

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 915734 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 915734

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07H 19/167

(22) Tekemispäivä - Ingningsdag - Filing date 05.12.1991

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 05.12.1991

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 08.06.1992

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

07.12.1990 DE 4039060

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Novartis AG, Schwarzwaldallee 215, 4058 BASEL, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Gadiant, Fulvio, Switzerland, SVEITSI, (CH)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Papula Oy, Mechelininkatu 1 a, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä 6-sykloheksyyli-2'-0-metyyli-adenosiinin valmistamiseksi

Förfarande för framställning av 6-cykloheksyl-2'0-metyladenosiin

UUSI KIDEMUOTO

Tähän samaan kategoriaan kuuluu...

Keksintö koskee 6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiinin uutta kidemuotoa.

5 6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiini ja sen farmakologiset ominaisuudet tunnetaan patenttijulkaisusta UK 2226027 A. Yhdisteen valmistusmenetelmä on kuvattu tässä UK-julkaisussa ja menetelmällä saatu 6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiini sisältää 1 mol
10 eetteriä 1 mol yhdistettä kohden ja se sulaa 90 - 94°C:ssa.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti on keksitty, että 6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiini on puhtaampaa, kun se saadaan hydraatin muodossa kuin tun-
15 netun eteraatin muodossa, ja tällöin se on lisäksi oleellisesti parempi käytettäväksi galeenista antoa varten.

6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiinin hydraatti valmistetaan kiteyttämällä tunnettu 6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiinin monoeteraatti vesipi-
20 toisesta liuottimesta.

6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiinin edullinen hydraatti on 1.5 hydraatti.

6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiinin 1.5
25 hydraatti valmistetaan uudelleenkiteyttämällä tunnettu 6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiinimonoeteraatti etyylialkoholin ja veden seoksesta.

Seuraavassa esimerkissä, jossa on kuvattu 6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiinin 1.5 hydraatin
30 valmistus, kaikki lämpötilat on annettu Celsius-asteina ja ne ovat korjaamattomia.

0.7 g 6-kloori-9-purinyyli-2'-O-metyyli-D-riboosia kuumennetaan 80°:ssa 2 h ajan 30 ml sykloheksyyliamiinissa. Sitten seosta pidetään alipaineessa,
35 kunnes se on kuiva, ja jäännöstä eluoidaan silikageelillä käyttäen metyleenikloridi/etyylialkoholin 95:5 seosta. Puhdistettu tuote sitten kiteytetään mety-

leenikloridi/dietyylieetteristä. Koska tuote sisältää dietyylieetteriä, jota ei pystytä poistamaan edes korkeavakuuissa, monoeteraatin muodossa oleva 6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiini kiteytetään uudelleen etyylialkoholi/vedestä. 6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiini kiteytyy tällöin 1.5 hydraattina. Sen sulamispiste on 88 - 91°, $[\alpha]_D^{20} = -57.2^\circ$ (c = 1 dimetyyli-formamidissa).

10 Alkuaineanalyysi

Laskettu: C: 52,3%

H: 7,2%

N: 17,9%

15 O: 22,5%

Havaittu: C: 52,5%

H: 7,2%

N: 18,0%

20 O: 22,4%

Tämän 1.5 hydraatin IR-spektri, DSC-termisen analyysin tulos ja NMR-analyysin tulos on esitetty kuvissa 1, 2 ja 3. Näiden määrityksien tulokset sekä
25 alkuaineanalyysin tulokset osoittavat, että edellä mainitulla menetelmällä on valmistetaan 6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiini.1.5 hydraattia.

Keksinnön mukaisesti saadulla 6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiini 1.5 hydraatilla on samat farmakologiset ominaisuudet kuin vastaavalla monoeteraattilla, mutta - kuten edellä on tuotu esiin - 1.5 hydraatin etuna on parantunut puhtaus ja parantunut käyttökelpoisuus galeenista prosessointia varten.

6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiini.hyd-
35 raattia, erityisesti 1.5 hydraattia, voidaan käyttää julkaisussa UK 2226027 A kuvattuihin sovellutuksiin ja lisäksi neurogeneratiivisten häiriöiden, eräiden peri-

feraalisten hermostosairauksien kuten diabeettisen neuropatian hoitoon sekä häiriöiden hoitoon, joihin liittyy perifeeraalinen vaskulaarinen sairaus ja/tai hermosolujen degeneraatio, hypertriglyseridemia, kohonneet vapaiden rasvahappojen arvot ja/tai tyyppi I ja tyyppi II diabetes, rytmihäiriöt, ja edelleen suojaamiseen myokardiaalista infarktiota vastaan. Lisäksi yhdisteet ovat aktiivisia sairauksia vastaan, jotka aiheutuvat kohonneesta verenpaineesta, kuten kongesttiiviseen sydämen vajaatoimintaan, myokardiaaliseen infarktiin tai äkilliseen sydämen pysähtymiseen (sudden cardiac death) ja munuaisten vajaatoimintaan, kuten on kuvattu patenttihakemusjulkaisussa EP 378 518.

Yhdisteen käytettävä annos vaihtelee tavalliseen tapaan riippuen häiriöiden vakavuudesta, potilaan painosta ja yhdisteen suhteellisesta tehosta. Yleisenä ohjeena, kuitenkin, sopivat yksikköannokset voivat olla suuruudeltaan 0.1 - 1000 mg, kuten 0.5 - 200, 0.5 - 100 tai 0.5 - 10 mg, esim. 0.5, 1, 2, 3, 4 tai 5 mg; ja tällaiset yksikköannokset voidaan antaa useammin kuin kerran päivässä, esim. 2, 3, 4, 5 tai 6 kertaa päivässä, mutta edullisesti 1 tai 2 kertaa päivässä, siten, että kokonaispäiväannos 70 kg aikuiselle on n. 0.1 - 1000 mg, mikä vastaa n. 0.001 - 20 mg/kg/päivä, kuten 0.007 - 3, 0.007 - 1.4, 0.007 - 0.14 tai 0.01 - 0.5 mg/kg/päivä, esim. 0.01, 0.02, 0.04, 0.05, 0.06, 0.08, 0.1 tai 0.2 mg/kg/päivä; ja tällainen hoito voi jatkua useita viikkoja tai kuukausia.

"Farmaseuttisesti hyväksyttävä" tarkoittaa tässä yhteydessä materiaaleja, jotka soveltuvat sekä ihmis- että eläinkäyttöön.

Yhdisteen aktiivisuus on osoitettu seuraavilla farmakologisilla kokeilla:

35 a) Affiniteetti adenosiniinireseptoreihin nähden

Sian striataalikalvovalmisteet valmistettiin kuten on kuvattu julkaisussa, H. Bruns et al., Molecu-

lar Pharmacology 29 (1986), ss 331-334. ^3H -NECA, joka on ei-selektiivinen adenosinireseptoriagonisti, käytettiin sekä A_1 - että A_2 -reseptoreiden leimaamiseen. IC_{50} -arvot johdettiin siirtokuvaajista painotetulla ei-linearisen pienimmän neliösumman kuvaajan sovituksella
 5 Langmuir-yhtälöön, ja pK_D -arvot laskettiin.

Tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa kirjallisuuden mukaisesti, CPA osoittautui tehokkaaksi ja erittäin selektiiviseksi syrjäyttäjäksi A_1 -reseptoriin sitoutumisessa, CV 1808 oli suhteellisen heikko,
 10 mutta selektiivinen A_2 -reseptoriligandille ja CGS 21680 osoitti suurta tehoa ja selektiivisyyttä A_2 -reseptorille. 6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiini sen 1.5 hydraattimuodossa osoittaa hyvää affiniteettia ja suurta
 15 selektiivisyyttä A_1 -reseptorille.

TAULUKKO: Adenosinireseptoriligandien affiniteetti A_1 - ja A_2 -reseptoreille

	A_1 (K_D ; nM)	A_2 (K_D ; nM)	$A_1:A_2$ n selektiivisyys
20 CPA ^a	0.74 ± 0.01	33 ± 110	1260 6
CV 1808 ^a	2460 ± 757	269 ± 70	0.1 5
CGS 21680 ^a	4360 ± 1080	10 ± 4	0.004 4
25 6-sykloheksyyli-2'-O-metyyliadenosiini 1.5 H ₂ O	23 ± 2	24500 ± 5160	1090 5

CPA^a = Syklopentyyliadenosiini

CV 1808^a = 2-fenyyliaminoadenosiini (Carbohydrates
 30 vol. 81 (1974) ref. 91898 K)

CGS 21680^a = 2-[p-(2-karboksietyyli)fenetyyliamino]-
 5'-N-etyyli-karboksamido-adenosiini (FA-

SEB J, 1989 3 (4) ref. 4770 ja 4773.

b) Rytmihäiriöt

Adenosiinireseptoriaktivaatio vähentää supra-
 5 ventrikulaarisen takykardian ja muiden rytmihäiriöiden
 esiintymistä. Koemenetelmä on esitetty julkaisussa, C.
 Clarke et al., The Pharmaceutical Journal Vol. 244,
 595-597 (1990). Tässä kokeessa käytetään 6-syklohek-
 syyli-2'-O-metyyli-adenosiinia sen 1.5 hydraattimuo-
 10 dossa.

c) Keskimääräinen valtimon verenpaine, bradykardia ja
 perifeeraalinen vasodilaatio (verisuonten laajeneminen)
 nukutetuilla rotilla

15 Kokeet suoritettiin käyttäen Wistar-urosrot-
 tia, joiden paino oli 300-350 g (323 ± 3 g), Inactin-
 nukutuksessa (150 mg/kg i.p.) Schroeder et al. mene-
 telmän mukaisesti (Measurement of the cardiodynamics,
 haemodynamics and the ECG in anesthetized rat, effects
 20 of catecholamines (dopamine and isoproterenol), joka on
 esitetty julkaisussa, Budden et al. "The Rat Electro-
 cardiogram in Pharmacology and Toxicology" Oxford Per-
 gamon Press 1981, 155-9). Katetrit asetettiin oikeaan
 jugulaari- ja oikeaan femoraalilaskimoon, vasempaan
 25 ventrikkeliin (vietiin oikean karotidivaltimon kautta),
 vasempaan femoraalivaltimoon ja aorttaan (vietiin oike-
 an femoraalivaltimon kautta). Seuraavat muuttujat mi-
 tattiin tai laskettiin: systolinen, diastolinen ja
 keskimääräinen valtimon verenpaine (mmHg; vasen femo-
 30 raalivaltimo, Statham-paineanturi P 23 Gb), pulssipaine
 (mmHg), sydämenlyöntinopeus (lyöntiä/min; saatiin ve-
 renpaineokuvaajasta), vasemman ventrikulaaripaineen
 kohoamisnopeus (dP/dt_{max} , mmHg/s; Stathamin paineanturi
 P 23 Gb), sydäimestä työnnetty verimäärä (ml/min/100 g
 35 kehon paino, termolaimennusmenetelmä, oikea jugulaari-
 laskimo ja aortta), perifeeraalinen kokonaisvastus (dy-
 nes $\cdot s \text{ cm}^{-5}$ /100 g kehon paino), ECG kytkentä III. Val-

timon verenpaine, vasen ventrikulaaripaine, dp/dt_{max} , sydämenlyöntinopeus ja elektrokardiogrammi rekisteröitiin jatkuvatoimisesti Schwarzer-polygrafilla. Parametrit mitattiin 30, 20, 10 ja 2 min ennen aineen antoa ja
 5 1, 10, 30 ja 60 min lääkkeen injektioista oikeaan femoraalilaskimoon. 6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiinia sen 1.5 hydraatin muodossa kokeiltiin annoksina 0.003, 0.01 ja 0.03 mg/kg käyttäen viittä eläintä annosta kohden.

10

d) Verivirta iskeemisen luurankolihasen lävitse

Normaaliverenpaineiset rotat (n. 300 g) nukutettiin Evipan Na:lla (160 mg/kg i.p.) ja oikea femoraalinen valtimo ligatoitiin. Kolmen viikon jälkeen
 15 ligaatiosta rotat nukutettiin pentotaalilla (Thiopental-Na, 40 mg/kg i.p.) ja ne asetettiin erityispidikkeisiin fosfokreatiinin (PCr), epäorgaanisen fosfaatin (Pi), ATP:n kolmen fosfaatin sekä fosfomonoestereiden ja sokerifosfaattien resonanssin mittaamiseksi käyttäen
 20 Bruker Biospec 47/15 spektrometriä, joka oli varustettu 15 cm esteettömän reiän 4.7 T horisontaalisella magneetilla. Veren kuljetus oikeaan takajalkaan estettiin väliaikaisesti n. 30 - 40 min ajaksi kiristysiteellä, joka oli järjestetty takajalan yläosan ympärille, kunnes PCr-tasot putosivat n. 1/3:aan alkuperäisestä ta-
 25 sosta. Sitten kiristys poistettiin ja PCr:n palautumisnopeutta (τ_1) seurattiin. Kolmekymmentä minuuttia myöhemmin toistettiin sama koe ilman lääkkeen antoa ja jälkeen lääkkeen laskimonsisäisen annon, esim. tutkimuksen kohteena olevan 6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-
 30 adenosinin 1.5 hydraattimuodon annon, jonka jälkeen PCr-tason (τ_2) palautumisnopeutta seurattiin jälleen. Molempien palautumisaikojen (τ_2 / τ_1) suhde otettiin parametriksi lääkkeen teholle perifereraalisessa veren-
 35 kierrossa. Joihinkin eläimiin saatettiin sympateettista neurotoksiini 6-hydroksidopamiinia femoraalivaltimoliigaation aikana ja niistä määritettiin 6-sykloheksyyli-

2'-O-metyyli-adenosiinin 1.5 hydraattimuodon vaikutus indusoituun perifeeraaliseen vaskulaariseen vajaatoimintaan.

5 e) Glukoosin kuljetus rotan rasvasoluissa (adiposyyteissä)

Rasvasolut eristettiin normaaliravinnolla syötettyjen rottien epididymaalisista rasvapehmusteista kollagenaasidigestiolla. Soluja (lopullinen pitoisuus 2
10 v/v-%) esi-inkuboitiin adenosiinideaminaasilla (1 U/ml), koeaineena käytettävällä, 1.5 hydraattimuodossa olevalla 6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiinilla ja muilla esitetyillä lisäyksillä 30 min ajan 37°C:ssa. Sitten lisättiin [3-³H]-glukoosia (lopullinen pitoisuus
15 50 μM, 0.5 μCi/ml) ja inkubointia jatkettiin vielä 60 min. Radioaktiivisuuden yhdistäminen [3-³H]glukoosista solulipidien sisään (glukoosikuljetuksen mitta) arvioitiin uuttamalla solususpensiota (0.5 ml) 5 ml tolu-
eenipohjaisella tuikeaineella ja sitten suorittamalla
20 nestetuikelaskenta; vesiliukoiset metaboliitit ja [3-³H]-glukoosijäämä jäävät vesifaasiin ja niitä ei todeta.

f) Kohonneina seerumin triglyseridiarvoina karakterisoidut dyslipidemiat

25 Useat kokeet ovat osoittaneet positiivista korrelaatiota seerumin triglyseriditasojen ja sydän-
sepelvaltimosairausriskin (coronary heart disease, CHD) välillä (Julkaisussa Grundy, Cholesterol and Atherosclerosis: Diagnosis and Treatment, Lippincott, Philadelphia (1990)). Kohonneiden triglyseriditasojen vä-
30 hentämisen merkitys CHD-riskin pienentämiseksi tuli esiin Helsinki Heart Study'sta, jonka mukaan gemfi-
brotsiililla hoidon jälkeen vakavien sepelvaltimosai-
raustapauksien suurin vähentyminen tapahtui tyyppi IIB
35 hyperlipideemisillä potilailla, joilla oli koholla sekä LDH-kolesterolitasot että seerumin kokonaisglyseriditasot.

6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiini sen 1.5 hydraattimuodossa tuotti oleelliset ja pitkäaikaiset pudotukset plasman vapaiden rasvahappojen arvoissa ja triglyseridiarvoissa Rhesus-apinoilla.

5

g) Suoja infarktiota vastaan esikuntoutuksella (pre-conditioning)

Esikuntoutuksen (5 min iskemiaa seuraa 10 min palautuminen) ansiosta sydän tulee hyvin resistentiksi infarktiolle myöhemmästä iskemiasta. Koemenetelmä on esitetty artikkelissa, G.S. Liu et al., Circulation 84, 1, 350-356 (1991). Tässä kokeessa 6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiinia käytetään sen 1.5 hydraatin muodossa.

15

PATENTTIVAATIMUKSET

1. 6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiini.hydraatti.

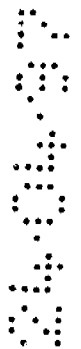
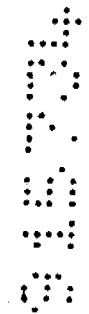
2. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisen
5 6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiini.hydraatin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että 6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiini-monoeteraatti kiteytetään vesipitoisesta liuottimesta.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen 6-
10 sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiini.hydraatti, t u n n e t t u siitä, että hydraatti on 1.5 hydraatti.

4. Menetelmä patenttivaatimuksen 3 mukaisen 6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiinin 1.5 hydraatin
15 valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että 6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiini.monoeteraatti kiteytetään etyylialkoholin ja veden seoksesta.

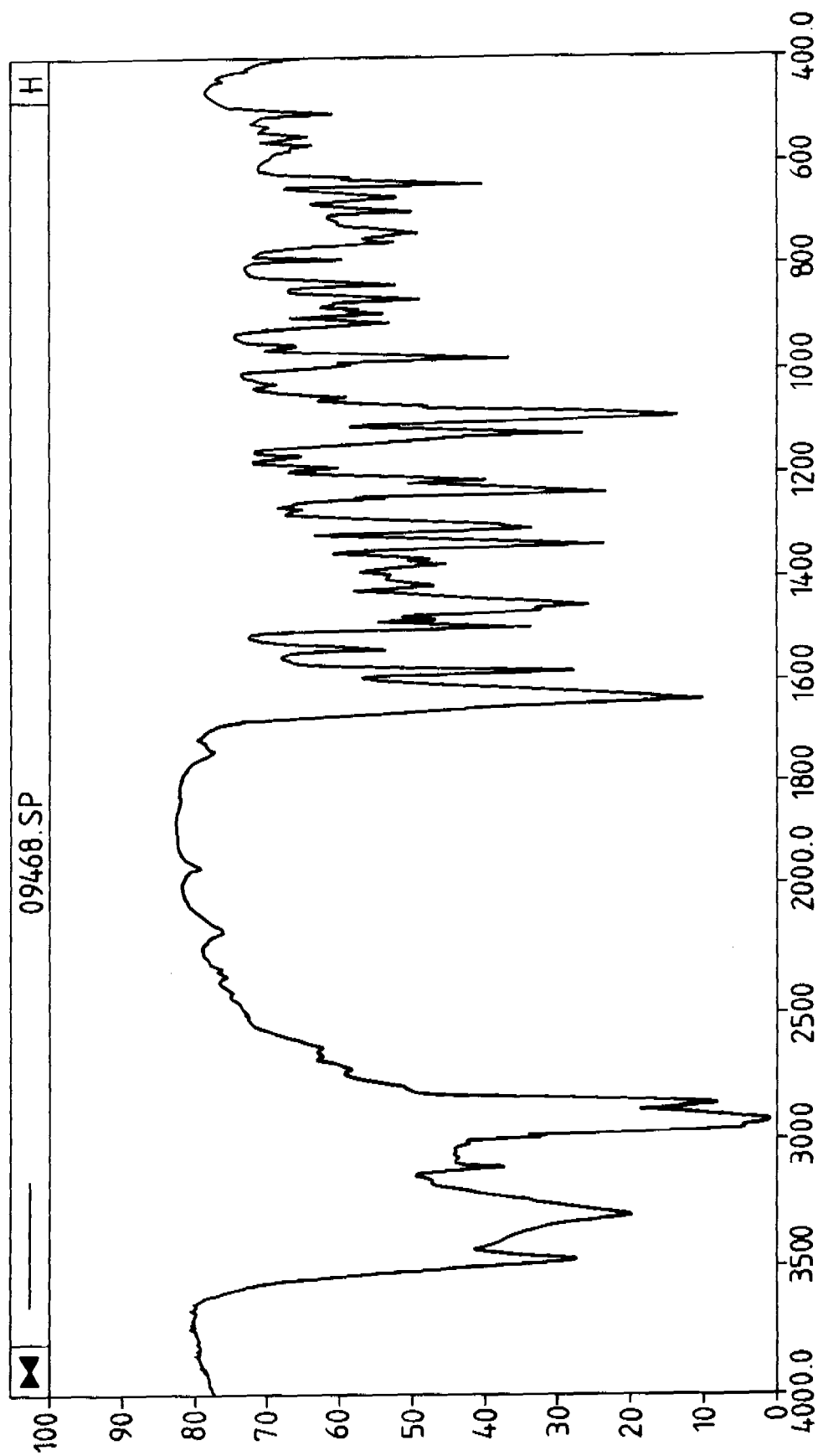
5. Farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u
20 siitä, että koostumus sisältää terapeuttisesti vaikuttavan määrän 6-sykloheksyyli-2'-O-metyyli-adenosiini.hydraattia ja sille sopivaa farmaseuttisesti hyväksyttävää kantajaa, ja että koostumus on tarkoitettu käytettäväksi korkean verenpaineen hoitoon, sepelvaltimoiden laajentajina, sekä trombosyyttiaggregaation
25 että leukosyyttiaktivaation inhibitioon, veren rasvasojen alentamiseen, kongestiivista sydämen vajaatoimintaa vastaan, myokardiaalista infarktiota vastaan, äkillistä sydämen pysähtymistä vastaan, munuaisten vajaatoimintaa vastaan ja edelleen neurodegeneratiivisten häiriöiden, tiettyjen perifeeraalisten hermos-
30 tosairauksien kuten diabeettisen neuropatian hoitoon ja häiriöiden hoitoon, joihin liittyy perifeeraalinen vaskulaarinen sairaus ja/tai hermosolujen degeneraatio, hypertriglyseridemia, kohonneet vapaiden rasvahappojen arvot ja/tai tyyppi I ja tyyppi II diabetes,
35

rytmihäiriöt, sekä suojaamiseen myokardiaalista infarktiota vastaan.



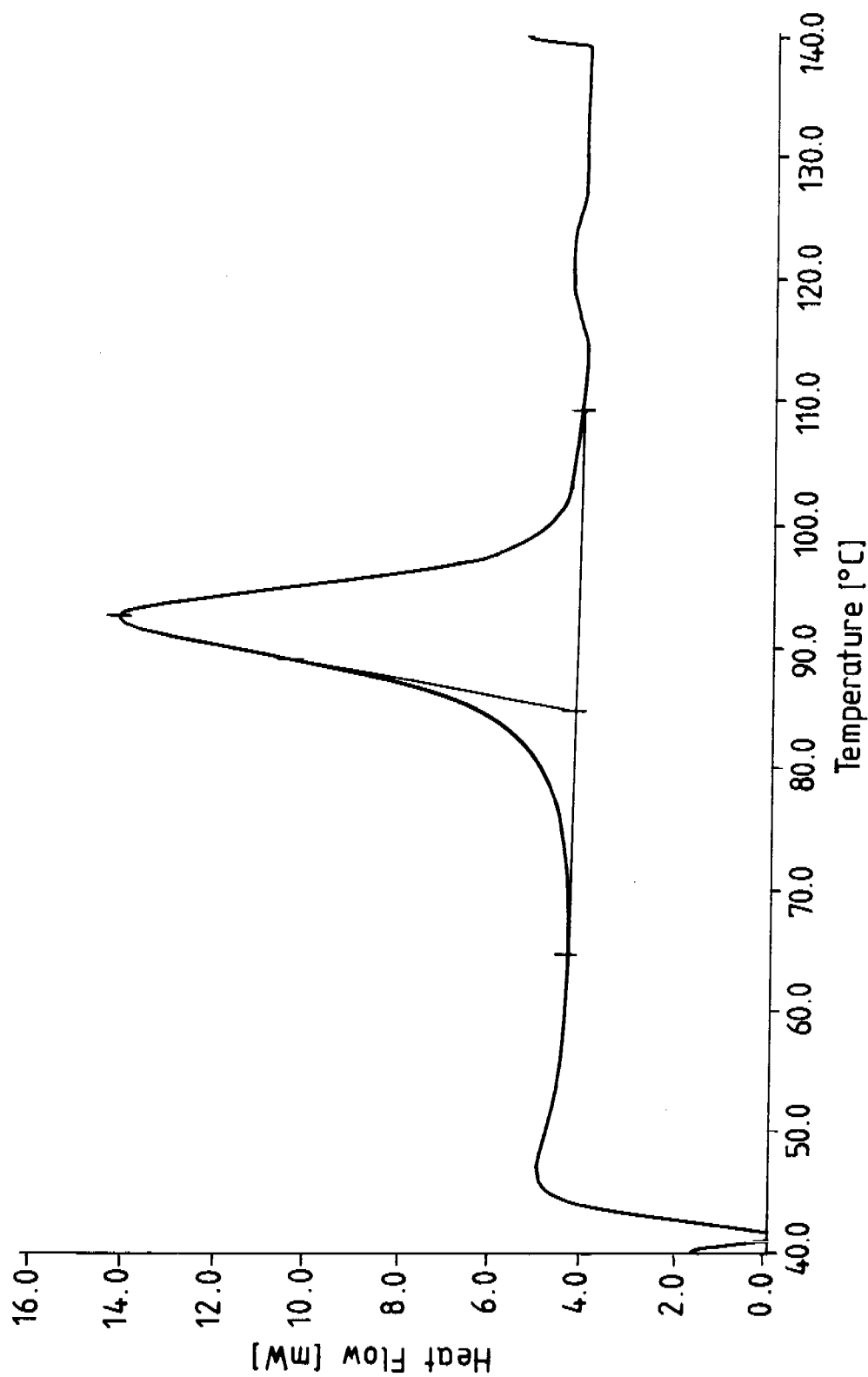
08-10-91 918736

FIG. 1



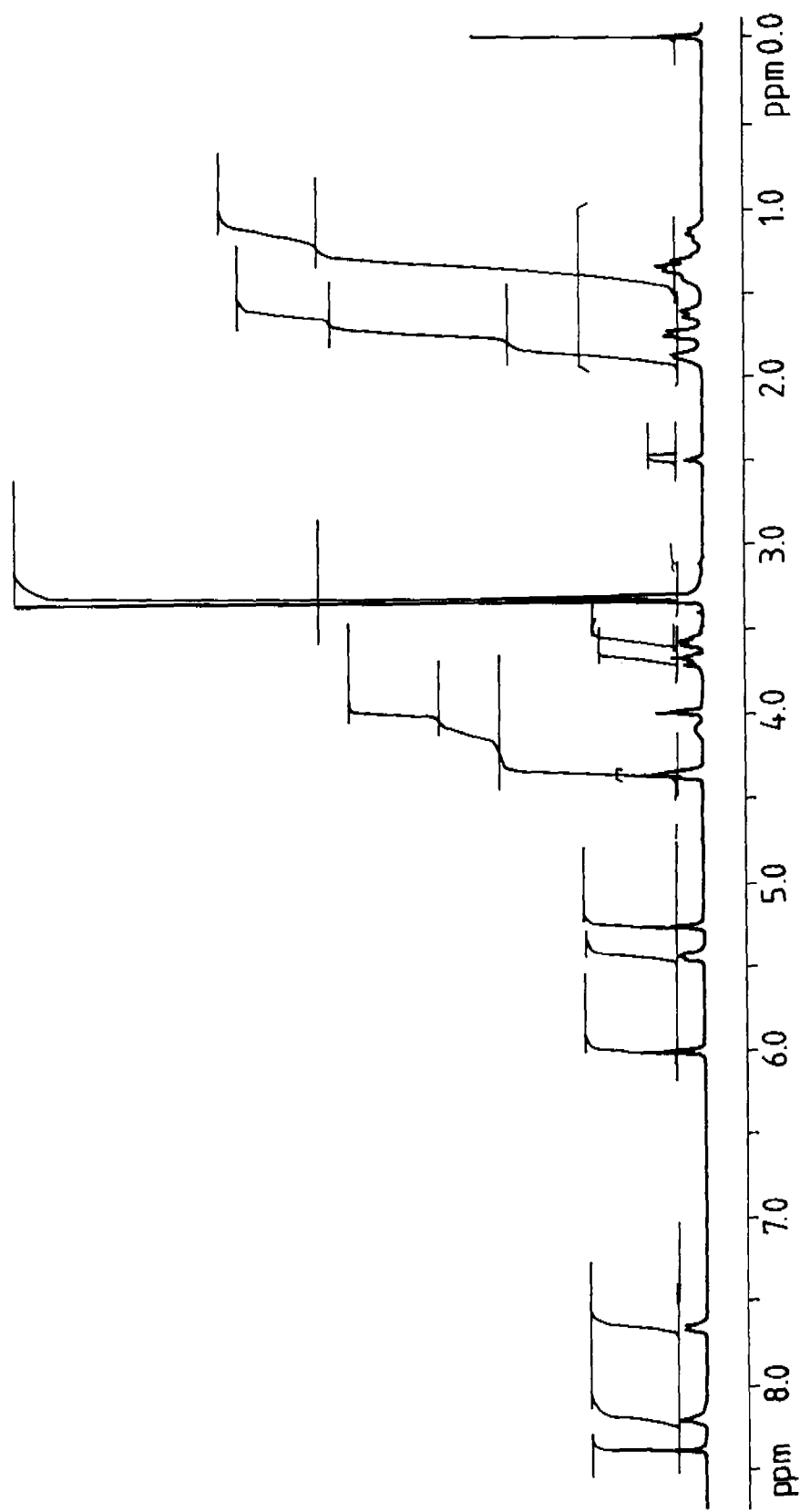
05.12.91 915734

FIG. 2



05-10-91 9:15:06

FIG. 3



PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

Patentti- ja innovaatiolinja

TUTKIMUSRAPORTTI

HAKEMUSNUMERO	LUOKITUS
915734	C07H 19/167
☐ jatkuu kääntöpuolella	

TUTKITTU AINEISTO	
Patenttivirastojen julkaisut FI, SE, NO, DK, DE, CH, EP, WO, GB, US	
C07H 19/16-167, 19/04 A61K 31/70	
☐ jatkuu kääntöpuolella	
Muu aineisto	
EP, US, NO Viitejulkaisut	
☐ jatkuu kääntöpuolella	

VIITEJULKAISUT		
Kategoria*)	Julkaisun tunnistetiedot	Koskee vaatimuksia
☐ jatkuu kääntöpuolella		
*) X Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu yksinään tarkasteltuna Y Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu, kun otetaan huomioon tämä ja yksi tai useampi samaan kategoriaan kuuluva julkaisu A Yleistä tekniikan tasoa edustava julkaisu, ei kuitenkaan patentoitavuuden este		
Päiväys	Tutkija	
27.6.1996	Neli - Järvi	