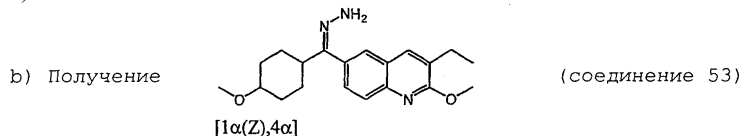
а) К раствору соединения (48) (полученного согласно примеру В2) (0,044 моль) в CH_2Cl_2 (200 мл) при 0°C добавляют 3-хлорбензолнадкарбовую кислоту (0,088 моль) и смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 12 ч. Смесь промывают 10%-ным K_2CO_3 . Органический слой сушат ($MgSO_4$), фильтруют и упаривают. Остаток перекристаллизовывают из $(C_2H_5)_2O$. Выход: 8,2 г циклогексил(3-метил-6-хиолинил)метанон-1-оксида (соединение 49) (69%).

б) К раствору соединения (49) (0,028 моль) в K_2CO_3 (400 мл) и CH_2Cl_2 (400 мл) добавляют 4-метилбензолсульфонилхлорид (0,043 моль) и перемешивают смесь при комнатной температуре в течение 1 ч. Смесь экстрагируют CH_2Cl_2 . Органический слой сушат ($MgSO_4$), фильтруют и упаривают. Остаток перекристаллизовывают из $(C_2H_5)_2O$. Выход: 6,64 г 6-(циклогексилкарбонил)-3-метил-2(1H)-хиолинон (соединение 50) (85%); т.пл. 256,1°C.

Пример В8.



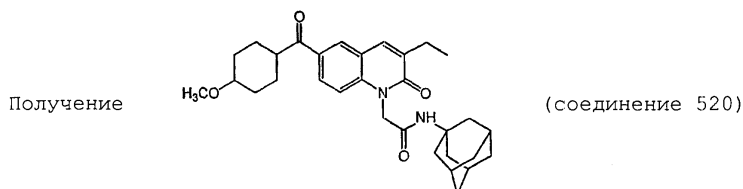
Смесь соединения (7) (0,0229 моль), гидроксилamina (0,0252 моль) и N, N-диэтилэтанамина (0,0252 моль) в этаноле (100 мл) перемешивают и кипятят с обратным холодильником в течение 6 ч, выливают в воду и экстрагируют CH_2Cl_2 . Органический слой отделяют, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток кристаллизуют из CH_3CN . Осадок отфильтровывают и сушат. Остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$, 80/20; 15-40 мкм). Отбирают две фракции и выпаривают растворитель. Выход: 2,8 г соединения (51) (36%; т.пл. 133°C) и 3 г соединения (52) (38%; т.пл. 142°C).



К раствору соединения (7) (0,015 моль) в этаноле (75 мл) добавляют при комнатной температуре гидразин (0,41 моль). Смесь перемешивают и кипятят с обратным холодильником в течение 1 ночи, выливают в воду и экстрагируют CH_2Cl_2 . Органический слой отделяют, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель.

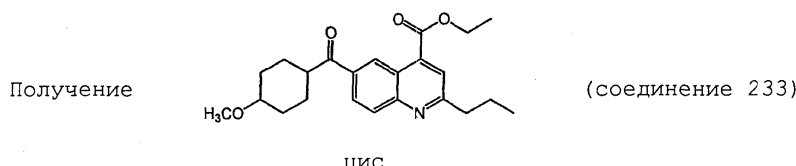
Остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH}$ 98/2/0,1). Очищенные фракции отбирают и выпаривают растворитель. Остаток кристаллизуют из простого диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,8 г соединения (53) (15%); т.пл. 110°C.

Пример B9.



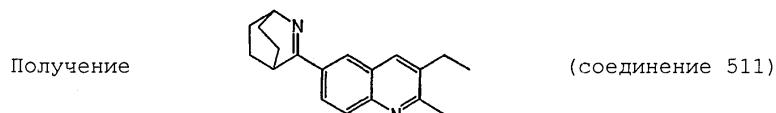
Методика для получения соединений 400, 401, 402 403, 404 и 405. Смесь промежуточного соединения 21 (полученного согласно A11) (0,000269 моль), гидрохлорида амантадина (0,000404 моль; 1,5 эквивалента), гидрохлорида N'-(этилкарбонимидоил)-N,N-диметил-1,3-пропандиамина (0,000404 моль; 1,5 эквивалента), 1-гидрокси-1H-бензотриазола (0,000404 моль; 1,5 эквивалента) и Et_3N (0,000269 моль) в CH_2Cl_2 (2 мл) перемешивают при комнатной температуре в течение 12 ч. Выпаривают растворитель. Остаток очищают ВЭЖХ. Фракции продукта отбирают и выпаривают растворитель. Выход: 0,063 г соединения 520 (46,37%).

Пример B10.



Смесь промежуточного соединения 27 (0,0026 моль) и промежуточного соединения 26 (0,0026 моль) в EtOH (380 мл) и концентр. H_2SO_4 (19 мл) перемешивают и кипятят с обратным холодильником в течение 15 ч, охлаждают до комнатной температуры, выливают в воду со льдом, подщелачивают K_2CO_3 и экстрагируют EtOAc . Органический слой отделяют, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (17,9 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: циклогексан/ EtOAc ; 80/20; 15-35 мкм). Очищенные фракции отбирают и выпаривают растворитель. Выход: 0,85 г F_1 , 1,1 г F_2 и 11,5 г F_3 . F_1 и F_2 по отдельности кристаллизуют из петролейного эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,34 г соединения 233.

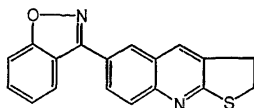
Пример B11.



Смесь соединения 22 (полученного согласно B4) (0,004 моль) в HCl (3н.) (20 мл) и ТГФ (20 мл) перемешивают и кипятят с обратным холодильником в течение 8 ч, выливают на лед, подщелачивают NH_4OH и экстрагируют CH_2Cl_2 . Органический слой отделяют, сушат (MgSO_4), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (1,2 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH}$; 93/7/0,5; 15-40 мкм). Отбирают две фракции и выпаривают растворитель. Выход: 0,5 г F_1 (41%) и 0,4 г F_2 . F_1 кристаллизуют из петролейного эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,17 г соединения 511 (14%).

Пример В12.

Получение

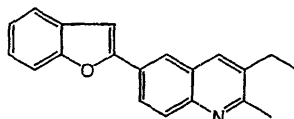


(соединение 514)

Смесь соединения 524 (полученного согласно В9а) (0,0018 моль) и 85%-ного КОН (0,0094 моль) в EtOH (15 мл) перемешивают и кипятят с обратным холодильником в течение 24 ч, выливают в H₂O и экстрагируют CH₂Cl₂. Органический слой отделяют, сушат (MgSO₄), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: CH₂Cl₂/циклогексан, 80/20; 15-40 мкм). Отбирают две фракции и выпаривают растворитель. Выход: 0,35 г F₁ (64%) и 0,17 г (SM) F₁ кристаллизуют из простого диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,33 г соединения 514 (60%) (т.пл.: 185°C).

Пример В13.

Получение

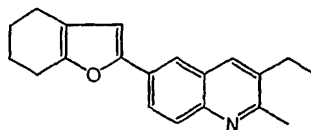


(соединение 515)

Смесь промежуточного соединения 28 (0,019 моль), 2-бензофуранилбороновой кислоты (0,028 моль), Pd(PPh₃)₄ (0,001 моль) и ВНТ (небольшое количество) в диоксане (25 мл) и Na₂CO₃ [2] (25 мл) перемешивают, кипятят с обратным холодильником в течение 8 ч и экстрагируют EtOAc. Водный слой подщелачивают NH₄OH и экстрагируют CH₂Cl₂. Органический слой отделяют, сушат (MgSO₄), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (3,6 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: CH₂Cl₂/CH₃OH, 99/1; 15-40 мкм). Очищенные фракции отбирают и выпаривают растворитель. Выход: 1,8 г (33%). Полученную фракцию кристаллизуют из 2-пропанона/диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,39 г соединения 515 (7%) (т.пл.: 134°C).

Пример В14.

Получение

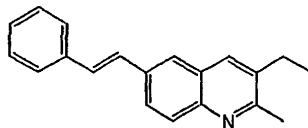


(соединение 526)

К раствору промежуточного соединения 32 (0,004 моль) в CF₃COOH (5 мл) и AcOH (10 мл) медленно добавляют при комнатной температуре триэтилсилан (0,0012 моль). По частям в токе N₂ добавляют NaBH₄ (0,0012 моль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 8 ч, выливают на лед, подщелачивают K₂CO₃ и экстрагируют CH₂Cl₂. Органический слой отделяют, сушат (MgSO₄), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (1,2 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: CH₂Cl₂/CH₃OH, 99/1; 15-40 мкм). Отбирают две фракции и выпаривают растворитель. Выход: 0,5 г F₁ (43%) и 0,4 г F₂. F₁ растворяют в iPrOH. Добавляют HCl/iPrOH (1 экв.). Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,32 г соединения 526 (т.пл.: 248°C).

Пример В15

Получение

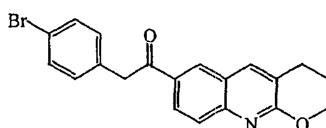


(соединение 471)

Смесь промежуточного соединения 33 (0,082 моль) и 3-хлор-2-этил-2-бутенала (0,098 моль) в AcOH (200 мл) перемешивают и кипятят с обратным холодильником в течение 8 ч. Досуха выпаривают растворитель. Остаток разжижают (растворяют) в CH₂Cl₂ и промывают 10%-ным K₂CO₃. Органический слой отделяют, сушат (MgSO₄), фильтруют и выпаривают растворитель. Остаток (27 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: CH₂Cl₂/EtOAc; от 95/5 до 92/8; 15-35 мкм). Отбирают две фракции и выпаривают растворитель. Выход: 0,7 г F₁ и 5,3 г F₂. F₁ кристаллизуют из 2-пропанона/диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 0,25 г соединения 471 (2%) (т.пл.: 140°C).

Пример В16.

Получение



(соединение 498)

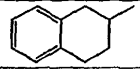
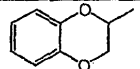
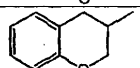
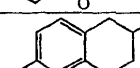
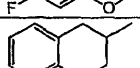
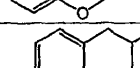
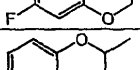
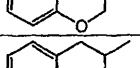
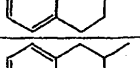
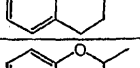
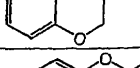
К раствору промежуточного соединения 35 (полученного согласно А17.б) (0,0379 моль) в ТГФ (200 мл) в токе N₂ добавляют по каплям n-BuLi (0,0417 моль). Смесь перемешивают в течение 30 мин. При -78°C добавляют по каплям раствор 4-бром-N-метокси-N-метилбензолацетамида (0,0568 моль) в ТГФ (100 мл). Температуру смеси поднимают при перемешивании от -78 до 0°C, смесь выливают в H₂O и экстра-

гируют EtOAc. Органический слой отделяют, сушат (MgSO_4), фильтруют и досуха выпаривают растворитель. Остаток (20,9 г) очищают колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: толуол/EtOAc, от 60/40 до 50/50; 15-35 мкм). Отбирают две фракции и выпаривают растворитель. Выход: 4 г фракции 1 и 4 г фракции 2 (28%). Фракцию 2 кристаллизуют из простого диэтилового эфира. Осадок отфильтровывают и сушат. Выход: 1 г соединения 528 (т.пл. 195°C).

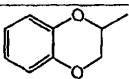
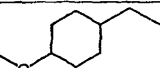
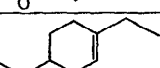
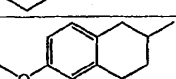
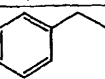
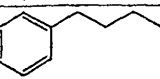
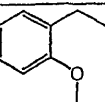
В табл. 1-8 перечислены соединения формулы (I-A) и (I-B), которые были получены согласно одному из описанных выше примеров.

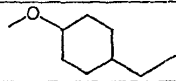
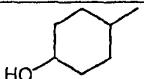
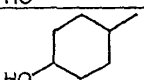
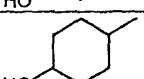
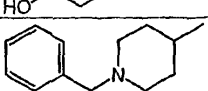
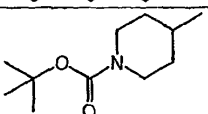
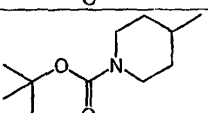
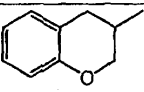
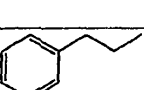
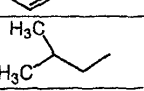
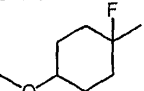
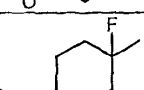
Таблица 1

№ соед.	№ пр.	R^2	R^3	R^4	R^1	физические данные
54	B2	Cl	этил	H		-
3	B3a	Cl	этил	H		т.пл. 145°C
55	B3b	Cl	этил	H		т.пл. 131°C
56	B3b	Cl	этил	H		т.пл. 104°C
57	B3b	Cl	этил	H	фенилэтил	т.пл. 100°C
58	B3b	Cl	этил	H		т.пл. 126°C
59	B3b	Cl	этил	H		т.пл. 150°C
60	B3b	Cl	этил	H		т.пл. 138°C
61	B3b	OCH_3	этил	H		-
62	B3b	OCH_3	этил	H		т.пл. 130°C
63	B3b	OCH_3	этил	H		т.пл. 116°C
64	B3b	Cl	этил	H	$-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_3$	т.пл. 82°C
65	B3b	OCH_3	этил	H	1-метилциклогексил	т.пл. 82°C
66	B3b	OCH_3	этил	H	3-метоксициклогексил	транс; т.пл. 94°C
67	B3b	OCH_3	этил	H	3-метоксициклогексил	цис; т.пл. 108°C

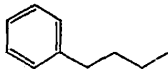
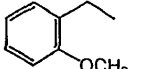
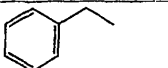
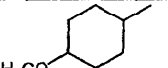
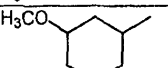
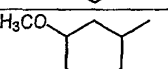
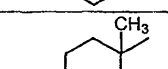
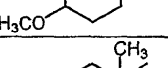
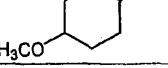
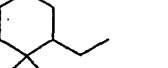
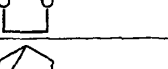
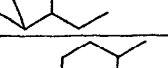
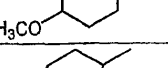
№ соед.	№ пр.	R ²	R ³	R ⁴	R ¹	физические данные
68	B3b	OCH ₃	этил	H	4-(метилэтокси)- циклогексил	(A), т.пл. 82°C
69	B3b	OCH ₃	этил	H	4-[C(CH ₃) ₃]циклогексил	цис; т.пл. 92°C
70	B3b	OCH ₃	этил	H	4-[C(CH ₃) ₃]циклогексил	транс; т.пл. 108°C
71	B3b	OCH ₃	этил	H	4-метоксициклогексил	(B), т.пл. 92°C
72	B3b	OCH ₃	этил	H	4-метоксициклогексил	(A), т.пл. 80°C
2	B2	Cl	этил	H	CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	т.пл. 82°C
73	B3b	Cl	этил	H	-CH ₂ -O-C ₂ H ₅	т.пл. 82°C
48	B2	H	метил	H	циклогексил	-
74	B4	I	этил	H		-
75	B4	I	этил	H		т.пл. 124°C
76	B4	I	этил	H		т.пл. 138°C
77	B4	I	этил	H		т.пл. 120°C
78	B4	CN	этил	H		т.пл. 128°C
79	B4	CN	этил	H		т.пл. 136°C
80	B4	CN	этил	H		т.пл. 120°C
81	B4	CN	этил	H		т.пл. 139°C
82	B4	метил	этил	H		т.пл. 106°C
83	B4	метил	этил	H		т.пл. 149°C
84	B4	метил	этил	H		т.пл. 118°C

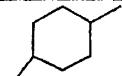
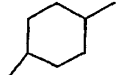
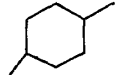
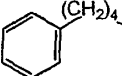
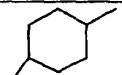
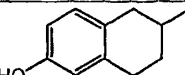
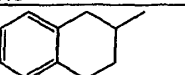
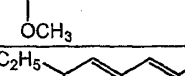
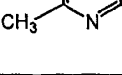
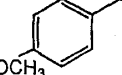
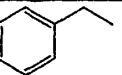
№ соед.	№ пр.	R ²	R ³	R ⁴	R ¹	физические данные
85	B4	метил	этил	H		т.пл. 180°C
86	B4	метил	этил	H	фенилэтил	т.пл. 53°C
87	B4	метил	этил	H		т.пл. 87°C
88	B4	метил	этил	H	-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	т.пл. 68°C
89	B4	метил	этил	H		т.пл. 120°C
31	B4	3-тиазолил	этил	H	4-метоксициклогексил	цис; 113°C
90	B3b	OCH ₃	H	H	4-метоксициклогексил	транс. т.пл. 126°C
91	B3b	OCH ₃	H	H	4-метоксициклогексил	цис; т.пл. 100°C
92	B3b	OCH ₃	H	CH ₃	4-метоксициклогексил	цис; т.пл. 120°C
93	B3b	OCH ₃	H	CH ₃	4-метоксициклогексил	транс; т.пл. 111°C
94	B3b	OCH ₃	метил	H	4-метоксициклогексил	цис; т.пл. 96°C
95	B3b	OCH ₃	фенил	H	4-метоксициклогексил	цис; HCl (1:1), т.пл. 138°C
96	B3b	OCH ₃	пропил	H	4-метоксициклогексил	транс; т.пл. 118°C
97	B3b	OCH ₃	пропил	H	4-метоксициклогексил	цис; т.пл. 108°C
98	B3b	OCH ₃	метил	H	4-метоксициклогексил	цис; т.пл. 104°C
99	B4	N(CH ₃) ₂	этил	H		(B); т.пл. 102°C
100	B3b	Cl	этил	H		т.пл. 114°C
101	B4	метил	этил	H	4-бутоксциклогексил	цис; т.пл. 86°C
102	B3b	Cl	этил	H		т.пл. 78°C

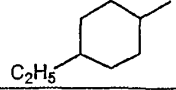
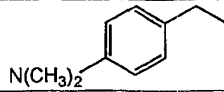
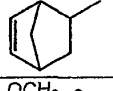
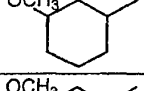
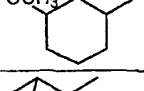
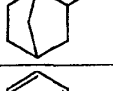
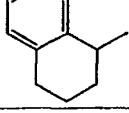
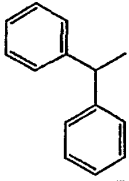
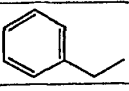
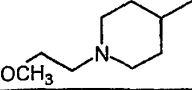
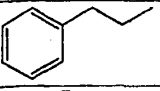
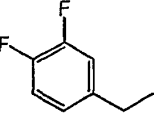
№ соед.	№ пр.	R ²	R ³	R ⁴	R ¹	физические данные
103	B3b	Cl	этил	H		т.пл. 91°C
104	B4	N(CH ₃) ₂	этил	H		т.пл. 103°C
105	B4	N(CH ₃) ₂	этил	H		т.пл. 170°C
106	B3b	Cl	этил	H		т.пл. 137°C
107	B3b	Cl	этил	H		т.пл. 137°C
108	B4	метил	этил	ethyl	4-метоксициклогексил	цис; т.пл. 91°C
109	B4	метил	этил	H	4-этоксциклогексил	транс; т.пл. 150°C
110	B4	метил	этил	H		т.пл. 90°C
111	B4	метил	этил	H		т.пл. 94°C
112	B4	метил	этил	H		т.пл. 176°C
113	B4	метил	этил	H		т.пл. 106°C
114	B4	пропил	H	H	4-метоксициклогексил	цис; т.пл. 74°C
115	B4	метил	этил	H	4-этоксциклогексил	цис; т.пл. 108°C
116	B4	метил	этил	H		т.пл. 110°C
117	B3b	Cl	этил	H		т.пл. 124°C
118	B3b	Cl	этил	H		т.пл. 107°C
119	B3b	Cl	этил	H		т.пл. 129°C

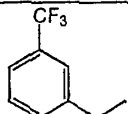
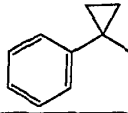
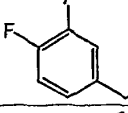
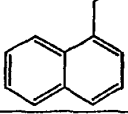
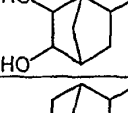
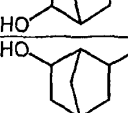
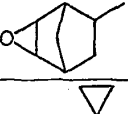
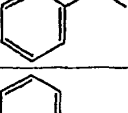
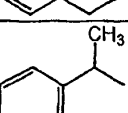
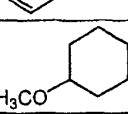
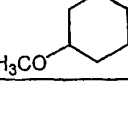
№ соед.	№ пр.	R ²	R ³	R ⁴	R ¹	физические данные
120	B4	метил	этил	H		т.пл. 106°C
41	B3b	Cl	этил	H		транс; т.пл. 157°C
182	B3b	метил	этил	H		цис; т.пл. 170°C
183	B3b	метил	этил	H		транс; т.пл. 144°C
184	B3b	метил	этил	H		т.пл. 138°C
185	B3b	Cl	этил	H		т.пл. 120°C
186	B3b	Cl	этил	H		
187	B3b	метил	этил	H		т.пл. 162°C
216	B4	CC≡N	этил	H		т.пл. 160°C
217	B4	метил	этил	H		этандиоат (1:1); т.пл. :143°C
218	B4	I	этил	H		т.пл. :102°C
219	B4	CC≡N	этил	H		т.пл. :115°C
220	B4	Cl	этил	H		(A); т.пл. :107°C
221	B4	Cl	этил	H		(B); т.пл. :113°C

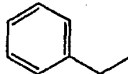
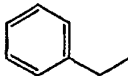
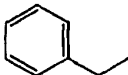
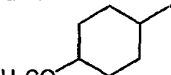
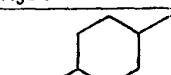
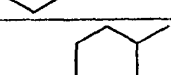
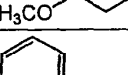
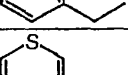
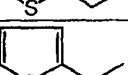
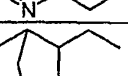
№ соед	№ пр.	R ²	R ³	R ⁴	R ¹	физические данные
222	B4	I	этил	H		т.пл. :206°C
223	B4	Cl	этил	H		(транс); т.пл. :117°C
224	B4	метил	этил	H		(A); т.пл. :103°C
225	B2	Cl	этил	H		т.пл. :94°C
226	B3b	Cl	этил	H		(транс); т.пл. :157°C
227	B3c	метокси		H		т.пл. :204°C
228	B4	Cl	этил	H		(A); т.пл. :136°C
229	B3b	н-пропил	H	H		(транс); HCl (1:1); т.пл. :150°C
230	B3b	Cl	этил	H		т.пл. :116°C
231	B3b	Cl	этил	H		т.пл. :120°C
232	B3b	Cl	этил	H		т.пл. 112°C
233	B10	изо-пропил	H	C(=O)O- C ₂ H ₅		(цис); т.пл. :91°C
234	B4	метил	этил	H		т.пл. :122°C

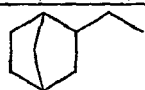
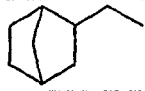
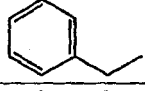
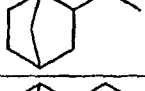
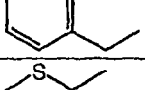
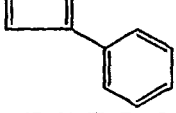
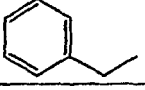
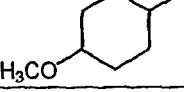
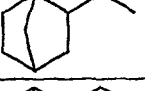
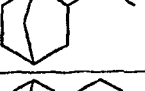
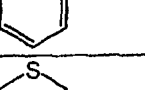
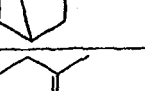
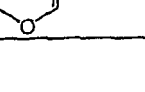
№ соед.	№ пр.	R ²	R ³	R ⁴	R ¹	Физические данные
235	B4	метил	этил	H		т.пл. :106°C
236	B4	метил	этил	H		т.пл. :104°C
237	B4	метил	этил	H		т.пл. :90°C
238	B4	метил	H	H		(цис); т.пл. :80°C
239	B3b	Cl	этил	H		(транс); т.пл. :126°C
240	B3b	Cl	этил	H		(цис); т.пл. :128°C
241	B4	метил	этил	H		(A); т.пл. :90°C
242	B4	метил	этил	H		(B); т.пл. :110°C
243	B3b	Cl	этил	H		т.пл. :134°C
244	B3b	Cl	этил	H		т.пл. :127°C
245	B4	NHC(=O)NH ₂	этил	H		(цис); т.пл. :176°C
246	B4	метил	этил	H		(B)
247	B3b	Cl	этил	H		т.пл. :92°C
248	B4	метил	этил	H		(A); т.пл. :80°C

№ соед.	№ пр.	R ²	R ³	R ⁴	R ¹	физические данные
249	B3b	Cl	этил	H		(B); т.пл. :138°C
250	B4	метил	этил	H	 О-н-пропил	(транс); т.пл. :118°C
251	B4	метил	этил	H		(B);,HCl(1:1)
252	B3b	Cl	этил	H	 изо-пропил	(A)
253	B3b	Cl	этил	H	 изо-пропил	(B)
254	B3b	метил	этил	H		т.пл. :74°C
255	B4	метил	этил	H	 О-н-пропил	(цис); т.пл. :68°C
256	B4	метил	этил	H		т.пл. :210°C
257	B4	метил	этил	H		т.пл. :113°C
258	B4	метил	этил	H		т.пл. :92°C
259	B3b	метил	этил	H		т.пл. :115°C
260	B3b	метил	этил	H		т.пл. :60°C
261	B3b	Cl	этил	H		(A); т.пл. :86°C

№ соед.	№ пр.	R ²	R ³	R ⁴	R ¹	физические данные
262	B3b	Cl	этил	H		(B); т.пл. :101°C
263	B3b	метил	этил	H		т.пл. :130°C
264	B3b	Cl	этил	H		(A); т.пл. :124°C
265	B3b	Cl	этил	H		(B); т.пл. :126°C
266	B4	N(CH ₃) ₂	этил	H		(транс); т.пл. :102°C
267	B4	N(CH ₃) ₂	этил	H		(цис);HCl(1:1); т.пл. :170°C
268	B4	метил	этил	H		(A);HCl(1:1); т.пл. :206°C
269	B4	метил	этил	H		т.пл. :104°C
270	B3b	метил	этил	H		т.пл. :117°C
271	B4	NHC ₂ H ₅ OCH ₃	этил	H		-
272	B4	метил	этил	H		-
273	B4	NH ₂	этил	H		-
274	B3b	Cl	этил	H		-

№ соед.	№ пр.	R ²	R ³	R ⁴	R ¹	физические данные
275	B3b	Cl	этил	H		т.пл.:99°C
276	B3b	Cl	этил	H		т.пл.:95°C
277	B4	метил	этил	H		т.пл.:105°C
278	B3b	Cl	этил	H		т.пл.:141°C
279	B4	Cl	этил	H		т.пл.:168°C
280	B4	Cl	этил	H		-
281	B4	Cl	этил	H		т.пл.:140°C
282	B4	Cl	этил	H		т.пл.:169°C
283	B4	метил	этил	H		т.пл.:96°C
284	B3b	Cl	CH ₂ N(CH ₃) ₂	H		т.пл.:115°C
285	B4	метил	этил	H		т.пл.:133°C
286	B4	метил	CH ₂ OCH ₃	H		(транс); т.пл.:106°C
287	B4	метил	CH ₂ N(CH ₃) ₂	H		(цис); т.пл.:110°C

№ соед.	№ пр.	R ²	R ³	R ⁴	R ¹	физические данные
288	B3b	Cl	н-пропил	H		т.пл. :110°C
289	B4	NH ₂	этил	H		т.пл. :218°C
290	B4	метил	н-пропил	H		т.пл. :90°C
291	B3b	Cl	н-пропил	H		(цис); т.пл. :128°C
292	B3b	Cl	н-пропил	H		(транс); т.пл. :104°C
293	B3b	Cl	этил	H		т.пл. :106°C
294	B4	метил	н-пропил	H		(цис); т.пл. :94°C
295	B4	метил	CH ₂ N(CH ₃) ₂	H		т.пл. :83°C
296	B3b	Cl	этил	H		т.пл. :99°C
297	B3b	Cl	этил	H		т.пл. :110°C
298	B4	метил	этил	H		т.пл. :93°C
299	B4	метил	этил	H		т.пл. :105°C
300	B4	метил	этил	H		т.пл. :114°C
301	B3b	метил	этил	H		т.пл. :143°C
302	B4	метокси	этил	H		т.пл. :93°C
303	B4	метил	этил	H		т.пл. :82°C

№ соед.	№ пр.	R ²	R ³	R ⁴	R ¹	физические данные
304	B4	н-бутил	этил	H		-
305	B3b	Cl	н-пропил	H		т.пл.:125°C
306	B1	метил	C(=O)OC ₂ H ₅	H		т.пл.:136°C
307	B4	метил	н-пропил	H		т.пл.:81°C
308	B4	метокси	н-пропил	H		т.пл.:80°C
309	B4	I	н-пропил	H		т.пл.:120°C
310	B3d	метил	этил	H		HCl(1:1); т.пл.:129°C
311	B3b	Cl	H	H		т.пл.:160°C
312	B3b	Cl	H	H		(транс); т.пл.:145°C
313	B3b	Cl	H	H		т.пл.:103°C
314	B4	н-пропил	н-пропил	H		HCl(1:1); т.пл.:150°C
315	B4	н-пропил	этил	H		HCl(1:1)
316	B4	н-пропил	H	H		HCl(1:1); т.пл.:140°C
317	B3b	Cl	H	H		т.пл.:168°C
318	B4	метил	н-пропил	H		HCl(1:1); т.пл.:200°C
509	B3b	Cl	этил	H		-

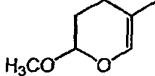
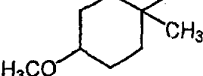
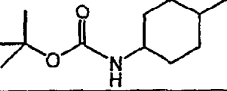
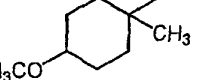
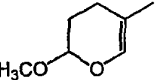
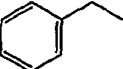
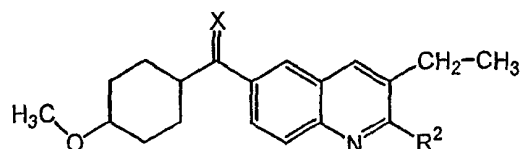
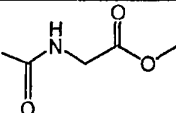
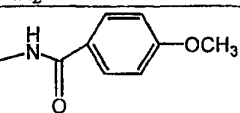
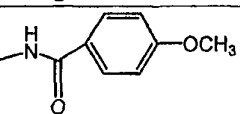
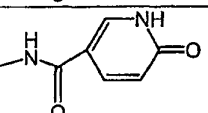
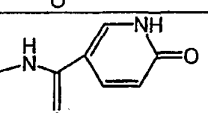
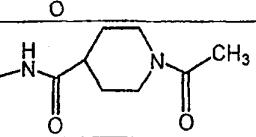
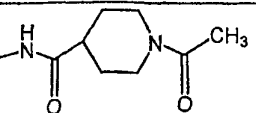
№ соед.	№ пр.	R ²	R ³	R ⁴	R ¹	физические данные
510	B4	метил	этил	H		H ₂ O(1:1)
513	B4	метил	этил	H		-
516	B4	Cl	этил	H		т.пл. :120°C
517	B4	I	этил	H	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-
518	B4	Cl	этил	H		-
519	B4	Cl	этил	H		(A+B)
521	B4	I	этил	H		-
522	B4	метил	этил	H		(A)
1	B4	метил	этил	H		(A)
525	B4	Cl	этил	H		
527	B4	F	этил	H		т.пл. : 116°C

Таблица 2



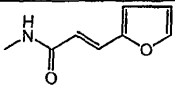
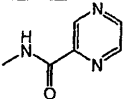
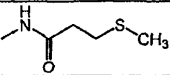
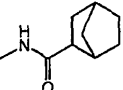
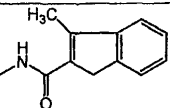
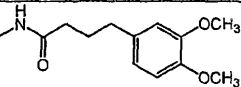
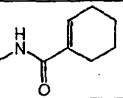
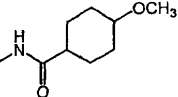
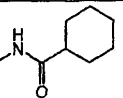
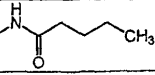
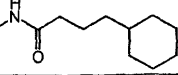
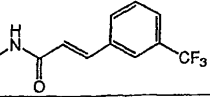
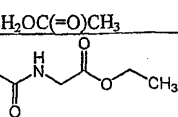
№ соед.	№ пр.	R ²	X	физические данные
5	B3b	Cl	O	транс; т.пл. 120°C
121	B3b	1-пиперидинил	O	цис; HCl (1:1)
122	B3b	1-пиперидинил	O	транс; HCl (1:1); т.пл. 128°C

№ соед.	№ пр.	R ²	X	физические данные
123	B3b	4-тиоморфолинил	O	цис; т.пл. 105°C
124	B3b	4-тиоморфолинил	O	транс; т.пл. 115°C
125	B3b	4-морфолинил	O	транс; т.пл. 118°C
126	B3b	4-morpholinyl	O	цис; т.пл. 118°C
127	B3b	-N(CH ₃) ₂	O	транс; т.пл. 96°C
128	B3b	-N(CH ₃) ₂	O	цис; т.пл. 114°C
4	B3b	Cl	O	цис; т.пл. 123°C
8	B3c	OCH ₃	O	транс; т.пл. 68°C
7	B3c	OCH ₃	O	цис; т.пл. 116°C
6	B4	acetyl	O	транс; т.пл. 108°C
129	B4	acetyl	O	цис; т.пл. 106°C
11	B4	NH-(CH ₂) ₂ -OCH ₃	O	транс; т.пл. 107°C
10	B4	NH-(CH ₂) ₂ -OCH ₃	O	цис; т.пл. 115°C
12	B4	NH-(CH ₂) ₂ -SCH ₃	O	цис; т.пл. 120°C
13	B4	NH-(CH ₂) ₂ -SCH ₃	O	транс; т.пл. 125°C
14	B4	-C≡C-Si(CH ₃) ₃	O	цис; т.пл. 114°C
16	B4	-C≡C-Si(CH ₃) ₃	O	транс; т.пл. 108°C
15	B4	-C≡CH	O	цис; т.пл. 132-133°C
17	B4	-C≡CH	O	транс; т.пл. 128°C
18	B4	-C≡C-CH ₂ OH	O	цис; т.пл. 113°C
130	B4	-C≡C-CH ₂ OH	O	транс; т.пл. 108°C
19	B4	F	O	цис; т.пл. 92-99°C
20	B4	F	O	транс; т.пл. 114°C
21	B4	I	O	цис; т.пл. 110°C
22	B4	CN	O	цис; т.пл. 137-138°C
26	B4	H	O	транс
23	B4	-C(=O)-OCH ₃	O	цис; т.пл. 91°C
24	B4	-C(=O)-OCH ₃	O	транс; т.пл. 99°C
25	B4	H	O	цис; т.пл. 88°C
27	B4	метил	O	цис; т.пл. 110-112°C
131	B4	метил	O	транс; т.пл. 25°C
28	B4	этинил	O	цис; т.пл. 108°C
132	B4	этинил	O	транс; т.пл. 103°C
29	B4	фенил	O	транс; т.пл. 112°C

№ соед.	№ пр.	R ²	X	физические данные
30	B4	2- тиенил	O	цис; 142°C
133	B4	2- тиазолил	O	цис; 108°C
134	B4	2- фуранил	O	цис; т.пл. 105°C
51	B8a	OCH ₃	N-OH	[1α(A),4α]; т.пл. 133°C
52	B8a	OCH ₃	N-OH	[1α(B),4α]; т.пл. 142°C
53	B8b	OCH ₃	NNH ₂	[1α(Z),4α]; т.пл. 110°C
135	B4	NH ₂	O	цис; т.пл. 203°C
136	B4	NH ₂	O	транс; т.пл. 202°C
137	B4	-C(=O)-OCH(CH ₃) ₂	O	цис; т.пл. 105°C
138	B4	-C(=O)-OCH(CH ₃) ₂	O	транс; т.пл. 88°C
38	B4	SCH ₃	O	цис; т.пл. 124°C
39	B4	SCH ₃	O	транс; т.пл. 116°C
32	B4		O	цис; т.пл. 130°C
139	B4	ethyl	O	цис; т.пл. 180°C
188	B4	NH ₂	O	цис+транс
189	B4		O	цис; т.пл. 154°C
190	B4		O	транс; т.пл. 156°C
191	B4		O	цис; т.пл. >260°C
192	B4		O	.H2O (1:1); транс; т.пл. 248°C
193	B4		O	цис; т.пл. 224°C
194	B4		O	транс; т.пл. 234°C

№ соед.	№ пр.	R ²	X	физические данные
195	B4		O	цис; т.пл. 108°C
196	B4		O	транс; т.пл. 127°C
197	B4		O	цис; т.пл. 150°C
198	B4		O	транс; т.пл. 90°C
199	B4		O	LC/MS [M+H] ⁺ ; 475.4
200	B4		O	LC/MS [M+H] ⁺ ; 464.3
201	B4		O	LC/MS [M+H] ⁺ ; 523.3
202	B4		O	LC/MS [M+H] ⁺ ; 465.3
203	B4		O	LC/MS [M+H] ⁺ ; 475.4
204	B4		O	LC/MS [M+H] ⁺ ; 465.3
205	B4		O	-
319	B4		O	(цис); этандиолат (1:1); т.пл. :160°C
320	B4		O	цис; т.пл. :150°C
321	B4	метокси	CH ₂	цис; .HCl(1:1); т.пл.:118°C
322	B4	n-бутил	O	цис; .HCl(1:1); т.пл.:158°C

№ соед.	№ пр.	R ²	X	физические данные
323	B4		O	-
324	B4		O	-
325	B4		O	-
326	B4		O	-
327	B4		O	-
328	B4		O	-
329	B4		O	-
330	B4		O	-
331	B4		O	-
332	B4		O	-
333	B4		O	-
334	B4		O	-
335	B4		O	-

№ соед.	№ пр.	R ²	X	физические данные
336	B4		O	-
337	B4		O	-
338	B4		O	-
339	B4		O	-
340	B4		O	-
341	B4		O	-
342	B4		O	-
343	B4		O	-
344	B4		O	-
345	B4		O	-
346	B4		O	-
347	B4		O	-
348	B4	CH ₂ OC(=O)CH ₃	O	(цис); т.пл. :74°C
349	B4		O	-

№ соед.	№ пр.	R ²	X	физические данные
350	B4		O	-
351	B4		O	-
352	B4		O	-
353	B4		O	(A); HCl(1:2).H2O(1:1); т.пл.: 166°C
354	B4		O	(цис);
355	B4		O	-
356	B4		O	-
357	B4		O	-
358	B4		O	-
359	B4		O	-
360	B4		O	-
361	B4		O	-
362	B4		O	-
363	B4		O	-

№ соед.	№ пр.	R ²	X	физические данные
364	B4		O	-
365	B4		O	-
366	B4		O	-
367	B4		O	-
368	B4		O	-
369	B4		O	-
370	B4		O	-
371	B4		O	-
372	B4		O	-
373	B4		O	-
374	B4		O	-
375	B4		O	-

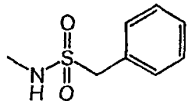
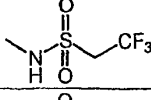
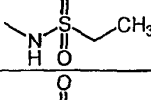
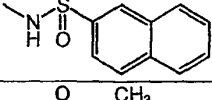
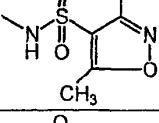
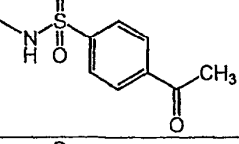
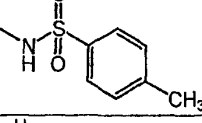
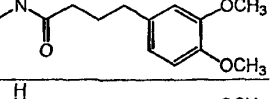
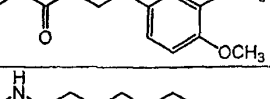
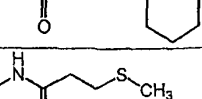
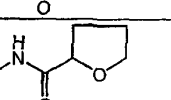
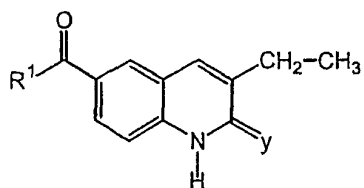
№ соед.	№ пр.	R ²	X	физические данные.
376	B4		O	-
377	B4		O	-
378	B4		O	-
379	B4		O	-
380	B4		O	-
381	B4		O	-
382	B4		O	-
383	B4		O	(цис); т.пл.:148°C
384	B4		O	(транс); т.пл.:141°C
385	B4		O	т.пл.:130°C
386	B4		O	(цис); т.пл.:140°C
387	B4		O	(транс); т.пл.:155°C

Таблица 3



№ соед.	№ гр.	Y	R¹	физические данные
140	B4	O		т.пл. 220°C
141	B4	O		т.пл. 213°C
142	B4	O		т.пл. 148°C
143	B4	O	1-метилциклогексил	т.пл. 195-210°C
144	B4	O	3-метоксициклогексил	(цис); т.пл. 156°C
145	B4	O	3-метоксициклогексил	(транс); т.пл. 156-163°C
146	B4	O	4-(диметилэтил)циклогексил	т.пл. 230°C
147	B4	O	4-(диметилэтил)циклогексил	т.пл. 186°C
148	B4	O	4-метилциклогексил	(транс); т.пл. 214°C
36	B4	S	4-метоксициклогексил	(цис); т.пл. 224°C
37	B4	S	4-метоксициклогексил	(транс); т.пл. 220°C
149	B4	O		т.пл. 188°C
40	B4	O		т.пл. 192°C
150	B4	O		(цис); т.пл. 226°C
151	B4	O		(транс); т.пл. 226°C
152	B4	O		т.пл. 213°C
153	B4	O		т.пл. 200°C

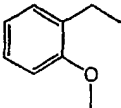
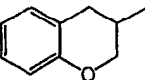
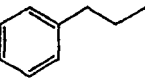
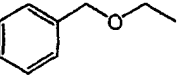
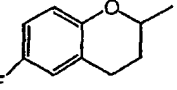
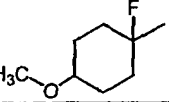
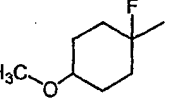
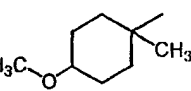
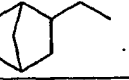
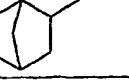
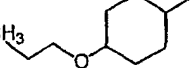
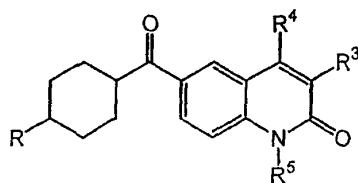
№ соед.	№ пр.	Y.	R ¹	физические данные
154	B4	O		т.пл. 210°C
155	B4	O	4,4-диметилциклогексил	т.пл. 242°C
388	B4	O	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	т.пл. 189°C
389	B4	O		т.пл. 228°C
390	B4	O		т.пл. 197°C
391	B4	O		т.пл. 145°C
392	B4	O		т.пл. 192°C
393	B4	O		(B); т.пл.: 224°C
394	B4	O		(A); т.пл.: 201°C
395	B4	O		(A); т.пл.: 207°C
396	B4	O		т.пл.: 212°C
397	B4	O		(B); т.пл.: 238°C
398	B4	O		т.пл.: 234°C
399	B4	O		(цис); т.пл.: 192°C

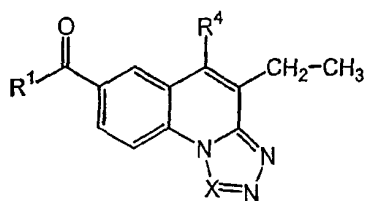
Таблица 4



№ соед.	№ пр.	R ³	R ⁴	R ⁵	R	физические данные
156	B4	этил	H	H	OCH ₃	транс; т.пл. 252°C
157	B4	H	H	H	OCH ₃	(цис+транс); т.пл. 244°C
158	B4	H	метил	H	OCH ₃	цис; т.пл. >260°C
159	B4	метил	H	H	OCH ₃	цис; т.пл. 254°C
160	B4	метил	H	H	OCH ₃	транс; т.пл. >260°C
161	B4	пропил	H	H	OCH ₃	т.пл. 208°C
162	B4	пропил	H	H	OCH ₃	транс; т.пл. 232°C
9	B4	этил	H	H	OCH ₃	цис; т.пл. 224-226°C
43	B5	этил	H	CH ₃	OCH ₃	транс; т.пл. 116°C
42	B5	этил	H	CH ₃	OCH ₃	цис; т.пл. 125°C
44	B6	этил	H	CH ₂ -COOC ₂ H ₅	OCH ₃	цис; т.пл. 152°C
45	B4	этил	H	CH ₂ -COOC ₂ H ₅	OCH ₃	транс; т.пл. 147°C
46	B4	этил	H	бензил	OCH ₃	цис; т.пл. 137°C
47	B4	этил	H	бензил	OCH ₃	транс; т.пл. 130°C
50	B7	метил	H	H	H	т.пл. 256.1°C
163	B4	этил	этил	H	OCH ₃	цис; т.пл. 221°C
164	B4	этил	этил	H	OCH ₃	цис; т.пл. 221°C
165	B4	этил	этил	H	OCH ₃	транс; т.пл. 215°C
166	B4	этил	H		OCH ₃	LC/MS [M+H] ⁺ ; 429.4
167	B4	этил	H		OCH ₃	LC/MS [M+H] ⁺ ; 451.3
168	B4	H	H	H	OCH ₃	цис; т.пл. 106°C
169	B4	этил	H		OCH ₃	LC/MS [M+H] ⁺ ; 409.3

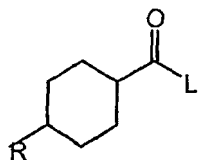
№ соед.	№ пр.	R ³	R ⁴	R ⁵	R	физические данные
400	B9	этил	H		OCH ₃	-
401	B9	этил	H		OCH ₃	-
402	B9	этил	H		OCH ₃	-
403	B9	этил	H		OCH ₃	-
404	B9	этил	H		OCH ₃	-
405	B9	этил	H		OCH ₃	-
406	B4	этил	H		OCH ₃	-
407	B4	этил	H		OCH ₃	-
408	B4	этил	H		OCH ₃	-
409	B3b		H	H	OCH ₃	т.пл.: 168°C
410	B4	CH ₂ OCH ₃	H	H	OCH ₃	т.пл.: 194°C
508	B4	этил	H		OCH ₃	-
520	B9	этил	H		OCH ₃	-

Таблица 5

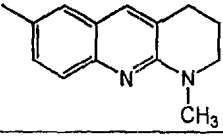
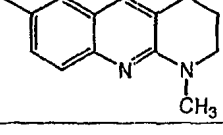
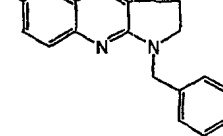
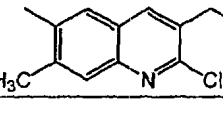
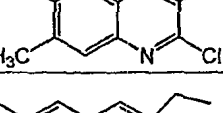
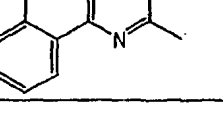
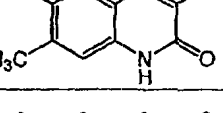
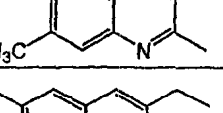
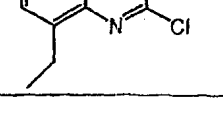
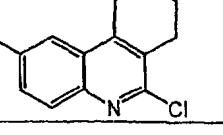
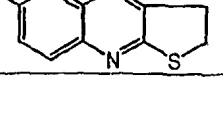


№ соед.	№ пр.	R ⁴	R ¹	X	физические данные
33	B4	H	метоксициклогексил	CH	цис; т.пл. 224°C
34	B4	H	метоксициклогексил	CH	транс; т.пл. 185°C
35	B4	H	метоксициклогексил	N	цис; т.пл. 160-172°C
170	B4	H	метоксициклогексил	N	транс; т.пл. 146°C
171	B4	H		N	(B); т.пл. 165°C
172	B4	H	метилциклогексил	N	цис+транс; т.пл. 143°C
173	B4	этил	метоксициклогексил	N	цис; т.пл. 126°C
411	B4	H		N	т.пл.: 109°C
412	B4	H		N	т.пл.: 180°C
413	B4	H		N	(A)
414	B4	H		N	т.пл.: 156°C

Таблица 6



№ соед.	№ пр.	R	L	физические данные
49	B7	H		-
174	B3b	OCH ₃		цис; т.пл. 115°C
175	B3b	OCH ₃		транс; т.пл. 141°C
176	B3b	OCH ₃		цис; т.пл. 149°C
177	B3b	OCH ₃		т.пл. 126°C
178	B3b	OCH ₃		транс; т.пл. 160°C
179	B3b	OCH ₃		цис; т.пл. 119°C
180	B3b	OCH ₃		транс; т.пл. 124°C
181	B3b	OCH ₃		транс; т.пл. 92°C
206	B3b	OCH ₃		цис; т.пл. 144°C

№ соед.	№ гр.	R	L	физические данные
207	B3b	OCH ₃		транс; т.пл. 125°C
208	B3b	OCH ₃		цис; т.пл. 127°C
209	B3b	OCH ₃		цис; т.пл. 101°C
210	B3b	OCH ₃		цис; т.пл. 104°C
211	B3b	OCH ₃		транс; т.пл. 134°C
212	B4	OCH ₃		цис; т.пл. 141°C
213	B4	OCH ₃		транс; т.пл. 215°C
214	B4	OCH ₃		цис; т.пл. 139°C
215	B3b	OCH ₃		транс
415	B3b	OCH ₃		(цис); т.пл. :136°C
416	B3b	OCH ₃		(цис)

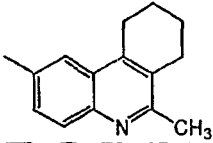
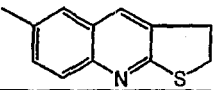
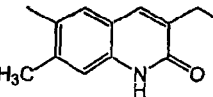
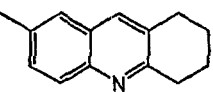
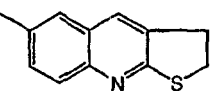
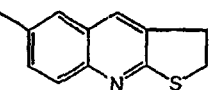
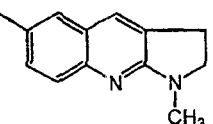
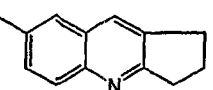
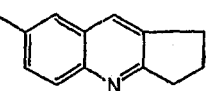
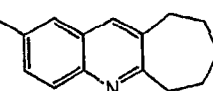
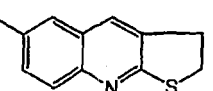
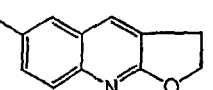
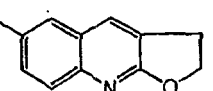
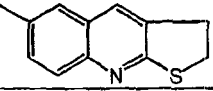
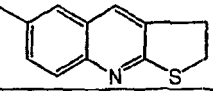
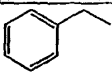
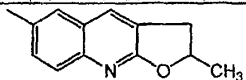
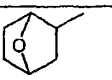
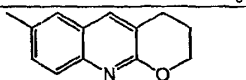
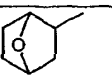
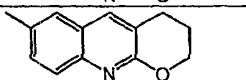
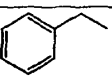
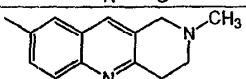
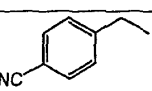
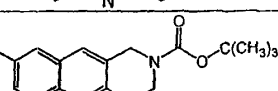
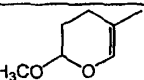
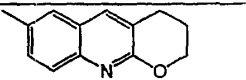
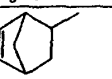
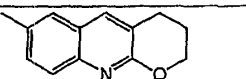
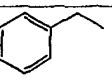
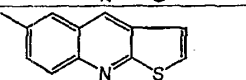
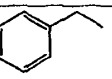
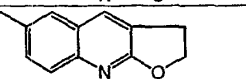
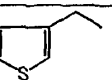
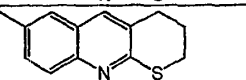
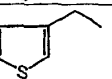
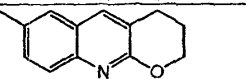
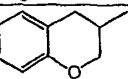
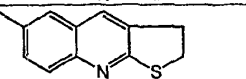
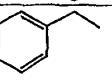
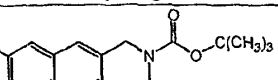
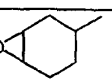
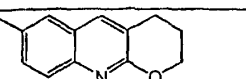
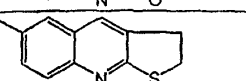
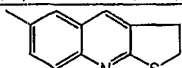
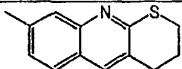
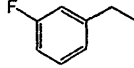
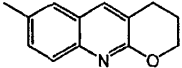
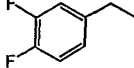
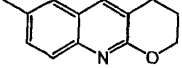
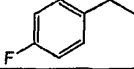
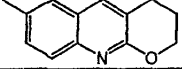
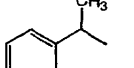
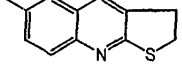
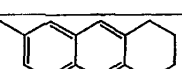
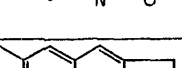
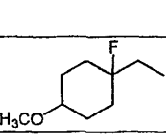
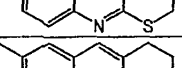
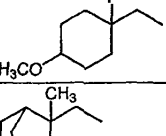
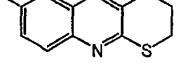
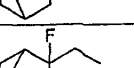
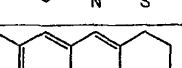
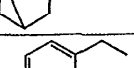
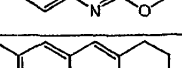
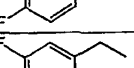
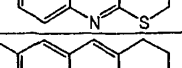
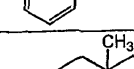
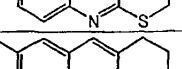
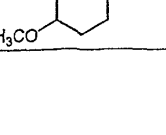
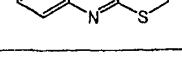
№ соед.	№ пр.	R	L	физические данные
417	B4	OCH ₃		(цис); т.пл.:149°C
418	B3b	OCH ₃		(транс); т.пл.:132°C
419	B4	OCH ₃		(цис); т.пл.:217°C
420	B3b	OCH ₃		(цис); .HCl(1:1); т.пл.:200°C
421	B4	OH		(цис); т.пл.:215°C
422	B4	OH		(транс); т.пл.:178°C
423	B3b	OCH ₃		т.пл.:160°C
424	B3b	OCH ₃		(цис); т.пл.:106°C
425	B3b	OCH ₃		(транс); т.пл.:120°C
426	B3b	OCH ₃		(цис); т.пл.:121°C
427	B3b	H		т.пл.:156°C
428	B3b	OCH ₃		(цис); т.пл.:156°C
429	B3b	OCH ₃		(транс); т.пл.:197°C
№ соед.	№ пр.	R	L	физические данные
430	B3b	CH ₃		(B)
431	B3b	CH ₃		(A)

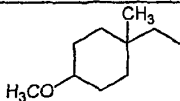
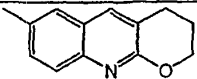
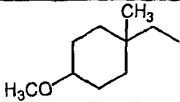
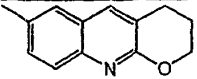
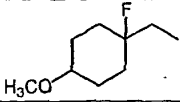
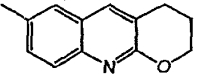
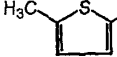
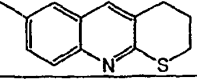
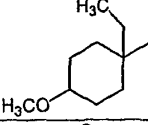
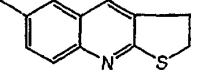
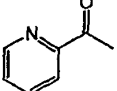
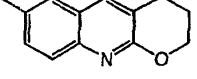
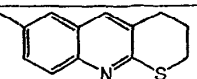
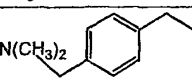
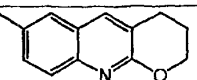
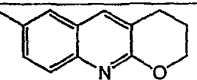
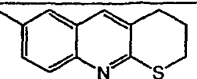
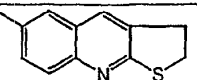
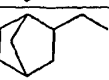
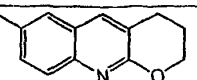
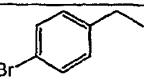
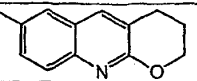
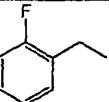
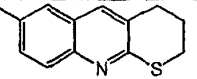
Таблица 7

№ соед.	№ пр.	R ¹	L	физические данные
432	B16			т.пл.:128°C
433	B4			т.пл.:175°C
434	B4			т.пл.:170°C
435	B4			т.пл.:103°C
436	B4			т.пл.:151°C
437	B4			(транс); т.пл.:110°C
438	B4			т.пл.:150°C
439	B4			т.пл.:150°C
440	B4			(цис)

№ соед.	№ пр.	R ¹	L	физические данные
441	B4			т.пл.:166°C
442	B4			т.пл.:173°C
443	B4			т.пл.:208°C
444	B4			т.пл.:149°C
445	B4			т.пл.:133°C
446	B3b			т.пл.:150°C
447	B3b			т.пл.:165°C
448	B3b			т.пл.:147°C
449	B3b			т.пл.:154°C
450	B3b			т.пл.:157°C
451	B4			т.пл.:190°C
452	B4			т.пл.:187°C
453	B3b			т.пл.:200°C
454	B3b			т.пл.:160°C

№ соед.	№ пр.	R ¹	L	физические данные
455	B3b			т.пл.:139°C
456	B3b			(A); т.пл.:174°C
457	B3b			(B); т.пл.:160°C
458	B3b			т.пл.:184°C
459	B4			-
460	B4			т.пл.:134°C
461	B4			(B); т.пл.:156°C
462	B4			т.пл.:153°C
463	B3b			т.пл.:161°C
464	B4			т.пл.:135°C
465	B4			т.пл.:131°C
466	B3b			.HCl(1:1); т.пл.:206°C
467	B3d			т.пл.:142°C
468	B4			.гидрат(1:1); т.пл.:104°C
469	B3b	диметилэтил		т.пл.:104°C

№ соед.	№ пр.	R ¹	L	физические данные
470	B3b			т.пл.:161°C
472	B3b			т.пл.:144°C
473	B4			т.пл.:143°C
474	B4			т.пл.:196°C
475	B4			т.пл.:162°C
476	B4			т.пл.:171°C
477	B4			т.пл.:155°C
478	B2	триметилметил		т.пл.:124°C
479	B4			(A); т.пл.:146°C
480	B4			(B); т.пл.:162°C
481	B4			(A); т.пл.:129°C
482	B4			т.пл.:115°C
483	B2			т.пл.:187°C
484	B2			т.пл.:162°C
485	B4			(A); т.пл.:130°C

№ соед.	№ пр.	R ¹	L	физические данные
486	B4			(A); т.пл.:124°C
487	B4			(B); т.пл.:128°C
488	B4			т.пл.:85°C
489	B2			т.пл.:150°C
490	B4			(A); т.пл.:117°C
491	B2			т.пл.:220°C
492	B4			т.пл.:136°C
493	B2			т.пл.:131°C
494	B4			(A); т.пл.:125°C
495	B4			т.пл.:135°C
496	B4			т.пл.:139°C
497	B4			т.пл.:127°C
498	B16			т.пл.:195°C
499	B2			т.пл.:201°C

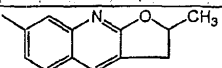
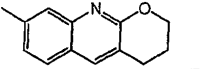
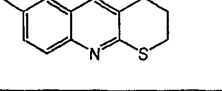
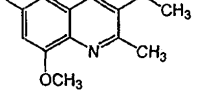
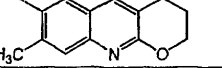
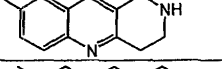
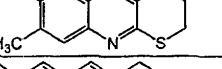
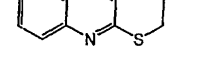
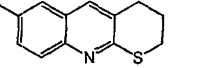
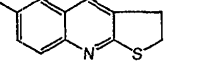
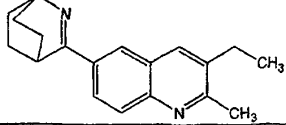
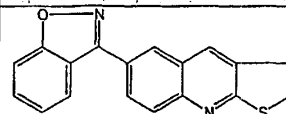
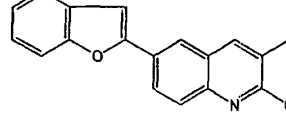
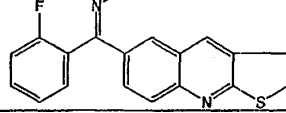
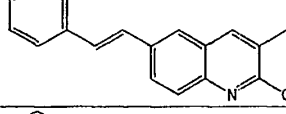
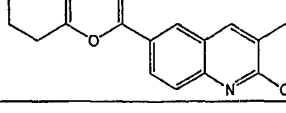
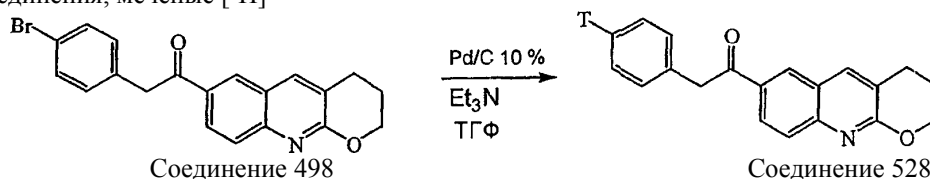
№ соед.	№ пр.	R ¹	L	физические данные
500	B3b			т.пл.:143°C
501	B3b			т.пл.:137°C
502	B2			т.пл.:210°C
503	B3d			т.пл.:134°C
504	B2			т.пл.:163°C
505	B4			т.пл.:142°C
506	B2			т.пл.:139°C
507	B4			т.пл.:171°C
512	B3b			-
523	B3b			-

Таблица 8

№ соед.	№ пр.	Структура	физические данные
511	B11		-
514	B12		-
515	B13		-
524	B9a		т.пл.:185°C
471	B15		(E)
526	B14		.HCl(1:1)

С. Получение меченных радиоактивными изотопами соединений

С.1 Соединения, меченые [^3H]

К тщательно взвешенному количеству палладия на углеводе (10%, 0,872 мг) добавляют раствор соединения 498 (I, 0,919 мг, 2,4 мкмоль) и триэтиламин (0,92 мкл, 6,6 мкмоль) в тетрагидрофуране, обезвоженном натрием (175 мкл). Реакционную колбу присоединяют к коллекторной системе для тритирования и реакционную смесь тщательно дегазируют. Газообразный тритий (19,5 Ки при давлении 1017 мбар) получают из тритида урана и дают возможность реакционной смеси перемешиваться при комнатной температуре. Спустя 30 мин реакционную смесь замораживают жидким азотом и улавливают избыток газообразного трития снова на губчатом уране. Растворитель удаляют из реакционной смеси путем лиофилизации. Вводят метанол (100 мкл) и лиофилируют для удаления несвязанного трития. Описанную процедуру повторяют еще два раза. Остаток переносят в этанол, фильтруют через 13 мм фильтрующий шприц GHP Acrodisk и промывают общим объемом этанола до 50,0 мл. Полученный продукт содержит [^3H]-соединение 528 (II) с радиоактивностью 71 мкюри при 67%-ой радиохимической чистоте. Из полученного количества берут фракцию (5,0 мл) и по частям тщательно очищают препаративной ВЭЖХ (Кромасил KR 100-10, размеры колонки 4,6 мм (вн. диаметр) x 300 мм). Спектрофотометрический анализ в УФ-области спектра выполняют при 265 нм. Изократическое элюирование проводят смесью воды-метанола-ацетонитрила-диизопропиламина (47:26, 5:26, 5:0,2; об./об.) при скорости потока 2,0 мл/мин. Фракции, содержащие продукт, объединяют и концентрируют в вакууме при 30°C. Остаток растворяют в этаноле (5,0 мл) и вновь концентрируют. Указанную процедуру повторяют еще два раза. Оставшийся остаток в последний раз растворяют в этаноле (20,0 мл) и хранят сам по себе. Полученная партия продукта содержит [^3H] соединение 528 (II) с общей радиоактивностью 3,83 мкюри при чистоте > 98% и удельной активности приблизительно 25 кюри/ммоль.

D. Примеры фармакологического применения.

D1. Передача сигнала клонированных крысиных mGlu1-рецепторов в СНО-клетках.

СНО-клетки, экспрессирующие mGlu1-рецептор, высевали в черные 96-луночные планшеты с предварительно нанесенным покрытием. На следующий день с помощью флуоресцентного анализа оценивали влияние соединений настоящего изобретения на повышение внутриклеточного Ca^{2+} , активированное глутаматом. Клетки загружали Fluo-3 AM, планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте, клетки промывали и добавляли в клетки на 20 мин соединения настоящего изобретения. После указанного инкубационного периода с помощью флуоресцентного спектрофотометра для считывания планшетов (FLIPR, Molecular Devices Inc) в каждой лунке регистрировали повышение Ca^{2+} , индуцируемое глутаматом, как функцию времени. Флуоресценцию регистрировали в относительных единицах, а графики получали по усредненным данным четырех лунок. Кривые зависимости ответа от концентрации строили на основе пиков флуоресценции (максимальный сигнал между 1 и 90 с) для каждой концентрации тестируемого соединения. Значения pIC_{50} представляют собой $-\log$ значений концентрации тестируемых соединений, приводящих к 50%-ому ингибированию повышения внутриклеточного Ca^{2+} , индуцируемого глутаматом.

Соединения согласно настоящему изобретению показывают значение pIC_{50} , равное по меньшей мере 5. Соединения, включенные в табл. 1-8, показывают значение pIC_{50} , равное по меньшей мере 6. Специфическая группа соединений показывает значение pIC_{50} между 7 и 8. Такие соединения перечислены в табл. 9.

Таблица 9

№ соедин.	pIC ₅₀
463	7.98
441	7.95
334	7.95
22	7.94
421	7.94
15	7.93
440	7.93
139	7.93
178	7.92
338	7.91
87	7.90
462	7.90
394	7.90
423	7.89
21	7.87
220	7.87
479	7.86
483	7.86
485	7.84
9	7.84
110	7.84
248	7.84
341	7.83
163	7.81
433	7.79
238	7.79
224	7.78
437	7.78
498	7.78
449	7.77
242	7.76

№ соедин.	pIC ₅₀
346	7.74
182	7.73
486	7.73
447	7.72
7	7.72
175	7.71
475	7.71
480	7.71
213	7.70
239	7.70
241	7.67
461	7.65
115	7.64
445	7.63

№ соедин.	pIC ₅₀
281	7.63
487	7.63
299	7.63
431	7.61
98	7.57
464	7.57
446	7.56
251	7.55
484	7.54
494	7.53
128	7.52
344	7.52
161	7.49
298	7.48
454	7.45
456	7.45
277	7.44
91	7.43
356	7.42
229	7.41
333	7.41
326	7.41
369	7.40
430	7.39
435	7.38
35	7.36
228	7.36
429	7.36
117	7.35
291	7.35
313	7.35

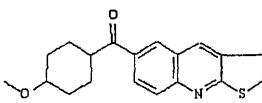
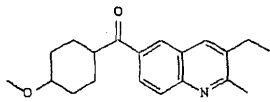
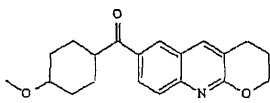
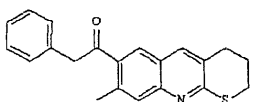
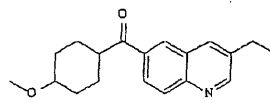
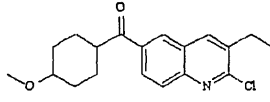
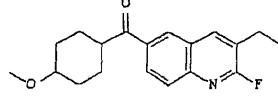
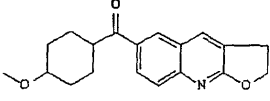
№ соедин.	pIC ₅₀
280	7.34
460	7.34
482	7.34
343	7.33
425	7.32
473	7.32
287	7.31
448	7.31
243	7.29
323	7.28
159	7.28
289	7.27
184	7.26
436	7.26

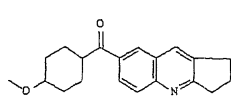
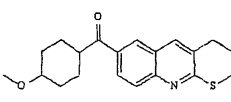
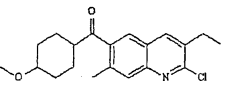
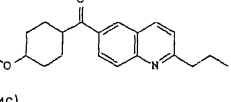
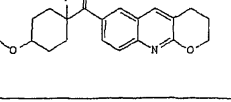
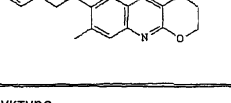
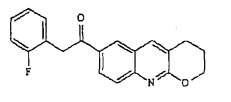
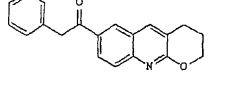
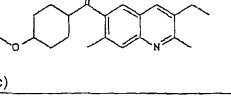
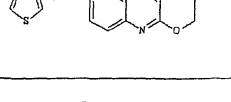
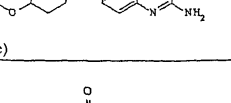
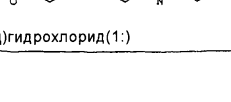
№ соедин.	pIC ₅₀
89	7.25
108	7.25
373	7.25
255	7.23
527	7.23
303	7.22
296	7.22
221	7.21
193	7.21
14	7.20
131	7.19
438	7.19
148	7.18
496	7.18
236	7.17
332	7.17
481	7.16
191	7.16
457	7.14
20	7.14
145	7.13
268	7.13
512	7.13
474	7.13
10	7.11
307	7.11
426	7.11
466	7.10
97	7.08
83	7.08
434	7.08

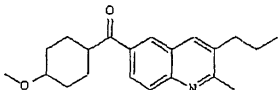
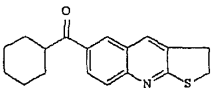
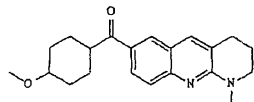
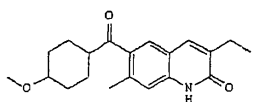
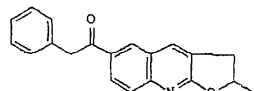
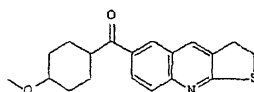
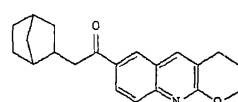
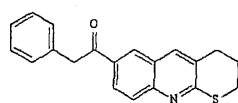
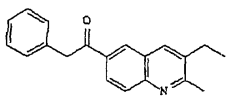
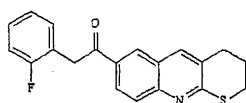
№ соедин.	pIC ₅₀
300	7.08
199	7.07
290	7.06
112	7.05
348	7.05
286	7.03
442	7.03
422	7.02
283	7.02
318	7.02
36	7.00
396	7.00

Специфическая группа соединений показывает значение pIC₅₀, равное по меньшей мере 8. Такие соединения перечислены в табл. 10.

Таблица 10

№ соед.	Структура	pIC50
416	 (цис)	8.587
27	 (цис)	8.527
174	 (цис)	8.49
506		8.48
25	 (цис)	8.45
4	 (цис)	8.4
19	 (цис)	8.38
429	 (цис)	8.38

№ соед.	Структура	pIC50
424	 (цис)	8.355
176	 (цис)	8.33
210	 (цис)	8.315
114	 (цис)	8.28
488		8.27
504		8.27
№ соед.	Структура	pIC50
477		8.25
432		8.237
214	 (цис)	8.233
465		8.145
135	 (цис)	8.14
420	 (сиц)гидрохлорид(1:)	8.135

№ соед.	Структура	pIC50
292	 (цис)	8.13
427		8.115
208	 (цис)	8.095
419	 (цис)	8.065
455		8.055
418	 (транс)	8.045
№ соед.	Структура	pIC50
497		8.025
439		8.023
237		8.01
499		8

D2. Эксперименты *in vitro* по изучению связывания с меченным изотопом [^3H] соединением согласно изобретению.

В качестве меченных изотопами [^3H] соединений применяли: соединение 528, далее обозначаемое

как [^3H] соединение А, которое представляет собой меченное тритием соединение, эквивалентное соединению 432.

В следующих параграфах будет описано исследование, иллюстрирующее применение меченных радиоактивными изотопами соединений согласно изобретению.

Материалы

Все клеточные культуры получены от фирмы Invitrogen (Carlsbad, USA). Глутамат получен от компании Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI); [^3H]квисквалат (29 кюри/ммоль), [^3H]Ro 48-8587 (53 кюри/ммоль), мио- [^3H]инозит (22 Ки/ммоль) и [^{35}S]GTP γ S (1030 кюри/ммоль) получены от фирмы Amersham (Paisley, Великобритания). [^3H]МК-801 (22,5 кюри/ммоль) и [^3H]CGP39653 (20-50 кюри/ммоль) получены от фирмы NEN (Zaventem, Бельгия). GDP получали от фирмы Boehringer Mannheim (Базель, Швейцария), а глицин получен от фирмы BioRad (CA, USA). [^3H]L689560 (10-30 кюри/ммоль), [^3H]LY341495 (34,61 Ки/ммоль), [^3H]MPEP (50,2 кюри/ммоль), (S)-4C3HPG, (1S,3R)-ACPD, (S)-3,5-DHPG, (S)-4CPG, AIDA, MCPG, MPEP, CPCCOEt, L-SOP и L-квискваловую кислоту приобретали у фирмы Tocris Cookson (Essex, Великобритания). BAY 36-7620, NPS 2390 и фенциклидин синтезировали самостоятельно. Fluo-3-AM и плуорониловую кислоту получали от фирмы Molecular Probes (Leiden, Нидерланды). Пробенецид, стрихнин, D-серин и Тритон X-100 приобретали у фирмы Sigma-Aldrich (Steinheim, Германия). Все другие реактивы получали от фирмы Merck (Darmstadt, Германия).

Трансфекцирование и культивирование клеток

L929sA-клетки, стабильно экспрессирующие человеческий mGlu1a-рецептор, получали так, как описано в публикации Lavreysen и др., Mol. Pharmacol. 61:1244-1254,2002, и культивировали в среде Glutamax-I с добавлением 10%-ой термоинактивированной, диализированной плодной телячьей сыворотки, 0,1 мг/мл сульфата стрептомицина и 100 единиц/мл пенициллина. CHO-dhfr $^-$ -клетки, стабильно экспрессирующие крысиный mGlu1a-, 2-, 3-, 4-, 5- и 6-рецептор, любезно предоставленные S.Nakanishi (Токийский университет, Япония), выращивали в DMEM с Glutamax-I с добавлением 10%-ой термоинактивированной, диализированной плодной телячьей сыворотки, 0,4 mM L-пролина, 0,2 мг/мл сульфата стрептомицина и 200 единиц/мл пенициллина. Клетки хранили при 37°C в атмосфере с 5% CO $_2$.

Ответ внутриклеточного Ca $^{2+}$ в клетках, экспрессирующих крысиный и человеческий mGlu1a-рецепторы и в клетках, экспрессирующих крысиный mGlu5-рецептор

С помощью флуоресцентного спектрофотометра для считывания планшетов (FLIPR, Molecular Devices, CA, USA) измеряли уровни внутриклеточных ионов кальция ([Ca $^{2+}$] $_i$) в L92 9sA-клетках, экспрессирующих человеческий mGlu1a-рецептор, как описано в публикации Lavreysen и др., Mol.Pharmacol. 61: 1244-1254, 2002.

Такую же методику применяли для CHO-dhfr $^-$ -клеток, экспрессирующих крысиный mGlu1a-рецептор. Для крысиного mGlu5-рецептора клетки засевали при 30000 клеток/лунку за 2 дня до эксперимента.

IP-ответ в CHO-dhfr $^-$ -клетках, экспрессирующих крысиный mGlu1a-рецептор

Накопление IP измеряли так, как описано в публикации Lavreysen и др., Mol.Pharmacol. 61:1244-1254,2002. Коротко, клетки засевали при 30000 клеток/лунку в 24-луночные планшеты и в течение ночи вводили метку мио- [^3H] инозита (2,5 μ Ки/мл). В день эксперимента клетки промывали и инкубировали в течение 10 мин с 10 mM LiCl. После 30-минутной инкубации с повышенными концентрациями [^3H] соединения А, добавляли 1н. HClO $_4$ и устанавливали планшеты при 4°C. Перед применением ионообменной хроматографии добавляли раствор КОН/фосфата и раствор, содержащий 30 mM Na $_2$ B $_4$ O $_7$ ·10H $_2$ O и 3 mM EDTA.

Получение мембран CHO-dhfr $^-$ -клеток, экспрессирующих крысиный mGlu1a-, 2-, 3-, 4-, 5- и 6-рецептор

Конфлюэнтные клетки промывали охлажденным до 0°C забуференным фосфатом физиологическим раствором и до получения мембран хранили при -20°C. После размораживания клетки суспендировали в 50 mM растворе Трис-HCl (pH 7,4) и собирали центрифугированием при 4°C и 23500g в течение 10 мин. Клетки лизировали в 10 mM гипотоническом растворе Трис-HCl, pH 7,4. После повторного центрифугирования в течение 10 минут при 4°C и 30000g осадок, полученный после центрифугирования, гомогенизировали на гомогенизаторе Ultra Turrax в 50 mM Трис-HCl, pH 7,4. Концентрацию белков измеряли с помощью белкового Bio-Rad-анализа с применением в качестве стандарта бычьего сывороточного альбумина.

Связывание [^{35}S]GTP γ S с мембранами CHO-dhfr $^-$ -клеток, экспрессирующих крысиные mGlu2-, 3-, 4- и 6-рецепторы

Мембраны размораживали на льду и разбавляли раствором 10 mM HEPES-кислоты, 10 mM соли HEPES-кислоты (pH 7,4), содержащим 100 mM NaCl, 3 mM MgCl $_2$, 3 мкМ GDP и 10 мкг/мл сапонина. Тестируемые смеси содержали 10 мкг мембранного белка и предварительно инкубировались в течение 5 мин при 37°C с соединениями или буфером. Затем добавляли глутамат и еще раз инкубировали тестируемые смеси в течение 30 мин при 37°C. В течение следующих 30 мин при 37°C добавляли [^{35}S]GTP γ S до конечной концентрации 0,1 нМ. Реакции прерывали путем ускоренного фильтрования через фильтро-

важные планшеты Unifilter-9 6 GF/B (Packard, Meriden, CT) с помощью 96-луночного фильтровального (filtermate) харвестера фирмы Packard. Фильтры: промывали 2 раза охлажденным до 0°C фосфатным буфером (10 mM NaH_2PO_4 /10 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4). Радиоактивность на фильтре определяли на микропланшетах Microplate Scintillation и люминесцентном счетчике Luminescence Counter фирмы Packard.

Связывание меченного радиоактивным изотопом лиганда с крысиным mGlu1a-рецептором СНО-dhfr-мембран

Связывание [^3H] соединения А. После размораживания мембраны гомогенизировали, применяя гомогенизатор Ultra Turrax, и суспендировали в охлажденном до 0°C буфере для связывания, содержащем, если не указано иначе, 50 mM Трис-НСl (pH 7,4), 1,2 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 . Эксперименты по изучению насыщения лигандами проводили при кажущемся равновесии связывания (инкубация 30 минут) с 20 мкг мембранного белка при 10 концентрациях (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1,2, 2,5, 5 и 10 нМ) меченного радиоактивным изотопом лиганда. Неспецифическое связывание оценивали в присутствии 1 мкМ соединения 135. Инкубацию останавливали путем ускоренного фильтрования с отсосом через фильтры из стекловолокна GF/C с помощью ручного 40-луночного фильтрационного коллектора. Для измерения кинетики ассоциации мембраны инкубировали при 4°C, 25°C или 37°C в присутствии 2,5 нМ [^3H] соединения А в течение 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 или 120 мин, затем прерывали инкубацию путем ускоренного фильтрования с применением ручного 40-луночного фильтрационного блока. Кинетику диссоциации измеряли путем добавления перед фильтрованием к мембранам, предварительно инкубированным в течение 30 мин при 4 или 25°C в присутствии 2,5 нМ [^3H] соединения А, 1 мкМ соединения 135 через разные интервалы времени. Фильтры переносили во флаконы для подсчета радиоактивности и после добавления Ultima-Gold MV с помощью сцинтилляционного счетчика фирмы Packard определяли собранную на фильтрах радиоактивность. В экспериментах по изучению ингибирования тестируемые смеси инкубировали в течение 30 мин при 4°C в 0,5 мл объеме, содержащем 10-20 мкг мембранного белка, соответствующие концентрации тестируемых соединений и 2,5 нМ [^3H] соединения А. Неспецифическое связывание определяли, как описано выше. Фильтрование проводили с помощью фильтровальных планшетов Unifilter-96 GF/C и 96-луночного фильтровального харвестера фирмы Packard. Радиоактивность на фильтрах определяли на микропланшетах Microplate Scintillation и люминесцентном счетчике Luminescence Counter фирмы Packard после добавления микроскинт-О (microscint-O).

Связывание [^3H] квискалата. Размороженные мембраны гомогенизировали и суспендировали в охлажденном до 0°C буфере для связывания. В экспериментах по изучению насыщения 30 мкг мембранного белка инкубировали в течение 1 ч при 25°C с 10 различными концентрациями (1, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120 и 150 нМ) [^3H]квискалата. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 1 mM L-глутамата. Связанный и свободный меченые лиганды разделяли путем ускоренного фильтрования на фильтрах из стекловолокна GF/C с применением ручного 40-луночного фильтрационного коллектора. В экспериментах по ингибированию 30 мкг мембранного белка инкубировали в течение 1 ч при 25°C в объеме 0,5 мл, содержащем соответствующие концентрации тестируемых соединений и конечную концентрацию [^3H]квискалата, равную 10 нМ. Фильтрование проводили с применением фильтровальных планшетов Unifilter-96 GF/C и фильтровального харвестера фирмы Packard. Радиоактивность, улавливаемую на фильтрах, определяли, как описано выше.

Связывание меченного лиганда с мембранами СНО-dhfr-клеток, экспрессирующих крысиные mGlu2, 3-, 4-, 5- и 6-рецепторы

После размораживания мембраны гомогенизировали, применяя гомогенизатор Ultra Turrax, и суспендировали в охлажденном до 0°C буфере для связывания, содержащем 50 mM Трис-НСl (pH 7,4), 1,2 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 . Для связывания [^3H] соединения А применяли от 20 до 160 мкг мембранного белка и конечную концентрацию [^3H] соединения А, равную 20 нМ. Как указано в разделе «результаты», для определения неспецифического связывания применяли различные контрольные опыты. Время и температура инкубации, так же как фильтрование, были такими же, как описанные выше для крысиного mGlu1a-рецептора СНО-dhfr-мембран. Экспрессию крысиных mGlu2, 3-, 5- и mGlu6-рецепторов подтверждали с помощью специфического [^3H]LY341495-связывания (mGlu2-, 3- и 6-) или [^3H] МРЕР-связывания (mGlu5). Для [^3H]LY341495-связывания применяли 1 нМ (mGlu2 и mGlu3) или 10 нМ (mGlu6) [^3H]LY341495. Неспецифическое связывание определяли с помощью 1 mM глутамата. Тестируемые смеси инкубировали в течение 30 мин (mGlu2 и mGlu3) или 60 минут (mGlu6) при 4°C. Инкубацию останавливали фильтрованием на фильтрах из стекловолокна GF/B (Whatman, Англия), применяя ручной 40-луночный фильтрационный коллектор. Для обнаружения неспецифического связывания крысиных mGlu5-рецепторов СНО-dhfr-мембран применяли 10 нМ [^3H]МРЕР и 10 мкМ МРЕР. Инкубацию проводили при 4°C в течение 30 мин. Связанный и свободный меченые лиганды разделяли на фильтрах из стекловолокна GF/C (Whatman, Англия) с применением 40-луночного фильтрационного блока.

Связывание [^3H] соединения А с мембранами мозга крысы

Получение тканей. Самца крысы Уистера (~200 г) забивали путем декапитации. Мозг быстро удаляли и незамедлительно иссекали кору головного мозга, гиппокамп, стриатум и мозжечок. Свежую ткань гомогенизировали на гомогенизаторе Ultra Turrax в 20 объемах 50 mM Tris-НСl (pH 7,4) и центрифугиро-

вали ткань при 23500 g в течение 10 мин. После гомогенизации с применением гомогенизатора DUAL мембраны дважды промывали путем центрифугирования при 23500 g в течение 10 мин. Осадок, полученный после центрифугирования, суспендировали в 10 объемах 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) и замораживали при -80°C.

Анализ связывания *in vitro*. После размораживания мембраны, полученные из коры головного мозга, мозжечка, стриатума и гиппокампа крысы, повторно гомогенизировали с применением гомогенизатора DUAL и суспендировали в охлажденном до 0°C буфере для связывания, содержащем 50 mM Tris-HCl, 1,2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ (pH 7,4). Анализ связывания проводили в общем объеме 0,5 мл, содержащем 2,5 nM [³H] соединения А и аликвоту мембран, соответствующую 40 мкг мембран мозжечка, 60 мкг мембран гиппокампа, 80 мкг мембран стриатума или 150 мкг мембран коры головного мозга. Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим связыванием и связыванием, измеренным в присутствии 1 мкМ соединения 135. После инкубации в течение 30 мин при 4°C меченые мембраны промывали и собирали путем ускоренного вакуумного фильтрования на фильтрах из стекловолокна GF/C фирмы Whatman с применением 40-луночного фильтрационного коллектора и определяли собранную на фильтрах радиоактивность, как описано выше.

Связывание [³H]Ro 48-8587, [³H]L689560, [³H]CGP39653 и [³H]МК-801 с мембранами мозга крысы. Получение тканей. Самца крысы Вистара (~200 г) забивали путем декапитации. Мозг быстро удаляли и иссекали передний мозг. Ткань гомогенизировали на гомогенизаторе Ultra Turrax в 20 объемах охлажденной до 0°C H₂O и центрифугировали при 48000 g в течение 20 мин. После гомогенизации с применением гомогенизатора DUAL мембраны промывали центрифугированием при 48000 g в течение 10 мин. Затем осадок, полученный после центрифугирования, суспендировали в 20 объемах 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), содержащем 0,04% Тритон X-100, и снова центрифугировали при 48000 g в течение 20 мин. Конечный осадок, полученный после центрифугирования, замораживали при -80°C.

Анализ связывания *In vitro*. В день проведения эксперимента осадок, полученный после центрифугирования, размораживали, промывали и повторно гомогенизировали с применением гомогенизатора DUAL в охлажденном до 0°C 50 mM Трисацетате (pH 7,4). Условия проведения анализа для различных меченых лигандов были следующие. Конечная концентрация мембран при проведении анализа составляла 20 мг/мл (сырая масса) для [³H]Ro 48-8587 и [³H]L689560 и 10 мг/мл (сырая масса) для [³H]CGP39653 и [³H]МК-801. Применяли следующие концентрации меченых лигандов: 2 nM [³H]Ro 48-8587, 2 nM [³H]L689560, 2 nM [³H]CGP39653 и 3 nM [³H]МК-801. Инкубацию проводили в присутствии 1 mM KSCN при связывании [³H]Ro 48-8587, 100 мкМ стрихнина, при связывании [³H]L689560 и 1 мкМ глицина + 1 мкМ глутамата при связывании [³H]МК-801. [³H]Ro 48-8587 и [³H]CGP39653 неспецифическое связывание определяли в присутствии 1 mM глутамата. При связывании [³H]L689560 и [³H]МК-801 для определения неспецифического связывания применяли соответственно 100 мкМ D-серина или 10 мкМ фенциклидина. Пробы инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 2 ч при 4°C, 30 мин при 25°C и 1 ч при 4°C соответственно при связывании [³H]Ro 48-8587, [³H]L689560, [³H]CGP39653 и [³H]МК-801. После инкубации связанный и свободный меченые лиганды разделяли с помощью 40-луночного фильтрационного коллектора. Собранную на фильтрах радиоактивность определяли, как описано выше.

Связывание [³H] соединения А и авторадиграфия срезов мозга крысы.

Получение тканей. Самца крысы Вистара (200 г) забивали путем декапитации. Мозг незамедлительно удаляли из черепа и быстро замораживали в 2-метилбутане при охлаждении сухим льдом (-40°C). Далее до получения срезов мозг хранили при -70°C. С помощью криостатного микротомы Leica C3050 (Leica Микросистемы, Wetzlar, Германия) готовили двадцатимикронные сагиттальные срезы и в размороженном состоянии устанавливали их на предметные стекла микроскопа SuperFrost Plus (Menzel-glaser, Германия). Далее до применения срезы хранили при -70°C.

Авторадиграфия рецепторов. Срезы размораживали и сушили в токе холодного воздуха, предварительно инкубировали (3 x 5 минут) в 50 mM Tris-HCl, 1,2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 0,1% BSA (pH 7,4) при комнатной температуре. Затем срезы инкубировали в течение 60 минут при комнатной температуре в буфере, содержащем 50 mM Tris-HCl, 1,2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 0,1% BSA (pH 7,4) и 1,5 nM [³H] соединения А. Неспецифическое связывание определяли путем добавления в инкубационный буфер 1 мкМ соединения 135. После инкубации избыток меченого лиганда вымывали (3 x 5 мин) охлажденным до 0°C буфером, содержащим 50 mM Tris-HCl, 1,2 mM MgCl₂ и 2 mM CaCl₂, с последующим быстрым погружением в холодную дистиллированную воду. Срезы сушили в токе холодного воздуха и затем в течение 6 недель при комнатной температуре экспонировали с пленкой [³H]Hyperfilm (Amersham, Великобритания). Пленки проявляли вручную на Kodak DI 9 и фиксировали с помощью Kodak Readymatic. Некоторые срезы в течение 2 дней при комнатной температуре экспонировали с пластиной Fuji Imaging Plate и сканировали с помощью Fujix Bass 2000 phosphorimager.

Анализ и статистика данных

Анализ данных проводили с помощью программы GraphPad Prism (GraphPad Prism Software, Inc, San Diego, CA). Эксперименты по изучению насыщения связывания анализировали, применяя нелинейный регрессионный анализ. Кривые ингибирования наносили на график по точкам с применением нели-

нейного регрессионного анализа в соответствии с уравнением конкурентного связывания по одному сайту: $Y = \text{нижнее значение} + ((\text{верхнее значение} - \text{нижнее значение}) / (1 + 10^{X - \text{LogIC}_{50}}))$. Значения K_i рассчитывали с помощью уравнения Ченга-Прусоса (Cheng-Prusoff): $K_i = \text{IC}_{50} / [1 + ([C]/K_D)]$, где C представляет собой концентрацию меченого лиганда, а K_D представляет собой константу диссоциации меченого лиганда (Cheng and Prusoff, Biochem.Pharmacol. 22, 3099-3108, 1973). Наблюдаемые скорости (k_{ob}) и (k_{off}) рассчитывали из кривых ассоциации-диссоциации с помощью программы Prism с применением уравнений однофазной экспоненциальной ассоциации и разложения соответственно. Константы k_{on} рассчитывали путем вычитания k_{off} из k_{ob} и деления на концентрацию меченого лиганда. Для статистической оценки данных экспериментов по изучению связывания применяли двухсторонний t-критерий Стьюдента: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$. Для анализа данных экспериментов по определению IP применяли t-критерий Даннетта с последующим 2-х факторным дисперсионным анализом (с учетом в качестве показателя концентрации соединения и эксперимента).

Результаты

Селективность и вид антагонизма соединения А по отношению к mGlu1-рецептору. В СНО-dhfr⁻клетках, экспрессирующих крысиный mGlu1a-рецептор, соединение А ингибирует увеличение $[Ca^{2+}]_i$, индуцируемое глутаматом, со значением IC_{50} $21,6 \pm 5,0$ нМ ($n=4$; фиг. 1А), и как видно, является приблизительно в 8 раз более сильным, чем недавно описанный специфический антагонист mGlu1-рецептора ВАУ 36-7620 ($\text{IC}_{50} = 161 \pm 38$ нМ, $n=3$), и в 500 раз более сильным, чем СРССОEt ($\text{IC}_{50} = 10,3 \pm 0,8$ мкМ, $n=3$), протестированный в таком же анализе. Для Glu1a-рецептора человека соединение А имеет значение IC_{50} $10,4 \pm 4,7$ нМ ($n=3$). При тестировании вплоть до концентрации 10 мкМ соединение А не ингибирует передачу сигналов Ca^{2+} , индуцируемую глутаматом, крысиного mGlu5-рецептора, экспрессируемого в СНО-dhfr⁻клетках. В рекомбинантных крысиных mGlu2-, 3-, 4- или 6-рецепторах значения IC_{50} для ингибирования $[^{35}S]$ GTPγ S-активации (30 мкМ), индуцируемой глутаматом, выше 30 мкМ. При проведении анализов с $[^{35}S]$ GTPγ S соединение А вплоть до концентрации 30 мкМ не проявляло агонистической активности по отношению к любому из mGlu-рецепторов. Кроме того, исследовали, может ли соединение А действовать как положительный аллостерический модулятор на один из указанных типов mGlu-рецептора. Для этого строили кривые зависимости ответа от концентрации глутамата путем добавления только одного глутамата или вместе с 10 мкМ соединения А. Анализы, проведенные с $[^{35}S]$ GTPγS на рекомбинантных крысиных mGlu2, 3-, 4- или 6-рецепторах, показали, что после добавления соединения А EC_{50} глутамата не изменялось и что значение $E_{\text{макс}}$ глутамата не повышалось. Когда вместе с глутаматом добавляли соединение А (данные не приводятся), значение EC_{50} и $E_{\text{макс}}$ мобилизации внутриклеточного Ca^{2+} , индуцированной глутаматом, в клетках, экспрессирующих крысиный mGlu5-рецептор, также не изменялись. Вместе указанные данные исключают агонистическую, антагонистическую активность или положительное аллостерическое воздействие на mGlu2-, 3-, 4-, 5- и 6-рецепторы. Исследование радиолигандного связывания на переднем мозге крысы с применением $[^3H]$ Ro-488587, $[^3H]$ L689560, $[^3H]$ CGP39653 и $[^3H]$ МК-801 показало, что соединение А не связывается с AMPA-рецептором, но также не связывается с глициновым, глутаматным рецептором или с участком NMDA-рецептора, образующим мембранный канал (испытано вплоть до концентрации 10 мкМ) соответственно. Для изучения того, как соединение А ингибирует глутаматную активацию mGlu1a-рецептора, сравнивали мобилизацию Ca^{2+} в ответ на глутамат при отсутствии и в присутствии соединения А (фиг. 1В). Присутствие соединения А не только вызывает сдвиг вправо кривой зависимости ответа от концентрации глутамата, но также приводит к резкому уменьшению максимального ответа, вызываемого агонистом, показывая, что антагонизм соединения А является неконкурентным. Полное ингибирование передачи сигналов, опосредуемой mGlu1a-рецептором, наблюдалось в присутствии 100 нМ - 1 мкМ соединения А. Для исследования, может ли соединение А действовать как обратный агонист, измеряли накопление базального IP в СНО-dhfr⁻клетках, содержащих крысиный mGlu1a-рецептор, в присутствии соединения А. На фиг. 1С показано, что с увеличением концентрации соединения А происходит явное уменьшение продукции базального IP. Такое уменьшение статистически значимо ($p < 0,05$), поскольку при удалении 1 мкМ соединения А накопление базального IP снижается на $24 \pm 4\%$. Максимальное уменьшение $33 \pm 3\%$ обнаружено при применении 100 мкМ соединения А. Полученные данные указывают, что соединение А по отношению к mGlu1a-рецептору действительно действует как обратный агонист.

Описание характера связывания $[^3H]$ соединения А с крысиным mGlu1a-рецептором СНО-dhfr⁻мембран. Специфическое связывание $2,5$ нМ $[^3H]$ соединения А при 4°C с крысиным mGlu1a-рецептором СНО-dhfr⁻ мембран пропорционально количеству мембранного белка и линейно увеличивается между 10 и 50 мкг мембранного белка в расчете на один анализ (фиг. 2). Неспецифическое связывание определяли с помощью 1 мкМ соединения 135 в качестве ингибитора. Соединение 135 идентифицируют как специфический антагонист mGlu1-рецептора с потенциалом реверсии мобилизации $[Ca^{2+}]_i$, индуцируемой глутаматом, $7,2 \pm 1,2$ нМ ($n=3$). При применении 20 мкг белка в расчете на один анализ специфическое связывание $[^3H]$ соединения А составляло 92% от общего связывания; при типичных условиях проведения анализа общее и неспецифическое связывание находятся соответственно в диапазоне 3800 и 300 DPM.

Добавление 1,2 мМ $MgCl_2$ и 2 мМ $CaCl_2$ вызывает небольшое увеличение специфического связыва-

ния (данные не приводятся).

Кроме того, добавление NaCl (10-100-300 мМ) не давало никакого эффекта. Несмотря на то, что при pH 6 специфическое связывание уменьшается на 22%, увеличение pH вплоть до 10 не давало никакого эффекта (данные не приводятся).

Кинетику ассоциации измеряли, как описано в разделах «Материалы» и «Методы».

Уменьшение температуры инкубации до 4° С резко усиливало специфическое связывание, тогда как при 37°С обнаруживали низкое связывание (фиг. 3). Ассоциация [³H] соединения А с мембранами была чрезвычайно быстрой. При 4°С уже двухминутная инкубация приводила к специфическому связыванию, соответствующему приблизительно 70% от количества, связанного при равновесии. Максимальное связывание достигалось в пределах 5 мин инкубации для каждой температуры инкубации. Полученные в результате анализа кривых ассоциации константы скорости ассоциации (k_{ob}) равны 0,6285, 2,571 и 1,523 мин⁻¹ соответственно при 4, 25 и 37°С. Кинетика диссоциации также была быстрой (фиг. 4). При 25°С меченный радиоактивным изотопом лиганд диссоциировал в пределах до 2 мин после добавления в реакционные пробирки 1 мкМ соединения 135. Быстрая кинетика диссоциации при 25°С не позволила рассчитать точную константу скорости диссоциации (k_{off}). При температуре инкубации 4°С диссоциация происходила более медленно. После добавления избытка соединения 135 [³H] соединение А полностью вытеснялось в течение приблизительно 45 мин. Полученная в результате анализа кривой диссоциации при 4°С константа k_{off} равна 0,124 9 мин⁻¹. k_{on} ($k_{ob} - k_{off}$ /концентрация меченного изотопом лиганда) при 4°С равна 0,1007 нМ⁻¹ мин⁻¹.

Эксперименты по изучению насыщения лигандом проводили при кажущемся равновесии связывания (инкубация 30 мин) и с 10 концентрациями меченного радиоактивным изотопом лиганда. На фиг. 5 приведена кривая насыщения и график Скэтчарда, отражающий связывание [³H] соединения А с крысиным mGlu1a-рецептором CHO-dhfr-мембран. Графики Скэтчарда линейны, что указывает на присутствие одного насыщаемого связывающего сайта с высокой степенью сродства. С помощью нелинейнорегрессионного анализа равносторонней гиперболы установили значение B_{max} 6512 ± 1501 фмоль/мг (фемтомоль/мг) белка и K_D 0,90 ± 0,14 нМ (n=3).

Серии агонистов и антагонистов mGlu1-рецептора тестировали на ингибирование связывания [³H] соединения А с крысиным mGlu1a-рецептором CHO-dhfr-мембран. Кривые ингибирования для некоторых антагонистов приведены на фиг. 6, а значения K_i для всех протестированных соединений перечислены в табл. 11.

Таблица 11. Потенциальные возможности различных агонистов и антагонистов mGlu1-рецептора при ингибировании связывания [³H] соединения А с крысиным mGlu1a-рецептором CHO-dhfr-мембран. Значения K_i и коэффициентов Хилла представляют собой усредненные значения ±SD, полученные в 3-4-х независимых экспериментах.

Соединение	K_i (нМ)	коэффициент Хилла
Соединение А	1,35±0,99	0,94±0,04
NPS 2390	1,36±0,50	0,97±0,02
BAY 36-7620	11,2±0,93	0,95±0,02
CPCCOEt	4,900±170	0,93±0,03
глутамат	> 1000000	
квисквалат	> 1000000	
1S,3R-ACPD	> 1000000	
(S)-3,5-DHPG	> 1000000	
LY367385	> 1000000	
(S)-4C3HPG	> 1000000	
AIDA	> 1000000	
(S)-4CPG	> 1000000	
MCPG	> 1000000	

Примечательно, что все лиганды, которые связываются с глутаматсвязывающим сайтом, то есть глутамат, квисквалат, 1S,3R-ACPD, (S)-3,5-DHPG, LY-367385, (S)-4C3HPG, (S)-4CPG, MCPG и AIDA не ингибировали связывание [³H] соединения А. Напротив, неконкурентные антагонисты mGlu1-рецептора CPCCOEt, BAY 36-7 620, NPS 2390 и соединение А ингибировали связывание [³H] соединения А с крысиным mGlu1a-рецептором CHO-dhfr-мембран с потенциальными возможностями (активностями), в общем случае согласующимися с их потенциальными возможностями по ингибированию функции mGlu1a-рецептора. Соединение А и NPS 2390 проявляли самое высокое сродство, соответственно с K_i 1,35 ± 0,99 и 1,36 ± 0,50 нМ. BAY 36-7 620 ингибировал связывание также при наномолярных концентрациях, тогда как CPCCOEt вытеснял ([³H] соединение А) при микромолярных концентрациях.

Авторы также исследовали специфичность [^3H] соединения А при связывании с mGlu1-рецептором в сравнении с mGlu2-, 3-, 4-, 5- и 6-рецепторами. Когда применяли мембраны, полученные из CHO-dhfr-клеток, экспрессирующих Glu2, mGlu3 или mGlu6-рецептор, с помощью [^3H]LY341495 обнаружили соответственно 95, 98 и 40%-ое специфическое связывание. [^3H]МРЕР, применяемый в качестве позитивного контроля для mGlu5-рецептора, продуцировал 95%-ое специфическое связывание с мембранами, содержащими крысиный mGlu5-рецептор. Общее связывание 20 нМ [^3H] соединения А с мембранами, полученными из CHO-dhfr-клеток, экспрессирующих крысиный mGlu2-, 3-, 4-, 5- или 6-рецептор, было не выше, чем связывание с мембранами CHO-dhfr-клеток дикого типа, но и не выше, чем неспецифическое связывание с крысиным mGlu1a-рецептором на CHO-dhfr-мембранах. Кроме того, исследовали специфическое связывание [^3H] соединения А с указанными мембранами, применяя различные контрольные соединения: 1 мкМ соединения 135, которое, как ожидается, связывается с тем же сайтом, что соединение А, глутамат и L-SOP, которые связываются с глутаматсвязывающим «карманом», и МРЕР, который связывается с аллостерическим сайтом на mGlu5-рецепторе (см. таблицу 12). Ни одно из указанных контрольных соединений не вытесняет [^3H] соединение А. В совокупности полученные данные говорят о специфичности [^3H] соединения А по отношению к mGlu1-рецептору по сравнению с подтипами mGlu2, 3-, 4-, 5- и 6-рецептора.

Таблица 12: [^3H] соединение А является специфическим по отношению к mGlu1-рецептору по сравнению с mGlu2-, 3-, 4-, 5-или 6-рецептором. Специфическое связывание 20 нМ [^3H] соединения А с 40 мкг мембран (CHO-dhfr)-клеток дикого типа или CHO-dhfr-клеток, экспрессирующих крысиный mGlu2-, 3-, 4-, 5- или 6-рецептор, сравнивали со связыванием 10 нМ [^3H] соединения А с 20 мкг CHO-dhfr-мембран, содержащих крысиный mGlu1a-рецептор. Для определения неспецифического связывания применяли различные соединения. Данные по специфическому связыванию (SB) с крысиным mGlu1a-рецептором CHO-dhfr-мембран представляют собой усредненное значение $\pm\text{SD}$ 3-х экспериментов, проводимых дважды.

Другие данные по SB представляют усредненное значение двух определений из одного эксперимента (ND означает «не определяли»).

SB (фмоль/мг белка)	mGlu1	дикий тип	mGlu2	mGlu3	mGlu4	mGlu5	mGlu6
Соединение	6057 $\pm$	65	0	0	82	38	0
135	1456	ND	34 ^a	0 ^a	57 ^b	0 ^c	0 ^a
в качестве контрольного							
Различные контрольные соединения	ND						

^a) для определения неспецифического связывания применяли 1 мМ глутамата;

^b) для определения неспецифического связывания применяли 0,1 мМ L-SOP;

^c) для определения неспецифического связывания применяли 10 мкМ МРЕР.

Сравнение со связыванием [^3H] квискалата. Эксперименты по изучению насыщения связывания проводили с применением 30 мкг белка на инкубат и 10 концентраций (1, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120 и 150 нМ) [^3H]квискалата, агониста Glu1-рецептора (фиг. 7). При статистической обработке кривых обнаружили один связывающий сайт со значениями K_D и $B_{\max}$ $22,0 \pm 10$ нМ и 3912 ± 436 фмоль/мг белка, соответственно ($n=3$). Очевидно, что [^3H] соединение А связывается с mGlu1a с намного более высоким сродством, чем [^3H]квискалат. Количество сайтов связывания, меченных [^3H]квискалатом, составляло ~60% от количества сайтов связывания, меченных [^3H] соединением А.

Проводили оценку ингибиторного действия тех же соединений на связывание [^3H]квискалата с крысиным mGlu1a-рецептором CHO-dhfr мембран. Потенциальные возможности для ингибирования протестированных агонистов и антагонистов, а также коэффициенты Хилла приведены в табл. 13. В этом случае соединения, применяемые (известные) для обнаружения конкурентного взаимодействия с глутаматом, ингибировали связывание [^3H]квискалата, тогда как CPCCOEt, BAY 36-7620 и NPS 2:390 не действовали на связывание [^3H]квискалата. Соединение А также не вытесняет [^3H]квискалат при его связывании с крысиным mGlu1a-рецептором. Конкурентные лиганды mGlu1-рецептора вытесняют [^3H]квискалат при его связывании в следующем порядке их потенциальных возможностей: квискалат > глутамат > LY367385 > (S)-3,5-DHPG > (S)-4C3NPG > 1S,3R-ACPD > (S)-4CPG > AIDA > MCPG.

Таблица 13. Потенциальные возможности различных агонистов и антагонистов mGlu1-рецептора при ингибировании связывания [^3H]квискалата с крысиным mGlu1a-рецептором CHO-dhfr-мембран. Значения K_i и коэффициенты Хилла представляют собой усредненное значение $\pm\text{SD}$ 2-х независимых экспериментов.

Соединение	K_i (мкМ)	коэффициент Хилла
Квисквалат	$0,030 \pm 0,00$	$0,98 \pm 0,01$
Глутамат	$0,40 \pm 0,07$	$0,99 \pm 0,01$
LY367385	$1,18 \pm 0,47$	$0,99 \pm 0,01$
(S)-3,5-DHPG	$1,42 \pm 0,00$	$0,97 \pm 0,00$
(S)-4C3HPG	$1,65 \pm 0,06$	$0,98 \pm 0,02$
1S,3R-ACPD	$1,92 \pm 0,20$	$0,97 \pm 0,01$
(S)-4CPG	$4,51 \pm 0,78$	$0,98 \pm 0,00$
AIDA	$98,3 \pm 15,4$	$0,98 \pm 0,03$
MCPG	$165 \pm 0,47$	$0,96 \pm 0,02$
Соединение А	> 1000	
NPS 2390	> 1000	
BAY 36-7620	> 1000	
CPCCOEt	> 1000	

Характер конкуренции между связыванием CPCCOEt, BAY 36-7620, NPS 2390 и $[^3H]$ соединения А. Тот факт, что все неконкурентные соединения вытесняют $[^3H]$ соединение А при его связывании, не влияя на связывание $[^3H]$ квисквалата, свидетельствует о том, что такие антагонисты связываются с сайтом, отличающимся от глутаматсвязывающего сайта. Чтобы оценить, являются ли описанные в литературе соединения CPCCOEt, BAY 36-7620, NPS 2390 и соединение А, недавно идентифицированное как антагонист mGlu1-рецептора, конкурентными для одного и того же сайта или взаимоисключающих сайтов, проводили эксперименты по изучению насыщения с концентрациями $[^3H]$ соединения А от 0,2 до 20 нМ при отсутствии и в присутствии CPCCOEt (30 мкМ), BAY 36-7620 (100 нМ) и NPS 2390 (10 нМ). Присутствие указанных конкурентов не влияло на значения V_{max} , однако вызывало значительное увеличение значения K_D $[^3H]$ соединения А (таблица 14). Сказанное проиллюстрировано на фиг. 8, где данные нанесены на график с применением линейной регрессии. На графиках Скэтчарда полученные прямые линии отсекают на оси Х фактически одинаковые отрезки (то есть, дают значение V_{max}).

Таблица 14. Значения K_D и V_{max} , полученные из анализа кривых насыщения связывания $[^3H]$ соединения А в отсутствие и в присутствии антагонистов mGlu1-рецептора CPCCOEt (30 мкМ), BAY 36-7620 (100 нМ) и NPS 2390 (10 нМ). Значения представляют собой усредненные значения $\pm SD$, полученные в 3-х отдельных экспериментах. Статистический анализ проводили с применением t-критерия Стьюдента (двухстороннего): ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$.

	контрольное	CPCCOEt	BAY 36-7620	NPS 2390
K_D (нМ)	$0,73 \pm 0,09$	$3,17 \pm 0,90^{**}$	$5,21 \pm 1,2^{**}$	$2,90 \pm 0,20^{***}$
V_{max} (фмоль/мг белка)	7284 $\pm$ 970	7009 $\pm$ 1231	5872 $\pm$ 1018	6887 $\pm$ 2804

Связывание $[^3H]$ соединения А в мембранах и срезах мозга крысы. Для изучения связывания рецептора в различных областях мозга крысы применяли $[^3H]$ соединение А, представляющее собой специфический меченый лиганд для mGlu1-рецептора. Мембраны получали из коры головного мозга, стриатума, мозжечка и гиппокампа крысы и измеряли связывание $[^3H]$ соединения А. Неспецифическое связывание в сравнении с общим связыванием составляло 10% в мозжечке, 30% в гиппокампе и 25% в коре головного мозга и стриатуме. Значения K_D и V_{max} определяли для каждой области мозга (таблица 15). Для всех структур значения K_D составляли приблизительно 1 нМ. Значения V_{max} значительно отличаются для разных областей. В мозжечке $[^3H]$ соединением А маркируется удивительно высокое число mGlu1-рецепторов. В стриатуме и гиппокампе маркируется приблизительно 16% от количества сайтов, обнаруженных в мозжечке. В коре головного мозга крысы связывалось только 11% от количества связывающих сайтов в мозжечке. Важно, что связывание $[^3H]$ соединения А также максимально ингибируется при инкубации с 10 мкМ структурно неродственного соединения BAY 36-7620 (фиг. 9). Селективное по отношению к mGlu5-рецептору соединение МРЕР (тестировали вплоть до 30 мкМ) не действовало на связывание $[^3H]$ соединения А с мембранами мозжечка крысы, еще раз указывая на селективность соединения А по отношению к mGlu1-рецептору.

Методом радиолигандной автордиографии распределения $[^3H]$ соединения А при связывании в срезах мозга крысы исследовали более подробно (фиг. 10). Автордиографию $[^3H]$ соединения А исследовали на сагиттальных срезах мозга крысы; неспецифическое связывание определяли с помощью соединения 135 (фиг. 10, рис. А). Очень высокое специфическое связывание наблюдали в молекулярном

слое мозжечка. Умеренный сигнал наблюдали в СА3-области и зубчатой извилине гиппокампального образования, таламусе, обонятельном бугорке, мозжечковой миндалине и черном сетчатом веществе. В коре головного мозга, хвостовом путаме, вентральном паллидуме, прилежащем ядре (accumbens) маркировка была более низкой. Связывание [^3H] соединения А со срезами мозга крысы также полностью ингибировалось при инкубации с ВАУ 36-7620 (фиг. 10, рис.С).

Таблица 15. Константы равновесного связывания, полученные для связывания [^3H] соединения А с мембранами коры головного мозга, гиппокампа, стриатума и мозжечка крысы. Значения K_D и $B_{\max}$ представляют собой усредненные значения $\pm\text{SD}$, полученные по результатам 3-х независимых экспериментов.

	кора	гиппокамп	стриатум	мозжечок
K_D (нМ)	1,04 $\pm$ 0,40	0,72 $\pm$ 0,22	0,84 $\pm$ 0,23	0,99 $\pm$ 0,36
$B_{\max}$ (фмоль/мг белка)	471 $\pm$ 68	688 $\pm$ 125	741 $\pm$ 48	4302 $\pm$ 2042

Обсуждение

До настоящего времени для подтипов mGlu1-рецептора обнаружено всего несколько селективных антагонистов. Было показано, что CPCCOEt (Litschig и др., Mol.Pharmacol., 55: 453-461,1999) и ВАУ 36-7620 с потенциальными возможностями, которые изменяются в диапазоне от микромолярных концентраций для CPCCOEt (6,6 мкМ) до высоких наномолярных концентраций для ВАУ 36-7620 (160 нМ), селективно блокируют mGlu1-рецептор. В настоящем исследовании соединение А идентифицировали в качестве нового антагониста mGlu1-рецептора с потенциальной возможностью функциональной антагонистической активности при низкой наномолярной концентрации по отношению к крысиному mGlu1a-рецептору (21,6 нМ) и человеческому mGlu1a-рецептору (10,4 нМ). Было установлено, что антагонистическое действие соединения А является неконкурентным, так как максимальная активация mGlu1-рецептора, индуцируемая глутаматом, уменьшается в присутствии соединения А. Наблюдаемое в присутствии соединения А увеличение EC_{50} глутамата можно объяснить присутствием свободных рецепторов. В присутствии низких концентраций неконкурентного антагониста кривая зависимости ответа от концентрации будет смещаться вправо, так как для возмещения «несвободных» рецепторов, которые заблокированы антагонистом, необходимо больше агониста. Такие концентрации антагониста еще не будут действовать на максимальный ответ агониста, в то время как более высокие концентрации антагониста, в конечном счете, будут подавлять максимальный ответ (Zhu и др., J.Pharm.Tox.Meth., 29: 85-91,1993). Такое явление также описано для ВАУ 36-7620 (Carroll и др., Mol.Pharmacol. 59: 965-973,2001) и CPCCOEt (Hermans и др., Neuropharmacology, 37: 1645-1647,1998). Полученные данные, кроме того, показывают, что соединение А может действовать как обратный агонист по отношению к mGlu1a-рецептору, и что по отношению к другим подтипам mGlu-рецептора и ионотропным глутаматным рецепторам соединение А действует на mGlu1-рецептор селективно. Данные по исследованию передачи сигнала показали, что соединение А не оказывает агонистического, антагонистического или положительного аллостерического действия на mGlu2-, 3-, 4-, 5- и 6-рецептор, а исследование радиолигандного связывания показало, что [^3H] соединение А не связывается с mGlu2-, 3-, 4-, 5- и 6-рецептором, более того, исключена возможность, что соединение А действует как нейтральный лиганд по отношению к любому из типов данного рецептора. Отсутствие меченых лигандов, селективных к mGlu1-рецептору, вместе с представляющими интерес фармакологическими свойствами соединения А являются неопровержимыми доводами для применения меченого радиоактивными изотопами соединения А для исследования mGlu1-рецепторов при изучении связывания.

[^3H] соединение А при связывании отвечает всем требованиям, предъявляемым к лиганду, очень хорошо подходит для изучения характеристик связывания, фармакологии и распределения mGlu1-рецепторов. Первоначально исследование связывания [^3H] соединения А проводили на крысином mGlu1a-рецепторе CHO-dhfr-мембран. Специфическое связывание было очень высоким и линейно увеличивалось с концентрацией белка (фиг. 2). Специфическое связывание умеренно увеличивалось в присутствии MgCl_2 и CaCl_2 , тогда как при pH 6 связывание уменьшалось на 22% и не изменялось с увеличением pH. Относительно влияния pH на связывание, стоит заметить, что расчетные физико-химические характеристики соединения А следующие: расчетные pK_a и clogP равны соответственно 6,2 и 4,5. Таким образом, при pH 7,4 степень ионизации соединения А очень низкая (только 5,9%). При более высоком pH процент ионизации уменьшается еще больше (1,6% при pH 8, 0,2% при pH 9, и при pH 10 протонирование отсутствует). Значение clogD остается равным 4,5 при значениях pH от 7,4 до 10. Однако при pH 6 61,3% соединения А находится в протонированной форме. Соответственно, clogD уменьшается до 4,1. Более низкое связывание лиганда в ионизированной форме позволяет предположить, что при связывании самым высоким сродством обладает неионизированный лиганд. Это удивительно по сравнению с данными, полученными для лигандов моноаминовых рецепторов, связанных с G-белком (например, допа-

минового рецептора), которые часто являются сильными основаниями и связываются в катионной форме. Для таких соединений при связывании с рецептором движущей силой является электростатическая по характеру сила (Van de Waterbeemd и др., *J.Med.Chem.* 29: 600-606, 1986). Полученные данные могут указывать на то, что при связывании с рецептором ионные взаимодействия не являются движущей силой и также, что нет вклада ионных поверхностных эффектов. Кроме того, хотя соединение А представляет собой сильно липофильное соединение, очень низкое неспецифическое связывание [^3H] соединения А может быть следствием того, что не происходит никакого электростатического взаимодействия между неионизированной формой соединения А и отрицательно заряженной клеточной мембраной. Связывание зависит от температуры и существенно увеличивается при 4°C (фиг.3). Благодаря быстрой кинетике ассоциации и диссоциации равновесие при связывании достигается быстро. Очевидно, [^3H] соединение А маркирует одну популяцию сайтов с очень высоким сродством ($K_D = 0,90 \pm 0,14$ нМ). Напротив, выбираемый до сих пор [^3H]квискалат, меченный изотопом лиганд mGlu1-рецептора, показал намного более высокое значение K_D $22,0 \pm 10$ нМ, которое хорошо коррелирует со значением 37 нМ, полученным в публикации Mutel и др., *J.Neurochem.* 75: 2590-2 601,2000. Помимо значительно более высокого сродства [^3H] соединения А маркирует значительно больше (~40%) связывающих сайтов, чем [^3H]квискалат. Значения $B_{\max}$, найденные для [^3H] соединения А и [^3H] квискалата, составили соответственно 6512 ± 1501 фмоль/мг белка и 3912 ± 436 фмоль/мг белка. Такое расхождение можно объяснить, исходя из связывания G-белка рецептора. Агонисты облегчают связывание рецептора с G-белком, что приводит к конформации рецептора с высоким сродством к агонистам. Согласно данной теории, полный агонист, такой как квискалат, преимущественно будет маркировать рецептор, находящийся в состоянии высокого сродства или связанный с G-белком. Антагонист будет обладать равным сродством к связанному и несвязанному рецептору, следовательно, как к рецептору, находящемуся в состоянии высокого сродства, так и к рецептору, находящемуся в состоянии низкого сродства.

Полученные данные о том, что $B_{\max}$ для [^3H] соединения А является значительно более высоким, чем для [^3H]квискалата, находятся в соответствии с описанной теорией.

Поразительное открытие настоящего исследования заключается в том, что природный агонист глутамат, а также квискалат, неспособны ингибировать связывание [^3H] соединения А с крысиным mGlu1a-рецептором CHO-dhfr-мембран, тогда как CPCCOEt, 3AY 36-7620, NPS 2390 и соединение А, известные в качестве неконкурентных антагонистов, все ингибируют связывание [^3H] соединения А до одинакового максимального уровня (фиг. 6). Ингибирование связывания [^3H] соединения А перечисленными соединениями логически вытекает из сигмоидальных кривых с коэффициентами Хилла, равными приблизительно 1,0 (табл. 11), которые никак не указывают на связывание с множественными сайтами. Важно упомянуть, что хотя для определения неспецифического связывания применяли структурно родственный аналог, со структурно неродственными соединениями, такими как BAY 36-7 620, получали такое же низкое неспецифическое связывание, когда их применяли при концентрации 1 мкМ или более для крысиного mGlu1a-рецептора CHO-dhfr-мембран (фиг. 6). Для [^3H]квискалата все структуры, подобные аминокислотам, известные как конкурентные лиганды, могут вытеснять [^3H]квискалат с его связывающего сайта. Потенциальные возможности квискалата, глутамата, LY367385, (S)-3,5-DHPG, (S)-4C3NPG, 1S, 3R-ACPD, (S)-4CPG, AIDA и MCPG (таблица 13) для ингибирования хорошо согласуются со значениями, о которых сообщается в публикации Mutel и др., *J.Neurochem.* 75: 2590-2601,2000. Напротив, описанные выше неконкурентные соединения не влияют на его связывание. Относительно CPCCOEt сообщалось, что данное соединение не влияет на связывание [^3H]глутамата с мембранами, полученными из клеток, экспрессирующих крысиный mGlu1a-рецептор (Litschig и др., *Mol.Pharmacol.* 55: 453-461,1999). Кроме того, считается, что CPCCOEt не связывается с глутаматным связывающим сайтом, но взаимодействует с Thr815 и Ala818 в трансмембранном домене VII. CPCCOEt предлагается в качестве соединения, препятствующего передаче рецепторного сигнала, в результате разрушения внутримолекулярного взаимодействия между глутаматсвязанным внеклеточным доменом и трансмембранным доменом VII. В публикации Caroll. и др. *Mol.Pharmacol.* 59: 965-973,2001 показано, что BAY 36-7620 не вытесняет [^3H]квискалат из глутаматсвязывающего кармана. Показано, что при связывании BAY 36-7620 критическую роль играют от 4 до 7 трансмембранных спиральных участков. Проведенные авторами эксперименты по изучению ингибирования, выполненные с [^3H] соединением А и [^3H]квискалатом, позволяют считать, что CPCCOEt, BAY 36-7620, NPS 2390 связываются с тем же сайтом, что соединение А. Эксперименты по изучению насыщения, в которых [^3H] соединение А применяли при отсутствии и в присутствии 30 мкМ CPCCOEt, 100 нМ BAY 36-7620 и 10 нМ NPS 2390, кроме того, служат доказательством, что данные соединения связываются с одинаковыми или взаимоисключающими сайтами. Значения K_D значительно увеличивались, тогда как значение $B_{\max}$ не изменялось (таблица 14). Полученные результаты показывают, что хотя сродство [^3H] соединения А уменьшается, при высоких концентрациях [^3H] соединение А все еще способно вытеснять при связывании другое соединение с его связывающего сайта, что является типичной характеристикой конкурентного взаимодействия. В заключение следует отметить, что полученные данные служат доказательством того, что CPCCOEt, BAY 36-7620, NPS 2390 и соединение А действуют на сайт, отличающийся от глутаматсвязывающего кармана, возможно они конкурируют за один и тот же трансмембранный сегмент VII.

Прежние исследования связывания mGlu-рецептора группы I в мозге проводили с применением [^3H]глутамата или [^3H]квисквалата (Schoepp и True, *Neurosci.Lett.* 145: 100-104, 1992; Wrigt и др., *J.Neurochem.*, 63: 938-945, 1994; Mutel и др., *J.Neurochem.* 75: 2590-2601, 2000). Данные меченые лиганды при маркировке более чем одного типа глутаматного рецептора имеют недостатки.

Следовательно, для предотвращения маркировки других подтипов метаботропного или ионотропного глутаматного рецептора селективные ингибиторы следует добавлять к инкубационному буферу. До настоящего времени не существовало меченого лиганда, подходящего для исследования специфического связывания и распределения mGlu1-рецептора. Благодаря специфической маркировке mGlu1-рецептора [^3H] соединением А его можно применять, в частности, для исследования нативных mGlu1-рецепторов в мозге крысы или человека. Эксперименты с применением мембран коры головного мозга, гиппокампа, стриатума и мозжечка крысы показали, что специфическое связывание [^3H] соединения А, определенное в присутствии 1 мкМ соединения 135, было высоким, особенно в мозжечке (только 10% неспецифического связывания).

Эксперименты по изучению насыщения вновь показали, что [^3H] соединение А с очень высоким сродством маркирует, очевидно, один связывающий сайт. Для различных областей мозга все найденные значения K_D приблизительно равны 1 нМ (табл.15). Обнаружено поразительное различие значений V_{max} : обширная популяция связывающих сайтов маркировалась в мозжечке, тогда как в гиппокампе, стриатуме и коре головного мозга уровни экспрессии рецептора от умеренного до низкого.

Доказано, что благодаря своей специфичности [^3H] соединение А особенно подходит для исследования распределения mGlu1-рецептора в срезах мозга с применением радиолигандной автордиографии. Автордиография mGlu1-рецептора показывает, что самый высокий уровень специфического связывания mGlu1 присутствует в молекулярном слое мозжечка. Слой гранулярных клеток (нейроцитов) маркировался очень слабо. Такие результаты также обнаружены в публикации Mutel и др., *J.Neurochem.* 75: 2590-2601, 2000, где исследовалось распределение mGlu-рецептора группы I с помощью [^3H]квисквалата. Обильная маркировка происходила в гиппокампальном образовании, дендритной области СА3 вместе с молекулярным слоем зубчатой извилины. В области СА1 происходило очень слабое связывание [^3H] соединения А, хорошо соответствующее иммуногистохимическим данным, приведенным в публикациях Lujan и др., *Eur. J.Neurosci.*, 8:1488-1500, 1996 и Shigemoto и др., *J.Neurosci.*, 17:7503-7522, 1997, где показано, что в дендритных областях СА1 антитело, специфичное по отношению к mGlu5-рецептору в отличие от антитела, специфичного по отношению к mGlu1-рецептору, давало на выходе интенсивное иммунное мечение.

В автордиографических экспериментах с применением [^3H] квисквалата действительно получали окрашивание как в области СА1, так и в области СА3 гиппокампа, указывающее соответственно на связывание как с mGlu1, так и с mGlu5-рецептором (Mutel и др., *J.Neurochem.*, 75: 2590-2601, 2000). Связывание [^3H] соединения А также весьма высоко в таламусе, обонятельном бугорке, мозжечковой миндалине и черном сетчатом веществе и несколько ниже в коре головного мозга, caudate putamen, прилегающем ядре (accumbens) и вентральном паллидуме. Те же структуры маркировали с помощью [^3H]квисквалата (Mutel и др., *J.Neurochem.*, 75: 2590-2601, 2000). Иммуноцитохимические данные по клеточной локализации mGlu1a-рецептора с применением антитела, селективного по отношению к mGlu1a-рецептору, в общем случае также соответствовали полученным в настоящем исследовании данным (Martin и др., *Neuron.*, 9:259-270, 1992). Несмотря на то, что [^3H] соединение А, как ожидается, маркирует все известные до настоящего времени варианты сплайсинга mGlu1-рецептора, распределение варианта сплайсинга 1 может однако отличаться от распределения радиоактивной метки, полученного авторами настоящего изобретения. Например, в области СА3 и хвостовом путамене, которые маркировались меченым лигандом, обнаружено наличие иммунореактивности mGlu1b-рецептора, но отсутствие иммунореактивности mGlu1a-рецептора или слабая иммунореактивность mGlu1a-рецептора (Martin и др., *Neuron*, 9:259-270, 1992; Shigemoto и др., *J.Neurosci.*, 17:7503-7522, 1997; Ferraguti и др., *J.Comp.Neur.*, 400:391-407, 1998). Важно, что при демонстрации идентичности сайтов, маркированных [^3H] соединением А, было обнаружено, что структурно отличающееся соединение ВАУ 36-7620 также полностью вытесняет [^3H] соединение А при связывании с мембранами мозга крысы (фиг. 9), так же как со срезами мозга (фиг. 10), тем самым обеспечивается хорошая гарантия, что ингибируемое связывание является полностью рецептор-специфическим и не относится к структурной группе меченого лиганда.

В настоящей заявке авторы показали, что [^3H] соединение А представляет собой превосходный меченый лиганд для исследования mGlu1-рецепторов в гетерологичной экспрессирующей системе, гомогенатах и срезах крысиного мозга. Можно сделать вывод, что благодаря его минимальному неспецифическому связыванию, его высокому сродству к связыванию и селективности, установленной с помощью маркировки, [^3H] соединение А представляет собой предпочтительный лиганд для дальнейшего исследования mGlu1-рецептора. Применение [^3H] соединения А открывает перспективы для подробного исследования субклеточной и клеточной локализации mGlu1-рецептора и для изучения функциональной роли и регуляции рецептора в различных областях.

Перечень фигур

Фиг. 1 - антагонистический профиль соединения А. Результаты ингибирования мобилизации Ca^{2+} (30 мкМ), индуцируемой глутаматом в СНО-dhfr-клетках, экспрессирующих крысиный mGlu1a-рецептор, представлены на фиг. 1А. Данные выражены в процентах от принятого за 100% сигнала, полученного при применении 30 мкМ глутамата, и представляют собой усредненное значение $\pm\text{SD}$ 3-х экспериментов. На фиг. 1В представлена кривая зависимости ответа от концентрации только одного глутамата или вместе с 20 нМ, 30 нМ, 60 нМ, 100 нМ и 1 мкМ соединения А. Значения представляют собой усредненные значения $\pm\text{SD}$ трехкратных определений в пределах 1-го эксперимента. В дополнительном эксперименте получены те же самые результаты. На фиг. 1С представлено накопление базального IP в присутствии увеличивающихся концентраций соединения А. Значения выражены в виде процента от продукции базального IP в присутствии растворителя, принятой за 100%, и представляют собой усредненные значения $\pm\text{SD}$ 3-х экспериментов, проведенных четырехкратно.

Фиг. 2 - специфическое связывание [^3H] соединения А представляет собой линейную зависимость от количества мембранного белка. От 10 до 50 мкг СНО-dhfr-мембран, содержащих крысиный mGlu1a-рецептор, инкубировали в течение 30 минут на льду с 2,5 нМ [^3H] соединением А. Данные получены на основе типичного эксперимента и выражены в виде усредненных значений $\pm\text{SD}$ трехкратных определений.

Фиг.3 - кривая зависимости связывания [^3H] соединения А с крысиным mGlu1a-рецептором СНО-dhfr-мембран от времени ассоциации. Кинетику ассоциации измеряли при добавлении 2,5 нМ [^3H] соединения А на разные по продолжительности периоды времени перед фильтрованием и определяли при 3-х разных температурах. Данные представляют собой усредненные значения $\pm\text{SD}$ 3-х независимых экспериментов, проводимых дважды.

Фиг. 4 - временная зависимость диссоциации [^3H] соединения А при связывании с крысиным mGlu1a-рецептором СНО-dhfr-мембран при 4°C и 25°C. Образцы инкубировали в течение 30 мин при 4°C или 25°C, затем на период времени, обозначенный для каждой точки на графике, добавляли избыток соединения 135 с последующим ускоренным фильтрованием. Значения представляют собой усредненные значения $\pm\text{SD}$ 2-х независимых экспериментов, проводимых дважды.

Фиг. 5 - типичная кривая насыщения связывания и график Скэтчарда для связывания [^3H] соединения А с крысиным mGlu1a-рецептором СНО-dhfr-мембран. Специфическое связывание (SB), измеренное в присутствии 1 мкМ соединения 135, получали при вычислении разности между общим связыванием (TB) и неспецифическим связыванием (BL). Точки на графике определяли дважды для каждого эксперимента. Эксперимент повторяли 3 раза.

Фиг.6. - ингибирование связывания 2,5 нМ [^3H] соединения А с крысиным mGlu1a-рецептором СНО-dhfr-мембран различными антагонистами mGlu-рецептора. Точки на графике представляют собой % от общего связывания и являются усредненными значениями $\pm\text{SD}$ 3-4-х отдельных экспериментов.

Фиг. 7 - типичная кривая насыщения связывания и график Скэтчарда для связывания [^3H] квискалата с крысиным mGlu1a-рецептором СНО-dhfr-мембран. Точки на графике определяли дважды для каждого эксперимента. Эксперимент повторяли 2 раза.

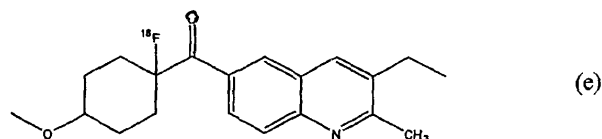
Фиг. 8 - кривые насыщения связывания и графики Скэтчарда для связывания [^3H] соединения А с крысиным mGlu1a-рецептором СНО-dhfr-мембран в отсутствии и в присутствии CPCCOEt (30 мкМ), BAY 36-7620 (100 нМ) и NPS 2390 (10 нМ). На графике представлены данные 3-х независимых экспериментов. Данные выражены в нМ специфического связывания. Точки на графике определяли дважды для каждого эксперимента.

Фиг. 9 - ингибирование соединением BAY 36-7620 связывания 2,5 нМ [^3H] соединения А с мембранами мозжечка крысы. Точки на графике представляют собой % от общего связывания и являются усредненными значениями $\pm\text{SD}$ 2-х отдельных экспериментов.

Фиг. 10 - связывание [^3H] соединения А с сагитальными срезами мозга крысы, определенное с применением автордиографии. На рисунке А представлен типичный срез, на котором показано общее связывание с 1,5 нМ [^3H] соединением А. На рисунке В представлен типичный и непосредственно примыкающий срез, где показано неспецифическое связывание с 1,5 нМ [^3H] соединением А в присутствии 1 мкМ соединения 135. На рисунке С представлен типичный срез, на котором показано неспецифическое связывание с 1,5 нМ [^3H] соединением А в присутствии 10 мкМ BAY 36-7620. Срезы, представленные на рисунках А и В, экспонировали с пленкой [^3H]Hyperfilm, тогда как срез на рисунке С экспонировали с пластинкой Fuji Imaging plate. Th означает таламус; SNr означает черное сетчатое вещество; CA3 означает область гиппокампа CA3; Dg означает зубчатую извилину гиппокампа; Cereb означает мозжечок; Str означает хвостовой путамен; Cx означает кору головного мозга, Opt означает обонятельный бугорок, Am означает мозжечковую миндалину, Vp означает вентральный паллидум, Na означает прилегающее ядро (accumbens).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Меченное радиоактивным изотопом соединение, представляющее собой соединение (е)



2. Радиоактивная композиция для маркировки и идентификации сайтов метаболитного глутаматного рецептора и для визуализации органа для введения млекопитающим, содержащая терапевтически эффективное количество меченного радиоактивным изотопом соединения по п.1 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

3. Применение меченного радиоактивным изотопом соединения по п.1 в качестве диагностического средства.

4. Применение радиоактивной композиции по п.2 в качестве диагностического средства.

5. Применение меченного радиоактивным изотопом соединения по п.1 при получении диагностического средства для маркировки или идентификации mGlu1-рецептора в биологическом материале.

6. Применение радиоактивной композиции по п.2 в качестве активного компонента при получении диагностического средства для маркировки или идентификации mGlu1-рецептора в биологическом материале.

7. Способ диагностики, включающий маркировку или идентификацию mGlu1-рецептора в биологическом материале меченным изотопом соединением по п.1.

8. Способ диагностики по п.7, где маркировку осуществляют путем введения меченного изотопом соединения по п.1 в биологический материал и идентификацию осуществляют путем обнаружения эмиссии от указанного меченного радиоактивным изотопом соединения.

9. Способ диагностики, включающий маркировку или идентификацию mGlu1-рецептора в биологическом материале радиоактивной композицией по п.2.

10. Способ диагностики по п.9, где маркировку осуществляют путем введения радиоактивной композиции по п.2 в биологический материал и идентификацию путем обнаружения эмиссии от указанного меченного радиоактивным изотопом соединения.

11. Способ диагностики по любому из пп.7-10, включающий оценку того, способно ли тестируемое соединение располагаться на mGlu1-рецепторе или связываться с mGlu1-рецептором в биологическом материале.

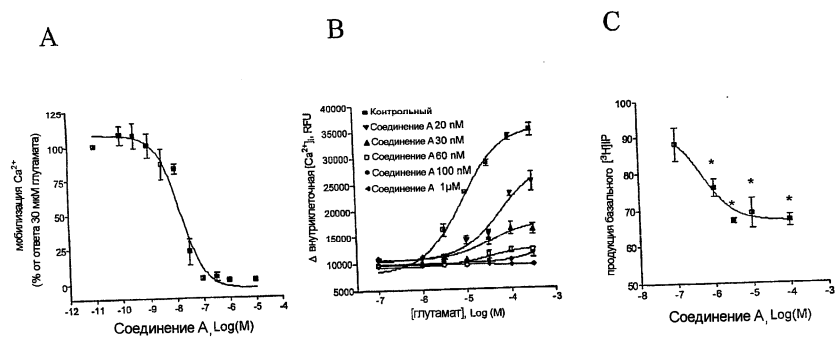
12. Способ диагностики путем визуализации органа, заключающийся в том, что в биологический материал в составе соответствующей композиции вводят меченное радиоактивным изотопом соединение по п.1, в количестве, достаточном для связывания указанного меченного радиоактивным изотопом соединения с сайтами mGlu1-рецептора в биологическом материале; и обнаруживают эмиссию от меченного радиоактивным изотопом соединения.

13. Способ диагностики путем визуализации органа, заключающийся в том, что в биологический материал в составе соответствующей композиции вводят радиоактивную композицию по п.2, в количестве, достаточном для связывания указанного меченного радиоактивным изотопом соединения с сайтами mGlu1-рецептора в биологическом материале; и обнаруживают эмиссию от меченного радиоактивным изотопом соединения.

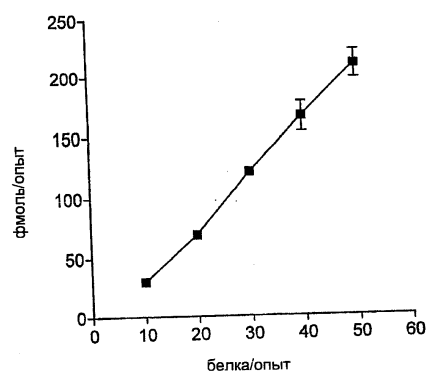
14. Способ диагностики по любому из пп.7-13, где биологический материал выбран из группы, включающей образцы ткани, жидкости плазмы, жидкости организма, части тела и органов, полученных от теплокровных животных и от теплокровных животных как таковых (per se), в частности от человека.

15. Применение меченного радиоактивным изотопом соединения по п.1 для получения диагностического средства для оценки того, обладает ли тестируемое соединения способностью располагаться на mGlu1-рецепторе или связываться с mGlu1-рецептором в биологическом материале.

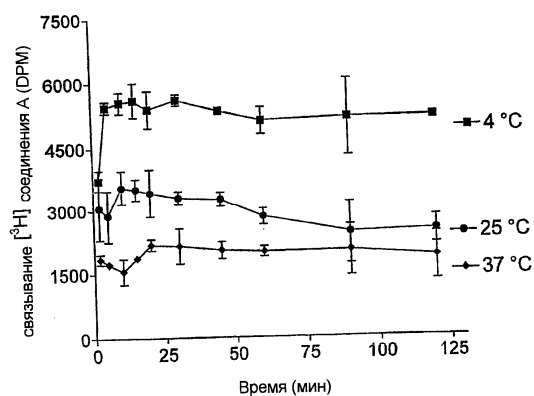
16. Применение радиоактивной композиции по п.2 для получения диагностического средства для оценки того, обладает ли тестируемое соединения способностью располагаться на mGlu1-рецепторе или связываться с mGlu1-рецептором в биологическом материале.



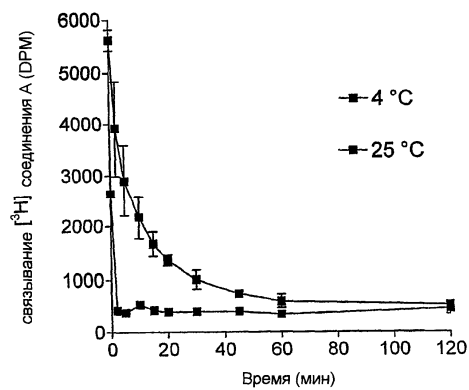
Фиг. 1



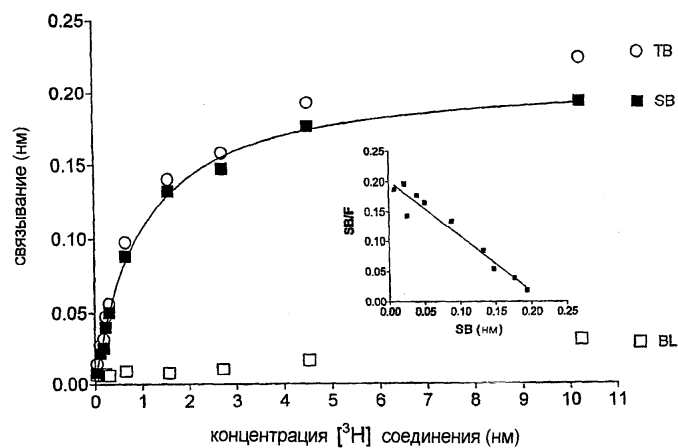
Фиг. 2



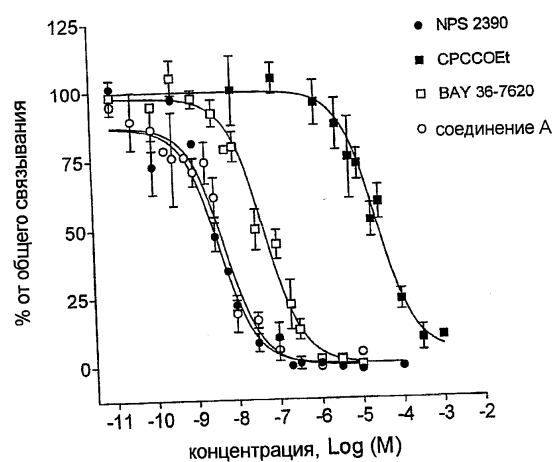
Фиг. 3



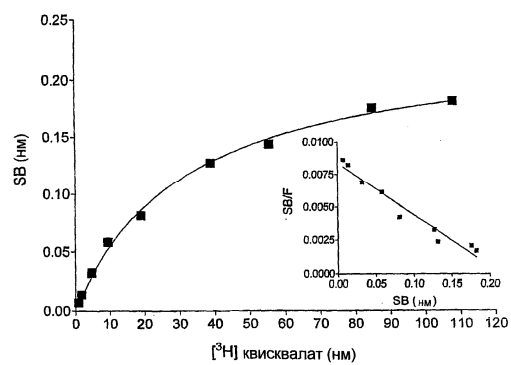
Фиг. 4



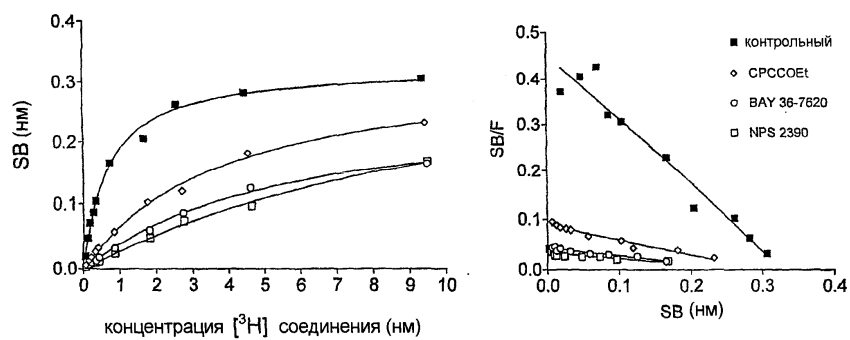
Фиг. 5



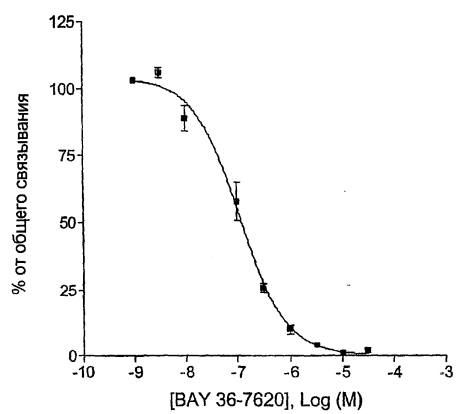
Фиг. 6



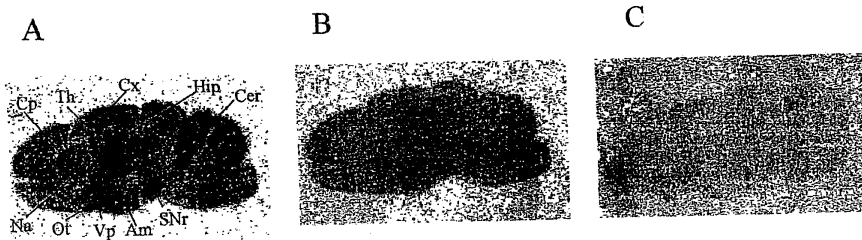
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2/6