

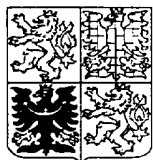
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

286 050

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2032-95**

(22) Přihlášeno: **08. 02. 94**

(30) Právo přednosti:

10. 02. 93 GB 93/9302636
16. 12. 93 GB 93/9325712
08. 02. 94 WO 94WO/18216

(40) Zveřejněno: **13. 12. 95**
(Věstník č. 12/95)

(47) Uděleno: **02. 11. 99**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **15. 12. 99**
(Věstník č. 12/99)

(86) PCT číslo: **PCT/GB94/00237**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 94/18216**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 H 19/20
A 61 K 31/70

(73) Majitel patentu:

ASTRA PHARMACEUTICALS LIMITED,
Kings Langley, GB;

(72) Původce vynálezu:

Ingall Anthony Howard, Loughborough, GB;
Cage Peter Alan, Shepshed, GB;
Kindon Nicholas David, Ibstock, GB;

(74) Zástupce:

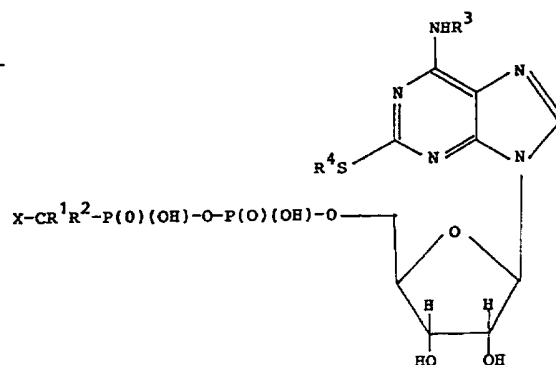
Traplová Jarmila JUDr., Přístavní 24, Praha
7, 17000;

(54) Název vynálezu:

N-Alkyl-2-substituované
adenosintrifosfátové deriváty, způsob
jejich přípravy a farmaceutické
kompozice tyto deriváty obsahující

(57) Anotace:

Sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém R¹ a R² znamenají atom vodíku nebo atom halogenu, R³ a R⁴ znamenají fenylovou skupinu nebo alkylovou skupinu, obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, případně substituovanou jedním nebo několika substituenty, zvolenými z množiny, zahrnující skupinu OR⁵, alkylthio-skupinu, obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, skupinu NR⁶R⁷, fenylovou skupinu, skupinu COOR⁸ a atom halogenu, R⁵, R⁶, R⁷ a R⁸ znamenají atom vodíku nebo alkylovou skupinu, obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, a X znamená kyselinový zbytek, a jejich farmaceuticky přijatelné soli.



N-Alkyl-2-substituované adenosintrifosfátové deriváty, způsob jejich přípravy a farmaceutické kompozice tyto deriváty obsahující

5 Oblast techniky

Vynález se týká nových farmaceutický použitelných sloučenin, způsobu jejich přípravy, farmaceutických kompozic, které tyto nové sloučeniny obsahují jako účinnou látku, a způsobu

10

Dosavadní stav techniky

Adenosintrifosfát (ATP) má potentní farmakologické účinky na různé tkáně. Účinnost adenosintrifosfátu a dalších dvou extracelulárních adeninových nukleotidů, tj. adenosindifosfátu (ADP) a adenosinmonofosfátu (AMP), je mediována P_2 -purinoreceptory. Nicméně potence adenosintrifosfátu může být v některých tkáních, například v močovém měchýři, snížena rychlou defosforylací za vzniku adenosinmonofosfátu a adenosinu, přičemž tato defosforylace je způsobena přítomností ektonukleotidáz v uvedených tkáních.

20

V nedávno provedených studiích byly za účelem zkoumání P_2 -purinoreceptorů, přítomných v různých tkáních, použity jako biologické sondy adenosintrifosfátové deriváty, které jsou rezistentní vůči defosforylaci:

25 Cusack a kol., Br. J. Pharmacol. 1987, 90, 791–792 popisují účinnost kyseliny 2-methylthio-5'-adenylové ve formě monoanhydridu s kyselinou methylenbisfosfonovou, kyseliny 2-methylthio-5'-adenylové ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou a kyseliny 2-methylthio-5'-adenylové ve formě monoanhydridu s kyselinou difluormethylenbisfosfonovou na tkáně podélných pruhů tračníku (*taenia coli*) a močového měchýře u morčete; Stone a Cusack, 30 Br. J. Pharmacol., 1989, 97, 631–635 popisují mezi jinými použití kyseliny 2-methylthio-5'-adenylové ve formě monoanhydridu s kyselinou difluormethylenbisfosfonovou při výzkumu P_2 -purinoreceptorů v krysím hippocampu (proužek tkáně v mozkové kůře); Maguire a Satchell popisují v „Physiological and Regulatory Functions of Adenosine and Adenine Nucleotides“, nakl. H. P. Baer a G. I. Drummond, Raven Press, New York (1979), str. 33–43 inhibici tkáně 35 podélných pruhů tračníku morčete indukovanou kyselinou 2-chlor-5'-adenylovou ve formě monoanhydridu s kyselinou methylenbisfosfonovou.

40 Cusack a Hourani v Nucleosides and Nucleotides, 1991, 10(5), 1019–1028 rovněž uvádí, že kyselina 2-methylthio-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou methylenbisfosfonovou inhibuje agregaci krevních destiček, indukovanou činidlem ADP-alfa-S.

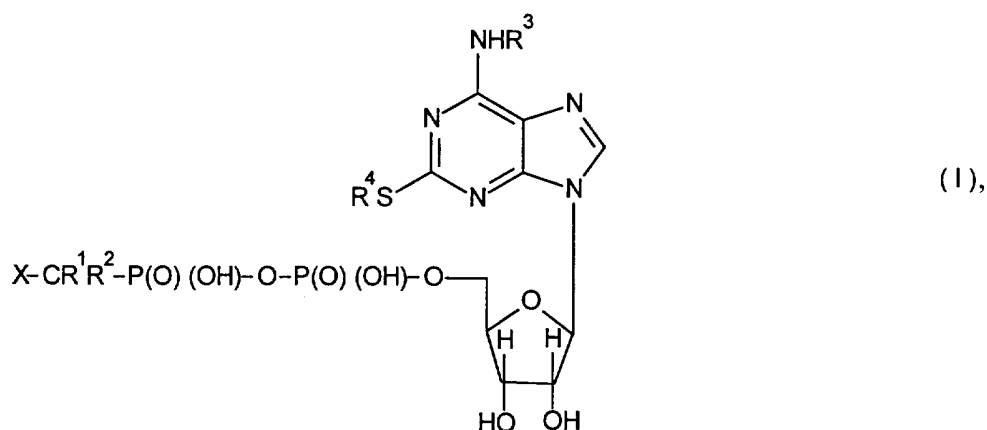
V mezinárodní patentové přihlášce WO 92/17488 (Fisons plc) jsou popsány některé 2-substituované adenosintrifosfátové deriváty a jejich inhibiční účinnost při agregaci krevních destiček.

45

Podstata vynálezu

50 Nyní byla nově zjištěna skupina N-alkyl-2-substituovaných adenosintrifosfátových derivátů, které vykazují farmakologickou účinnost.

Předmětem vynálezu tedy především je sloučenina obecného vzorce I



ve kterém

5 R^1 a R^2 nezávisle jeden na druhém znamenají atom vodíku nebo atom halogenu,

R^3 a R^4 nezávisle jeden na druhém znamenají fenylovou skupinu nebo alkylovou skupinu, obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, případně substituovanou jedním nebo několika substituenty z množiny, zahrnující skupinu OR^5 , alkylthioskupinu, obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, skupinu NR^6R^7 , fenylovou skupinu, skupinu $COOR^8$ a atom halogenu, přičemž

10 R^5 , R^6 , R^7 a R^8 každý nezávisle znamená atom vodíku nebo alkylovou skupinu, obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, a

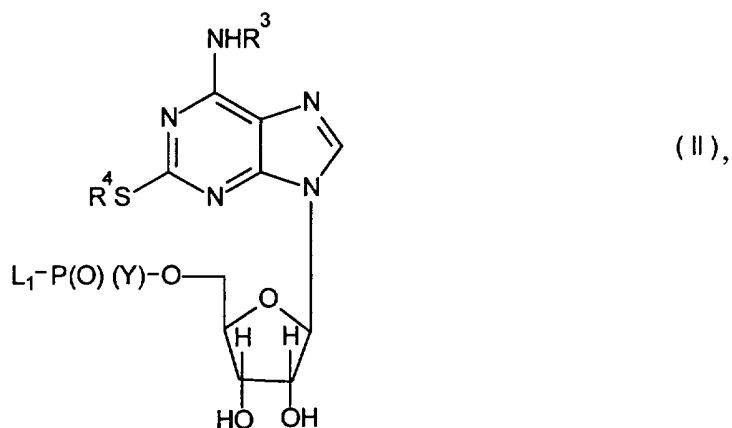
15 X znamená kyselinový zbytek $-P(O)(OH)_2$, $-SO_3H$ nebo $-CO_2H$,

a její farmaceuticky přijatelné soli.

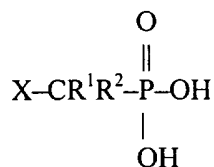
20 Sloučeniny obecného vzorce I mohou existovat v tautomerní, enantiomerní a diastereomerní formě, přičemž všechny tyto formy sloučeniny obecného vzorce I spadají do rozsahu vynálezu.

Dalším předmětem vynálezu je způsob přípravy sloučenin obecného vzorce I a jejich solí, jehož podstata spočívá v tom, že se

25 a) sloučenina obecného vzorce II nebo její sůl



ve kterém R^3 a R^4 mají výše uvedené významy, L_1 znamená odlučitelnou aminovou skupinu nebo atom halogenu a Y znamená (i) skupinu OH, nebo (ii) odlučitelnou skupinu L_2 , tvořenou atomem halogenu, jejíž funkční skupiny jsou případně chráněny ochrannými skupinami, uvede v reakci se sloučeninou obecného vzorce III



(III),

ve kterém R^1 , R^2 a X mají výše uvedené významy, jejíž funkční skupiny jsou případně chráněny ochrannými skupinami, nebo s její soli, načež se v případě, že Y v získané sloučenině znamená atom halogenu, provede hydrolyza této sloučeniny, a

b) případně se odstraní ochranné skupiny ze získané sloučeniny obecného vzorce I v případě, že jedna nebo několik funkčních skupin této sloučeniny je resp. jsou chráněny ochrannými skupinami, a

v případě, že je to žádoucí nebo nezbytné, potom se rezultující sloučenina obecného vzorce I nebo její jiná sůl převede na její farmaceuticky přijatelnou sůl nebo naopak.

V rámci reakčního stupně a) (i) v případě, že Y znamená skupinu OH, mohou odštěpitelné skupiny L_1 zahrnovat skupiny odvozené od aminů, například dialkylaminů, nebo od nasycených nebo nenasyčených cyklických aminů, přičemž zde lze zejména uvést morfolinylovou skupinu, imidazolylovou skupinu a triazolylovou skupinu. Uvedená reakce se výhodně provádí v rozpouštědle, výhodně v dipolárním aprotickém rozpouštědle, například v pyridinu, dimethylformamidu, acetonitrilu, triamidu kyseliny hexamethylfosforečné, N,N' -dimethylpropylenmočoviny nebo 1-methyl-2-pyrrolidinonu. Tato reakce může být provedena při teplotě -20 až 100 °C, například při teplotě 10 až 30 °C.

Sloučenina obecného vzorce II, ve kterém Y znamená skupinu OH, jsou buď známými sloučeninami, nebo mohou být připraveny o sobě známými způsoby, například způsoby, které jsou analogické se způsoby, popsány v mezinárodní patentové přihlášce WO 92/17488 (Fisons plc). Tak například sloučeniny obecného vzorce II, ve kterém L_1 znamená morfolinylovou skupinu, mohou být připraveny z odpovídajících 5'-monofosfátů působením morfolinu v přítomnosti kondenzačního činidla, jakým je dicyklohexylkarbodiimid, výhodně v přítomnosti protického rozpouštědla nebo směsi rozpouštědel, jakou je směs terc.butanolu a vody.

V rámci reakčního stupně a) (ii) v případě, že Y znamená odlučitelnou skupinu L_2 , mohou být odštěpitelnými skupinami L_1 a L_2 atomy halogenu, například atomy chloru. Odštěpitelné skupiny L_1 a L_2 mohou být odlišné, avšak výhodně jsou tyto odštěpitelné skupiny stejné. Sloučeniny obecného vzorce II, ve kterém Y znamená L_2 , mohou být připraveny z odpovídajícího nukleosidu reakcí s fosforylačním činidlem, nesoucím tři odlučitelné skupiny, tj. s činidlem $\text{POL}_1\text{L}_2\text{L}_3$. Jako konkrétní takové fosforylační činidlo je možné uvést POCl_3 . Získaná sloučenina obecného vzorce II nemusí být z reakční směsi izolována, nýbrž může být in situ uvedena v reakci se sloučeninou obecného vzorce III, načež následuje hydrolyza produktu, například báží katalyzovaná hydrolyza za použití uhličitanu sodného.

Nukleosidy a nukleosid-5'-monofosfáty, použité při přípravě sloučenin obecného vzorce II, jsou buď známými sloučeninami, nebo mohou být připraveny ze známých sloučenin za použití

Sloučeniny obecného vzorce III jsou buď známými sloučeninami, nebo mohou být připraveny ze známých sloučenin za použití známých postupů, popsanych například v mezinárodní patentové přihlášce WO 92/17488 (Fisons plc).

5

Při výše uvedeném způsobu může být nezbytné chránit některé funkční skupiny, například hydroxy- nebo amino-skupiny. V tomto případě reakční stupeň b) může zahrnovat odstranění jedné nebo několika ochranných skupin.

- 10 Vhodné ochranné skupiny a způsoby jejich odstranění jsou například popsané v „Protective Groups in Organic Synthesis“, T. Greene a P. G. M. Wutts, John Wiley and Sons Inc., 1991. Hydroxy-skupiny mohou být například chráněny arylmethylovými skupinami, jakými jsou fenylmethylová skupina, difenylmethylová skupina nebo trifenylmethylová skupina, acylovými skupinami, jakými jsou acetylová skupina, trichloracetylová skupina nebo trifluoracetylová skupina, nebo jako tetrahydropyranylové deriváty. Vhodné ochranné skupiny aminové funkce zahrnují arylmethylové skupiny, jakými jsou benzylová skupina, (R,S)-alfa-fenylethylová skupina, difenylmethylová skupina nebo trifenylmethylová skupina, a acylové skupiny, jakými jsou acetylová skupina, trichloracetylová skupina nebo trifluoracetylová skupina. Při odstraňování ochranných skupin (deprotekcí) mohou být použity konvenční postupy, jakými jsou zejména hydrogenolýza, kyselá nebo bazická hydrolýza nebo fotolýza. Arylmethylové skupiny mohou být například odstraněny hydrogenolýzou v přítomnosti kovového katalyzátoru, jakým je například palladium na aktivním uhlí. Tetrahydropyranylové skupiny mohou být odštěpeny hydrolýzou za kyselých podmínek. Acylové skupiny mohou být odstraněny hydrolýzou za použití báze, jakou je hydroxid sodný nebo uhličitán draselný. Skupina, jakou je trichloracetylová skupina, může být odstraněna redukcí, například za použití systému zinek/kyselina octová.
- 20
- 25

Sloučeniny obecného vzorce I a jejich soli mohou být z jejich reakčních směsí izolovány za použití konvenčních postupů.

30

- Soli sloučenin obecného vzorce I mohou být připraveny reakcí volné kyseliny nebo její soli, nebo volné báze nebo její soli nebo jejího derivátu, s jedním nebo několika ekvivalenty příslušné báze nebo kyseliny. Tato reakce může být provedena v rozpouštědle nebo v prostředí, ve kterém je sůl nerozpustná, nebo v rozpouštědle, ve kterém je sůl rozpustná, například v ethanolu, tetrahydrofuranu nebo diethyletheru. Toto rozpouštědlo může být odstraněno za vakua nebo lyofilizací. Uvedenou reakci může být také výměnná reakce, nebo může být provedena na iontoměničové pryskyřici.
- 35

- Farmaceuticky přijatelné soli sloučenin obecného vzorce I zahrnují soli alkalických kovů, například sodné a draselné soli, soli kovů alkalických zemin, například vápenaté a hořečnaté soli, soli prvků III. skupiny periodického systému prvků, například hlinité soli, a amonné soli. Soli s vhodnými organickými bázemi zahrnují například soli s hydroxylaminem, s nižšími alkylaminy, například methylaminem nebo ethylaminem, se substituovanými nižšími alkylaminy, například s hydroxy-substituovanými alkylaminy, nebo s monocyklickými dusíkatými heterocyklickými sloučeninami, například s piperidinem nebo morfolinem, s aminokyselinami, například s argininem nebo lysinem, nebo s jejich N-alkyl-deriváty nebo s aminocukrem, například s N-methyl-D-glukaminem nebo glukosaminem. Výhodnými solemi jsou netoxické farmaceuticky přijatelné soli, i když vhodné jsou i další soli, které mohou být například použity při izolaci nebo čištění produktu.
- 40
- 45

50

Sloučeniny obecného vzorce I mohou vykazovat tautometrii, například imin-enaminovou tautomerii v poloze 6 adeninu. Tyto sloučeniny rovněž obsahují jeden nebo několik asymetrických uhlíků a vykazují tudíž i optickou nebo/a diastereomerní izomerii. Jednotlivé diastereomery mohou být rozděleny za použití konvenčních postupů, například chromatografií

nebo frakční krystalizací. Jednotlivé optické izomery mohou být izolovány rozdělením racemické nebo jiné směsi za použití konvenčních postupů, například za použití frakční krystalizace nebo velmi rychlé kapalinové chromatografie. Alternativně mohou být požadované optické izomery připraveny reakcí příslušného opticky aktivního výchozího produktu za podmínek, při kterých nedochází k racemizaci.

Alkylové skupiny ve významu obecných substituentů R^3 až R^8 zahrnují přímé nebo rozvětvené nebo cyklické nasycené nebo nenasycené alkylové skupiny.

Atomy halogenů ve významu obecných substituentů R^1 a R^2 zahrnují fluor, chlor, brom a jod.

Výhodnými sloučeninami jsou sloučeniny, ve kterých R^1 a R^2 jsou stejné. Obzvláště výhodnými sloučeninami jsou sloučeniny, ve kterých R^1 a R^2 znamenají chlor.

Výhodnými sloučeninami jsou sloučeniny, ve kterých R^3 a R^4 znamenají alkylovou skupinu, obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a případně substituovanou jedním nebo několika substituenty, zvolenými z množiny, zahrnující skupinu OR^5 , alkylthioskupinu, obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, skupinu NR^6R^7 , fenylovou skupinu, skupinu $COOR^8$ a atom halogenu.

Atomy halogenů, kterými mohou být substituovány R^3 a R^4 , zahrnují atom chloru, atom bromu a atom jodu a zejména atom fluoru.

Výhodnými sloučeninami jsou sloučeniny, ve kterých R^3 znamená alkylovou skupinu, obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a případně substituovanou alkylthio-skupinou, obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů. Specifické alkylové skupiny ve významu obecného substituentu R^3 zahrnují propylovou a butylovou skupinu a zejména ethylovou skupinu. Specifické substituované alkylové skupiny ve významu obecného substituentu R^3 zahrnují zejména 2-(methylthio)-ethylovou skupinu.

Výhodnými sloučeninami jsou sloučeniny, ve kterých R^4 znamená alkylovou skupinu, obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a případně substituovanou jedním nebo několika, například třemi, atomy halogenů. Specifické skupiny ve významu obecného substituentu R^4 zahrnují propylovou skupinu a 3,3,3-trifluorpropylovou skupinu.

Kyselinové zbytky ve významu obecného substituentu X zahrnují zbytky Bronsted–Lowryho kyselin, tj. zbytky, které působí jako protonové donory. Tyto kyselinové zbytky mohou být zbytky mono- nebo polykyselin. Specifickými takovými kyselinovými zbytky mohou být $-P(O)(OH)_2$, $-SO_3H$ a $-CO_2H$.

Výhodnými sloučeninami jsou sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém Z znamená $-P(O)(OH)_2$.

Sloučeniny obecného vzorce I jsou využitelné vzhledem k jejich farmakologické účinnosti u savců. Tyto sloučeniny se uplatňují zejména v rámci inhibice agregace krevních destiček.

Potence sloučenin obecného vzorce I jakožto inhibitorů agregace krevních destiček může být stanovena na základě jejich schopnosti působit jako antagonistující činidla receptorů P_{2T} , což je patrné z dále zařazeného příkladu X.

Sloučeniny podle vynálezu mohou být využity v rámci jakéhokoliv stavu, u kterého dochází k agregaci krevních destiček. Tyto sloučeniny mohou takto působit jako antitrombotická činidla a jsou indikována pro léčení nebo profylaxi nestabilní angíny, tromboembolické příhody a periferního vaskulárního onemocnění. Tyto sloučeniny mohou být také indikovány pro léčení a profylaxi následků trombotických komplikací, spojených s angioplastikou, trombolýzou,

endarterektomií, koronární a vaskulární implantátovou chirurgií, renální dialýzou a kardio-pulmonárními odklony (bypass).

5 Další indikace sloučenin podle vynálezu zahrnují léčení nebo profylaxi roztroušené intravaskulární koagulace, hloubové žilní trombózy, preeklampsie a eklampsie, regeneraci tkání po chirurgických nebo úrazových traumatech a léčení a profylaxi vaskulitidy, artritidy, trombocytémie, ischemie a migrény.

10 Dalším předmětem vynálezu jsou proto výše definované sloučeniny obecného vzorce I jako léčiva.

Dalším předmětem vynálezu je použití sloučeniny obecného vzorce I nebo její farmaceuticky přijatelné soli při výrobě farmaceutické kompozice pro léčení stavu, u kterého dochází k agregaci krevních destiček.

15 Použitelné dávky sloučenin podle vynálezu se budou v široké míře měnit v závislosti mezi jinými na konkrétní použité účinné sloučenině obecného vzorce I, na způsobu podání, na léčeném stavu a na stupni jeho vážnosti. Nicméně pro člověka může být obecně vhodná celková denní dávka, pohybující se od 0,1 mg do 1000 mg, přičemž tato denní dávka může být podávána v dílčích
20 dávkách, například až šestkrát denně. V případě, že má být sloučenina podle vynálezu podávána infuzí, potom se typicky člověku zavádí například 0,5 µg účinné látky na kilogram tělesné hmotnosti za minutu.

25 Sloučeniny podle vynálezu se obecně podávají ve formě farmaceutické kompozice.

Dalším předmětem vynálezu je tato farmaceutická kompozice, která obsahuje výhodně méně než 80 % hmotnosti, výhodněji méně než 50 % hmotnosti a například 0,1 až 20 % hmotnosti sloučeniny obecného vzorce I nebo její farmaceuticky přijatelné soli v kombinaci s farmaceuticky přijatelným ředidlem nebo nosičem.

30 Vynález se rovněž týká způsobu přípravy takové farmaceutické kompozice, jehož podstata spočívá ve smíšení jednotlivých složek.

35 Dále jsou uvedeny příklady použitelných farmaceutických formulací a vhodných ředidel nebo nosičů:

pro intravenózní injekci nebo infuzi: purifikovaná voda nebo fyziologický roztok,

40 pro inhalační kompozice: hrubozrnná laktóza,

pro tablety, kapsle a dražé: mikrokrytalická celulóza, fosforečnan vápenatý, rozsvivková zemina, cukr, jako například laktóza, dextróza nebo manitol, talek, kyselina stearová, škrob, hydrogenuhličitan sodný nebo/a želatina,

45 pro čípky: přírodní nebo ztužené oleje nebo vosky.

V případě, že má být sloučenina podle vynálezu použita ve formě vodného roztoku, například za účelem infuze, potom může být nezbytné i přidání dalších pomocných látek. V tomto smyslu zde lze zejména zmínit chelatizační nebo sekvestrační činidla, antioxidační přísady, činidla
50 nastavující tonicitu, činidla upravující hodnotu pH a pufry.

Roztoky, obsahující sloučeninu obecného vzorce I, mohou být případně zbaveny rozpouštědla, například lyofilizací nebo rozprašovacím sušením, přičemž se získá pevná kompozice, která může být před vlastním použitím opět rekonstituována přidáním příslušného kapalného podílu.

- 5 V případě, že sloučenina obecného vzorce I není použita ve formě roztoku, potom má pevná forma této sloučeniny výhodně hmotnostní střední průměr částic v rozmezí od 0,01 do 10 μm . Tyto kompozice mohou rovněž obsahovat vhodná konzervační, stabilizační a smáčecí činidla, solubilizační činidla, například ve vodě rozpustný celulóзовý polymer, jakým je hydroxypropylmethylcelulóza, nebo ve vodě rozpustný glykol, jakým je propylenglykol, sladidla, barviva a ochucovadla. V případě, že je to žádoucí, může být farmaceutická kompozice podle vynálezu
10 formulována jako kompozice s prolongovaným uvolňováním účinné látky.

- Vynález se také týká způsobu léčení stavu, při kterém dochází k agregaci krevních destiček, jehož podstata spočívá v tom, že se pacientovi, trpícímu uvedeným stavem, podá terapeuticky
15 účinné množství sloučeniny obecného vzorce I.

- Výhoda sloučenin podle vynálezu spočívá v tom, že mají omezené vedlejší účinky. Tyto sloučeniny například v menší míře způsobují hypotermii, jak je to demonstrováno v dále zařazeném příkladu Y, mají delší dobu účinku, jsou méně toxické, jsou účinnější, potentnější,
20 stabilnější a snadněji absorbovatelné, snadněji se z těla vylučují, mají širší spektrum účinku nebo mají další užitečné farmakologické vlastnosti, a to ve srovnání s dosud známými sloučeninami.

- V následující části bude vynález blíže vysvětlen pomocí konkrétních příkladů jeho provedení, přičemž tyto příklady mají pouze ilustrační charakter a nikterak neomezují rozsah vynálezu,
25 který je jednoznačně vymezen definicí patentových nároků. Při pojmenování sloučenin bylo použito nomenklatury, běžné v Chemical Abstracts.

Příklady provedení vynálezu

30

Příklad 1

- Kyselina N-ethyl-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlor-
35 methylenbisfosfonovou, tetrasodná sůl

a) N-Ethyl-2-(propylthio)adenosin

- 9-(2,3,5-Tris-O-acetyl-beta-D-ribofuranosyl)-6-chlor-2-(propylthio)purin (1,3 g) a ethyl-
40 amin (1,6 ml) v dioxanu (30 ml) a vodě (30 ml) se zahřívá v uzavřeném autoklávu na teplotu 110 °C po dobu 20 hodin. Po ochlazení na okolní teplotu a odpaření se získá zbytek, který se rekrystalizuje z ethylacetátu. Dalším čištěním, provedením chromatograficky na silikagelu za použití eluční soustavy, tvořené směsí methanolu a ethylacetátu v objemovém poměru 1:15, se získá požadovaná sloučenina.

45

Výtěžek: 0,46 g,

hmotové spektrum (FAB, Fast Atom Bombardment = ionizace rychlými atomy): 370 (M+H, 100%), 238 (30%).

50

b) Monoamonná sůl kyseliny N-ethyl-2-(propylthio)-5'-adenylové

K míchanému roztoku produktu ze stupně a) (0,4 g) v triethylfosfátu (12 ml) o teplotě 0 °C se přidá oxychlorid fosforečný (0,66 g). Po 4 hodinách a 30 minutách se reakční směs nalije do směsi ledu a vody (100 g), obsahující hydrogenuhličitan sodný (1,45 g). Po 45 minutách se roztok promyje etherem (2 x 100 ml) a nanese na sloupec pryskyřice Dowex 50W X 8 v H⁺-cyklu. Sloupec se potom promývá vodou až do okamžiku, kdy eluát má hodnotu pH rovnou 6, načež se sloupec eluuje 2M roztokem hydroxidu amonného. Po lyofilizaci příslušné frakce eluátu se získá požadovaná sloučenina.

Výtěžek: 0,32 g.

³¹P–nukleární magnetickorezonanční spektrum:
delta (D₂O): 2,03 (s).

c) N–Ethyl–2–(propylthio)–5′–adenylová kyselina ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, tetrasodná sůl.

Produkt ze stupně b) (0,38 g) a tributylamin (0,15 g) se sloučí v malém objemu pyridinu a roztok se odpaří k suchu. Po azeotropním vysušení za použití pyridinu (3 x 15 ml) a bezvodého N,N–dimethylformamidu (2 x 15 ml) se získá zbytek, který se vyjme bezvodým N,N–dimethylformamidem (10 ml). Přidá se karbonyldiimidazol (0,66 g), načež se po 4 hodinách při okolní teplotě přidá methanol (0,209 g). Po 30 minutách se přidá mono(tributylamoniová) sůl kyseliny dichlormethylenbisfosfonové (2,09 g) v bezvodém N,N–dimethylformamidu (30 ml) a získaná směs se míchá při okolní teplotě po dobu 18 hodin. Po filtraci a odpaření se získá zbytek, který se chromatograficky přečistí na sloupci DEAE–Sephadexu za použití elučního činidla, tvořeného 0 až 0,6M triethylamoniumhydrogenuhličitanem. Po lyofilizaci se získá triethylamoniová sůl, která se převede na sodnou sůl rozpuštěním v methanolu (2 ml) a přidáním roztoku jodidu sodného (1M v acetonu, 30 ml). Sraženina se izoluje odstředěním, promyje opakovaným suspendováním v acetonu (4 x 40 ml) a znovu odstředí. Nakonec se pevný podíl rozpustí ve vodě a lyofilizuje, přičemž se získá požadovaná sloučenina ve formě bezbarvého práškového produktu.

Výtěžek: 0,25 g,

³¹P–nukleární magnetickorezonanční spektrum:
delta (D₂O): 9,00 (d, J=18,6Hz), 1,18 (dd, J=18,6Hz, J=30,4Hz), –9,35 (d, J=30,4Hz).

Příklad 2

Kyselina N–Butyl–2–(propylthio)–5′–adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, tetrasodná sůl

a) N–Butyl–2–(propylthio)adenosin

Požadovaná sloučenina se připraví postupem podle příkladu 1a).

Hmotové spektrum (FAB) 398 (M+H, 100%).

b) Kyselina N–butyl–2–(propylthio)–5′–adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, tetrasodná sůl

K roztoku produktu ze stupně a) (1,8 g) v triethylfosfátu (50 ml) se za chlazení přidá oxychlorid fosforečný (1,39 g), přičemž tento přídatek se provádí po kapkách. Získaný roztok se míchá při okolní teplotě po dobu 4 hodin.

- 5 K míchané suspenzi mono(tributylamoniové) soli (5,76 g) v triethylfosfátu (60 ml) se přidá tributylamin (2,16 ml). Po jednohodinovém míchání při okolní teplotě se získaný roztok nalije v průběhu 15 minut do výše popsaného roztoku. Po čtyřhodinovém míchání se reakční směs nalije do 5% vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného (113 ml) a získaná směs se míchá po dobu 18 hodin. Získaný roztok se promyje etherem (4 x 50 ml) a potom lyofilizuje. Po přečištění na silikagelu s reverzní fází C₁₈ za použití elučního činidla, tvořeného 4% solankou a potom vodou, se získá požadovaná sůl ve formě bezbarvého pevného produktu.

Výtěžek: 0,69 g,

- 15 ³¹P–nukleární magnetickorezonanční spektrum:
delta (D₂O): 9,70 (d, J=18,4Hz), 3,4 (dd, J=18,4Hz, J=30,5Hz), -9,19 (d, J=30,5Hz).

Příklad 3

20

Za použití postupu podle příkladu 2 se připraví následující sloučeniny:

- a) Kyselina N–propyl–2–(propylthio)–5′–adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, tetrasodná sůl.

25

- i. N–Propyl–2–(propylthio)adenosin.

Hmotové spektrum (FAB): 384 (M+H⁺, 100%).

- 30 ii. Kyselina N–propyl–2–(propylthio)–5′–adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, tetrasodná sůl.

³¹P–nukleární magnetickorezonanční spektrum:
delta (D₂O): 8,92 (d, J=18,5Hz), 1,07 (dd, J=18,7Hz, J=29,0Hz), -9,4 (d, J=29,4Hz).

35

- b) Kyselina N–(1–methylethyl)–2–(propylthio)–5′–adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, diamonná sůl.

- i. N–(1–Methylethyl)–2–(propylthio)adenosin,

40

hmotové spektrum (FAB): 384 (M+H⁺, 100%), 252.

- ii. Kyselina N–(1–methylethyl)–2–(propylthio)–5′–adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, diamonná sůl.

45

Další přečištění surového produktu chromatografií na DEAE–Sephadexu za použití elučního činidla, tvořeného 0 až 0,6M roztokem hydrogenuhličitanu amonného, poskytne požadovanou sůl.

- 50 ³¹P–Nukleární magnetickorezonanční spektrum:
delta (D₂O): 8,71 (d, J=18,6Hz), 0,38 (dd, J=19,1Hz, J=28,7Hz), -9,49 (d, J=29,0Hz).

c) Kyselina N-(2-methoxyethyl)-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, tetrasodná sůl.

i. N-(2-Methoxyethyl)-2-(propylthio)adenosin.

Hmotové spektrum (FAB): 400 ($M+H^+$, 100%), 268.

ii. Kyselina N-(2-methoxyethyl)-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, tetrasodná sůl.

^{31}P -Nukleární magnetickorezonanční spektrum:

delta (D_2O): 9,05 (d, $J=18,7\text{Hz}$), 1,44 (dd, $J=18,8\text{Hz}$, $J=29,3\text{Hz}$), -9,40 (d= $29,5\text{Hz}$).

d) Kyselina N-cyklopentyl-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, tetrasodná sůl.

i. N-Cyklopentyl-2-(propylthio)adenosin.

Hmotové spektrum (FAB): 410 ($M+H^+$), 278 (100%).

ii. tKyselina N-cyklopentyl-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, tetrasodná sůl.

Elementární analýza:

$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{Na}_4\text{O}_{12}\text{P}_3\text{S}$

	C(%)	H(%)	N(%)	S(%)
vypočteno:	24,56	4,30	7,53	3,44
nalezeno:	24,43	4,43	7,52	3,76

e) Kyselina N-fenyl-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, tetrasodná sůl.

i. N-Fenyl-2-(propylthio)adenosin.

Hmotové spektrum (FAB): 418 ($M+H^+$, 100%), 278.

ii. Kyselina N-fenyl-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, tetrasodná sůl.

^{31}P -nukleární magnetickorezonanční spektrum:

delta (D_2O): 8,98 (d, $J=18,3\text{ Hz}$), 2,70 (dd, $J=18,3\text{Hz}$, $J=30,6\text{Hz}$), -9,89 (d, $J=30,6\text{ Hz}$).

f) Kyselina N-(2,2,2-trifluorethyl)-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, tetrasodná sůl.

i. N-(2,2,2-Trifluorethyl)-2-(propylthio)adenosin.

Hmotové spektrum (FAB): 424 ($M+H^+$), 292 (100%).

ii. Kyselina N-(2,2,2-trifluorethyl)-2-propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, tetrasodná sůl.

Hmotové spektrum (FAB): 822, 820, 818 ($M+H^+$), 115 (100%).

g) Kyselina N-(methoxykarbonylmethyl)-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, trisodná sůl.

5 i. N-(Methoxykarbonylmethyl)-2-(propylthio)adenosin

Elementární analýza:

$C_{16}H_{23}N_5O_6S$

	C(%)	H(%)	N(%)	S(%)
10 vypočteno:	46,48	5,61	16,94	7,76
nalezeno:	46,44	5,43	16,80	7,67

ii. Kyselina N-(methoxykarbonylmethyl)-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, triamonná sůl.

15

Dalším přečištěním surového produktu chromatografií na DEAE-Sephadexu za použití elučního činidla, tvořeného 0 až 0,6M roztokem hydrogenuhličitanu amonného, se získá požadovaná sůl.

^{31}P -nukleární magnetickorezonanční spektrum:

20 delta (D_2O): 9,05 (d, $J=18,7Hz$), 1,44 (dd, $J=18,8Hz$, $J=29,3Hz$), -9,40 (d, $J=29,5Hz$).

h) Kyselina N-/2-(methylthio)ethyl/-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monohydrátu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, triamonná sůl.

25 i. N-/2-(Methylthio)ethyl/-2-(propylthio)adenosin.

Hmotové spektrum (FAB): 416 ($M+H^+$, 100%).

ii. Kyselina N-/2-methylthio)ethyl/-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, triamonná sůl.

30

Dalším přečištěním surového produktu chromatografií na DEAE-Sephadexu za použití elučního činidla, tvořeného 0 až 0,6M hydrogenuhličitanem amonným, se získá požadovaná sůl.

^{31}P -nukleární magnetickorezonanční spektrum:

35 delta (D_2O): 8,68 (d, $J=18,6Hz$), 0,33 (dd, $J=18,9Hz$, $J=29,0Hz$), -9,53 (d, $J=29,0Hz$).

j) Kyselina N-/2-(N,N-dimethylamino)ethyl/-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, trisodná sůl.

40

i. N-/2-(N,N-dimethylamino)ethyl/-2-(propylthio)adenosin.

Hmotové spektrum (FAB): 413 ($M+H^+$, 100%).

ii. Kyselina N-/2-(N,N-dimethylamino)ethyl/-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, trisodná sůl.

45

Hmotové spektrum (FAB): 789, 787, 785 ($M+H^+$), 93 (100%).

Příklad 4

Kyselina 2-(cyklohexylthio)-N-ethyl-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, tetrasodná sůl

5

a) 9-(2,3,5-Tri-O-acetyl-beta-D-ribofuranosyl)-6-chlor-2-(cyklohexylthio)purin.

K roztoku 2-amino-9-(2,3,5-tri-O-acetyl-beta-D-ribofuranosyl)-6-chlorpurinu (10,0 g) v acetonitrilu (200 ml) se přidá dicyklohexyldisulfid (51,5 g) a izoamylnitrit (16,96). Získaný roztok se odplyní dusíkem a potom zahřívá na teplotu 60 °C po dobu 16 hodin. Roztok se zahustí a zbytek se přečistí chromatograficky na sloupci silikagelu za použití eluční soustavy, tvořené směsí ethylacetátu a petroletheru v objemovém poměru 1:1, přičemž se získá požadovaná sloučenina ve formě oranžového gumovitého produktu.

15 Výtěžek: 3,88 g,

hmotové spektrum (EI): 528, 526 (M^+), 43 (100%).

b) 2-(Cyklohexylthio)-N-ethyladenosin.

20

Požadovaná sloučenina se připraví postupem podle příkladu 1a) za použití produktu ze stupně a). Hmotové spektrum (FAB): 410 ($M+H^+$, 100%).

25 c) Kyselina 2-(cyklohexylthio)-N-ethyl-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, tetrasodná sůl.

Požadovaná sloučenina se připraví postupem podle příkladu 2b) za použití produktu ze stupně b).

^{31}P -nukleární magnetickorezonanční spektrum:

30 delta (D_2O): 9,85 (d, $J=18,5\text{Hz}$), 3,85 (dd, $J=18,5\text{Hz}$, $J=30,4\text{Hz}$), -9,07 (d, $J=30,4\text{Hz}$).

Příklad 5

35 Kyselina N-ethyl-2-/(3,3,3-trifluorpropyl)thio/-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenfosfonovou, trisodná sůl

a) 2-/(3,3,3-Trifluorpropyl)thio/adenosin.

40 Suspenze hydridu sodného (60%, 1,453 g) a adenosin-2-thio-monohydrát (5,35 g) v N,N-dimethylformamidu (80 ml) se míchá při okolní teplotě po dobu jedné hodiny, načež se k ní přidá 3-chlor-1,1,1-trifluorpropan (6,6 ml). Po 5 denním míchání se roztok zahustí a zbytek se rozdělí mezi ethylacetát (250 ml) a vodu (150 ml). Organická fáze se vysuší a zahustí. Po chromatografickém přečištění na silikagelu za použití eluční soustavy, tvořené směsí dichlormethanu a methanolu v objemovém poměru 9:1, se získá požadovaná sloučenina ve formě bezbarvého pevného produktu.

45

Výtěžek: 5.55 g,

50 hmotové spektrum (FAB): 396 ($M+H^+$, 100%).

b) N-Acetyl-2-/(3,3,3-trifluorpropyl)thio/adenosin-2',3',5'-triacetát.

Produkt ze stupně a) (5,28 g) a bezvodý octan sodný (0,723 g) v anhydridu kyseliny octové (42 ml) se míchá při teplotě 80 °C po dobu 6 hodin a 30 minut. Roztok se zředí vodou (100 ml), míchá při okolní teplotě po dobu 18 hodin a potom extrahuje dichlormethanem (4 x 200 ml). Sloučené organické extrakty se promyjí nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (200 ml) a potom odpaří, načež se zbytek chromatografuje na silikagelu za použití eluční soustavy, tvořené směsí diethyletheru a methanolu v objemovém poměru 97:3. Získá se požadovaná sloučenina ve formě bezbarvého pěnitého produktu.

Výtěžek: 5,35 g,

hmotové spektrum (FAB): 564 ($M+H^+$), 139 (100%).

c) N-Acetyl-N-ethyl-2'-(3,3,3-trifluorpropyl)thio/adenosin-2',3',5'-triacetát.

Produkt z reakčního stupně b) (5,12 g) v N,N-dimethylformamidu (100 ml) se v průběhu 3 hodin přidá k suspenzi hydridu sodného (60%, 0,443 g) v N,N-dimethylformamidu (100 ml), obsahující ethyljodid (2,2 ml). Po 2 denním míchání se roztok odpaří a zbytek se vyjme ethylacetátem (300 ml) a potom promyje vodou (3 x 100 ml). Organická fáze se zahustí a zbytek se přečistí chromatograficky na silikagelu za použití chromatografické soustavy, tvořené směsí ethylacetátu a cyklohexanu v objemovém poměru 1:1. Požadovaná sloučenina se získá ve formě žlutého gumovitého produktu.

Výtěžek: 4,54 g,

hmotové spektrum (FAB): 592 ($M+H^+$), 139 (100%).

d) N-Ethyl-2'-(3,3,3-trifluorpropyl)thio/adenosin.

Produkt ze stupně c) (4,54 g) v roztoku hydroxidu sodného (0,1M v methanolu, 155 ml) se zahřívá na teplotu varu pod zpětným chladičem po dobu 30 minut. Po ochlazení na okolní teplotu se přidá ledová kyselina octová (0,89 ml) a roztok se zahustí. Po chromatografickém přečištění na silikagelu za použití eluční soustavy, tvořené směsí dichlormethanu a methanolu v objemovém poměru 95:5, se získá požadovaná sloučenina ve formě bezbarvého pevného produktu.

Výtěžek: 2,73 g,

hmotové spektrum (FAB): 424 ($M+H^+$), 100%.

e) Kyselina N-ethyl-2'-(3,3,3-trifluorpropyl)thio/-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfonovou, trisodná sůl.

Požadovaná sůl se připraví postupem podle příkladu 2b) za použití produktu ze stupně d).

^{31}P -nukleární magnetickorezonanční spektrum:

delta (D_2O): 8,89 (d, $J=18,0\text{Hz}$), 2,34 (dd, $J=18,0\text{Hz}$, $J=30,0\text{Hz}$), -9,90 (d, $J=30,0\text{Hz}$).

Příklad 6

Způsobem, popsáním v příkladu 2, se připraví následující sloučeniny.

a) Kyselina N-(2,2,2-trifluorethyl)-2-/(3,3,3-trifluorpropyl)thio/-5'-adenylová ve formě monohydrátu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, triamonná sůl.

i. N-Acetyl-N-(2,2,2-trifluorethyl)-2-/(3,3,3-trifluorpropyl)thio/adenosin-2',3',5'-triacetát.

ii. N-(2,2,2-Trifluorethyl)-2-/(3,3,3-trifluorpropyl)thio/adenosin.

Hmotové spektrum (FAB): 478 (M+H⁺), 346 (100%).

iii. Kyselina N-(2,2,2-trifluorethyl)-2-/(3,3,3-trifluorpropyl)thio/-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, triamonná sůl.

³¹P-nukleární magnetickorezonanční spektrum:

delta (D₂O): 8,82 (d, J=18,6Hz), 0,63 (dd, J=18,9Hz, J=28,9Hz), -9,43 (d, J=29,0Hz).

b) Kyselina N-/2-(methylthio)ethyl/-2-/(3,3,3-trifluorpropyl)thio/-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, triamonná sůl.

i. N-Acetyl-N-/2-(methylthio)ethyl/-2-/(3,3,3-trifluorpropyl)thio/adenosin-2',3',5'-triacetát.

Hmotové spektrum (FAB): 638 (M+H⁺), 139 (100%).

ii. N-/2-(Methylthio)ethyl/-2-/(3,3,3-trifluorpropyl)thio/adenosin.

Elementární analýza:

C₁₆H₂₂F₃N₅O₄S₂

	C(%)	H(%)	N(%)	S(%)
vypočteno:	40,90	4,72	14,92	13,70
nalezeno:	40,70	4,82	14,79	13,60

iii. Kyselina N-/2-(methylthio)ethyl/-2-/(3,3,3-trifluorpropyl)thio/-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, triamonná sůl.

Dalším čištěním surového produktu chromatografií na DEAE-Sephadexu za použití elučního činidla, tvořeného 0 až 0,6M roztokem hydrogenuhličitanu amonného, se získá požadovaná sůl.

³¹P-nukleární magnetickorezonanční spektrum:

delta (D₂O): 8,77 (d, J=18,7Hz), 0,38 (dd, J=18,9Hz, J=27,4Hz), -9,43 (d, J=28,8Hz).

Příklad 7

Kyselina N-(2-methoxyethyl)-2-/(3,3,3-trifluorpropyl)thio/-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, tetrasodná sůl.

a) N-(2-Methoxyethyl)-2-/(3,3,3-trifluorpropyl)thio/-adenosin.

Roztok sloučeniny z příkladu 5b) (4,8 g), 2-bromethylmethylether (1,2 ml) a uhličitan draselný (1,77 g) v bezvodém N,N-dimethylformamidu (190 ml) se míchá při okolní teplotě po dobu 3 dnů. Přidají se další podíly 2-bromethylmethyletheru (1,2 ml) a uhličitanu draselného (1,77 g) a směs se míchá při teplotě 40 °C po dobu 24 hodin. Reakční směs se zfiltruje a filtrát se zahustí,

přičemž se získá olej, který se rozdělí mezi ethylacetát (200 ml) a vodu (200 ml). Organická fáze se vysuší a potom zahustí. Získaný gumovitý produkt se rozpustí v 0,1M roztoku methoxidu sodného v methanolu (180 ml) a potom zahřívá na teplotu varu pod zpětným chladičem po dobu 45 minut. Po neutralizaci kyselinou octovou se roztok zahustí a zbytek se přečistí chromatograficky na silikagelu za použití eluční soustavy, tvořené směsí dichlormethanu a methanolu v objemovém poměru 92:8. Požadovaná sloučenina se získá ve formě bezbarvého pevného produktu.

Výtěžek: 3,41 g,

hmotové spektrum (FAB): 454 ($M+H^+$, 100%).

b) Kyselina N-(2-methoxyethyl)-2-[(3,3-trifluorpropyl)thio]-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou, tetrasodná sůl.

Požadovaná sůl se připraví za použití postupu podle příkladu 2b) za použití sloučeniny ze stupně a).

^{31}P -nukleární magnetickorezonanční spektrum:

delta (D_2O): 9,88 (d, $J=19,0\text{Hz}$), 3,80 (dd, $J=19,0\text{Hz}$, $J=31,0\text{Hz}$), -9,12 (d, $J=31,0\text{Hz}$).

Příklad X

Kvantitativní vyhodnocení agonizující a antagonistické účinnosti vůči $\text{P}_{2\text{T}}$ -receptorům v promytých lidských krevních destičkách

Příprava preparátu

Lidská venální krev (100 ml) se stejnoměrně rozdělí do tří kyvet, které obsahují po 4 ml antikoagulačního činidla, tvořeného 3,2% citranem trojsodným. Kyvety se potom odstředí po dobu 15 minut při 240 G, přičemž se získá plazma, obohacená krevními destičkami, ke které se za účelem stabilizace krevních destiček v průběhu promývacího postupu přidá $300\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ prostacyklinu (PGI_2 , $3\text{ }\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ plazmy obohacené krevními destičkami ve zředění 1:10 ve fyziologickém roztoku ze zásobního roztoku $1\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ v ethanolu). Plazma obohacená krevními destičkami prostá červených krvinek se získá 10 minutovým odstředěním při 125 G a následným 15 minutovým odstředěním při 640 G. Supernatant se odlije a peleta krevních destiček se resuspenduje v modifikovaném, vápníku prostém Tyrodově roztoku (10 ml) CTF, složení: NaCl : 137 mM ($8\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), NaHCO_3 : 11,9 mM ($1\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), NaH_2PO_4 : 0,38 mM ($0,06\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), KCl : 2,86 mM ($1\text{ ml } 20\% \text{ roztoku na litr}$), MgCl_2 : 1,05 mM ($1\text{ ml } 10\% \text{ roztoku na litr}$), dextróza: 5,55 mM ($1\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), který je udržován na teplotě 37°C a probubláván plynou směsí, obsahující 95 % O_2 a 5 % CO_2 . Po přidání dalšího podílu $300\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ PGI_2 se získaná suspenze ještě jednou odstředí po dobu 15 minut při 640 G. Supernatant se odlije a krevní destičky se opětovně suspendují v 10 ml CFT, načež se přidá další podíl CFT k nastavení celkového finálního počtu krevních destiček na $2 \times 10^5 \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Tato finální suspenze se přechovává v 60 ml injekční stříkačce při teplotě 3°C a za nepřítomnosti vzduchu.

Za účelem dosažení normální funkce prosté inhibice PGI_2 se krevní destičky použijí při agregační studii teprve až 2 hodiny po finálním resuspendování. Při všech studiích se 430 μl alikvoty suspenze krevních destiček zavedou do silikonizovaných agregačních kyvet, obsahujících roztok chloridu vápenatého (10 μl 45mM roztoku, finální koncentrace 1 mM) a míchají při 900 otáčkách za minutu v agregometru PAP4 (Biodata). Přidá se lidský fibrinogen (Sigma, F 4883) a 8-sulfofenyltheofillin (8-SPT, k blokování jakékoliv P_1 -agonizující účinnosti

sloučenin) k dosažení finálních koncentrací 0,2 mg/ml (10 μ l 10 mg.ml⁻¹ roztoku srazitelného proteinu ve fyziologickém roztoku) a 3×10^{-4} M (10 μ l 5,6 mg.ml⁻¹ roztoku v 6% glukóze). Potom se započne sledování agregace.

5 Protokol

a) Selektce submaximální koncentrace ADP

Koncentrace ADP, produkující právě submaximální odezvu, se získá vynesemím křivky koncentrace/odezva v rozmezí 10 až 300 μ M. Příslušný roztok ADP se přidá do agregační kyvety v objemu 10 μ l 20 minut po započetí sledování agregace. Agregační odezvy se měří za použití maximální míry změny světelné transmise (index daný ukazatelem směrnice PAP4). Submaximální koncentrace ADP, získaná v tomto stupni protokolu, se použije při následujícím vyhodnocení antagonistizující účinnosti sloučenin. Všechna měření se provádí se dvěma vzorky krevních destiček od každého dárce.

b) Vyhodnocení agonizující a antagonistizující účinnosti

5 minut po započetí sledování agregace se do agregační kyvety přidá fyziologický roztok nebo příslušný roztok testované sloučeniny v objemu 30 μ l k dosažení finální koncentrace 0, 10, 100 nebo 1000 μ M. Agregace v tomto stádiu je ukazatelem agonizující účinnosti a v případě, že k ní dojde, vyhodnotí se agonizující potence srovnáním s kontrolními ADP-odezvami, získanými části a) protokolu.

V případě, že k agregaci nedojde, přidá se 15 minut po testované sloučenině předběžně stanovená submaximální koncentrace ADP v objemu 10 μ l. Antagonizující potence se vyhodnotí jako procentická inhibice kontrolní ADP-odezvy k dosažení aproximativní IC₅₀. Sloučeniny, které zcela inhibují ADP-odezvu při výchozích koncentracích, se znovu testují v nižším koncentračním rozmezí. Sloučeniny s IC₅₀ nižší než 10^{-8} M se také opětovně testují v nepřítomnosti 8-SPT za účelem potvrzení nepřítomnosti jakékoliv P₁-agonizující účinnosti a za použití 2 minutové a nikoliv 15 minutové inkubace za účelem zjištění, zda je inhibice časově závislá.

Výsledky

Reprezentativní údaje, získané pro sloučeniny obecného vzorce I, jsou uvedeny jako záporný logaritmus antagonistizující potence (pIC₅₀) v následující tabulce.

Tabulka

Příklad	pIC ₅₀
1	9,04 ± 0,15
5	8,68 ± 0,33
6a	9,14 ± 0,11

Příklad Y

45 Měření hypotermní účinnosti u myši při vědomí

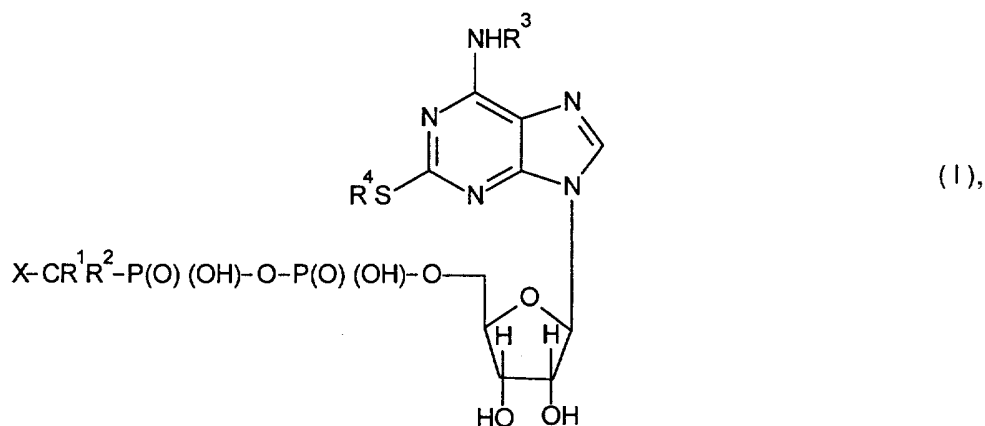
V tomto testu se použije myši CR/CD-1 s tělesnou hmotností 25 až 45 g. Myši se zváží a jejich výchozí rektální teplota se změří za použití termistorové sondy. Každé pokusné zvíře se umístí pod blokující zvon a ocasní žíla zvířete se kanyluje za použití hypodermní jehly 27G, připojené

k polythenové kanyle a fixované v této poloze fixační páskou. Pokusnému zvířeti se potom podá testovaná sloučenina ve formě 10 minutové intravenózní infuze rychlostí $0,5 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$. 30 minut, 1 hodinu, 1 hodinu a 30 minut, 2 hodiny, 3 hodiny, 4 hodiny, 6 hodin a 24 hodin po ukončení infuze se měří rektální teplota pokusných zvířat.

Střední maximální snížení rektální teploty se vynese proti dávce sloučeniny a ze získané křivky se stanoví dávka, potřebná ke snížení tělesné teploty o 5°C .

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Sloučenina obecného vzorce I



ve kterém

R^1 a R^2 nezávisle jeden na druhém znamenají atom vodíku nebo atom halogenu,

R^3 a R^4 nezávisle jeden na druhém znamenají fenylovou skupinu nebo alkylovou skupinu, obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, případně substituovanou jedním nebo několika substituenty, zvolenými z množiny, zahrnující skupinu OR^5 , alkylthio-skupinu, obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, skupinu NR^6R^7 , fenylovou skupinu, skupinu $COOR^8$ a atom halogenu,

R^5 , R^6 , R^7 a R^8 nezávisle jeden na druhém znamenají atom vodíku nebo alkylovou skupinu, obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, a

X znamená kyselinový zbytek $-P(O)(OH)_2$, $-SO_3H$ nebo $-CO_2H$,

a její farmaceuticky přijatelné soli.

2. Sloučenina podle nároku 1 obecného vzorce I, ve kterém X znamená skupinu $-P(O)(OH)_2$, nebo její farmaceuticky přijatelná sůl.

3. Sloučenina podle nároku 1 obecného vzorce I, ve kterém R^4 znamená alkylovou skupinu, obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů a případně substituovanou atomem halogenu, nebo její farmaceuticky přijatelná sůl.
- 5 4. Sloučenina podle některého z nároků 1 až 3 obecného vzorce I, ve kterém R^1 a R^2 znamenají atom chloru, nebo její farmaceuticky přijatelná sůl.
- 10 5. Sloučenina podle některého z nároků 1 až 4 obecného vzorce I, ve kterém R^3 znamená alkylovou skupinu, obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, případně substituovanou alkylthioskupinou, obsahující 1 až 6 uhlíkových atomů, nebo její farmaceuticky přijatelná sůl.
6. Sloučenina podle nároku 1 obecného vzorce I, kterou je
- 15 kyselina N-ethyl-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou,
- kyselina N-ethyl-2-(3,3,3-trifluorpropylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou,
- 20 kyselina N-2-(methylthio)ethyl-2-(3,3,3-trifluorpropylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou,
- nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli.
- 25 7. Sloučenina podle nároku 1 obecného vzorce I, kterou je
- kyselina N-butyl-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou,
- 30 kyselina N-propyl-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou,
- kyselina N-(1-methylethyl)-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou,
- 35 kyselina N-(2-methoxyethyl)-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou,
- kyselina N-cyklopentyl-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou,
- 40 kyselina N-fenyl-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou,
- 45 kyselina N-(2,2,2-trifluorethyl)-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou,
- kyselina N-(methoxykarbonylmethyl)-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou,
- 50 kyselina N-(2-methylthioethyl)-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou,

kyselina N-2-(N,N-dimethylamino)ethyl-2-(propylthio)-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou,

5 kyselina 2-(cyklohexylthio)-N-ethyl-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou,

kyselina N-(2,2,2-trifluorethyl)-2-(3,3,3-trifluorpropyl)thio-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou,

10 kyselina N-(2-methoxyethyl)-2-(3,3,3-trifluorpropyl)thio-5'-adenylová ve formě monoanhydridu s kyselinou dichlormethylenbisfosfonovou,

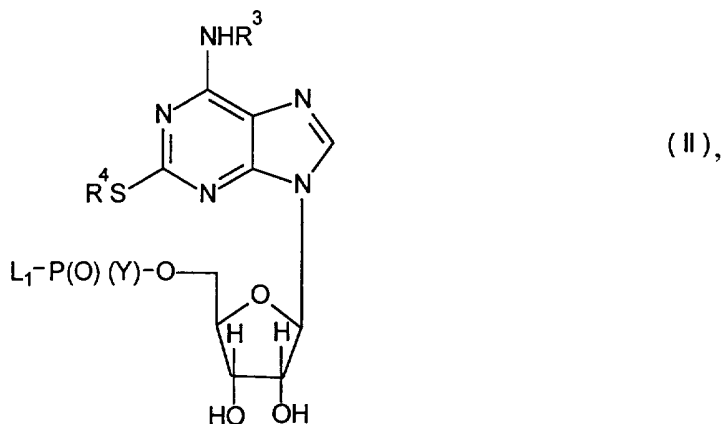
nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli.

15 **8.** Farmaceutická kompozice, **v y z n a ě n á t í m**, že obsahuje sloučeninu obecného vzorce I podle některého z nároků 1 až 7 nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem.

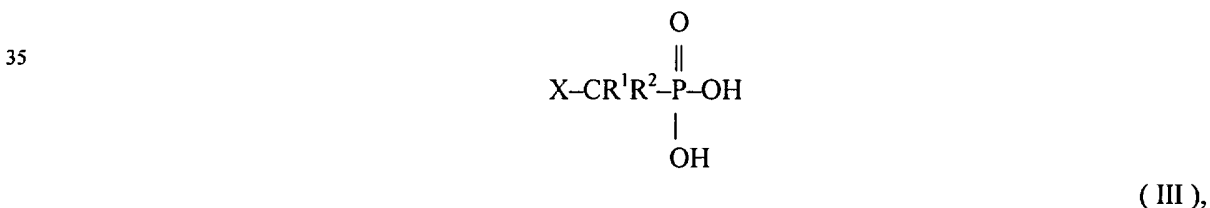
20 **9.** Použití sloučeniny obecného vzorce I podle některého z nároků 1 až 7 nebo její farmaceuticky přijatelné soli při výrobě farmaceutické kompozice pro léčení stavu, u kterého dochází k agregaci krevních destiček.

10. Způsob přípravy sloučeniny obecného vzorce I podle některého z nároků 1 až 7 nebo její farmaceuticky přijatelné soli, **v y z n a ě n ý t í m**, že se

25 a) sloučenina obecného vzorce II



30 ve kterém R³ a R⁴ mají výše uvedené významy, L₁ znamená odlučitelnou aminovou skupinu nebo atom halogenu a Y znamená (i) skupinu OH nebo (ii) odlučitelnou skupinu L₂, tvořenou atomem halogenu, jejíž funkční skupiny jsou případně chráněny ochrannými skupinami, uvede v reakci se sloučeninou obecného vzorce III



ve kterém R^1 , R^2 a X mají výše uvedené významy, jejíž funkční skupiny jsou případně chráněny ochrannými skupinami, nebo s její soli, načež se v případě, že Y v získané sloučenině znamená atom halogenu, provede hydrolýza této sloučeniny, a

- 5 b) případně se odstraní ochranné skupiny ze získané sloučeniny obecného vzorce I v případě, že jedna nebo několik funkčních skupin této sloučeniny je resp. jsou chráněny ochrannými skupinami, a v případě, že je to žádoucí nebo nezbytné, převede se získaná sloučenina obecného vzorce I nebo její jiná sůl na její farmaceuticky přijatelnou sůl nebo naopak.

10

Konec dokumentu

15