



österreichisches
patentamt

(10)

AT 414 240 B 2006-10-15

(12)

Patentschrift

(21) Anmeldenummer:

A 9043/99
US99/021103

(51) Int. Cl.⁷: **C07D 487/12**

C07D 239/20, A61K 31/505

(22) Anmeldetag:

1999-09-15

(42) Beginn der Patentdauer:

2006-01-15

(45) Ausgabetag:

2006-10-15

(30) Priorität:

16.09.1998 US 154435 beansprucht.

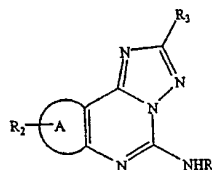
23.08.1999 US 379300 beansprucht.

(73) Patentinhaber:

KING PHARMACEUTICALS RESEARCH
AND DEVELOPMENT, INC.
27709 RESEARCH TRIANGLE PARK
(US).

(54) **ADENOSIN A₃-REZEPTOR-MODULATOREN**

(57) Die Erfindung betrifft Verbindungen der nachstehenden Formel,

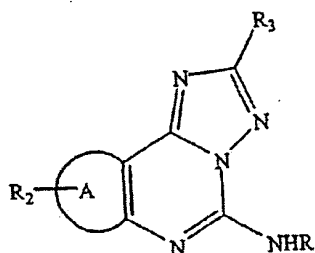


wobei R, R², R³ die in der Beschreibung aufgeführte Bedeutung haben, und A Imidazol, Pyrazol oder Triazol ist. Diese Verbindungen lassen sich markieren, vorzugsweise mit fluoreszierenden oder radioaktiven Markierungen, und die Markierungen können in vivo oder in vitro zum Nachweisen des Vorhandenseins von Tumorzellen, die eine hohe Konzentration von Adenosin A₃-Rezeptoren aufweisen, verwendet werden.

AT 414 240 B 2006-10-15

DVR 0078018

Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen der nachstehenden Formel



wobei A gleich Imidazol, Pyrazol oder Triazol ist, sowie Zusammensetzungen enthaltend diese Verbindungen. Die Erfindung betrifft weiters die Verwendung dieser Verbindungen als Modulatoren von Adenosin A₃-Rezeptoren, nämlich als Tumormarker.

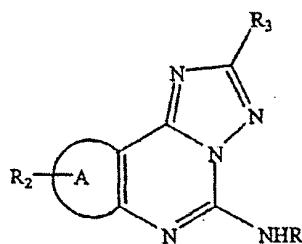
Pharmakologisch wurden drei Adenosinrezeptor-Hauptklassen, die als A₁, A₂ und A₃ bezeichnet werden, charakterisiert. A₁-Rezeptoren sind an der Hemmung der Adenylatcyclase über G_i-Proteine beteiligt. Es wurde gezeigt, dass sie auch an anderen Second-messenger-Systemen, einschließlich der Hemmung oder Stimulation des Phosphoinositol-Umsatzes und an der Aktivierung der Ionenkanäle beteiligt sind. A₂ Rezeptoren werden außerdem in zwei Subtypen, A_{2A} und A_{2B} unterteilt, bei denen Adenosinagonisten die Adenylatcyclase mit hoher bzw. niedriger Affinität aktivieren. Die A₃-Rezeptor-Sequenz wurde zuerst in einer Rattenhoden-cDNA-Genbank identifiziert. Diese Sequenz, die später über Homologie an andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aus einer Rattengehirn-cDNA-Genbank kloniert wurden, entsprach einem neuen funktionellen Adenosinrezeptor.

Die Entdeckung des A₃-Rezeptors eröffnete neue therapeutische Perspektiven auf dem Purin-Gebiet. Der A₃-Rezeptor vermittelt insbesondere Entzündungs-, Hypotonie- und Mastzellen-Degranulationsprozesse. Dieser Rezeptor spielt offensichtlich eine Rolle im Zentralnervensystem. Der A₃-selektive Agonist IB-MECA induziert depressives Verhalten und schützt bei chronischer Verabreichung gegen cerebraler Ischämie. Es hat sich ebenfalls herausgestellt, dass A₃-selektive Agonisten in hoher Konzentration die Apoptose in menschlichen HL-60-Leukämiezellen induzieren. Aufgrund dieser und anderer Befunde ist der A₃-Rezeptor zu einem vielversprechenden Therapieziel geworden. Als potentielle antiinflammatorische oder mögliche antiischämische Mittel im Gehirn sucht man nach selektiven Antagonisten für den A₃-Rezeptor. Seit neuem werden A₃-Antagonisten als antiasthmatische, antidepressive, antiarrhythmische, nierenschützende, Antiparkinson- und cognitive Verstärkungs-Medikamente entwickelt.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher die Bereitstellung von Verbindungen und deren Herstellungsverfahren und Verwendung als Modulatoren von Adenosin-A₃-Rezeptoren.

Erfindungsgemäß werden Verbindungen der nachstehenden

Formel



angegeben, wobei

A Imidazol, Pyrazol oder Triazol ist;

R $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{R}'-\text{X}'$ oder $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{R}'-\text{X}'$ ist;

5 R' Phenyl oder ein 5- oder 6-gliedriger aromatischer, heterocyclischer Ring, der ein oder mehrere Heteroatome, die aus der Gruppe bestehend aus N, O und S, ausgewählt sind, enthält;

X' Wasserstoff, Alkoxy oder Halogen ist;

10 R² Wasserstoff, gerades oder verzweigtes oder cyclisches Alkyl, Alkenyl, Arylalkyl, substituiertes Arylalkyl oder Aryl bedeutet;

R³ Furyl ist, gegebenenfalls substituiert mit einem oder mehreren Substituenten ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Hydroxy-, Acyl-, Alkyl-, Alkoxy-, Alkenyl-, Alkynyl-, substituiertes Alkyl, substituiertes Alkoxy, substituiertes Alkenyl, substituiertes Alkynyl, Amino, substituiertes Amino, Aminoacyl, Acyloxy, Acylamino, Alkaryl, Aryl, Aryloxy, Azido, Carboxyl, Carboxylalkyl, 15 Cyano, Halo, Nitro, Heteroaryl, Heteroaryloxy, einem heterocyclischen Rest, Heterocycloxy, Aminoacyloxy, Oxyacylamino, Thioalkoxy, substituiertes Thioalkoxy, Thioaryloxy, Thioheteroaryloxy, $-\text{SO}-\text{Alkyl}$, $-\text{SO}-\text{substituiertes Alkyl}$, $-\text{SO}-\text{Aryl}$, $-\text{SO}-\text{Heteroaryl}$, $-\text{SO}_2-\text{Alkyl}$, $-\text{SO}_2-\text{substituiertes Alkyl}$, $-\text{SO}_2-\text{Aryl}$, $\text{SO}_2-\text{Heteroaryl}$ und Trihalo- methyl; sowie pharmazeutisch verträgliche Salze davon.

20 Weitere vorteilhafte Verbindungen sind gemäß Unteransprüche 2 bis 5 offenbart.

Die Erfindung betrifft weiters eine Zusammensetzung enthaltend eine der erfindungsgemäßen Verbindungen in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger. Weitere Ausgestaltungen dieser Zusammensetzung sind gemäß Unteransprüche 7 bis 9 offenbart. Bei radioaktiver oder fluoreszierender Markierung werden die genannten Verbindungen erfindungsgemäß als Tumormarker eingesetzt. Die Erfindung betrifft weiters ein Verfahren zum Nachweisen von Tumorzellen, die eine hohe Konzentration von Adenosin-A₃-Rezeptoren aufweisen, in einer Zellprobe, umfassend folgende Schritte:

30 a) Herstellen einer Suspension der Zellen in einem Zellkulturmedium;

b) Zugabe einer Verbindung nach Anspruch 4 oder 5 zu der gemäß Schritt a) hergestellten Suspension

c) Inkubieren der Suspension

35 d) Abtrennen der Zellen aus der Suspension, wobei

e1) durch das Abtrennen markierter Zellen ein positiver Nachweis oder

e2) durch das Abtrennen nicht markierter Zellen ein negativer Nachweis für das Vorhandensein von Tumorzellen, die eine hohe Konzentration von Adenosin-A₃-Rezeptoren aufweisen, erbracht wird.

40 Die Erfindung wird im folgenden anhand der Figuren 1 bis 4, anhand von beispielhaften Ausführungen sowie Vergleichsbeispielen zum Stand der Technik weiter erläutert.

45 Figur 1 ist eine graphische Darstellung, welche die Sättigung der [¹²⁵I]AB-MECA-Bindung (fmol/mg Protein) an menschliche A₃-Rezeptoren zeigt, ausgedrückt in HEK-293-Zellen gegen die molare Konzentration von [¹²⁵I]AB-MECA.

50 Figur 2 eine graphische Darstellung, welche die Sättigung der [¹²⁵I]AB-MECA-Bindung (fmol/mg Protein) an menschliche A₃-Rezeptoren zeigt, ausgedrückt in JURKAT-Zelllinie gegen die molare Konzentration von [¹²⁵I]AB-MECA. Die ermittelte Dichte des A₃-Rezeptors betrug der Figur zufolge etwa 300 fmol/mg Protein in Jurkat-Zellmembranen mittels [¹²⁵I]AB-MECA.

55 Die Figuren 3 und 4 sind graphische Darstellungen, welche die Sättigung der Bindung eines trithierten Analogons von Verbindung 47-5-[[[4-Methoxyphenyl]amino]carbonyl]amino-8-propyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (Verbindung 102) (fmol/mg Protein) an

A₃-Rezeptoren zeigt, ausgedrückt als JURKAT-Zelllinie gegen die molare Konzentration von Verbindung 102. Die Daten in diesen Figuren zeigen die Anwesenheit von Adenosin-A₃-Rezeptoren in menschlichen Tumorzellen in hohen Dichten. In Jurkat-Zellen wurden bspw. etwa 1300 fmol/mg Protein nachgewiesen, und in HL-60-Zellen wurden 650 fmol/mg Protein nachgewiesen. Die Verbindung 102 ist daher wahrscheinlich ein viel empfindlicheres Mittel zum Nachweisen von Adenosin-A₃-Rezeptoren als [¹²⁵I]AB-MECA. Diese Befunde haben die Bestimmung des Vorhandenseins von A₃-Rezeptoren in vielen menschlichen Tumoren erleichtert.

Die vorliegende Verbindung offenbart Verbindungen, die sich als leistungsfähige, aber noch selektive Modulatoren von Adenosin-Rezeptoren eignen und als A₃-Agonisten und gelegentlich als A₃-Antagonisten aktiv sind, sowie ihre Herstellungsverfahren und Verwendung.

Die Verbindungen lassen sich in einem Verfahren zur Modulation von Adenosin-A₃-Rezeptoren in einem Säugetier, einschließlich Mensch, verwenden. Die Verfahren beinhalten die Verabreichung einer wirksamen Menge einer Verbindung der Formel I, die zum Mäßigen von Adenosin-A₃-Rezeptoren hinreicht, an den Menschen.

Die Verbindungen lassen sich in einer pharmazeutischen Formulierung, die eine Verbindung der Formel I und einen oder mehrere Exzipienten umfasst, verwenden. Zur Herstellung der Verbindungen lassen sich verschiedene chemische Zwischenprodukte verwenden.

Eine Verbindung, wie hier verwendet, ist ein Agonist des Adenosin A₁-Rezeptors, wenn sie die Adenylatcyclase (A₃) vollständig hemmen kann und [¹²⁵I]-AB-MECA in einem kompetitiven Bindungstest verdrängen kann.

Eine Verbindung, wie hier verwendet, ist ein partieller Agonist eines Adenosin-A₃-Rezeptors, wenn sie die Adenylatcyclase (A₃) partiell hemmen kann und [¹²⁵I]-AB-MECA in einem kompetitiven Bindungstest verdrängen kann.

Eine Verbindung, wie hier verwendet, ist ein Antagonist eines A₃-Rezeptors, wenn sie die Hemmung aufgrund eines Agonisten verhindern kann und [¹²⁵I]-AB-MECA in einem kompetitiven Bindungstest verdrängen kann.

Eine Verbindung, wie hier verwendet, ist selektiv für den A₃-Rezeptor, wenn das Verhältnis von A₁/A₃- und A₂/A₃-Aktivität größer als etwa 50 ist, vorzugsweise zwischen etwa 50 und 100 liegt, und stärker bevorzugt größer als etwa 100 ist.

Der Begriff "Alkyl", wie hier verwendet, betrifft einwertige gerade, verzweigte oder cyclische Alkylreste mit vorzugsweise 1 bis 20 Kohlenstoffatomen, stärker bevorzugt 1 bis 10 Kohlenstoffatomen ("Niederalkyl") und am stärksten bevorzugt 1 bis 6 Kohlenstoffatomen. Unter diesen Begriff fallen bspw. Gruppen, wie Methyl-, Ethyl-, n-Propyl-, Isopropyl-, n-Butyl-, Isobutyl-, n-Hexylgruppen und dergleichen. Die Begriffe "Alkylen" und "Niederalkylen" betreffen zweiwertige Reste des entsprechenden Alkans. Andere Einheiten mit von Alkanen abgeleiteten Namen, wie Alkoxy-, Alkanoyl-, Alkenyl-, Cycloalkenyl-, usw. haben weiterhin wie hier verwendet, Kohlenstoffketten mit 10 oder weniger Kohlenstoffatomen, wenn sie durch "Nieder-" modifiziert sind. In Fällen, bei denen die Mindestanzahl an Kohlenstoffatomen größer als 1 ist, bspw. Alkenyl (mindestens 2 Kohlenstoffatome) und Cycloalkyl (mindestens 3 Kohlenstoffatome), bedeutet "Nieder-" zumindest die Mindestanzahl an Kohlenstoffatomen.

Der Begriff "substituiertes Alkyl", wie er hier verwendet wird, betrifft einen Alkylrest, vorzugsweise mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen ("substituiertes Niederalkyl"), der 1 bis 5 Substituenten, vorzugsweise 1 bis 3 Substituenten besitzt, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Alkoxy-, substituierten Alkoxy-, Cycloalkyl, substituierten Cycloalkyl-, Cycloalkenyl-, substituierten Cycloalkenyl-, Acyl-, Acylamino-, Acyloxyresten, Amino-, substituierten Aminogruppen, Aminoacyl-, Aminoacyloxy-, Oxyacylaminoresten, Cyanogruppen, Halogenatomen, Hydroxyl-, Keto-,

Thioketo-, Carboxyl-, Carboxyalkyl-, Thiol-, Thioalkoxy-, substituierten Thioalkoxygruppen, Aryl-, Aryloxy-, Heteroaryl-, Heteroaryloxy-, heterocyclischen Resten, Hydroxyaminogruppen, Alkoxyaminoresten, Nitrogruppen, -SO-Alkyl-, -SO-substituierten Alkyl-, -SO-Aryl-, -SO-Heteroaryl-, -SO₂-Alkyl-, -SO₂-substituierten Alkyl-, -SO₂-Aryl-, -SO₂-Heteroarylresten, sowie Mono- und Dialkylamino-, Mono- und Di-(substituiertes Alkyl)amino-, Mono- und Diarylamino-, Mono- und Diheteroarylamino, Mono- und Diheterocycloaminoreste und unsymmetrische disubstituierte Amine mit unterschiedlichen Substituenten, ausgewählt aus Alkyl-, Aryl-, Heteroaryl- und heterocyclischen Resten. Andere Einheiten mit dem Zusatz "substituiert", wie hier verwendet, sollen einen oder mehrere der vorstehend genannten Substituenten umfassen.

Der Begriff "Alkaryl", wie hier verwendet, betrifft einen Arylrest mit einem Arylsubstituenten. Die Bindung erfolgt über den Alkylrest. "Aralkyl" betrifft einen Arylrest mit einem Alkylsubstituenten, wobei die Bindung über den Arylrest erfolgt.

Der Begriff "Alkoxy", wie er hier verwendet wird, betrifft den Rest "Alkyl-O-", wobei der Arylrest die vorstehend definierte Bedeutung hat. Bevorzugte Alkoxyreste umfassen bspw. Methoxy-, Ethoxy-, n-Propoxy-, Isopropoxy-, n-Butoxy-, tert.-Butoxy, sek.-Butoxy-, n-Pentoxy-, n-Hexoxy-, 1,2-Dimethylbutoxygruppen und dergleichen.

Der Begriff "Alkenyl", wie er hier verwendet wird, betrifft Alkenylreste, mit vorzugsweise 2 bis 10 Kohlenstoffatomen, stärker bevorzugt 2 bis 6 Kohlenstoffatomen und vorzugsweise mit 1 bis 2 Stellen einer Alkenyl-Ungesättigkeit. Bevorzugte Alkenylreste umfassen Ethenyl(-CH=CH₂-), n-Propenyl(-CH₂CH=CH₂-), Isopropenyl(-C(CH₃)=CH₂-)Gruppen und dergleichen.

Der Begriff "Alkynyl", wie er hier verwendet wird, betrifft Alkynylreste mit vorzugsweise 2 bis 10 Kohlenstoffatomen, stärker bevorzugt 2 bis 6 Kohlenstoffatomen und vorzugsweise mit 1 bis 2 Stellen einer Alkynyl-Ungesättigkeit.

Der Begriff "Acyl", wie er hier verwendet wird, betrifft die Reste Alkyl-C(O)-, substituiertes Alkyl-C(O)-, Cycloalkyl-C(O)-, substituiertes Cycloalkyl-C(O)-, Aryl-C(O)-, Heteroaryl-C(O)- und Heterocyclus-C(O), wobei Alkyl, substituiertes Alkyl, Cycloalkyl, substituiertes Cycloalkyl, Aryl, Heteroaryl 1 und heterocyclischer Rest die vorstehend definierte Bedeutung haben.

Der Begriff "Acylarnino", wie er hier verwendet wird, betrifft den Rest -C(O)NRR, wobei jedes R unabhängig ein Wasserstoffatom, ein Alkyl-, substituiertes Alkyl-, Aryl-, Heteroaryl- oder heterocyclischer Rest ist, wobei Alkyl, substituiertes Alkyl, Aryl, Heteroaryl und heterocyclischer Rest die vorstehend definierte Bedeutung haben.

Der Begriff "Aryl", wie er hier verwendet wird, betrifft einen ungesättigten aromatischen carbocyclischen Rest mit 6 bis 14 Kohlenstoffatomen und mit einem einfachen Ring (bspw. Phenyl) oder mehrfach kondensierten Ringen (bspw. Naphthyl oder Anthryl). Bevorzugte Aryle umfassen Phenyl, Naphthyl und dergleichen. Diese Arylreste können, wenn sie nicht durch die Definition für den Arylsubstituenten definiert sind, gegebenenfalls mit 1 bis 5 Substituenten und vorzugsweise 1 bis 3 Substituenten, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Hydroxy-, Acyl-, Alkyl-, Alkoxy-, Alkenyl-, Alkynyl-, substituierten Alkyl-, substituierten Alkoxy-, substituierten Alkenyl-, substituierten Alkynyl-, Amino-, substituierten Amino-, Aminoacyl-, Acyloxy-, Acylamino-, Alkaryl-, Aryl-, Aryloxy-, Azido-, Carboxyl-, Carboxylalkylresten, Cyanogruppen-, Halogenatomen, Nitrogruppen, Heteroaryl-, Heteroaryloxy-, heterocyclischen Resten, Heterocyclooxy-, Aminoacyloxy-, Oxyacylamino-, Thioalkoxy-, substituierten Thioalkoxy-, Thioaryloxy-, Thioheteroaryloxy-, -SO-Alkyl-, -SO-substituierten Alkyl-, -SO-Aryl-, -SO-Heteroaryl-, -SO₂-Alkyl-, -SO₂-substituierten Alkyl-, -SO₂-Aryl-, -SO₂-Heteroaryl-, Trihalogenmethyl-Resten, substituiert sein. Bevorzugte Substituenten umfassen Alkyl, Alkoxy, Halogen, Cyano, Nitro, Trihalogenmethyl und Thioalkoxy.

Der Begriff "Cycloalkyl", wie hier verwendet, betrifft cyclische Alkylreste mit 3 bis 12 Kohlen-

stoffatomen mit einem einfachen cyclischen Ring oder mehrfach kondensierten Ringen. Diese Cycloalkylreste umfassen bspw. Einzelringstrukturen, wie Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclopentyl, Cyclooctyl und dergleichen, oder Mehrfachringstrukturen, wie Adamantyl und dergleichen.

- 5 Die Begriffe "Halo" oder "Halogen", wie hier verwendet, betreffen Fluor, Chlor, Brom und Iod und vorzugsweise entweder Fluor oder Chlor.

Der Begriff "Heteroaryl", wie er hier verwendet wird, betrifft einen aromatischen carbocyclischen Rest mit 1 bis 15 Kohlenstoffatomen und 1 bis 4 Heteroatomen, ausgewählt aus der Gruppe,
10 bestehend aus Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel in mindestens einem Ring (sofern mehr als ein Ring vorhanden ist).

Diese Heteroarylreste können, wenn nicht anderweitig durch die Definition für den Heteroarylsubstituenten definiert ist, gegebenenfalls mit 1 bis 5 Substituenten, vorzugsweise 1 bis 3 Substituenten, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Hydroxy, Acyl, Alkyl, Alkoxy, Alkenyl, Alkynyl, substituiertem Alkyl, substituiertem Alkoxy, substituiertem Alkenyl, substituiertem Alkynyl, Amino, substituiertem Amino, Aminoacyl, Acyloxy, Acylamino, Alkaryl, Aryl, Aryloxy, Azido, Carboxyl, Carboxylalkyl, Cyano, Halogen, Nitro, Heteroaryl, Heteroaryloxy, heterocyclischem Rest, Heterocyclooxy, Aminoacyloxy, Oxyacylamino, Thioalkoxy, substituiertem Thioalkoxy, Thioaryloxy, Thioheteroaryloxy, -SO-Alkyl, -SO-substituiertem Alkyl, -SO-Aryl, -SO-Heteroaryl, SO₂-Alkyl, SO₂ substituiertem Alkyl, SO₂-Aryl, -SO₂-Heteroaryl und Trihalogenmethyl. Bevorzugte Substituenten umfassen Alkyl, Alkoxy, Halogen, Cyano, Nitro, Trihalogenmethyl und Thioalkoxy. Diese Heteroarylreste können einen einfachen Ring (bspw. Pyridyl oder Furyl) oder mehrfach kondensierte Ringe (bspw. Indolizinyll oder Benzothienyl) besitzen.

25 "Heterocyclus" oder "heterocyclisch" betrifft einen einwertigen gesättigten oder ungesättigten Rest mit einem einfachen Ring oder mehrfach kondensierten Ringen und mit 1 bis 15 Kohlenstoffatomen und 1 bis 4 Heteroatomen, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Stickstoff, Schwefel und Sauerstoff im Ring.

30 Diese heterocyclischen Reste können, wenn nicht anderweitig durch die Definition für den heterocyclischen Substituenten definiert, gegebenenfalls mit 1 bis 5 Substituenten, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Alkyl, substituiertem Alkyl, Alkoxy, substituiertem Alkoxy, Aryl, Aryloxy, Halogen, Nitro, Heteroaryl, Thiol, Thioalkoxy, substituiertem Thioalkoxy, Thioaryloxy, Trihalogenmethyl und dergleichen substituiert sein. Diese heterocyclischen Reste können einen einfachen Ring oder mehrfach kondensierte Ringe aufweisen.

Für alle vorstehend genannte Reste, die 1 oder mehrere Substituenten enthalten, gilt selbstverständlich, dass diese Gruppen keine Substitution oder kein Substitutionsmuster, die sterisch unpraktisch und/oder synthetisch nicht durchführbar sind, enthalten.

45 "Carbonsäure-Derivate" und "Sulfonsäure-Derivate", wie hier verwendet, betreffen -C(X)R₁, -C(X)-N(R₁)₂, -C(X)OR₁, -C(X)SR₁, -SO_nR₁ -SO_nR₁ -SO_nSR₁ oder SO_n-N(R₁)₂, wobei X für O, S oder NR¹ steht und R¹ ein Wasserstoffatom, Alkyl, substituiertes Alkyl oder Aryl, und aktivierte Derivate davon, wie Anhydride, Ester und Halogenide, wie Chloride, Bromide und Iodide, ist, die zum Kuppeln der Carbonsäure- und Sulfonsäure-Derivate an das 5'-Amin unter Verwendung von Standard-Kupplungs-Chemie verwendet werden.

50 "Pharmazeutisch verträgliche Salze" betrifft pharmazeutisch verträgliche Salze einer Verbindung der Formeln IA, IB oder IC, welche von einer Reihe im Fachgebiet bekannter organischer und anorganischer Gegenionen abstammen, und umfassen nur bspw. Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium, Ammonium, Tetraalkylammonium und dergleichen; und wenn das Molekül eine basische Funktionalität besitzt, lassen sich Salze von organischen oder anorganischen Säuren, wie Hydrochlorid, Hydrobromid, Tatrtrat, Mesylat, Acetat, Maleat, Oxalat und dergleichen als pharmazeutisch verträgliches Salz verwenden.

Der Begriff "Schutzgruppe" oder "Blockierungsgruppe" betrifft eine Gruppe, die bei Bindung an eine oder mehrere Hydroxyl-, Amino- oder Carboxylgruppen der Verbindungen (einschließlich deren Zwischenprodukten, wie Aminolactamen, Aminolactonen, usw.) verhindert, dass an diesen Gruppen Reaktionen stattfinden, und die durch herkömmliche chemische oder enzymatische Schritte entfernt werden kann, so dass die Hydroxyl-, Amino- oder Carboxylgruppe wieder hergestellt wird. Bevorzugte entfernbbare Aminoblockierungsgruppen umfassen herkömmliche Substituenten, wie tert.-Butoxycarbonyl (t-BOC), Benzyloxycarbonyl (CBZ), und dergleichen, die sich durch herkömmliche Bedingungen, die mit der Beschaffenheit des Produktes kompatibel sind, entfernen lassen.

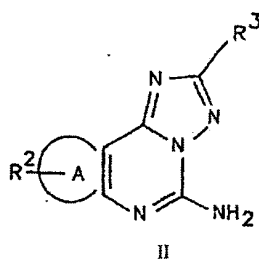
Hier werden die nachstehenden Abkürzungen verwendet: Abkürzungen:

[¹²⁵I]AB-MECA, [¹²⁵I]N⁶-(4-Amino-3-iodbenzyl)adenosin-5'-N-methyluronamid; (R)-PIA, (R)-N⁶-(Phenylisopropyl)adenosin; DMSO, Dimethylsulfoxid; 1-AB-MECA, N⁶-(4-Amino-3-iodbenzyl)adenosin-5'-N-methyluronamid; IB-MECA, N⁶-(3-Iodbenzyl)adenosin-5'-N-methyluronamid; K_i, Gleichgewichtsinhibitionskonstante; NECA, 5'-N-Ethylcarboxamidoadenosin; THF, Tetrahydrofuran; Tris, Tris(hydroxymethyl)aminomethan.

Herstellung der Verbindung

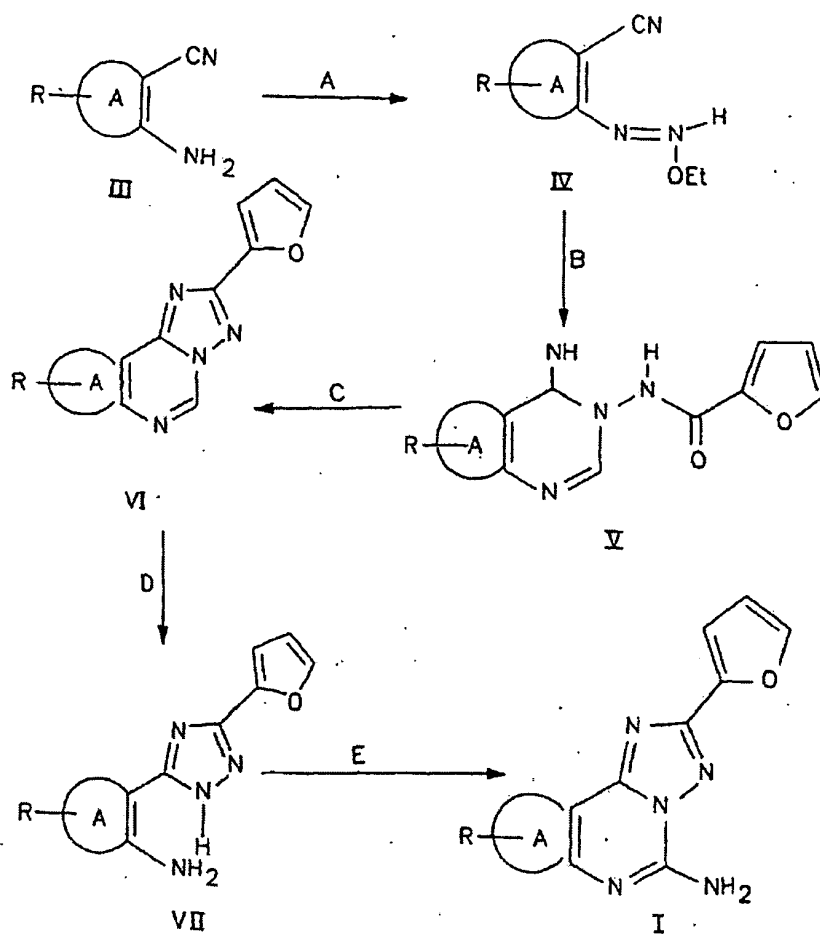
Der Fachmann der organischen Chemie erkennt, dass reaktive und brüchige funktionelle Gruppen vor einer bestimmten Reaktion oder einer Folge von Reaktionen oft geschützt werden müssen, und nach Beendigung der letzten Umsetzung in ihre ursprünglichen Formen gebracht werden müssen. Die Gruppen werden gewöhnlich geschützt, indem sie zu einem relativ stabilen Derivat umgewandelt werden. Eine Hydroxylgruppe kann bspw. zu einer Ethergruppe, und eine Aminogruppe zu einem Amid oder Carbatat umgewandelt werden. Verfahren zum Schützen und Entfernen der Schutzgruppen, ebenfalls bekannt als "Blockieren" und Entfernen der Blockierungsgruppe sind bekannt und werden im Fachgebiet weithin durchgeführt, siehe bspw. T. Green, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley, New York (1981) oder Protective Groups in Organic Chemistry, Hrsg. J.F.W. McOrnie, Plenum Press, London (1973).

Die Verbindungen werden vorzugsweise durch Umsetzen einer Verbindung der nachstehenden Formel mit einem geeigneten Carbonsäure- oder Sulfonsäure-Derivat mit bekannter Chemie hergestellt.



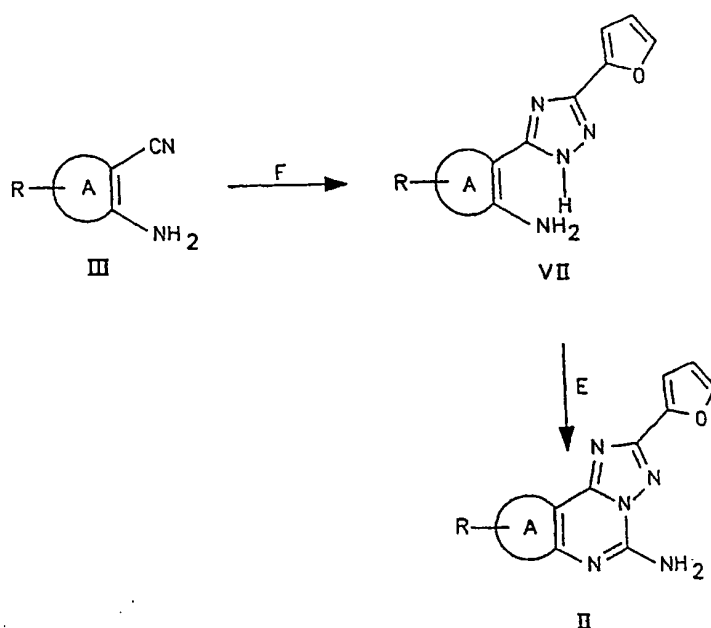
Verbindungen der Formel II lassen sich mit Hilfe der nachstehenden veranschaulichten Schemata 1 und II, wobei R³ Furan ist, herstellen.

Schema I



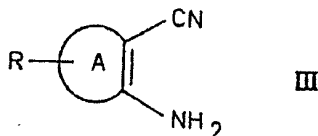
Reagenzien: A) Triethylorthoformiat; B) 2-Brenzschleimsäurehydrazid, 2-Methoxyethanol; C) PhOPh, 260°C; D) 10% HCl, unter Rückfluss; E) Cyanamid, pTsOH, N-Methylpyrrolidon

Schema II

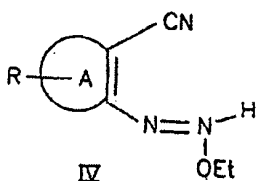


Reagenzien: F) Brenzschleimsäurehydrazid, Diphenylether; E) Cyanamid, pTsOH, N-Methylpyrrolidon

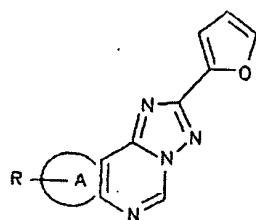
Die Verbindungen der Formel II lassen sich durch einen indirekten Weg, beschrieben in Schema I, oder einen direkten Weg, beschrieben in Schema II, herstellen. Geeignete Ausgangsmaterialien für beide Schemata sind die heterocyclischen Orthoaminonitrile der Formel III, die im Allgemeinen gemäß den aus der Literatur bekannten und im Buch von E.C. Taylor und A. McKillop (Bd. 7 der Reihe Advances in Organic Chemistry, Hrsg. Interscience, 1970) beschriebenen Syntheseverfahren hergestellt werden.



Die Orthoaminonitrile III werden durch Umsetzen mit einem Überschuss Ethylorthoformiat bei der Rückflusstemperatur für 8 bis 18 Std. in die entsprechenden Imidate der Formel IV umgewandelt. Die Umsetzung führt nach Verdampfen des Ethylorthoformiates zu den entsprechenden im wesentlichen einen Imidaten N in einer hohen Ausbeute, wie mittels IR und ^1H -NMR-Analyse der rohen Reaktionsprodukte nachgewiesen wurde.



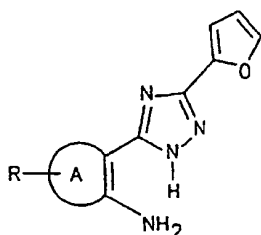
Die Imidate der Formel IV werden dann einer Folge von zwei Reaktionen unterworfen, so dass die tricyclischen Strukturen der Formel VI in hoher Ausbeute erhalten wurde.



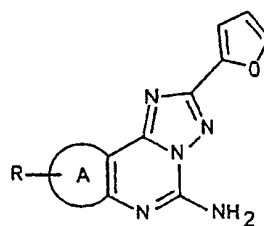
VI

Die Reaktionssequenz beinhaltet: a) Umsetzung mit 2-Brenzschleimsäurehydrazid in einer 2-Methoxyethanol-Lösung bei Refluxtemperatur für 8-10 Std., so dass die Zwischenverbindungen der Formel V erhalten werden; b) thermische Cyclisierung der Letzteren zu den entsprechenden Verbindungen der Formel VI durch Erhitzen in Diphenylether bei der Temperatur von 260°C für 0,5 bis 1 Std.

Die tricyclischen Verbindungen VI werden dann 1 bis 3 Std. unter Rückfluss mit HCl hydrolysiert, so dass die Triazole VII erhalten werden, die schließlich mit Cyanamid in N-Methylpyrrolidon unter Rückfluss und in Gegenwart von para-Toluolsulfonsäure in die gewünschten Verbindungen II cyclisiert werden (Schema I).



VII

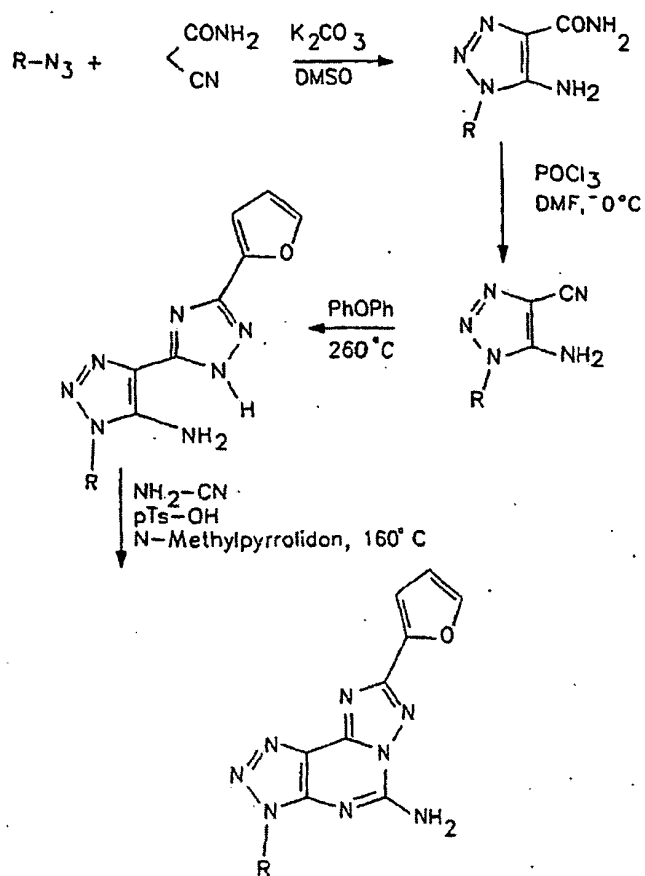


II

In einigen Fällen lassen sich die Triazole VII durch direktes Erhitzen in Diphenyletherorthoamionitril III mit 2-Brenzschleimsäurehydrazid erhalten. Die Triazole VII werden dann wie im vorstehenden Schema II beschrieben cyclisiert. In den nachstehenden Schemata III, IV und V ist die Synthese der Verbindungen der Formel I, worin A ein Triazolring ist, eingehender beschrieben.

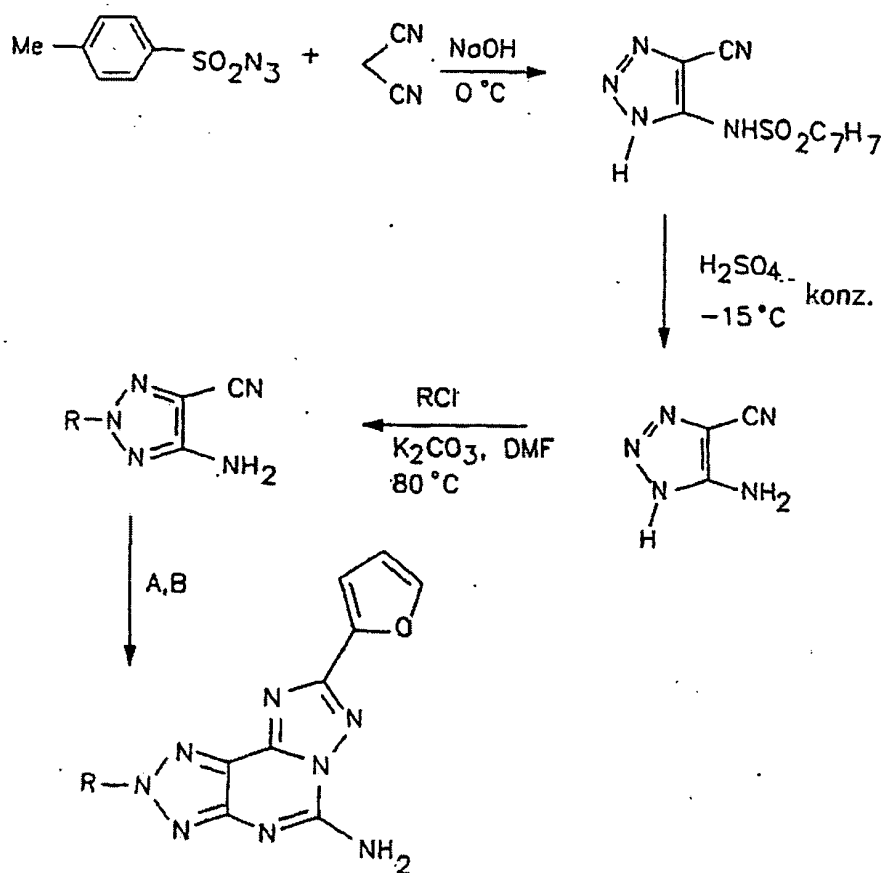
Schema III

Synthese von 5-amino-7-substituierten 2(2-Furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]1,2,4-triazol[1,5-c]pyrimidin-Derivaten



Schema IV

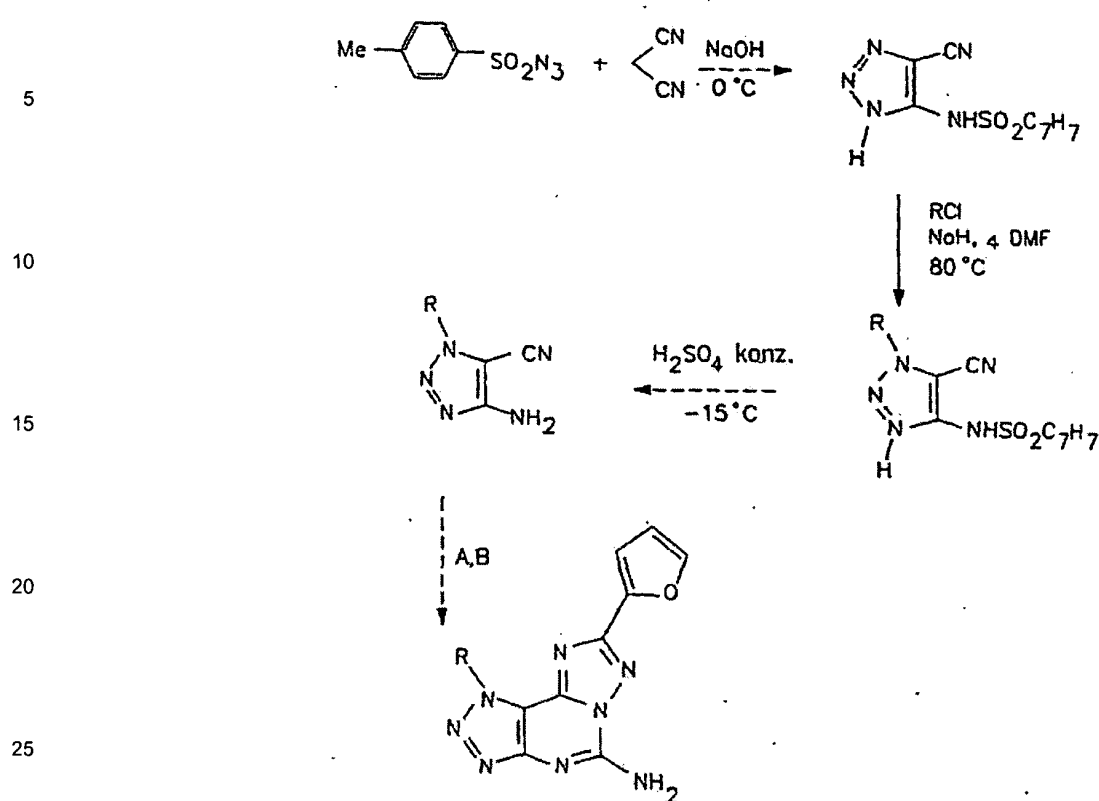
Synthese von 5-Amino-8-substituierten 2(2-Furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin-Derivaten



Reagenzien: A) Brenzschleimsäurehydrazid, PhOPh, 260°C, B) NH₂CN, pTsOH, N-Methylpyrrolidon.

Schema V

Synthese von 5-amino-9-substituierten 2(2-Furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin-Derivaten



Reagenzien: A) Brenzschleimsäurehydrazid, PhOPh, 260°C, B) NH₂CN, pTsOH, N-Methylpyrrolidon.

Anschließend werden die 5-aminhaltigen Verbindungen II mit Carbonsäuren, Sulfonsäuren, aktivierten Carbonsäuren, aktivierten Sulfonsäuren, Thiocarbonsäuren, aktivierten Thiocarbonsäuren und dergleichen umgesetzt, so dass die gewünschten Verbindungen erhalten werden. Aktivierte Carbonsäuren umfassen Säurehalogenide, Ester, Anhydride und andere Derivate, die bekanntlich mit Aminen unter Bildung von Amidn reagieren. Aktivierte Sulfonsäuren umfassen Sulfonylhalogenide, wie Sulfonylchloride.

Man muss nicht in allen Fällen aktivierte Carbonsäure- und Sulfonsäure-Derivate verwenden. Die Säuren selbst lassen sich mittels Standard-Kupplungs-Chemie an die Amine kuppeln, bspw. mittels Dicyclohexyldiimid (DCI) und anderen routinemäßig verwendeten Kupplungsreagenzien. Geeignete Kupplungsbedingungen zur Bildung von Amidbindungen sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Peptidsynthese bekannt.

Die vorstehend genannte Chemie kann zur Herstellung von 8-(Ar)alkyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5c]pyrimidinen verwendet werden, wenn 3-Cyano-2-aminopyrazole als Ausgangsmaterialien verwendet werden. Die 3-Cyano-2-aminopyrazole können mit einem Alkylhalogenid (RX) in einem polaren aprotischen Lösungsmittel, wie Dimethylformamid (DMF) umgesetzt werden, so dass an einem der Ring-Stickstoffatome ein Rest R bereitgestellt wird. Die erhaltene Verbindung kann mit Triethylorthoformiat unter Rückfluss belassen werden, so dass ein Iminethylester bereit gestellt wird, der mit Brenzschleimsäurehydrazid, vorzugsweise mit einer Dean-Stark-Falle, für die azeotrope Elimination von bei der Reaktion erzeugtem Wasser umgesetzt wird, so dass 8-(Ar)alkyl-2-(2-furyl)pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5c]pyrimidine erhalten werden. Die Produkte können zur Verwendung in der nachfolgenden Chemie durch Chromatographie, bspw. in EtOAc/Hexan (1:1), gereinigt werden.

Das Produkt dieser Reaktion kann mit einer geeigneten Säure, wie HCl, unter Rückfluss umgesetzt werden und anschließend mit Cyanamid in einem Lösungsmittel, wie N-Methylpyrrolidon, mit katalytischer Paratoluolsulfonsäure bei erhöhten Temperaturen umgesetzt werden, so dass 5-Amino-8-(ar)alkyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5c]pyrimidine erhalten werden.

Diese aminsubstituierten Verbindungen lassen sich mit geeigneten Isocyanaten umsetzen, so dass Harnstoffverbindungen, aktivierte Carbonsäuren, wie Säurehalogenide, zur Bildung von Amidinen, aktivierte Sulfonsäuren, wie Sulfonsäurehalogenide, zur Bildung von Sulfonamiden, oder andere reaktive Carbonsäure- oder Sulfonsäure-Derivate zur Bildung anderer gewünschter Verbindungen gebildet werden.

Triazolotriazolopyrimidin-Verbindungen lassen sich unter Verwendung einer ähnlichen Chemie herstellen, jedoch ausgehend von einem geeignet funktionalisierten Azid und unter Umsetzen des Azids mit $\text{H}_2\text{NC(O)CH}_2\text{CN}$, so dass der anfängliche heterocyclische Ring gebildet wird, gefolgt von der Umsetzung der Amidgruppe mit einem Dehydratisierungsmittel, wie POCl_3 , so dass ein Nitril erhalten wird. Das resultierende Cyanoaminotriazol kann auf die gleiche Weise wie die vorstehend zur Herstellung von Triazolo-triazolopyrimidinen verwendeten 3-Cyano-2-aminopyrazole umgesetzt werden.

Synthese der radioaktiv markierten Analoga

Die Verbindungen können mit einer geeigneten Radioaktivmarkierung markiert werden. Beispiele für geeignete Radioaktivmarkierungen umfassen ^3H und ^{14}C , jedoch lässt sich jede im Wesentlichen nicht toxische Radioaktivmarkierung, die gewöhnlich bei pharmakokinetischen Untersuchungen verwendet wird, verwenden. Maßnahmen zum Einbringen der Radiomarkierungen in organische Verbindungen sind dem Fachmann geläufig.

Sind die Verbindungen 5-[[substituiertes Phenyl]amino]carbonylamino-8-(ar)alkyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin-Verbindungen oder 5-Amino-8-(ar)alkyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin-Verbindungen, ist eine Tritiummarkierung genau richtig.

Bei einem geeigneten Ausgangsmaterial einer Ausführungsform hat der (Ar)alkylrest an der Stellung 8 eine Doppelbindung. Die Doppelbindung kann in Gegenwart eines geeigneten Katalysators, bspw. Palladium auf Kohle oder anderen bekannten Hydrierungskatalysatoren, mit Tritium umgesetzt werden.

Bspw. kann 5-[[[4-Methoxyphenyl]amino]carbonylamino]-8-(1,2-ditritiopropyl)-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (Verbindung 102) hergestellt werden, indem Tritium an die Doppelbindung von 5-[[[4-Methoxyphenyl]amino]carbonylamino]-8-1-propenyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (Verbindung 101) addiert wird. Die Verbindung 102 wird nachstehend in Bezug auf verschiedene Bindungsaffinitätsuntersuchungen an JUR-KAT-Krebszellen erörtert.

Die Tritiummarkierung kann alternativ auf den Verbindungen vorhanden sein, mit denen die 5-Aminogruppe unter Bildung der Amide, Harnstoffe oder anderer Gruppen an der 5-Stellung umgesetzt wird. Die zur Herstellung der hier beschriebenen 5-Aminocarbonylamino-Verbindungen verwendeten Isocyanate können bspw. eine Tritium- oder andere Radiomarkierungen beinhalten und lassen sich daher leicht in das Endprodukt einbringen.

Bei einer anderen Ausführungsform kann die Radiomarkierung in das Molekül eingebracht werden, während das Ringsystem zusammengebaut wird. Wie vorstehend für die Synthese der Verbindungen der Formel II erklärt worden ist, werden verschiedene tricyclische Verbindungen der Formel VI mit HCl hydrolysiert, so dass Triazole der Formel VII erhalten werden, die mit Cyanamid unter Rückfluss in Gegenwart von para-Toluolsulfonsäure, wie Schema I gezeigt,

cyclisiert werden. Der Einbau einer ^{14}C -Markierung in diesem Schritt bei der Synthese ist relativ einfach mit Hilfe von ^{14}C -markiertem Cyanamid.

- 5 Iodierte Verbindungen lassen sich bspw. herstellen, indem radioaktives Iod in die aromatische Verbindung eingebracht wird, die zur Umsetzung mit der 5-Amingruppe verwendet wird. Der Einbau von Jod in die aromatischen Ringe ist dem Fachmann geläufig. Der Einbau eines Jodatoms in die aromatischen Verbindungen, die zur Umsetzung mit der 5-Amingruppe zur Herstellung der hier beschriebenen Verbindungen verwendet werden, ist einfach.
- 10 Folglich lassen sich geeignete radioaktiv markierte Analoga lediglich mit Durchschnittsfachkenntnissen einfach herstellen.

Synthese von fluoreszierend markierten Analoga

- 15 Die Synthese von fluoreszierend markierten Verbindungen ist wie bei den radioaktiv markierten Verbindungen relativ einfach. Die fluoreszierenden Gruppen sind vorzugsweise an Stellung R^2 vorhanden, obwohl eine Substitution an Stellung R^3 ebenfalls möglich ist. Bei einer Ausführungsform umfasst/umfassen die fluoreszierende(n) Gruppe(n) einen Furanring, der an Stellung R^3 gebunden werden kann. Alternativ lassen sich andere aromatische Ringe verwenden. Fluoreszierende Markierungen sind dem Fachmann bekannt und lassen sich leicht mittels bekannter Chemie an die hier beschriebenen Verbindungen binden. Diese Verbindungen werden erfindungsgemäß zum Nachweisen von Krebs verwendet.
- 20

- 25 Dabei werden neben fluoreszierend markierten Verbindungen auch radioaktiv markierte Verbindungen einem Patienten zur Durchführung eines Tests zur Bestimmung der An- oder Abwesenheit kanzeröser Tumorzellen, die A_3 -Rezeptoren exprimieren, verabreicht. Die Verbindungen, von denen hier gesagt ist, dass sie eine relativ hohe Affinität für den A_3 -Rezeptor-Substyp haben, werden einem Patienten vorteilhafterweise verabreicht, und nach Bindung der Verbindungen an die in den Tumorzellen vorhandenen A_3 -Rezeptoren, lassen sich die Verbindungen
- 30 lokalisieren, indem die radioaktiv markierten Verbindungen lokalisiert werden. Geräte zur Bestimmung des Ortes und der Dichte radioaktiv markierter Verbindungen sind dem Fachmann bekannt.

- 35 Die Verwendung radioaktiv markierter und/oder fluoreszierend markierter Verbindungen während der operativen Entfernung von Krebsgewebe können auch vorteilhaft sein.

- Oft müssen die Chirurgen sicher sein, dass sie das Krebsgewebe vollständig entfernen. Die radioaktiv oder fluoreszierend markierten Verbindungen können einem Patienten entweder vor oder während der Operation verabreicht werden, und sie binden an die im Patienten vorhandenen Krebszellen. Die Verabreichungszeit variiert u.a. je nach der Aufnahme der bestimmten Verbindung für die jeweiligen Tumorzellen, und der Stelle des Tumors im Körper. Der Chirurg hat dann einen relativ einfachen Assay zur Bestimmung des Vorhandenseins restlicher Krebszellen nach Entfernung des Tumors. Das Vorliegen von Resttumorzellen kann durch Messen der Fluoreszenz oder Radioaktivität an der Operationsstelle gemessen werden, wobei dem
- 40 Fachmann bekannte Analysegeräte verwendet werden.
- 45

- Der Nachweis von Krebszellen in vitro erfolgt durch Zugabe der Verbindungen an eine Zellsuspension in Zellkulturmedien, damit die Verbindung an Adenosin- A_3 -Rezeptoren auf den Krebszellen binden kann, und Nachweisen der Markierung.
- 50

Formulierungen

- Die vorstehend beschriebenen Verbindungen werden vorzugsweise in einer Formulierung verabreicht, die einen Wirkstoff, d.h. eine Verbindung der Formel I, und einen für den Verabreichungsweg verträglichen Träger umfasst. Geeignete pharmazeutisch verträgliche Träger sind
- 55

dem Fachmann bekannt.

Die Zusammensetzungen können gegebenenfalls andere therapeutisch aktive Inhaltsstoffe, wie Antivirumittel, Antitumormittel, Antibakterienmittel, entzündungshemmende Mittel, Analgetika und Immunsuppressiva, enthalten. Der Träger muss in dem Sinne pharmazeutisch verträglich sein als er mit den anderen Inhaltsstoffen der Formulierung kompatibel ist und dem Empfänger nicht schadet.

Die Formulierungen können Träger umfassen, die sich für orale, rektale, topische oder parenterale (einschließlich subkutaner, intramuskulärer und intravenöser) Verabreichung eignen. Bevorzugte Träger eignen sich für die orale oder parenterale Verabreichung.

Für die parenterale Verabreichung geeignete Formulierungen umfassen geeigneterweise ein steriles wässriges Präparat des Wirkstoffs, das vorzugsweise mit dem Blut des Empfängers isotonisch ist. Diese Formulierungen können geeigneterweise destilliertes Wasser, 5% Dextrose in destilliertem Wasser oder Kochsalzlösung enthalten. Geeignete Formulierungen umfassen ebenfalls konzentrierte Lösungen oder Feststoffe mit der Verbindung der Formel (I), die beim Verdünnen mit einem geeigneten Lösungsmittel eine Lösung ergeben, die sich zur o.g. parenteralen Verabreichung eignet.

Für die enterale Verabreichung kann die Verbindung in einen inerten Träger in bestimmten Einheiten, wie Kapseln, Gelatinekapseln, Tabletten oder Pastillen, die jeweils eine festgelegte Menge Wirkstoff enthalten; als Pulver oder Granula; oder eine Suspension oder Lösung in einer wässrigen oder nicht-wässrigen Flüssigkeit, bspw. ein Sirup, ein Elixir, eine Emulsion oder ein Getränk eingebracht werden. Geeignete Träger können Stärken oder Zucker sein und umfassen Gleitmittel, Geschmacksstoffe, Bindemittel und andere Materialien der gleichen Beschaffenheit.

Eine Tablette kann durch Pressen oder Formen, gegebenenfalls mit einem oder mehreren Zusatzstoffen, hergestellt werden. Gepresste Tabletten lassen sich durch Pressen des Wirkstoffs in rieselfähiger Form, bspw. als Pulver oder Granula, die gegebenenfalls mit Zusatzstoffen, wie Bindemitteln, Gleitmitteln, inerten Verdünnungsmitteln, oberflächenaktiven Mitteln oder Dispersionsmitteln, gemischt sind, in einem geeigneten Gerät herstellen. Geformte Tabletten lassen sich durch Formen eines Gemischs des pulverförmigen Wirkstoffs und eines geeigneten Trägers in einer geeigneten Maschine herstellen.

Ein Sirup oder eine Suspension lässt sich herstellen durch Zugabe des Wirkstoffs zu einer konzentrierten, wässrigen Lösung eines Zuckers, bspw. Saccharose, wozu auch Zusatzstoffe gegeben werden können. Diese Zusatzstoffe können Geschmacksstoffe, ein Mittel zur Verzögerung der Kristallisation des Zuckers oder ein Mittel zur Erhöhung der Löslichkeit eines anderen Inhaltsstoffes, bspw. ein mehrwertiger Alkohol, bspw. Glycerin oder Sorbit.

Die Verbindung kann auch lokal durch topische Anwendung einer Lösung, einer Salbe, einer Creme, eines Gels, einer Lotion oder eines Polymermaterials (bspw. Pluronic™, BASF) verabreicht werden, die sich durch herkömmliche auf dem Gebiet der Pharmazie bekannte Verfahren herstellen lassen. Neben Lösung, Salbe, Creme, Gel, Lotion oder Polymerbasis und Wirkstoff können topische Formulierungen auch Konservierungsmittel, Duftstoffe und zusätzliche Wirkstoffe enthalten.

Formulierungen für die rektale Verabreichung werden als Zäpfchen gegeben, wobei ein herkömmlicher Träger, bspw. Kakaobutter oder Witepsol S55 (Markenzeichen von Dynamite Nobel Chemical, Deutschland) als Zäpfchenbasis verwendet wird.

Ersatzweise kann die Verbindung in Liposomen oder Mikrosphären (oder Mikropartikeln) verabreicht werden. Verfahren zur Herstellung von Liposomen und Mikrosphären zur Verabreichung

an einen Patienten sind dem Fachmann geläufig. US-Patent Nr. 4 789 734, dessen Inhalt hiermit durch Bezugnahme aufgenommen ist, beschreibt Verfahren zum Einkapseln biologischer Materialien in Liposomen. Das Material wird im Wesentlichen in einer wässrigen Lösung gelöst, die geeigneten Phospholipide und Lipide werden zugegeben, nötigenfalls zusammen mit oberflächenaktiven Mitteln, und das Material wird bei Bedarf dialysiert oder mit Ultraschall behandelt. Ein Überblick über bekannte Verfahren wird von G. Gregoriadis, Kapitel 14, "Liposomes" Drug Carriers in Biology and Medicine, S. 287-341 (Academic Press, 1979) bereitgestellt. Mikrosphären, die aus Polymeren oder Proteinen hergestellt werden, sind dem Fachmann bekannt, und können für den Durchtritt durch den Magen-Darm-Trakt direkt in den Blutstrom angepasst werden. Alternativ kann die Verbindung eingebracht werden, und die Mikrosphären oder der Mikrosphärenverbund können für eine langsame Abgabe über einen Zeitraum von Tagen bis zu Monaten implantiert werden. Siehe bspw. US-Patent Nr. 4 906 474, 4 925 673, und 3 625 214, deren Inhalte hiermit durch Bezugnahme aufgenommen sind.

Bevorzugte Mikropartikel werden aus biologisch abbaubaren Polymeren, wie Polyglycolid, Polylactid und Copolymeren davon hergestellt. Der Fachmann kann leicht ein geeignetes Trägersystem bestimmen, das von verschiedenen Faktoren abhängt, einschließlich der gewünschten Medikamentenfreisetzungsrates und der gewünschten Dosierung.

Die Formulierungen können geeigneterweise in Einheitsdosierungsform zugegen sein und können durch beliebige auf dem Gebiet der Pharmazie bekannte Verfahren hergestellt werden. Alle Verfahren umfassen den Schritt Zusammenbringen des Wirkstoffs mit einem Träger, der einen oder mehrere Zusatzstoffe ausmacht. Die Formulierungen werden im Allgemeinen durch einheitliches und inniges Zusammenbringen des Wirkstoffs mit einem flüssigen Träger oder einem feinteiligen festen Träger und sofern nötig anschließendes Formen des Produkts in eine gewünschte Einheitsdosierungsform hergestellt.

Neben den vorstehend genannten Inhaltsstoffen können die Formulierungen zudem einen oder mehrere wahlfreie(n) Zusatzstoff(e) enthalten, die auf dem Gebiet der pharmazeutischen Formulierungen verwendet werden, bspw. Verdünnungsmittel, Puffer, Geschmacksstoffe, Bindemittel, oberflächenaktive Mittel, Verdickungsmittel, Gleitmittel, Suspendierungsmittel, Konservierungsmittel (einschließlich Antioxidantien) und dergleichen.

Bestimmung des Aktivitätsgrades für die Verbindungen.

Die Aktivität der Verbindungen lässt sich leicht nur mit Routineversuchen mit einem der nachfolgenden Tests bestimmen.

A₁- und A_{2A}-Adenosin-Rezeptorbindungstest bei der Ratte

Membran-Präparationen:

Männliche Wistar-Ratten (200 - 250 g) können enthauptet und das gesamte Gehirn (ohne Hirnstamm, Striatum und Cerebellum) auf Eis seziiert werden. Die Gehirngewebe können dann in einem Polytron (Stufe 5) in 20 Volumina 50 mM Tris HCl, pH-Wert 7,4 aufgebrochen werden. Das Homogenat kann dann 10 min bei 48000 g zentrifugiert werden und das Pellet in Tris-HCl mit 2 IU/ml Adenosindesaminase, Typ VI (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., USA) resuspendiert werden. Nach 30 min Inkubation bei 37°C können die Membranen zentrifugiert werden und die Pellets bei -70°C aufbewahrt werden. Striatumgewebe können mit einem Polytron in 25 Volumina 50 mM Tris-HCl-Puffer mit 10 mM MgCl₂, pH-Wert 7,4, homogenisiert werden. Das Homogenat kann dann 10 min bei 48000 g und 4°C zentrifugiert werden und in Tris-HCl-Puffer mit 2 IU/ml Adenosindesaminase resuspendiert werden. Nach 30 min Inkubation bei 37°C können die Membranen zentrifugiert werden und das Pellet bei -70°C aufbewahrt werden.

Radioliganden-Bindungsassays:

Die Bindung von [³H]-DPCPX (1,3-Dipropyl-8-cyclopentylxanthine) an Membranen von Rattengehirn kann im Wesentlichen nach dem Verfahren durchgeführt werden, das zuvor von Bruns et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 77 (1980) 5547 - 5551, beschrieben worden war. Verdrängungsexperimente können in 0,25 ml eines Puffers durchgeführt werden, der 1 nM [³H]-DPCPX, 100 µl verdünnte Membranen von Rattenhirnen (100 µg Protein/Assay) und mindestens 6-8 unterschiedliche Konzentrationen der untersuchten Verbindungen enthält. Nichtspezifische Bindung kann in Gegenwart von 10 µM CHA (N⁶-Cyclohexyladenosin) bestimmt werden, und dies ist immer ≤ 10% der Gesamtbindung. Die Inkubationszeiten sind gewöhnlich 120 min bei 25°C.

Die Bindung von [³H]-SCH 58261 (5-Amino-7-(2-phenylethyl)-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin) an Ratten-Striatummembranen (100 µg Protein/Assay) kann gemäß dem in Zocchi et al., J. Pharm und Exper. Ther. 276 (1996) 398-404 beschriebenen Verfahren durchgeführt werden. Bei Kompetitionsuntersuchungen sollten mindestens 6-8 verschiedene Konzentrationen der untersuchten Verbindungen verwendet werden. Nichtspezifische Bindung kann in Gegenwart von 50 µM NECA (5'-(N-Ethylcarboxamido)adenosin) bestimmt werden. Die Inkubationszeit dauert gewöhnlich 60 min bei 25°C.

Gebundene und freie Radioaktivität kann durch Filtrieren des Assaygemischs durch Whatman GF/B-Glasfaserfilter mit einem Brandel-Zellernter (Gaithersburg, MD, USA) getrennt werden. Das Inkubationsgemisch kann mit 3 ml eiskaltem Inkubationspuffer verdünnt werden, rasch vakuumfiltriert werden, und der Filter kann dreimal mit 3 ml Inkubationspuffer gewaschen werden. Die filtergebundene Radioaktivität kann bspw. durch Flüssigszintillationspektrometrie gemessen werden. Die Proteinkonzentration kann bspw. gemäß einem Verfahren von Bio-Rad (Bradford, Anal. Biochem. 72 (1976) 248) bestimmt werden, wobei Rinderalbumin als Bezugsstandard dient.

Bindungsassay mit kioniertem menschlichen A₃-Adenosin-Rezeptor

Rezeptor-Bindungsassays: Bindungsassays können gemäß den in Salvatore et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90: (1993) 10365-10369 beschriebenen Verfahren durchgeführt werden. In Sättigungs-Studien kann ein Aliquot von Membranen (8 mg Protein/ml) von HEK-293-Zellen, transfiziert mit menschlichem rekombinantem A₃-Adenosinrezeptor (Research Biochemical International, Natick, MA, USA) mit 10-12 verschiedenen Konzentrationen von [¹²⁵I]AB-MECA von 0,1 bis 5 nM inkubiert werden. Kompetitionsexperimente können in Doppelansätzen in einem Endvolumen von 100 µl in Teströhrchen mit 0,3 nM [¹²⁵I]AB-MECA, 50 mM Tris-HCl-Puffer, 10 mM MgCl₂, pH-Wert 7,4, und 20 µl verdünnten Membranen (12,4 mg Protein/ml) und mindestens 6-8 unterschiedlichen Konzentrationen der untersuchten Liganden durchgeführt werden.

Die Inkubationszeit betrug 60 min bei 37°C, entsprechend den Ergebnissen der vorhergegangenen Zeitverlaufsexperimente. Gebundene und freie Radioaktivität wurden durch Filtern des Assaygemischs durch Whatman GF/B-Glasfaserfilter mit einem Brandel Zellernter getrennt. Nicht-spezifische Bindung wurde als Bindung in Gegenwart von 50 µM R-PIA definiert und betrug etwa 30% der Gesamtbindung. Das Inkubationsgemisch wurde mit 3 ml eiskaltem Inkubationspuffer verdünnt, rasch vakuumfiltriert, und der Filter wurde dreimal mit 3 ml Inkubationspuffer gewaschen. Die am Filter gebundene Radioaktivität wurde in einem Beckman gamma 5500B γ-Counter gezählt. Die Proteinkonzentration lässt sich gemäß einem Verfahren von Bio-Rad (3) mit Rinderalbumin als Bezugsstandard bestimmen.

Datenanalyse

Die Werte der inhibitorischen Bindungskonstante K_i können aus den IC₅₀-Werten gemäß der Gleichung nach Cheng & Prusoff (Cheng und Prusoff, Biochem. Pharmacol. 22 (1973) 3099-3108), $K_i = IC_{50}/(1 + [C^*]/K_D^*)$, wobei [C*] die Konzentration des Radioliganden und K_D* seine

Dissoziationskonstante ist, berechnet werden.

Ein Anpassungsprogramm der gewichteten nichtlinearen Kurve der kleinsten Fehlerquadrate LIGAND (Munson und Rodbard, Anal. Biochem. 107 (1990) 220-239) kann für die Computer-analyse von Sättigungs- und Inhibierungsexperimenten verwendet werden. Die Daten werden üblicherweise als geometrischer Mittelwert ausgedrückt, wobei die 95% oder 99% Vertrauensgrenzen in Klammern angegeben sind.

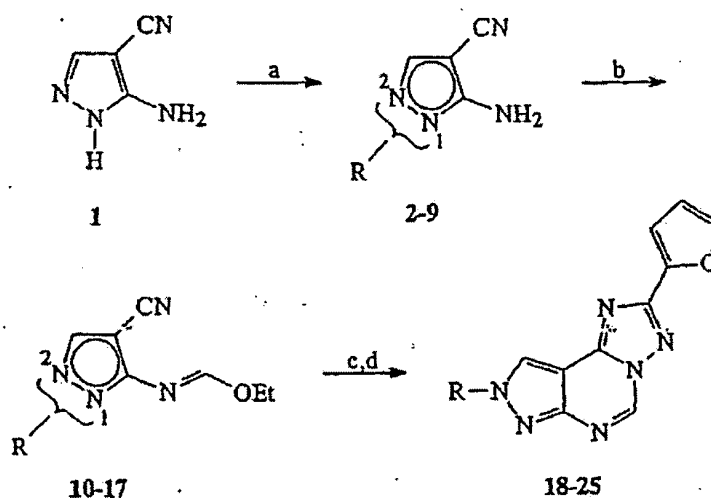
Beispiele:

Die nachstehenden Beispiele veranschaulichen erfindungsgemäße Aspekte ebenso im Vergleich mit bekannten Substanzen, welche jedoch nicht als Einschränkungen aufgefasst werden sollen. Die in diesen Beispielen verwendeten Symbole und Konventionen sollen denen, die in der zeitgenössischen, internationalen chemischen Literatur, bspw. im Journal of the American Chemical Society ("J. Am. Chem. Soc.") und Tetrahedron verwendet werden, entsprechen.

Vergleichsbeispiel 1: Herstellung von 8-(Ar)alkyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidinen (Vergleichssubstanzen 18-25)

8-(Ar)alkyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine wurden gemäß der im nachstehenden Schema VI gezeigten Synthesestrategie hergestellt.

Schema VI. Allgemeines Verfahren zur Herstellung von 8-(Ar)alkyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidinen (Vergleichssubstanzen 18-25)



Bei der Herstellung der Verbindungen 18-25 wurde eine Lösung von 1 (10 mmol) in 40 ml 0°C kaltes DMF mit NaH (60% in Öl, 12 mmol) in mehreren Portionen über 10 min behandelt. Nach 45 min wurde das entsprechende (Ar)alkylhalogenid (12 mmol) zugegeben, und das Reaktionsgemisch wurde auf 25°C aufwärmen gelassen und 3-5 Std. gerührt (TLC:EtoAc 1:1). Die Reaktion wurde durch Zugabe von H₂O (80 ml) gequencht, und die wässrige Schicht wurde mit EtOAc (5 x 25 ml) extrahiert. Die organischen Schichten wurden erneut vereinigt, getrocknet (Na₂SO₄), filtriert und unter reduziertem Druck eingeeengt, so dass das alkylierte Pyrazol (2-9) als nicht trennbares Gemisch aus N¹- und N²-Isomeren (Verhältnis ungefähr 1:4) erhalten wurde. Dieses Gemisch aus N¹- und N²-substituierten 4-Cyano-5-aminopyrazolen (2-9) wurde dann in Triethylorthoformiat (60 ml) gelöst, und die Lösung wurde 8 Std. unter Rückfluss und Stickstoff belassen. Das Lösungsmittel wurde dann unter Vakuum entfernt, und der ölige Rückstand, den das Gemisch aus den Imidaten (10-17) ausmachte, wurde gelöst, und 2-Methoxyethanol (50 ml)

und 2-Brenzschleimsäurehydrazid (13 mmol) wurden dazu gegeben. Das Gemisch wurde 5-10 Std. unter Rückfluss belassen, und dann wurde das Lösungsmittel nach Abkühlen unter reduziertem Druck entfernt, und der dunkle ölige Rückstand wurde ohne weitere Reinigung in Diphenylether (50 ml) bei 260°C cyclisiert, wobei eine Dean-Stark-Falle für die azeotrope Eliminierung von bei der Reaktion entstandenem Wasser verwendet wurde. Nach 1,5 Std. wurde das Gemisch auf Hexan (300 ml) gegossen und gekühlt. Das Präzipitat wurde abfiltriert und durch Chromatographie (EtOAc/Hexan 1:1) gereinigt. Auf diese Weise wurde das Hauptprodukt (N⁸-alkyliert) (18-25) in einer guten Gesamtausbeute erhalten.

- 10 Entsprechend diesem allgemeinen Verfahren wurden die nachstehenden Verbindungen hergestellt:

8-Methyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (Vergleichssubstanz 18)

- 15 Ausbeute 45%; gelber Feststoff, Schmp. 155-156°C (EtOAc-Petrolether); IR (KBr): 1615, 1510 cm⁻¹; ¹H-NMR(DMSO-d₆) δ 4,1 (s, 1H); 6,32(m, 1H); 7,25 (m, 1H); 8,06 (m, 1H); 8,86 (s, 1H), 9,38 (s, 1H).

8-Ethyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (Vergleichssubstanz 19)

- 20 Ausbeute 50%; blassgelber Feststoff, Schmp. 188-189°C (EtOAc-Petrolether); IR (KBr): 1620, 1500cm⁻¹; ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 1,67 (t, 2H, J = 7); 4,53 (q, 2H, J=7); 6,59 (m, 1H); 7,23 (m, 1H); 7,64 (s, 1H); 8,34 (s, 1H); 9,10 (s, 1H)

- 25 8-Propyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (Vergleichssubstanz 20)

Ausbeute 60%; gelber Feststoff, Schmp. 189-190 °C (EtOAc-Petrolether); IR (KBr): 1600, 1505 cm⁻¹; ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 0,98 (t, 2H, J = 7); 2,03-2,10 (m, 2H); 4,41 (q, 2H, J=7); 6,60 (m, 1H); 7,24 (m, 1H); 7,64 (s, 1H); 8,32 (s, 1H); 9,10 (s, 1H).

- 30 8-Butyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (Vergleichssubstanz 21)

Ausbeute 50%, hellgelber Feststoff, Schmp. 245-247°C (EtOAc-Petrolether); IR (KBr): 1610, 1500 cm⁻¹; ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ, 0,9 (m, 3H); 1,3 (m, 2H); 1,9 (m, 2H); 4,5 (t, 2H, J = 7,2); 6,2 (m, 1H); 7,3 (m, 1H); 8,0 (m, 1H); 8,9 (s, 1H); 9,4 (s, 1H).

- 35 8-Isopentyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (Vergleichssubstanz 22)

Ausbeute 54%; blassgelber Feststoff, Schmp. 235-237°C (EtOAc-Petrolether); IR (KBr): 1635, 1510, 1450 cm⁻¹; ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 1,0 (d, 6H, J = 6,2); 1,5-1,9 (m, 3H); 4,6 (t, 2H, J = 7,4); 6,6 (m, 1 H), 7,3 (m, 1 H); 7,7¹(m, 1 H); 8,8 (s, 1 H); 9,1 (s, 1 H).

8-(2-Isopentenyl)-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (Vergleichssubstanz 23)

- 45 Ausbeute 48%; gelber Feststoff, Schmp. 210-212°C (EtOAc-Petrolether); IR (KBr): 1625, 1500, 1430 cm⁻¹; ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 1,79 (s, 3H); 1,87 (s, 3H); 5,05 (d, 2H, J = 6); 5,55-5,63 (m, 1 H)-5 6,60 (m, 1H); 7,24 (m, 11,4; 7,64 (s, 1H); 8,34 (s, 1H); 9,10 (s, 1H).

- 50 8-2-Phenylethyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (Vergleichssubstanz 24)

Ausbeute 56%, Schmp. 268-270°C; (EtOAc-Petrolether); IR (KBr): 1660, 1510, 1450 cm⁻¹; ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 3,32 (t, 2H, 3 = 6,7); 4,72 (t, 2H, J = 6,7), 6,73 (s, 1H); 7,23 (m, 5H); 7,95 (s, 1H); 8,8 (s, 1H); 9,41 (s, 1H), Anal. (C₁₆H₁₄N₆O) C, H, N.

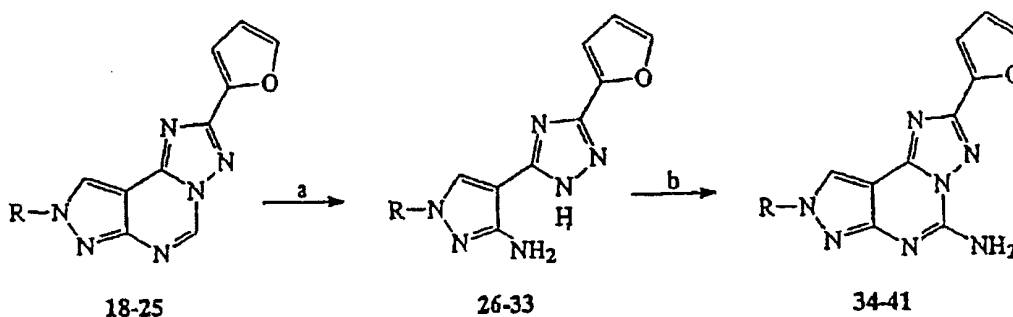
8-(3-Phenylpropyl)-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (Vergleichssubstanz 25)

Ausbeute 63%; gelber Feststoff, Schmp. 165-166°C (EtOAc-Petrolether); IR (KBr): 1630, 1500, 1440 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ : 2,34-2,48 (m, 2H); 2,67 (t, 3H, $J = 7,5$); 4,43 (t, 2H, $J = 7,5$), 6,61 (m, 1H); 7,16-7,32 (m, 6H); 7,64 (d, 1H, $J = 2$); 8,29 (s, 1H); 9,02 (s, 1H).

Beispiel 2: Herstellung von 5-Amino-8-(ar)alkyl 2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidinen (Ausgangsverbindungen für die Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen 42-59)

5-Amino-8-(ar)alkyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine wurden gemäß der im nachstehenden Schema VII gezeigten Synthesestrategie hergestellt.

Schema VII: Allgemeine Verfahren zur Herstellung von 5-Amino-8-(ar)alkyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (33-41) als Ausgangsverbindungen für die Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen 42-59



Reagenzien: a) HCl, Rückfluss; b) NH_2CN , "1-Methyl-2-pyrrolidon, pTsOH, 140°C

Bei der Herstellung der Verbindungen 33-40 wurde das Triazolo-Pyrimidin-Gemisch (18-20) (10 mmol) in wässriger 10%iger HCl (50 ml) 3 Std. unter Rückfluss gehalten. Dann wurde die Lösung gekühlt und mit einer gesättigten NaHCO_3 -Lösung bei 0°C neutralisiert. Die Verbindungen (26-33) wurden mit EtOAc (3 x 20 ml) extrahiert, die organischen Schichten wurden mit Na_2SO_4 getrocknet und unter Vakuum eingedampft. Das erhaltene rohe Amin (26-33) wurde in N-Methylpyrrolidon (40 ml) gelöst, Cyanamid (60 mmol) und p-Toluolsulfonsäure (15 mmol) wurden zugegeben, und das Gemisch wurde 4 Std. bei 160°C erhitzt. Dann wurde erneut Cyanamid (60 mmol) zugegeben, und die Lösung wurde über Nacht erhitzt. Dann wurde die Lösung mit EtOAc (80 ml) verdünnt, und der Niederschlag (Überschuss Cyanamid) wurde abfiltriert; das Filtrat wurde unter reduziertem Druck eingedampft und mit Wasser (3 x 30 ml) gewaschen. Die organische Schicht wurde getrocknet (Na_2SO_4) und unter Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde durch Chromatographie gereinigt (EtOAc/Petrolether 2:1), so dass das gewünschte Produkt (34-41) als Feststoff erhalten wurde.

Entsprechend diesem allgemeinen Verfahren wurden die nachstehenden Verbindungen hergestellt.

5-Amino-8-methyl-2-(2-furyl)-pyrazolo-[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (34)

Ausbeute 53%; gelber Feststoff, Schmp. 167-168°C (EtOAc-Petrolether); IR (KBr): 3500-2950, 1680, 1645, 1610, 1560, 1455 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ : 4,12 (s, 3H); 6,70 (m, 1H); 6,99 (bs, 2H); 7,18 (m, 1H); 7,81 (s, 1H), 8,42 (s, 1H).

5-Amino-8-ethyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (35)

Ausbeute 65%, gelber Feststoff, Schmp. 249-250°C (EtOAc-Petrolether); IR (KBr): 3430-2950, 1680, 1655, 1620, 1550, 1450 cm⁻¹; ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 1,46 (t, 2H, J = 7); 4,30 (d, 2H, J = 7); 6,72 (m, 1H); 7,18 (m, 1H); 7,93 (bs, 2H); 7,93 (s, 1H); 8,62 (s, 1H).

5-Amino-8-propyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (36)

Ausbeute 57%; hellgelber Feststoff, Schmp. 209-210°C (EtOAc-Petrolether); IR (KBr): 3400-2900, 1660, 1645, 1610, 1545, 1430 cm⁻¹; ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 0,83 (t, 2H, J = 7); 1,81-1,91 (m, 2H); 4,22 (d, 2H, J = 7); 6,71 (m, 1H); 7,19 (m, 1H); 7,63 (bs, 2H); 7,93 (s, 1H); 8,61 (s, 1H).

5-Amino-8-butyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (37)

Ausbeute 47%; weißer Feststoff, Schmp. 200-203°C (EtOAc-Petrolether); IR (KBr): 3500-2900, 1685, 1640, 1620, 1550, 1450 cm⁻¹; ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 0,9 (t, 3H); 1,2 (m, 2H); 1,8 (m, 2H); 4,2 (t, 2H); 6,7 (m, 1H); 7,2 (m, 2H); 7,6 (s, 1H); 8,0 (s, 1H); 8,6 (s, 1H).

5-Amino-8-isopentyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (38)

Ausbeute 60%; gelb-weißer Feststoff, Schmp. 212-213°C (EtOAc-Petrolether); IR (KBr): 3500-2850, 1670, 1650, 1615, 1560, 1455 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 0,96 (d, 6H, i = 6,4); 1,59 (m, 1H); 1,86 (m, 2H); 4,32 (t, 2H, J=6,4); 6,58 (m, 1H); 6,72 (bs, 2H); 7,21 (d, 1H, J = 4,2); 7,63 (d, 1H, J = 1,2); 8,10 (s, 1H).

5-Amino-8-(2-isopentenyl)-2-(2-furyl)-pyrazolo [4,3-e]-1,2,4-triazolo [1,5-c]pyrimidin (39)

Ausbeute 58%; blassgelber Feststoff, Schmp. 178-179°C (EtOAc-Petrolether); IR (KBr): 3520-2950, 1665, 1640, 1610, 1555, 1450 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,74 (s, 3H); 1,77 (s, 3H); 4,87 (d, 2H, J = 7); 5,43-5,46 (m, 1H); 6,72 (m, 1H); 7,18 (m, 1H); 7,62 (bs, 2H); 7,93 (s, 1H); 8,55 (s, 1H).

5-Amino-8-(2-phenylethyl)-2-(2-furyl)-pyrazolo [4,3-e]-1,2,4-triazolo [1,5-c]pyrimidin (40)

Ausbeute 45%; weißer Feststoff, Schmp. 183-185°C (EtOAc-Petrolether); IR (KBr): 3500-2900, 1670, 1645, 1620, 1530, 1455 cm⁻¹; ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 3,21 (t, 2H, J= 6,4); 4,53 (t, 2H, J = 6,4); 6,7 (s, 1H); 7,1-7,4 (m, 6H); 7,65 (bs, 2H); 7,93 (s, 1H); 8,45 (s, 1H).

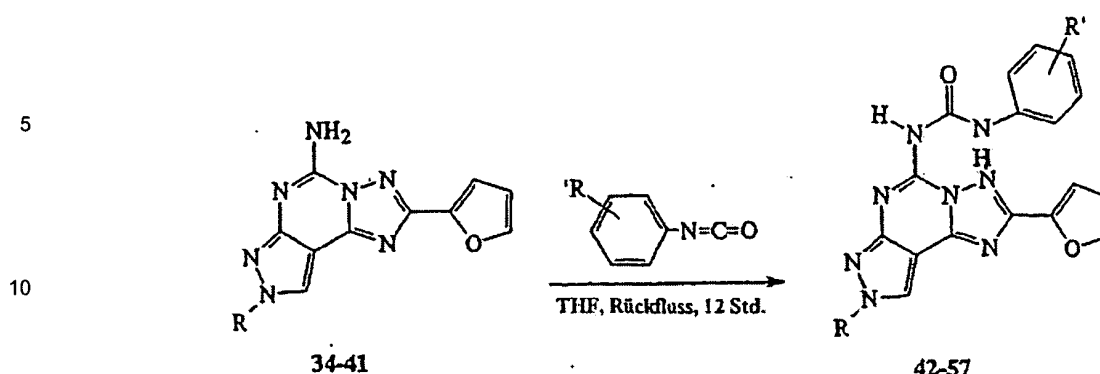
5-Amino-8-(3-phenylpropyl)-2-(2-furyl)-pyrazolo [4,3-e]-1,2,4-triazolo [1,5-c]pyrimidin (41)

Ausbeute 57%; gelber Feststoff, Schmp. 168-170°C (EtOAc-Petrolether); IR (KBr): 3510-2950, 1665, 1640, 1615, 1520, 1455 cm⁻¹; ¹H-NMR(DMSO-d₆) δ: 2,14-2,21 (m, 2H); 2,54 (t, 2H, J=7); 4,29 (t, 2H, J = 6,4); 6,71 (s, 1H); 7,1-7,32 (m, 6H); 7,64 (bs, 2H); 7,93 (s, 1H); 8,64 (s, 1H).

Beispiel 3: Herstellung von 5-[[substituiertes Phenyl]amino]carbonylamino-8-(ar)alkyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (erfindungsgemäße Verbindungen 42-57)

5-[[substituiertes Phenyl]amino]carbonylamino-8-(ar)alkyl-2-(2-furyl)-pyrazolo-[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine können gemäß der im nachfolgenden Schema VIII gezeigten Synthesestrategie hergestellt werden.

Schema VIII: Allgemeine Verfahren zur Herstellung von 5-[[substituiertes Phenyl]amino]carbonylamino-8-(ar)alkyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (erfindungsgemäße Verbindungen 42-57)



15 Bei der Herstellung der Verbindungen 42-57 wurde die geeignete Aminoverbindung (34-41) (10 mmol) in frisch destilliertem THF (15 ml) gelöst, und das geeignete Isocyanat (13 mmol) wurde hinzu gegeben. Das Gemisch wurde 18 Std. unter Argon und unter Rückfluss belassen. Dann wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt, und der Rückstand wurde durch Flash-Chromatographie (EtOAc-Petrolether 4-6) gereinigt, so dass die gewünschten Verbindungen 42-57 erhalten wurden. Gemäß diesem allgemeinen Verfahren wurden die nach-

20 stehenden allgemeinen Verbindungen hergestellt:

5-[[[(3-Chlorphenyl)amino]carbonyl]amino-8-methyl-2-(2-furyl)pyrazolo [4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]-pyrimidin (42)

25 Ausbeute 98%; blassgelber Feststoff, Schmp. 142-145°C (Et₂-Petrolether); IR (KBr): 3210-2930, 1660, 1630, 1610, 1500 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 4,21 (s, 3H); 6,60 (m, 1H); 7,11 (d, 1H, J = 8); 7,13-7,28 (m, 2H); 7,55 (d, 1H, J = 8); 7,65 (s, 1H); 7,78 (d, 1 H, J = 2); 8,22 (s, 1H); 8,61 (bs, 1H); 11,24 (bs, 1H).

30 5-[[[(4-Methoxyphenyl)amino]carbonyl]amino-8-methyl-2-(2-furyl)-pyrazolo [4,3-e]-1,2,4-triazolo [1,5-c]pyrimidin (43)

35 Ausbeute 99%; gelber Feststoff, Schmp. 193-195°C (Et₂O-Petrolether); IR (KBr): 3200-2900, 1664, 1625, 1600, 1500 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 3,81 (s, 3H); 4,20 (s, 3H); 6,61 (m, 1H); 6,85 (d, 2H, J = 9); 7,26 (m, 1H); 7,55 (d, 2H, J = 9); 7,65 (s, 1H); 8,21 (s, 1H); 8,59 (bs, 1H); 10,96 (bs, 1H).

40 5-[[[(3-Chlorphenyl)amino]carbonyl]amino-8-ethyl-2-(2-furyl)pyrazolo [4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (44)

45 Ausbeute 98%; blassgelber Feststoff, Schmp. 204-205°C (Et₂O-Petrolether); IR (KBr): 3220-2930, 1660, 1620, 1600, 1500 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,71 (t, 3H, J = 7); 4,50 (q, 2H, J = 7); 6,67 (m, 1H); 7,20 (d, 1 H, J = 8); 7,31 (m, 1H); 7,61 (d, 1H, J = 8); 7,70 (s, 1H); 7,84 (s, 1H); 8,30 (s, 1H); 8,67 (bs, 1H); 11,30 (bs, 1H).

5-[[[(4-Methoxyphenyl)amino]carbonyl]amino-8-ethyl-2-(2-furyl)pyrazolo [4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (45)

50 Ausbeute 99%; blassgelber Feststoff, Schmp. 200-201 °C (Et₂O-Petrolether); IR (KBr): 3250-2950, 1665, 1620, 1610, 1520 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,71 (t, 3H, J = 7); 3,85 (s, 3H); 4,49 (s, 3H); 6,65 (m, 1H); 6,88 (d, 2H, J = 9); 7,26 (m, 1H); 7,58 (d, 2H, J = 9); 7,69 (s, 1H); 8,28 (s, 1H); 8,63 (bs, 1H); 10,99 (bs, 1H).

55 5-[[[(3-Chlorphenyl)amino]carbonyl]amino-8-propyl-2-(2-furyl)pyrazolo [4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]

pyrimidin (46)

Ausbeute 95%; weißer Feststoff, Schmp. 138-139°C (Et₂O-Petrolether); IR (KBr): 3210-2920, 1655, 1615, 1600, 1510 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,71 (t, 3H, J = 7); 2,04 (m, 2H); 4,36 (q, 2H, J = 7); 6,62 (m, 1H); 7,12 (d, 1H, J = 8); 7,27 (m, 1H); 7,56 (d, 1H, J = 8); 7,66 (s, 1H); 7,80 (s, 1H); 8,24 (s, 1H); 8,62 (bs, 1H); 11,08 (bs, 1H).

5-[[[4-Methoxyphenyl]amino]carbonyl]amino-8-propyl-2-(2-furyl)pyrazolo [4,3-e]1,2,4-triazolo-[1,5-c]pyrimidin (47)

Ausbeute 98%; blassgelber Feststoff, Schmp. 146-148°C (Et₂O-Petrolether); IR (KBr): 3230-2950, 1660, 1620, 1600, 1530 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 0,98 (t, 3H, J = 7); 2,04-2,08 (m, 2H); 3,82 (s, 3H); 4,35 (t, 2H, J = 7); 6,61 (m, 1H); 6,89 (d, 2H, J = 9); 7,25 (m, 1H); 7,56 (d, 2H, J = 9); 7,65 (s, 1H); 8,23 (s, 1H); 8,59 (bs, 1H); 10,95 (bs, 1H).

5-[[[3-Chlorophenyl]amino]carbonyl]amino-8-butyl-2-(2-furyl)-pyrazolo [4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrhnidin (48)

Ausbeute 97%; weißer Feststoff, Schmp. 210-212°C -(Et₂O-Petrolether); IR (KBr): 3240-2970, 1650, 1610, 1510 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,00 (t, 3H, J = 7); 1,39-1,41 (m, 2H); 1,99-2,03 (m, 2H); 4,41 (q, 2H, J = 7); 6,63 (m, 1H); 7,14 (d, 1H, J = 8); 7,29 (m, 1H); 7,56 (d, 1H, J = 8); 7,67 (s, 1H); 7,80 (s, 1H); 8,25 (s, 1H); 8,63 (bs, 1H); 11,26 (bs, 1H).

5-[[[4-Methoxyphenyl]amino]carbonyl]amino-8-butyl-2-(2-furyl)-pyrazolo [4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (49)

Ausbeute 96%; weißer Feststoff, Schmp. 197-198°C-(Et₂O-Petrolether); IR (KBr): 3250-2960, 1665, 1610, 1600, 1520 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 0,98 (t, 3H, J = 7); 1,38-1,42 (m, 2H); 2,02-2,05 (m, 2H); 3,82 (s, 3H); 4,39 (t, 2H, J = 7); 6,63 (m, 1H); 6,92 (d, 2H, J = 9); 7,25 (m, 1H); 7,57 (d, 2H, J = 9); 7,67 (s, 1H); 8,23 (s, 1H); 8,60 (bs, 1H); 10,95 (bs, 1H).

5-[[[3-Chlorphenyl]amino]carbonyl]amino-8-isopentyl-2-(2-furyl)-pyrazolo [4,3-e]-1,2,4-triazolo-[1,5-c]pyrimidin (50)

Ausbeute 97%; blassgelber Feststoff, Schmp. 199-200°C (Et₂O-Petrolether); IR (KBr): 3230-2950, 1655, 1600, 1510 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,01 (d, 6H, J = 7,5); 1,49-1,51 (m, 1H); 1,88-2,03 (m, 2H); 4,42 (t, 2H, J = 7); 6,62 (m, 1H); 7,13 (d, 1H, J = 8); 7,34 (m, 1H); 7,57 (d, 1H, J = 8); 7,67 (s, 1H); 7,80 (s, 1H); 8,24(s, 1H); 8,63 (bs, 1H); 11,25 (bs, 1H).

5-[[[4-Methoxyphenyl]amino] carbonyl] amino-8-isopentyl-2-(2-furyl)-pyrazolo [4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (51)

Ausbeute 98%; weißer Feststoff, Schmp. 192-193°C (Et₂O-Petrolether); IR (KBr): 3230-2970, 1660, 1615, 1600, 1500 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 0,99 (d, 6H, J = 7,5); 1,58-1,22 (m, 1H); 1,87-1,97 (m, 2H); 3,82 (s, 3H); 4,40 (t, 2H, J = 7); 6,62 (m, 1H); 6,91 (d, 2H, J = 9); 7,23 (m, 1H); 7,58 (d, 2H, J = 9); 7,66 (s, 1H); 8,23 (s, 1H); 8,59 (bs, 1H); 10,94 (bs, 1H).

5-[[[3-Chlorphenyl]amino]]carbonyl]amino-8-(2-isopentenyl)-2-(2-furyl)pyrazolo [4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (52)

Ausbeute 99%; weißer Feststoff, Schmp. 204-205°C (Et₂O-Petrolether); IR (KBr): 3245-2960, 1650, 1600, 1510 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,84 (s, 3H); 1,88 (s, 3H); 5,01 (d, 2H, J = 8); 5,57 (m, 1H); 6,62 (m, 1H); 7,12 (d, 1H, J = 8); 7,29 (m, 1H); 7,56 (d, 1H, J = 8); 7,66 (s, 1H); 7,80 (s, 1H); 8,26 (s, 1H); 8,60 (bs, 1H); 11,26 (bs, 1H).

5-[[[4-Methoxyphenyl]amino]carbonyl]amino-8-(2-isopentenyl)-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (53)

5 Ausbeute 96%; blassgelber Feststoff, Schmp. 198-199°C (Et₂O-Petrolether); IR (KBr): 3235-2950, 1665, 1620, 1600, 1510 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,83 (s, 3H); 1,87 (s, 3H); 3,81 (s, 3H); 4,97 (d, 2H, J = 7); 5,57 (m, 1H); 6,61 (m, 1H); 6,93 (d, 2H, J = 9); 7,24 (m, 1H); 7,54 (d, 2H, J = 9); 7,66 (s, 1H); 8,25 (s, 1H); 8,58 (bs, 1H); 10,96 (bs, 1H).

10 5-[[[3-Chlorphenyl]amino]carbonyl]amino-8-(2-phenylethyl)-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (54)

15 Ausbeute 98%; weißer Feststoff, Schmp. 186-187°C (Et₂O-Petrolether); IR (KBr): 3250-2970, 1660, 1610, 1515 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 3,33 (t, 2H, J = 7); 4,62 (t, 2H, J = 7); 6,60 (m, 1H); 7,19-7,35 (m, 7H); 7,57 (d, 1H, J = 8); 7,61 (s, 1H); 7,81 (s, 1H); 7,89 (s, 1H); 8,63 (bs, 1H); 11,27 (bs, 1H).

5-[[[4-Methoxyphenyl]amino]carbonyl]amino-8-(2-phenylethyl)-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (55)

20 Ausbeute 99%; weißer Feststoff, Schmp. 180-181°C (Et₂O-Petrolether); IR (KBr): 3245-2960, 1660, 1615, 1600, 1500 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 3,42 (t, 2H, J = 7); 3,82 (s, 3H); 4,60 (t, 2H, J = 7); 6,60 (m, 1H); 6,93 (d, 2H, J = 9); 7,09 (m, 2H); 7,20-7,28 (m, 4H); 7,56 (d, 2H, J = 8); 7,60 (s, 1H); 7,89 (s, 1H); 8,59 (bs, 1H); 10,96 (bs, 1H).

25 5-[[[3-Chlorphenyl]amino]carbonyl]amino-8-(3-phenylpropyl)-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (56)

30 Ausbeute 99%; blassgelber Feststoff, Schmp. 183-184°C (Et₂O-Petrolether); IR (KBr): 3245-2960, 1665, 1610, 1515 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2,46 (m, 2H); 2,73 (t, 2H, J = 7); 4,43 (t, 2H, J = 7); 6,66 (m, 1H); 7,19-7,40 (m, 8H); 7,59 (d, 1H, J = 8); 7,64 (s, 1H); 7,85 (m, 1H); 8,25 (s, 1H); 8,67 (bs, 1H); 11,30 (bs, 1H).

35 5-[[[4-Methoxyphenyl]amino]carbonyl]amino-8-(3-phenylpropyl)-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (57)

40 Ausbeute 98%; weißer Feststoff, Schmp. 174-175°C (Et₂O-Petrolether); IR (KBr): 3240-2950, 1665, 1615, 1600, 1510 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2,46 (m, 2H); 2,73 (t, 2H, J = 7); 4,42 (t, 2H, J = 7); 6,67 (m, 1H); 6,96 (d, 2H, J = 9); 7,22-7,41 (m, 6H); 7,60 (d, 2H, J = 8); 7,64 (s, 1H); 8,25 (s, 1H); 8,65 (bs, 1H); 11,16 (bs, 1H).

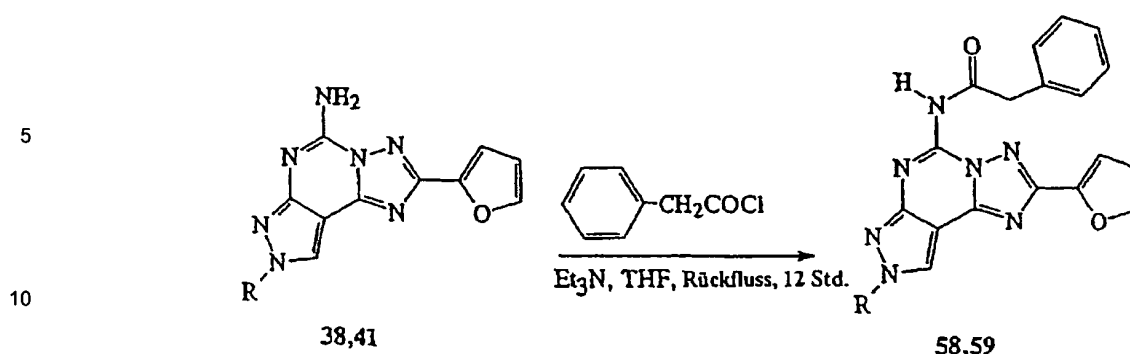
45 Beispiel 4: Herstellung von 5-[(Benzyl)carbonyl]amino-8-(ar)alkyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (Verbindungen 58-59)

5-[(Benzyl)carbonyl]amino-8-(ar)alkyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine lassen sich gemäß der im nachstehenden Schema IX gezeigten Synthesestrategie herstellen.

Schema IX: Allgemeine Verfahren zur Herstellung von 5-[(Benzyl)carbonyl]amino-8-(ar)alkyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidinen (58-59)

50

55



Bei der Herstellung der Verbindungen 58-59 wurde die geeignete Aminoverbindung (38 oder 41) (10 mmol) in frisch destilliertem THF (15 ml) gelöst, und das geeignete Säurehalogenid (13 mmol) und Triethylamin (13 mmol) wurden hinzu gefügt. Das Gemisch wurde 18 Std. unter Argon und unter Rückfluss belassen. Das Lösungsmittel wurde dann unter reduziertem Druck entfernt, und der Rückstand wurde in EtOAc (30 ml) gelöst und zweimal mit Wasser (15 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde auf Na₂SO₄ getrocknet und unter reduziertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde durch Flash-Chromatographie (EtOAc-Petrolether 4:6) gereinigt, so dass die gewünschten Verbindungen 48, 58 erhalten wurden. Gemäß diesem allgemeinen Verfahren wurden die nachstehenden Verbindungen hergestellt:

5-[[Benzyl)carbonyl]amino-8-isopentyl-2-(2-furyl)-pyrazolo [4,3-e]-1,2,4-triazolo [1,5-c]pyrimidin (58)

Ausbeute 85%, blassgelber Feststoff, Schmp. 144-145°C (Et₂O-Petrolether); IR (KBr): 3255-2930, 1673, 1620, 1610, 1520 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0,98 (d, 6H, J = 7,5); 1,60 (m, 1H); 1,91 (m, 1H); 4,40 (t, 2H, J = 7); 4,53 (s, 2H); 6,60 (m, 1H); 7,18 (m, 1H); 7,26-7,39 (m, 5H); 7,64 (s, 1H); 8,22 (s, 1H); 9,11 (bs, 1H).

5-[[Benzyl)carbonyl]amino-8-(3-phenylpropyl)-2-(2-furyl)-pyrazolo [4,3-e] -1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin (59)

Ausbeute 95%, blassgelber Feststoff, Schmp. 116-117°C (Et₂O-Petrolether); IR (KBr); 3250-2900, 1675, 1625, 1600, 1500 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2,39 (m, 2H); 2,67 (t, 2H, J = 7); 4,37 (t, 2H, J = 7); 4,53 (s, 2H); 6,61 (m, 1H); 7,16-7,43 (m, 11H); 7,65 (s, 1H); 7,64 (s, 1H); 8,19 (s, 1H); 9,12 (bs, 1H)

Beispiel 5: Herstellung von 1-substituierten 4-Cyano-5-aminopyrazolen

Gemäß den in J. Org. Chem. 21 (1956) 1240, J. Am. Chem. Soc. 78 (1956) 784 und den darin aufgeführten Literaturstellen beschriebenen Verfahren werden die nachstehend genannten Verbindungen hergestellt, ausgehend von kommerziell erhältlichen Ethoxymethylenmalonodinitril und N1-substituierten Hydrazinen, die ebenfalls kommerziell erhältlich sind:

- 1-Methyl-4-cyano-5-aminopyrazol
- 1-n-Butyl-4-cyan-5-aminopyrazol
- 1-Isopentyl-4-cyano-5-aminopyrazol
- 1-(2-Cyclopentyl)ethyl-4-cyan-5-aminopyrazol
- 1-Hydroxyethyl-4-cyano-5-aminopyrazol
- 1-Phenyl-4-cyano-5-aminopyrazol
- 1-tert.-Butyl-4-cyano-5-aminopyrazol
- 1-Phenylethyl-4-cyano-5-aminopyrazol
- 1-(2-Chlorphenyl)-4-cyano-5-aminopyrazol.

Diese Verbindungen lassen sich als Zwischenprodukte zur Herstellung von Pyrazolotriazolopyrimidinverbindungen, wie hier beschrieben verwenden.

Beispiel 6: Herstellung von 1-substituierten 4-Cyano-3-aminopyrazolen

Ausgehend von 4-Cyano-5-aminopyrazol, hergestellt nach dem Verfahren, beschrieben in Chem. Pharm. Bull. 18 (1970) 2353 oder J. Heterocyclic Chem. 16 (1979) 1113, können 1-substituierte 4-Cyano-3-aminopyrazole durch direkte Alkylierung mit dem entsprechenden Alkylhalogenid in Dimethylformamid bei 80°C für 1 bis 2 Std. in Gegenwart von wasserfreiem Kaliumcarbonat hergestellt werden. Aus dem Reaktionsgemisch, das die beiden N1- und N2-alkylierten Stellungsisomere in einem Verhältnis von etwa 1:2 enthält, kann das N2-Isomer durch eine einzelne Kristallisation oder Säulenchromatographie auf Silicagel unter Elution mit Ethylacetat und Petrolether-Gemischen isoliert werden. Mit diesen Verfahren wurden die nachstehenden Verbindungen hergestellt:

- 1-Methyl-4-cyano-3-aminopyrazol
- 1-Butyl-4-cyano-3-aminopyrazol
- 1-Benzyl-4-cyano-3-aminopyrazol
- 1-Isopentyl-4-cyano-3-aminopyrazol
- 1-Phenylethyl-4-cyano-3-aminopyrazol

Diese Verbindungen können als Zwischenprodukte zur Herstellung von Pyrazolotriazolopyrimidin-Verbindungen, wie hier beschrieben, verwendet werden.

Beispiel 7: Herstellung von Phenylethyl-4-cyano-3-aminopyrazolen

a) Eine Suspension von wasserfreiem Kaliumcarbonat (30 mmol) in DMF (50 ml) wird mit 3-Amino-4-cyanopyrazol (20 mmol) versetzt, 30 min auf eine Temperatur von 80°C erhitzt. Die Suspension wird mit Phenethylbromid (25 mmol) versetzt und 2 Std. auf 80°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird das Gemisch unter Vakuum bis zur Trockne verdampft und der erhaltene Rückstand wird in destilliertem Wasser (100 ml) aufgenommen und mit Ethylacetat (3 x 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und unter Vakuum bis zur Trockne eingedampft. Der erhaltene Rückstand besteht aus einem 1:3-Gemisch von 1-Phenylethyl-4-cyano-5-aminopyrazol (20%) und 1-Phenylethyl-4-cyano-3-aminopyrazol (60%), das als solches in Beispiel 9 verwendet werden kann oder auf Silicagel unter Elution mit einem Ethylacetat/Hexan-Gemisch chromatographisch aufgetrennt werden kann, so dass 1-Phenylethyl-4-cyano-5-aminopyrazol, Schmp. 172-173°C (20%) erhalten wird; ¹H-NMR (DMSO-d₆): 3,04 (t, 2H); 4,12 (t, 2H); 5,85 (sb, 2H); 7,21-7,30 (m, 5H); 7,41 (s, 1H); 1-β-Phenylethyl-4-cyano-3-aminopyrazol, Schmp. 98-100°C (60%); ¹H-NMR (CDCl₃): 3,07 (t, 2H); 4,10 (t, 2H); 4,23 (sb, 2H); 7,17 (s, 1H); 7,00-7,28 (m, 5H).

b) Eine Lösung von 1-β-Phenylethyl-4-cyano-5-aminopyrazol (20 mmol) in Triethylorthoformiat (40 ml) wird 8 Std. unter Stickstoff und unter Rückfluss belassen. Das überschüssige Orthoformiat wird unter Vakuum bis zur Trockne verdampft, und das restliche Öl wird in Ethylether gelöst und auf Silicagel gereinigt, so dass der entsprechende Iminoether (87%ige Ausbeute) erhalten wird. Der nach der Orthoformiat-Eindampfung erhaltene Rückstand ist praktisch rein und wird direkt im nachfolgenden Schritt verwendet. Eine Lösung des Iminoethers (20 mmol) und 2-Brenzschleimsäurehydrazid (2,5 g, 22 mmol) in 2-Methoxyethanol (50 ml) wird 5 bis 10 Std. unter Rückfluss gehalten. Nach dem Abkühlen wird die Lösung bis zur Trockne eingedampft, so dass ein öliger Rückstand erhalten wird, der in Diphenylether (50 ml) mit einer Dean-Stark-Vorrichtung thermisch cyclisiert wird, so dass das bei der Umsetzung entstandene Wasser azeotrop entfernt wird. Nach 1,5 Std. wird die Umsetzung via DC (Ethylacetat:Petrolether 2:1) überprüft, und das Gemisch wird abgekühlt und mit Hexan versetzt, wenn die Ausgangsverbindung verbraucht ist. Der erhaltene Niederschlag wird filtriert und kristallisiert, so dass 7-(β-Phenylethyl)-2(2-furyl)pyrazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin, Schmp. 174-175°C

(20%) erhalten wird; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): 3,23 (t, 2H); 4,74 (t, 2H); 6,75 (s, 1H); 7,14-7,17 (m, 5H); 7,28 (s, 1H), 7,98 (s, 1H); 8,53 (s, 1E); 9,56 (s, 1H).

Auf ähnliche Weise wurde ausgehend von 1- β -Phenylethyl-4-cyano-3-aminopyrazol, 8-(β -Phenylethyl)-2-(2-furyl)pyrazolo[4,3-e] 1,2,4-triazol(1,5-c)pyrimidin hergestellt; Schmp. 268-270°C (600A) $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): 3,32 (t, 2H); 4,72 (t, 2H); 6,73 (s, 1H), 7,23 (m, 5H); 7,95 (s, 1H); 8,8 (s, 1H); 9,41 (s, 1H).

c) Eine Suspension des Produktes von Schritt b) (10 mmol) in 10% HCl (5,0 ml) wird 3 Std. unter Rühren und Rückfluss belassen. Nach dem Abkühlen wird die Lösung mit konzentriertem Ammoniumhydroxid bei 0°C alkalisch gemacht, und der erhaltene Niederschlag wird filtriert oder mit Ethylacetat (3 x 100 ml) extrahiert, getrocknet und bis zur Trockne unter Vakuum eingedampft, so dass das entsprechende 1- β -Phenylethyl-4-[3(2-furyl)1,2,4-triazol-5-yl]-5-aminopyrazol, Schmp. 175-176°C erhalten wird; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): 3,15 (t, 2H); 4,48 (t, 2H); 5,78 (s, 1H), 6,37 (s, 1H); 6,68 (s, 1H); 7,1 (s, 1H); 7,27-7,28 (m, 5H); 7,82 (s, 1H); 14,51 (sb, 2H); auf ähnliche Weise wird 1-(β -Phenylethyl)-4-[3(2-furyl)-1,2,4-triazol-5-yl]-3-aminopyrazol (Schmp. 205-206°C) erhalten; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): 3,12 (t, 2H); 4,46 (t, 2H); 5,75 (s, 1 H); 14,41 (sb, 2H).

d) Cyanamid (60 mmol) wird zu einer Suspension des Amins aus Schritt c) (10 mol) in N-Methylpyrrolidon (40 ml) gegeben, gefolgt von p-Toluolsulfonsäure (15 mmol). Das Gemisch wird unter Rühren auf 160°C erhitzt. Nach 4 Std. wird eine zweite Portion Cyanamid (60 mmol) zugegeben, und es wird über Nacht weiter erhitzt. Das Gemisch wird dann mit heißem Wasser (200 ml) behandelt, und der Niederschlag wird filtriert, mit Wasser gewaschen und aus Ethanol kristallisiert, so dass das entsprechende 5-Amino-7-(β -phenylethyl)-2-(2-furyl)pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazol[1,5-c]pyrimidin, Schmp. 225-226°C erhalten wird. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): 3,21 (t, 2H); 4,51 (t, 2H); 6,65 (s, 1H); 7,1-7,44 (m, 5H, Atom und 1H); 7,78 (s, 1H); 7,89 (sb, 2H); 8,07 (s, 1H).

Auf ähnliche Weise wurde 5-Amino-8-(β -phenylethyl)-2-(2-fu yl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin, Schmp. 212-213°C erhalten. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): 3,21 (t, 2H); 4,53 (t, 2H); 6,7 (s, 1H); 7,1-7,4 (m, 5H, Atom und 1H); 7,65 (sb, 2H); 7,93 (s, 1H); 8,45 (s, 1H).

Beispiel 8: Herstellung von 4-Cyano-5-amino-1,2,3-triazolen

Eine Suspension von Kaliumcarbonat (0,23 mol) in DMSO (70 ml) wird nacheinander mit Cyanoacetamid (70 mmol) und p-Fluorbenzylazid (54,5 mmol) versetzt. Die erhaltene Lösung wird 1 Std. bei Raumtemperatur gerührt und dann in ein großes Volumen Wasser (1,5 l) gegossen. Der abgeschiedene Feststoff wird filtriert, mit Wasser gewaschen und in einem Ofen bei 70°C getrocknet, so dass 1-(p-Fluorbenzyl)-4-carboxamido-5-amino-1,2,3-triazol (961%ige Ausbeute) erhalten wurde. Schmp. 198-199°C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): 7,5-7,1 (m, 6H); 6,4 (s, 2H); 5,4 (s, 2H). Eine Amidsuspension (0,005 mol), gerührt und auf 0°C gekühlt, in DMF (5 ml) wird mit Phosphoroxychlorid (0,01 mol) versetzt. Die erhaltene Lösung wird 5 min bei 0°C, 10 min bei 25°C und 15 min bei 80°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 5 ml N HCl dazu gegeben, und das Gemisch wird 5 min unter Rückfluss gehalten. 1-(p-Fluorbenzyl)-4-cyano-5-amino-1,2,3-triazol setzt sich aus der gekühlten Lösung ab (90%ige Ausbeute). Schmp. 185-186°C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): 7,3-7,0 (m, 6H); 5,5 (s, 2H); IR (KBr): 3400, 3220, 2220, 1655 cm^{-1} .

Analog wurden die nachstehenden Verbindungen hergestellt:

1- oder 2-Benzyl-4-cyano-5-amino-1,2,3-triazol

1- oder 2-(o-Fluorbenzyl)-4-cyano-5-amino-1,2,3-triazol

1- oder 2-(p- Fluorbenzyl)-4-cyano-5-amino- 1,2,3-triazol

1- oder 2-Butyl-4-cyano-5-amino-1,2,3-triazol

1- oder 2-Isopentyl-4-cyano-5-amino-1,2,3-triazol
1- oder 2-(2-Methoxyethyl)-4-cyano-5-amino-1,2,3-triazol
1- oder 2-Heptyl-4-cyano-5-amino-1,2,3-triazol
1- oder 2-Octyl-4-cyano-5-amino-1,2,3-triazol.

5

Diese Verbindungen können als Zwischenprodukte zur Herstellung der hier beschriebenen Triazolotriazolopyrimidin-Verbindungen verwendet werden.

Beispiel 9: Herstellung von Ethoxymethylenamino-Heterocyclen

10

Die Herstellung von Ethoxymethylenamino-Heterocyclen der Formel IV erfolgt unter Rückfluss des entsprechenden ortho-Aminonitrils mit Ethylorthoformiat. Beispielsweise wird die Herstellung von 4-Cyano-5-(ethoxymethylenamino)-1-butylpyrazol beschrieben. Eine Lösung von 4-Cyano-5-amino-1-butylpyrazol (20 mmol) in Triethylorthoformiat (40 ml) wird 8 Std. unter einer Stickstoffatmosphäre auf Rückflusstemperatur erhitzt. Überschüssiges Orthoformiat wird bis zur Trockne unter Vakuum eingedampft, und das restliche gelbe Öl wird in Ethylether gelöst und durch Silicagel eluiert, so dass die reine Verbindung (87%ige Ausbeute) erhalten wird. In vielen Fällen ist der nach dem Eindampfen des Orthoformiates erhaltene Rückstand im Wesentlichen rein und wird als solcher im nachfolgenden Schritt verwendet. IR (Nujol): 3140, 2240, 1640 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 8,4 (s, 1H); 7,9 (s, 1H); 4,5 (t, 2H); 4,3 (q, 2H); 1,8 (m, 2H); 1,5 (m, 2H); 1,4 (t, 3H); 0,9 (t, M).

20

Beispiel 10: Cyclisierung von Ethoxymethylenamino-Heterocyclen

25

Eine Lösung des Ethoxymethylenamino-Heterocyclus (20 mmol) und 2-Brenzschleimsäurehydrazid (2,5 g, 22 mmol) in 2-Methoxyethanol (50 ml) wird 5 bis 10 Std. unter Rückfluss belassen. Nach dem Abkühlen wird die Lösung bis zur Trockne verdampft, so dass ein Restöl erhalten wird, das in Diphenylether (50 ml) mit Hilfe eines Rundbodenkolbens, der mit einer Dean-Stark-Vorrichtung verbunden ist, thermisch cyclisiert wird, so dass das bei der Umsetzung entstehende Wasser azeotrop entfernt wird. Nach verschiedenen Zeiten (3 bis 5 Std.) wird die Umsetzung durch DC (2:1 Ethylacetat:Petrolether) überprüft, und nach Verschwinden des vollständigen Ausgangsproduktes wird das Gemisch *gekühlt*, und Hexan wird zugegeben. Der erhaltene Niederschlag wird filtriert und aus dem geeigneten Lösungsmittel kristallisiert. In einigen Fällen scheidet sich ein viskoses Öl aus der Lösung ab, welches dann dekantiert und anschließend extrahiert wird. Der ölige Rückstand wird dann auf Silicagel chromatographisch aufgetrennt, wobei mit Ethylacetat/Petrolether-Gemischen eluiert wird, so dass die trizyklische Verbindung VI erhalten wird.

30

35

Nachstehend sind die Analyse- und Spektroskopiedaten einiger durch dieses Verfahren hergestellte Verbindungen aufgeführt.

40

7-Butyl-2(2-furyl)-pyrazolo-[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5c]pyrimidin.

$^1\text{H NMR}$ (DMSO-d_6): 9,6 (s, 1H); 8,6 (s, 1H); 8,0 (m, 1H); 7,4 (m, 1H); 6,7 (m, 1H); 4,5 (t, 2H); 1,9 (m, 2H); 1,3 (m, 2H); 0,9 (t, 3H).

45

8-Butyl-2(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo [1, 5-c]pyrimidin.

$^1\text{H NMR}$ (DMSO-d_6): 9,4 (s, 1H); 8,9 (s, 1H); 8,0 (m, 1H), 7,3 (m, 1H); 6,2 (m, 1H); 4,5 (t, 2H); 1,9 (m, 2H); 1,; (m, 2H); 0,9 (m, 3H). Im 2D-NMR (NOESY)-Spektrum zeigt das bei 4,5 resonierende N-CH, Signal Kreuzsignale mit dem bei 8,9 resonierenden C9-H-Signal.

50

7-Isopentyl-2(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e] 1,2,4-triazolo(1,5-c]pyrimidin.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 9,1 (s, 1H); 8,8 (s, 1H); 7,7 (m, 1H); 7,3 (m, 1H); 6,6 (m, 1H); 4,6 (t, 2H); 1,18-

55

1,7 (m, 3H); 1,0 (d, 6H).

8-isopentyl-2(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin.

5 9,1 (s, 1H); 8,8 (s, 1H); 7,7 (m, 1H); 7,3 (m, 1H); 6,6 (m, 1H); 4,6 (t, 2H); 1,9-1,5 (m, 3H); 1,0 (d, 6H)

Gemäß diesem Verfahren wurden die nachstehenden Verbindungen hergestellt:

- 10 7-Methyl-2(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 8-Methyl-2(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 7-(2-Chlorphenyl)-2(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 7-Phenylethyl-2(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 7-tert.-Butyl-2(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 15 7-(2-Cyclopentyl)ethyl-2(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 8-Benzyl-2(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 7-Benzyl-2(2-furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 7-(2-Fluorbenzyl)-2(2-furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 7-(4-Fluorbenzyl)-2(2-furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 20 7-Butyl-2(2-furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 7-Isopentyl-2(2-furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 7-(2-Methoxy)ethyl-2(2-furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 7-Heptyl-2(2-furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 7-Octyl-2(2-furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 25 8-Benzyl-2(2-furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 8-(2-Fluorbenzyl)-2(2-furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 8-(4-Fluorbenzyl)-2(2-furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 8-Butyl-2(2-furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 8-Isopentyl-2(2-furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 30 8-Hexyl-2(2-furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 8-Heptyl-2(2-furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 8-Octyl-2(2-furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 9-Benzyl-2(2-furyl)-1,2,3-triazolo[4,5-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 9-(2-Fluorbenzyl)-2(2-furyl)-1,2,3-triazolo[4,5-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
 35 9-(4-Fluorbenzyl)-2(2-furyl)-1,2,3-triazolo[4,5-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin

Diese Verbindungen können als Zwischenprodukte zur Herstellung der Triazolotriazolo-Pyrimidine und Pyrazolotriazolo-Pyrimidine wie hier beschrieben verwendet werden.

- 40 Beispiel 11: Herstellung von 5-Amino-7-[aralkyl]-2(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin

Eine Suspension der Amine der Formel VII (10 mmol) in N-Methylpyrrolidon (40 ml) wird mit Cyanamid (60 mmol) und anschließend p-Toluolsulfonsäure (15 mmol) versetzt. Das Gemisch
 45 wird unter Rühren mit dem Magnetrührer auf 160°C erhitzt. Nach 4 Std. wird eine zweite Portion Cyanamid (60 mmol) dazu gegeben, und es wird weiter über Nacht erhitzt. Das Gemisch wird dann mit heißem Wasser behandelt (200 ml), und der gefällte Feststoff wird filtriert, mit Wasser gewaschen und aus Ethanol auskristallisiert. Findet keine Fällung statt, wird die Lösung mit Ethylacetat (4 x 100 ml) extrahiert, die Extrakte werden mit Salzlösung (2 x 50 ml) gewaschen,
 50 getrocknet und unter Vakuum bis zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird dann auf einer Silicagelsäule unter Elution mit Ethylacetat chromatographisch aufgetrennt.

Nachstehend sind die Analyse- und Spektroskopiedaten einiger durch dieses Verfahren hergestellte Verbindungen aufgeführt.

55

5-Amino-7-butyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin. Schmp. 157-158°C; ¹H NMR (DMSO-d₆) 8,1 (s, 1H); 8,0 (s, 2H); 7,9 (m, 1H); 7,2 (m, 1H); 6,7 (m, 1H); 4,2 (t, 2H); 1,9 (m, 2H); 1,5 (m, 2H); 0,9 (t, 3H). 5-Amino-8-butyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin Schmp. 183-185°C; ¹H NMR (DMSO-d₆): 8,6 (s, 1H); 8,0 (s, 1H); 7,6 (s, 2H); 7,2 (m, 1H); 6,7 (m, 1H); 4,2 (t, 2H); 1,8 (m, 2H); 1,2 (m, 2H); 0,9 (t, 3H).

5-Amino-7-benzyl-2-(2-furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin. Schmp. 295-297°C; ¹H-NMR (DMSO-d₆): 8,5 (s, 2H); 8,0 (s, 1H); 7,3 (m, 6H); 6,7 (m, 1H); 5,7 (s, 2H).

5-Amino-7-o-fluor-benzyl-2-(2-furyl)-1,2,3-triazolo-[5,4-e]-1,2,4-triazolo [1,5-c]pyrimidin Schmp. 310-312°C; ¹H-NMR (DMSO-d₆): 8,5 (s, 2H); 8,0 (s, 1H); 7,3 (m, 5H); 6,8 (s, 1H); 5,75 (s, 2H).

5-Amino-7-methyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo-[1,5-c]pyrimidin; Schmp. 210-213°C

5-Amino-7-tert-butyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo-[1,5-c]pyrimidin; Schmp. 238-240°C

5-Amino-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo(1,5-c)pyrimidin; Schmp. 248-250°C

5-Amino-7-(2-hydroxyethyl)-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo-[1,5-c]pyrimidine; Schmp. 258-260°C

5-Amino-7-phenyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo-[1,5-c]pyrimidin; Schmp. 295-297°C

5-Amino-7-isopentyl 1-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo-[1,5-e]-pyrimidin; Schmp. 208-210°C.

5-Amino-8-isopentyl-2-(2-furyl)-pyrazolo(4,3-e)-1,2,4-triazolo-[1,5-c]pyrimidin; Schmp. 200-203°C.

5-Amino-7-phenethyl-2-(2-furyl)-pyrazolo-[4,3-e]-1,2,4-triazolo-[1,5-c]pyrimidin; Schmp. 225°C.

5-Amino-7-benzyloxyethyl-2-(2-furyl)-pyrazolo-[4,3-e]-1,2,4-triazolo-[1,5-c]pyrimidin. 5-Amino-7-[β-(4-isobutylphenethyl)]-2-(2-furyl)-pyrazolo-[4,3-e]-1,2,4-triazolo-[1,5-c]pyrimidin; Schmp. 207-210°C.

Diese Verbindungen können mit einem geeigneten Säure- oder Sulfonsäure-Derivat umgesetzt werden, so dass die hier offenbarten Verbindungen der Formel I erhalten werden.

Beispiel 12: Herstellung von substituierten 4-Carboxamido-5-amino-1,2,3-triazolen

p-Fluorbenzylazid (15,1 g, 0,1 mol) und Cyanacetamid (10,8 g, 0,13 mol) werden in dieser Reihenfolge zu einer Suspension aus pulverisiertem Kaliumcarbonat (57,5 g, 0,42 mol) in Dimethylsulfoxid (150 ml) gegeben. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur 1 Std. lang gerührt. Das Gemisch wird in 3 l Wasser gegossen, und der sich abscheidende Feststoff wird filtriert und sorgfältig mit Wasser gewaschen, so dass 22,47 g (96%) 1-p-Fluorbenzyl-4-carboxamido-5-amino-1,2,3-triazol erhalten wird. Schmp. 189-199°C; ¹H-NMR (DMSO-d₆): 7,5-7,1 (m, 6H); 6,4 (s, 2H); 5,4 (s, 2H).

Analog wurden erhalten:

2-Fluor-6-chlorbenzyl-4-carboxamid-5-amino-1,2,3-triazol; Schmp. 230°C-231°C; ¹H-NMR (DMSO-d₆): 5,40 (s, 2H); 6,52 (sb, 2H); 7,12-7,45 (m, 5H).

3-Fluorbenzyl-4-carboxamido-5-amino-1,2,3-triazol; Schmp. 211-211°C ¹H-NMR (DMSO-d₆):

5,46 (s, 2H); 6,47 (sb, 2H); 7,00-7,52 (m, 6H).

2-Fluorbenzyl-4-carboxamido-5-amino-1,2,3-triazol; Schmp. 195-197°C. 1-(β-Phenylethyl)-4-carboxamido-5-amino-1,2,3-triazol; Schmp. 181-183°C; ¹H-NMR (DMSO-d₆): 3,04 (t, 2H); 4,35 (t, 2H); 6,30 (sb, 2H); 7,20-7,47 (m, 7H).

Beispiel 13: Herstellung von substituierten 4-Cyano-5-amino-1,2,3-triazolen

Eine mittels Magnetrührer bei 0°C gerührte Suspension von 1-p-Fluorbenzyl-4-carboxamido-5-amino-1,2,3-triazol (23,4 g, 0,1 mol) in DMF (100, 10 ml) wird mit 20,8 ml (0,2 mol) POCl₃ versetzt. Die Lösung wird 5 Std. bei 0°C, 10 Std. bei Raumtemperatur und schließlich 15 Std. bei 80°C gerührt. Nach dem Abkühlen wird 1N HCl (100 ml) dazu gegeben, und die erhaltene Lösung wird 5 Std. unter Rückfluss belassen; beim Abkühlen fällt 1,5-p-Fluorbenzyl-4-cyano-5-amino-1,2,3-triazol (18,54 g, 90%) aus. Schmp. 185-186°C; ¹H-NMR (DMSO-d₆): 7,3-7,0 (m, 6H); 5,5 (s, 2H); IR (KBr): 3400, 3220, 2220, 1655 cm⁻¹.

Analog wurden die nachstehenden Verbindungen erhalten:

2-Fluor-6-chlorbenzyl-4-cyano-5-amino-1,2,3-triazol;

Schmp. 181-185°C ¹H-NMR (DMSO-d₆): 5,40 (s, 2H); 7,26-7,50 (m, 5H).

3-Fluorbenzyl-4-cyano-5-amino-1,2,3-triazol; Schmp. 195-197°C; ¹H-NMR (DMSO-d₆): 5,44 (s, 2H); 7,00-7,43 (m, 6H).

2-Fluorbenzyl-4-cyano-5-amino-1,2,3-triazol; Schmp. 195-197°C.

1-(β-Phenylethyl)-4-cyano-5-amino-1,2,3-triazol; Schmp. 149-150°C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): 3,04 (t, 2H), 4,36 (t, 2H); 7,03 (sb, 2H); 7,23-7,28 (m, 5H).

Beispiel 14: Herstellung von substituierten 4-[3(2-Furyl)-1,2,4-triazol-5-yl]-5-amino-1,2,3-triazolen

Eine Suspension von 1-p-Fluorbenzyl-4-cyano-5-amino-1,2,3-triazol (20 mmol) und 2-Brenzschleimsäurehydrazid (22 mmol) in Diphenylether (30 ml) wird gerührt und mit einer Dean-Stark-Vorrichtung auf Rückfluss (260°C) erhitzt, bis die Ausgangsverbindung verschwindet (DC, 1 bis 2 Std.). Nach dem Abkühlen wird das Gemisch mit Petrolether verdünnt, und der erhaltene Niederschlag wird entweder filtriert oder durch Dekantieren abgetrennt und auf einer Silicagelsäule unter Elution mit 2:1 Ethylacetat und Petrolether chromatographisch aufgetrennt.

1-p-Fluorbenzyl-4-[3(2-furyl)-1,2,4-triazol-5-yl]-5-amino-1,2,3-triazol; Schmp. 266-268°C ¹H-NMR (DMSO-d₆): 14,5 (s, 1H), 7,8 (s, 1H); 7,4-7,1 (m, 5H); 6,6 (s, 1H); 6,5 (s, 2H); 5,5 (s, 2H).

Analog wird 1-(β-Phenylethyl)-4[3(2-furyl)-1,2,4-triazol-5-yl]-5-amino-1,2,3-triazol (50%) erhalten; Schmp. 200-202°C. ¹H-NMR (DMSO-d₆): 3,07 (t, 2H); 4,16 (t, 2H) 5,50 (sb, 2H); 6,61 (s, 1H); 6,95 (s, 1H); 7,2-7,4 (m, 5H); 7,78 (s, 1H); 13,8 (sb, 1H).

Beispiel 15: Herstellung von 5-Amino-7-substituierten 2-(2-Furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e] 1,2,4-triazolo [1,5-c] pyrimidinen

Eine Suspension von 1-p-Fluorbenzyl-4[3(2-furyl)-1,2,4-triazolo-5-yl]-5-amino-1,2,3-triazol (0,325 g, 1 mmol) in N-Methylpyrrolidon (4 ml) wird mit Cyanamid (6 mmol), gefolgt von p-Toluolsulfonsäure (1,5 mmol), versetzt. Das Gemisch wird unter Rühren mit dem Magnetrührer bei 160°C erhitzt. Nach 4 Std. wird ein zweiter Anteil Cyanamid (6 mmol) dazu gegeben, und es wird über Nacht weiter erhitzt. Das Gemisch wird dann mit heißem Wasser (20 ml) behandelt,

und der ausgefällte Feststoff wird filtriert, mit Wasser gewaschen und aus Ethanol kristallisiert. Findet keine Ausfällung statt, wird die Lösung mit Ethylacetat (4 x 10 ml) extrahiert, die Extrakte werden mit Salzlösung (2 x 5 ml) gewaschen, getrocknet und bis zur Trockne unter Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird dann auf einer Silicagelsäule unter Elution mit Ethylacetat chromatographisch aufgetrennt, so dass 105 mg (30%ige Ausbeute) 5-Amino-7-p-fluorbenzyl-2-(2-furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin, Schmp. 266-268°C, erhalten wurde; ¹H-NMR (DMSO-d₆): 8,5 (stärker bevorzugt, 2H); 7,95 (s, 1H), 7,4-7,1 (m, 6H); 6,7 (s, 1H), 5,7 (s, 2H).

10 Analog wurden erhalten:

5-Amino-7-o-fluorbenzyl-2-(2-furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin; Schmp. 310°C.

15 5-Amino-7-benzyl-2-(2-furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin; Schmp. 295-297°C.

20 5-Amino-7-(2-fluor-6-chlorbenzyl)-2-(2-furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin; Schmp. 218-220°C; ¹H-NMR (DMSO-d₆): 8,51 (sb, 2H); 7,98 (s, 1H); 7,55-7,28 (m, 4H); 6,77 (m, 1H); 5,73 (s, 2H).

25 5-Amino-7-(m-fluorbenzyl)-2-(2-furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin; Schmp. 280-283°C; ¹H-NMR (DMSO-d₆): 8,45 (bs, 2H); 7,98 (s, 1H); 7,4-7,1 (m, 5H); 6,76 (s, 1H); 5,75 (s, 2H).

5-Amino-7-(13-phenylethyl)-2-(2-furyl)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin; Schmp. 269-271 °C; ¹H-NMR (DMSO-d₆): 8,4 (sb, 2H); 7,98 (s, 1H); 7,3-7,15 (m, 6H); 6,8 (s, 1H); 4,71 (t, 2H); 3,31 (t, 2H)

30 Beispiel 16: Bewertung der biologischen Aktivität der Verbindungen

Einige der vorstehend beschriebenen Verbindungen wurden auf ihre Affinität an Ratten-A₁- und -A_{2A} Rezeptoren mit den nachstehenden Tests untersucht.

35 *Bindungstest mit A₁- und A_{2A} Adenosin-Rezeptor aus Ratte*

Männliche Wistar-Ratten (200-250 g) wurden enthauptet, und das Gesamtgehirn und das Striatum wurden auf Eis seziiert. Die Gewebe wurden in einem Polytron-Homogenisator bei der Einstellung 5 30 sec. lang in 25 Volumina 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH-Wert 7,4, welcher 10 mM MgCl₂ enthielt, aufgebrochen. Das Homogenat wurde 10 min lang bei 48000 zentrifugiert, und das Pellet wurde im gleichen Puffer, welcher 2 IU/ml Adenosindesaminase enthielt, resuspendiert. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden die Membranen zentrifugiert und die Pellets wurden bei -80°C aufbewahrt. Vor dem Einfrieren wurde ein Aliquot des Homogenates für einen Proteinassay mit Rinderalbumin als Bezugsstandard entnommen. Die Bindungsassays wurden an Rattengehirn bzw. Striatummembranen in Gegenwart von 10 mM MgCl₂ bei 25°C durchgeführt. Sämtliche Pufferlösungen wurden so eingestellt, dass sie einen konstanten pH-Wert von 7,4 hielten.

50 Verdrängungsexperimente wurden in 500 µl Tris-HCl-Puffer, mit 1 nM des selektiven Adenosin-A₁-Rezeptorliganden [³H]CHA (N⁶-Cyclohexyladenosin) und Membranen von Rattenhirn (150-200µg Protein/Test) durchgeführt.

55 Verdrängungsexperimente wurden in 500 µl Tris-HCl-Puffer, mit 10 mM MgCl₂, 0,2 nM des selektiven Adenosin-A_{2A}-Rezeptorliganden [³H]SCH58261 (5-Amino-7-(2-phenylethyl)-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin) und Membranen von Ratten-Striatum (80-

100µg Protein/Test) durchgeführt. Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte (wobei IC_{50} die Inhibitorkonzentration ist, welche 50% des markierten Liganden verdrängt) wurde die Testverbindung in Dreifachansätzen zu Bindungstestproben in mindestens sechs unterschiedlichen Konzentrationen gegeben. Die Trennung des gebundenen vom freien Radioliganden wurde durch rasche
5 Filtration durch Whatman GF/B-Filter durchgeführt, welche dreimal mit eiskaltem Puffer gewaschen wurden. Die filtergebundene Radioaktivität wurde durch Szintillationsspektrometrie nach Zugabe von 5 ml Aquassure gemessen. Nichtspezifische Bindung wurde definiert als Bindung in Gegenwart von 10 µM R-PIA (N^6 -(Phenylisopropyl)adenosin bzw. 10 µM NECA (5'-(N-Ethylcarboxamido)adenosin) und sie betrug immer 10% der Gesamtbindung. Die Inkubationszeit reichte gemäß den Ergebnissen vorhergegangener Zeit-Verlaufs-Experimente von 150 min.
10 bei 0°C bis 75 min bei 30°C. Die K_i -Werte wurden aus der Cheng-Prusoff-Gleichung berechnet. Sämtliche Bindungsdaten wurden mit dem Anpassungsprogramm für nichtlineare Regressionskurven LIGAND analysiert.

15 *Bindungsassays von menschlichem klonierten A_3 Adenosin-Rezeptor*

Ein Aliquot von Membranen (8 µg Protein/ml) von HEK-293-Zellen, die mit dem menschlichen rekombinanten A_3 -Adenosinrezeptor transfiziert worden waren, wurden für Bindungstests verwendet. Die Figur 1 zeigt eine typische Sättigung von [125]AB-MECA (N^6 -(4-Amino-3-iodbenzyl)-
20 5'-(N-methylcarbamoyl)adenosin) an HEK-293-Zellen. Inhibitionsexperimente wurden im Doppelansatz in einem Endvolumen von 100 µl in Teströhrchen mit 0,3 nM [125]AB-MECA, 50 nM Tris-HCl-Puffer, 10 mM $MgCl_2$, pH-Wert 7,4, 20 µl verdünnten Membranen (12,4 mg Protein/ml) und mindestens 6-8 verschiedenen Konzentrationen typischer Adenosinrezeptorantagonisten durchgeführt. Nichtspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 50 µM R-PIA definiert und
25 betrug etwa 30% der Gesamtbindung. Die Inkubationszeit betrug 60 min bei 37°C, gemäß den Ergebnissen vorhergegangener Zeit-Verlaufs-Experimente. Gebundene und freie Radioaktivität wurde durch Filtern des Assay-Gemischs durch Whatman GFB-Glasfaserfilter mit einem Brandel-Zellemter getrennt.

30 Ergebnisse und Diskussion

Die Verbindungen 34-59 wurden in Radioliganden-Bindungstests auf die Affinität zu Rattengehirn- A_1 , A_{2A} - und menschlichen A_3 -Rezeptoren untersucht, und die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Die Daten zeigen, dass Verbindungen, denen voluminöse (Verbindungen 38, 40 und 41) Gruppen an der Stellung N^5 fehlen, eine große Affinität für A_{2A} -Adenosinrezeptoren mit geringer Selektivität gegenüber A_1 und eine geringe Affinität für den menschlichen Adenosin- A_3 -Rezeptor-Subtyp aufweisen, und dass Verbindungen mit einer substituierten Phenyl-Carbamoylkette an der Stellung N^5 Affinität im Nanomolarbereich bei hA_3 -Rezeptor-Subtyp mit
40 unterschiedlichem Ausmaß an Selektivität gegenüber dem A_1 - und A_{2A} -Rezeptor-Subtyp besitzen. Insbesondere die 4-Methoxyphenylcarbamoyl-Einheit (Verbindungen 51, 55 und 57) verleiht eine um etwa drei Größenordnungen höhere Affinität als die Chlorphenylcarbamoyl-Einheit (Verbindungen 50, 54 und 56).

Die Einbringung von Ketten mit verschiedenen sterischen Eigenschaften an der Stellung N^8 ermöglicht die Entwicklung von Derivaten mit hoher Leistung beim menschlichen A_3 -Adenosinrezeptor und besserer Selektivität gegenüber A_1 - und A_2 -Rezeptor-Subtypen.

Die Figur 1 zeigt eine Sättigungskurve von [125]AB-MECA an den Adenosin- A_3 -Rezeptor, und die Linearität des Scatchard-Plots im Nebenbild zeigt unter unseren experimentellen Bedingungen das Vorhandensein einer einzelnen Klasse von Bindungsstellen mit einem K_D -Wert von $0,9 \pm 0,01$ nM und einen B_{max} Wert von 62 ± 1 fmol/mg Protein ($n = 3$).

Tabelle 1. Bindungsaffinität an rA_{11} , rA_{2A} und hA_3 Adenosinrezeptoren der Ausgangsverbindungen 35, 36, 38, 40, 41 sowie der erfindungsgemäßen Verbindungen, 44-47, 50, 51 und 54-57.

Verbindung	R	R'	rA_1 (K_d , nM)	rA_{2A} (K_d , nM)	hA_3 (K_d , nM)	rA_1/hA_3	rA_{2A}/hA_3	rA_{2A}/rA_1
MRS 1220*								
			305 ± 51	52 ± 8.8	0.65 ± 0.25	470	80	
34	CH ₃	H	313 (286-342)	30.65(28.62-32.82)	557 (489-636)	0.56	0.05	
43	CH ₃	4-MeO-Ph-NHCO	<10,000	>10,000	0.10 (0.09-0.11)	>100,000	>100,000	>100,000
42	CH ₃	3-Cl-Ph-NHCO	5,045 (4,566-5,579)	>10,000	0.22 (0.20-0.25)	22,931	>45,454	
35	CH ₃ CH ₂	H	95.09 (86.76-104.22)	11.15 (9.84-12.63)	3,579 (3,376-3,793)	0.03	0.003	
45	CH ₃ CH ₂	4-MeO-Ph-NHCO	>10,000	>10,000	0.28 (0.25-0.32)	>35,714	>35,714	
44	CH ₃ CH ₂	3-Cl-Ph-NHCO	2,699 (2,521-2,889)	2,799 (2,621-2,989)	2.09 (1.9-2.31)	1,291	1,339	
36	CH ₃ CH ₂ CH ₂	H	139 (107-181)	20.23 (16.14-25.36)	613 (582-646)	0.22	0.03	
47	CH ₃ CH ₂ -CH ₂	4-MeO-Ph-NHCO	>10,000	1,993 (1,658-2,397)	0.29 (0.27-0.32)	>34,482	6,872	
46	CH ₃ CH ₂ -CH ₂	3-Cl-Ph-NHCO	1,582 (1,447-1,730)	<10,000	0.49 (0.47-0.52)	3,228	>20,408	
37	CH ₃ CH ₂ CH ₂ -CH ₂	H	26.30 (23.66-29.24)	4.20 (3.84-4.58)	1.109 (981-1,254)	0.02	0.003	
49	CH ₃ CH ₂ CH ₂ -CH ₂	4-MeO-Ph-NHCO	2,098 (1,923-2,290)	649 (563-747)	0.30 (0.26-0.34)	6,993	2,163	
48	CH ₃ CH ₂ CH ₂ -CH ₂	3-Cl-Ph-NHCO	1,515 (1,382-1,661)	498 (414-599)	0.75 (0.65-0.86)	2,020	664	

38	$(\text{CH}_3)_2\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	H	8.09 (7.46-8.78)	1.20 (1.03-1.40)	1.163 (1.024-1.320)	0.007	0.001
51	$(\text{CH}_3)_2\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	4-MeO-Ph-NHCO	4.76 (4.32-5.25)	3.76 (3.32-4.26)	2.957 (2.694-3.246)	16	13
50	$(\text{CH}_3)_2\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	3-Cl-Ph-NHCO	1.650 (1.560-1.744)	1.197 (1.027-1.396)	81.10 (68.45-96.09)	20	15
58	$(\text{CH}_3)_2\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	Ph-CH ₂ CO	3.73 (3.30-4.22)	3.23 (2.80-3.72)	81.10 (68.45-96.09)	4.6	4
39	$(\text{CH}_3)_2\text{C=CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	H	10.08 (8.63-11.76)	1.45 (1.36-1.54)	887 (761-1034)	0.01	0.001
53	$(\text{CH}_3)_2\text{C=CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	4-MeO-Ph-NHCO	5.296 (4.826-5.811)	>10,000	29.57 (26.94-32.46)	179	>338
52	$(\text{CH}_3)_2\text{C=CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	3-Cl-Ph-NHCO	3.744 (3.312-4.233)	1.453 (1.363-1.549)	147 (122-178)	25.4	9.8
40	Ph-CH ₂ -CH ₂	H	2.16 (1.9-2.47)	0.70 (0.53-0.91)	2.785 (2.463-3.149)	0.0007	0.0002
55	Ph-CH ₂ -CH ₂	4-MeO-Ph-NHCO	1.282 (1.148-1.432)	1.398 (1.225-1.594)	1.47 (1.22-1.78)	872	951
54	Ph-CH ₂ -CH ₂	3-Cl-Ph-NHCO	1.049 (961-1.145)	1.698 (1.524-1.892)	13.28 (10.87-16.23)	79	128
41	Ph-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂	H	11.13 (9.34-13.27)	0.59 (0.44-0.81)	2.666 (2.533-2.805)	0.004	0.0002
57	Ph-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂	4-MeO-Ph-NHCO	1.514 (1.332-1.721)	>10,000	19.81 (17.61-22.27)	76.4	>504
56	Ph-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂	3-Cl-Ph-NHCO	>10,000	3.200 (3.025-3.385)	42.65 (39.92-45.57)	>234	75
59	Ph-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂	Ph-CH ₂ CO	345 (313-379)	400 (365-438)	121 (102-143)	2.8	3.3

*Werte aus Kim et al., *J. Med. Chem.*, 39:4142-4148 (1996).

Die Daten zeigen, dass kleine Substituentenkette (Cl_3) an der Stellung 8 der hier beschriebenen 5-[[substituiertes Phenyl]amino]carbonylamino-8-(ar)alkyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin-Verbindungen, insbesondere Methyl-, Ethyl- und Propyl-Gruppen, gegenüber größeren Ketten, wie Pentyl- und Hexylgruppen bevorzugt sind. Insbesondere die Verbindungen 45 und 47, die 8-methyl-, 8-ethyl- und 8-propyl, 5-(4-methoxyphenyl)-substituierten Verbindungen zeigten die höchste Affinität und Selektivität, und haben wahrscheinlich die höchste Affinität und Selektivität für den menschlichen Adenosin- A_3 -Rezeptor-Subtyp (hA_3) aller jemals synthetisierten Verbindungen.

Die Methyl-, Ethyl- und Propyl-Ketten können mit Phenyl- oder substituierten Phenylgruppen substituiert werden und zeigen noch ziemlich hohe Affinität und Selektivität für den A_1 -Rezeptor-Subtyp, jedoch ist die Affinität um einen Faktor zwischen 10 und 100 niedriger. Die Verbindung mit einer β -Phenylethylkette an N^8 und einer 4-MeO-Phenylcarbamoylekette an der Stellung N^5 (Verbindung 55) zeigte einen relativ guten Wert hinsichtlich Affinität und Selektivität ($K_1\text{hA}_3 = 1,47 \text{ nM}$, $r\text{A}_1/\text{hA}_3 = 872$, $r\text{A}_{2A}/\text{hA}_3 = 951$).

Sogar mit den in den Verbindungen 50 und 51 vorhandenen relativ großen Pentylgruppen zeigen die Verbindungen eine relativ hohe Affinität für den A_3 -Rezeptor-Subtyp (81,10 bzw. 29,57 nm), obwohl die Selektivität um einen Faktor von etwa 10 bis 100 sinkt.

Vorhergegangene Studien zeigten, dass die Affinität von 5-Amino-8-(ar)alkyl-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo-[1,5-c]pyrimidin-Verbindungen für den Adenosin- A_2 -Rezeptor-Subtyp mit der Größe der Gruppe an Stellung 8 zu steigen neigte. Es scheint, dass der entgegengesetzte Trend für die Affinität der hier für den A_3 -Rezeptor-Subtyp beschriebenen Verbindungen zutrifft. Cl_3 -Substituenten scheinen die idealen sterischen und lipophilen Eigenschaften für die Wechselwirkung mit dem A_3 -Rezeptor-Subtyp zu haben.

Beispiel 17: Bindungsexperimente mit einer radioaktiv markierten Verbindung

Eine Reihe von Bindungsexperimenten wurde an verschiedenen Tumorzelllinien mittels 0,5 nM [^{125}I]-ABMECA durchgeführt, wobei die unspezifische Bindung in Gegenwart von 50 μM R-PIA oder 200 μM NECA an Zellmembranen der Zelllinien bestimmt wurde. Die spezifische Bindung wurde bestimmt, indem die unspezifische Bindung von der Gesamtbindung subtrahiert wurde. Die Zelllinien waren HL 60-, NB4-, SKN-MC-, SKN-Be2C-, SKN-SH- und JURKAT-Zelllinien. Die Ergebnisse der Bindungsexperimente sind nachstehend in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2

Zelllinien	Gesamtbindung	Unspezifische Bindung	Spezifische Bindung (cpm)	Prozent spezifische Bindung
HL 60	3484	2791	693	20
NB4	3377	2740	637	19
SKN-MC	7528	6220	1308	17
SKN-Be2C	6000	4585	1415	24
SKN-SH	2671	2580	91	3
JLJRKAT	7599	4753	2846	38

Die Ergebnisse sind in graphischer Form in Figur 2 gezeigt.

Jurkat-Zelllinien scheinen die besten Ergebnisse der untersuchten Zelllinien zu liefern. Mit Jurkat-Zelllinien wurde bei 37°C ein Sättigungsexperiment mit 1 Std. Inkubationsdauer durchgeführt, wobei [^{125}I]-ABMECA (0,125-1,5 nM) verwendet wurde und die unspezifische Bindung

mittels R-PIA (50 μ M) gemessen wurde. Der K_d -Wert (nM) betrug 4, und der B_{\max} -Wert (fmol/mg Protein) betrug 290. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Figur 2 gezeigt. Anhand eines weiteren Tests wurde bestimmt, ob der A_1 -Rezeptor vorhanden war. Ein Verdrängungstest wurde 150 min bei 0°C an Jurkat-Zelllinien mittels [3 H]DPCPX, einem spezifischen A_1 -Antagonisten (0,5 nM), durchgeführt, wobei die unspezifische Bindung mittels R-PIA (50 μ M) bestimmt wurde. Die Gesamtbindung betrug 13208, die unspezifische Bindung betrug 2997, und die spezifische Bindung betrug 10211 (77%). Folglich wurde ein erhebliches Ausmaß an A_1 -Bindung beobachtet.

Die nachstehenden Experimente beschreiben erstmals die Charakterisierung von A_3 -Rezeptoren in einigen menschlichen Tumorzelllinien, wie HL-60, einer promyelotischen menschlichen Leukämie, und Jurkat, einer menschlichen T-Zell-Leukämie, indem der hier beschriebene neue selektive Antagonist (Verbindung 102) verwendet wurde. Bei diesen Untersuchungen wurden Membranen (0,5 mg Protein/ml) von Jurkat und HL60-Zellen mit 10-12 verschiedenen Konzentrationen der Verbindung 102 von 0,2 bis 15 nM und 0,1 bis 10 nM für Jurkat bzw. HL60-Zellen inkubiert. Die Figur 3 zeigt die Sättigungskurve der Bindung von Verbindung 102 an Adenosin- A_3 -Rezeptoren in Jurkat-Zellmembranen, und die Linearität des Scatchard-Plots im Nebenbild zeigt das Vorhandensein einer einzigen Klasse von Bindungsstellen mit einem K_d -Wert von $1,9 \pm 0,2$ nM und einem B_{\max} -Wert von $1,30 \pm 0,03$ pmol/mg Protein ($n = 3$). Die Figur 4 zeigt eine Sättigungskurve der Bindung von Verbindung 102 an Adenosin- A_3 -Rezeptoren in HL-60-Membranen, und die Linearität des Scatchard-Plot im Nebenbild zeigt das Vorhandensein einer einzigen Klasse Bindungsstellen mit einem K_d -Wert von $1,2 \pm 0,1$ nM und einem B_{\max} -Wert von 626 ± 42 fmol/mg Protein ($n = 3$).

Diese Ergebnisse zeigen, dass viele Zelllinien eine relativ große Zahl Adenosinrezeptoren enthalten. Da Verbindung 102 bekanntlich an A_3 -Rezeptoren mit einer hohen Affinität und Selektivität binden, liegen wahrscheinlich viele A_3 -Rezeptoren in Tumorzellen vor.

Beispiel 18. Pharmazeutische Formulierungen

(A) Transdermales System - für 1000 Pflaster

Inhaltsstoffe	Menge
Wirkstoff	100 g
Silikon-Fluid	450 g
Kolloidales Siliciumdioxid	2 g

(B) Oraltablette - Für 1000 Tabletten

Inhaltsstoffe	Menge
Wirkstoff	50 g
Stärke	50 g
Magnesiumstearat	5g

Der Wirkstoff und die Stärke werden mit Wasser granuliert und getrocknet. Magnesiumstearat wird zu den getrockneten Granula gegeben, und das Gemisch wird sorgfältig gemischt. Das Gemisch wird zu Tabletten gepresst.

(C) Injektion - für 1000 1 ml-Ampullen

<i>Inhaltsstoffe</i>	<i>Menge</i>
Wirkstoff	log
Puffermittel	Q. s.
Propylenglycol	400 mg
Wasser zur Injektion	Q. s. 1000 ml

Der Wirkstoff und die Puffermittel werden in Propylenglycol bei etwa 50°C gelöst. Das Wasser für die Injektion wird dann unter Rühren zugegeben, und die erhaltene Lösung wird filtriert, in Ampullen gefüllt, versiegelt und durch Autoklavieren sterilisiert.

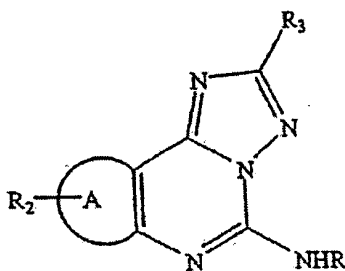
(D) Kontinuierliche Injektion - für 1000 ml

<i>Inhaltsstoffe</i>	<i>Menge</i>
Wirkstoff	10 g
Puffermittel	Q. s.
Wasser zur Injektion	Q. s. 1000 ml

Der Fachmann erkennt oder kann bloß mit Routineexperimenten feststellen, dass es viele Äquivalente zu den hier beschriebenen erfindungsgemäßen spezifischen Ausführungsformen gibt. Diese äquivalente sollen durch die nachstehenden Patentansprüche umfasst sein.

Patentansprüche:

1. Verbindung der nachstehenden Formel:



wobei

A Imidazol, Pyrazol oder Triazol ist;

R -C(O)-CH₂-R'-X' oder -C(O)-NH-R'-X' ist;

R' Phenyl oder ein 5- oder 6-gliedriger aromatischer, heterocyclischer Ring, der ein oder mehrere Heteroatome, die aus der Gruppe bestehend aus N, O und S, ausgewählt sind, enthält;

X' Wasserstoff, Alkoxy oder Halogen ist;

R² Wasserstoff, gerades oder verzweigtes oder cyclisches Alkyl, Alkenyl, Arylalkyl, substituiertes Arylalkyl oder Aryl bedeutet;

R³ Furyl ist, gegebenenfalls substituiert mit einem oder mehreren Substituenten ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Hydroxy-, Acyl-, Alkyl-, Alkoxy-, Alkenyl-, Alkynyl-, substituiertes Alkyl, substituiertes Alkoxy, substituiertes Alkenyl, substituiertes Alkynyl, Amino, substituiertes Amino, Aminoacyl, Acyloxy, Acylamino, Alkaryl, Aryl, Aryloxy, Azido, Carboxyl, Carboxylalkyl, Cyano, Halo, Nitro, Heteroaryl, Heteroaryloxy, einem heterocyclischen Rest, Heterocycloxy, Aminoacyloxy, Oxyacylamino, Thioal-

koxy, substituiertes Thioalkoxy, Thioaryloxy, Thioheteroaryloxy, -SO-Alkyl, -SO-substituiertes Alkyl, -SO-Aryl, -SO-Heteroaryl, -SO₂-Alkyl, -SO₂-substituiertes Alkyl, -SO₂-Aryl, SO₂-Heteroaryl und Trihalo- methyl; sowie pharmazeutisch verträgliche Salze davon.

2. Verbindung nach Anspruch 1, wobei A ein Triazolring ist.
3. Verbindung nach Anspruch 1, wobei A ein Pyrazolring ist.
4. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Verbindung radioaktiv markiert ist.
5. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Verbindung fluoreszierend markiert ist.
6. Zusammensetzung enthaltend eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3 als Wirkstoff sowie einen pharmazeutisch verträglichen Träger.
7. Zusammensetzung enthaltend eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3 als Wirkstoff in Kombination mit einem anderen therapeutisch aktiven Inhaltsstoff sowie einen pharmazeutisch verträglichen Träger.
8. Zusammensetzung nach Anspruch 6 oder 7, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Zusammensetzung eine Verbindung nach Anspruch 2 enthält.
9. Zusammensetzung nach Anspruch 6 oder 7, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Zusammensetzung eine Verbindung nach Anspruch 3 enthält.
10. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 4 oder 5 als Tumormarker.
11. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 4 oder 5 zum Nachweisen von Tumorzellen, die eine hohe Konzentration von Adenosin-A₃-Rezeptoren aufweisen, in einer Zellprobe.
12. Verfahren zum Nachweisen von Tumorzellen, die eine hohe Konzentration von Adenosin-A₃-Rezeptoren aufweisen, in einer Zellprobe, umfassend folgende Schritte:
 - a) Herstellen einer Suspension der Zellen in einem Zellkulturmedium;
 - b) Zugabe einer Verbindung nach Anspruch 4 oder 5 zu der gemäß Schritt a) hergestellten Suspension
 - c) Inkubieren der Suspension
 - d) Abtrennen der Zellen aus der Suspension, wobei
 - e1) durch das Abtrennen markierter Zellen ein positiver Nachweis oder
 - e2) durch das Abtrennen nicht markierter Zellen ein negativer Nachweis für das Vorhandensein von Tumorzellen, die eine hohe Konzentration von Adenosin-A₃-Rezeptoren aufweisen, erbracht wird.
13. Verfahren nach Anspruch 12, *dadurch gekennzeichnet*, dass im Falle eines positiven Nachweises die unter Schritt e1) abgetrennten Zellen quantitativ bestimmt werden.

Hiezu 4 Blatt Zeichnungen



**SÄTTIGUNG DER [¹²⁵I]-AB-MECA BINDUNG AN
MENSCHLICHE, IN HEK 293-ZELLEN
EXPRIMIERTER A₃-REZEPTOREN**

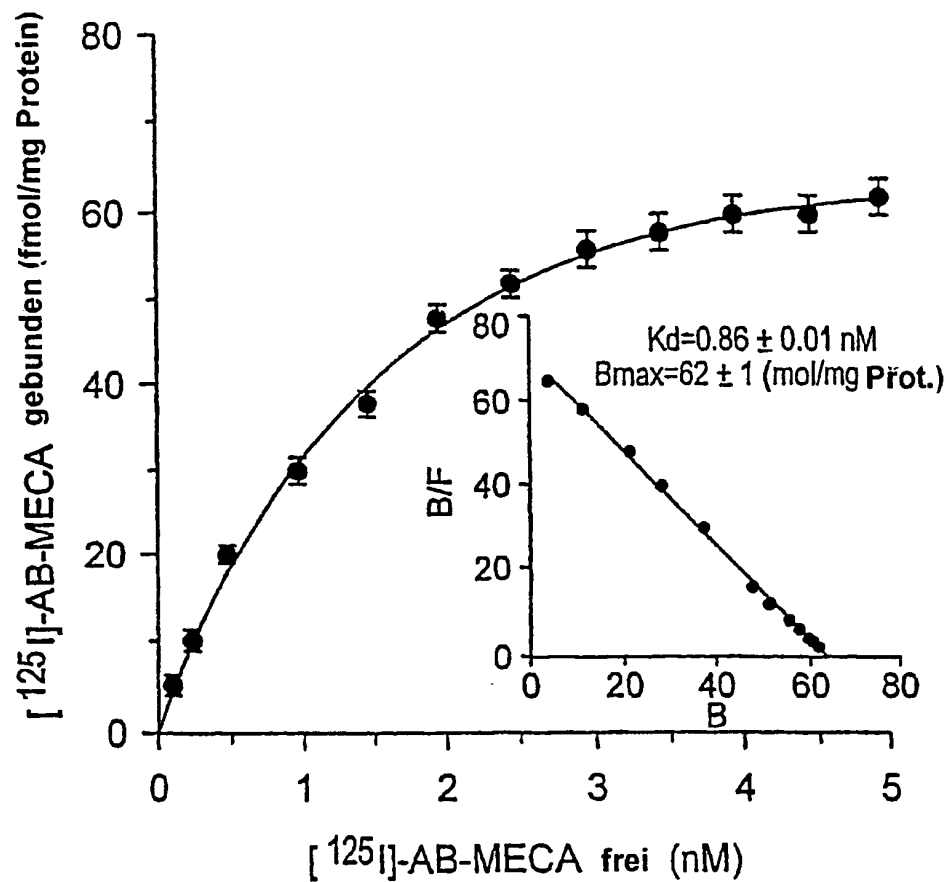


FIG. 1

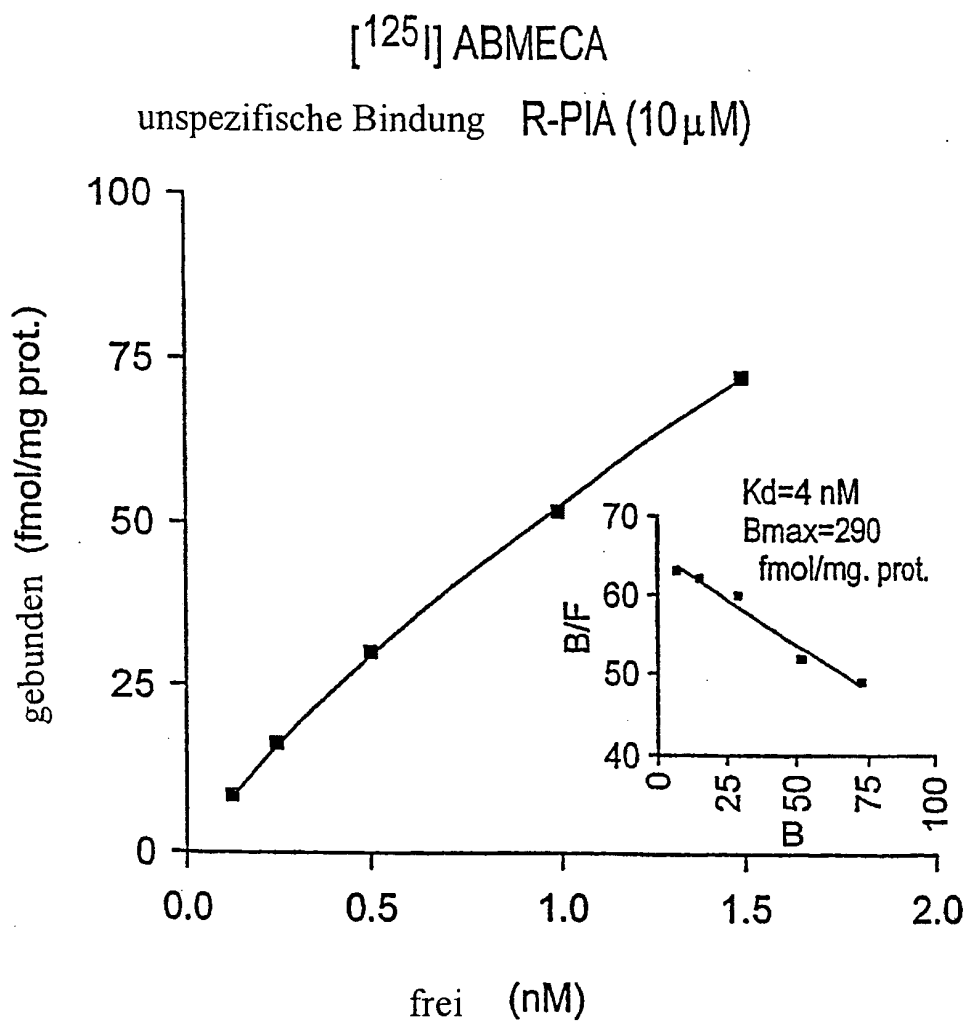


FIG. 2

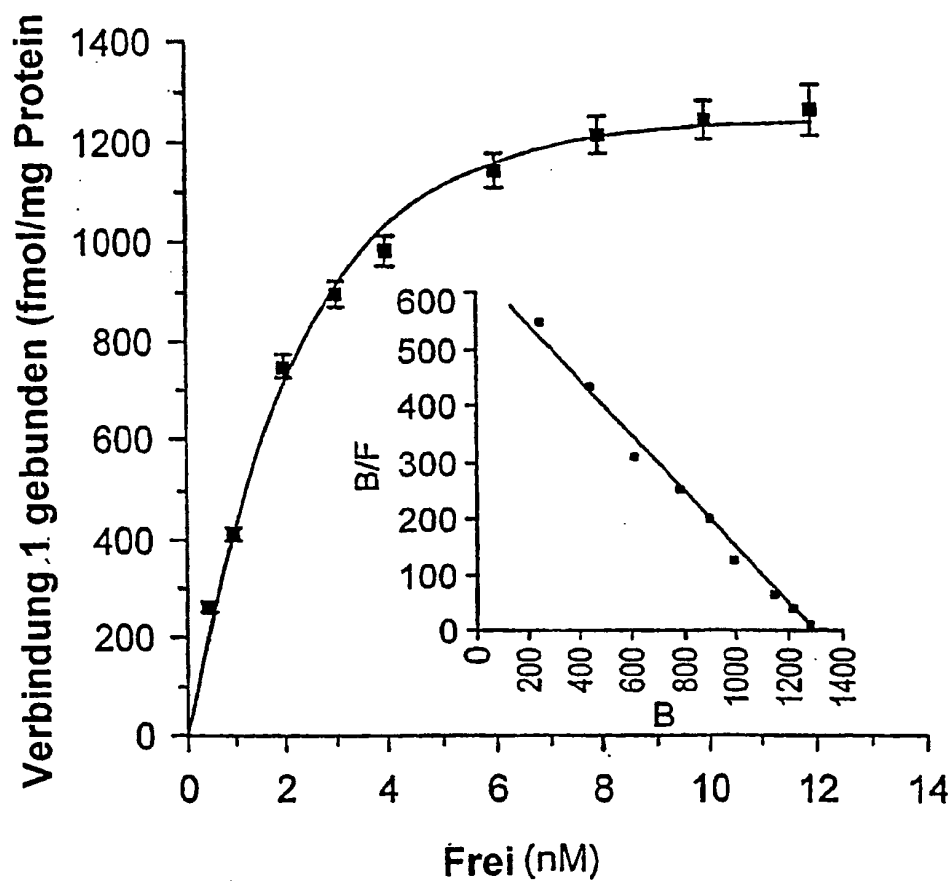


FIG. 3

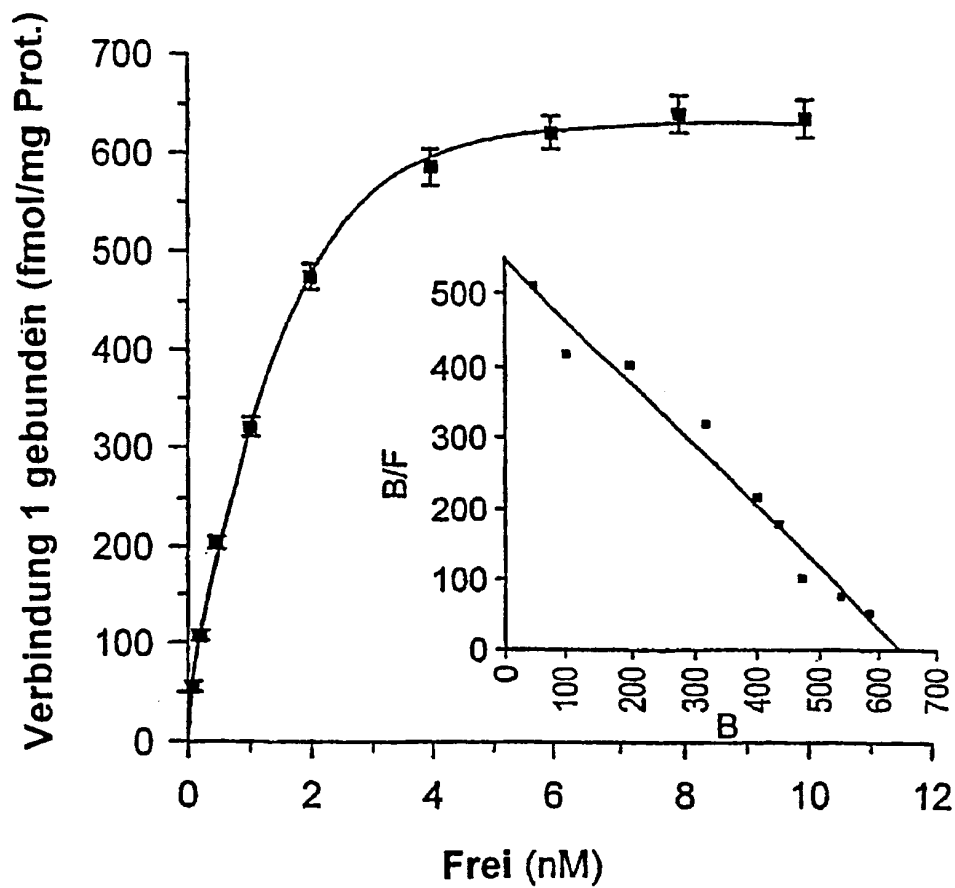


FIG. 4