

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2008118995/15, 10.10.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
10.10.2006

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
14.10.2005 ES P200502545

(43) Дата публикации заявки: 20.11.2009 Бюл. № 32

(45) Опубликовано: 20.03.2012 Бюл. № 8

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: Bertolet BD et al. Myocardial infarction related atrial fibrillation: role of endogenous adenosine. Heart. 1997 Jul; 78(1):88-90. Yasui K et al. Theophylline induces neutrophil apoptosis through adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonism. J Leukoc Biol. 2000 Apr;67(4): 529-35. US 4772607 A, 20.09.1988. Vu CB et al. Novel diamino derivatives of (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 14.05.2008

(86) Заявка РСТ:  
ES 2006/000564 (10.10.2006)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2007/045705 (26.04.2007)

Адрес для переписки:  
127055, Москва, а/я 11, пат.п.ов.  
Н.К.Попеленскому, рег. № 31

(72) Автор(ы):

ЛЬЮИС БИСЕТ Кармен (ES),  
МЮЛЛЕР Криста (DE),  
СИНКА КУСКУЛЬОЛА Хоан (ES),  
СИРУЭЛА АЛЬФЕРЕС Франсиско (ES),  
ФРАНКО ФЕРНАНДЕС Рафаэль (ES),  
ХОВЕ-МАДСЕН Леиф (ES)

(73) Патентообладатель(и):

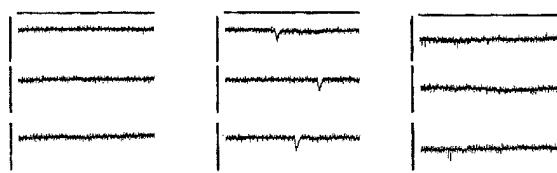
ПРОЕКТО ДЕ БИОМЕДИСИНА СИМА,  
С.Л. (ES)

(54) СЕЛЕКТИВНЫЕ АНТАГОНИСТЫ АДЕНОЗИНОВОГО РЕЦЕПТОРА A<sub>2A</sub> ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ФИБРИЛЛЯЦИИ ПРЕДСЕРДИЙ

(57) Реферат:

Предложено применение селективных антагонистов аденозинового рецептора A<sub>2A</sub> для получения лекарственных препаратов для лечения фибрилляции предсердий у млекопитающих, включая человека. Обнаружено, что аденозиновый рецептор A<sub>2A</sub> предсердных кардиомиоцитов участвует в патологических механизмах, лежащих в основе

фибрилляции предсердий. Преимущество применения селективных антагонистов A<sub>2A</sub> (ZM214385, H-89, SCH58261) относительно других агентов состоит в том, что антагонисты A<sub>2A</sub> специфически направлены на пациентов с фибрилляцией предсердий: снижают повышенную частоту волн кальция при их фибрилляции, т.е. участвуют в электрическом ремоделировании предсердия в состоянии



Фиг. 6

(56) (продолжение):

[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazine as potent and selective adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonists. J Med Chem. 2005 Mar 24; 48(6):2009-18. Реферат [on line] [найдено 26.05.2010] Найдено из PubMed PMID: 15771443. US 5998387 A, 07.12.1999. EP 1308441 A1, 07.05.2003. ЭНЦИКЛОПЕДИЯ ЛЕКАРСТВ РЛС 2001 с.846 статья «Теофиллин».

R U 2 4 4 5 0 9 9 C 2

R U 2 4 4 5 0 9 9 C 2

R U 2 4 4 5 0 9 9 C 2

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) RU (11) 2 445 099 (13) C2

(51) Int. Cl.

**A61K 31/522** (2006.01)  
**A61K 31/52** (2006.01)  
**A61K 31/498** (2006.01)  
**A61K 31/519** (2006.01)  
**A61K 31/53** (2006.01)  
**A61K 31/42** (2006.01)  
**A61K 31/4709** (2006.01)  
**A61P 9/06** (2006.01)

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2008118995/15, 10.10.2006

(24) Effective date for property rights:  
10.10.2006

Priority:

(30) Priority:  
14.10.2005 ES P200502545

(43) Application published: 20.11.2009 Bull. 32

(45) Date of publication: 20.03.2012 Bull. 8

(85) Commencement of national phase: 14.05.2008

(86) PCT application:  
ES 2006/000564 (10.10.2006)

(87) PCT publication:  
WO 2007/045705 (26.04.2007)

Mail address:

127055, Moskva, a/ja 11, pat.pov.  
N.K.Popelenskomu, reg. № 31

(72) Inventor(s):

L'JuIS BISET Karmen (ES),  
MJuLLER Krista (DE),  
SINKA KUSKUL'OLA Khoan (ES),  
SIRUEhLA AL'FERES Fransisko (ES),  
FRANKO FERNANDES Rafaehl' (ES),  
KhOVE-MADSEN Leif (ES)

(73) Proprietor(s):

PROEKTO DE BIOMEDISINA SIMA, S.L. (ES)

## (54) SELECTIVE ADENOSINE A<sub>2A</sub> RECEPTOR ANTAGONISTS FOR PREPARING DRUG FOR ATRIAL FIBRILLATION

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceutics.

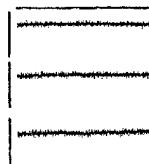
SUBSTANCE: what is offered is applying selective adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonists for preparing drugs for atrial fibrillation in mammals including a human. It has been found that adenosine A<sub>2A</sub> receptor of atrial cardiac myocytes is involved in pathological mechanisms underlying atrial fibrillation.

EFFECT: A<sub>2A</sub> antagonists (≥M214385, H-89, SCH58261) specifically aim at the patients with atrial fibrillation: they reduce high calcium group

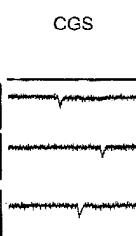
frequency in fibrillation, ie are involved in electric remodelling of fibrillating atrium.

11 cl, 9 dwg

Контроль



CGS



ZM + CGS



Фиг. 6

Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение относится к области медицины и ветеринарии и, в частности, к соединениям, предназначенным для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, в особенности для лечения фибрилляции предсердий.

Уровень техники

Фибрилляция предсердий является наиболее распространенным типом сердечной аритмии и она связана со значительным уровнем заболеваемости и смертности. Ее частота и распространение увеличиваются и она представляет собой возрастающую клиническую и экономическую нагрузку (в настоящее время распространение составляет 2% в популяции в целом). В дополнение к тяжелым клиническим симптомам, например учащенному сердцебиению, головокружению, одышке и др., фибрилляция предсердий является единственным наиболее важным фактором, приводящим к ишемическому инсульту в популяции в возрасте старше 75 лет. В целом фибрилляция предсердий является причиной более 5% госпитализаций вследствие сердечно-сосудистых заболеваний. Примерно 90% случаев фибрилляции предсердий происходит при наличии других сердечных заболеваний, таких как гипертоническая болезнь сердца, застойная сердечная недостаточность или болезни сердечных клапанов. Только в 10% случаев фибрилляция предсердий все-таки развивается в отсутствии сердечных патологий ("одинокая" фибрилляция предсердий). Различают три формы фибрилляции предсердий: (1) пароксизмальная фибрилляция предсердий, характеризующая самоограниченные эпизоды фибрилляции предсердий с длительностью, которая варьирует от секунд до дней; (2) неограниченная фибрилляция предсердий, которая продолжается неограниченное время, пока ее не останавливают посредством медицинских вмешательств; (3) постоянная фибрилляция предсердий, которую не удается остановить фармакологической или электрической кардиоверсией.

Исследования показали, что фибрилляция предсердий происходит в результате множества возвратных электрических волн малой амплитуды, которые двигаются случайным образом вокруг предсердия. Данные волны малой амплитуды инициируются электрическими импульсами, обычно в устьях миокарда, продолжающихся от левого предсердия до проксимальных частей легочных вен длиной 5-6 см. После начала фибрилляции в предсердиях возникают изменения (ремоделирование предсердий), которые воздействуют на их электрические, механические и метаболические свойства, ответственные за продолжительность аритмии. Регулирование скорости сокращений желудочков при наличии фибрилляции предсердий повышается, а если регулирование скорости не может быть понижено посредством лечения, происходит дилатация желудочков и нарушение систолической функции, которую обычно называют тахикардиомиопатией. Инсульт и тромбоэмболия являются основной причиной смертности и заболеваемости и связаны с фибрилляцией предсердий; лежащая в основе этиологии патофизиологическая база данного явления представляет собой протромботическое состояние или состояние гиперкоагуляции в сочетании с патологиями кровотока (например, предсердный стаз) и эндотелиальным или эндокардиальным повреждением.

Как и в других узких направлениях кардиологии, за последние сорок лет достигнут большой прогресс в развитии диагностики и лечения сердечных аритмий. Несмотря на многие достижения, действительное излечение сердечных аритмий и предупреждение внезапной смерти от аритмии осуществлено у меньшинства

пациентов. В наши дни лечение фибрилляции предсердий охватывает уменьшение симптомов, связанных с фибрилляцией предсердий, предупреждение тромбоэмбологических осложнений и прекращение аритмии соответствующим образом.

5 В общем, существует два подхода в лечении фибрилляции предсердий: (а) лечение самой аритмии и (б) снижение риска тромбоэмбологического события (см. M.B.Iqbal et al., "Recent developments in atrial fibrillation" (Современные исследования в области фибрилляции предсердий), British Medical Journal, 2005, т.330, стр.238-43). Лечение

10 аритмии охватывает регуляцию ритма (восстановление и поддержание синусового ритма) и регуляцию частоты сердечных сокращений. Фармакологически регуляцию ритма и частоты сердечных сокращений осуществляют антиаритмическими лекарственными препаратами (антиаритмические агенты класса I и класса III).

15 Примерами данных препаратов, которые используют в настоящее время, являются флекаинид, пропафенон, амиодарон, дофетилид, ибutilид и сotalол.

Нефармакологически регуляцию ритма и частоты сердечных сокращений осуществляют с помощью электрической кардиоверсии, предсердной электрокардиостимуляции, имплантируемого предсердного дефибриллятора, 20 высокочастотного катетерного удаления и комплексной хирургической процедуры.

Уменьшение риска тромбоэмболии и таким образом предупреждение инсульта имеет большую важность в стратегии лечения. Фармакологически аспирин и 25 варфарин рекомендуют большинству пациентов для предупреждения образования предсердного тромба и тромбоэмбологических событий. Объединенные данные исследований на пациентах из группы высокого риска показывают, что варфарин действует лучше, чем аспирин, в плане предупреждения инсультов, но риск

30 обширного кровотечения при приеме варфарина в два раза выше, чем при приеме аспирина. Во всяком случае противовертикающее лечение необходимо подбирать индивидуально на основе возраста, сопутствующих заболеваний и противопоказаний. Нефармакологически снижение риска тромбоэмбологического события в настоящее время осуществляют путем удаления отростка левого предсердия или с использованием катетера (способ находится на стадии исследования).

35 Настоящее исследование выдвигает на первый план новые подходы как к фармакологической, так и нефармакологической стратегиям лечения. Наиболее перспективными агентами являются ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) и лекарственные препараты, блокирующие рецептор ангиотензина II. Ингибиторы протеазы, фосфатазы достаточной избирательности и специфичности или антиоксиданты могут также дать новые терапевтические 40 стратегии уменьшения или обратного развития структурных изменений, дилатации предсердий и сократительной дисфункции. Однако проблема лечения фибрилляции предсердий еще далека от удовлетворительного решения.

45 Раскрытие изобретения

Авторы обнаружили, что хорошо известная группа фармацевтических соединений, а именно антагонисты аденоzinового рецептора A<sub>2A</sub>, эффективны для получения лекарственных средств против фибрилляции предсердий у млекопитающих, в том числе человека.

50 Изобретение происходит из неожиданного обнаружения того факта, что аденоzinовый receptor A<sub>2A</sub> присутствует в кардиомиоцитах предсердий человека и участвует в патологических механизмах, лежащих в основе фибрилляции предсердий.

В частности, авторы обнаружили, что экспрессия гомодимерного аденоzinового рецептора  $A_{2A}$ , представляющего собой функциональный вид в плазматической мембране, повышающим образом регулируется у пациентов с фибрилляцией предсердий. Электрофизиологические эксперименты показали, что активация аденоzinового рецептора  $A_{2A}$  в миоцитах предсердий, взятых у данных пациентов, приводит к опосредованному протеинкиназой А повышению спонтанного высвобождения кальция из саркоплазматической сети, измеряемому как волны кальция.

Более того, используя два различных экспериментальных подхода (конфокальную визуализацию кальция и метод пэтч-кламп), авторы обнаружили, что антагонисты аденоzinового рецептора  $A_{2A}$  снижают повышенную частоту волн кальция при фибрилляции предсердий. В самом деле, антагонисты аденоzinового рецептора  $A_{2A}$  не только реверсируют стимулирующий эффект агонистов на волны кальция, но также снижают исходную частоту волн кальция. Вместе взятые данные результаты позволяют предположить, что опосредованное аденоzinовым рецептором  $A_{2A}$  нарушение регуляции потоков внутриклеточного кальция участвует в комплексном электрическом ремоделировании предсердия в состоянии фибрилляции. Данные факты позволяют включить антагонисты аденоzinового рецептора в избирательные терапевтические агенты для лечения фибрилляции предсердий.

Ранее и в качестве наиболее близкого научного исследования авторы описали только, что миоциты, выделенные из правого предсердия у пациентов с эпизодами фибрилляции предсердий, демонстрируют более частое спонтанное высвобождение  $Ca^{2+}$  из саркоплазматической сети, чем миоциты пациентов, не имеющих аритмии (см. статью L.Hove-Madsen et al., "Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes" (Фибрилляция предсердий ассоциирована с повышенным уровнем спонтанного высвобождения кальция из саркоплазматической сети в предсердных миоцитах человека), Circulation 2004, сентябрь, стр.1358-63).

Соответственно настоящее изобретение относится к применению антагониста аденоzinового рецептора  $A_{2A}$  для получения лекарственного средства для предупреждения и/или лечения фибрилляции предсердий у млекопитающего, в том числе человека. В дальнейшем "антагонист аденоzinового рецептора  $A_{2A}$ " будут называть "антагонист  $A_{2A}$ " и "аденоzinовый рецептор  $A_{2A}$ " - "рецептор  $A_{2A}$ ".  
Данный аспект изобретения можно альтернативно сформулировать как способ предупреждения и/или лечения фибрилляции предсердий с помощью антагонистического действия в отношении рецепторов  $A_{2A}$ , который заключается во введении нуждающемуся в этом млекопитающему (предпочтительно человеку) эффективного количества антагониста  $A_{2A}$  вместе с соответствующими количествами приемлемых разбавителей или носителей.

Преимущество использования антагонистов  $A_{2A}$  относительно других агентов, используемых в области техники, состоит в том, что антагонисты  $A_{2A}$  специфически направлены на пациентов с фибрилляцией предсердий. Таким образом экспрессия функциональных димерных рецепторов  $A_{2A}$  находится на низком уровне у пациентов с нормальным размером предсердий и без фибрилляции предсердий в анамнезе, тогда как экспрессия рецептора димерного типа в сильной степени повышающим образом регулируется у пациентов с фибрилляцией предсердий. Напротив, другие агенты, используемые в настоящее время, действуют более широко на рецепторы

или каналы, которые важным образом регулируют многочисленные функции в множестве клеток. Так, антагонисты кальция не только снижают переизбыток кальция путем ингибирования кальциевых каналов L-типа, но также снижают сократительную способность сердца. Более того, ток кальция L-типа также регулирует функцию гладкой мускулатуры и секреторных клеток, что обуславливает нежелательные побочные эффекты антагонистов кальция.

### Рецептор $A_{2A}$

Аденозин представляет собой пуриновый нуклеозид, образуемый всеми

10 метаболически активными клетками организма. Аденозин проявляет свое действие через четыре идентифицированных подтипа поверхностных клеточных рецепторов:  $A_1$   $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  и  $A_3$ , которые принадлежат к суперсемейству рецепторов, связанных с G белком.  $A_1$  и  $A_3$  связаны с ингибирующим G белком, тогда как  $A_{2A}$  и  $A_{2B}$  связаны со стимулирующим G белком. Рецепторы  $A_{2A}$  в основном обнаруживаются в головном 15 мозге, как в нейронах, так и в клетках глии (максимальный уровень в полосатом теле и прилежащем ядре, от среднего до высокого уровня - в обонятельной луковице и гипоталамусе и на участках гиппокампа). В полосатом теле рецептор регулирует высвобождение и функцию нейромедиаторов (см. статью H.Kase et al. "Progress in 20 pursuit of therapeutic  $A_{2A}$  antagonists: the adenosine  $A_{2A}$  receptor selective antagonist KW 6002: research and development toward a novel nondopaminergic therapy for Parkinson's disease" (Достижения в изыскании терапевтических антагонистов  $A_{2A}$ , избирательный антагонист аденозинового рецептора  $A_{2A}$  KW 6002 - поиск и подход к новому 25 недопаминергическому препарату для лечения болезни Паркинсона), Neurology 2003, т.61, стр.97-100). Известно, что в периферических тканях рецепторы  $A_{2A}$  присутствуют в тромбоцитах, нейтрофилах, селезенке, вилочковой железе, эндотелии и клетках гладкой сосудистой мускулатуры, где вызывают сильную коронарную 30 вазодилатацию, которая позволяет оценить перфузию миокарда у пациентов с коронарной болезнью сердца (см. статью Z.Gao et al., "Novel short-acting  $A_{2A}$  adenosine receptor agonists for coronary vasodilatation: inverse relationship between affinity and duration of action of  $A_{2A}$  agonists" (Новые агонисты аденозинового рецептора  $A_{2A}$  короткого действия для коронарной вазодилатации, обратная зависимость между 35 аффинностью и продолжительностью действия агонистов  $A_{2A}$ ), J.Pharmacol. Exp.Ther. 2001, т.298, стр.209-18). Однако рецептор  $A_{2A}$  никогда до настоящего времени не был локализован в предсердных кардиомиоцитах человека.

Подходящие соединения для лечения фибрилляции предсердий

Как правило, антагонист представляет собой молекулу, которая связывается с 40 рецептором, не активируя рецептор. Он конкурирует с эндогенным лигандом(ами) или субстратом(ами) за связывание центра(ов) на рецепторе и таким образом ингибирует способность рецептора к трансдукции внутриклеточного сигнала в ответ на связывание эндогенного лиганда. Антагонист действует несколькими путями. Он 45 может связывать или выводить аденозин с достаточной аффинностью и специфичностью для того, чтобы нарушать, блокировать или иным образом предотвращать связывание аденозина с рецептором  $A_{2A}$ , таким образом ингибируя, подавляя или вызывая прекращение аденозин-опосредованной биологической активности.

50 Рецептор  $A_{2A}$  в кардиомиоцитах в отсутствие эндогенного лиганда проявляет основную активность. Данная активность может быть обусловлена конститутивной активностью рецептора или активацией рецептора эндогенным аденозином. В данном случае лечения фибрилляции предсердий может достигаться снижением

данной основной активности посредством применения антагониста или обратного агониста. Некоторые из антагонистов  $A_{2A}$ , представленных в изобретении, могут проявлять обратный агонизм.

5 В соответствии с известной локализацией и функцией рецептора  $A_{2A}$ , антагонисты  $A_{2A}$  использовали до настоящего времени для лечения болезни Паркинсона и других заболеваний ЦНС (центральной нервной системы) (шизофрении, сенильной деменции, как при болезни Альцгеймера, психоза органической природы и т.п.). Среди них главной является болезнь Паркинсона.

10 Каждый антагонист  $A_{2A}$  предназначен для применения для целей данного изобретения. Многие различные соединения глубоко исследованы как антагонисты  $A_{2A}$ , которые можно подразделить на два больших семейства: производные ксантина и нексантиновые гетероциклы.

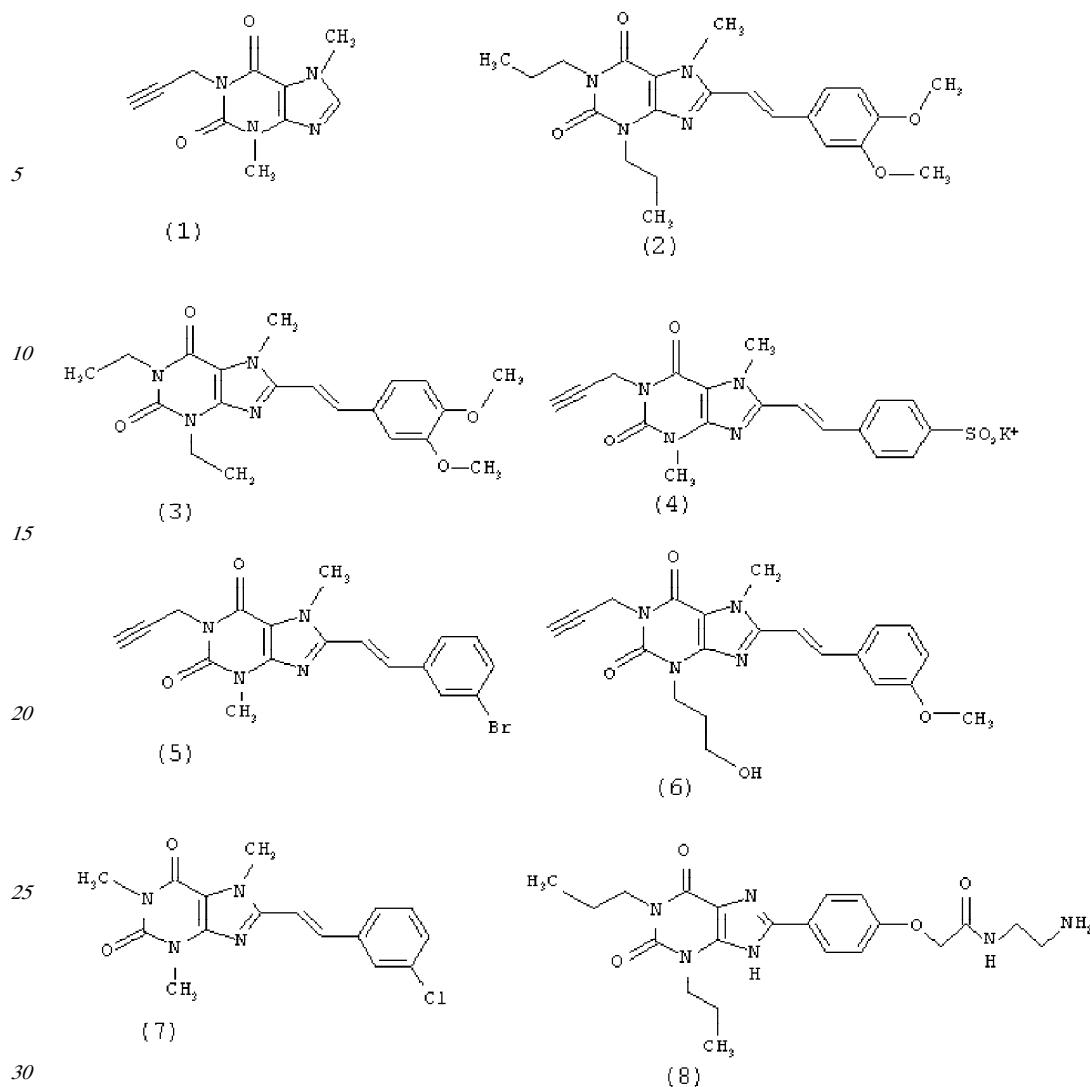
15 В конкретном варианте осуществления изобретения антагонист  $A_{2A}$  представляет собой производное ксантина или его фармацевтически приемлемую соль. Различные заместители в разных положениях, а также деазо- или азо-аналоги, либо другие гетероциклические аналоги пуринового цикла либо три- или тетрациклические производные/аналоги могут иметь аналогичную антагонистическую активность в 20 отношении  $A_{2A}$ . Среди производных ксантина предпочтительной структурой, общей для некоторых соединений, является структура 1,3,7-триалкил-8-стририл-ксантина. В предпочтительном варианте осуществления антагонист  $A_{2A}$  представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из теобромина, известного как DMPX (см. формулу 1), KF 17837 (см. формулу 2), истрадефиллина, известного как KW 6002 (имеющий наименование 8-[(E)-2-(3,4-диметоксифенил)этенил]-1,3-диэтил-7- 25 метилпурин-2,6-дион согласно номенклатуре IUPAC; см. формулу 3), п-сульфостирил-DMPX (см. формулу 4), BS-DMPX (см. формулу 5), MSX-2 (имеющий наименование 3-(3-гидроксипропил)-8-[(E)-2-(3-метоксифенил)этенил]-7-метил-1 - 30 проп-2-инилпурин-2,6-дион согласно номенклатуре IUPAC; см. формулу 6), CSC (см. формулу 7), аминной структуры, близкой ксантину (ХАС, формула 8), и MSX-3.

35 В более предпочтительном варианте осуществления антагонист  $A_{2A}$  представляет собой KW 6002. Данное соединение в настоящее время находится на фазе III клинических испытаний в плане лечения болезни Паркинсона. В другом предпочтительном варианте осуществления антагонист  $A_{2A}$  представляет собой MSX-2. В другом предпочтительном варианте осуществления антагонист  $A_{2A}$  представляет собой MSX-3, сложный эфир фосфорной кислоты MSX-2, пролекарственную форму MSX-2.

40

45

50



Известны другие соединения ксантина, проявляющие антагонистическую активность в отношении рецептора  $A_{2A}$ , как описано, например, в патентах США №№5484920, 5587378, 5543415 и в Европейской заявке EP 1016407 A1.

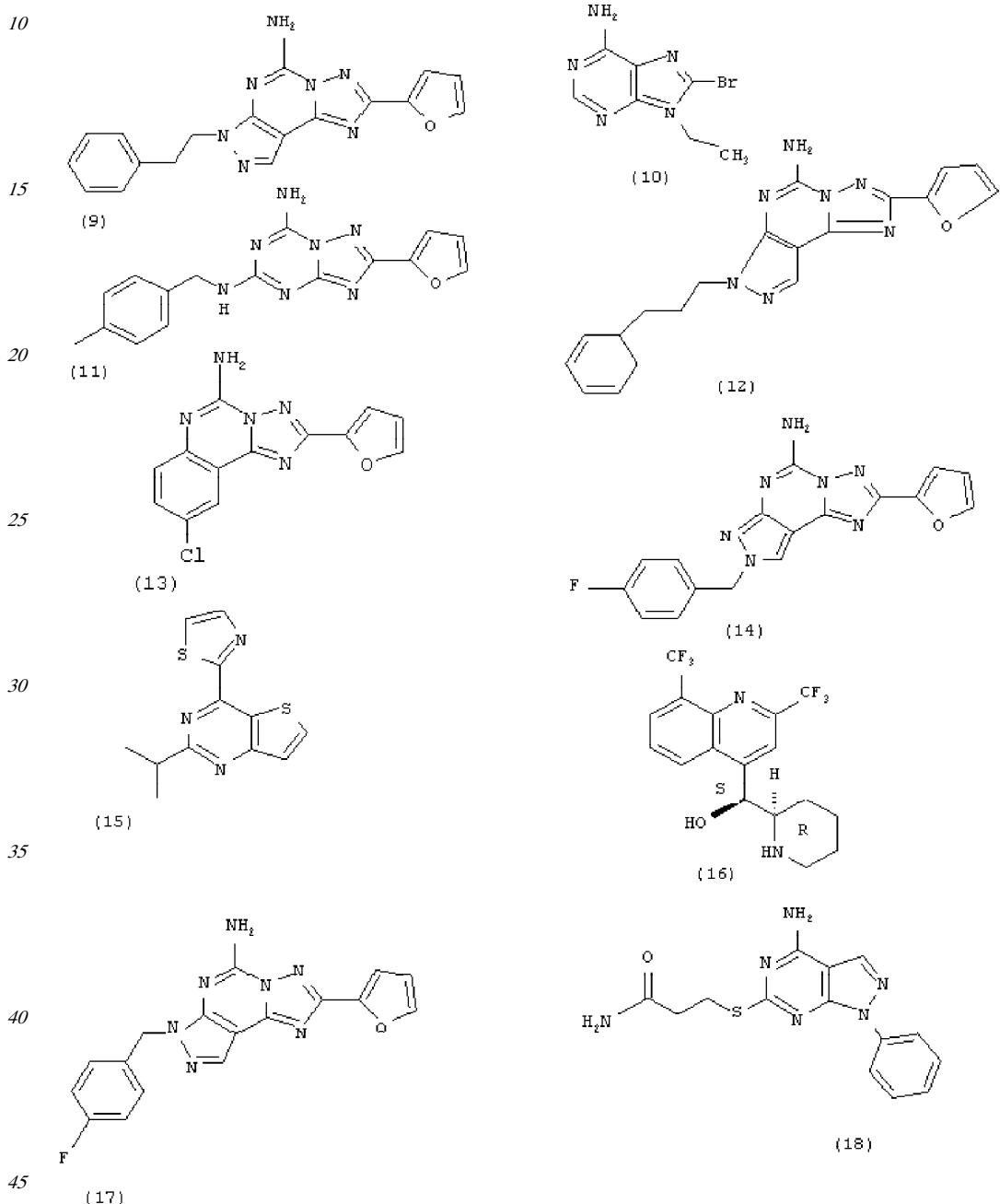
В другом конкретном варианте осуществления изобретения антагонист  $A_{2A}$  представляет собой нексантиновый гетероциклический. Типичные нексантиновые аденоzinовые антагонисты  $A_{2A}$  получены из аденина и представляют собой аденоzinовые производные в самом широком смысле, включая моно-, ди-, три- и тетрациклические соединения, с различными заместителями.

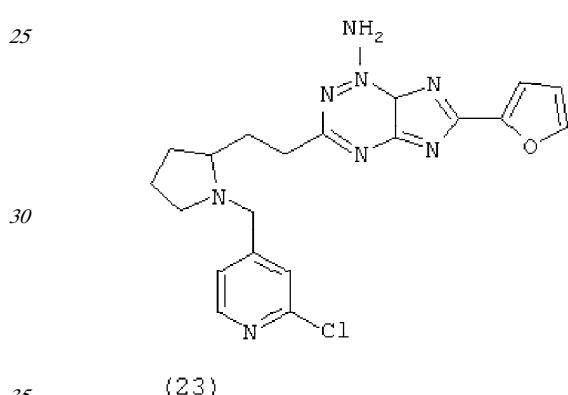
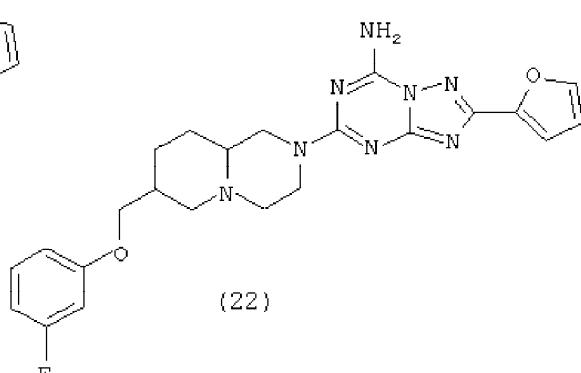
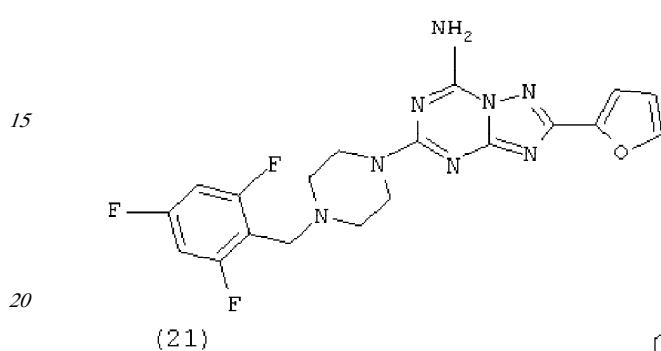
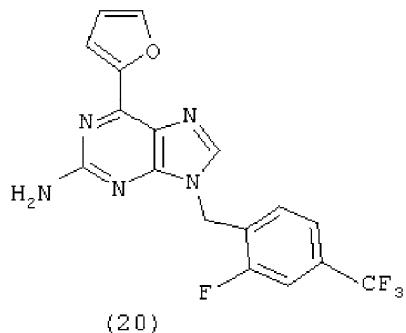
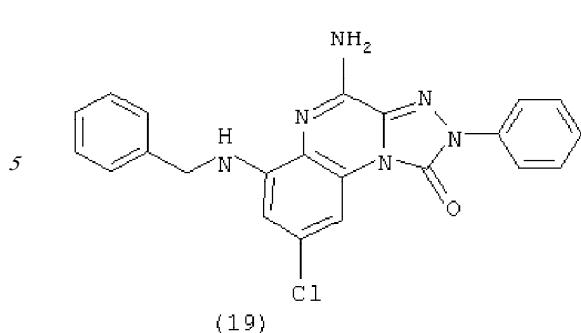
Идентифицированы дополнительные гетероциклические соединения, полученные не из аденина, которые обладают антагонистической активностью в отношении  $A_{2A}$ . Известно, что некоторые 2-аминопиридиновые соединения проявляют антагонизм в отношении рецептора  $A_{2A}$  (см., например, международные публикации WO 02/14282 и WO 01/25210), известны также некоторые 9-аминопиридиновые соединения (см., например, патентную заявку США №2001/0027196).

В предпочтительном варианте осуществления антагонист  $A_{2A}$  выбран из группы, состоящей из SCH 58261 (см. формулу 9); ANR-82 (см. формулу 10); ZM 241385 (см. формулу 11); SCH 63390 (см. формулу 12), CGS 15943 (см. формулу 13), 8FB-PTP (см. формулу 14); VER-6623 (имеющий наименование 2-пропан-2-ил-4-(1,3-тиазол-2-ил)тиено [2,3-е] пиримидин согласно номенклатуре IUPAC; известный также

как V2006, см. формулу 15); (-)R,S-мефлоквин (см. формулу 16) и 7FB-PTP (см. формулу 17). В более предпочтительном варианте осуществления антагонистом  $A_{2A}$  в группе нексантиновых соединений является VER-6623.

Другими соединениями, предпочтительными в качестве антагонистов  $A_{2A}$ , являются пиразолопиримидиновое производное формулы 18; триазолохиноксалиновое производное формулы 19; 9-замещенное 2-амино-6-фурил-адениновое производное формулы 20 и триазолотриазиновые производные формул 21, 22 и 23.





Другие триазолопиrimидиновые антагонисты описаны, например, в международных публикациях WO 04/029056, WO 95/01356, WO 98/52568, WO 01/92264, 40 WO 97/05138, в международной заявке PCT/US02/32630 и в патенте США №5565460. В частности, замещенные пиразол[4,3-e]-1,2,4-триазоло-[1,5-c]пиrimидиновые соединения описаны в международных публикациях WO 05/054245, в патентных заявках США №№2004/220194 и 2003/212059.

45 Другие специфические примеры подходящих антагонистов  $A_{2A}$  включают соединения, описанные в следующих патентах, патентных заявках, международных публикациях и статьях: WO 95/01356, US 6630475, US 5935964, WO 03/032996, WO 03/048165, WO 03/048164, WO 03/048163, WO 05/042500, WO 05/058883, WO 05/040151, WO 05/039572, WO 04/092177, US 2004/138235, WO 04/019949, WO 02/14282, WO 50 04/016605, WO 03/082873, US 5484920, US 5703085, WO 92/06976, WO 94/01114, US 5565460, WO 98/42711, WO 00/7201, WO 99/43678, WO 99/26627, WO 01/92264, WO 99/35147, WO 00/13682, WO 00/13681, WO 00/69464, WO 01/40230, WO 01/02409, WO 01/02400, EP 1054012, WO 01/62233, WO 01/17999, WO 01/80893, WO 02/14282, WO

01/97786, WO 01/16134, WO 00/73307, US 2005/043315, US 2003/149060; Baraldi et al. "Recent developments in the field of  $A_{2A}$  and  $A_3$  adenosine receptor antagonists" (Последние разработки в области антагонистов аденоzinовых рецепторов  $A_{2A}$  и  $A_3$ ), European Journal of Medicinal Chemistry, 2003, т.38, стр.367-82; E.Ongini, et al. "Selective adenosine  $A_{2A}$  receptor antagonists" (Избирательные антагонисты аденоzinового рецептора  $A_{2A}$ ), Farmaco, 2001, т.56, стр.87-90; C.E. Muller et al., " $A_{2A}$  Adenosine receptor antagonists - future drugs for Parkinson's disease?" (Антагонисты аденоzinового рецептора  $A_{2A}$  - лекарства будущего для лечения болезни Паркинсона?), Drugs of the Future, 2000, т.25, стр.1043-52; L.J.Knutsen et al., "KW-6002 (Kyowa Hakko Kogyo)", Curr. Opin. Investig. Drugs, 2001, т.2, стр.668-73; B.Cacciari et al., "Medicinal chemistry of  $A_{2A}$  adenosine receptor antagonists" (Медицинская химия антагонистов аденоzinового рецептора  $A_{2A}$ ), Curr. Top.Med. Chem., 2003, т.3, стр.403-11; G.Yao et al., "Synthesis of alkyne derivatives of novel triazolopyrazine as  $A_{2A}$  adenosine receptor antagonists" (Синтез алкиновых производных нового триазолопиразина как антагонистов аденоzinового рецептора  $A_{2A}$ ), Bioorg. Med. Chem. Lett., 2005, т.15, стр.511-5; E. Kiselgof et al., "6-(2-furanyl)-9H-purin-2-amine derivatives as  $A_{2A}$  adenosine antagonists" (Производные 6-(2-фуранил)-9Н-пурин-2-амина как антагонисты аденоzin  $A_{2A}$ ), Bioorg. Med. Chem. Lett., 2005, т.15, стр.2119-22; S.M. Weiss et al., "Discovery of nonxanthine adenosine  $A_{2A}$  receptor antagonists for the treatment of Parkinson's disease" (Открытие нексантиновых антагонистов аденоzinового рецептора  $A_{2A}$ . Для лечения болезни Паркинсона), Neurology, 2003, т.61 (Supp.6), стр.S101-6; C. B.Vu et al., "Novel diamino derivatives of [1,24]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazine as potent and selective adenosine  $A_{2A}$  receptor antagonists" (Новые диаминопроизводные [1,24]триазоло[1,5-a][1,3,5]триазина как сильные и избирательные антагонисты аденоzinового рецептора  $A_{2A}$ ), J. Med. Chem., 2005, т.48, стр.2009-18; C.B.Vu et al., "Piperazine derivatives of [1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazine as potent and selective adenosine  $A_{2A}$  receptor antagonists" (Пиперазиновые производные [1,24]триазоло[1,5-a][1,3,5]триазина как сильные и избирательные антагонисты аденоzinового рецептора  $A_{2A}$ ), J. Med. Chem., 2004, т.47, стр.4291-9.

Компетентный специалист в области техники будет знать, является ли соединение подходящим антагонистом  $A_{2A}$  для целей изобретения. Например, в области техники существуют подходящие способы оценки, является ли соединение подходящим антагонистом  $A_{2A}$ . Примером является способ, основанный на анализе связывания радиолигандов, описанный в патентной заявке США № 2004/0138235, параграфы [0226]-[0240].

Для лечения фибрилляции предсердий предпочтительно когда антагонист  $A_{2A}$  является избирательным (селективным) в отношении рецептора  $A_{2A}$ . Все вышеописанные антагонисты  $A_{2A}$  являются избирательными в отношении рецептора  $A_{2A}$ , но степень избирательности среди них различна. Избирательность также может некоторым образом отличаться среди разных видов (например крыса, человек).

Антагонисты  $A_{2A}$  получают известными способами, как описано в приведенных патентах и заявках.

#### Фармацевтические композиции и применение

Касательно лечения термин "эффективное количество" относится к количеству активного ингредиента, которое достаточно для получения благоприятного или желательного клинического результата: ослабления, облегчения, стабилизации, обратного развития или замедления развития заболевания или нарушения, либо, иначе, уменьшения патологических последствий заболевания или нарушения.

Эффективное количество, как правило, определяет лечащий врач на основе конкретного случая.

Хотя активное соединение, предназначенное для применения при лечении в соответствии с изобретением, можно вводить в форме неочищенного химического соединения, предпочтительно введение активного ингредиента, необязательно в форме физиологически приемлемой соли, в фармацевтической композиции вместе с одним или более адьювантов, наполнителей, носителей, буферов, разбавителей и/или других принятых фармацевтических вспомогательных агентов. Компоненты можно вводить либо в однократной либо в многократной дозах любым из принятых способов введения агентов, имеющих близкое применение, включая ректальный, защечный, интраназальный и чрескожный пути, посредством интраартериальной инъекции, внутривенно, внутрибрюшно, парентерально, внутримышечно, подкожно, перорально, местно, как ингаляционный препарат или посредством пропитанного или имеющего покрытие устройства, такого как стент, например, или введенный в артерию цилиндрический полимер.

Одним из предпочтительных способов введения является парентеральный, особенно посредством инъекции. Формы введения путем инъекции включают водные или масляные сусpenзии или эмульсии, а также стерильные водные растворы. Пероральное введение представляет собой другой предпочтительный путь введения. Фармацевтическая композиция может быть в форме таблеток, пилюль, порошков, эликсиров, сусpenзий, эмульсий, растворов, сиропов, аэрозолей, капсул и т.п.

Композиции, соответствующие изобретению, можно приготовить так, чтобы обеспечить быстрое, замедленное или задержанное высвобождение активного ингредиента после введения пациенту при использовании способов, известных в области техники. Системы доставки лекарственного средства с контролируемым высвобождением для перорального применения включают системы с осмотическим насосом и растворяющиеся системы, содержащие покрытые полимером резервуары или препараты, содержащие состав лекарственное средство - полимерная матрица. В другом препарате, предназначенном для применения в способах, соответствующих настоящему изобретению, используют устройства для чрескожной доставки ("пластыри"). Данные чрескожные пластиры могут быть использованы для обеспечения непрерывной или прерывистой инфузии соединения в контролируемых количествах.

Предпочтительно когда композиции получают в унифицированной лекарственной форме. Доза зависит от природы и тяжести заболевания и ее определение входит в компетенцию лечащего врача.

Пока не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в данном контексте, имеют такое же значение, какое обычно имеет в виду обычный специалист в области техники, к которой принадлежит данное изобретение. На протяжении описания и в формуле изобретения слово "содержит (включает)" и его варианты, такие как "содержащий", не предназначены для исключения других технических признаков, дополнительных агентов, компонентов или стадий. Реферат настоящей заявки включен в данном контексте. Дополнительные объекты, преимущества и признаки изобретения будут очевидны компетентным специалистам в области техники при изучении описания или могут быть изучены при практической реализации изобретения. Следующие примеры и чертежи представлены в порядке иллюстрации и не предусматривают ограничения настоящего изобретения.

Краткое описание чертежей

Фигуры 1-3 иллюстрируют регуляцию повышающим образом экспрессии рецептора у пациентов с фибрилляцией предсердий.

На Фиг.1 представлены только что выделенные миоциты из правого предсердия человека, которые дважды окрашивают антителом к рецептору  $A_{2A}$  (панели 1, 4, 7 и 10) и антителом к миозину (2),  $\alpha$ -актинину (5), коннексину-43 (8) или RyR (11). Совмещение изображений с двойной иммунофлуоресценцией (панели 3, 6, 9 и 12) показывают солокализацию рецептора  $A_{2A}$  с  $\alpha$ -актинином и перекрывающееся распространение рецептора  $A_{2A}$  с рианодиновым рецептором (RyR).

На Фиг.2 показаны клеточные мембранные из клеток НЕК, временно трансфецированных человеческим рецептором  $A_{2A}$  (положительный контроль, C+) и мембранные человеческих предсердий, полученные от пациентов с синусовым ритмом (SINUS) или с фибрилляцией предсердий (AF), разделенные с помощью SDS-PAGE (электрофореза в полиакриламидном геле с использованием додецилсульфата натрия) и подвергнутые иммуноблоттингу с использованием кроличьего антитела к рецептору  $A_{2A}$ . "Di" означает димер и "Mo" означает мономер.

На Фиг.3 показано относительное денситометрическое сканирование (RDS) иммуноблота, представленного на Фиг.2. Общее количество рецептора  $A_{2A}$  (мономер+димер) показано черными столбиками. Относительные количества мономера рецептора  $A_{2A}$  (белые столбики) и димера (серые столбики) нормализованы с использованием общей суммы рецептора  $A_{2A}$  (димер+мономер) для каждой дорожки.

Фигуры 4-8 показывают агонистическую стимуляцию рецептора  $A_{2A}$ , включающую РКА-зависимое повышение спонтанного высвобождения кальция из саркоплазматической сети у пациентов с фибрилляцией предсердий.

На Фиг.4 спонтанный  $I_{NCX}$  регистрируют с мембранным потенциалом, фиксированным при -80 мВ до (контроль), во время (CGS) и после (промывание, W) воздействия на миокардиоцит 200 нМ CGS 21680. Горизонтальные и вертикальные измерительные линейки соответствуют 30 сек и 100 пА соответственно.

На Фиг.5 показан период стимулирующего действия CGS 21680 на ряд спонтанных обменных токов Na-Ca (регистрируемых как события на каждой 30-секундной развертке, e/s). Жирная линия над столбиками показывает период применения CGS 21680.

На Фиг.6 показано, как антагонист  $A_{2A}$  ZM 241385 (1 мкМ) способен возвращать к исходному состоянию стимулирующий эффект 200 нМ CGS 21680 на спонтанный  $I_{NCX}$ . Горизонтальные и вертикальные измерительные линейки соответствуют 30 сек и 100 пА соответственно.

На Фиг.7 представляют суммарный эффект CGS в кардиомиоцитах, полученных от 8 контрольных пациентов, не имеющих фибрилляции предсердий, и 11 пациентах с фибрилляцией предсердий. Для оценки эффекта CGS 21680 используют парный критерий Стьюдента, и р-значения приведены выше столбиков.  $I_{NCX} F$  означает частоту  $I_{NCX}$ .

На Фиг.8 показано, что добавление 10 мкМ H-89 устранило стимулирующий эффект 200 нМ CGS 21680 у 5 пациентов. Программа ANOVA показывает существенный эффект лечения на частоту волн ( $p=0,001$ ) и повторная проверка дает  $p=0,03$  для CGS относительно контроля,  $p=0,002$  для CGS относительно CGS+H-89 и  $p=0,05$  для CGS+89 относительно контроля.

На Фиг.9 показано, что антагонист  $A_{2A}$  SCH 58261 (50 нМ) вызывает обратимое снижение частоты спонтанного  $I_{NCX}$  в образцах, полученных от пациентов с

фибрилляцией предсердий. Горизонтальные и вертикальные измерительные линейки соответствуют 30 сек и 100 пА соответственно.

Фигуры 9-10 демонстрируют, что антагонисты  $A_{2A}$  снижают исходный уровень спонтанного высвобождения кальция из саркоплазматической сети у пациентов с 5 фибрилляцией предсердий. Эксперименты показывают спонтанный  $I_{NCX}$  при фиксируемом потенциале -80 мВ.

На Фиг.10 показано, что антагонисты  $A_{2A}$  снижают как частоту волны спонтанного кальция (WF), измеренную посредством конфокальной визуализации 10 кальция (левая панель, n=6) или с помощью метода пэтч-кламп (правая панель, n=7). Эффекты 50 нМ ZM 241385 и SCH 58261 сравнимы и были объединены. Статистическую достоверность с использованием непарного критерия Стьюдента для конфокальных экспериментов и парного критерия Стьюдента для 15 экспериментов с использованием метода пэтч-кламп приводят над столбиками.

#### Осуществление изобретения

##### Экспрессия и локализация рецептора $A_{2A}$ в правом предсердии человека

Присутствие рецептора  $A_{2A}$  в кардиомиоцитах из правого предсердия человека исследуют с помощью иммуноблоттинга. Результаты показывают, что рецептор 20 присутствует в правом предсердии и что обе - мономерная и димерная - формы рецептора экспрессируются в данной ткани, причем димерная форма является неосновной в образцах, полученных из предсердий при синусовом ритме.

Локализацию рецептора  $A_{2A}$  в миокарде предсердий изучают с помощью 25 конфокальной микроскопии в образцах, дважды помеченных антителами к рецептору и либо к миозину,  $\alpha$ -актинину, коннексину-43, либо RyR. Рецептор  $A_{2A}$  экспрессируется по типу поперечного пучка вдоль волокна миокарда и солокализован с ассоциированным с цитоскелетом белком  $\alpha$ -актинином на уровне Z-линий в саркомере. Распространение рецептора  $A_{2A}$  качественно близко в образцах, 30 полученных от пациентов с фибрилляцией предсердий и без фибрилляции предсердий.

Регуляция повышающим образом экспрессии рецептора  $A_{2A}$  у пациентов с фибрилляцией предсердий

Выделенные предсердные миоциты сохраняют тип пучка рецептора  $A_{2A}$ , а также 35 солокализацию с  $\alpha$ -актинином и перекрывающееся с RyR распространение, видимое в образцах предсердной ткани (ср. Фиг.1). В локализации рецепторов в кардиомиоцитах, полученных от пациентов с фибрилляцией предсердий и без фибрилляции предсердий, не наблюдают никаких различий (данные не представлены). Уровень белка рецептора  $A_{2A}$ , измеренный вестерн-блоттингом, 40 заметно возрастает у пациентов с фибрилляцией предсердий (ср. Фиг.2, С) и интересно, что тип димерного рецептора  $A_{2A}$ , который является функциональной формой, присутствующей на клеточной поверхности, заметно повышен при фибрилляции предсердий (ср. Фиг.3). В кровеносных сосудах не наблюдается 45 никаких существенных различий. Вследствие этого данные результаты не только впервые демонстрируют экспрессию рецептора  $A_{2A}$  в человеческих предсердных миоцитах, но также их повышающую регуляцию, в основном в гомодимерной форме, у пациентов с фибрилляцией предсердий.

Агонистическая стимуляция рецептора  $A_{2A}$  индуцирует РКА-зависимое (зависимое 50 от протеинкиназы А) повышение спонтанного высвобождения кальция из саркоплазматического ретикулума (SR) у пациентов с фибрилляцией предсердий.

Эффект агонистов рецептора  $A_{2A}$  на спонтанное высвобождение кальция из SR анализируют на выделенных предсердных миоцитах, полученных у пациентов с

синусовым ритмом и у пациентов с фибрилляцией предсердий. Анализируют как местное нераспространяющееся высвобождение кальция (вспышки кальция), так и регенеративное высвобождение кальция из SR (волны кальция). Предварительное инкубирование с агонистом рецептора A<sub>2A</sub> CGS 21680 (200 нМ) увеличивает количество волн кальция у пациентов с фибрилляцией предсердий, но не у пациентов, не страдающих аритмией.

Для того чтобы определить, является ли эффект CGS 21680 на спонтанное высвобождение кальция из SR вторичным относительно эффекта на мембранный потенциал, используют метод пэтч-кламп для фиксации мембранныго потенциала при -80 мВ. Это не препятствует тому, что CGS 21680 обратимо увеличивает число спонтанных волн кальция, измеряемых как обменный ток Na-Ca (I<sub>NCX</sub>), активируемый ими (ср. Фиг.4 и 5). В самом деле, данный подход подтверждает существенный стимулирующий эффект CGS 21680 у пациентов с фибрилляцией предсердий (ср. Фиг.7). Вследствие этого повышенное спонтанное высвобождение кальция из SR, индуцируемое CGS 21680, обусловлено рецептором A<sub>2A</sub>-зависимой регуляцией активности RyR. Специфический эффект CGS 21680 изменяется на противоположный двумя избирательными антагонистами A<sub>2A</sub> ZM 241385 (ср. Фиг.6) и SCH 58261.

Поскольку рецептор A<sub>2A</sub> связан с G белками, опосредованная агонистом активация рецептора должна повышать уровни cAMP (циклического аденозинмонофосфата), который, в свою очередь, приводит к активации PKA и фосфорилированию RyR. Для тестирования, проявляет ли рецептор A<sub>2A</sub> свой эффект посредством cAMP-зависимой активации PKA, используют избирательный ингибитор PKA H-89. Стимулирующий эффект CGS 21680 в миоцитах, полученных от пациентов с фибрилляцией предсердий, устраняют с помощью H-89 (ср. Фиг.8), подтверждая, что рецептор A<sub>2A</sub>-зависимая регуляция спонтанного высвобождения кальция из SR в действительности опосредована активацией PKA. Интересно, что H-89 не только устраняет эффект CGS 21680, но и действительно уменьшает спонтанное высвобождение кальция до существенно более низкого уровня, чем исходный уровень, регистрируемый до применения CGS 21680. Анализ вспышек и волн кальция с помощью конфокальной микроскопии подтверждает зависимость рецептора A<sub>2A</sub>-опосредованного спонтанного высвобождения кальция от PKA.

Блокада рецептора A<sub>2A</sub> уменьшает исходный уровень спонтанного высвобождения кальция из SR

Существование исходного тонуса cAMP в человеческих предсердных миоцитах заявлено в исследованиях нейрогормональной модуляции токов кальция L-типа. Обнаружение авторами того, что блокатор PKA H-89 уменьшает частоту волн кальция до уровня ниже исходного, кроме того, позволяет предположить, что в человеческих предсердных миоцитах имеется исходный рецептор A<sub>2A</sub>-зависимый тонус cAMP. В соответствии в данным представлением клетки, полученные от пациентов с фибрилляцией предсердий при контакте с избирательными агонистами рецептора A<sub>2A</sub> SCH 58261 или ZM 241385, демонстрируют повышенный исходный уровень высвобождения кальция из SR, существенно пониженную частоту волн кальция, измеренную либо посредством конфокальной микроскопии либо с помощью метода пэтч-кламп (ср. Фиг.9-10).

Образцы, полученные от человека

В данном исследовании используют образцы сердечной ткани, полученные в целом от 54 пациентов, подвергшихся хирургическому вмешательству на сердце.

Хотя образцы предсердной ткани состояли из ткани, которую в норме отбрасывают во время хирургической операции, разрешение на использование в данном исследовании было получено от каждого пациента. Исследование одобрено Комитетом по этике больницы Сант Пау (Барселона, Испания).

5 Семнадцать из 54 пациентов имеют в истории болезни фибрилляцию предсердий, тогда как у остальных пациентов данная аритмия отсутствует. У двадцати пяти пациентов отсутствует фибрилляция предсердий, но имеется дилатация левого предсердия (диаметр левого предсердия  $>40$  мм). Число пациентов, используемых в 10 специальных экспериментальных группах, указано соответствующим образом.

Пациентов, которых лечили антагонистами  $\text{Ca}^{2+}$ , были исключены из исследования. 15 Обнаружено, что другое медикаментозное лечение пациентов не оказывает существенного влияния на измеряемые параметры. Для иммуногистохимического анализа в целом 8 пациентов с фибрилляцией предсердий (диаметр левого предсердия:  $53,8 \pm 6,8$  мм) и 15 пациентов с отсутствием дилатации предсердий и отсутствием в истории болезни фибрилляции предсердий служат контрольными группами (диаметр левого предсердия:  $36,5 \pm 3,4$  мм).

#### Антитела

20 Используют следующие первичные антитела: Кроличье аффинно очищенное поликлональное антитело к рецептору  $\text{A}_{2A}$  VC21-Ab, нацеленное на пептид, соответствующий второй внеклеточной петле рецептора  $\text{A}_{2A}$ ; кроличье антитело к рецептору  $\text{A}_{2A}$  (клон PA1-042, Affinity BioReagents, Golden, CO, U.S.A.); мышьюное антитело к медленному мышечному миозину (клон N0 Q7.5.4D, Chemicon International, 25 Temecula, California, U.S.A.); мышьюное антитело к  $\alpha$ -актинину (клон EA-53, SigmaAldrich Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.); мышьюное антитело к коннексину-43 (клон 2, Transduction Laboratories, Lexington, KY, U.S.A.); мышьюное антитело к рианодиновому рецептору (клон C3-33, Calbiochem, San Diego, California, U.S.A.).

30 Используемые вторичные антитела представляют собой: конъюгированное с ALEXAFLUOR 488<sup>®</sup> козье IgG к мыши (1/1000), конъюгированное с TEXAS RED<sup>®</sup> козье IgG к кролику (1/2000) (Molecular Probes, Eugene, OR, U.S.A.) конъюгированное с пероксидазой хрена козье IgG к кролику (1/60000) (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, 35 U.S.A.) и кроличье IgG к мыши (1:2000) (Dako, Glostrup, Denmark).

#### Выделение миоцитов

Миоциты выделяют из образцов человеческой предсердной ткани, как описано ранее (ср. L. Hove-Madsen et al., "Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes"

40 (Фибрилляция предсердий ассоциирована с повышенным уровнем спонтанного высвобождения кальция в человеческих предсердных миоцитах), Circulation, 2004, т.110, стр.1358-63). Вкратце, образцы промывают, разрезают на маленькие кусочки в растворе не содержащем кальций, включающем 30 мМ бутандион моноксим (BDM),

45 и инкубируют при 35°C в не содержащем  $\text{Ca}^{2+}$  растворе, включающем 0,5 мг/мл коллагеназы (тип 2 по Уортингтону, 318 мкг/мг) и 0,5 мг/мл протеиназы (Sigma тип XXIV, 11 мкг/мг твердого вещества). Через 45 минут ткань удаляют из раствора ферментов и клетки разделяют в не содержащем  $\text{Ca}^{2+}$  растворе с помощью

50 пастеровской пипетки. Оставшуюся ткань подвергают разложению в течение 3×15 минут в свежем не содержащем кальций растворе, включающем 0,4 мг/мл коллагеназы. Растворы, содержащие разделенные клетки, центрифицируют при 600 об/мин. В течение 1 минуты ресуспенсируют в бескальциевой среде, и затем содержание кальция постепенно повышают до 1 мМ. Для экспериментов используют

только продолговатые клетки с отчетливой поперечной исчерченностью и без грануляции.

Положительный контроль: клеточная культура и трансфекция

5 Клетки HEK-293 выращивают в среде Игла в модификации Дальбекко (DMEM, Sigma Aldrich Chemical Co.). Клетки временно трансфицируют ДНК, кодирующей человеческий рецептор A<sub>2A</sub> (ср. M. Canals et al. "Adenosine A<sub>2A</sub>-dopamine D<sub>2</sub> receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer" (гетеромеризация аденоzinового A<sub>2A</sub>-допаминового 10 D<sub>2</sub> рецепторов - качественная и количественная оценка по флуоресценции и переносу энергии биолюминесценции), J.Biol. Chem., 2003, т.278, стр.46741-9) посредством осаждения фосфатом кальция. Клетки собирают либо через 24 либо через 48 часов после трансфекции.

15 Спонтанное высвобождение кальция из SR

15 Вспышки кальция и волны кальция определяют в клетках, нагруженных fluo-3, используя конфокальный микроскоп с лазерным сканированием (Leica TCS SP2 AOBS, Germany). Экспериментальный раствор содержит (в mM): NaCl 136, KCl 4, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,33, NaHCO<sub>3</sub> 4, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1,6, HEPES 10, глюкозу 5, пировиноградную 20 кислоту 5, (pH 7,4). Испускание флуоресценции собирают при длине волны между 500 и 650 нм при возбуждении при 488 нм, ослабленном до 1-5%. Вспышки кальция и волны кальция измеряют в условиях покоя в течение 2×10,24 сек, при частоте сканирования 1 кГц. Вспышки кальция определяют как увеличение 25 интенсивности сигнала среза 3 мкм через центр вспышки кальция без какого-либо определяемого повышения в прилегающем срезе 3 мкм. Увеличение интенсивности сигнала в двух или более прилежащих срезах 3 мкм считают волнами кальция. Амплитуду каждой вспышки кальция и полупериод ее существования определяют по экспоненциальному приближению фазы распада кратковременной вспышки кальция. 30 Частоту вспышек кальция определяют для каждой клетки и нормализуют относительно длины сканируемой клетки.

Пэтч-кламп

35 Кратковременный обменный ток Na-Са внутрь, ассоциированный с волнами кальция, регистрируют в перфорированной пэтч-конфигурации, используя пакет программ для контролируемого усилителя пэтч-клампа (EPC 10, НЕКА, Germany). Сопротивление пипетки составляет 1,5-4 МОм. Эксперименты проводят при комнатной температуре и начинают когда доступное сопротивление становится стабильным и снижается до меньше чем 5-кратного сопротивления пипетки. 40 Внеклеточный раствор содержит (в mM): NaCl 127, тетраэтиламмоний (TEA) 5, HEPES 10, NaHCO<sub>3</sub> 4, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,33, глюкозу 10, пировиноградную кислоту 5, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1,8, (pH 7,4). Раствор в пипетке содержит (в mM): аспарагиновую кислоту 109, CsCl 47, Mg<sub>2</sub>ATФ 3, MgCl<sub>2</sub> 1, Na<sub>2</sub>-фосфокреатин 5, Li<sub>2</sub>ГТФ (гуанозинтрифосфат) 0,42, HEPES 10 и 250 мкг/мл амфотерицина В, (pH 7,2). Все компоненты: агонист 45 рецептора A<sub>2A</sub> CGS 21860, антагонисты ZM 241385 и SCH 58261 и ингибитор протеинкиназы А H-89 растворяют в ДМСО (диметилсульфоксид) и сохраняют как 10 mM исходные растворы. Содержание кальция из SR, высвобождающееся под действием кофеина, измеряют путем краткосрочного воздействия на клетки 10 mM 50 кофеина. Интеграл по времени полученного в результате обменного тока Na-Са переводят в пмоли (1·10<sup>-18</sup> моль) кальция, высвобождающегося из SR, позволяя предположить стехиометрию 3Na<sup>+</sup>:1Ca<sup>2+</sup> для обменника Na-Са.

Анализ данных и статистика

Эксперименты по электрофизиологии и конфокальной визуализации кальция проводят, не зная о клинических данных пациентов. Вспышки  $\text{Ca}^{2+}$  и волны  $\text{Ca}^{2+}$  регистрируют в клетках, полученных от одного и того же пациента, усредняют. Если не установлено иное, средние значения, полученные для каждого пациента, используют для статистического анализа и выражают как среднее  $\pm \text{S.E.M.}$  (стандартная ошибка). Группы данных тестируют на соответствие нормальному закону распределения, t-критерий Стьюдента используют для оценки существенной разницы при анализе специфического эффекта. Программу ANOVA используют для 10 сравнения множества эффектов, и повторную проверку Стьюдента-Неймана-Кеулса используют для оценки значимости специфических эффектов.

#### Мембранный препарат

Мембранные получают центрифугированием после разрушения клеток с помощью гомогенизатора Polytron (Kinematica, ротор PTA 20TS, настройка 5, три периода 15 по 15 сек) в ледяном растворе 0,32 М сахарозы, содержащем 5 mM Трис-HCl (pH 7,4; буфер A). Клеточный дебрис отделяют центрифугированием при 1000×g в течение 30 минут при 4°C (3500 об/мин с использованием ротора типа 75Ti). Супернатант центрифугируют при 26000×g в течение 30 минут при 4°C (20000 об/мин с 20 использованием ротора типа 75Ti), осадок ресуспензируют в буфере A, инкубируют при 37°C в течение 30 минут и центрифугируют при тех же условиях. Осадок ресуспензируют в 0,3 M KCl, перемешивают при 4°C в течение ночи, центрифугируют при 26000×g в течение 30 мин при 4°C (20000 об/мин с 25 использованием ротора типа 75Ti) и однократно промывают буфером A, как описано выше. Конечный продукт (мембранные фракции) ресуспензируют в 50 mM Трис-HCl и замораживают при -80°C. Суспензии мембран из трансфектированных клеток НЕК получают, как описано ранее (ср. C.Herrera, et al., "Adenosine 30  $\text{A}_2\text{B}$  receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells" (Аденозиновые рецепторы  $\text{A}_2\text{B}$  ведут себя как альтернативный заякоривающийся белок для аденоиндезаминазы клеточной поверхности в лимфоцитах и культивируемых клетках), Mol. Pharmacol. 2001, т.59, стр.127-34). Белок количественно определяют методом с использованием бицинхоновой кислоты (Pierce Chemical Co.).

#### Гель-электрофорез и иммуноблоттинг

Мембранные из человеческих клеток или временно трансфектированных клеток НЕК обрабатывают буфером для образцов SDS-PAGE (8 M мочевина, 2% SDS, 100 mM DTT (дитиотрейтол), 375 mM Трис, pH 6,8) путем нагревания при 37°C в 40 течение 2 часов и разделяют электрофорезом в SDS-полиакриламидном геле в 10% гелях. Белки переносят на PVDF мембранные, используя полусухую систему переноса, и подвергают иммуноблоттингу с указанным антителом и затем коньюгированным с пероксидазой хрена (HRP) козьим IgG к кролику (1/60000). Иммунореактивные 45 полосы проявляют, используя набор для хемолюминесцентной детекции (SuperSignal, West Pico Chemiluminiscent substrate, Pierce).

#### Иммуноокрашивание

Для иммуногистохимического исследования человеческую предсердную ткань погружают в OCT (ортопропиленол) и замораживают в охлажденном жидким 50 азотом изопентане. На криостате, охлажденном до 18°C, делают восемь срезов по микрометру. Срезы собирают на предметные стекла SUPERFROST PLUS® (BDH Chemicals Ltd., Poole, United Kingdom), сушат воздухом и хранят при -70°C. Для изучения иммунофлуоресценции срезы блокируют в течение 30 минут в 10% ослиной

сыворотке Tris-забуференном солевом растворе (TBS) (150 мМ NaCl/50 мМ Трис-HCl, pH 7,5). Срезы инкубируют с аффинно очищенным антителом к рецептору A<sub>2A</sub> (VC21, 25 мкг/мл) и антителом к  $\alpha$ -актинину (разведение 1:500), антителом к миозину (2 мкг/мл), антителом к коннексину-43 (2,5 мкг/мл) и антителом к рианодиновому рецептору (6,5 мкг/мл) в течение одного часа при комнатной температуре и затем три раза промывают в течение 10 минут в TBS.

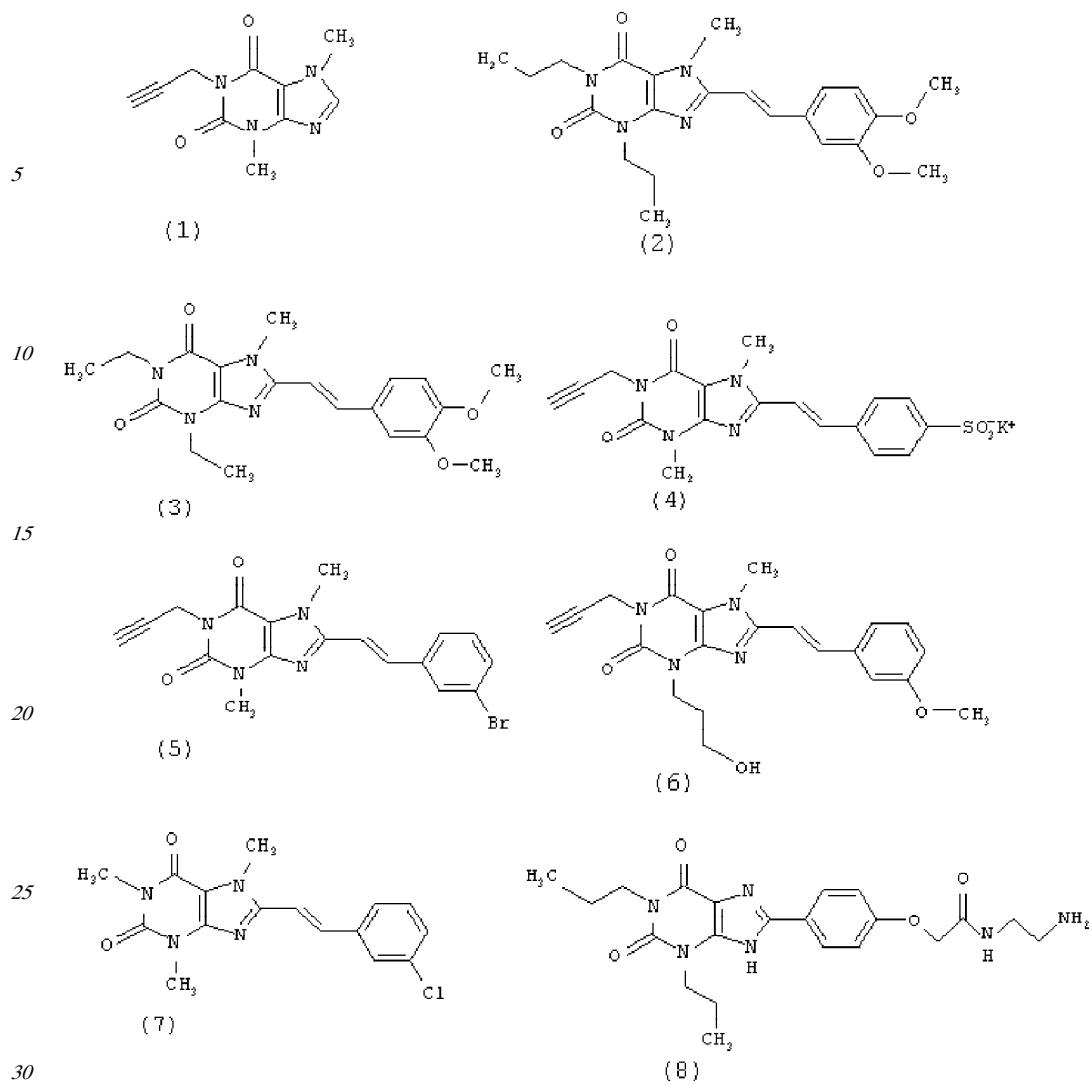
Конъюгированное с ALEXA FLUOR 488<sup>®</sup> козье IgG к мыши и конъюгированное с TEXAS RED<sup>®</sup> козье IgG к кролику применяют в блокирующем растворе в разведении 1:2000. Срез промывают и заключают в среду для иммунофлуоресценции VECTASHIELD<sup>®</sup> (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, U.S.A.). Для имmunогистохимического исследования только что выделенные человеческие кардиомиоциты помещают на покровные стекла 24 мм, покрытые поли-D-лизином. После адгезии клетки в растворе для выделения промывают в забуференном фосфатом солевом растворе и фиксируют 2% параформальдегидом в PBS в течение 20 минут при комнатной температуре. Клетки промывают PBS и инкубируют 0,1 М глицином в течение 5 минут, чтобы блокировать альдегидные группы. После промывания в PBS у миоцитов нарушают проницаемость мембранны с помощью 0,2% Тритон-X-100 в PBS в течение 15 мин. Затем клетки промывают в PBS, блокируют в течение 30 минут 10% лошадиной сывороткой при комнатной температуре и инкубируют со следующими основными антителами: кроличьим поликлональным антителом к рецептору A<sub>2A</sub> (10 мкг/мл), антителом к  $\alpha$ -актинину (разведение 1:500), антителом к миозину (разведение 1:500) и антителом к коннексину-43 (разведение 1:150) в течение одного часа при комнатной температуре, промывают три раза в PBS и потом окрашивают антителом к мыши, конъюгированным с ALEXA FLUOR 488<sup>®</sup>, и/или антителом к кролику, конъюгированным с TEXAS RED<sup>®</sup>. Наконец, клетки снова трижды промывают и заключают в VECTASHIELD<sup>®</sup>. Исследования с помощью конфокальной микроскопии проводят с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica TCS 4D (Leica Lasertechnik GmbH, Heidelberg, Germany).

### 35 Формула изобретения

1. Применение селективных антагонистов аденоzinового рецептора A<sub>2A</sub> для изготовления лекарственного средства для предупреждения и/или лечения фибрилляции предсердий у млекопитающего, включая человека.
2. Применение по п.1, в котором в качестве селективных антагонистов A<sub>2A</sub> используют ксантиновые производные или их фармацевтически приемлемые соли.
3. Применение по п.2, в котором в качестве селективных антагонистов A<sub>2A</sub> используют соединения, имеющие структурные формулы, выбранные из группы, включающей в себя

45

50



4. Применение по п.3, в котором в качестве селективного антагониста  $A_{2A}$  используют 8-[(E)-2-(3,4-диметоксифенил)этенил]-1,3-диэтил-7-метилпурин-2,6-дион, имеющий вышеприведенную структурную формулу (3).

5. Применение по п.3, в котором в качестве селективного антагониста  $A_{2A}$  используют 3-(3-гидроксипропил)-8-[(E)-2-(3-метоксифенил)этенил]-7-метил-1-проп-2-инилпурин-2,6-дион, имеющий вышеприведенную структурную формулу (6).

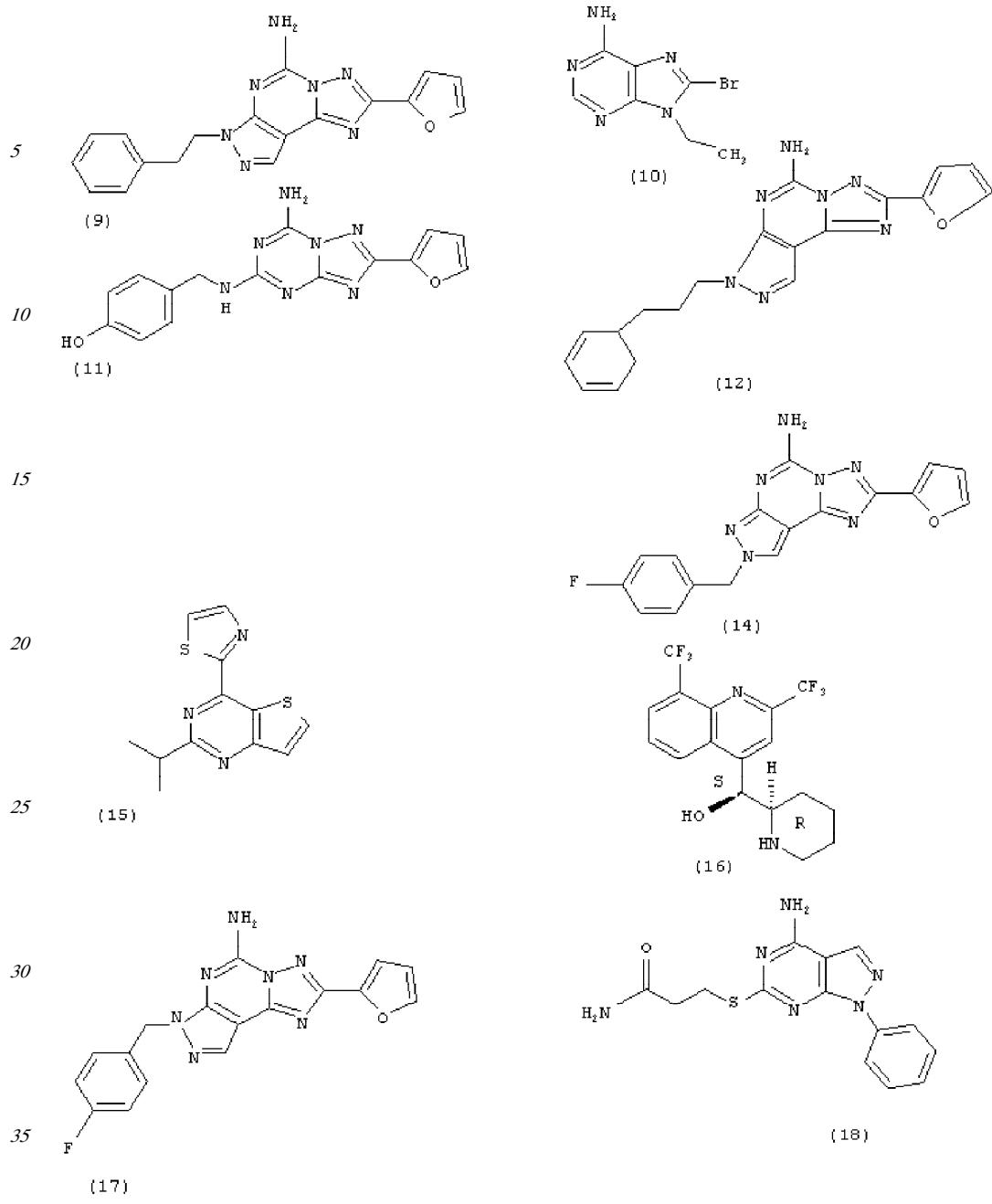
6. Применение по п.2, в котором в качестве селективного антагониста  $A_{2A}$  используют сложный эфир фосфорной кислоты и 3-(3-гидроксипропил)-8-[(E)-2-(3-метоксифенил)этенил]-7-метил-1-проп-2-инилпурин-2,6-диона, имеющего вышеприведенную структурную формулу (6).

7. Применение по п.1, в котором в качестве селективных антагонистов  $A_{2A}$  используют пиразолопирамидиновые производные.

8. Применение по п.1, в котором в качестве селективных антагонистов  $A_{2A}$  используют триазолохиноксалиновые производные.

9. Применение по п.1, в котором в качестве селективных антагонистов  $A_{2A}$  используют триазолотриазиновые производные.

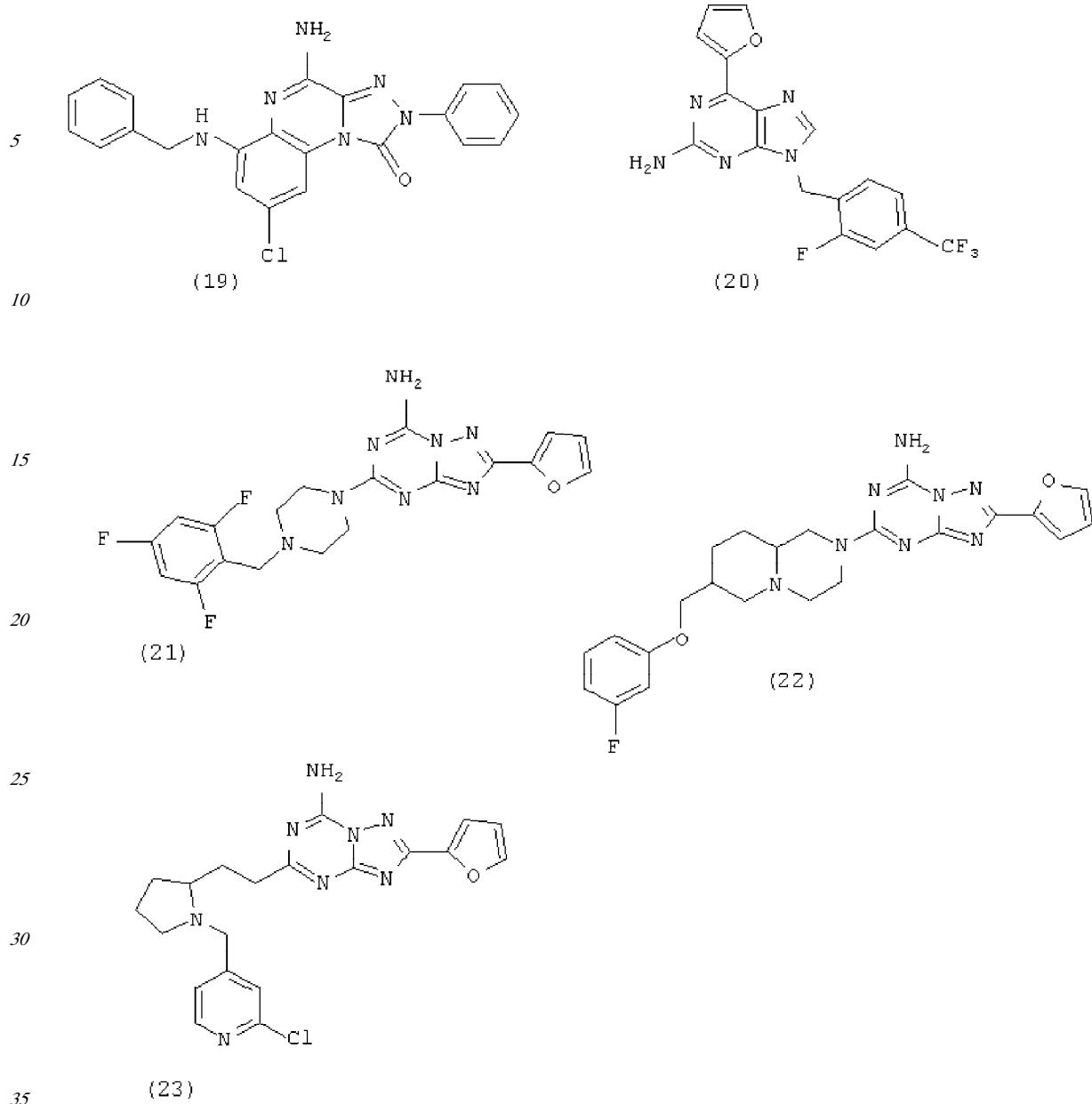
10. Применение по п.1, в котором в качестве селективных антагонистов  $A_{2A}$  используют соединения, имеющие структурные формулы, выбранные из группы, включающей в себя



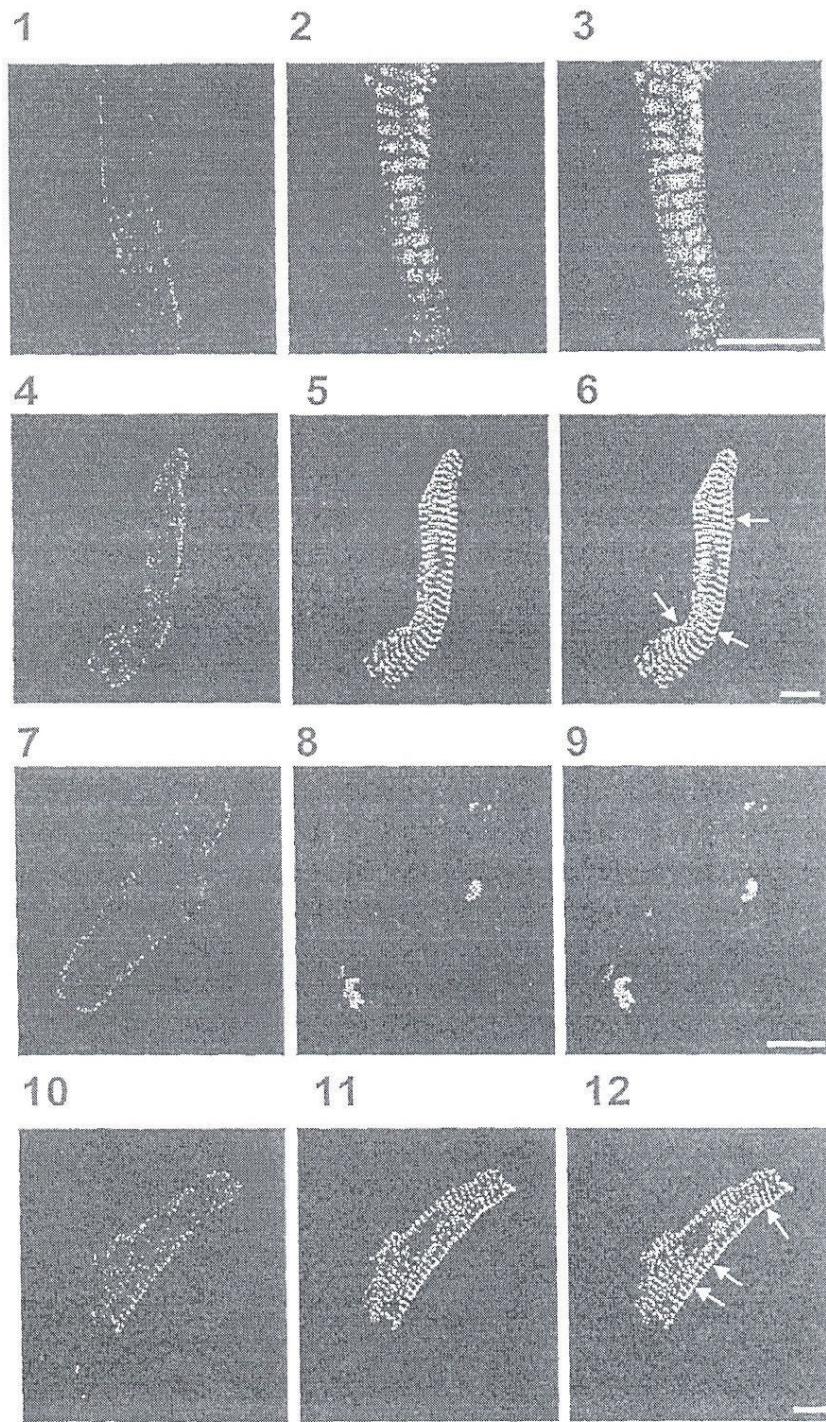
40

45

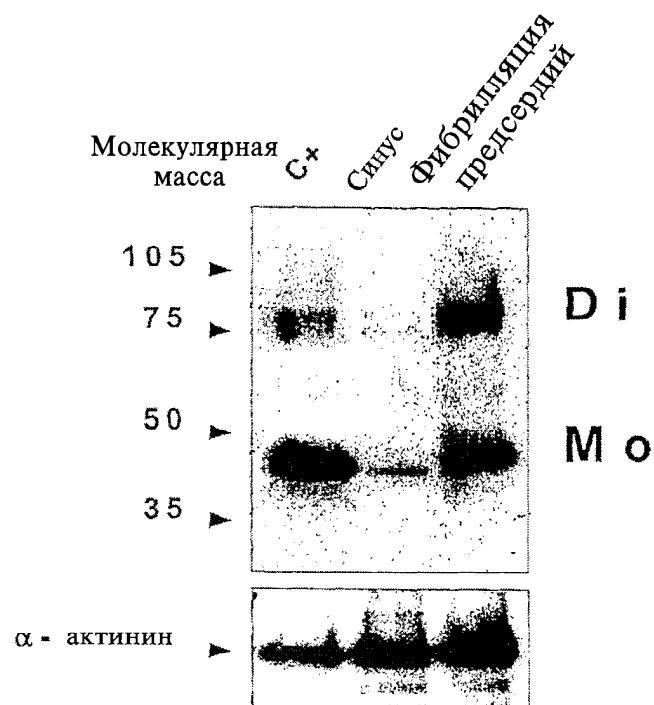
50



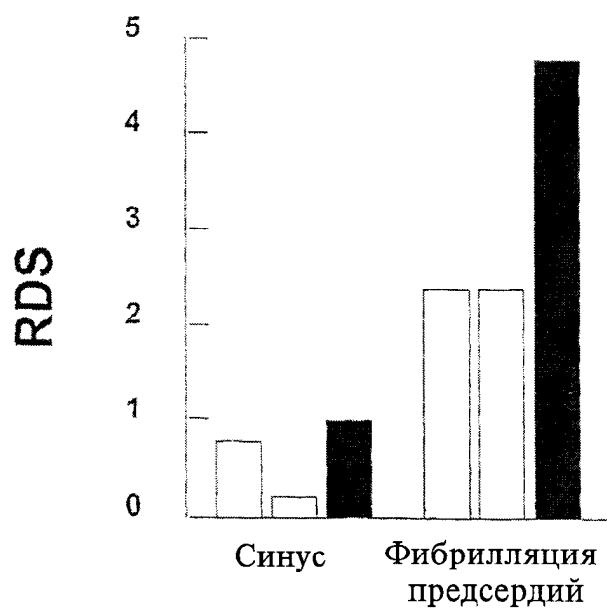
11. Применение по п.10, в котором в качестве селективного антагониста  $A_{2A}$  используют 2-пропан-2-ил-4-(1,3-тиазол-2-ил)тиено[2,3-*e*]пиrimидин, имеющий структурную формулу (15).



Фиг. 1

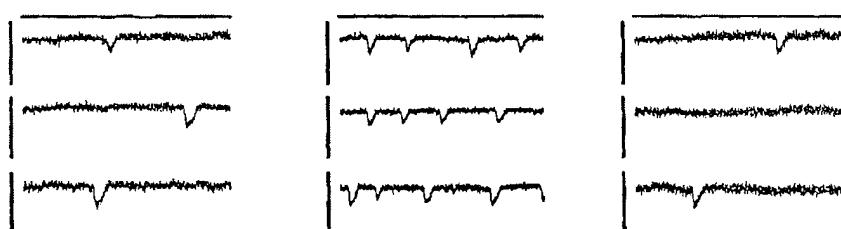


Фиг. 2

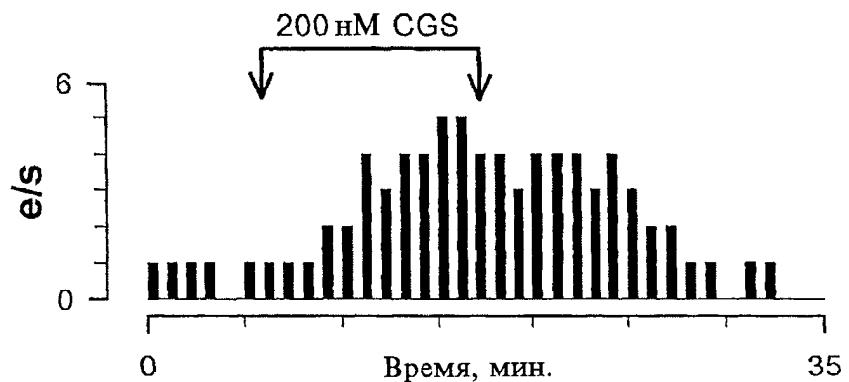


Фиг. 3

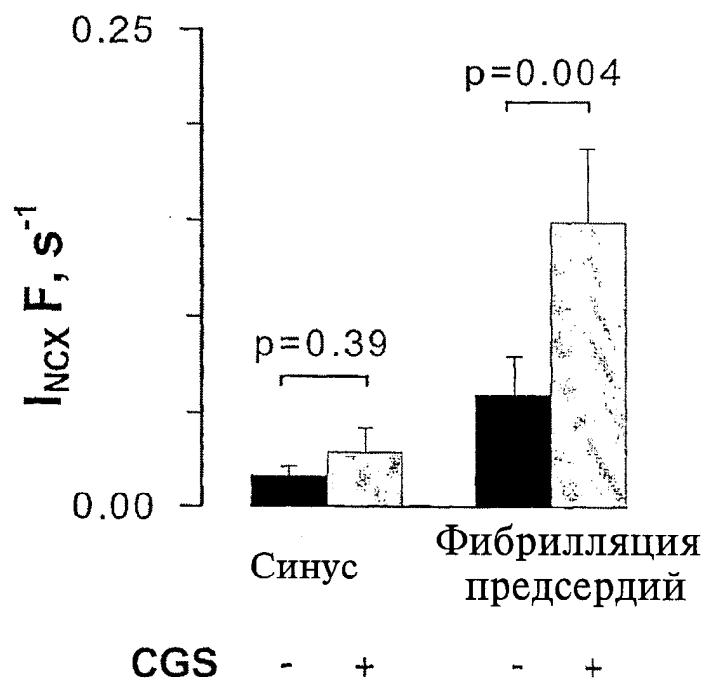
Контроль 200 nM CGS W



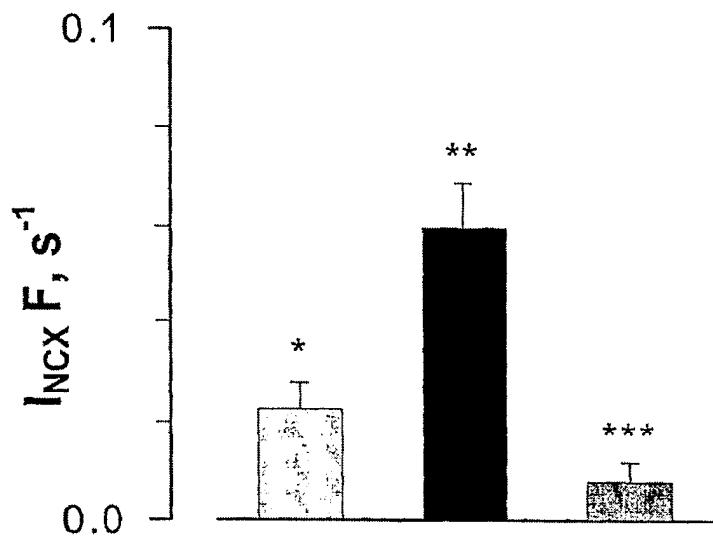
Фиг. 4



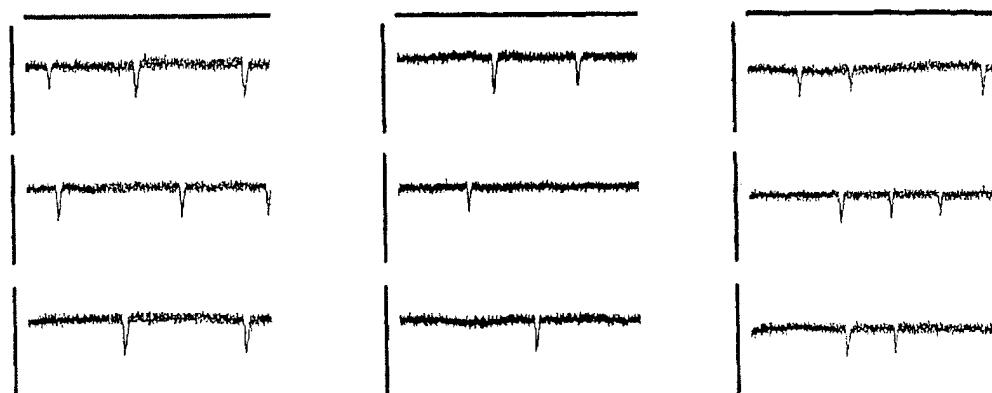
Фиг. 5



Фиг. 7



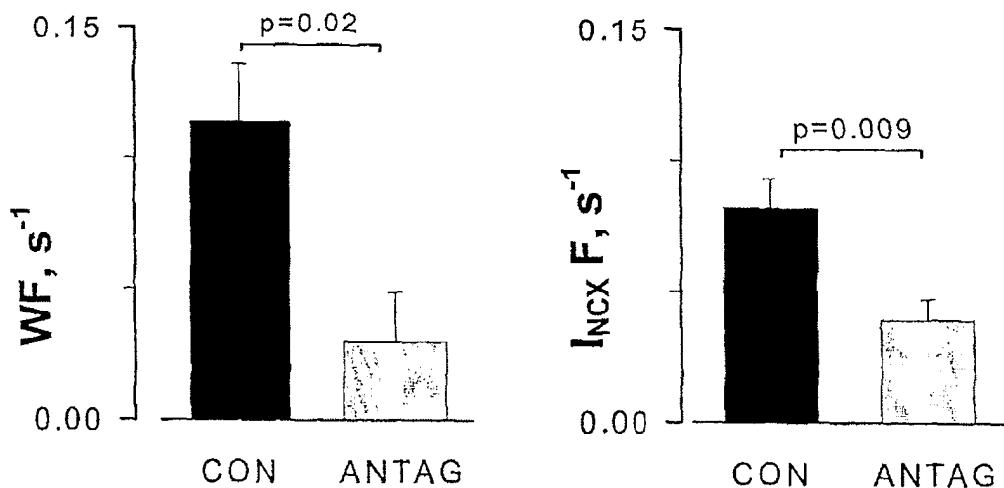
	CGS	H-89	50 nM SCH	W
Контроль	-	-		
	+	-	+	



Фиг. 9

Конфокальная  
визуализация

## Пэтч-кламп



Фиг. 10