



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 323163

(13) B1

(51) Int Cl.

C07H 19/16 (2006.01)

A61K 31/7076 (2006.01)

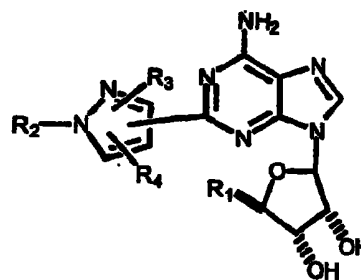
A61P 9/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20016351	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.06.21 PCT/US00/17095
(22)	Inng.dag	2001.12.21	(85)	Videreføringsdag	2001.12.21
(24)	Løpedag	2000.06.21	(30)	Prioritet	1999.06.22, US, 338327
(41)	Alm.tilgj	2002.02.18			
(45)	Meddelt	2007.01.08			
(73)	Innehaver	CV Therapeutics Inc, 3172 Porter Drive, CA94304 PALO ALTO, US			
(72)	Oppfinner	Jeff A Zablocki, 580 Sleeper Avenue, CA94040 MOUNTAIN VIEW, US Venkata P Palle, 600 Rainbow Drive, Mountain View, CA 94041, US Elfatih O Elzein, 4644 Creekwood Drive, CA94555 FREMONT, US			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, NO			

- (54) Benevnelse **C-pyrazol A2A reseptoragonister**
(56) Anførte publikasjoner Ingen
(57) Sammendrag

2-adenosin C-pyrazol forbindelser som har formelen (a) og fremgangsmåter ved anvendelse av forbindelsene som A2A reseptor agonister for å stimulere pattedyr koronar vasodilatasjon for terapeutiske formål og for formål av hjerteavbildning.



(a)

Foreliggende oppfinnelse angår C-pyrazolforbindelser som er anvendelige som A_{2A} reseptor or agonister. Forbindelsene ifølge oppfinnelsen er vasodilaterende midler som er anvendelige ved hjerteavbildning for å lette identifikasjon hos pattedyr, og særlig mennesker som lider av forstyrrelser slike som koronar perfusjon som er indikativ for koronar arteriesykdom (CAD). Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan også anvendes for fremstilling av terapeutiske midler for koronar arteriesykdom.

Farmakologisk stress blir ofte induisert med adenosin or dipyridamol hos pasienter som mistenkes for å ha CAD før avbildning med T1 scintigrafi or ekkokardiografi. Begge legemidlene bevirker dilatasjon av de koronare resistensskarene ved aktivering av celleoverflate A₂ reseptorer. Selv om farmakologisk stress opprinnelig ble introdusert som en måte å fremkalle koronar dilatasjon hos pasienter som ikke var i stand til å trene har flere studier vist at prognoseverdien til ²⁰¹Tl or ekkokardiografisk avbildning hos pasienter er gjenstand for farmakologisk stress med adenosin or dipyridamol var ekvivalent for pasienter som ble gjenstand for tradisjonelle treningstester. Imidlertid er det en høy insidens av legemiddelrelaterte uheldige bivirkninger ved farmakologisk stressavbildning med disse legemidlene slik som hodepine og kvalme, som kan forbedres med nye terapeutiske midler.

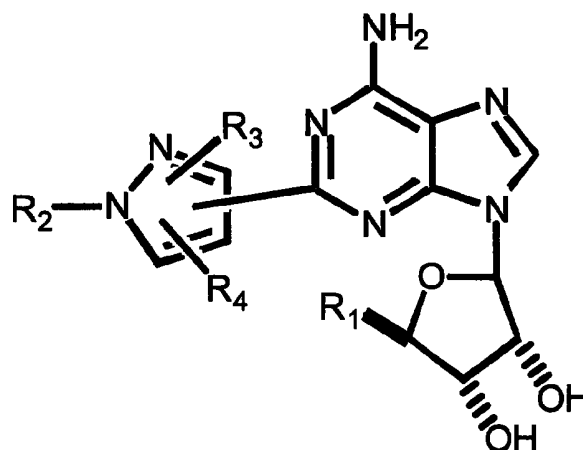
Adenosin A_{2B} og A₃ reseptorer er involvert i en mastcelle degranulering og derfor gir ikke asthmatiske midler de ikke-spesifikke adenosinagonistene som inducerer en farmakologisk stresstest. I tillegg reduserer adenosinstimulering av A₁ reseptoren i atrium og A-V noden S-H intervallet som kan indusere A-V blokkering. (N.C. Gupto et al.; *J. Am. Coll. Cardiol.*; (1992) 19: 248-257). I tillegg kan stimulering av adenosin A₁ reseptoren ved adenosin være ansvarlig for kvalme siden A₁ reseptoren finnes i intestinaltrakten. (J. Nicholls et al.; *Eur. J. Pharm.* (1997) 338(2) 143-150).

Dyredata viser at spesifikk adenosin A_{2A} undertype reseptorer på koronare resistens kar formidler de koronare dilatasjonsresponsene til adenosin, hvis undertype A_{2B} reseptor stimulering relaksere perifere kar (bemerk: sistnevnte reduserer systemisk blodtrykk). Som et resultat er det et behov for farmasøytiske sammensetninger som er A_{2A} reseptor-agonister som ikke har noen farmakologisk effekt som et resultat av stimulering av A₁

reseptoren *in vivo*. Videre er det et behov for A_{2A} reseptoragonister som har en kort halveringstid og som er godt tolerert av pasienter som gjennomgår farmakologiske koronare stressevalueringer.

- 5 I ett aspekt angår oppfinnelsen 2-adenosin C-pyrazol forbindelser som er anvendelige A_{2A} reseptoragonister.

I en utførelsesform inkluderer foreliggende oppfinnelse C-pyrazol forbindelser som har følgende formel:



10

I en annen utførelsesform inkluderer oppfinnelsen fremgangsmåter for anvendelse av forbindelser ifølge oppfinnelsen for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for å stimulere koronar vasodilatasjon hos pattedyr, og særlig hos mennesker, for å presse hjertet til å indusere en situasjon hvor hensikten er avbildning av hjertet.

15

Figur 1 er en konsentrasjonsresponskurve for A₁ adenosin reseptor (Ador)-formidlet negativ dromotropiske (AV-ledningstid) og A_{2A} Ador-formidlet vasodilator (økt hjerteledningsevne) effekter av forbindelse 18 ifølge oppfinnelsen hos rotteisolerte perfuserte hjerter. Symboler og feilstolper indikerer middelverdier ± SEM av enkel-bestemmelse
20 fra hver av de fire hjertene. EC₅₀-verdi (potens) er konsentrasjonen av forbindelse 18 som forårsaker 50% av maksimal respons;

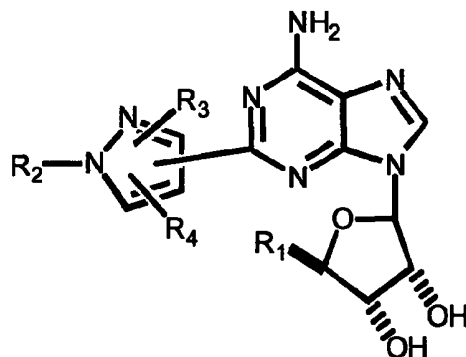
Figur 2 er en konsentrasjonrespons-kurve for A₁ adenosinreseptor (Ador)-formidlede

negative dromotropiske (AV-ledningstid) og A_{2A} Ador-formidlede vasodilator (økt hjerteledningsevne)-effekter av forbindelse 18 i isolerte perfuserte hjerter hos hamster. Symboler og feilstolper indikerer middelværdier \pm SEM av enkel bestemmelse fra hver av de fire hjertene. EC_{50} -verdi (potens) er konsentrasjonen av forbindelse 18 som forårsaker 50% av maksimal respons; og

Figur 3 er et plot av effekten av CVT510, en A_1 adenosinreseptor agonist og forbindelse 18 ifølge oppfinnelsen, en A_{2A} adenosin reseptor agonist på atrioventrikulær (AV) ledningstid hos isolerte perfuserte hjerter hos rotte.

10

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen inkluderer en klasse av 2-adenosin C-pyrazol forbindelser som har følgende formel:



hvor R^1 er $-\text{CH}_2\text{OH}$;

- 15 R^2 er utvalgt fra gruppen som består av hydrogen, C_{1-15} alkyl, C_{2-15} alkenyl, C_3-C_7 cykloalkyl, C_3-C_7 cykloalkyl- C_2-C_4 alkyl eller fenyl- C_1-C_4 , og R^3 , R^4 er hydrogen.

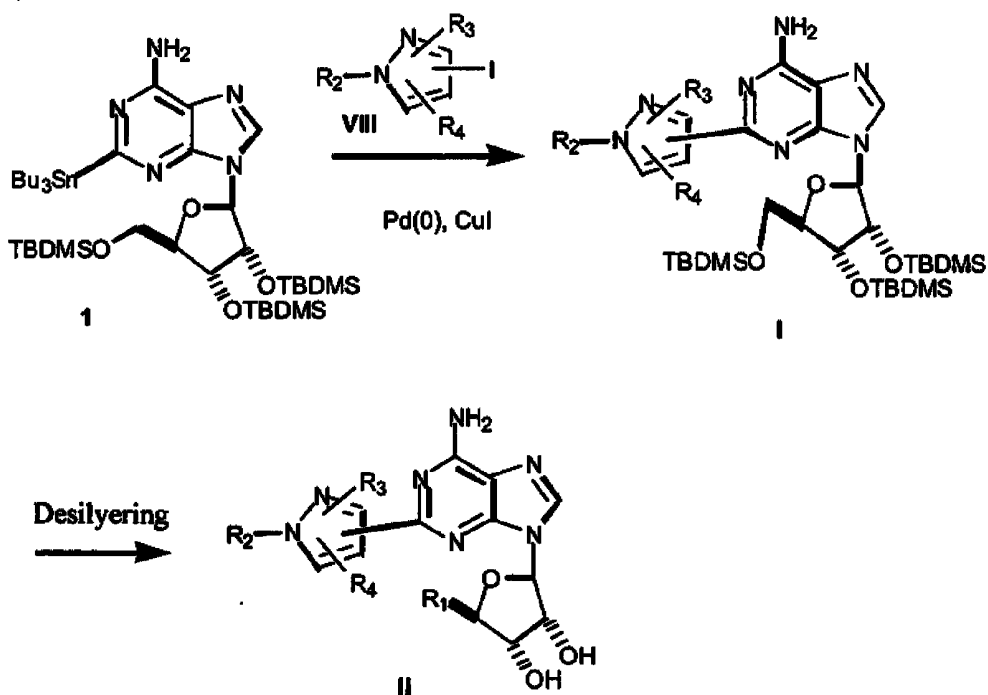
Det er mest foretrukket at forbindelser ifølge oppfinnelsen er utvalgt fra

- 20 (4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-benzylpyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol, (4S,2R,3R,5R)-2-[6-amino-2-(1-pentylpyrazol-4-yl)purin-9-yl]-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol, (4S,2R,3R,5R)-2-[6-amino-2-(1-metylpyrazol-4-yl)purin-9-yl]-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol, (4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-(metyletyl)pyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol,
- 25 (4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-(3-fenylpropyl)pyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-

- (hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol, (4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-(4-t-butylbenzyl)pyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol, (4S,2R,3R,5R)-2-(6-amino-2-pyrazol-4-ylpurin-9-yl)-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol, (4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-pent-4-enylpyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol, (4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-desylpyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol, (4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-(sykloheksylmetyl)pyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol, (4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-(2-fenyletetyl)pyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol, (4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-(3-sykloheksylpropyl)pyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol, (4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-(2-sykloheksyletetyl)pyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol, og blandinger derav.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen fremstilles som angitt i skjemaene 1-5.

Skjema 1

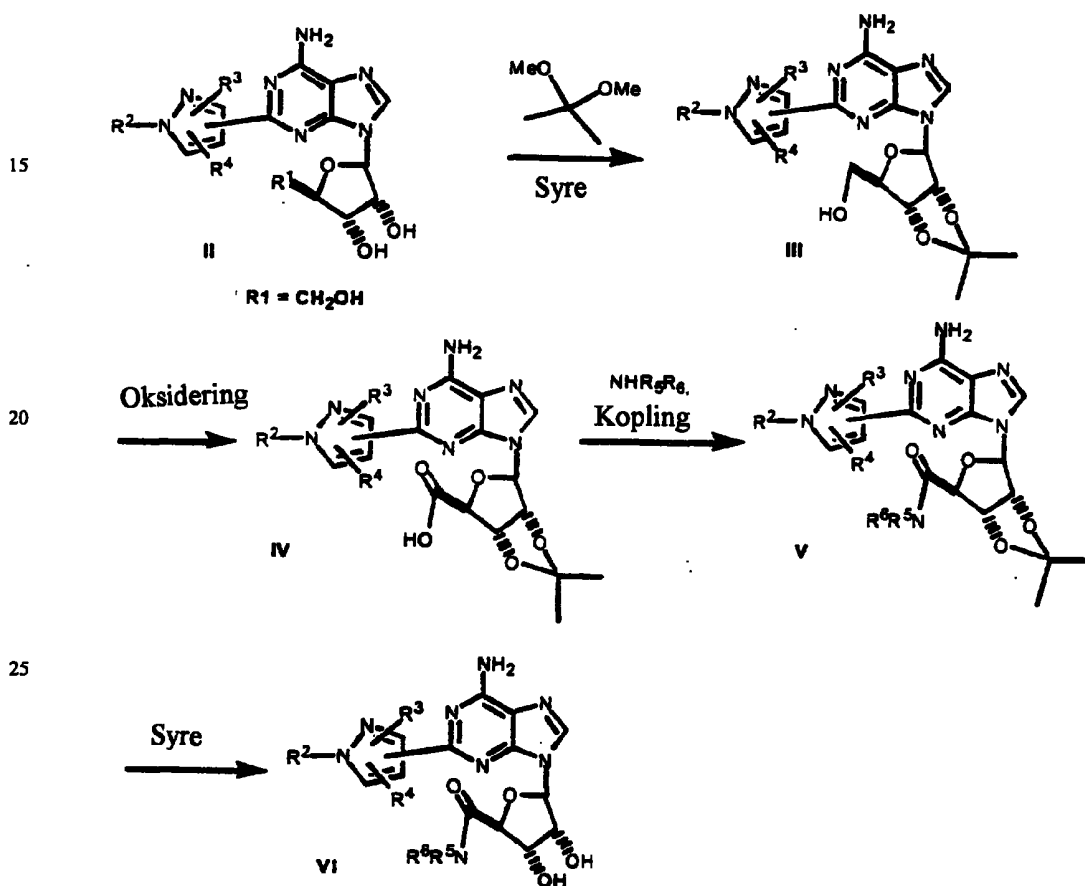


Forbindelsene som har den generelle formel II ble fremstilt ved palladium-formidlet kobling av forbindelse 1 med halo-pyrazoler representert ved formel VIII (skjema 4) i nærvær or fravær av kobbersalter (K. Kato et. al. J. Org. Chem. 1997, 62, 6833-6841; Palladium Reagents and Catalysts-Innovations in Organic Synthesis, Tsuji, John Wiley and Sons, 1995) fulgt av avbeskyttelse med enten TBAF or NH_4F (Markiewicz et. al Tetrahedron Lett.(1988), 29, 1561). Fremstilling av forbindelse 1 er tidligere blitt beskrevet (K. Kato et. al. J. Org. Chem. 1997, 62, 6833-6841) og er angitt i skjema 5.

Forbindelser med generell formel VI kan fremstilles som vist i skjema 2.

10

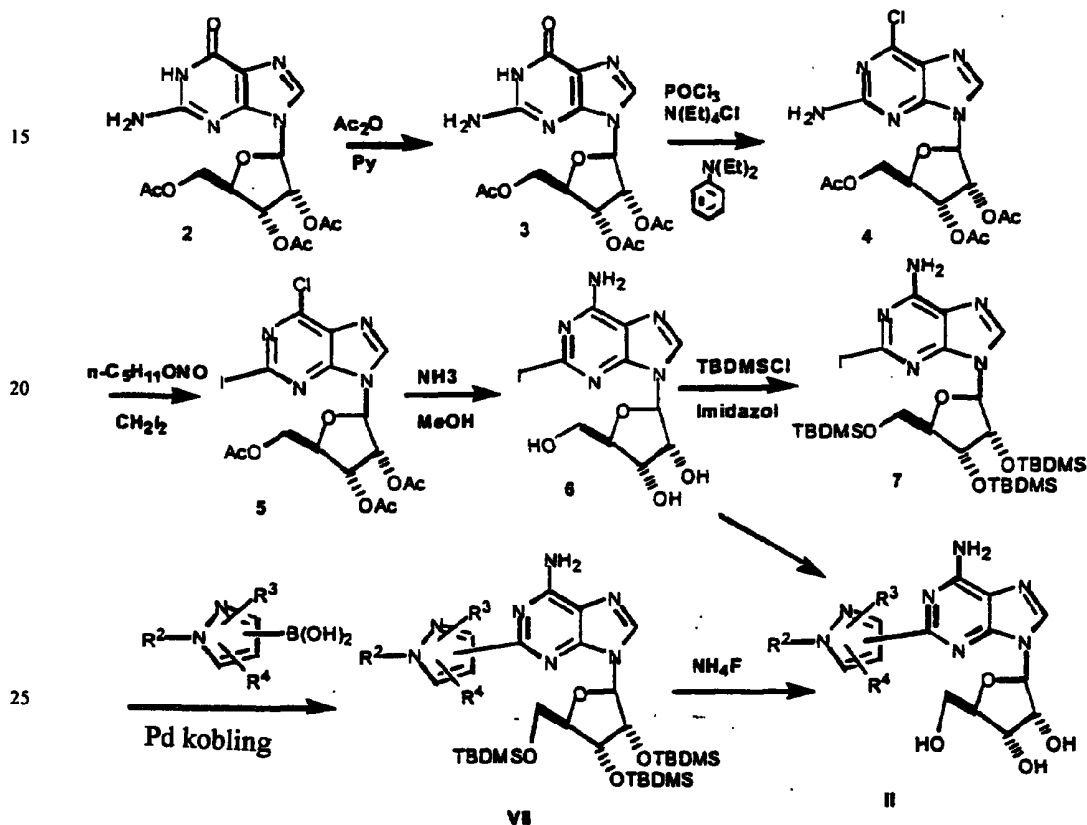
Skjema 2



Forbindelse III som kan oppnås ved å omsette II med 2,2-dimetoksypropan i nærvær av en syre kan oksideres til karboksylsyren IV, basert på strukturelt lignende forbindelser,

(Jones et.al., J. Am.Chem. Soc.(1949), 71, 3994.; Hudlicky, "Oxidations in organic chemistry", American Chemical Society, Washington D. C., 1990) til forbindelse IV. Reaksjon mellom primært or sekundært amin med formel NHR^5R^6 , og forbindelse IV ved anvendelse av DCC (Fujino et.al., Chem. Pharm. Bull. (1974), 22, 1857), PyBOP (J. Martinez et. al., J. Med. Chem. (1988), 28, 1967) or PyBrop (J. Caste et.al. Tetrahedron, (1991), 32, 1967) koblingsbetingelser kan gi forbindelse V. Avbeskyttelse av forbindelse V kan utføres ved oppvarming med 80% vandig eddiksyre (T. W. Green and P. G. M. Wuts, (1991), "Protective Grupper in Organic Synthesis", A, Wiley-Interscience publication) or med vannfri HCl (4N) for å oppnå forbindelse med generell formel VI.

Skjema 3



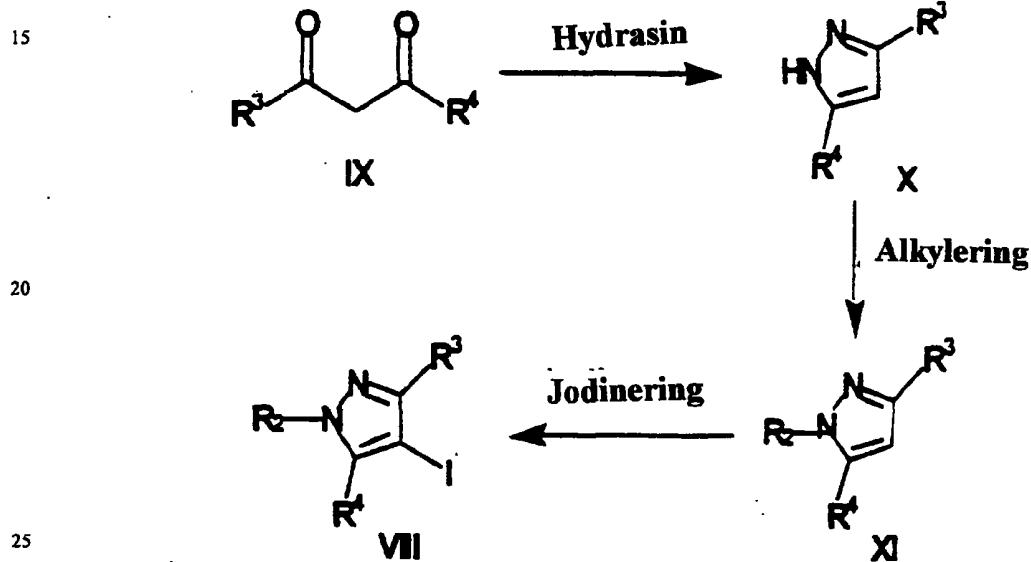
Alternativt kan forbindelser med generell formel II også fremstilles ved Suzuki type kobling som vist i skjema 3. 2-jodoadenosin 6 kan fremstilles i fire trinn fra guanosin 2 ved å følge litteraturprosedyrene (M. J. Robins et.al. Can. J. Chem. (1981), 59, 2601-2607; J. F. Cerster et.al. Org. Synthesis, ---242-243; V. Nair et. al., J. Org. Chem.,

(1988), 53, 3051-3057). Palladiumformidlet Suzuki-kobling av 6 med passende substituerte pyrazol-borsyrer XVII i nærvær av en base kan gi sluttforbindelser med generell formel II (A.Suzuki, Acc.Chem.Res) (1982), 15, 178). Hvis nødvendig kan 2', 3', 5' hydroksyler på 6 beskyttes som TBDMS etere før Suzuki-kobling.

5

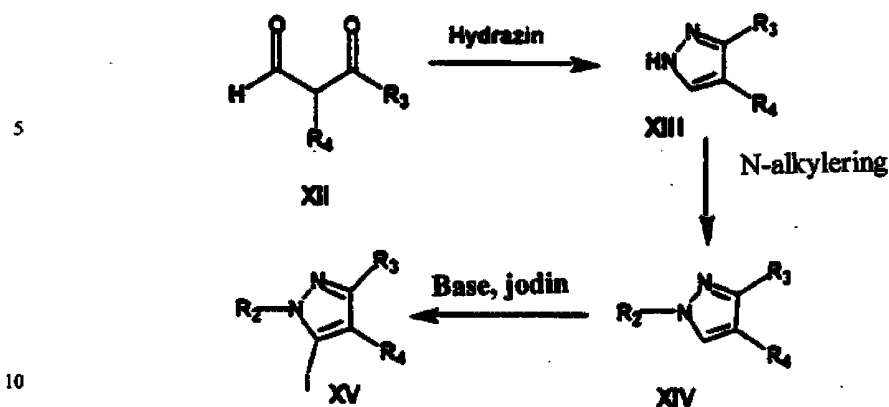
Forbindelsene med generell formel VIII er enten kommersielt tilgjengelig eller fremstilles ved å følge trinnene vist i skjema 4. Kondensasjon av 1,3-diketo forbindelser med formel IX med hydrazin i et passende løsemiddel kan gi pyrazoler med generell formel X (R.H. Wiley et. al. Org.Synthesis, Coll.Vol IV (1963), 351. Disse pyrazolene kan N-alkyleres med forskjellige alkyl halider og gi forbindelser med formel XI som ved jodering gir 4-jod derivater med generell formel VIII (R. Huttel et.al. Justus Liebigs Ann.Chem.(1955), 593, 200).

Skjema 4



5-jodpyrazoler med generell formel XV kan fremstilles ved å følge trinnene angitt i skjema 5.

Skjema 5

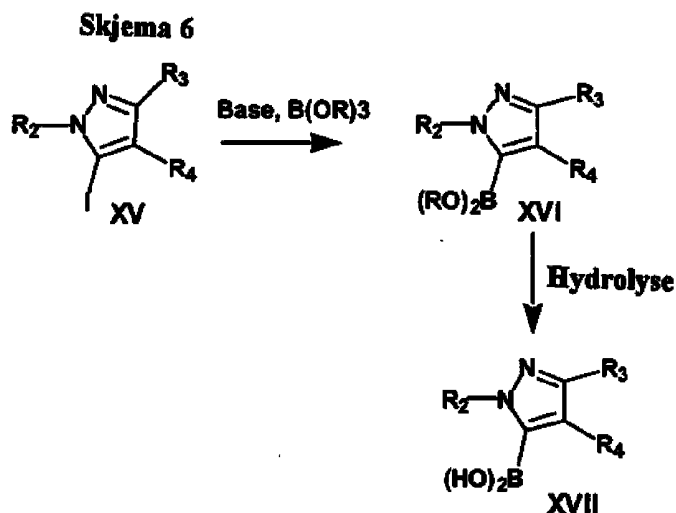


Kondensasjon av 1,3-diketo forbindelser med formel XII med hydrazin i et passende løsemiddel gir pyrazoler med generell formel XIII. Disse pyrazolene kan N-alkyleres med forskjellige alkyl halider og gi forbindelser med formel XIV. Abstraksjon av 5-H med en sterk base fulgt av stopping av reaksjonen med jod gir 5-jod derivater med generell formel XV (F. Effenberger et. al. J. Org. Chem. (1984), 49, 4687).

15

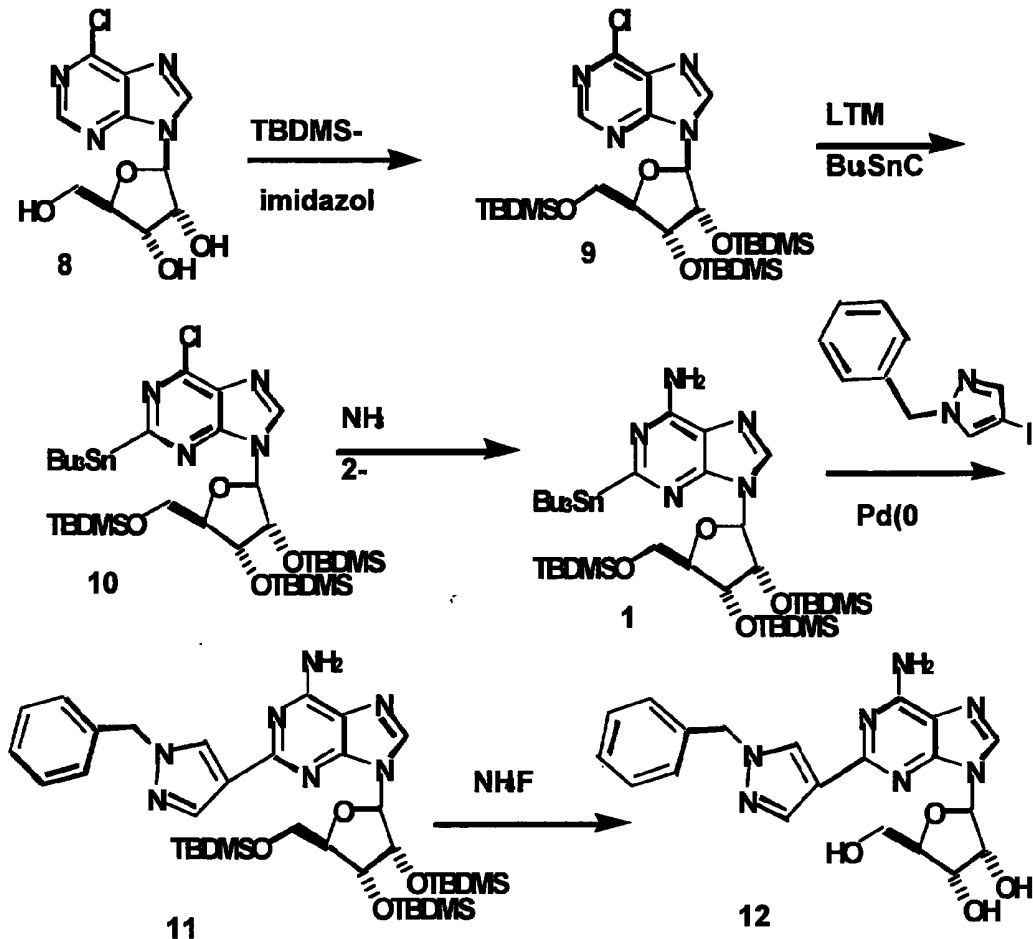
4- eller 5- jodpyrazoler kan omdannes til korresponderende borsyrer som vist i skjema 6. Transmetallering med n-buLi fulgt av behandling med trimetylborat gir forbindelser med generell formel XVI som ved hydrolyse gir borsyre med generell formel XVII (F. C. Fischer et.al. RECUEIL (1965), 84, 439).

20



2-Stannyladenosin 1 ble fremstilt i tre trinn fra kommersielt tilgjengelig 6-klorpurin ribosid ved å følge litteraturfremgangsmåte (K. Kato et.al., J. Org. Chem. (1997), 62, 6833-6841). Tri TBDMS derivat ble oppnådd ved behandling av 8 m ed TBDMSCl og imidazol i DMF. Litiering med LTMP fulgt av stopping av reaksjonen med tri n-butyltin klorid ga eksklusivt 2-stannyl derivat 10. Ammonolyse i 2-propanol ga 2-stannyladenosin 1. Stillekobling av 1 med 1-benzyl-4-jodpyrazol i nærvær av Pd(PPh₃)₄ og CuI resulterte i 11 (K. Kato et.al., J. Org. Chem. (1997), 62, 6833-6841). Avbeskyttelse av silylgruppene og 2', 3' og 5' hydroksylene med 0,5 M ammonium fluorid i metanol ga 12 i godt utbytte (skjema 7). Forbindelsene 18-23 ble fremstilt på tilsvarende måte. Fremgangsmåtene anvendt for fremstilling av forbindelsene ifølge oppfinnelsen er ikke begrenset til de som er beskrevet ovenfor. Ytterligere fremgangsmåter finnes i følgende kilder og er inkludert med referanse (J. March, Advanced Organic Chemistry; "Reaction Mechanisms and Studies" (1992), A Wiley Interscience Publications; and J. Tsuji, "Palladium reagents and catalysts-Innovations in organic synthesis", John Wiley and Sons, 1995).

Skjema 7



Forbindelser ifølge oppfinnelsen er anvendelige i forbindelse med radioaktive
 avbildningsmidler for å avbilde koronar aktivitet. Forbindelsene ifølge oppfinnelsen er
 5 A_{2A} agonister og antas å gi spesifikk aktivering av adenosin A_{2A} reseptorer i hjertekar i
 motsetning til adenosin A₁ reseptorer i atrium og AV-noden og/eller A_{2B} reseptorer i
 periferale kar, og unngår således uønskede bivirkninger. Etter administrasjon i en
 terapeutisk mengde forårsaker forbindelsene ifølge oppfinnelsen hjerteblodkar og vaso-
 dilatere koronar stjeling hvori friske hjertekar stjeler blod fra syke kar som resulterer i
 10 mangel på blodstrøm til hjertevev. Koronar avbildning identifiserer således
 hjerteregioner med frisk og ikke-frisk blodstrøm. Lavere doser av A_{2A} agonister kan gi
 fordelaktig koronar vasodilatasjon (mindre alvorlig) ved behandling av kronisk CAD.

Som A_{2A} agonister er forbindelsene ifølge oppfinnelsen også anvendelige i forbindelse med adjuktiv behandling med angioplasti for å indusere dilatasjon, inhibere blodplateaggregering og som et generelt anti-inflammasjonsmiddel. A_{2A} agonister, slik som forbindelsene ifølge oppfinnelsen, kan gi de terapeutiske fordelene beskrevet ovenfor ved å hindre neutrofil aktivering. (Purinergic Approaches in Experimental Therapeutics
5 K. A. Jacobson and M. F. Jarvis 1997 Wiley, New York). Forbindelsene ifølge oppfinnelsen er også effektive ovenfor en tilstand som kalles "no-reflow" hvori blodplatene og neutrofilene aggregerer og blokkerer et kar. Som A_{2A} agonister er forbindelsene ifølge oppfinnelsen effektive overfor "no-reflow" ved å hindre neutrofil og blodplate aktivering (for eksempel antas de å hindre frigivelse av superoksid fra
10 neutrofiler). Som A_{2A} agonister er også forbindelsene ifølge oppfinnelsen anvendelige som kardiobeskyttende midler ved deres anti-inflammasjonsaktivitet på neutrofiler. Således i situasjoner når hjertet vil gå gjennom en iskemisk tilstand slik som et transplantat, vil de være anvendelige.

15

Sammensetningene kan administreres oralt, intravenøst, gjennom epidermis eller ved en hvilken som helst annen kjent fremgangsmåte i litteraturen for administrering av terapeutiske midler. Fremgangsmåten for behandling innbefatter administrering av en effektiv mengde av den valgte forbindelsen, foretrukket dispergert i en farmasøytisk
20 bærer. Doseringenheter av aktiv ingrediens blir generelt valgt ut fra området 0,01 til 100 mg/kg, men vil lett bestemmes av fagmannen avhengig av administrasjonsrute, alder og tilstand til pasienten. Denne dosen blir typisk administrert i løpet av ca. 5 minutter til ca. en time eller mer før koronar avbildning. Ingen ikke-akseptable toksikologiske effekter forventes når forbindelsen ifølge oppfinnelsen administreres i
25 terapeutiske mengder.

Hvis den endelige forbindelsen ifølge oppfinnelsen inneholder en basisk gruppe kan et syreaddisjonssalt fremstilles. Syreaddisjonssalter av forbindelsene fremstilles på standard måte i et egnet løsemiddel fra morforbindelsen og et overskudd av syre, slik
30 som saltsyre, hydrobromsyre, svovelsyre, fosforsyre, eddiksyre, maleinsyre, ravsyre eller metansulfonsyre. Saltsyresaltformen er særlig anvendelig. Hvis sluttforbindelsen inneholder en sur gruppe kan kationiske salter fremstilles. Typisk blir morforbindelser behandlet med overskudd av et alkalisk reagens, slik som hydroksid, karbonat eller alkoksid, som inneholder det passende kationet. Kationer slike som Na⁺, K⁺, Ca⁺² og

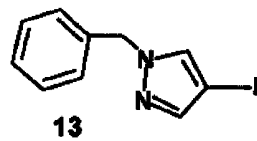
NH_4^+ er eksempler på kationer tilstede i farmasøytisk akseptable salter. Visse forbindelser danner indre salter eller zwitterjoner som også kan være akseptable.

- Farmasøytiske sammensetninger som inkluderer forbindelser ifølge oppfinnelsen og/eller derivater derav, kan formuleres som løsninger eller lyofiliserte pulvere for parenteral administrasjon. Pulvrene kan rekonstitusjoneres ved tilsetning av et egnet fortynningsmiddel eller andre farmasøytisk akseptable bærere før anvendelse. Hvis de anvendes i flytende form blir sammensetningene ifølge oppfinnelsen foretrukket inkorporert i en bufferet isoton vandig løsning. Eksempler på egnede fortynningsmidler er normale isotone saltvannsløsninger, standard 5% dekstrose i vann og bufferede natrium eller ammonium acetatløsninger. Slike flytende formuleringer er egnet for parenteral administrasjon, men kan også anvendes for oral administrasjon. Det er ofte ønskelig å tilsette eksipienter slike som polyvinylpyrrolidinone, gelatin, hydroksycellulose, akasia, polyetylen glykol, mannitol, natrium klorid, natrium sitrat eller en hvilken som helst annen eksipient kjent for fagmannen til de farmasøytiske sammensetningene som inkluderer forbindelser ifølge oppfinnelsen. Alternativt kan de farmasøytiske forbindelsene innkapsles, tableteres eller fremstilles i en emulsjon eller sirup for oral administrasjon. Farmasøytisk akseptable faste eller flytende bærere kan tilsettes for å øke effekten av eller stabilisere sammensetningen eller for å lette fremstillingen av sammensetningen. Flytende bærere inkluderer sirup, peanøttolje, olivenolje, glyserin, saltvann, alkoholer og vann. Faste bærere inkluderer stivelse, laktose, kalsiumsulfat, dihydrat, teffa alba, magnesium stearat eller stearinsyre, talkum, pektin, akasia, agar eller gelatin. Bæreren kan også inkludere et vedvarende stivelsesmateriale slik som glyserol monostearat eller glyserol distearat, alene eller med voks. Mengden fast bærer varierer, men vil foretrukket være mellom ca. 20 mg og ca. 1 g pr. doseringsenhet. Farmasøytiske doseringer blir fremstilt ved anvendelse av vanlige teknikker slik som maling, blanding, granulering og sammenpressing, hvis nødvendig, for tablettformer; eller maling, blanding og fylling for harde gelatinkapselformer. Når en flytende bærer anvendes vil preparatet være i form av en sirup, eliksir, emulsjon eller en vandig eller ikke-vandig suspensjon. En slik flytende formulering kan administreres direkte eller fylles i mye gelatinkapsler. Det er foretrukket at sammensetninger ifølge oppfinnelsen administreres som en løsning enten oralt eller intravenøst ved kontinuerlig infusjon eller bolus.
- Eksemplene som følger vil tjene som illustrasjon på oppfinnelsen. Eksemplene er ikke ment å begrense omfanget av oppfinnelsen, men er tilveiebragt for å vise hvordan

forbindelsene ifølge oppfinnelsen anvendes og fremstilles. I eksemplene er alle temperaturer i grader Celsius.

5

EKSEMPEL 1



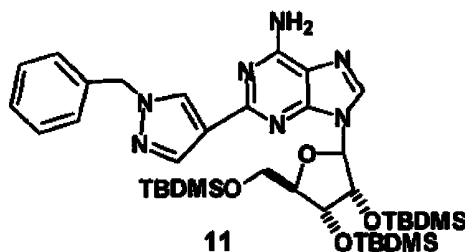
4-jodo-1-benzylpyrazole (13)

10 Til en løsning av 4-jodpyrazole (400 mg, 2 mmol) in DMF (4mL) ble ved 0°C tilsatt natriumhydride (80 mg, 60% dispersjon i mineralolje, 2 mmol) fulgt av benzyl bromide (342 mg, 2 mmol) og reaksjonsblandingen ble rørt i 2 timer. Reaksjonsblandingen ble konsentrert i vakuum og residuet ble rensset med kolonne kromatografi som ga N—benzylpyrazol i nesten kvantitativt utbytte.

15

¹H NMR 5.29 (s, 2H), 7.18-7.28 (m, 2H), 7.28-7.40 (m, 4H), 7.53 (s, 1H).

EKSEMPEL 2

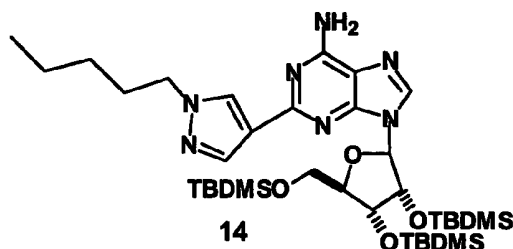


20

9-((2R,3R,4R,5R)-3,4-bis(1,1,2,2-tetrametyl-1silapropoksy)- 5-[(1,1,2,2-tetrametyl-1-silapropoksy)metyl]oksolan-2-yl)-2-[1-benzylpyrazol-4-yl]purin-6-ylamin (11)

En blanding av forbindelse 1 (50 mg, 0.056 mmol), N-benzyl-4-jodopyrazol 13 (50 mg, 0.183 mmol), Pd(PPh₃)₄ (20 mg (15 mol %) og CuI (40 mg, 0.2 mmol) i DMF (1 mL) ble rørt ved 90°C i 16 timer. Reaksjonsblandingen ble konsentrert i vakuum og residuet ble renset med preparativt tynnsjikt kromatografi (metylen kloride: methanol 10:1) som
5 ga forbindelse 11:

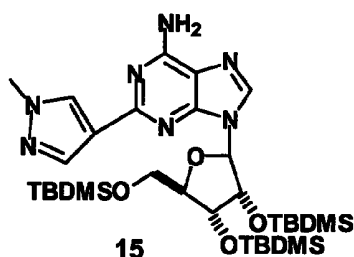
¹H NMR(CDCl₃) δ 0.00(s, 3H, CH₃), 0.01(s, 3H, CH₃), 0.04(s, 3H, CH₃), 0.07 (s, 3H, CH₃), 0.11 (s, 3H, CH₃),, 0.14 (s, 3H, CH₃), 0.78 (s, 9H, t-bu), 0.83 (s, 9H, t-bu), 0.91 (s, 9H, t-bu), 3.80 (d, 1H), 4.05 (d, 1H), 4.11-4.12 (m, 1H), 4.33 (d, 1H), 4.50-4.52
10 (m, 1H), 5.35 (m, 2H), 5.65 (bs, 2H, D₂O utbyttbar), 6.05 (d, 1H), 7.28-7.40 (m, 5H), 7.98 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.22 (s, 1H).



**9-((2R,3R,4R,5R)-3,4-bis(1,1,2,2-tetrametyl-1silapropoksy)- 5-[(1,1,2,2-tetrametyl-
15 1-silapropoksy)metyl]oksolan-2-yl)-2-[1-pentylpyrazol-4-yl]purin-6-ylamin (14)**

Forbindelse 14 ble fremstilt på samme måte som forbindelse 11 ved å anvende 4-jod-pentylpyrazol istedenfor 4-jodo-benzylpyrazol som ga forbindelse 14:

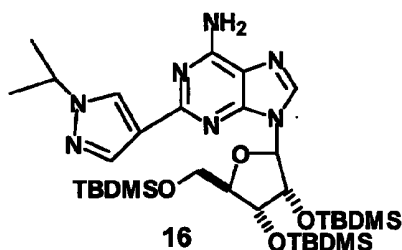
¹H NMR(CDCl₃) 0.00(s, 3H, CH₃), 0.01(s, 3H, CH₃), 0.04(s, 3H, CH₃), 0.07 (s, 3H,
20 CH₃), 0.11 (s, 3H, CH₃),, 0.14 (s, 3H, CH₃), 0.78 (s, 9H, t-bu), 0.80 (t, 3H), 0.83 (s, 9H, t-bu), 0.91 (s, 9H, t-bu), 1.25-1.40 (m, 4H), 1.85-1.95 (m, 2H), 3.82 (d, 1H), 4.08 (d, 1H), 4.20-4.28 (m, 3H), 4.32-4.34 (m, 1H), 4.55-4.57 (m, 1H), 5.35 (m, 2H), 5.70 (bs, 2H, D₂O utbyttbar), 6.08 (d, 1H), 7.28-7.40 (m, 5H), 8.05 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.20 (s, 1H).



9-[(2R,3R,4R,5R)-3,4-bis(1,1,2,2-tetramethyl-1-silapropoxy)- 5-[(1,1,2,2-tetramethyl-1-silapropoxy)methyl]oksolan-2-yl]-2-[1-methylpyrazol-4-yl]purin-6-ylamin (15)

Forbindelse 15 ble fremstilt på samme måte som forbindelse 11 ved å anvende 4-jod-metylpyrazol istedenfor 4-jod-benzylpyrazol som ga forbindelse 15:

¹H NMR(CDCl₃) 0.00 (s, 3H, CH₃), 0.01 (s, 3H, CH₃), 0.04 (s, 3H, CH₃), 0.07 (s, 3H, CH₃), 0.11 (s, 3H, CH₃), 0.14 (s, 3 H, CH₃), 0.78 (s, 9H, t-bu), 0.83 (s, 9H, t-bu), 0.91 (s, 9H, t-bu), 3.8 (d, 1H), 3.90 (s, 3H, N-CH₃) 4.05 (d, 1H), 4.08-4.12 (m, 1H),
 10 4.30-4.32 (m, 1H), 4.55-4.60 (m, 1H), 5.60 (bs, 1H, D₂O utbyttbar), 6.00-6.05 (m, 1H), 7.99 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 8.15 (s, 1H)



9-[(2R,3R,4R,5R)-3,4-bis(1,1,2,2-tetramethyl-1-silapropoxy)- 5-[(1,1,2,2-tetramethyl-1-silapropoxy)methyl]oksolan-2-yl]-2-[1-(1-metyletyl)pyrazol-4-yl]purin-6-ylamin (16)

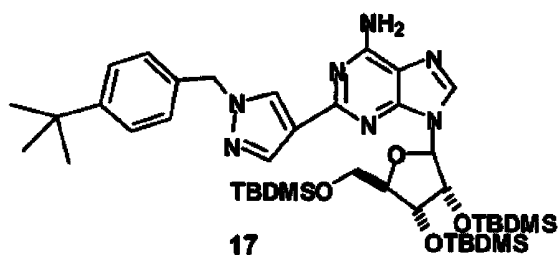
Forbindelse 16 ble fremstilt på samme måte som forbindelse 11 ved å anvende 4-jod-(1-metyletyl)-pyrazol istedenfor 4-jod-benzylpyrazol som ga forbindelse 16:

¹H NMR(CDCl₃) 0.00 (s, 3H, CH₃), 0.01 (s, 3H, CH₃), 0.04 (s, 3H, CH₃), 0.07 (s, 3H, CH₃), 0.11 (s, 3H, CH₃), 0.14 (s, 3 H, CH₃), 0.78 (s, 9H, t-bu), 0.83 (s, 9H, t-bu),
 20 3H, CH₃), 0.11 (s, 3H, CH₃), 0.14 (s, 3 H, CH₃), 0.78 (s, 9H, t-bu), 0.83 (s, 9H, t-bu),

16

0.91 (s, 9H, t-bu), 1.55(d, 6H, C(CH₃)₂), 3.8 (d, 1H), 4.05 (d, 1H), 4.08-4.15(m, 1H), 4.30-4.32 (m, 1H), 4.44-4.56 (m, 2H), 5.55(bs, 1H, D₂O utbyttbar), 6.05 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 8.2 (s, 1H)

5



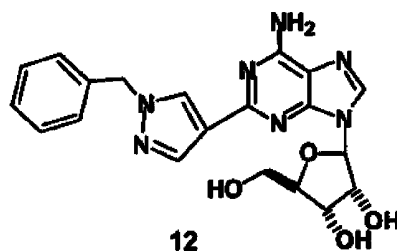
9-((2R,3R,4R,5R)-3,4-bis(1,1,2,2-tetrametyl-1silapropoksy)- 5-[(1,1,2,2-tetrametyl-1-silapropoksy)metyl]oksolan-2-yl)-2-[1-(4-t-butylbenzyl)pyrazol-4-yl]purin-6-ylamin (17)

- 10 Forbindelse 17 ble fremstilt på samme måte som forbindelse 11 ved å anvende 4-jod-(4-t-butylbenzyl)pyrazol istedenfor 4-jod-benzylpyrazol to afford forbindelse 17:

1H NMR(CDCl₃) 0.00 (s, 3H, CH₃), 0.01 (s, 3H, CH₃), 0.04 (s, 3H, CH₃), 0.07 (s, 3H, CH₃), 0.11 (s, 3H, CH₃), 0.14 (s, 3 H, CH₃), 0.78 (s, 9H, t-bu), 0.83 (s, 9H, t-bu),
15 0.91 (s, 9H, t-bu), 1.30 (s, 9H, t-bu), 3.8 (d, 1H), 4.05 (d, 1H), 4.08-4.15(m, 1H), 4.30-4.32 (d, 1H), 4.47-4.49 (dd, 1H), 5.44 (bs, 1H, D₂O utbyttbar), 6.01 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.2 (d, J = 2.0 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 2.0 Hz, 2H), 7.99 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 8.20 (s, 1H)

EKSEMPEL 3

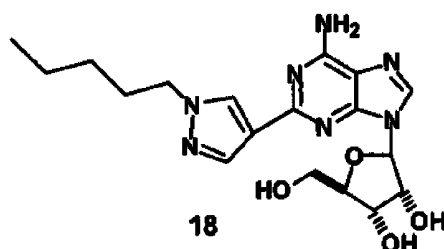
20



(4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-benzylpyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol (12)

En løsning av triTBDMS derivat (25 mg, 0.035 mmol) in 0.5 M løsning av NH₄F i metanol (5mL) ble refluxert i 16 timer. Reaksjonsblandingen ble konsentrert og residuet ble renset med preparativ TLC (metanol-diklorometan 9:1) som ga 12;

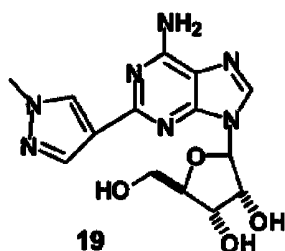
¹H NMR (CD₃OD) 3.65 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 3.81 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 4.18-4.19 (m, 1H), 4.26 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.78 (dd, 1H), 5.23 (s, 2H), 5.72 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.15-7.17 (m, 2H), 7.17-7.27 (m, 3H), 7.80 (s, 1H), 8.10 (s, 2H).



(4S,2R,3R,5R)-2-[6-amino-2-(1-pentylpyrazol-4-yl)purin-9-yl]-5-(hydroksymetyl)oksolane-3,4-diol (18)

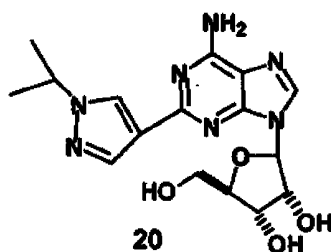
Forbindelse 18 ble fremstilt på samme måte som forbindelse 12;

¹H NMR (CD₃OD) 0.8 (t, J = 3.6 Hz, 3H), 1.20-1.26 (m, 4H), 1.76-1.80 (m, 2H), 3.67 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 3.85 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 4.03 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 4.19-4.20 (m, 1H), 4.28 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 4.78 (dd, 1H), 5.73 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 8.07 (s, 1H).



(4S,2R,3R,5R)-2-[6-amino-2-(1-methylpyrazol-4-yl)purin-9-yl]-5-(hydroksymetyl)oksolane-3,4-diol (19)

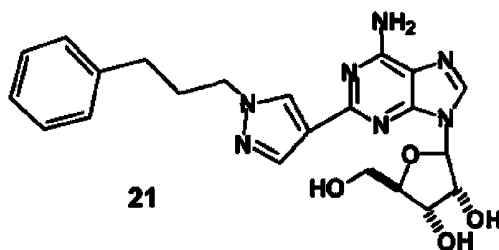
Compound 19 was prepared in the manner of compound 12; ¹H NMR (CD₃OD) 3.60 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H, N-CH₃), 3.80 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 4.10-4.12 (m, 1H),
 5 4.24 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 4.78 (dd, 1H), 5.69 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 8.01 (s, 1H).



(4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-(metyletyl)pyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol (20)

Forbindelse 20 ble fremstilt på samme måte som forbindelse 12;

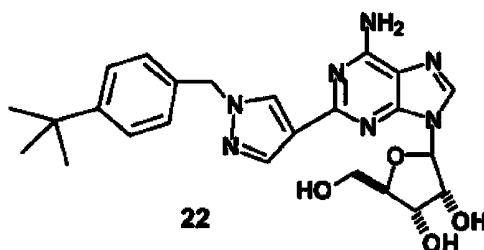
¹H NMR (CD₃OD) 1.41 (d, J = 6.8 Hz, 6H), 3.66 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 3.80 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 4.16-4.18 (m, 1H), 4.25 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.40 (septet, 1H), 4.77 (dd, 1H),
 15 5.71 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 8.13 (s, 1H).



(4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-(3-fenylpropyl)pyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol (21)

Forbindelse 21 ble fremstilt på samme måte som forbindelse 12;

¹H NMR (CD₃OD) 2.10 (t, J = 6.7 Hz, 2H, CH₂), 2.51 (t, J = 6.7 Hz, 2H, CH₂), 3.65 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 3.80 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 4.04 (t, J = 6.7 Hz, 1H), 4.16-4.17 (m, 1H),
 5 4.25 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 4.79 (dd, 1H), 5.71 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.05-7.07 (m, 2H),
 7.16-7.24 (m, 3H), 7.80 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 8.08 (s, 1H).



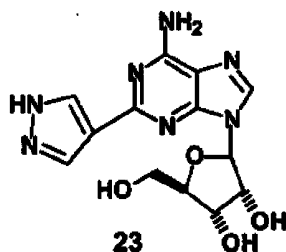
(4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-(4-t-butylbenzyl)pyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol (22)

10

Forbindelse 22 ble fremstilt på samme måte som forbindelse 12;

¹H NMR (CD₃OD) 1.15 (s, 9h, t-bu) 3.55 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 3.75 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 4.18-4.19 (m, 1H), 4.26 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.65 (dd, 1H), 5.12 (s, 2H), 5.65 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.05 (d, 2H), 7.17 (d, 3H), 7.75 (s, 1H), 8.05 (s, 2H).

15

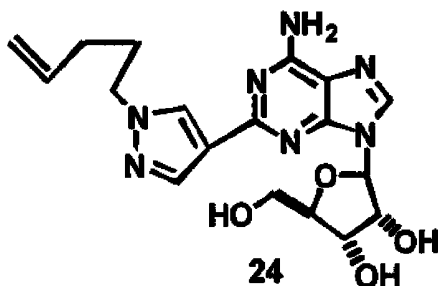


(4S,2R,3R,5R)-2-(6-amino-2-pyrazol-4-ylpurin-9-yl)-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol (23)

Forbindelse 23 ble fremstilt på samme måte som forbindelse 12;

5

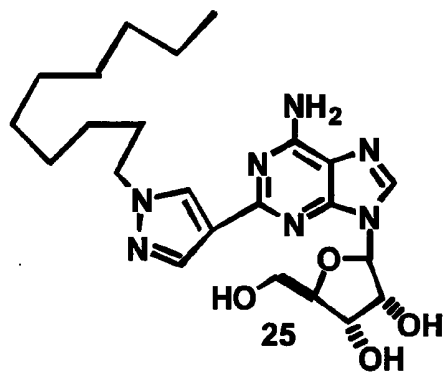
¹H NMR (CD₃OD) 3.75 (d, 1 H, 5'-CH), 3.90 (d, 1 H, 5'-CH), 4.15 (d, 2 H, 4'-CH) 4.35 (m, 1 H, 3'-CH), 4.85 (m, 1 H, 2'-CH), 5.95 (d, 1 H, 1'-CH), 8.20 (s, 1 H, 8-H), 8.25 (s, 2 H, Ar).



10

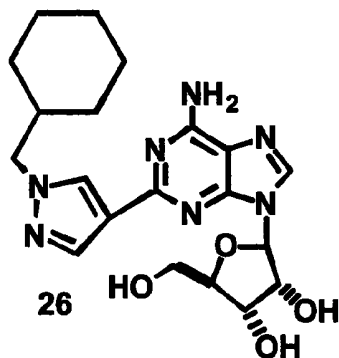
(4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-pent-4-enylpyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol (24)

15 Forbindelse 24 ble fremstilt på samme måte som forbindelse 12; [MS 402 (M+1)]



(4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-desylpyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol (25)

- 5 Forbindelse 25 ble fremstilt på samme måte som forbindelse 12; [MS 430 (M+1)]



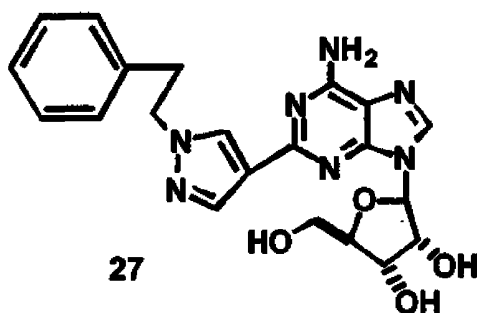
(4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-(sykloheksylmetyl)pyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol – (26)

10

- Forbindelse 26 ble fremstilt på same mate som forbindelse 12; [MS 474 (M+1)]

15

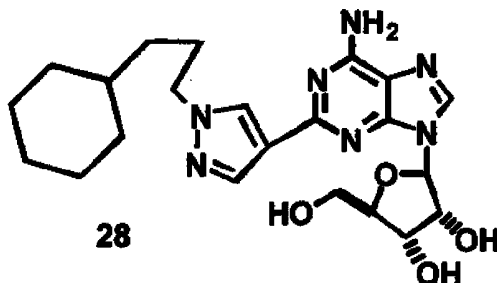
22



(4S,2R,3R,5R)-2-{{6-amino-2-[1-(2-phenyletyl)pyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol – 27

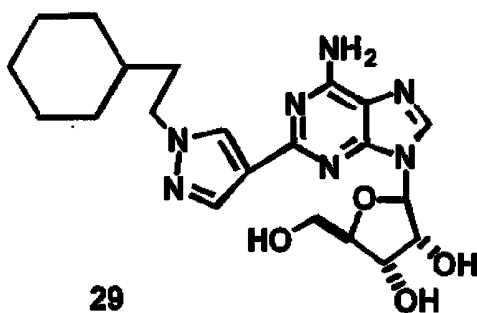
Forbindelse 27ble fremstilt på samme måte som forbindelse 12; [MS 438 (M+1)]

5



(4S,2R,3R,5R)-2-{{6-amino-2-[1-(3-cykloheksylpropyl)pyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol

10 Forbindelse 28ble fremstilt på samme måte som forbindelse 12; [MS 458 (M+1)]



(4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-(2-cykloheksyletyl)pyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol – 29

- 5 Forbindelse 29 Ble fremstilt på samme måte som forbindelse 12; [MS 444 (M+1)]

EKSEMPEL 4

Forbindelser ifølge oppfinnelsen ble undersøkt for å bestemme deres affinitet for A2A
10 reseptoren hos et grisestriatum membranpreparat. Kort fortalt ble 0,2 mg grise-striatale
membraner behandlet med adenosin deaminase og 50 mM Tris buffer (pH = 7,4)
etterfulgt av sammenblanding. Til grise-membranene ble det tilsatt 2 mikroL av serie-
fortynnede DMSO forrådsløsninger av forbindelsene ifølge oppfinnelsen ved
konsentrasjoner varierende fra 100 mikroM til 10 nM eller kontrollen som mottok 2
15 mikroL DMSO alene, og deretter ble den tritierte antagonist ZM 241385 i Tris buffer
(50 mM, pH av 7,4) tilsatt for å oppnå en sluttkonsentrasjon på 2 nM. Etter inkubering
ved 23°C i 2 timer ble deretter løsningene filtrert ved anvendelse av en membran
innhøster ved anvendelse av multippel vasking av membranene (3 x). Filterplatene ble
talt i scintillasjonscocktail som ga mengden erstattet med tritert ZM ved den
20 konkurrerende bindingen av forbindelser ifølge oppfinnelsen. Større enn en 5 punkts
kurve ble anvendt for å generere IC₅₀ verdier og antallet eksperimenter er angitt i
kolonnene markert i tabell 1 nedenfor.

Tabell 1

Forbindelsenr.	A _{2a} Ki (nM)	n
12	6674±11□ ₁	3
18	7089±780	3
19	>10,000	1
20	~10,000	1
21	6133±582	2
22	7680	1
23	>100,000	1

EKSEMPEL 5

5

Formålet med dette eksperimentet var å bestemme affinitetene og reseptorbindingsselektiviteten til en forbindelse ifølge oppfinnelsen for A₁, A_{2A}, A_{2B} og A₃ adenosinreseptorer. Molekulær kloning har identifisert og bekreftet eksistensen av fire undertyper adenosinreseptorer (AdoRs), betegnet som A₁, A_{2A}, A_{2B} og A₃AdoRs (Linden 1994). Disse AdoR undertypene har forskjellige anatomiske fordelinger, farmakologiske egenskaper og fysiologiske funksjoner (Shryock og Belardinelli, 1997). A₁ og A₃Adors kobler til inhiberende G-proteiner (G_{i/o}) og reduserer aktiviteten til adenylyl syklase, mens A_{2A} og A_{2B} AdoRs øker intracellulært cAMP innhold via kobling til stimulator G-proteiner (Gs).

15

Ligander med høy potens og vev/organselektivitet for forskjellige adenosinreseptorer undertyper har terapeutiske og diagnostiske potensialer overfor et antall sykdommer (slike som arrytmi, iskemi hjertesykdommer, astma og Parkinson's sykdom) og er fokus for betydelig forskning både akademisk og innen industrien. Her rapporteres farmakologisk og funksjonell karakterisering av en serie nye adenosinområder ifølge oppfinnelsen ved anvendelse av pattedyr-cellelinjer som uttrykker enten endogent AdoRs eller rekombinant humant AdoRs.

20

Materialer

Adenosine deaminase ble levert fra Boehringer Mannheim Biochemicals Indianapolis, IN, U.S.A). [³H]ZM241385 (Lot No. 1) ble levert fra Tocris Cookson Ltd (Langford, Bristol, UK). [³H]CPX (Lot No. 3329207) ble levert fra New England Nuclear (Boston, MA, USA). CGS21680 (Lot No. SW-3R-84 and 89H4607), NECA (Lot No. OXV-295E), R-PIA (Lot No. WY-V-23), Rolipram og HEK-hA_{2A}AR membraner ble levert fra Sigma-RBI (Natick, MA). WRC-0470 ble fremstilt og beskrevet i litteraturen (K. Niiya et al., J. Med. Chem. 35: 4557-4561 (1992). Forbindelse 18 og 10 forbindelse 12 ifølge oppfinnelsen ble syntetisert og fremstilt som forrådsløsninger (10 mmol/l) i DMSO.

Celle kultur og membran preparat-PC12 celler ble oppnådd fra "the American Type Culture Collection" og dyrket i DMEM med 5% foster bovint serum, 10% hesteserum, 15 0,5 mmol/l L-glutamin, 100 µ/ml penisillin, 0,1 mg/ml streptomysin og 2,5 µg/ml amfoterisin. HEK-293 celler som uttrykte stabilt rekombinant humant A_{2B}AdoRs (HEK-hA_{2B}AdoR) ble dyrket i DMEM supplementert med 10% foster bovint serum og 0,5 mg/ml G-418. CHOK1 celler som stabilt uttrykte det rekombinante humane A₁AdoR (CHO-hA₁AdoR) og A₃AdoR (CHO-hA₃AdoR) ble dyrket som monosjikt på 20 150 mm-plastikk dyrkningsplater i Ham's F-12 medium supplementert med 10% foster bovint serum i nærvær av 0,5 mg/ml G-418. Cellene ble dyrket i en atmosfære på 5% CO₂/95% luft ved en temperatur på 37°C.

For fremstilling av membranene ble celler fjernet fra dyrkningsplatene over i iskald 50 25 mmol/l Tris-HCl buffer (pH 7,4). Cellesuspensjonene ble homogenisert med Polytron ved innstilling 4 i 30 sekunder og spunnet ved 48.000 g i 15 minutter. Pelletene ble vasket tre ganger ved resuspending i iskald Tris-HCl buffer og sentrifugert. Endelig pellet ble resuspendert i et lite volum Tris-HCl, tilsatt alekvoter og frosset ved -78°C til de ble anvendt i reseptor bindingsundersøkelser. Proteinkonsentrasjonen til 30 membransuspensjonene ble bestemt ved anvendelse av Bradford fremgangsmåten (Bio-Rad) med bovin serum som standard.

Konkurrerende bindingsundersøkelser- Konkurrerende undersøkelser ble utført for å bestemme affinitetene (K_1) til de følgende ikke-merkede forbindelsene (konkurrerende midler): Forbindelser WRC-0470, forbindelse 18, forbindelse 12, NECA, CGS 21680 og R-PIA for A_1 AdoRs ($[^3\text{H}]$ DPCPX bindings seter på CHO-h A_1 Ador cellemembraner), A_{2A} Adors($[^3\text{H}]$ ZM241385 bindings seter på PC12 og HEK-h A_{2A} AR cellemembraner), A_{2B} Ador ($[^3\text{H}]$ DPCPX bindings seter på HEK-h A_{2B} Ador cellemembraner) og A_3 Ador ($[^{125}\text{I}]$ ABMECA bindings seter på CHO-h A_3 Ador cellemembran). Membransuspensionene ble inkubert i 2 timer ved romtemperatur i 50 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 7.4) som inneholder ADA (1 U/mL), Gpp(NH)p (100 μM), radioligand {enten $[^3\text{H}]$ ZM241385 (-1.5 to 5 nmol/L), $[^3\text{H}]$ DPCPX (~2.5 to 3.0 nmol/L for A_1 og 30 nM for A_{2B}) eller $[^{125}\text{I}]$ ABMECA (1 nM)} og progressivt høyere konsentrasjoner av de konkurrerende midlene. Ved slutten av inkuberingen ble bundede og frie radioligander separert ved filtrering gjennom Whatman GF/C glass fiber filtere ved anvendelse av en Brandel vevinnhøster (Gaithersburg, MD). Triplikate bestemmelser ble utført for hver konsentrasjon av det konkurrerende midlet.

Study design (Protokoller)

Affiniteten (K_1) til forskjellige CVT-forbindelser for A_1 og A_{2A} adenosin reseptoren ble bestemt ved deres potensiale til å konkurrere om $[^3\text{H}]$ CPX (A_1) eller $[^3\text{H}]$ ZM241385 (A_{2A}) bindings seter på membranene avledet fra CHO-h A_1 Ador, PC12 eller HEK-HA A_{2A} Ador celler. R-PIA og CGS21680, agonister som er selektive for A_1 og A_{2A} respektivt, og NECA, en ikke-selektiv AdoR agonist ble anvendt som kontroller. For å lette sammenligningen og unngå komplikasjon med multiple affinitetstilstander på grunn av reseptorkobling til G-proteiner ble konkurrerende bindingsstudier utført under nærvær av Gpp (NH) p (100 μM) for å frikoble reseptorene fra G-proteinene. Affiniteten til utvalgte forbindelser for A_{2B} and A_3 reseptorer ble bestemt ved deres potensialer til å konkurrere om $[^3\text{H}]$ CPX (A_{2B}) og $[^{125}\text{I}]$ ABMECA (A_3) bindings seter på membranene avledet fra HEK-h A_{2B} Ador og CHO-h A_3 Ador celler, respektivt.

Det funksjonelle potensialet og selektiviteten til disse legemidlene for A_{2A} vs. A_{2B}Adors ble bestemt ved å bestemme deres effekter på A_{2A} eller A_{2B}-formidlet cAMP akkumulering i PC 12 og HEK-293 celler, respektivt. I disse eksperimentene ble CGS21680 og NECA anvendt som positive kontroller.

5

Resultater

Affiniteten (K_i) til WRC-0470, Forbindelse18, og forbindelse 12 for humant A₁ rotte and humant A_{2A}Adors, som bestemmes ved konkurrerende bindingsstudier er summert i tabell 2 nedenfor. Med unntak av forbindelse 12 viste alle forbindelsene moderat selektivitet for humant A_{2A} versus A₁ reseptoren.

10

Tabell 2 – Bindingsaffiniteter til adenosin receptor agonister for A_{2A}Adors og A₁Adors

K_i/ nmol/L (pK_i±SEM)

15

	HEK-hA _{2A} AR Cells		CHO-hA ₁ AR	
	Bindingsaffinitet	n	Bindingsaffinitet	n
WRC-0470	272 (6.55±0.04) [0.83±0.07]	6	7278 (5.16±0.09) [1.13±0.21]	3
Forbindelse 18	2895 (5.54±0.03) [0.83±0.07]	3	5836 (5.24±0.04) [1.01±0.06]	3
Forbindelse 12	13651 (4.87±0.02) [0.75±0.13]	3	6350 (5.22±0.11) [0.93±0.03]	3
CGS21680	609 (6.22±0.06) {0.65±0.07}	3	>3540 (5.47±0.20)	3
NECA	360 (6.45±0.06) [0.83±0.08]	3	328 (6.49±0.06) [0.88±0.03]	3
R-PIA	1656 (5.78 ±0.02) [1.05 ± 0.02]	3	477 (6.35 ± 0.11) [1.03 ± 0.08]	3

Resultatene i dette eksperimentet viser at forbindelse 16 er en lavaffinitets A_{2A} agonist.

EKSEMPEL 6

Formålet med dette eksemplet var å karakterisere farmakologisk effektene av forbindelse 12 og 18 ifølge oppfinnelsen på koronar arterieledningsevne. Særlig ble ekseperimentene designet for å bestemme potensialet til forbindelsene 12 og 18 og sammenligne deres potensialer med det for adenosin og andre utvalgte A_{2A} AdoR agonister.

I hjertet formidler A_{2A} adenosin reseptoren koronar vasodilatasjon forårsaket av adenosin, mens A₁ reseptoren formidler hjerteundertrykkende virkninger av adenosin, slik som de negative kronotropiske og dromotropiske (AV-blokkering) effektene.

Flere potente og selektive ligander, både agonister og antagonister, for A₁ og A_{2A} AdoRs er blitt syntetisert. I hjertet har agonister av A₁ AdoRs blitt foreslått å være anvendelige som antiarrytmimidler, mens agonister av A_{2A} AdoRs er blitt utviklet for selektiv koronar vasodilatasjon.

En serie adenosinderivater målrettet for selektiv aktivering av A_{2A} adenosinreseptor (A_{2A} AdoR) ble syntetisert med formålet å utvikle koronare vasodilatorer. Mer spesifikt blir det i denne studien rapportert effekten av en serie nye A_{2A} AdoR agonister på koronar arterieledningsevne (vasodilatasjon) i isolerte perfuserte hjerter fra rotte og hamster.

Materialer

Rotter (Sprague Dawley) og hamster (Hartley) ble levert fra Simonsen og Charles Rivers, respektivt. WRC-0470 ble fremstilt som beskrevet i litteraturen (K. Niiya et al., J. Med. Chem. 35: 4557-4561 (1992)). Forbindelse 12 og 18 ifølge oppfinnelsen ble fremstilt som beskrevet ovenfor. CGS 21680 (lot nr. 89H4607) og adenosin (lot nr. 123H094) ble levert fra Sigma. Krebs-Henseleit løsning ble fremstilt ifølge standard fremgangsmåter og 0,9% saltvann ble levert fra McGraw, Inc. (lot nr. J8B246).

Fremgangsmåter

Voksne Sprague Dawley rotter og Hartley hamstere av begge kjønn som veide fra 230 til 260 gram og 300 til 350 gram, respektivt, ble anvendt i den neste studien. Dyrene ble anestesibehandlet ved peritoneal injeksjon av en cocktail som inneholdt ketamin og xylazin (ketamin 100 mg, xylazin 20 mg/ml). Brystet ble åpnet og hjertet ble fjernet raskt. Hjertet ble kort rensert i iskald Krebs-Heseleit løsning (se nedenfor) og aorta

kanulert. Hjertet ble deretter perfusert ved en strømningshastighet på 10 ml/min med modifisert Krebs-Henseleit (K-H) løsning som inneholdt NaCl 117,9, KCl 4,5, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,18, KH₂PO₄ 1-18, pyruvat 2,0 mmo/l. K-H-løsningen (pH 7,4) ble kontinuerlig gasset med 95% O₂ og 5% CO₂ og varmet til 35 ± 0,50°C. Hjertet ble

5 elektrisk innstilt til en fast sykellengde på 350 ms (250 slag/min.) ved anvendelse av en bipolar elektrode plassert på venstre atrium. Den elektriske stimuli ble generert av en Grass stimulator (Modell S48, W. Warwick, RI) og levert gjennom en stimuli

isolasjonsenhet (Modell SIU5, Astro-Med, Inc., NY) som kvadratbølge pulser med 3 msek i varighet og amplitude på minst det dobbelte av terskelintensiteten.

10

Koronar perfusjonspress (CPP) ble målt ved anvendelse av en trykkomformer, forbundet til den aortiske kanylen via en T-kobling posisjonert ca. 3 cm over hjertet. Koronar perfusjonstrykk ble overvåket gjennom eksperimentet og avlest enten på en

diagramavleser (Gould Recorder 2200S) eller et dataavlesningssystem (PowerLab/4S,

15 Adinstruments Pty Ltd, Australia). Bare hjerter med CPP varierende fra 60 til 85 mmHg (i fravær av legemidler) ble anvendt i studien. Koronar konduktans (i ml/min/mmHg) ble beregnet som forholdet mellom koronar perfusjonshastighet (10 ml/min) og koronart perfusjonstrykk.

20 I eksperimentene hvori A₁ adenosin reseptor-formidlet negativ dromotropisk effekt ble målt ble atrial og ventrikulær overflate elektrogrammer avlest i løpet av konstant atrial pacing. Effekten av forskjellige adenosinreseptor agonister på atrioventrikulær ledningstid ble bestemt som tidligere beskrevet av Jenkins og Belardinelli (Circ. Res. 63: 97-116 (1988).

25

Forrådsløsninger av forbindelsen ifølge oppfinnelsen (5 mM) og CGS 21680 (5 mM) ble fremstilt i dimetyl sulfoksid (DMSO) levert fra Aldrich, PS 04253MS. En forråds-

løsning av adenosin (1 mg/ml) ble fremstilt i saltvann. En kontrastjon ble gjort fra

forrådsløsningen ved fortykning i saltvann som ga løsning av enten 2X10⁻⁴ eller 2X10⁻⁵

30 ⁵M. Disse løsningene ble injisert i perfusjonslinjen til apparatet som boluser på 20 µl. I noen eksperimenter ble løsningene plassert i en 30 ml glassprøyte og legemidlene ble infusert i hastigheter nødvendig for å oppnå de ønskede perfusatkonsentrasjonene (for eksempel 10, 100 nM, etc.).

35 Koronar vasodilatasjon av A_{2A} adenosin reseptor agonister

Konsentrasjonsresponsforholdet til effekten av forbindelsene ifølge oppfinnelsen (0,1 til 400 nM) og CGS21680 (0,1 til 10 nM) for å øke koronar ledningsevne ble oppnådd.

Etter avlesning av kontrollmålinger av koronar perfusjonstrykk ble progressive høyere konsentrasjoner av adenosinreseptor agonistene administrert til maksimal koronar vasodilatasjon ble observert. Steady-state responsene for hver konsentrasjon av adenosin reseptor agonister ble avlest. I hvert hjerte av denne serien (4 til 6 hjerter for hver agonist) ble kun en agonist og et konsentrasjons-responsforhold oppnådd.

Resultater

I isolerte perfuserte hjerter (n = 36 rotter og 18 hamstere) gjort til gjenstand for pacing ved konstant atrial sykellengde på 340 msek., adenosin, CGS21680, WRC0470, og forbindelsene 12 og 18 ifølge oppfinnelsen forårsaket en konsentrasjons-avhengig økning i koronar ledningsevne. CGS21680 og WRC0470 var de mest potente agonistene i denne serien. Forbindelsene 12 og 18 var ca. like potente som adenosin i økende koronar ledningsevne. Det er verdt å legge merke til at alle agonistene var flere ganger mer potente koronare vasodilatorer i rotte- enn hamsterhjerter.

Tabell 3 Potens av adenosin A_{2A} adenosin reseptor agonister for å øke koronar ledningsevne i rotte og hamster isolerte perfuserte hjerter

Potens (EC ₅₀)			
Agonist	N	Rotte	Hamster
Forbindelse 18	3	67.9±16.7	203.0±6.0
Adenosin	4	59.2±6.4	86.0±0.5
CGS21680	4	0.5±0.1	1.7±0.4
WRC0470	3	0.6±0.2	2.4±1.1

EKSEMPEL 7

Formålet med dette eksemplet er å bestemme den funksjonelle selektiviteten til forbindelse 18 til å forårsake koronar vasodilatasjon. Spesielt ble potensialet til forbindelse 18 til å forårsake koronar vasodilatasjon (A_{2A} AdoR respons) og forlengelse av A-V nodal ledningstid (A₁AdoR respons) bestemt i rotte og hamster hjerter.

Materialer

Sprague Dawley rotter ble levert fra Simonsen. Hartley hamster ble levert fra Charles River. Forbindelse 18 ble fremstilt som beskrevet ovenfor. CVT-510 - 2- (6-

[[((3R)oksolan-3-yl)amino]purin-9-yl}(4S,3R,5R)-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol – ble fremstilt ifølge syntesefremgangsmåte beskrevet i U.S. Patent No. 5,789,416, hvor beskrivelsen av denne innbefattes heri med referanse. Ketamin ble levert fra Fort Dodge Animal Health (Lot No. 440444) and xylazin fra Bayer (Lot No. 26051 A).

- 5 Krebs-Henseleit ble fremstilt ifølge standard fremgangsmåter, og 0,9% natrium klorid ble levert fra McGraw, Inc. (Lot No. J8B246).

Isolert perfusert hjertepreparat:

Rotter og hamstere, av begge kjønn som veier fra 230 til 260 gram og 300 til 350 gram, respektivt, ble anvendt i denne studien. Dyrene ble anestesibehandlet ved peritoneal injeksjon av en cocktail som inneholder ketamin og xylazin (ketamin 1,00 mg, xylazin 20 mg/ml). Brystet ble åpnet og hjertet fjernet raskt. Hjertet ble raskt rensert i iskald Krebs-Henseleit løsning (se nedenfor), og aorta ble kanylert. Hjertet ble deretter perfusert ved en strømningshastighet 10 ml/min. med modifisert Krebs-Henseleit (K-H) løsning som inneholdt NaCl 117,9, KCl 4,5, CaCl, 2,5, MgSO₄, 1,18, KH₂PO₄, 1,18, pyruvat 2,0 mmo/l. K-H-løsningen (pH 7,4) ble gasset kontinuerlig med 95% O₂ og 5% CO₂ og varmet til 35 ± 0,5°C. Hjertet ble gjenstand for elektrisk pacing ved en fiksert sykellengde på 340 ms (250 slag/min.) ved anvendelse av en bipolar elektrode plassert på venstre atrium. Den elektriske stimulien ble generert med en Grass stimulator (Modell S48, W. Warwick, RI) og levert gjennom en Stimuli Isolation Unit (Model SIU5, Astro-Med, Inc., NY) som kvadratbølgepulser av 3-msek. i varighet og amplitude på minst to ganger terskelintensiteten.

Koronart perfusjonstrykk (CPP) ble målt ved anvendelse av en trykkomformer koblet til aorta kanylen via en T-sammenkobler posisjonert ca. 3 cm over hjertet. Koronart perfusjonstrykk ble overvåket gjennom eksperimentet og avlest enten på en diagramavleser (Gould Recorder 2200S) eller et dataavlesningssystem (PowerLab/4S, ADInstruments Pty Ltd, Australia). Kun hjerter med CPP varierende fra 60 til 85 mmHg (i fravær av legemidler) ble anvendt i denne studien. Koronar ledningsevne (i ml/min/mmHg) ble beregnet som forholdet mellom koronar perfusjonshastighet (10 ml/min) og koronar perfusjonstrykk.

A₁ adenosin reseptor-formidlet depresjon av A-V nodal ledningstid (negativ dromotropisk effekt) ble målt. Atriale og ventrikulære overflate elektrogrammer hos rotter og His-bunt elektrogram hos hamstere ble avlest i løpet av konstant atrial pasing. Effektene av forbindelse 18 på atrioventrikulær ledningstid og stimulus-overfor-His-bunt (S-H-intervall) ble bestemt som beskrevet tidligere av Jenkins og Belardinelli (1988).

Effektene av forbindelse 18 på koronar ledningsevne (A_{2A} effekt) og atrioventrikulær ledningstid eller stimulus overfor His-bunt (S-H) intervall (A₁ effekt) ble deretter bestemt. Hjertene ble instrumentert for kontinuerlig avlesning av koronar perfusjons-trykk (A_{2A} respons) og atrioventrikulær (A-V) ledningstid eller S-H intervall (A₁ respons). I hvert eksperiment ble konsentrasjonsresponsforholdet til forbindelse 18 (n = 5 rotter, 5 hamstere) for å øke koronar ledningsevne og å forlenge A-V ledningstid eller S-H intervall ble bestemt. Etter kontrollmålinger av CPP og A-V ledningstid eller S-H intervall ble gjort ble progressiv høyere konsentrasjoner av forbindelse 18 administrert til maksimal koronar vasodilatasjon og A-V nodal ledningstid eller S-H intervall forlengelse oppnådd. I separate rottehjerter (n=4) ble effekten av forskjellige konsentrasjoner (100 – 400 nM) av CVT510 (innsatt kjemisk navn), en A₁ adenosin agonist (Snowdy et al., 1999) på A-V nodal ledningstid bestemt og sammenlignet med den for forbindelse 18 (0,1 – 30 µM).

Konsentrasjonsresponskurvene for forbindelse 18 for å øke koronar arterie ledningsevne og å forlenge A-V nodal ledningstid eller S-H intervall er vist i figurene 1 og 2. Både hos rotte og hamster økte forbindelse 18 koronar ledningsevne på en konsentrasjons-avhengig måte. Potensialene (EC₅₀ verdiene) for forbindelse 18 for å øke koronar ledningsevne i rottehjerter var 68,9 ± 9,6 nM, og i hamsterhjerter 203 ± 22 nM. Til forskjell fra dette var effekten av denne agonisten på S-H intervall noe variabel mellom rotte- og hamsterhjerter. I rottehjerter forlenget ikke forbindelse 18 A-V nodal ledningstid (figur 1), mens A₁ AdoR agonist CVT510 forlenget signifikant A-V nodal ledningstid (figur 3). Forbindelse 18 ved konsentrasjoner så høye som 50 µM forårsaket ingen forlengelse av S-H intervall i hamsterhjerter (figur 2).

Resultatene indikerer at forbindelse 18 er en koronar vasodilator (A_{2A} AdoR-formidlet effekt) uten negativ dromotropisk effekt (A_1 AdoR-formidlet effekt) i rottehjerter. I hamsterhjerter forårsaket forbindelse 18 ingen negativ dromotropisk effekt. I begge artene (rotte og hamster) forårsaket forbindelse 18 maksimal koronar vasodilatasjon ved konsentrasjoner som ikke forårsaket forlengelse av A-V nodal ledningstid, dvs. uten negativ dromotropisk effekt. Det ble også observert at forbindelse 18 har en større affinitet (dvs. $> 2\text{-}/>13$ ganger) for A_{2A} enn A_1 AdoR og at det er en markert større responsreserve for A_{2A} AdoR-formidlet koronar vasodilatasjon enn for A_1 AdoR-formidlet negativ dromotropisk effekt.

10

EKSEMPEL 8

Foreliggende studie ble designet for teste hypotesen om at det er et omvendt forhold mellom affinitet (K_1 eller pK_1) og virkningsvarighet til A_{2A} adenosin reseptorer (AdoR). Spesifikt var målet ved studien å bestemme forholdet mellom varigheten til koronar vasodilatasjon forårsaket av en utvalgt serie av høy og lav affinitet A_{2A} AdoR agonister i rotteisolert hjerte og anestesibehandlede griser: og affiniteten til disse agonistene for A_{2A} AdoR i grisestriatum.

20 Materialer:

Rotter (Sprague Dawley) ble levert fra Simonsen. Bondegård griser ble levert fra "Division of Laboratory Animal Resources", University of Kentucky. Forbindelse 12, forbindelse 18, forbindelse 21 og forbindelse 13 ifølge oppfinnelsen ble fremstilt som beskrevet i fremgangsmåten ovenfor. YT-0146 ble fremstilt som beskrevet i US patentnr. 4,956,345, hvor beskrivelsen av denne innbefattes heri med referanse. WRC-0470 ble fremstilt som beskrevet i litteraturen (K. Niiya et al., J. Med. Chem. 35: 4557-4561 (1992)). CGS21680 ble levert fra Research Biochemicals, Inc. and Sigma and R-PIA (Lot No. WY-V-23) ble levert fra Research Biochemicals, Inc. HENECA var en gave fra professor Gloria Cristalli fra Camerino universitetet i Italy.

Anestesimidler:

Ketamin ble levert fra Fort Dodge Animal Health. Xylazine ble levert fra Bayer.

Natrium pentobarbital ble levert fra The Butler Co. Fenylefrin ble levert fra Sigma.

- 5 DMSO ble levert fra Sigma og American Tissue Type Collections. Krebs-Henseleit
løsning ble fremstilt ifølge standard fremgangsmåter, 0,9% saltvann ble levert fra
McGraw, Inc.

Rotteisolert perfusjonshjertepreparat

- 10 Voksne Sprague Dawley rotter av begge kjønn som veier fra 230 til 260 gram ble
anvendt i denne studien. Dyrene ble anestesibehandlet ved peritoneal injeksjon av en
cocktail som inneholdt ketamin and xylazin (ketamin 100 mg, xylazin 20 mg/ml).
Brystet ble åpnet og hjertet ble fjernet raskt. Hjertet ble forsiktig rensert i iskald Krebs-
Henseleit (K-H) løsning (se nedenfor) og aorta kanylert. Hjertet ble deretter perfusert
15 ved en strømningshastighet på 10 ml/min. med modifisert Krebs-Henseleit (K-H)
løsning som inneholdt NaCl 117.9, KCl 4.5, CaCl. 2.5, MgSO₄ 1.18, KH₂PO₄ 1.18,
pyruvat 2.0 mmo/L. K-H løsningen (pH 7.4) ble gasset kontinuerlig med 95% O₂ og
5% CO₂ og varmet til 35±0.50°C. Hjertet ble gjort gjenstand for elektrisk pacing ved en
fiksert sykellengde på 340 ms (250 slag/minutt) ved anvendelse av en bipolar elektrode
20 plassert på venstre atrium. Den elektriske stimulien ble generert med en Grass
stimulator (Model S48, W. Warwick, RI) og levert gjennom en Stimuli Isolation Unit
(Model SIU5, Astro-Med, Inc., NY) som kvadratbølge pulser på 3 msek i varighet og
amplitude på minst to ganger terskelintensiteten.
- 25 Koronar perfusjonstrykk (CPP) ble målt ved anvendelse av en trykkomformer forbundet
med den aortiske kanylen via en T-sammenkoblet posisjonert ca. 3 cm over hjertet.
Koronar perfusjonstrykk ble målt gjennom eksperimentet og avlest enten på en
diagramavleser (Gould Recorder 2200S) eller et dataavlesningssystem (PowerLab/4S,
ADInstruments Pty Ltd, Australia). Kun hjerter med CPP varierende fra 60 til 85
30 mmHg (i fravær av legemidler) ble anvendt i denne studien. Koronar ledningsevne (i
ml/min/mmHg) ble beregnet som forholdet mellom koronar perfusjonshastighet (10
ml/min) og koronar perfusjonstrykk.

Anestesibehandlede grisepreparat med åpent bryst

Bondegårdgriser som veier 22-27 kg ble anvendt i denne studien. Alle dyrene fikk human pleie ifølge retningslinjene fremsatt i "The Principles of Laboratory Animal Care" formulert av "the National Society for Medical research" og the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" utarbeidet av "the Institute of Laboratory Animal Resources" og publisert av "the National Institutes of Health" (NIH Publikasjonsnr. 86-23, revidert 1996). I tillegg ble dyrene anvendt ifølge retningslinjene til "the University of Kentucky Institutional Animal Care and Use Protocol".

10

Anestesibehandlingen ble gjort med ketamin (20 mg/kg, i.m.) og natrium pentobarbital (15-18 mg/kg, i.v.). Anestesi ble holdt ved ytterligere natrium pentobarbital (1.5-2 mg/kg, i.v.) hvert 15-20 minutter. Ventilasjon ble opprettholdt via et trakeotomi ved anvendelse av en blanding av romluft og 100% O₂. Tidalvolum, respirasjonshastighet og fraksjon O₂ i inåndet luft ble justert for å opprettholde normal arterieblodgass (ABG) og pH-verdier. Kjernekkroppstemperatur ble overvåket med en esofageal temperaturprobe og holdt med en oppvarmingspad mellom 37,0 og 37,5°C. Lactate Ringers løsning ble administrert via et øre eller lårvene ved 5-7 ml/kg/min. etter en begynnende bolus på 300-400 ml. Et kateter ble innsatt i lårarterien for å overvåke arterieblodtrykket og for å oppnå ABG-prøver.

20

Hjertet ble eksponert gjennom en median sternotomi og suspendert i en perikardial grav. Venstre hjertekammertrykk (LVP) ble målt med en 5F høynøyaktighets trykksensitiv tipomformer (Millar Instruments, Houston, TX) plassert i venstre hjertekammer hulrom via apeksen og sikret med en snurpe streng sutur. Et segment av venstre bakgre nedadstigende koronare arterie (LAD), proksimal til begynnelsen av den første diagonale grenen ble dissekert fri for omgivende vev. En transittid perivaskulær strømningsprobe (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY) ble plassert rundt dette segmentet for å måle koronar blodstrøm (CBF). Proksimal til strømningsproben ble et 24 g modifisert angiokateter innsatt for intrakoronare infusjoner. Alle hemodynamiske data ble kontinuerlig vist på en dataskjerm og matet gjennom en 32 bit analog-digital omformer til en online data acquisitions computer med passende software (Augury,

30

Coyote Bay Instruments, Manchester, NH). A_{2A} Ador agonister ble løst i DMSO for å gi forhåndskonstrasjoner på 1-5 mM som ble fortynnet i 0,9% saltvann og infusert i hastigheter på 1-1,5 ml/min. A_{2A} Ador agonistene ble administrert intrakoronart. For å opprettholde konstant blodtrykk ble fenyleferin administrert intravenøst. Fenylefrin
5 forrådsløsninger (30 mM) ble fremstilt i destillert vann.

Isolerte perfuserte hjerter

For å bestemme varigheten av A_{2A} adenosin reseptor-formidlet koronar vasodilasjon forårsaket av adenosin og adenosinreseptor agonister ble agonistene administrert
10 intravenøst ved bolusinjeksjon. Protokoll: Bolus injeksjoner. I hvert hjerte i denne serien (3 til 11 hjerter for hver agonist) ble boluser av adenosin (20 μ l, 2×10^{-4} M), forbindelser ifølge oppfinnelsen (20 to 40 μ l, 2×10^{-5} M), og andre adenosin reseptor agonister injisert til perfusjonslinjen. Tid til 50% (t 0.5) og 90% (t 0.9) reversering til reduksjon i CPP ble målt. Hvert hjerte ble eksponert for maksimalt tre vasodilatorer.

15

Forhold mellom affinitet til forskjellige agonister for A_{2A} adenosin reseptor og reverseringstid på deres effekt til å øke koronar ledningsevne:

Disse eksperimentene ble utført for å konstruere forholdet mellom affinitetene til forskjellige agonister for A_{2A} adenosinreseptor og varigheten på deres respektive effekt
20 på koronar ledningsevne. Boluser av forskjellige agonister ble injisert i perfusjonslinjen til rotteisolerte perfuserte hjerter (n = 4 til 6 for hver agonist) og tiden til 90% (t 0,9) reversering av reduksjon i CPP ble målt. Affinitetene til de forskjellige agonistene for A_{2A} adenosin reseptor ble bestemt i grisestriatum membraner ved anvendelse av radio-ligandbindingsundersøkelse, som beskrevet ovenfor. Reverseringstiden (t 0,9) til
25 reduksjon i CPP ble plottet mot deres affinitet (pK_i) for A_{2A} adenosin reseptor.

Gris med åpent bryst

Før starten på eksperimentet ble alle instrumentene stabilisert i 30 minutter. Etter oppnåelse av grunnlinje hemodynamiske data ble den første intrakoronare infusjon av
30 en A_{2A} ADOR agonist injisert. Infusjoner ble opprettholdt i 4-5 minutter for å muliggjøre LAD CBF og nå en likevektssinnstilling, hvoretter infusjonen ble stoppet. Tiden for gjenvinning av 50% (t 0,5) og 90% (t 0,9) grunnlinje CBF ble avlest. 10 til 15

minutter etter CBF returnerte til førlegemiddelverdier ble en andre infusjon med en forskjellig agonist startet. I innledende studier ble det funnet at den intrakoronare infusjonen av adenosin agonister ga forskjellig grad av systemisk hypotensjon, og således ble i alle etterfølgende eksperimenter fenylefrin administrert intravenøst.

5 Hemodynamiske målinger ble gjort før og etterfølgende den første fenylefrin-infusjonen ved dose på 1 µg/kg/min. Fenylefrin-infusjonshastigheten ble justert i løpet av og etterfølgende infusjonene av adenosin agonister for å opprettholde arterieblodtrykk innenfor 5 mmHg av perinfusjonsverdiene. Effekten av maksimalt tre forskjellige agonister ble bestemt i hvert eksperiment.

10

Resultater

Adenosin, forbindelsene ifølge oppfinnelsen og andre adenosinderivater, ble gitt som boluser til perfusjonslinjen ved konsentrasjoner som forårsaket lik eller nesten lik økning i koronar ledningsevne. Selv om adenosin og agonistene forårsaket tilsvarende

15 maksimale økninger i koronar konduktans var varigheten på effekten markert forskjellig. Varigheten på effekten av adenosin var den korteste fulgt av forbindelse 18, forbindelse 12 og forbindelse 21, mens den for CGS21680, YT-146, HENECA og WRC0470 var den lengste. Varighetene på den koronare vasodilatasjonen forårsaket av adenosin, forbindelsene ifølge oppfinnelsen og andre agonister målt som tiden til 50%

20 og 90% (t 0.5 og t 0.9, respektivt) reversering i økning i koronar ledningsevne er summert i tabell 4.

Tabell 4 – Reverseringstid av koronar vasodilatasjon med adenosin reseptor agonister i rotteisolerte perfuserte hjerter

Agonist	t 0.5 (min)	t 0.9 (min)	n
Adenosin	1.06±0.1	5.6±0.8	11
HENECA	28.6±1.1	32.8±3.1	3
R-PIA	7.9±0.1	12.6±0.8	3
CGS21680	14.5±0.9	19.5±0.9	3
YT-146	17.7±1.0	28.5±4.0	3
Forbindelse 12	4.1±0.3	9.8±1.4	4
Forbindelse 18	3.4±0.5	8.4±2.2	4
WRC-0470	21.9±0.9	27.9±1.4	6
Forbindelse 21	8.3±0.4	12.6±0.4	4

5

Tid (i minutter) til 50% og 90% (t 0,5 og t 0,9, respektivt) reversering av økning i koronar ledningsevne forårsaket av adenosin og adenosin reseptor agonister. Verdiene er middelerverdi ± SEM av enkeltbestemmelser i hvert av preparatene (n).

- 10 Reverseringstid av koronar vasodilatasjon er avhengig av affiniteten til adenosin-derivatene for hjernestriatum A_{2A} reseptorer. Det var et signifikant (P < 0,05) omvendt forhold (r = 0,87) mellom affiniteten (PK_i) til agonistene for A_{2A}AdoR og revereringstid (t 0,9) av den koronare vasodilatasjonen forårsaket av samme agonister.

15 **Koronar vasodilatasjon i et grise-åpent brystpreparat**

- I *in situ* hjerter av et anestesibehandlet grise-åpent brystpreparat forårsaket forbindelse 12 og 18 ifølge oppfinnelsen så vel som CGS21680 og andre A_{2A}AdoR agonister (dvs., WRC-0470 og YT-146) signifikante økninger i koronar blodstrøm (CBF). Utvalgte doser av disse forbindelsene gitt som kontinuerlige (4 til 5 min.) intrakoronare infusjoner forsakket 3.1 til 3.8 ganger økning i CBF som fremsatt i tabell 3 nedenfor. Idet det ble etablert at alle agonister forårsaket nær samme størrelse på økning i CBF, (dvs. "ganger økning") og forårsaket tilsvarende forandringer i hjertehastighet og midlere arterieblodtrykk ble reverseringstiden til deres respektive koronare vasodilatasjonseffekter bestemt.

Tabell 4. Størrelse på økning i koronar blodstrøm forårsaket av forskjellige adenosinreseptor agonister i anestesibehandlede grise-åpnede bryst

Agonist	CBF ("ganger økning")	n
Forbindelse 12 (30µg/kg/min)	3.78±0.70	3
Forbindelse 18 (50µg/kg/min)	3.33±0.58	3
WRC-470 (1µg/kg/min)	3.14±0.24	6
GSC21680 (2µg/kg/min)	3.54±0.093	3
YT-146 (1µg/kg/min)	3.44±0.47	3

5

Maksimal "ganger økning" i koronar blodstrøm (CBF) over grunnlinjen forårsaket av forskjellige adenosinreseptor agonister. Data representerer middelverdi ± SEM til en eller to målinger i hver gris (n).

- 10 Som summert i tabell 5 var $t_{0,5}$ og $t_{0,9}$ til koronar vasodilatasjon forårsaket av forskjellige A_{2A} AdoR agonister og "CVT-forbindelser" variable. Reverseringstiden til økning i CBF forårsaket av forbindelse 12 og 18 ifølge oppfinnelsen var kortere enn den for CGS21680, WRC-0470 eller YT-146. Mer viktig, som i rotteisolerte perfuserte hjerter, var det et signifikant ($P < 0,05$) inverst forhold ($r = 0,93$) mellom affiniteten
- 15 (PKi) til A_{2A} AdoR agonister for grisehjerne striatum A_{2A} reseptorer og reverseringstid ($t_{0,9}$) til koronar vasodilatasjon. Det var en svært god overensstemmelse mellom reverseringstid til koronar vasodilatasjon forårsaket av et utvalgt antall agonister i rotte-isolerte perfuserte hjerter og i anestesibehandlede grise-åpen brystpreparater.

- 20 **Tabell 5. Reverseringstid av koronar vasodilatasjon forårsaket av forskjellige adenosinreseptor agonister i anestesibehandlede grise-åpen bryst**

Agonist	$t_{0,5}$ (min)	$t_{0,9}$ (min)	n
Forbindelse 12 (30µg/kg/min)	2.3±0.6	9.6±1.0	3
Forbindelse 18 (50µg/kg/min)	3.1±0.9	12.0±1.0	3
WRC-470 (1µg/kg/min)	9.5±0.8	22.5±1.6	6
GSC21680 (2µg/kg/min)	9.7±0.8	21.4±0.8	3
YT-146 (1µg/kg/min)	17.8. ±3.4	32.9±5.6	3

Tid (i minutter) til 50% og 90% ($t_{0,5}$ og $t_{0,9}$, resepektivt) reversering av økning i koronar blodstrøm forårsaket av adenosin reseptor agonister. Verdier er middelerdi \pm SEM av en eller to bestemmelser i hvert dyr (n).

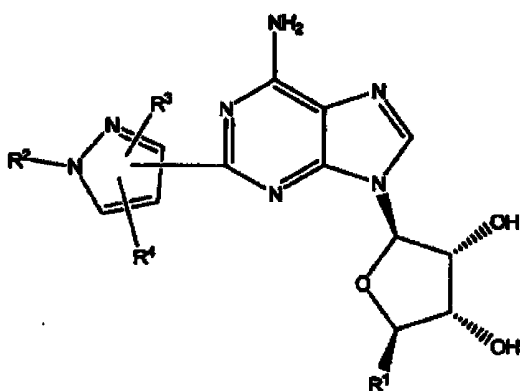
- 5 Forbindelse 18 er en lav affinitet A_{2A} AdoR agonister og mindre potent (- ti ganger) enn prototypisk agonist CGS21680. Uansett er forbindelse 18 en full agonist til å forårsake koronar vasodilatasjon. Men, som vist i denne studien er varigheten på dens effekt flere ganger kortere enn den for høyaffinitetsagonistene CGS21680 og WRC-0470. Således er forbindelse 18 en kortvirkende A_{2A} AdoR agonist koronar vasodilator. På grunn av
- 10 deres kortere virkningsvarighet sammenlignet med høyaffinitets A_{2A} AdoR agonister (for eksempel WRC-0470, CGS21680) kan denne lave affiniteten, men fremdeles full agonist koronar vasodilator vise seg å være ideell farmakologisk "stressvirkningsmiddel" i løpet av radionukleotid-avbildning av myokardium.

P a t e n t k r a v

1.

Forbindelse, k a r a k t e r i s e r t v e d f o r m e l e n:

5

hvor R^1 er $-CH_2OH$;

10 R^2 er utvlagt fra gruppen som består av hydrogen, C_{1-15} alkyl, C_{2-15} alkenyl, C_3-C_7 cykloalkyl, C_3-C_7 cykloalkyl- C_2-C_4 alkyl eller feny- C_1-C_4 , og

 R^3 , R^4 er hydrogen.

15 2.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t bindingspunktet til pyrazolringen er C-4.

3.

20 Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t bindingspunktet til pyrazolringen er C-5.

4.

Forbindelse ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d a t

R² er valgt fra gruppen som består av hydrogen og C₁₋₈ alkyl.

5.

Forbindelse ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
5 forbindelsen er valgt fra

- (4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-benzylpyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol,
 (4S,2R,3R,5R)-2-[6-amino-2-(1-pentylpyrazol-4-yl)purin-9-yl]-5-
 10 (hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol,
 (4S,2R,3R,5R)-2-[6-amino-2-(1-metylpyrazol-4-yl)purin-9-yl]-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol,
 (4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-(metyletyl)pyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol,
 15 (4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-(3-phenylpropyl)pyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol,
 (4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-(4-t-butylbenzyl)pyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol,
 (4S,2R,3R,5R)-2-(6-amino-2-pyrazol-4-ylpurin-9-yl)-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-
 20 diol,
 (4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-pent-4-enylpyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol,
 (4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-decylpyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol,
 25 (4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-(cykloheksylmetyl)pyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol,
 (4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-(2-phenyletyl)pyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol,
 (4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-(3-cykloheksylpropyl)pyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-
 30 (hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol og
 (4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[1-(2-cykloheksyletyl)pyrazol-4-yl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol.

6.

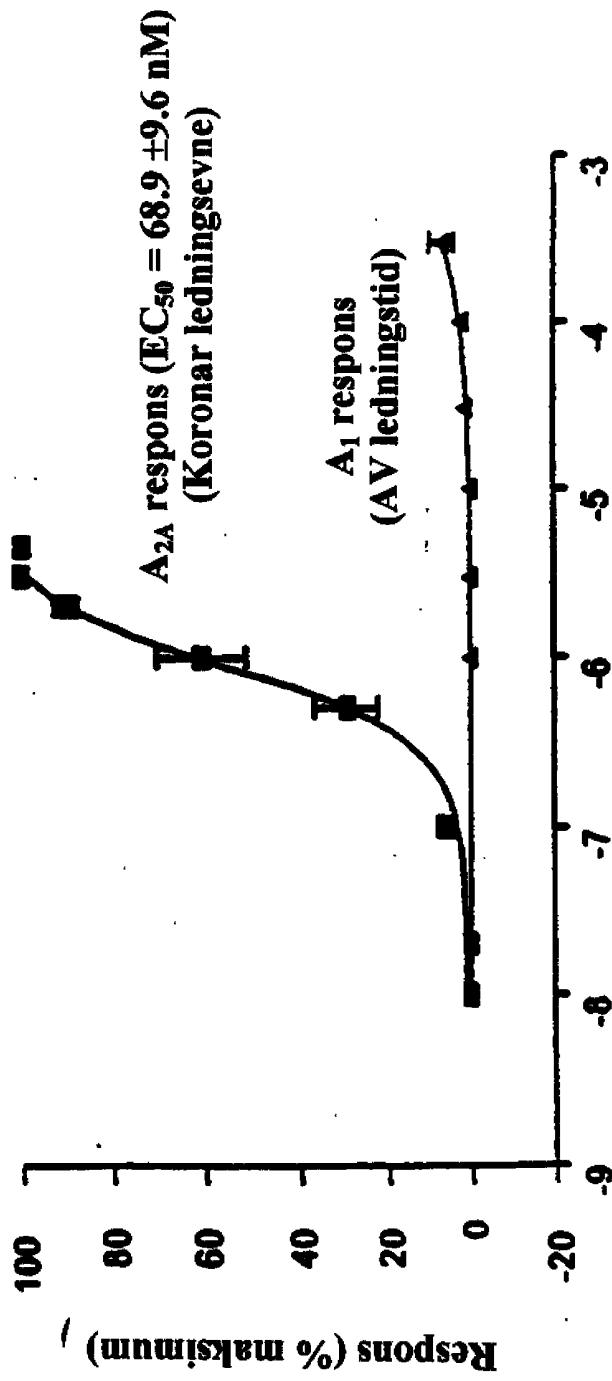
Forbindelse ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
forbindelsen er (4S,2R,3R,5R)-2-[6-amino-2-(1-pentylpyrazol-4-yl)purin-9-yl]-5-
5 (hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol.

7.

Anvendelse av en forbindelse ifølge krav 1 for fremstilling av en farmasøytisk
sammensetning for å stimulere koronar vasodilatasjon hos et pattedyr, som innbefatter
10 administrering til pattedyret av en terapeutisk effektiv mengde av en forbindelse ifølge
krav 1 som er tilstrekkelig til å stresse hjertet og indusere en koronar "stjele situasjon"
for formålet ved å avbilde hjertet.

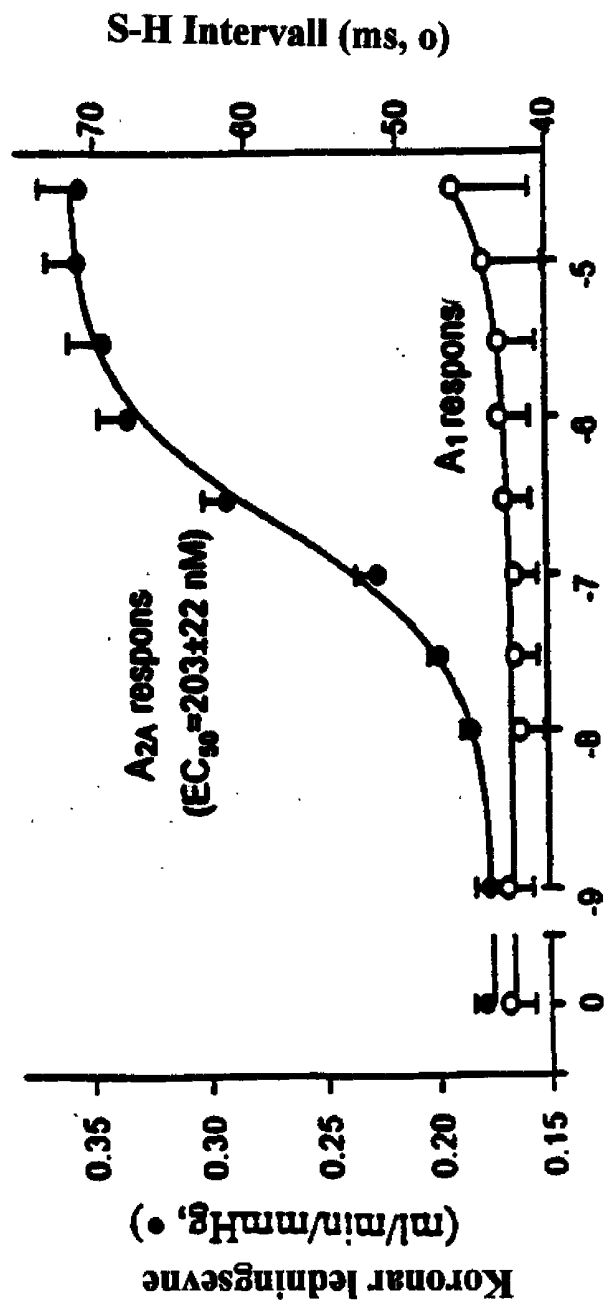
8.

15 Anvendelse ifølge krav 7, hvori den terapeutiske effektive mengden varierer fra 0,01 til
100 mg/kg vekt av pattedyret.



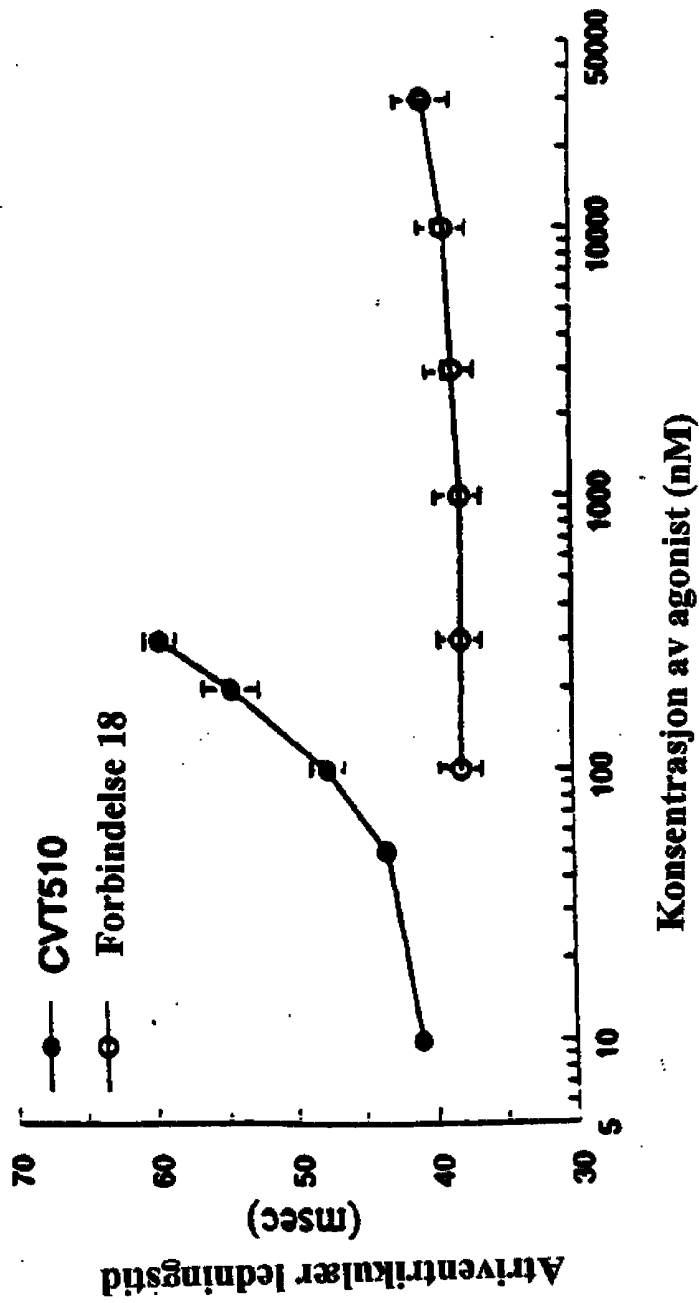
Konsentrasjon av Forbindelse 18 (log M)

Figur 1



Forbindelse 18 Konsentrasjon (log M)

Figur 2



Figur 3