



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 322096

(13) B1

(51) Int Cl.

C07H 19/16 (2006.01)

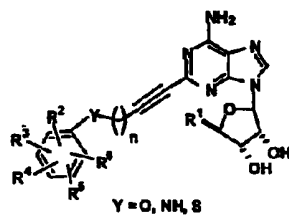
A61K 31/7076 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20016349	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.06.21 PCT/US00/17001
(22)	Inng.dag	2001.12.21	(85)	Videreføringsdag	2001.12.21
(24)	Løpedag	2000.06.21	(30)	Prioritet	1999.06.22, US, 338183
(41)	Alm.tilgj	2002.02.01			
(45)	Meddelt	2006.08.14			
(73)	Innehaver	CV Therapeutics Inc , 3172 Porter Drive, CA94304 PALO ALTO, US			
(72)	Oppfinner	Jeff A Zablocki, 580 Sleeper Avenue, CA94040 MOUNTAIN VIEW, US			
		Elfatih O Elzein, 4644 Creekwood Drive, CA94555 FREMONT, US			
		Venkata P Palle, Sunnyvale, CA, US			
		Gregory Nudelman, Freemont, CA, US			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS , Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, NO			
(54)	Benevnelse	Propargylfenyleter A_{2A}-reseptoragonister, anvendelse derav samt farmasøytiske preparater omfattende forbindelsene.			
(56)	Anførte publikasjoner	Ingen			
(57)	Sammendrag				

2-adenosin propargylfenyleterforbindelser som har formel (A) og fremgangsmåter for anvendelse av forbindelsene som A_{2A}-reseptoragonister for å stimulere mammalisk koronar vasodilatering for terapeutiske formål og for det formål å bilde danne hjertet er beskrevet.



(A)

Foreliggende oppfinnelse omfatter 2-adenosinpropargylfenyleterforbindelser som er nyttige som A_{2A}-reseptoragonister. Forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse er vasodilaterende midler som er nyttige som bildeiddannende midler for hjertet som understøtter identifikasjonen av pattedyr, og spesielt mennesker som lider av tilstander som

5 dårlig koronar perfusjon som er en indikasjon på koronar arteriesykdom (CAD). Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse kan også anvendes som terapeutiske midler for koronar arteriesykdom. Oppfinnelsen omfatter videre anvendelse av de omtalte forbindelsene samt farmasøytiske preparater inneholdende disse.

10 Farmakologisk stress induseres ofte med adenosin eller dipyridamol i pasienter med antatt CAD før bildeiddannelse med T1-scintigrafi eller ekkokardiografi. Begge legemidler bevirker dilatering av koronare motstandskar ved aktivering av celleoverflate A₂-reseptorer. Selv om farmakologisk stress opprinnelig ble innført som en mulighet for å fremkalle koronardilatering i pasienter som er ute av stand til å trene, har flere undersø-

15 kelser vist at den prognostiske verdien av ²⁰¹Tl eller ekkokardiografisk bildeiddannelse i pasienter utsatt for farmakologisk stress med adenosin eller dipyridamol var ekvivalent med pasienter utsatt for tradisjonelle treningsstresstester. Imidlertid er det en høy forekomst av legemiddelrelaterte bivirkninger under farmakologisk stressbildeiddannelse med disse legemidlene, så som hodepine og kvalme, som kunne forbedres med nye te-

20 rapeutiske midler.

Adenosin A_{2B}- og A₃-reseptorer er involvert i en mastcelledegranulering og derfor gir astmatiske midler ikke de ikke-spesifikke adenosinagonistene for å inducere en farmakologisk stresstest. I tillegg vil adenosinstimulering av A₁-reseptoren i atrium og A-V-

25 modus redusere S-H-intervallet som kan inducere AV-blokkering. (N.C. Gupto et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*; (1992) 19:248-257). Videre kan stimulering av adenosin A₁-reseptoren ved hjelp av adenosin være ansvarlig for kvalmen, siden A₁-reseptoren finnes i fordøyelseskanalen. (J. Nicholls et al., *Eur. J. Pharm.* (1997) 338(2) 143-150).

30 Dyredata antyder at spesifikke adenosin A_{2A}-undertypereseptorer på koronare motstandskar formidler de koronare dilatoriske responsene på adenosin, mens undertype A_{2B}-reseptorstimulering relaxerer perifere kar (legg merke til: sistnevnte nedsetter systemisk blodtrykk). Følgelig foreligger det et behov for farmasøytiske preparater som er A_{2A}-reseptoragonister som ikke har farmakologiske effekter som et resultat av stimule-

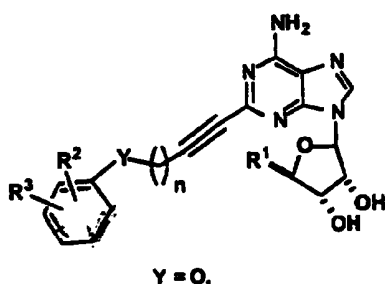
35 ring av A₁-reseptoren *in vivo*. Videre foreligger det et behov for A_{2A}-reseptoragonister som har en kort halveringstid og som tåles godt av pasienter som undergår farmakologisk koronar stressvurdering.

Ifølge et trekk omfatter oppfinnelsen 2-adenosinpropargylfenyleterforbindelser som er nyttige A_{2A}-reseptoragonister.

- 5 Ifølge et annet trekk omfatter foreliggende oppfinnelse farmakologiske preparater omfattende 2-adenosinpropargylfenyleterforbindelser som tåles godt med få bivirkninger.

Nok et trekk ved foreliggende oppfinnelse er 2-adenosinpropargylfenyleterforbindelser som lett kan anvendes i forbindelse med radioaktive billedannende midler for å lette
10 koronar billedannelse.

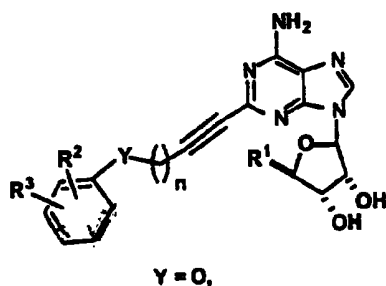
I en utførelsesform omfatter oppfinnelsen 2-adenosinpropargylfenyleterforbindelser som har følgende formel:



- 15 I en annen utførelsesform omfatter foreliggende oppfinnelse for anvendelse av forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse for fremstilling av preparater for å stimulere koronar vasodilatering i pattedyr, og spesielt i mennesker, for å stresse hjerteindusert "steal" situasjon" for det formål å billedanne hjertet.

20 I nok en annen utførelsesform omfatter foreliggende oppfinnelse farmasøytiske sammensetninger som omfatter en eller flere forbindelser ifølge oppfinnelsen og en eller flere farmasøytiske eksipienter.

- 25 Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter en klasse av propargylfenyleter-substituerte 2-adenosinforbindelser som har følgende formel:



hvor $n = 1$ eller 2 ;

$Y = O,$

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

- R^2 og R^3 er hver individuelt valgt fra gruppen bestående av hydrogen, halogen, CF_3 , CN, C_{1-6} alkyl, C_{1-6} alkoksy, feny, feny- C_{1-4} alkyl eller R^2 og R^3 danner sammen en C_{1-3} -alkylendioksygruppe.

- I en ytterligere foretrukket utførelsesform er minst en, mer foretrukket begge substituentene valgt fra gruppen bestående av R^2 og R^3 hydrogen.

I en ytterligere mer foretrukket utførelsesform er forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse valgt fra

- (4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[3-(2-fenylfenoksy)prop-1-ynyl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol,
- (4S,2R,3R,5R)-2-[6-amino-2-(3-fenoksyprop-1-ynyl)purin-9-yl]-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol,
- 4-{3-[9-[(4S,2R,3R,5R)-3,4-dihydroksy-5-(hydroksymetyl)oksolan-2-yl]-6-aminopurin-2-yl} prop-2-ynyloksy)benzenkarbonitril,
- (4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[3-(4-fenylfenoksy)prop-1-ynyl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol,
- (4S,2R,3R,5R)-2-(6-amino-2-{3-[2-benzylfenoksy]prop-1-ynyl}purin-9-yl)-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol,
- 2-[2-(3-(2H-benzo[2,3-d]1,3-dioksolen-4-yloksy)prop-1-ynyl)-6-aminopurin-9-yl](4S,2R,3R,5R)-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol,
- (4S,2R,3R,5R)-2-(6-amino-2-{3-[3,5-bis(tert-butyl)fenoksy]prop-1-ynyl}purin-9-yl)-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol,
- og blandinger derav.

De følgende definisjoner gjelder betegnelsene som her er anvendt.

"Halogen" alene eller i kombinasjon betyr alle halogener, dvs. klor (Cl), fluor (F), brom (Br), jod (I).

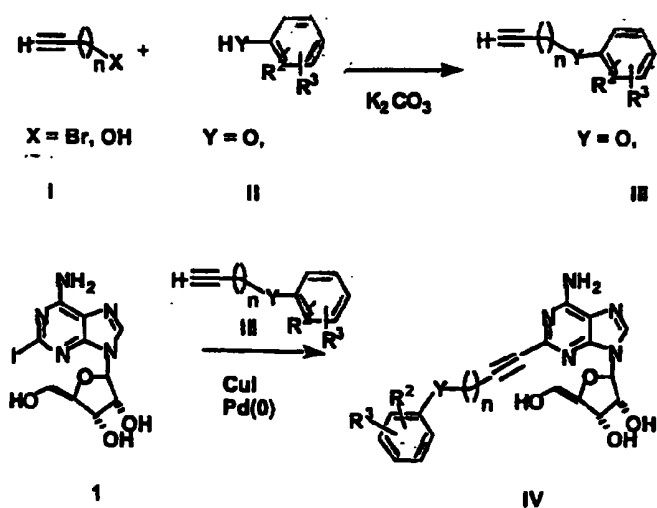
5

"Hydroksyl" refererer til gruppen -OH.

"Tiol" eller "merkapt" refererer til gruppen -SH.

- 10 "Alkyl" - alene eller i kombinasjon, betyr en alkanavleddet rest inneholdende fra 1 til 6, karbonatomer (med mindre spesifikt definert). Det er en rettkjedet alkyl, forgrenet alkyl eller cykloalkyl. Foretrukket er rettkjedede eller forgrenede alkylgrupper inneholdende 1-6, ytterligere mer foretrukket 1-4 og mest foretrukket 1-2 karbonatomer, så som metyl, etyl, propyl, isopropyl, butyl, t-butyl og lignende. Betegnelsen "lavere alkyl" anvendes her for å beskrive de rettkjedede alkylgruppene omtalt ovenfor. Forbindelsene
- 15 ifølge foreliggende oppfinnelse kan fremstilles som angitt i skjema 1-3 nedenfor.

SKJEMA 1

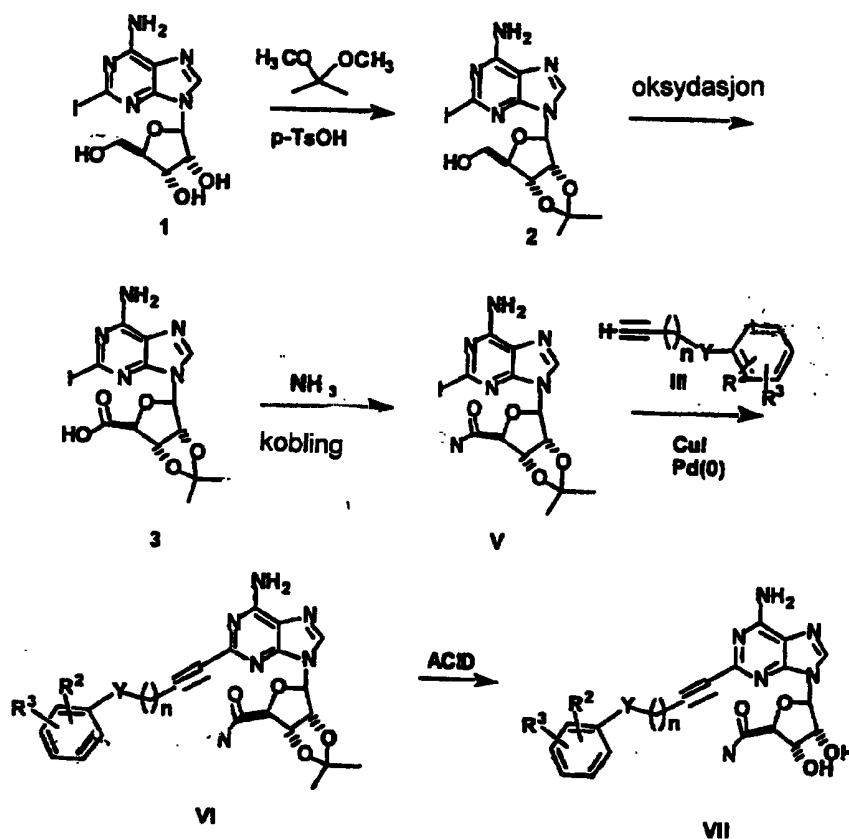


20

- Forbindelser som har den generelle formel IV (skjema 1) kan fremstilles ved palladium-formidlet krysskobling av forbindelse 1 med alkynylderivater ($Y = O, NH, S$) representert ved formelen III (skjema 1) i nærvær eller fravær av kobbersalter (Matsuda et al.,
- 25 Chem. Phar. Bull. (1985), 33, 19766-19769; Kochetkov et al., Organic Chemistry of

- Nucleic Acids, del B, Plenum Press, New York (1972), 333; Nair, et al., Tet. Lett. (1990), 31, 807-810). I noen tilfeller kan forbindelse III oppnås fra kommersielle kilder. Eksempler på kommersielt tilgjengelige forbindelse III omfatter fenylpropargyleter, 3-(2,6-diklorfenoksy)prop-1-yn, 3-(4-cyanofenoksy)prop-1-yn, 3-(4-karboksyetyl-
 5 fenoksy)prop-1-yn, 3-(4-cyanofenoksy)-3-metyl-but-1-yn og fenylpropargylsulfid. Forbindelse III kan fremstilles enten ved omsetning av propargyl eller homopropargylbromid med substituerte fenoler, tiofenoler og aniliner ved anvendelse av en base (f.eks. kaliumkarbonat) i et egnet oppløsningsmiddel (f.eks. DMF, aceton). Når Y = NH, kan anilinutgangsmaterialet nærmere bestemt aktiveres ved å fremstille et trifluoracetamid
 10 etterfulgt av alkylering. En alternativ syntese av forbindelse III kan oppnås ved omsetning av propargyl eller homopropargylalkoholer med fenoler og tiofenoler under Mitsunobu-reaksjonsbetingelser (O. Mitsunobu, Bull. Chem. Soc. Jpn., (1976), 40, 2380; A. Hassner, J. Org. Chem. (1990), 55, 2243).
- 15 Forbindelser med generell formel VII kan fremstilles som vist i skjema 2.

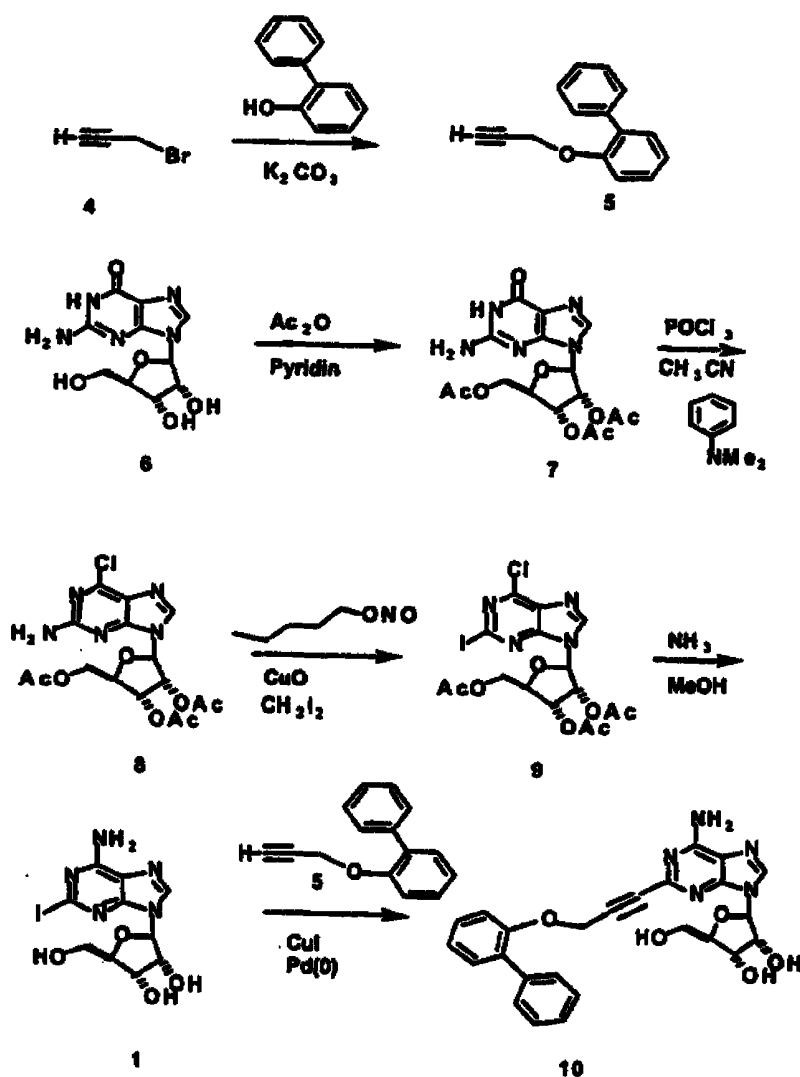
SKJEMA 2



- Forbindelse 2, som kan oppnås ved omsetning av forbindelse 1 med 2,2-dimetoksypropan i nærvær av en syre, kan oksideres til karboksylsyre 3, basert på strukturelt lignende forbindelser, ved anvendelse av kaliumpermanganat eller pyridinium-
- 5 klorkromat, eller TEMPO osv., (M. Hudlicky, (1990) *Oxidations in Organic Chemistry*, ACS Monographs, American Chemical Society, Washington D.C.; B. Cox et al., WO 9828319) til forbindelse 3. Omsetning av et primært eller sekundært amin med formelen HNR^6R^7 og forbindelse 3 ved anvendelse av DCC (M. Fujino et al., *Chem. Pharm. Bull.* (1974), 22, 1857), PyBOP (J. Martinez et al., *J. Med. Chem.* (1988) 28, 1874) eller
- 10 ByBrop (J. Caste et al., *Tetrahedron*, (1991), 32, 1967) koblingsbetingelser kan gi forbindelse V. Forbindelse VI kan fremstilles ved den palladiumformidlede krysskoblingen av forbindelse V med alkynylderivater ($\text{Y} = \text{O}, \text{N}, \text{S}$) representert ved formel III (skjema 1), i et egnet oppløsningsmiddel (f.eks. DMF, aceton) i nærvær eller fravær av kobbersalter. Avbeskyttelse av forbindelse VI kan utføres ved oppvarming med 80% vandig
- 15 eddiksyre (T.W. Greene og P.G.M. Wuts, (1991) *Protective Groups in Organic Synthesis*, A. Wiley-Interscience publication) eller med vannfri saltsyre (4N) for å oppnå forbindelse VII.

En spesifikk syntese av forbindelse 10 er illustrert i skjema 3.

SKJEMA 3



Kommersielt tilgjengelig guanosin (forbindelse 6) ble omdannet til triacetatet 7 som beskrevet tidligere (M.J. Robins og B. Uznanski, Can. J. Chem. (1981), 59, 2601-2607). Forbindelse 8, fremstilt ved å følge litteraturfremgangsmåten ifølge Cerster et al. (J.F. Cerster, A.F. Lewis og R.K. Robins, Org. Synthesis, 242-243), ble omdannet til forbindelse 1 i to trinn som beskrevet tidligere (V. Nair et al., J. Org. Chem., (1988), 53, 3051-3057). Forbindelse 1 ble underkastet palladiumformidlet krysskobling, ved anvendelse av diklor-bis-(trifenylfosfin)palladium(II) som en katalysator, med forbindelse 5 for å tilveiebringe forbindelse 10. Forbindelser 11-18 ble fremstilt på en tilsvarende måte.

Fremgangsmåtene anvendt for å fremstille forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse er ikke begrenset til de som er beskrevet ovenfor. Ytterligere fremgangsmåter kan finnes i de følgende kildene og er innbefattet som henvisning (J. March, *Advanced Organic Chemistry; Reaction Mechanisms and Studies* (1992), A Wiley Interscience Publications og J. Tsuji, *Palladium Reagents and Catalyst, Innovations in Organic Synthesis* (1996), John Wiley & Sons Publications).

Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse er nyttige i forbindelse med radioaktive bilde-dannelsesmidler for å bilde-danne koronar aktivitet. Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse er A_{2A} -agonister som antas å gi spesifikk aktivering av adenosin A_{2A} -reseptor i koronarkarene i motsetning til adenosin A_1 -reseptorer i atrium og AV-noden og/eller A_{2B} -reseptorer i perifere kar, for derved å unngå uønskede bivirkninger. Ved administrering i en terapeutisk mengde forårsaker forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse at koronare blodkar vasodilaterer for å indusere koronar "steal", hvori friske koronarkar stjeler blod fra ufriske kar, hvilket resulterer i mangel på blodstrøm til hjer-tevev. Koronar bilde-dannelse identifiserer da koronarområder med frisk og ikke-frisk blodstrøm. Lavere doser av A_{2A} -agonister kan gi fordelaktig koronar vasodilatering (mindre alvorlig) ved behandlingen av kronisk CAD.

Som A_{2A} -agonister er forbindelsene ifølge oppfinnelsen også nyttige i adjunktiv terapi, med angioplasti for å indusere dilatering, inhibere plateaggregering, og som et generelt antiinflammatorisk middel. A_{2A} -agonister, som forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse, kan tilveiebringe de terapeutiske fordelene beskrevet ovenfor for å forhindre neutrofil aktivering (*Purinergic Approaches in Experimental Therapeutics*, K.A. Jacobson og M.F. Jarvis 1997, Wiley, New York). Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse er også aktive mot en tilstand kalt no-reflow hvori plater og neutrofiler aggregerer og blokkerer et kar. Som A_{2A} -agonister er forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse effektive mot non-reflow ved å forhindre neutrofil og plateaktivering (f.eks. antas de å forhindre frigivelse av superoksyd fra neutrofiler). Som A_{2A} -agonister er forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse også nyttige som kardiobeskyttende midler ved deres anti-inflammatoriske virkning på neutrofiler. I situasjoner hvor hjertet vil gå igjennom en ischemisk tilstand, så som et transplantat, vil de følgelig være nyttige.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også promedikamenter for de ovenfor angitte A_{2A} -agonistene. Et promedikament er et legemiddel som er kjemisk modifisert og som kan være biologisk inaktivt ved dets virkningssete, men som vil nedbryte eller modifiseres

ved en eller flere enzymatiske eller *in vivo* prosesser til den bioaktive formen. Promedikamentene ifølge foreliggende oppfinnelse bør ha en annen farmakokinetisk profil enn opphavet som muliggjør forbedret absorpsjon over slimhinneepitelet, bedre saltdannelse og/eller oppløselighet og forbedret systemisk stabilitet. De ovenfor angitte forbindelsene kan fordelaktig modifiseres ved en eller flere av hydroksylgruppene. Modifikasjonen kan være (1) ester eller karbamatderivater som kan spaltes ved hjelp av esteraser eller lipaser, for eksempel; (2) peptider som kan gjenkjennes ved spesifikk eller ikke-spesifikk proteinase; eller (3) derivater som akkumulerer ved et virkningssete gjennom membranseleksjon eller en promedikamentform eller modifisert promedikamentform, eller en hvilken som helst kombinasjon (1) til (3) ovenfor.

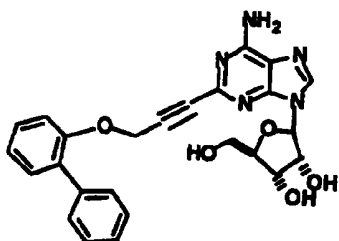
Preparatene kan administreres oralt, intravenøst, gjennom epidermis eller ved en hvilken som helst kjent fremgangsmåte innen teknikken for administrering av et terapeutisk middel. Behandlingsfremgangsmåten omfatter administreringen av en effektiv mengde av den valgte forbindelsen, fortrinnsvis dispergert i en farmasøytisk bærer. Doseringenheter av den aktive bestanddelen velges generelt fra området 0,01 til 100 mg/kg, men vil lett bestemmes av fagmannen avhengig av administreringsmåten, alderen og tilstanden til pasienten. Denne dosen administreres typisk i en oppløsning ca. 5 minutter til ca. 1 time eller mer før koronar billedannelse. Ingen uakseptable toksikologiske effekter ventes når forbindelsene ifølge oppfinnelsen administreres i terapeutiske mengder.

Dersom den endelige forbindelsen ifølge oppfinnelsen inneholder en basisk gruppe, kan et syreaddisjonssalt fremstilles. Syreaddisjonssalter av forbindelsene fremstilles på en standard måte i et egnet oppløsningsmiddel fra utgangsforbindelsen og et overskudd syre, så som saltsyre, hydrobromsyre, svovelsyre, fosforsyre, eddiksyre, maleinsyre, ravsyre eller metansulfonsyre. Saltsyresaltformen er spesielt nyttig. Dersom den endelige forbindelsen inneholder en sur gruppe, kan kationiske salter fremstilles. Typisk behandles utgangsforbindelsen med et overskudd av en alkalisk reagens, så som hydrok-syd, karbonat eller alkoksyd, inneholdende det egnede kationet. Kationer, så som Na^+ , K^+ , Ca^{+2} og NH_4^+ , er eksempler på kationer tilstede i farmasøytisk akseptable salter. Visse av forbindelsene danner indre salter eller dobbeltioner som også kan være akseptable.

Farmasøytiske preparater omfattende forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse og/eller derivater derav, kan formuleres som oppløsninger eller lyofiliserte pulvere for parenteral administrering. Pulvere kan rekonstitueres ved tilsetning av et egnet fortynningsmiddel eller annen farmasøytisk akseptabel bærer før anvendelse. Dersom de an-

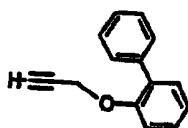
vendes i flytende form er preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse fortrinnsvis inkorporert i en bufret, isotonisk, vandig oppløsning. Eksempler på egnede fortynningsmidler er normal isotonisk saltvannsoppløsning, standard 5% dekstrose i vann og bufret natrium- eller ammoniumacetatoppløsning. Slike flytende formuleringer er egnede for parenteral administrering, men kan også anvendes for oral administrering. Det kan være ønskelig å tilsette hjelpestoffer så som polyvinylpyrrolidon, gelatin, hydroksycellulose, akasia, polyetylglykol, mannitol, natriumklorid, natriumsitrat eller et hvilket som helst annet kjent hjelpestoff innen området farmasøytiske preparater omfattende forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse. Alternativt, kan de farmasøytiske forbindelsene innkapsles, tabletteres eller fremstilles i en emulsjon eller sirup for oral administrering. Farmasøytisk akseptable faste eller flytende bærere kan tilsettes for å fremme eller stabilisere sammensetningen, eller for å lette fremstillingen av sammensetningen. Flytende bærere omfatter sirup, peanøttolje, olivenolje, glyserol, saltvann, alkoholer og vann. Faste bærere omfatter stivelse, laktose, kalsiumsulfat, dihydrat, teffa alba, magnesiumstearat eller stearinsyre, talk, pektin, akasia, agar eller gelatin. Bæreren kan også omfatte et materiale med langvarig frigivelse så som glyserol monostearat eller glyserol distearat, alene eller med en voks. Mengden av fast bærer varierer, men vil fortrinnsvis være mellom ca. 20 mg til ca. 1 mg pr. doseringsenhet. De farmasøytiske dosene fremstilles ved å anvende konvensjonelle teknikker så som maling, blanding, granulering og komprimering, om nødvendig, for tablettformer; eller maling, blanding og fylling for hårdgelatinkapselformer. Når en flytende bærer anvendes, vil preparatet være i form av en sirup, eliksir, emulsjon eller en vandig eller ikke-vandig suspensjon. Et slikt flytende preparat kan administreres direkte eller fylles i en mykgelatinkapsel. Det er foretrukket at preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse administreres som en oppløsning enten orale eller intravenøst ved kontinuerlig infusjon eller bolus.

Eksemplene som følger tjener til å illustrere foreliggende oppfinnelse. Eksemplene viser hvorledes man fremstiller og anvender forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse. I eksemplene, er alle temperaturer i grader Celcius.

EKSEMPEL 1

(4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[3-(2-phenylfenoksy)prop-1-ynyl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol (10).

Syntese av 2-fenyl-1-prop-2-ynyloksybenzen (forbindelse 5).



10

Til en oppløsning av propargylbromid (80% oppløsning i toluen, 500 δ 3,36 mmol) i aceton (15 ml) ved 23°C ble det tilsatt 2-fenylfenol (316 mg, 1,86 mmol) og kaliumkarbonat (1,05 g, 7,61 mmol). Etter å være omrørt i en forseglet reaksjonsflaske ved 65°C i 14 timer, ble reaksjonen konsentrert i vakuum, resten ble rensset ved flashkromatografi (etylacetat:heksan 9:1) for å gi forbindelse 5 i 95% utbytte.

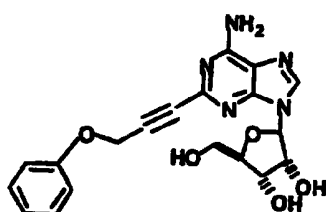
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 2,45-2,55 (m, 1H), 4,60-4,70 (m, 2H), 6,90-7,43 (m, 9H).

Syntese av (4S,2R,3R,5R)-2-[6-amino-2-(3-fenoksyprop-1-ynyl)purin-9-yl]-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol (forbindelse 10).

Til en oppløsning av (4S,2R,3R,5R)-2-(6-amino-2-jodpurin-9-yl)-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol (forbindelse 1) (50 mg, 0,126 mmol) og prop-2-ynyloksybenzen (22 mg, 0,1605 mmol) i N,N-dimetylformamid (1 ml) og trietylamin (21 mg, 16,065 mmol) ved 23°C ble det tilsatt kobberjodid (5 mg, 0,026 mmol) og diklorbis(trifenylfosfin)palladium(II) (22 mg, 0,031 mmol) katalysator. Etter å være omrørt i en forseglet rekti-flaske ved 80°C i 6 timer, ble reaksjonen konsentrert i vakuum, resten ble rensset ved preparatorisk tynnsjikt-kromatografi (metylenklorid:metanol 9:1) for å gi forbindelse 10 (9,6 mg, 0,024 mmol) i 20% utbytte.

^1H NMR (CDCl_3 , CD_3OD 9:1) δ 3,02-3,04 (m, 1H), 3,07 (s, 1H), 3,55, 3,74 (dd, 2H), 4,02 (s, 1H), 4,11-4,13 (m, 1H), 4,48-4,52 (m, 1H), 4,72 (s, 2H), 5,65 (d, 1H), 6,75-6,82 (m, 3H), 7,08-7,12 (m, 2H), 7,94 (s, 1H).

5 EKSEMPEL 2

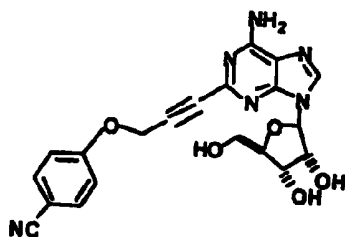


10 (4S,2R,3R,5R)-2-[6-amino-2-(3-fenoksyprop-1-ynyl)purin-9-yl]-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol (11)

Forbindelse 11 ble fremstilt ved fremgangsmåten i henhold til forbindelse 10.

^1H NMR (CDCl_3 , CD_3OD 9:1) δ 3,02-3,04 (m, 1H), 3,07 (s, 1H), 3,55, 3,74 (dd, 2H), 4,02 (s, 1H), 4,11-4,13 (m, 1H), 4,48-4,52 (m, 1H), 4,72 (s, 2H), 5,65 (d, 1H), 6,75-6,82 (m, 3H), 7,08-7,12 (m, 2H), 7,94 (s, 1H), 4,48-4,52 (m, 1H), 4,72 (s, 2H), 5,65 (d, 1H), 6,90-7,00 (m, 1H), 7,10-7,15 (m, 1H), 7,15-7,32 (m, 5H), 7,35-7,45 (m, 2H), 7,94 (s, 1H).

EKSEMPEL 3



20

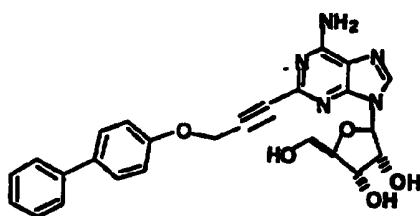
25 4-(3-{9-[(4S,2R,3R,5R)-3,4-dihydroksy-5-(hydroksymetyl)oksolan-2-yl]-6-aminopurin-2-yl}prop-2-ynyloksy)benzenkarbonitril (12)

Forbindelse 12 ble fremstilt ved fremgangsmåten for forbindelse 10.

¹H NMR (CDCl₃:CD₃OD 9:1) δ 3,55 (d, 1H), 3,70 (d, 1H), 4,05-4,07 (m, 1H), 4,10-4,12 (m, 1H), 4,48 (dd, 1H), 4,80 (s, 2H), 5,65 (d, 1H), 6,90 (d, 2H), 7,45 (d, 2H), 7,95 (s, 1H).

5

EKSEMPEL 4

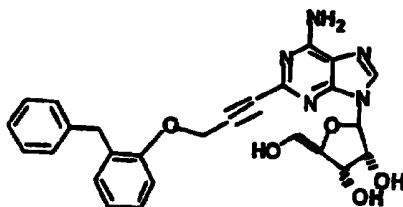


10 **(4S,2R,3R,5R)-2-((6-amino-2-((3-(4-phenylphenoxy)prop-1-ynyl)purin-9-yl)-5-(hydroxymethyl)oxolan-3,4-diol (13)**

Forbindelse 13 ble fremstilt ved fremgangsmåten for forbindelse 10.

15 ¹H NMR (CDCl₃:CD₃OD 9:1) δ 3,02-3,04 (m, 1H), 3,07 (s, 1H), 3,55, 3,74 (dd, 2H), 4,02 (s, 1H), 4,11-4,13 (m, 1H), 4,48-4,52 (m, 1H), 4,72 (s, 2H), 5,65 (d, 1H), 6,90-7,00 (m, 1H), 7,10-7,15 (m, 1H), 7,15-7,32 (m, 5H), 7,35-7,45 (m, 2H), 7,94 (s, 1H).

EKSEMPEL 5



20

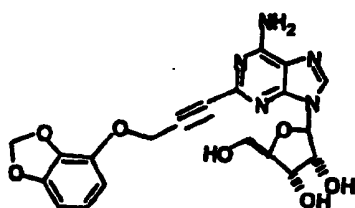
(4S,2R,3R,5R)-2-((6-amino-2-((3-(2-benzylphenoxy)prop-1-ynyl)purin-9-yl)-5-(hydroxymethyl)oxolan-3,4-diol (14)

Forbindelsen ble fremstilt ved fremgangsmåten for forbindelse 10.

25

^1H NMR ($\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ 9:1) δ 3,02-3,04 (m, 1H), 3,07 (s, 1H), 3,55, 3,74 (dd, 2H), 3,92 (s, 2H), 4,02 (s, 1H), 4,11-4,13 (m, 1H), 4,48-4,52 (m, 1H), 4,72 (s, 2H), 5,65 (d, 1H), 6,80-6,88 (m, 1H), 6,96-7,01 (m, 2H), 7,15-7,22 (m, 6H), 7,94 (s, 1H).

5 EKSEMPEL 6

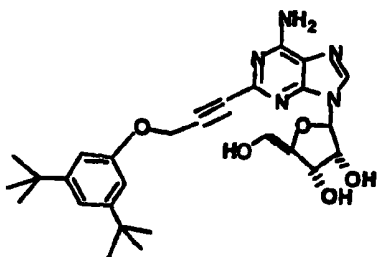


2-[2-(3-(2H-benzo[2,3-d]1,3-dioxolen-4-yloxy)prop-1-ynyl)-6-aminopurin-9-yl](4S,2R,3R,5R)-5-(hydroxymethyl)oxsolan-3,4-diol (15)

Forbindelse 15 ble fremstilt ved fremgangsmåten for forbindelse 10.

^1H NMR ($\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ 9:1) δ 3,61 (d, $J=13,2\text{Hz}$, 1H), 3,78 (d, $J=13,2\text{Hz}$, 1H), 4,10-4,12 (m, 1H), 4,21-4,22 (m, 1H), 4,58-4,59 (m, 1H), 4,68 (s, 2H, O-CH₂-O), 5,73-5,75 (m, 3H), 6,30 (d, $J=8,4\text{Hz}$, 2H), 6,45 (s, 1H), 6,54 (d, $J=8,4\text{Hz}$, 2H), 8,07 (s, 1H).

EKSEMPEL 7



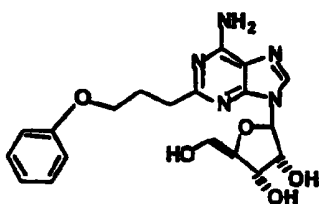
20

(4S,2R,3R,5R)-2-(6-amino-2-{3-[3,5-bis(tert-butyl)fenoksy]prop-1-ynyl}purin-9-yl)-5-(hydroxymethyl)oxsolan-3,4-diol (16).

Forbindelse 16 ble fremstilt ved fremgangsmåten for forbindelse 10.

^1H NMR ($\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ 9:1) δ 1,22 (s, 9H), 3,02-3,04 (m, 1H), 3,07 (s, 1H), 3,55, 3,74 (dd, 2H), 4,02 (s, 1H), 4,11-4,13 (m, 1H), 4,48-4,52 (m, 1H), 4,72 (s, 2H), 5,65 (d, 1H), 6,78 (s, 2H), 6,99 (s, 1H), 7,94 (s, 1H).

5 EKSEMPEL 8



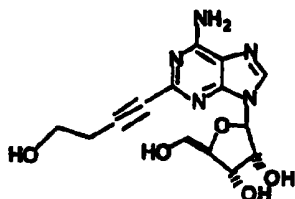
(4S,2R,3R,5R)-2-[6-amino-2-(3-fenoksypropyl)purin-9-yl]-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol (17).

10 Forbindelse 17 ble fremstilt ved fremgangsmåten for forbindelse 10.

^1H NMR ($\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ 9:1) δ 2,15-2,25 (m, 2H), 3,02-3,04 (m, 1H), 3,07 (s, 1H), 3,55, 3,74 (dd, 2H), 3,90-4,00 (m, 2H), 4,02 (s, 1H), 4,11-4,13 (m, 1H), 4,48-4,52 (m, 1H), 4,65-4,75 (s, 2H), 5,65 (d, 1H), 6,75-6,82 (m, 3H), 7,08-7,12 (m, 2H), 7,94 (s, 1H).

15

EKSEMPEL 9



20 **(4S,2R,3R,5R)-2-[6-amino-2-(4-hydroksybut-1-ynyl)purin-9-yl]-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol (18).**

Forbindelse 18 ble fremstilt ved fremgangsmåten for forbindelse 10.

25 ^1H NMR ($\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ 9:1) δ 2,45-2,55 (m, 2H), 3,02-3,04 (m, 1H), 3,07 (s, 1H), 3,55, 3,74 (dd, 2H), 4,02 (s, 1H), 4,11-4,13 (m, 1H), 4,48-4,52 (m, 1H), 4,65-4,73 (m, 2H), 5,65 (d, 1H), 7,94 (s, 1H).

EKSEMPEL 10

Forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse ble analysert for å bestemme deres affinitet for A_{2A}-reseptoren i et svinestriatummembranpreparat. 0,2 mg svinstriatalmembraner ble behandlet med adenosin deaminase og 50 mM Tris buffer (pH = 7,4) etterfulgt av blanding. Til svinemembranene ble det tilsatt 2 µl av serievis fortynnet DMSO-forrådsoppløsning av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse ved konsentrasjoner varierende fra 100 µM til 10 nM eller kontrollen mottok 2 µl av DMSO alene, deretter ble den tritierte agonisten ZM 241385 i Tris buffer (50 mM, pH 7,4) tilsatt for å oppnå en endelig konsentrasjon på 2 nM. Etter inkubering ved 23°C i 2 timer ble oppløsningene filtrert ved anvendelse av en membranløser ved anvendelse av flere vaskinger av membranene (3 x). Filterskivene ble telt i scintillasjonscocktail hvilket gir mengden fortrenkning av tritiert ZM ved kompetitiv binding av forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse. Mer enn en 5 punkts kurve ble anvendt for å generere IC₅₀-verdier og antallet forsøk (n) er indikert i kolonnen merket på denne måten i tabell 1 nedenfor.

TABELL 1

Forbindelse nr.	Ki (nM)	n
10	++	2
11	+++	4
12	++	3
13	+	3
14	++	3
15	+++	1
16	+	2

+++ = 10-100 nM
 ++ = 100-1 000 nM
 + = 1 000-10 000 nM

Disse resultatene indikerer at forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse er potente nok til å være nyttige som vasodilatorer.

EKSEMPEL 12

Formålet med dette forsøket var å bestemme affinitetene og reseptorbindingssелеktivite-
ten av en forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse for A₁, A_{2A}, A_{2B} og A₃ adenosin-
reseptorer. Molekylær kloning har identifisert og bekreftet eksistensen av fire underty-
per av adenosinreseptorer (AdoRs), betegnet som A₁, A_{2A}, A_{2B} og A₃AdoRs (Linden,
1994). Disse AdoR-undertypene har distinkte anatomiske fordelinger, farmakologiske
egenskaper og fysiologiske funksjoner (Shryock og Belardinelli, 1997). A₁ og A₃AdoRs
kobler til inhibitoriske G-proteiner (G_{i/o}) og reduserer aktiviteten av adenylylcyklase,
mens A_{2A} og A_{2B}AdoRs øker intracellulært cAMP-innhold via kobling til stimulatoriske
G-proteiner (G_s).

Ligander med høy potens og vev/organselektivitet for distinkte adenosinreseptorunder-
typer har terapeutisk og diagnostisk potensiale for en rekke sykdommer (så som aryt-
mier, iskemiske hjertesykdommer, astma og Parkinson's sykdom) og er fokus for be-
tydelig forskningsinnsats både akademisk og industrielt. Det rapporteres her om farma-
kologisk og funksjonell karakterisering av en serie nye adenosinanaloger ifølge forelig-
gende oppfinnelse ved anvendelse av pattedyrcellerlinjer som uttrykker enten endogent
AdoRs eller rekombinant humant AdoRs.

Materialer

Adenosindeaminase ble innkjøpt fra Boehringer Mannheim Biochemicals Indianapolis,
IN, U.S.A). [³H]ZM241385 ble innkjøpt fra Tocris Cookson Ltd. (Langford, Bristol,
England. [³H]CPX var fra New England Nuclear (Boston, MA, U.S.A.). CGS21680,
NECA, R-PIA, Rolipram og HEK-hA_{2A}AR-membraner ble oppnådd fra Sigma-RBI
(Natick, MA). WRC-0470 ble fremstilt som beskrevet i litteraturen (K. Niiya et al., J.
Med. Chem. 35:4557-4561 (1992). Forbindelse 11 ifølge foreliggende oppfinnelse ble
syntetisert som beskrevet ovenfor og fremstilt som en forrådsoppløsning (10 mmol/l) i
DMSO.

Cellekultur og membranpreparering

PC12-celler ble oppnådd fra American Type Culture Collection og dyrket i DMEM med
5% fetalt bovint serum, 10% hesteserum, 0,5 mmol/l L-glutamin, 100 U/ml penicillin,
0,1 mg/ml streptomycin, og 2,5 µg/ml amfotericin. HEK-293-celler som stabilt uttryk-
ker rekombinant humant A_{2B}AdoRs (HEK-hA_{2B}AdoR) ble dyrket i DMEM supplert
med 10% fetalt bovint serum og 0,5 mg/ml G-418. CHOK1-celler som stabilt uttrykker
det rekombinante humane A₁AdoR (CHO-hA₁AdoR) og A₃AdoR (CHO-hA₃AdoR) ble

dyrket som monolag på 150 mm plaskulturskåler i Ham's F-12 medium supplert med 10% bovint serum i nærvær av 0,5 mg/ml G-418. Celler ble dyrket i en atmosfære av 5% CO₂/95% luft holdt ved 37°C.

- 5 For å fremstille membraner, ble celler løsnet fra kulturplatene inn i iskald 50 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 resuspensjon i iskald Tris-HCl-buffer og sentrifugering. Den endelige pelleten ble resuspendert i et lite volum av Tris-HCl, porsjonert og frosset ved -80°C inntil
- 10 den ble anvendt for reseptorbindingsanalyser. Proteinkonsentrasjonen av membransuspensjoner ble bestemt ved anvendelse av Bradford-metoden (Bio-Rad) med bovint serum som standarder.

Kompetisjonsbindingsanalyser

- 15 Kompetisjonsanalyser ble utført for å bestemme affinitetene (K_i) av de følgende umerkede forbindelsene (konkurrerende midler): forbindelser WRC-0470; forbindelse 11 ifølge foreliggende oppfinnelse; NECA; CGS 21680 og R-PIA for A₂AdoRs ([³H]DPCPX-bindings seter på CHO-hA₁AdoR-cellemembraner), A_{2A}-AdoRs ([³H]ZM241385-bindings seter på PC12 og HEK-hA_{2A}Ar-cellemembraner),
- 20 A_{2B}AdoR ([³H]DPCPX-bindings seter på HEK-hA_{2B}-AdoR-cellemembraner) og A₃AdoR ([¹²⁵I]ABMECA-bindings seter på CHO-hA₃AdoR-cellemembran). Membransuspensjoner ble inkubert i 2 timer ved romtemperatur i 50 mmol/l Tris-HCl-buffer (pH 7,4) inneholdende ADA (1 U/ml), Gpp(NH)p (100 µM), radioligand {enten [³H]ZM241385 (-1,5 til 5 nmol/l), [³H]DPCP (~2,5 til 3,0 nmol/l for A₁ og 30 nM for
- 25 A_{2B}) eller [¹²⁵I]ABMECA (1 nM)} og progressivt høyere konsentrasjoner av de konkurrerende midlene. Ved avslutningen av inkuberingen ble bundede og frie radioligander separert ved filtrering gjennom Whatman GF/C-glassfiberfiltere ved anvendelse av en Brandel-vevshøster (Gaithersburg, MD). Triplikatbestemmelser ble utført for hver konsentrasjon av det konkurrerende midlet.

30

Utforming av undersøkelse (protokoller)

- Affiniteten (K_i) av forbindelse 11 ifølge oppfinnelsen for A₁ og A_{2A}-adenosinreseptor ble bestemt ved dens potens for konkurranse for [³H]CPX (A₁) eller [³H]ZM241385 (A_{2A}) bindings seter på membraner avledet fra CHO-hA₁AdoR, PC12 eller HEK-
- 35 HA_{2A}AdoR-celler. R-PIA og CGS21680, agonister som er selektive for hhv. A₁ og A_{2A}, og NECA, en ikke-selektiv AdoR-agonist ble anvendt som kontroller. For å lette sammenligning og unngå komplikasjonen med flere affinitetstilstander på grunn av reseptor

torkobling til G-proteiner, ble kompetisjonsbindingsundersøkelsene utført i nærvær av Gpp (NH) p (100 μ M) for å avkoble reseptorer fra G-proteiner. Affiniteten av valgte forbindelser for A_{2B} og A_3 reseptorer ble bedømt ved deres potenser for konkurranse for [3 H]CPX (A_{2B}) og [125 I]ABMECA (A_3) bindingssteder på membraner avledet fra hhv.

- 5 HEK-h A_{2B} AdoR og CHO-h A_3 AdoRs-celler.

Den funksjonelle potensen og selektiviteten av disse legemidlene for A_{2A} vs. A_{2B} AdoRs ble bedømt ved å bestemme deres effekter på A_{2A} eller A_{2B} -formidlet cAMP-akkumulering i hhv. PC 12 og HEK-293 celler. I disse forsøkene ble CGS21680 og

- 10 NECA anvendt som positive kontroller.

Resultater

Affiniteten (K_i) av WRC-0470 og forbindelse 11 ifølge foreliggende oppfinnelse for human A_1 , rotte og human A_{2A} AdoRs, som bestemt ved kompetisjonsbindingsundersø-

15 kelser er sammenfattet i tabell 6 nedenfor. Alle forbindelser viser moderat selektivitet for human A_{2A} vs. A_1 reseptor. Videre reduserte forbindelse 16 (N-Py), ved en konsentrasjon på 10 μ M, den spesifikke bindingen av [3 H]CPX (HEK-h A_{2B} AdoR) eller [125 I]ABMECA (CHO-h A_3 AdoR) ved hhv. 20% og 22%.

- 20 **TABELL 6 - Bindingsaffiniteter av adenosinreseptoragonister for A_{2A} AdoRs og A_1 AdoRs K_i /nmol/l ($pK_i \pm$ SEM)**

	HEK-h A_{2A} AR-celler		CHO-h A_1 AR	
	Bindingsaffinitet	n	Bindingsaffinitet	n
Forbindelse 11	305 (6,52 $\pm$ 0,04) [0,75 $\pm$ 0,09]	6	866 (6,07 $\pm$ 0,05) [0,87 $\pm$ 0,07]	3
WRC-0470	272 (6,55 $\pm$ 0,04) [0,83 $\pm$ 0,07]	6	7278 (5,16 $\pm$ 0,09) [1,13 $\pm$ 0,21]	3
NECA	360 (6,45 $\pm$ 0,06) [0,83 $\pm$ 0,08]	3	328 (6,49 $\pm$ 0,06) [0,88 $\pm$ 0,03]	3
R-PIA	1656 (5,78 $\pm$ 0,02) [1,05 $\pm$ 0,02]	3	477 (6,35 $\pm$ 0,11) [1,03 $\pm$ 0,08]	3

Resultatene av dette forsøket viser at forbindelse 11 er en høyaffinitets A_{2A} -agonist.

EKSEMPEL 13

Formålet med dette eksemplet var å karakterisere de farmakologiske effektene av A_{2A} AdoR-agonister ifølge foreliggende oppfinnelse på koronar arteriekonduktans. Nærmere bestemt ble forsøket utformet for å bestemme potensen av forbindelse 11 ifølge oppfinnelsen og å sammenligne dens potens med den av adenosin og andre valgte A_{2A} AdoR-agonister.

I hjertet formidler A_{2A} -adenosinreseptoren den koronare vasodilateringen forårsaket ved adenosin, mens A_1 -reseptoren formidler de hjerteundertrykkende virkningene av adenosin, så som de negative kronotropiske og dromotropiske (AV-blokk) effektene.

Flere potente og selektive ligander, både agonister og antagonister, for A_1 og A_{2A} AdoRs er syntetisert. I hjertet har agonister av A_1 AdoRs vært foreslått som nyttige som antiarytmiske midler, mens agonister av A_{2A} AdoRs utvikles for selektiv koronar vasodilatering.

En serie av adenosinderivater målrettet for selektiv aktivering av A_{2A} -adenosinreseptor (A_{2A} AdoR) ble syntetisert for det formål å utvikle koronare vasodilatorer. Nærmere bestemt rapporteres i denne undersøkelsen effekten av en serie nye A_{2A} AdoR-agonister på koronar arteriekonduktans (vasodilatering) i rotte og marsvin isolerte perfuserte hjerter.

Materialer

Rotter (Sprague Dawley) og marsvin (Hartley) ble innkjøpt fra hhv. Simonsen og Charles Rivers. WRC-0470 ble fremstilt som beskrevet i litteraturen (K. Niiya et al., J. Med. Chem. 35:4557-4561 (1992)). Forbindelse 11 ifølge foreliggende oppfinnelse ble fremstilt som beskrevet ovenfor. CGS 21680 (porsjon nr. 89H4607) og adenosin (porsjon nr. 123HO94) ble innkjøpt fra Sigma. Krebs-Henseleit-oppløsning ble fremstilt i henhold til standard metoder og 0,9% saltvannsoppløsning ble innkjøpt fra McGraw, Inc. (porsjon nr. J8B246).

Fremgangsmåter

Voksne Sprague Dawley rotter og Hartley marsvin av begge kjønn med vekt fra hhv. 230 til 260 g og 300 til 350 g, ble anvendt i foreliggende undersøkelse. Dyrene ble bedøvet ved peritoneal injeksjon av en blanding inneholdende ketamin og xylazin (ketamin 100 mg, xylazin 20 mg/ml). Brystet ble åpnet og hjertet raskt fjernet. Hjertet ble kort rensset i iskald Krebs-Henseleit-oppløsning (se nedenfor), og aorta kannulert. Hjer-

tet ble deretter perfusert ved en strømningshastighet på 10 ml/min. med modifisert Krebs-Henseleit (K-H) oppløsning inneholdende NaCl 117,9, KCl 4,5, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,18, KH₂PO₄ 1-18, pyruvat 2,0 mmol/l. K-H-oppløsningen (pH 7,4) ble gassbehandlet kontinuerlig med 95% O₂ og 5% CO₂ og oppvarmet til 35 ± 0,50°C. Hjertet ble elektrisk "paced" ved en fiksert sykluslengde på 340 ms (250 slag/min.) ved å anvende en bipolar elektrode plassert på venstre atrium. De elektriske stimuli ble generert ved hjelp av en Grass-stimulator (modell S48, W. Warwick, RI) og avlevert gjennom en Stimuli Isolation Unit (modell SIU5, Astro-Med, Inc., NY) som firkantbølgepulser av 3 msek. varighet og amplitude på minst det dobbelte av terskelintensiteten.

10

Koronart perfusjonstrykk (CPP) ble målt ved å anvende en trykktransduser, forbundet til den aortiske kanylen via et T-forbindelsesledd posisjonert ca. 3 cm over hjertet. Koronart perfusjonstrykk ble overvåket gjennom forsøket og registrert enten på en skriver (Gould Recorder 2200S) eller på et datamaskinassisert registreringssystem (Power-Lab/4S, ADInstruments Pty Ltd., Australia). Bare hjerter med CPP varierende fra 60 til 85 mm/Hg (i fravær av legemidler) ble anvendt i undersøkelsen. Koronar konduktans (i ml/min./mmHg) ble beregnet som forholdet mellom koronar perfusjonsrate (10 ml/min.) og koronart perfusjonstrykk.

I forsøk hvori A₁-adenosinreseptorformidlet negativ dromotropisk effekt ble målt, ble arterielle og ventrikulære overflateelektrogrammer registrert under konstant arteriell "pacing". Effekten av forskjellige adenosinreseptoragonister på artrioventrikulær ledningstid ble bestemt som beskrevet av Jenkins og Bellardinelli, *Circ. Res.* 63:97-116 (1988).

25

Forrådsoppløsninger av forbindelsen ifølge oppfinnelsen (5 mM) og CGS 21680 (5 mM) ble fremstilt i dimetylsulfoksyd (DMSO); innkjøp fra Aldrich, PS 04253MS. En forrådsoppløsning av adenosin (1 mg/ml) ble fremstilt i saltvannsoppløsning. En konsentrasjon ble fremstilt fra forrådsoppløsningen ved fortynning i saltvann for å gi oppløsning av enten 2x10⁻⁴ eller 2x10⁻⁵ M. Disse oppløsningene ble injisert i perfusjonsrøret av apparaturen som boluser på 20 µl. I noen forsøk ble oppløsningene plassert i en 30 ml glassprøyte og legemidlene ble infusert ved rater nødvendig for å oppnå de ønskede perfusatkonsentrasjonene (f.eks. 10, 100 nM, osv.).

35 Koronar vasodilatering av A_{2A}-adenosinreseptoragonister

Konsentrasjon-responsrelasjoner for effekten av forbindelse 11 ifølge foreliggende oppfinnelse (0,1 til 400 nM) og CGS21680 (0,1 til 10 nM) for å øke koronar konduktans ble

oppnådd. Etter at kontrollmålinger av koronart perfusjonstrykk var registrert, ble gradvis høyere konsentrasjoner av adenosinreseptoragonistene administrert inntil maksimal koronar vasodilatering var observert. Responsene ved stasjonær tilstand på hver konsentrasjon av adenosinreseptoragonister ble registrert. I hvert hjerte av disse seriene (4
5 til 6 hjerter for hver agonist) ble bare en agonist og en konsentrasjon-responsrelasjon oppnådd.

For å bestemme hvilken adenosinreseptorundertype (A_1 eller A_{2A}) som formidler den koronare vasodilateringen forårsaket ved forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse
10 ble det anvendt hhv. A_1 og A_{2A} adenosinreseptorantagonister CPX og ZM241385. Hjerter ($n = 6$) ble eksponert mot forbindelsen som ble testet (10 nM) og etter at effekten av denne agonisten hadde nådd stasjonær tilstand ble først CPX (60 nM) og deretter ZM241385 tilsatt til perfusatet og endringene i CPP ble registrert.

15 I isolerte, perfuserte hjerter ($n = 36$ rotter og 18 marsvin) "paced" ved konstant arteriell sykluslengde på 340 msek., forårsaket adenosin, CGS21680, WRC0470 og forbindelse 11 ifølge foreliggende oppfinnelse en konsentrasjonsavhengig økning i koronar konduk-
tans. CGS21680, WRC0470 og forbindelse 11 var alle mer potente agonister enn adenosin.

20

EKSEMPEL 14

Foreliggende oppfinnelse ble utformet for å teste hypotesen at det er en invers relasjon mellom affiniteten (K_i eller pK_i) og virkningsvarigheten av A_{2A} -adenosinreseptorer (AdoR). Nærmere bestemt er formålene med undersøkelsen å bestemme relasjonen mel-
25 lom varigheten av koronar vasodilatering forårsaket av en valgt serie av høy og lav affinitets A_{2A} AdoR-agonister i isolerte rottehjerter og bedøvede griser; og affiniteten av disse agonistene for A_{2A} AdoRs i svinestriatum.

Materialer:

30 Rotter (Sprague Dawley) ble innkjøpt fra Simonsen. Gårdsgriser ble oppnådd fra Division of Laboratory Animal Resources, University of Kentucky. Forbindelser 11, 12 og 14 ifølge foreliggende oppfinnelse ble fremstilt som beskrevet i fremgangsmåten ovenfor. YT-0146 ble fremstilt som beskrevet i U.S. patent nr. 4,956,345. WRC-0470 ble fremstilt som beskrevet i litteraturen (K. Niiya et al., J. Med. Chem. 35:4557-4561
35 (1992). CGS21680 ble innkjøpt fra Research Biochemicals, Inc. og Sigma og R-PIA (porsjon nr. WY-V-23) ble innkjøpt fra Research Biochemicals, Inc. HENECA var en gave fra professor Gloria Cristalli ved University of Camerino, Italia.

Bedøvelsesmidler:

Ketamin ble innkjøpt fra Fort Dodge Animal Health. Xylasin ble innkjøpt fra Bayer. Natriumpentobarbital ble innkjøpt fra The Butler Co. Fenylefrin ble innkjøpt fra Sigma. 5 DMSO ble innkjøpt fra Sigma og American Tissue Type Collections. Krebs-Henseleit-oppløsning ble fremstilt i henhold til standard fremgangsmåter og 0,9% saltvannsoppløsning ble innkjøpt fra McGraw, Inc.

Preparering av isolerte perfuserte hjerter fra rotter

- 10 Voksne Sprague Dawley-rotter av begge kjønn med vekt fra 230 til 260 g ble anvendt i denne undersøkelsen. Dyr ble bedøvet ved peritoneal injeksjon av en blanding inneholdende ketamin og xylazin (ketamin 100 mg, xylazin 20 mg/ml). Brystet ble åpnet og hjertet raskt fjernet. Hjertet ble kort renset i iskald Krebs-Henseleit-oppløsning (se nedenfor) og aorta ble kannulert. Hjertet ble deretter perfusert ved en strømningshastighet 15 på 10 ml/min. med modifisert Krebs-Henseleit (K-H) oppløsning inneholdende NaCl 117,9, KCl 4,5, CaCl 2,5, MgSO₄ 1,18, KH₂PO₄ 1,18, pyruvat 2,0 mmol/l. K-H-oppløsningen (pH 7,4) ble gassbehandlet kontinuerlig med 95% O₂ og 5% CO₂ og oppvarmet til 35 ± 0,50°C. Hjertet ble elektrisk "paced" ved en fastsatt sykluslengde på 340 ms (250 slag/min.) ved å anvende en bipolar elektrode plassert på venstre atrium. De 20 elektriske stimuli ble generert ved hjelp av en Grass-stimulator (Modell S48, W. Warwick, RI) og avlevert gjennom en Stimuli Isolation Unit (modell SIU5, Astro-Med, Inc., NY) som en kvadratbølgepuls av 3 msek. varighet og amplitude på minst det dobbelte av terskelintensiteten.
- 25 Koronart perfusjonstrykk (CPP) ble målt ved å anvende en trykktransduser, forbundet til den aortiske kanylen via et T-forbindelsesledd anbragt ca. 3 cm over hjertet. Koronart perfusjonstrykk ble overvåket gjennom forsøket og registrert enten på en skriver (Gould Recorder 2200S) eller på et datamaskinassistert registreringssystem (PowerLab/4S, ADInstruments Pty Ltd., Australia). Bare hjerter med CPP varierende fra 60 til 85 30 mmHg (i fravær av legemidler) ble anvendt i undersøkelsen. Koronar konduktans (i ml/min./mmHg) ble beregnet som forholdet mellom koronar perfusjonsrate (10 ml/min.) og koronart perfusjonstrykk.

Isolerte perfunderte hjerter

For å bestemme varigheten av den A_{2A} -adenosinreseptorformidlede koronare vasodilateringen forårsaket av adenosin og adenosinreseptoragonister, ble agonistene administrert intravenøst ved bolusinjeksjon. I hvert hjerte av denne serien (3 til 11 hjerter for hver agonist), ble boluser av adenosin ($20 \mu\text{l}$, $2 \times 10^{-4} \text{M}$), forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse (20 til $40 \mu\text{l}$, $2 \times 10^{-5} \text{M}$) og andre adenosinreseptoragonister injisert i perfusjonsrøret. Tidene til 50% ($t 0,5$) og 90% ($t 0,9$) reversjon av reduksjonen i CPP ble målt. Hvert hjerte ble eksponert mot maksimalt tre vasodilateringer.

10 Relasjon mellom affinitet av forskjellige agonister for A_{2A} -adenosinreseptor og reversjonstiden av deres effekt for å øke koronar konduktans:

Disse forsøkene ble utført for å etablere relasjonen mellom affinitetene av de forskjellige agonistene for A_{2A} -adenosinreseptor og varigheten av deres respektive effekt på koronar konduktans. Boluser av forskjellige agonister ble injisert i perfusjonsrøret av isolerte perfunderte hjerter fra rotte ($n = 4$ til 6 for hver agonist) og tiden til 90% ($t 0,9$) reversjon av reduksjonen i CPP ble målt. Affinitetene av de forskjellige agonistene for A_{2A} -adenosinreseptor ble bestemt i svinestriatummembraner ved å anvende en radioligandbindingsanalyse, som beskrevet ovenfor. Reversjonstiden ($t 0,9$) av reduksjonen i CPP ble avsatt som funksjon av deres affiniteter (pK_i) for A_{2A} -adenosinreseptoren.

20

Resultater

Adenosin, forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse og andre adenosinderivater ble tilført som boluser i perfusjonsrøret ved konsentrasjoner som forårsaker lik eller tilnærmet lik økning i koronar konduktans. Selv om adenosin og agonistene forårsaket like maksimale økninger i koronar konduktans, var varigheten av deres effekt markert forskjellig. Varigheten av effekten av adenosin. Varigheten av effekten av forbindelser 11, 12 og 14 falt innenfor midten av gruppen av forbindelsen testet, mens den av CGS21680 og WRC0470 var lengst. Varighetene av den koronare vasodilateringen forårsaket av adenosin, forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse og andre agonister målt som tiden til 50% og 90% (hhv. $t 0,5$ og $t 0,9$) reversjon av økningene i koronar konduktans er sammenfattet i tabell 7, nedenfor.

30

Tabell 7 - Reversjonstid for koronar vasodilatering ved adenosin og adenosinreseptoragonister i isolerte perfunderte rottehjerter

Agonist	<i>t</i> 0,5 (min.)	<i>t</i> 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 11	17,5 ± 1,2	23,2 ± 2,1	4
Forbindelse 14	16,1 ± 0,1	21,8 ± 2,0	3
WRC-0470	21,9 ± 0,9	27,9 ± 1,4	6
Forbindelse 12	16,7 ± 0,5	25,6 ± 2,3	3

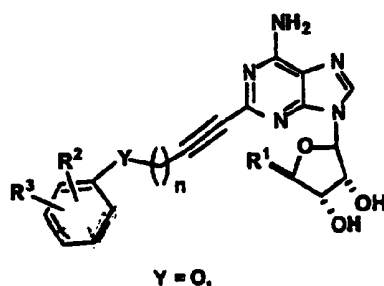
- 5 Tid (i minutter) til 50% og 90% (hhv. *t* 0,5 og *t* 0,9) reversjon av økningene i koronar konduktans forårsaket ved adenosin og adenosinreseptoragonister. Verdier er middelverdiene ± SEM av enkeltbestemmelser i hvert av preparatene (n).

- 10 Reversjonstiden av koronar vasodilatering var avhengig av affiniteten av adenosinderivatene for hjernestriatum A_{2A}-reseptorer. Det var en signifikant ($P < 0,05$) invers relasjon ($r = 0,87$) mellom affiniteten (PK_i) av agonistene for A_{2A}AdoR og reversjonstiden (*t* 0,9) av den koronare vasodilateringen forårsaket av de samme agonistene.

P a t e n t k r a v

1.

Forbindelse av formelen:



5

hvor $n = 1$ eller 2 ; $Y = O,$

10

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

R^2 og R^3 er hver individuelt valgt fra gruppen bestående av hydrogen, halogen, CF_3 , CN , C_{1-6} alkyl, C_{1-6} alkoksy, fenyl, fenyl- C_{1-4} alkyl eller R^2 og R^3 danner sammen en C_{1-3} -alkylendioksygruppe.

15

2.

Forbindelse ifølge krav 1, hvor R^2 og R^3 individuelt er valgt fra gruppen bestående av hydrogen, halogen, CF_3 , CN , C_{1-6} alkyl, fenyl eller fenyl- C_{1-4} -alkyl.

20

3.

Forbindelse ifølge krav 2, hvor minst en substituent valgt fra gruppen bestående av R^2 og R^3 er hydrogen.

4.

25

Forbindelse ifølge krav 2, hvor minst to substituenten valgt fra gruppen bestående av R^2 og R^3 er hydrogen.

5.

Forbindelse ifølge krav 1, hvor R^2 og R^3 hver individuelt er valgt fra gruppen bestående av hydrogen, halogen, CF_3 , CN og C_{1-4} alkyl.

5 6.

Forbindelse ifølge krav 1, hvor R^2 og R^3 hver individuelt er valgt fra gruppen bestående av hydrogen, halogen, CF_3 , CN, C_{1-4} alkyl og fenyl.

7.

10 Forbindelse ifølge krav 1, hvor R^2 og R^3 hver individuelt er valgt fra gruppen bestående av hydrogen, CN og C_{1-4} alkyl.

8.

Forbindelse ifølge krav 1, hvor forbindelsene er valgt fra gruppen bestående av

15 (4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[3-(2-fenylfenoksy)prop-1-ynyl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol,
 (4S,2R,3R,5R)-2-[6-amino-2-(3-fenoksyprop-1-ynyl)purin-9-yl]-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol,
 4-{3-[9-[(4S,2R,3R,5R)-3,4-dihydroksy-5-(hydroksymetyl)oksolan-2-yl]-6-aminopurin-
 20 2-yl] prop-2-ynyloksy)benzenkarbonitril,
 (4S,2R,3R,5R)-2-{6-amino-2-[3-(4-fenylfenoksy)prop-1-ynyl]purin-9-yl}-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol,
 (4S,2R,3R,5R)-2-(6-amino-2-{3-[2-benzylfenoksy]prop-1-ynyl}purin-9-yl)-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol,
 25 2-[2-(3-(2H-benzo[2,3-d]1,3-dioksolen-4-yloksy)prop-1-ynyl)-6-aminopurin-9-yl](4S,2R,3R,5R)-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol,
 (4S,2R,3R,5R)-2-(6-amino-2-{3-[3,5-bis(tert-butyl)fenoksy]prop-1-ynyl}purin-9-yl)-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol,
 og blandinger derav.

30

9.

Anvendelse av en forbindelse ifølge krav 1 for fremstilling av et farmasøytisk preparat for å stimulere koronar vasodilatering i et pattedyr.

10.

Anvendelse ifølge krav 9, hvor det farmasøytiske preparatet er for administrering av en terapeutisk effektiv mengde av forbindelsen ifølge krav 1 varierende fra ca. 0,01 til ca 100 mg/kg vekt av pattedyret.

5

11.

Anvendelse ifølge krav 10, hvor pattedyret er et menneske.

12.

10 Farmasøytisk preparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter forbindelsen ifølge krav 1 og ett eller flere farmasøytiske hjelpestoffer.

13.

15 Farmasøytisk preparat ifølge krav 12, k a r a k t e r i s e r t v e d at preparatet er i form av en oppløsning.

14.

20 Farmasøytisk preparat ifølge krav 12, k a r a k t e r i s e r t v e d at preparatet er nyttig som et anti-inflammatorisk middel, i adjunktiv terapi med angioplasti, som en plateaggregeringsinhibitor, og som en inhibitor av plate og neutrofil aktivering.

15.

25 Farmasøytisk preparat ifølge krav 12, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et promedikament av en forbindelse ifølge krav 1.