



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 16 127 T2 2004.04.22**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 045 849 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 16 127.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/26293**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 963 053.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/031102**

(86) PCT-Anmeldetag: **11.12.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **24.06.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **25.10.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **02.07.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.04.2004**

(51) Int Cl.7: **C07D 473/34**
A61K 31/52

(30) Unionspriorität:
69371 P 12.12.1997 US

(73) Patentinhaber:
**EURO-CELTIQUE S.A., Luxemburg/Luxembourg,
LU**

(74) Vertreter:
Maiwald GmbH, 80335 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:
**CAVALLA, David, Cambridge CB1 2DX, GB;
CHASIN, Mark, Manalapan, US; HOFER, Peter,
CH-4410 Liestal, CH; GEHRIG, Andre, CH-4056
Basel, CH; WINTERGERST, Peter, CH-4056 Basel,
CH**

(54) Bezeichnung: **PURINDERIVATE MIT PHOSPHODIESTERASE IV HEMMENDEN EIGENSCHAFTEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Asthma ist eine komplexe Krankheit, die durch das Zusammenspiel vieler Entzündungs- und Immunzellen, Spasmogenen, Entzündungsvermittlern, Zytokinen und Wachstumsfaktoren zustande kommt. In der jüngsten Praxis werden vier Hauptklassen an Wirkstoffen zur Behandlung von Asthma verwendet. Dabei handelt es sich um Bronchodilatoren (z. B. Agonisten der (β -adrenergen Rezeptoren), entzündungshemmende Stoffe (z. B. Corticosteroide), prophylaktische anti-allergische Stoffe (z. B. Natriumchromoglycat) und Xanthine (z. B. Theophyllin), die sowohl eine bronchodilatatorische als auch eine entzündungshemmende Aktivität aufzuweisen scheinen.

[0002] Theophyllin ist als Wirkstoff die bevorzugte erste Wahl bei der Behandlung von Asthma. Obwohl es ursprünglich wegen seiner direkten bronchodilatatorischen Wirkung propagiert worden ist, geht man heute davon aus, dass der therapeutische Wert von Theophyllin auch in seiner entzündungshemmenden Aktivität begründet ist. Der Wirkmechanismus von Theophyllin ist dabei unklar. Es wird aber davon ausgegangen, dass einige seiner zellulären Aktivitäten für seine Wirkung als ein Anti-Asthmatikum wichtig sind. Zu diesen zählen die Inhibierung von zyklischer Nukleotidphosphodiesterase, die antagonistische Wirkung auf Adenosin-Rezeptoren, die Stimulierung der Katecholaminfreisetzung und die Fähigkeit, die Anzahl und Aktivität von Suppressor-T-Lymphozyten zu erhöhen.

[0003] Während all diese Aktivitäten zur Wirksamkeit von Theophyllin tatsächlich beitragen könnten, scheint es, dass nur die Inhibition der PDE sowohl für die entzündungshemmenden als auch die bronchodilatatorischen Komponenten verantwortlich ist. Theophyllin ist jedoch dafür bekannt, dass es einen schmalen therapeutischen Index sowie einen breiten Bereich von ungünstigen Nebenwirkungen, die als problematisch angesehen werden, aufweist.

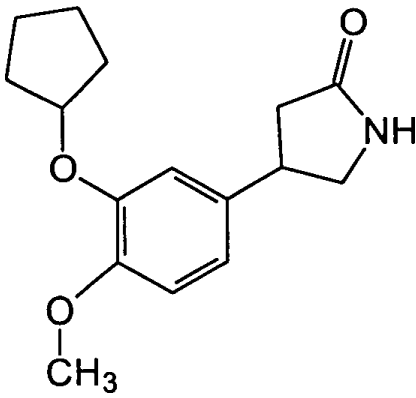
[0004] Von den oben erwähnten Aktivitäten hat insbesondere die Aktivität von Theophyllin bei der Inhibierung von zyklischer Nukleotidphosphodiesterase seit kurzem beträchtliche Aufmerksamkeit erfahren. Zyklische Nukleotidphosphodiesterasen (PDEs) haben beträchtliche Aufmerksamkeit als molekulare Zielstrukturen (Targets) für anti-asthmatische Wirkstoffe erfahren. Zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) und zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat (cGMP) sind bekannte sekundäre Botenstoffe („second messengers“), die die funktionellen Antworten von Zellen gegenüber einer Vielzahl von Hormonen, Neurotransmittern und Autocoiden vermitteln. Mindestens zwei therapeutisch wichtige Effekte könnten sich aus der Inhibition von Phosphodiesterase und dem sich daraus ergebenden Anstieg an intrazellulärem Adenosin 3',5'-Monophosphat (cAMP) oder Guanosin 3',5'-Monophosphat (cGMP) in Schlüsselzellen der Pathophysiologie von Asthma ergeben. Dabei handelt es sich um die Relaxation der glatten Muskulatur, was zur Bronchodilatation führt, und die entzündungshemmende Aktivität.

[0005] Es ist mittlerweile klar, dass es mehrere, unterschiedliche PDE Isoenzyme gibt, die sich hinsichtlich ihrer zellulären Verteilung unterscheiden. Es ist eine Vielzahl an Inhibitoren synthetisiert worden, die einen ausgeprägten Grad an Selektivität für das eine oder andere Isoenzym aufweisen.

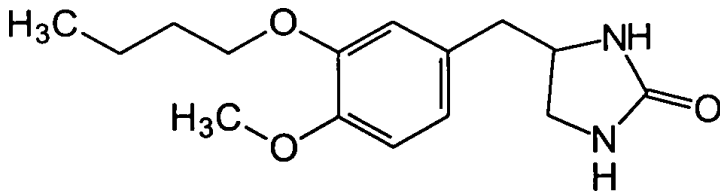
[0006] Die Struktur-Aktivitätsbeziehungen (englisch: structure-activity relationships, SAR) von Isoenzym-selektiven Inhibitoren sind im Detail diskutiert worden, z. B. in der Publikation von Theodore J. Torphy, et. al., „Novel Phosphodiesterase Inhibitors For the Therapy Of Asthma“, Drug News & Prospectives, 6(4) May 1993, Seiten 203–214.

[0007] Entsprechend ihrer Spezifität bei der Hydrolyse von cAMP oder cGMP, ihrer Sensivität bezüglich der Regulation durch Calcium, Calmodulin oder cGMP und ihrer selektiven Inhibierung durch verschiedene Wirkstoffe können die PDE-Enzyme in fünf verschiedene Familien gruppiert werden. PDE I wird durch Ca^{2+} /Calmodulin stimuliert. PDE II wird durch cGMP stimuliert und im Herz und in den Nebennieren gefunden. PDE III wird durch cGMP inhibiert, wobei die Inhibierung des Enzyms eine positive ionotopische Aktivität generiert. PDE IV ist cAMP-spezifisch, wobei seine Inhibierung eine Relaxation der Atemwege, eine entzündungshemmende und anti-depressive Aktivität bewirkt. PDE V scheint bei der Regulation des cGMP-Gehalts in der vasculären glatten Muskulatur wichtig zu sein, so dass PDE V-Inhibitoren womöglich eine cardio-vaskuläre Aktivität aufweisen.

[0008] Während es Wirkstoffe gibt, die aus den vielfältigen Strukturaktivitätsbeziehungsuntersuchungen abgeleitet wurden und eine PDE III-Inhibition bewirken, ist die Anzahl der strukturellen Klassen von PDE IV-Inhibitoren vergleichsweise beschränkt. Insbesondere sind Analoge von Rolipram, das die folgende Strukturformel (A) aufweist:

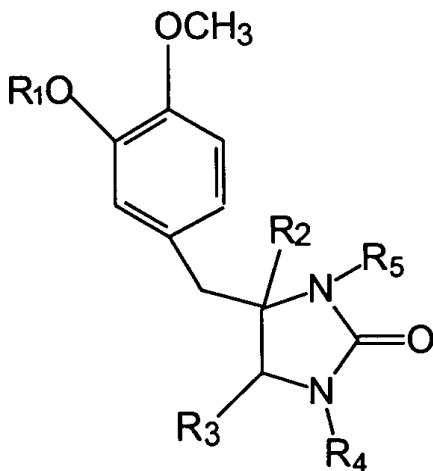


und von RO-20-1724, das die folgende Strukturformel (B) aufweist:



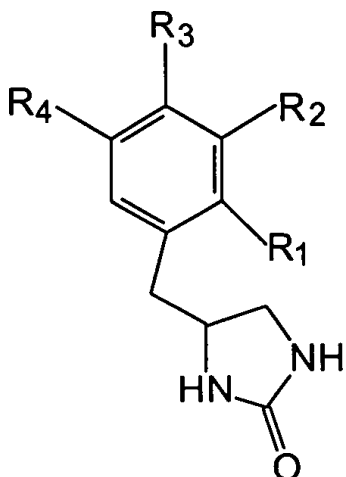
untersucht worden.

[0009] Das US-Patent 4,308,278 offenbart Verbindungen der Formel (C)



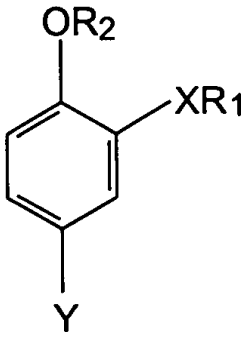
wobei R_1 (C_3 - C_6) Cycloalkyl oder Benzyl, R_2 und R_3 Wasserstoff oder (C_1 - C_4) Alkyl, $R_4 = R_2$ oder Alkoxy-carbonyl und R_5 Wasserstoff oder Alkoxy-carbonyl ist.

[0010] Verbindungen der Formel (D) werden im US-Patent 3,636,039 offenbart. Bei diesen Verbindungen handelt es sich um Benzylimidazolidinone, die als hypertensive Wirkstoffe wirken.



[0011] Die Substituenten R_1 - R_4 in Formel D repräsentieren eine Vielzahl an Gruppen, einschließlich Wasserstoff und Niederalkyl.

[0012] Die PCT-Veröffentlichungsschrift WO 87/06576 offenbart Antidepressiva der Formel E:



wobei R_1 eine Polycycloalkylgruppe mit 7 bis 11 Kohlenstoffatomen ist, R_2 Methyl oder Ethyl ist, $X = 0$ oder NH ist und Y eine mono- oder bicyclische, heterocyclische Gruppe mit optionalen Substituenten umfasst.

[0013] Für Rolipram, das ursprünglich wegen seiner Aktivität als ein Antidepressivum untersucht wurde, ist gezeigt worden, dass es selektiv das PDE IV-Enzym inhibiert, so dass dieser Wirkstoff seitdem zum Standard-Wirkstoff bei der Klassifikation von PDE-Enzym-Subtypen geworden ist. Es scheint ein beträchtliches, therapeutisches Potential für PDE IV-Inhibitoren zu geben. Frühere Arbeiten konzentrierten sich auf Depression als einen therapeutischen Endpunkt des zentralen Nervensystems und auf Entzündungsreaktionen. Mittlerweile sind die Studien auf verwandte Krankheiten wie Demenz und Asthma ausgeweitet worden. Es konnte gezeigt werden, dass Rolipram RO-20-1724 und andere PDE IV-Inhibitoren in vitro (1) die Synthese und Freisetzung von Vermittlerstoffen in Mastzellen, Basophilen, Monocyten und Eosinophilen inhibieren, (2) den Atemausbruch, die Chemotaxis und Degranulation in Neutrophilen und Eosinophilen inhibieren und (3) das Mitogen-abhängige Wachstum und die Differenzierung in Lymphozyten inhibieren (The PDE IV Family Of Calcium-Phosphodiesterases Enzymes, John A. Lowe, III, et. al., Drugs of the Future 1992, 17(9): 799– 807).

[0014] PDE IV findet sich in allen beim Asthma hauptsächlich auftretenden Entzündungszellen einschließlich der Eosinophilen, Neutrophilen, T-Lymphozyten, Makrophagen und Endothelzellen. Ihre Inhibierung bewirkt die Herunterregulation der Entzündungszellaktivierung und eine Relaxation von Zellen der glatten Muskulatur in der Luftröhre und den Bronchien. Andererseits bewirkt die Inhibierung von PDE III, die sich im Myocardium findet, einen Anstieg sowohl der Kraft als auch der Geschwindigkeit der Herzkontraktilität. Dabei handelt es sich um unerwünschte Nebenwirkungen für einen entzündungshemmenden Wirkstoff.

[0015] Theophyllin, ein nicht-selektiver PDE-Inhibitor, inhibiert sowohl PDE III und PDE IV was sowohl zu den erwünschten anti-asthmatischen Wirkungen als auch der unerwünschten cardio-vaskulären Stimulation führt. Die Möglichkeit für eine gleichzeitig entzündungshemmende und bronchodilatatorische Wirkung, ohne dass viele der Nebenwirkungen, wie sie mit der Theophyllin-Therapie verbunden sind, auftreten, ist angesichts der gut bekannten Unterscheidung zwischen PDE-Isoenzymen offensichtlich. Die erhöhte Häufigkeit der Morbidität und Mortalität in vielen westlichen Ländern infolge von Asthma über die letzte Dekade, hat zu einer Fokussierung des klinischen Schwerpunkts auf die entzündliche Natur dieser Krankheit und den Vorteil von inhalierten Steroiden geführt. Die Entwicklung eines Wirkstoffes, der sowohl über bronchodilatatorische als auch entzündungshemmende Eigenschaften verfügt, wäre daher höchst vorteilhaft.

[0016] Dabei sollten selektive PDE IV-Inhibitoren effektiver als Theophyllin bei gleichzeitig weniger Nebenwirkungen sein. Diese Hypothese ist durch klinische Daten unterstützt worden. Darüber hinaus wäre es wünschenswert, PDE IV-Inhibitoren zur Verfügung zu stellen, die wirksamer und selektiver als Rolipram sind und daher einen geringeren IC_{50} -Wert haben, so dass die Menge an Wirkstoff, die zur Inhibition von PDE IV benötigt wird, reduziert werden kann.

[0017] In den letzten Jahren sind mehrere verschiedene Wirkstoffe als mögliche therapeutische Zusammensetzungen vorgeschlagen worden, die die gewünschte PDE IV-Inhibierung ohne die Nebenwirkungen, von denen oben gesprochen wurde, erreichen. Diese Anstrengungen haben sich jedoch hauptsächlich auf die Entwicklung nicht-spezifischer Derivate von bestimmten Wirkstoffklassen, nämlich Rolipram-Analoga, Benzoxazole, Adenine, Thioxanthine etc. konzentriert. Diese Anstrengungen haben darüber hinaus zu Myriaden an Wirkstoffen geführt, die einen breiten Bereich der IC_{50} -Werte für die PDE IV-Inhibierung aufweisen. Häufig ergeben die generellen Formeln, wie sie offenbart wurden, verschiedene Wirkstoffe, die einen schlechten Grad bezüglich der PDE IV-Inhibierung aufweisen und/oder denen eine ausreichende Spezifität fehlt. Diese Anstrengungen gewährleisteten somit keine Sicherheit, dass ein spezifisches Derivat, das durch die Formel abgedeckt wird, die gewünschte Kombination von hoher PDE IV-Inhibition und Selektivität aufweist.

Aufgaben und Zusammenfassung der Erfindung

[0018] Es ist daher eine vorrangige Aufgabe der vorliegenden Erfindung, neue Verbindungen zur Verfügung zu stellen, die effektivere selektive PDE-Inhibitoren als die bekannten Verbindungen des Stands der Technik sind.

[0019] Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, neue Verbindungen zur Verfügung zu stellen, die als effektive PDE IV-Inhibitoren bei einer geringeren PDE III-Inhibition wirken.

[0020] Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Verfahren zur Behandlung eines Patienten zur Verfügung zu stellen, die eine Inhibierung von PDE IV benötigen.

[0021] Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, neue Verbindungen zur Behandlung von Krankheitszuständen zur Verfügung stellen, die mit abnorm hohen physiologischen Anteilen an entzündungsvermittelnden Zytokinen, einschließlich Tumornecrosis-Faktor, einhergehen.

[0022] Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung der neuen Verbindungen dieser Erfindung zur Verfügung zu stellen.

[0023] Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Behandlung eines Patienten zur Verfügung zu stellen, der an Krankheitszuständen leidet, wie Asthma, Allergien, Entzündung, Depression, Demenz einschließlich Alzheimer, vaskuläre Demenz und „multi-in-farct“-Demenz, einer durch das Human Immunodeficiency Virus verursachten Krankheit, und Krankheitszuständen, die mit abnorm hohen physiologischen Anteilen an entzündungsvermittelnden Zytokinen einhergehen.

[0024] Andere Aufgaben und Vorteile der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus der folgenden, detaillierten Beschreibung der Erfindung.

[0025] Hinsichtlich dieser und anderer Aufgaben umfasst die vorliegende Erfindung Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

6-Amino-3-(3-cyclopentyl-4-methoxy-benzyl)-8-isopropyl-3H-purin;

3-(3-Cyclopentyl-4-methoxy-benzyl)-6-ethylamino-8-(1-hydroxy-1-methyl-ethyl)-3H-purin;

6-Amino-3-(3-cyclopentyl-4-methoxybenzyl)-8-(1-hydroxy-1-methyl-ethyl)-3H-purin;

6-Ethylamino-3-(3-((1RS,3RS)-3-hydroxycyclopentyl-4-methoxy-benzyl)-8-(1-hydroxy-1-methyl-ethyl)-3H-purin;

6-Amino-3-(3-((1RS,3RS)-3-hydroxycyclopentyl-4-methoxy-benzyl)-8-(1-hydroxy-1-methyl-ethyl)-3H-purin;

6-Ethylamino-3-(3-((1RS,3RS)-3-hydroxycyclopentyl-4-methoxy-benzyl)-8-isopropyl-3H-purin;

6-Amino-3-(3-((1RS,3RS)-3-hydroxycyclopentyl-4-methoxy-benzyl)-8-isopropyl-3H-purin;

pharmazeutisch verträgliche Salze davon und stereoisomere Formen davon.

[0026] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der Verbindungen der vorliegenden Erfindung zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Patienten, die an einem Krankheitszustand leiden, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Asthma, Allergien, Entzündungen und Depressionen.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0027] Die folgenden Begriffe, wie sie hier benutzt werden, sollen die Bedeutung haben, wie sie vom Durchschnittsfachmann verstanden werden und sollen speziell die im folgenden dargestellten Bedeutungen haben: Der Begriff „Patient“, wie er im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet wird, schließt sowohl Menschen als auch andere Säugetiere mit ein.

[0028] Die vorliegende Erfindung umfasst ebenfalls organische und anorganische Salze, Hydrate, Vorläufer-wirkstoffmoleküle (englisch: prodrugs) und Metaboliten der erfinderischen Verbindungen.

[0029] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung können jedem verabreicht werden, der der Inhibition von PDE IV benötigt. Die Verabreichung kann oral, topisch, durch Suppositorien, Inhalation, Insufflation oder parenteral erfolgen.

[0030] Die vorliegende Erfindung umfasst auch alle pharmazeutisch verträglichen Salze der vorgenannten Verbindungen. Der Fachmann wird erkennen, dass die Säuresalze der momentan beanspruchten Verbindungen durch die Reaktion der Verbindungen mit einer entsprechenden Säure mittels einer Vielzahl von bekannten Verfahren hergestellt werden können.

[0031] Es können verschiedene orale Darreichungsformen verwendet werden, einschließlich solcher festen Formen wie Tabletten, Gelkapseln (englisch: gelcaps), Kapseln, Kapselchen (englisch: caplets), Granulate, Rauten (englisch: lozenges) und lose Haufenpulver (englisch: bulk powders) sowie flüssige Formen wie z. B. Emulsionen, Lösungen und Suspensionen. Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung können alleine oder in Kombination mit verschiedenen, pharmazeutisch verträglichen Trägerstoffen und Hilfsstoffen, die dem Fachmann bekannt sind, verabreicht werden. Diese schließen, ohne darauf beschränkt zu sein, Verdünnungsmittel,

Suspensionsmittel, Lösungsmittel, Bindemittel, Zersetzungsstoffe, Konservierungsstoffe, Färbemittel, Schmiermittel und ähnliche mit ein.

[0032] Wenn die Verbindungen der vorliegenden Erfindung in orale Tabletten inkorporiert werden, können solche Tabletten verpresst, pulverisiert, enterisch beschichtet, zuckerbeschichtet, filmbeschichtet, mehrfach verpresst oder mehrfach beschichtet werden. Flüssige orale Darreichungsformen schließen wässrige und nicht-wässrige Lösungen, Emulsionen, Suspensionen, und/oder Suspensionen, die aus nicht-schäumenden Granulaten rekonstituiert werden, ein, wobei diese geeignete Lösungsmittel, Konservierungsstoffe, Emulsionsmittel, Suspensionsmittel, Verdünner, Süßstoffe, Färbestoffe und Geschmacksstoffe enthalten. Wenn die Verbindungen der vorliegenden Erfindung parenteral injiziert werden, können sie z. B. die Form einer isotonischen sterilen Lösung annehmen. Wenn die Verbindungen der vorliegenden Erfindung inhaliert werden sollen, können sie alternativ als ein trockenes Aerosol oder als eine wässrige oder teilweise wässrige Lösung formuliert werden.

[0033] Wenn die Verbindungen der vorliegenden Erfindung in orale Darreichungsformen inkorporiert werden sollen, wird zusätzlich in Erwägung gezogen, dass solche Darreichungsformen eine unmittelbare Freisetzung der Verbindung im gastrointestinalen System oder alternativ eine kontrollierte und/oder verzögerte Freisetzung innerhalb des gastrointestinalen Systems gewährleisten können. Eine große Vielzahl an kontrollierten und/oder verzögert freisetzenden Formulierungen sind dem Fachmann gut bekannt und werden für die Benutzung in Verbindung mit den Formulierungen der vorliegenden Erfindung in Erwägung gezogen. Die kontrollierte und/oder verzögerte Freisetzung kann z. B. durch eine Beschichtung auf der oralen Darreichungsform oder durch Inkorporation des oder der Wirkstoffe der Erfindung in eine kontrolliert und/oder verzögert freisetzende Matrix gewährleistet werden.

[0034] Spezifische Beispiele von pharmazeutisch verträglichen Trägern und Hilfsstoffen, die zur Formulierung der oralen Darreichungsformen verwendet werden können, sind im Handbook of Pharmaceutical Excipients, American Pharmaceutical Association (1986) beschrieben. Techniken und Zusammensetzungen zur Herstellung von festen oralen Darreichungsformen sind in Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets (Lieberman, Lachman and Schwartz, Herausgeber), 2. Ausgabe, veröffentlicht durch Marcel Dekker, Inc., beschrieben. Techniken und Zusammensetzungen zur Herstellung von Tabletten (verpresst oder geformt), Kapseln (Hart- oder Weichgelatine-kapseln) und Pillen sind in Remington's Pharmaceutical Sciences (Arthur Osol, Herausgeber), 1553–1593 (1980), ebenfalls beschrieben. Die Techniken und Zusammensetzungen zur Herstellung von flüssigen oralen Darreichungsformen sind in Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems (Lieberman, Rieger and Banker, Herausgeber), veröffentlicht durch Marcel Dekker, Inc., beschrieben.

[0035] Wenn die Verbindungen der vorliegenden Erfindung zur parenteralen Verabreichung mittels Injektion formuliert werden (z. B. durch kontinuierliche Infusion oder Bolusinjektion), kann die Formulierung zur parenteralen Verabreichung die Form von Suspensionen, Lösungen, Emulsionen in öligen oder wässrigen Vehikeln, annehmen. Solche Formulierungen können darüber hinaus pharmazeutisch notwendige Additive wie Stabilisierungsmittel, Suspensionsmittel, Dispersionsmittel und ähnliche umfassen. Die Verbindungen der Erfindung können ebenfalls die Form eines Pulvers zur Rekonstitution einer injizierbaren Formulierung annehmen.

[0036] Die Dosis der Verbindungen der vorliegenden Erfindung ist unter anderem abhängig von dem Leiden, das behandelt werden soll, der Schwere der Symptome, dem Weg der Verabreichung, der Häufigkeit des Dosierungsintervalls, dem Auftreten von schädlichen Nebenwirkungen und der spezifisch verwendeten Verbindung.

[0037] Die Verbindung 3-(3-Cyclopentyloxy-4-methoxybenzyl)-6-ethylamino-8-isopropyl-3H-purin wird offenbart und beansprucht in der Prioritätsanmeldung Serien-Nr. 08/578,580 mit dem Titel „Novel Chemical Compounds Having PDE IV Inhibition Activity“.

[0038] Wenn bestimmte der oben genannten Verbindungen in geometrischen oder stereoisomeren Formen existieren könnten, zieht die vorliegende Erfindung all diese Verbindungen in Erwägung.

Detaillierte Beschreibung bevorzugter Ausführungsformen

[0039] Die folgenden Beispiele illustrieren verschiedene Aspekte der Erfindung.

Beispiel 1 6-Amino-3-(3-cyclopentyloxy-4-methoxy-benryl)-8-isopropyl-3H-purin

[0040] 3-(3-Cyclopentyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-isopropyl-hypoxanthin (5,74 g, 15 mmol) und Phosphoroxchlorid (60 ml) wurden bei 65°C für 30 Minuten erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde zur Trockne im Vakuum eingedampft und der Rückstand zweimal mit Toluol eingedampft. Das Rohchlorpurin (15 mmol) wurde dann in THF (80 ml) und 32%iger wässriger Ammoniaklösung (36,2 ml) gelöst und zusammen mit flüssigem Ammoniak (50 g) in einem 450 ml Druckreaktor auf 60°C (340 psi) für 4 Stunden erhitzt. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum abgedampft und der Rückstand in einer Mischung aus Diethylether und 1 M NaOH-Lösung resuspendiert. Der Feststoff wurde gesammelt und aus Ethylacetat kristallisiert, so dass sich die oben genannte Verbind-

ung in einer Menge von 3,92 g (68,5%) und mit einem Schmelzpunkt von 190–193°C ergab.

[0041] Die Elementaranalyse für $C_{21}H_{27}N_5O_2/381,48$ ergab:

% berechnet C 66,12 H 7,13 N 18,36 O 8,39

% gefunden C 65,96 H 6,95 N 18,31 O 8,61

Beispiel 2 3-(3-Cyclopentyloxy-4-methoxy-benzyl)-6-ethylamino-8-(1-hydroxy-1-methyl-ethyl)-3H-purinhydrochlorid

[0042] Eine Lösung von 8-(1-Benzyl-1-methyl-ethyl)-3-(3-cyclopentyloxy-4-methoxy-benzyl)-6-ethylamino-3H-purinhydrochlorid (1,65 g, 3 mmol) in Methanol (25 ml) wurde mit 10% Pd-C (0,17 g) hydriert. Nach der Zugabe von 25 ml THF wurden weitere 10% Pd-C (0,17 g) zugegeben und die Mischung für 12 Stunden bei Raumtemperatur hydriert. Der Katalysator wurde durch Filtern entfernt und die Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in heißem Aceton suspendiert und der Feststoff bei 0–5°C gesammelt, um das Rohhydroxypurin (1,10 g) zu erhalten. Dieses wurde in Chloroform gelöst und durch 4,4 g Kieselgel, das sich in einer Säule befand, gefiltert. Das gereinigte Produkt (0,84 g) wurde in Diethylether suspendiert und der Feststoff bei 0–5°C gesammelt, um die oben genannte Verbindung in einer Menge von 0,78 g (56,1%) und mit einem Schmelzpunkt von 209–212°C zu erhalten.

[0043] Die Elementaranalyse für $C_{23}H_{32}ClN_5O_3/461,99$ ergab:

% berechnet C 59,80 H 6,98 N 15,16 O 10,39

% gefunden C 59,89 H 7,10 N 15,16 O 10,60

Beispiel 3 6-Amino-3-(3-cyclopentyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-(1-hydroxy-1-methylethyl)-3H-purinhydrochlorid

[0044] Eine Lösung von 6-Amino-8-(1-benzyl-1-methyl-ethyl)-3-(3-cyclopentyloxy-4-methoxybenzyl)-3H-purinhydrochlorid (2,13 g, 4,06 mmol) in THF : Methanol 1 : 1 (60 ml) wurde bei Raumtemperatur unter Druck mit 10% Pd-C (0,26 g) für 12 Stunden hydriert. Der Katalysator wurde durch Filtern entfernt und die Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Der Rückstand wurde in heißem Aceton suspendiert, der Feststoff bei 0–5°C gesammelt (1,23 g) und aus Methanol-Aceton rekristallisiert, um die oben genannte Verbindung in einer Menge von 0,76 g (43,2%) und mit einem Schmelzpunkt von 231–232°C zu erhalten.

[0045] Die Elementaranalyse für $C_{21}H_{28}ClN_5O_3 \cdot 0,5 H_2O$ ergab:

% berechnet C 56,69 H 7,02 N 15,74 O 12,58

% gefunden C 56,87 H 6,86 N 15,56 O 12,75

Beispiel 4 6-Ethylamino-3-(3-(3-hydroxycyclopentyloxy)-4-methoxy-benzyl)-8-(1-hydroxy-1-methyl-ethyl)-3H-purinhydrochlorid

A 1-(3-Benzyl-4-methoxybenzyl)-2-thiourea

[0046] Eine Lösung von 3-Hydroxy-4-methoxy-benzylalkohol (61,67 g, 400 mmol) in 1-Propanol (600 ml) wurde bei 60°C mit 97% t-BuOK (55,52 g, 480 mmol) und bei 90°C mit Benzylchlorid (66,57 ml, 560 mmol) umgesetzt. Die sich ergebende Mischung wurde dann im Rückfluss für 2 Stunden erhitzt. Danach wurde bei 90°C ein zweiter Ansatz von t-BuOK (9,25 g, 80 mmol) zugegeben. Nach einer weiteren Stunde Erhitzen im Rückfluss wurde ein dritter Ansatz von t-BuOK (9,25 g, 80 mmol) und ein zweiter Ansatz von Benzylchlorid (9,51 ml, 80 mmol) bei 90°C zugegeben. Nach weiteren 2,5 Stunden Erhitzen im Rückfluss wurde die Mischung auf Raumtemperatur abgekühlt und der Feststoff abgefiltert. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum abgezogen und der Rückstand mit Wasser (300 ml) behandelt. Ein Drittel des Lösungsmittels wurde dann im Vakuum abgezogen. Zum Rückstand wurde Wasser (100 ml) gegeben, das dann im Vakuum abdestilliert wurde. Der Vorgang wurde dann wiederholt. Die sich ergebende Suspension wurde filtriert, der Feststoff gesammelt, getrocknet und mit Petroleumether (2 × 600 ml) pulverisiert, um 3-Benzyl-4-methoxy-benzylalkohol (86,21 g, 88,2%) mit einem Schmelzpunkt von 62–65°C zu erhalten.

[0047] Thionylchlorid (64 ml) wurde über einen Zeitraum von 10 Minuten zu einer gerührten Lösung des oben genannten Alkohols in Dichlormethan (500 ml) gegeben. Nach 20 Minuten wurde die Mischung bis zur Trockne im Vakuum eingedampft, Toluol (2 × 75 ml) zugegeben und die Verdampfung im Vakuum wiederholt, um rohes 3-Benzyl-4-methoxy-benzylchlorid (97,85 g, 105,5%) zu erhalten. Das Chlorid (353 mmol) wurde in Aceton

gelöst (400 ml), mit Natriumthiocyanat (57,22 g, 706 mmol) behandelt, homogenisiert und im Rückfluss für 1,5 Stunden erhitzt. Der Feststoff wurde bei Raumtemperatur abgefiltert und das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Der Rückstand wurde in Wasser (600 ml) suspendiert, um eine Lösung mit pH 2 zu erhalten. Anschließend wurde mit Natriumbicarbonat-Lösung neutralisiert. Nach der Kristallisierung wurde der Feststoff gesammelt, getrocknet, in Dichlormethan (300 ml) gelöst, getrocknet (Na_2SO_4), mit Aktivkohle behandelt, gefiltert und bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde aus Petroleumether (400 ml) kristallisiert, um 3-Benzyloxy-4-methoxy-benzylthiocyanat (95,65 g, 95,0%) mit einem Schmelzpunkt von 70–74°C zu erhalten. Das Thiocyanat (335 mmol) wurde im Rückfluss in n-Valeronitril (280 ml) für 2 Stunden erhitzt und bis zur Trockne eingedampft, um 98,4 g des rohen Produktes zu erhalten. Dieses wurde in THF (200 ml) gelöst und mit 32%iger wässriger Ammoniaklösung (101 ml) bei Raumtemperatur behandelt. Nach 3 Stunden wurde der Thioharnstoff bei 10°C gesammelt und mit Diethylether gewaschen, um 1-(3-Benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-2-thioharnstoff (63,08 g, 62,2%) mit einem Schmelzpunkt von 179–181°C zu erhalten. Das Filtrat wurde bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand aus Dichlormethan rekristallisiert, um 11,51 g (11,3%) zu erhalten.

B. 6-Amino-1-(3-benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-2-thiouracil

[0048] 1-(3-Benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-2-thioharnstoff (72,58 g, 240 mmol) wurde einer Lösung von 97%igem t-BuOK (30,54 g, 264 mmol) in Isopropanol (300 ml) zugesetzt. Die Mischung wurde im Rückfluss bis zur kompletten Lösung erhitzt. Dann wurde Ethylcyanoacetat (26,1 ml, 245 mmol) zugegeben. Nach 5 Stunden im Rückfluss wurde die Mischung leicht abgekühlt und ein zweiter Ansatz t-BuOK (2,78 g, 24 mmol) und Ethylcyanoacetat (5,12 ml, 48 mmol) zugegeben. Die Mischung wurde im Rückfluss für weitere 15 Stunden erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, in Wasser gegossen (1,21) und unter Kühlung auf pH 8 mit 5 M HCl (43 ml) neutralisiert. Nach einstündigem Rühren wurde der Feststoff bei 10°C gesammelt und zuerst mit Wasser (180 ml), dann mit einer gesättigten Natriumbicarbonatlösung (60 ml), Isopropanol (60 ml) und schließlich kaltem Wasser (500 ml) gewaschen. Das Rohmaterial wurde in 0,5 M NaOH (1,41) und Isopropanol (350 ml) suspendiert. Der unlösliche Anteil wurde abgefiltert und mit 0,1 M NaOH und Wasser gewaschen, um wiedergewonnenen Thioharnstoff zu erhalten (10,45 g, 14,4%). Das Filtrat wurde auf pH 8 mit 2 M Phosphorsäure (175 ml) neutralisiert, über Nacht kristallisiert, der Feststoff gesammelt und mit den oben genannten drei Komponenten-Flüssigkeiten und Wasser gewaschen, um das Rohthiouracil (73,33 g) zu erhalten. Dieses Produkt wurde in heißem Aceton (600 ml) suspendiert, auf 500 ml aufkonzentriert und bei 0–5°C gesammelt, um 6-Amino-1-(3-benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-2-thiouracil (65,73 g, 74,1%) mit einem Schmelzpunkt von 239–240°C zu erhalten.

C. 1-(3-Benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-5,6-diamino-2-thiouracil

[0049] 6-Amino-1-(3-benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-2-thiouracil (36,94 g, 100 mmol) wurde in DMSO (74 ml) gelöst, mit THF (185 ml) verdünnt und mit 85%iger Phosphorsäure (7,46 ml) behandelt. Bei einer Temperatur von 55–60°C wurde 4 M Natriumnitrit (30 ml, 120 mmol) langsam zugegeben. Nach 30 Minuten wurde Methanol (10 ml) zugegeben, die Reaktion auf 30°C gekühlt und eine Suspension von 85%igem Natriumdithionit (40,96 g, 200 mmol) in Wasser (80 ml) langsam zugegeben. Nach der Zugabe von Wasser (200 ml) wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und die Suspension mit Wasser auf 1 l verdünnt. Der Feststoff wurde bei 0–5°C gesammelt, um das rohe 1-(3-Benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-5,6-diamino-2-thiouracil (40,58 g) zu erhalten.

D. 6-Amino-1-(3-benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-5-(2-benzyloxy-2-methylpropionylamino)-2-thiouracil

[0050] Eine Lösung von 2-Benzyloxy-2-methyl-propionylchlorid (30,70 g, 144 mmol) in THF (100 ml) wurde bei 0–5°C über einen Zeitraum von 15 Minuten zu einer gerührten Suspension von 1-(3-Benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-5,6-diamino-2-thiouracil (40,58 g, 100 mmol) und Triethylamin (31,4 ml, 225 mmol) in THF (400 ml) zugegeben. Nach einer Stunde wurde der Feststoff abgefiltert und die Lösung im Vakuum bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in einer Mischung aus Diethylether (400 ml), Wasser (100 ml) und einer gesättigten Natriumbicarbonatlösung (60 ml) suspendiert. Nach Kristallisation für 60 Stunden wurde der Feststoff gesammelt und mit Ether und Wasser gewaschen, um 6-Amino-1-(3-benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-5-(2-benzyloxy-2-methyl-propionylamino)-2-thiouracil (42,23 g, 75,3%) zu erhalten. Die Kristallisation aus Ethylacetat ergab einen Schmelzpunkt von 123–125/184–187°C.

E. 3-(3-Benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-(1-benzyloxy-1-methyl-ethyl)-2-thioxanthin

[0051] 6-Amino-1-(3-benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-5-(2-benzyloxy-2-methyl-propionylamino)-2-thiouracil (46,54 g, 83 mmol) und 97%iges t-BuOK (38,41 g, 332 mmol) wurden im Rückfluss in Isopropanol (460 ml) für

50 Minuten erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgedampft, der Rückstand in Wasser (300 ml) gelöst, zweimal mit 5 g Aktivkohle behandelt, gefiltert und Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 500 ml zugegeben. Der pH wurde dann auf einen neutralen Wert mit einer Mischung aus 5 M HCl (60 ml) und einer Natriumbicarbonatlösung eingestellt. Der Feststoff wurde bei 10°C gesammelt, um 41,62 g des Rohprodukts zu erhalten, das in Dichlormethan (60 ml) gelöst wurde und über ein Kieselgel (126 g) chromatographiert wurde, wobei Dichlormethan als Elutionsmittel benutzt wurde. Die Kristallisation aus Methanol ergab 3-(3-Benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-(1-benzyloxy-1-methyl-ethyl)-2-thioxanthin (31,5 g, 69,9%) mit einem Schmelzpunkt von 290–302°C (englisch: dec) zu erhalten.

F. 3-(3-Benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-(1-benzyloxy-1-methyl-ethyl)-hypoxanthin

[0052] 3-(3-Benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-(1-benzyloxy-1-methyl-ethyl)-2-thioxanthin (26,05 g, 48 mmol) wurde in 1-Propanol (700 ml) mit Raney-Nickel (29 g) (mit 0,1%iger wässriger Essigsäure behandelt) für 1,5 Stunden im Rückfluss erhitzt. Der Nickel wurde abgefiltert und das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Der Rückstand wurde in Dichlormethan (300 ml) gelöst, mit einer Natriumcarbonatlösung extrahiert und wieder zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in Methanol (150 ml) gelöst, mit Aktivkohle behandelt, gefiltert, konzentriert und kristallisiert, um 3-(3-Benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-(1-benzyloxy-1-methyl-ethyl)-hypoxanthin (15,81 g, 64,5%) mit einem Schmelzpunkt von 78–86°C (enthaltend Methanol) zu erhalten. Ein zweites Nachkristallisieren (englisch: crop) ergab 2,29 g (9,3%) des Hypoxanthins.

G 3-(3-Benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-(1-benzyloxy-1-methyl-ethyl)-6-ethylamino-3H-purinhydrochlorid

[0053] 3-(3-Benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-(1-benzyloxy-1-methyl-ethyl)-hypoxanthin (3,06 g, 6 mmol) wurde zweimal mit Toluol behandelt und zur Trockne eingedampft, um Reste an Methanol aus dem vorherigen Syntheseschritt zu entfernen. Anschließend wurde es mit Phosphoroxychlorid (30 ml) auf 70°C erhitzt. Nach 40 Minuten wurde die Reaktionsmischung im Vakuum zur Trockne eingedampft, was nach Zugabe von Toluol zweimal wiederholt wurde. Das rohe Chloropurin wurde in THF (50 ml) gelöst und langsam zu 70%igem, wässrigem Ethylamin (24 ml) unter Kühlung zugegeben. Nach 30 Minuten wurde die Reaktionsmischung im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in Dichlormethan (50 ml) gelöst, mit 1 M NaOH-Lösung extrahiert und erneut eingedampft. Der Rückstand wurde in Methanol (25 ml) gelöst, mit 1 M methanolischem HCl (6,1 ml) behandelt und im Vakuum zur Trockne eingedampft, um rohes 3-(3-Benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-(1-benzyloxy-1-methyl-ethyl)-6-ethylamino-3H-purinhydrochlorid (3,31 g, 96,2%) zu erhalten.

H. 6-Ethylamino-3-(3-hydroxy-4-methoxy-benzyl)-8-(1-hydroxy-1-methyl-ethyl)-3H-purinhydrochlorid

[0054] Das oben genannte rohe 3-(3-Benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-(1-benzyloxy-1-methyl-ethyl)-6-ethylamino-3H-purinhydrochlorid (3,28 g, 5,7 mmol) wurde bei Raumtemperatur unter Druck in einer Mischung von THF : Methanol 1 : 1 (60 ml) mit 10 %igem Pd-C (0,66 g) hydriert. Der Katalysator wurde abgefiltert, die Lösungsmittel im Vakuum abgedampft und der Rückstand aus Aceton kristallisiert, um 6-Ethylamino-3-(3-hydroxy-4-methoxy-benzyl)-8-(1-hydroxy-1-methyl-ethyl)-3H-purinhydrochlorid (1,80 g, 80,0%) mit einem Schmelzpunkt von 184–185°C zu erhalten.

I. 6-Ethylamino-3-(3-(3-hydroxycyclopentyl)oxy)-4-methoxy-benzyl)-8-(1-hydroxy-1-methyl-ethyl)-3H-purinhydrochlorid

[0055] Eine Lösung von 6-Ethylamino-3-(3-hydroxy-4-methoxy-benzyl)-8-(1-hydroxy-1-methyl-ethyl)-3H-purinhydrochlorid (1,18 g, 3 mmol) in DMF (12 ml) und Kaliumcarbonat (2,49 g, 18 mmol) wurde bei Raumtemperatur mit rohem cis-trans-3-Bromocyclopentanol (1,49 g, 9 mmol) (hergestellt aus cis-trans-1,3-Cyclopentandiol und Triphenylphosphindibromid) behandelt. Nach 72 Stunden wurde eine zweite Portion Kaliumcarbonat (0,62 g, 4,5 mmol) und cis-trans-3-Bromocyclopentanol (0,74 g, 4,5 mmol) zugegeben. Nach 6 Tagen wurde der Feststoff abgefiltert und die Lösung im Vakuum eingedampft. Dieser Vorgang wurde viermal mit Wasser wiederholt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan gelöst, mit 1 M NaOH extrahiert und bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand (1,71 g) wurde in Methanol (20 ml) gelöst, mit 1 M methanolischem HCl (3,2 ml) behandelt und bis zur Trockne im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde aus Aceton kristallisiert und aus Methanol-Aceton rekristallisiert, um das Rohprodukt (1,02 g) zu erhalten. Die unreinen Kristalle wurden in THF (70 ml) gelöst und viermal mit 2 M NaOH und einmal mit Natriumchloridlösung extrahiert, zur Trockne eingedampft, in Dichlormethan aufgenommen, mit Natriumsulfat getrocknet, gefiltert und bis zur Trockne eingedampft. Die freie Base wurde dann wieder in das HCl-Salz überführt und aus Aceton kristallisiert, um 0,78 g (54,6%) der im Titel des Beispiels angegebenen Verbindung mit einem Schmelzpunkt von 180–185°C zu erhalten.

[0056] Die Elementaranalyse für $C_{23}H_{32}ClN_5O_4$ mit 1% HCl und 1% H_2O ergab:

% berechnet C 56,63 H 6,76 N 14,36 O 14,01 Cl 8,24

% gefunden C 56,30 H 6,80 N 14,48 O 13,99 Cl 7,92

Beispiel 5 6-Amino-3-(3-(3-hydroxycyclopentyloxy)-4-methoxy-benzyl)-8-(1-hydroxy-1-methyl-ethyl)-3H-purinhydrochlorid

A. 6-Amino-3-(3-benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-(1-benzyloxy-1-methyl-ethyl)-3H-purinhydrochlorid

[0057] 3-(3-Benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-(1-benzyloxy-1-methyl-ethyl)-hypoxanthin (Beispiel 4 F) (3,06 g, 6 mmol) wurde zweimal mit Toluol behandelt, bis zur Trockne eingedampft, um Reste an Methanol aus dem vorherigen Syntheseschritt zu entfernen, und dann mit Phosphoroxychlorid (30 ml) auf 70°C erhitzt. Nach 35 Minuten wurde die Lösung im Vakuum zur Trockne eingedampft, unter Zugabe von Toluol wurde der Vorgang zweimal wiederholt. Die Rohchloro-Verbindung wurde in THF (40 ml) gelöst und unter Kühlung zu 32%igem wässrigem Ammoniak (12 ml) in einen 450 ml Druckreaktor gegeben. Nach der Zugabe von flüssigem Ammoniak (50 ml) bei -30°C wurde die Reaktionsmischung auf 60°C (340 psi) für 3 Stunden erhitzt. Der Feststoff wurde abgefiltert und die Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Der Rückstand wurde in Dichlormethan (40 ml) gelöst, mit 1 M NaOH (2 × 10 ml) extrahiert und wiederum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in Methanol gelöst, mit 1 M methanolischer HCl-Lösung (6,2 ml) behandelt und zur Trockne im Vakuum eingedampft, um das leicht unreine 6-Amino-3-(3-benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-(1-benzyloxy-1-methyl-ethyl)-3H-purinhydrochlorid (3,22 g, 98,2%) mit einem Schmelzpunkt von 189–190°C (nach Kristallisation aus Aceton) zu erhalten.

B. 6-Amino-3-(3-hydroxy-4-methoxybenzyl)-8-(1-hydroxy-1-methyl-ethyl)-3H-purinhydrochlorid

[0058] Eine Lösung des oben genannten 6-Amino-3-(3-benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-(1-benzyloxy-1-methyl-ethyl)-3H-purinhydrochlorid (3,22 g) in THF : Methanol 1 : 1 (60 ml) wurde bei Raumtemperatur unter Druck für 2,5 Stunden mit 10% Pd-C (0,64 g) hydriert. Der Katalysator wurde abgefiltert und die Lösung im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde aus Aceton kristallisiert, um 6-Amino-3-(3-hydroxy-4-methoxy-benzyl)-8-(1-hydroxy-1-methyl-ethyl)-3H-purinhydrochlorid (1,67 g, 77,3%) mit einem Schmelzpunkt von 155–160°C zu erhalten.

C. 6-Amino-3-(3-(3-hydroxycyclonentyloxy)-4-methoxy-benzyl)-8-(1-hydroxy-1-methyl-ethyl)-3H-purinhydrochlorid

[0059] Eine gerührte Lösung von 6-Amino-3-(3-hydroxy-4-methoxy-benzyl)-8-(1-hydroxy-1-methyl-ethyl)-3H-purinhydrochlorid (1,46 g, 4 mmol) in DMF (15 ml) wurde mit Kaliumcarbonat (3,46 g, 25 mmol) und cis-trans-3-Bromocyclopentanol (2,53 g, 15,31 mmol) behandelt. Nach 3 Tagen bei Raumtemperatur wurde ein zweiter Ansatz Kaliumcarbonat (1,1 g, 8 mmol) und 3-Bromocyclopentanol (1,33 g, 8,1 mmol) zugegeben. Nach 10 Tagen wurde der Feststoff abgefiltert und die Lösung im Vakuum eingedampft. Der Feststoff wurde in Dichlormethan (70 ml) gelöst, zweimal mit 1 M NaOH (20 ml) extrahiert und im Vakuum bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in Methanol (20 ml) gelöst, mit 1 M methanolischer HCl-Lösung (4 ml) behandelt und wiederum im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde aus Aceton kristallisiert, um Dihydroxyadenin (1,08 g, 60,0%) zu erhalten, das dann in Wasser (30 ml) gelöst wurde und mit einer kleinen Menge an Ether und 10 M NaOH-Lösung (3 ml) behandelt wurde. Nach 72 Stunden wurden die Kristalle gesammelt, getrocknet und aus wassergesättigtem Ethylacetat rekristallisiert, um die im Titel des Beispiels angegebene Verbindung (0,66 g, 40,0%) mit einem Schmelzpunkt von 98–108°C und einem trans-cis-Verhältnis von ca. 4 : 1 bei 250 MHz N.M.R. zu erhalten.

[0060] Die Elementaranalyse für $C_{21}H_{27}N_5O_4$ mit 10,2% Wasser ergab:

% berechnet C 54,78 H 7,05 N 15,21 O 22,96

% gefunden C 54,47 H 7,05 N 15,12 O 22,64

Beispiel 6 6-Ethylamino-3-(3-(3-hydroxycyclopentyloxy)-4-methoxy-benzyl)-8-isopropyl-3H-purinhydrochlorid

A. 6-Amino-1-(3-benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-5-isobutyrylamino-2-thiouracil

[0061] Eine 4 M Natriumnitritlösung (46,6 ml, 186 mmol) wurde über einen Zeitraum von 5 Minuten bei 55°C

unter Rühren zu einer Lösung von 6-Amino-1-(3-benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-2-thiouracil (53,00 g, 144 mmol) und 85%iger Phosphorsäure (12,09 ml, 179 mmol) in DMF (550 ml) gegeben. Nach 1,5 Stunden wurde die Reaktionsmischung auf 35°C gekühlt und mit einer Suspension von 85%igem Natriumdithionit (58,77 g, 287 mmol) in Wasser (138 ml) behandelt. Nach 30 Minuten wurde Isobutyricanhydrid (72 ml, 215 mmol) zugegeben. Nach einer Stunde wurde die Suspension langsam mit 1 M NaOH (790 ml) und Wasser (1950 ml) (pH veränderte sich von 3 auf 7) langsam verdünnt. Die Lösung wurde über Nacht gerührt und Natriumbicarbonat (24,2 g) zugegeben, um den pH auf 7.5 einzustellen. Der Feststoff wurde gesammelt, mit 0,2 M Natriumbicarbonatlösung gewaschen. Anschließend wurde der Feststoff mit Wasser gewaschen und danach getrocknet, um das rohe Thiouracil (56,10 g, 86,0%) zu erhalten. Eine Pulverisierung mit Aceton ergab 6-Amino-1-(3-benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-5-isobutyrylamino-2-thiouracil mit einem Schmelzpunkt von 240–244°C.

B. 3-(3-Benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-isopropyl-2-thioxanthin

[0062] 6-Amino-1-(3-benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-5-isobutyrylamino-2-thiouracil (56,10 g, 123 mmol) wurde im Rückfluss in einer 1 M NaOH-Lösung (560 ml) für 40 Minuten erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde der Feststoff durch Filtration abgetrennt, die Lösung zweimal mit Aktivkohle (2,7 g) behandelt, gefiltert und mit 5 M HCl (95 ml) auf pH 8 neutralisiert. Der Feststoff wurde gesammelt, mit 0,1 M Natriumbicarbonatlösung und Wasser gewaschen und dann getrocknet, um das Rohprodukt (38,65 g, 71,7%) zu erhalten. Die Kristallisierung aus THF und Methanol ergab ein immer noch unreines Produkt (34,65 g), das in 1 M NaOH (340 ml) gelöst wurde, zweimal mit Aktivkohle (3,4 g) behandelt wurde, gefiltert, mit Methanol (80 ml) verdünnt und mit 85%iger Phosphorsäure (13 ml) neutralisiert wurde. Der Feststoff wurde gesammelt, mit Wasser (1,51) gewaschen, bis ein neutraler pH-Wert erreicht wurde, um 3-(3-Benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-isopropyl-2-thioxanthin (28,99 g, 53,8%) mit einem Schmelzpunkt von 280–281°C zu erhalten.

C. 3-(3-Benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-isopropyl-hypoxanthin

[0063] 3-(3-Benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-isopropyl-2-thioxanthin (21,83 g, 50 mmol) wurde im Rückfluss in 1-Propanol (700 ml) mit Raney-Nickel (30 g) (vorbehandelt mit 0,1% wässriger Essigsäure) erhitzt. Nach 4 Stunden wurde der Nickel abgefiltert und mit heißem Propanol und Chloroform gewaschen. Die Lösung wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in Chloroform gelöst, mit 1 M Natriumcarbonatlösung extrahiert, getrocknet (Na_2SO_4), zweimal mit Aktivkohle (0,8 g) behandelt, gefiltert und bis zur Trockne im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in heißem Aceton (250 ml) suspendiert, konzentriert und der Feststoff bei 0–5°C gesammelt, um 3-(3-Benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-isopropyl-hypoxanthin (15,27 g, 75,5%) mit einem Schmelzpunkt von 233–235°C zu erhalten.

D. 3-(3-Benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-6-ethylamino-8-isopropyl-3H-purinhydrochlorid

[0064] 3-(3-Benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-isopropyl-hypoxanthin (2,02 g, 5 mmol) und Phosphoroxchlorid (20 ml) wurden für 35 Minuten auf 70°C erhitzt. Die Lösung wurde zur Trockne eingedampft und das Abdampfen zweimal nach Zugabe von Toluol (50 ml) wiederholt. Der rohe Chloropurinrückstand wurde in THF (20 ml) gelöst und bei 0–5°C zu 70%igem wässrigem Ethylamin (20 ml) zugegeben. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand wurde in Dichlormethan (70 ml) gelöst und mit 1 M NaOH gewaschen. Die organische Phase wurde durch 9 g Kieselsäuregel, das sich in einer Säule befand, gefiltert und bis zur Trockne im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in Methanol (20 ml) gelöst, mit 1 M methanolischer HCl (4,8 ml) behandelt und bis zur Trockne im Vakuum eingedampft, um 3-(3-Benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-6-ethylamino-8-isopropyl-3H-purinhydrochlorid (2,20 g, 94,0%) mit einem Schmelzpunkt von 79–83°C (nach Kristallisation aus wassergesättigtem Ether) zu erhalten.

E. 6-Ethylamino-3-(3-hydroxy-4-methoxy-benzyl)-8-isopropyl-3H-purinhydrochlorid

[0065] Eine Lösung des oben genannten 3-(3-Hydroxy-4-methoxy-benzyl)-6-ethylamino-8-isopropyl-3H-purinhydrochlorids (2,20 g, 4,7 mM) in THF : Methanol 1 : 1 (140 ml) wurde für eine Stunde mit 10% Pd-C (0,44 g) hydriert. Der Katalysator wurde abgefiltert und die Lösung zur Trockne im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde aus Ethylacetat kristallisiert, um die im Titel angegebene Verbindung (1,64 g, 92,1%) mit einem Schmelzpunkt von 156–160°C zu erhalten.

F. 6-Ethylamino-3-(3-(3-hydroxycyclopentyl)oxy-4-methoxy-benzyl)-8-isopropyl-3H-purinhydrochlorid

[0066] Eine Lösung von 3-(3-Hydroxy-4-methoxy-benzyl)-6-ethylamino-8-isopropyl-3H-purinhydrochlorid (0,76 g, 2 mmol) in DMF (8 ml) wurde bei Raumtemperatur mit Kaliumcarbonat (1,66 g, 12 mmol) behandelt.

Nach einer Stunde wurde es mit rohem cis-trans-3-Bromocyclopentanol (0,99 g, 6 mmol) behandelt. Nach Rühren für 18 Stunden wurde ein weiterer Ansatz Kaliumcarbonat (0,83 g, 6 mmol) und 3-Bromocyclopentanol (0,99 g, 6 mmol) zugegeben. Nach weiteren 24 Stunden wurde der Feststoff abgefiltert und die Lösung zur Trockne im Vakuum eingedampft. Nach Zugabe von Wasser wurde das Abdampfen viermal wiederholt. Der Feststoff wurde in Chloroform (50 ml) gelöst und mit 1 M NaOH-Lösung (2 × 20 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde bis zur Trockne im Vakuum eingedampft. Der Rückstand (1,35 g) wurde in Dichlormethan : Methanol 98 : 2 (5 ml) gelöst und mittels Säulenchromatographie über 30 g Kieselsäuregel gereinigt. Das Rohprodukt (0,16 g) wurde in Methanol (5 ml) gelöst, mit 1 M methanolischer HCl (0,4 ml) behandelt und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde aus Ethylacetat kristallisiert, um die im Titel des Beispiels angegebene Verbindung (0,15 g, 16,2%) mit einem Schmelzpunkt von 165– 169°C zu erhalten.

[0067] Die Elementaranalyse für $C_{23}H_{32}ClN_5O_3$ ergab:

% berechnet C 59,80 H 6,98 N 15,16 O 10,39

% gefunden C 59,60 H 6,99 N 15,02 O 10,58

Beispiel 7 6-Amino-3-(3-(3-hydroxycyclopentyloxy)-4-methoxy-benryl)-8-isopropyl-3H-purinhydrochlorid

A. 6-Amino-3-(3-benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-isopropyl-3H-purinhydrochlorid

[0068] 3-(3-Benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-isopropyl-hypoxanthin (Beispiel 6 C) (4,04 g, 10 mmol) und Phosphoroxchlorid (40 ml) wurden für 35 Minuten auf 70°C erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde im Vakuum bis zur Trockne eingedampft und das Abdampfen wurde nach Zugabe von Toluol zweimal wiederholt. Das Rohchloropurin wurde in THF (40 ml) gelöst und langsam unter Kühlung zu 32%igem wässrigem Ammoniak (12 ml, 200 mmol) in einem 450 ml Druckreaktor zugegeben. Nach der Zugabe von flüssigem Ammoniak (50 g) bei -30°C wurde die Mischung auf 60°C (340 psi) für 3 Stunden erhitzt. Der Feststoff wurde abgefiltert und die Lösung im Vakuum bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in Wasser (100 ml) suspendiert und die Mischung wurde gefiltert, um das Rohprodukt (4,09 g) als einen kristallinen Feststoff zu erhalten. Dieser wurde in Methanol (60 ml) gelöst, mit 1 M methanolischer HCl-Lösung (10 ml) behandelt, zur Trockne im Vakuum eingedampft, in Aceton suspendiert und gefiltert, um 6-Amino-3-(3-benzyloxy-4-methoxybenzyl)-8-isopropyl-3H-purinhydrochlorid (4,04 g, 91,8%) als einen kristallinen Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 200°C (Sublimierung)/240–243°C zu erhalten.

B. 6-Amino-3-(3-hydroxy-4-methoxy-benzyl)-8-isopropyl-3H-purinhydrochloridhydrat

[0069] 6-Amino-3-(3-benzyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-isopropyl-3H-purinhydrochlorid (4,04 g, 9,2 mmol) in THF : Methanol 1 : 1 (600 ml) wurde für 10 Stunden mit 10% Pd-C (0,8 g) bei Raumtemperatur und unter Druck hydriert. Der Katalysator wurde abgefiltert, die Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und der Rückstand aus Aceton kristallisiert, um 6-Amino-3-(3-hydroxy-4-methoxy-benzyl)-8-isopropyl-3H-purinhydrochlorid (2,53 g, 78,8%) mit einem Schmelzpunkt von 125–130/185–195°C zu erhalten.

[0070] Die Elementaranalyse für $C_{16}H_{20}ClN_5O_2$ mit $H_2O/367,84$ ergab:

% berechnet C 52,25 H 6,03 N 19,04 O 13,05

% gefunden C 52,55 H 5,96 N 19,05 O 12,55

C. 6-Amino-3-(3-(3-hydroxycyclopentyloxy)-4-methoxy-benzyl)-8-isopropyl-3H-purinhydrochlorid

[0071] Eine Lösung von 6-Amino-3-(3-hydroxy-4-methoxy-benzyl)-8-isopropyl-3H-purinhydrochlorid (2,45 g, 7,0 mmol) in DMF (25 ml) wurde mit Kaliumcarbonat (5,80 g, 42 mmol) behandelt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für eine Stunde gerührt, dann wurde rohes cis-trans-3-Bromocyclopentanol (3,47 g, 21 mmol) zugegeben. Nach 21 Stunden wurde ein zweiter Ansatz Kaliumcarbonat (2,90 g, 21 mmol) und 3-Bromocyclopentanol (3,47 g, 21 mmol) zugegeben. Nach weiterem Rühren für 6 Tage wurde der Feststoff abgefiltert und das Lösungsmittel im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in Chloroform (50 ml) gelöst, mit 1 M NaOH-Lösung extrahiert und erneut im Vakuum eingedampft. Der Rückstand (5,84 g) wurde in Dichlormethan : Methanol 98 : 2 (50 ml) gelöst und durch Säulenchromatographie über ein Kieselsäuregel gereinigt, wobei mit einem Gradienten von 2–10% Methanol in Dichlormethan eluiert wurde. Die Fraktionen wurden gesammelt (0,78 g, 28,0%), in das HCl-Salz überführt und aus Aceton kristallisiert, um die im Titel des Beispiels angegebene Verbindung (0,55 g, 18,1%) mit einem Schmelzpunkt von 185– 187°C zu erhalten.

[0072] Die Elementaranalyse für $C_{21}H_{28}ClN_5O_3/433,94$ ergab:

% berechnet C 58,13 H 6,50 N 16,14 O 11,06

% gefunden C 57,84 H 6,60 N 16,10 O 11,39

Enzymisolierungsprotokolle

[0073] Protokolle zur Isolierung von PDE III, PDE IV und PDE V sowie zur Bestimmung der Inhibitionsaktivitäten werden im folgenden dargestellt.

Typ III Phosphodiesterase

Protokoll zur Enzymisolation:

[0074] Die Typ III-PDE wurde aus humanen Plättchenzellen isoliert, wobei ein Verfahren angewandt wurde, das ähnlich zu dem bereits früher von Weishaar R. E., Burrows S. D., Kobylarg D. C., Quade N. M., Evans D. B.: *Biochem. Pharmacol.* 35: 787, 1986, beschrieben ist. Kurz dargestellt, wurden 1–2 Einheiten von Plättchenzellen in einem gleichen Volumen Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, enthaltend 2 mM Magnesiumacetat, 1 mM Dithiothreitol und 5 mM Na₂EDTA) suspendiert. Der Proteaseinhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) war in diesem Puffer mit einer Endkonzentration von 200 mM enthalten. Die Suspension wurde unter Verwendung eines Polytron homogenisiert und das Homogenisat wurde dann bei 100.000 g für 60 Minuten zentrifugiert. Alle Arbeitsschritte wurden bei 0–4°C durchgeführt. Der Überstand wurde dann durch 4 Lagen Gaze filtriert und auf eine DEAE-Trisacryl M Säule aufgebracht. Diese war vorher mit Puffer B (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, enthaltend 1 mM Magnesiumacetat, 1 mM Dithiothreitol und 200 mM PMSF) equilibriert worden. Nach Aufbringen der Probe wurde die Säule mit mehreren Säulenvolumenpuffer B gewaschen. Anschließend wurden die verschiedenen PDE-Formen von der Säule unter Verwendung zweier sukzessiver linearer NaCl-Gradienten (0,05–0,15 M, 300 ml gesamt, 0,15–0,40 M, 200 ml gesamt) eluiert. Es wurden 5 mm Fraktionen gesammelt und hinsichtlich zyklischer AMP- und zyklischer GMP-PDE-Aktivität getestet. Fraktionen, die PDE III-Aktivität aufwiesen, wurden gepoolt und über Nacht gegen 41 Puffer B dialysiert. Die dialysierte PDE III wurde dann auf 10% ihres ursprünglichen Volumens aufkonzentriert, auf 50% mit Ethylenglycolmonoethylether verdünnt und bei –20°C gelagert. PDE III kann typischerweise bis zu 4 Wochen mit wenig oder keinem Aktivitätsverlust gelagert werden.

Messung von Typ III PDE-Aktivität:

[0075] Die Enzymaktivität wurde durch Messung der Hydrolyse von [³H]-zyklischem AMP, wie durch Thompson W. J., Teraski W. L., Epstein P. N., Strada S. J.: *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 10: 69, 1979, bestimmt. Im Nachweisverfahren betrug die zyklische AMP-Konzentration 0,2 mM, was ca. dem K_m-Wert entspricht. Die Proteinkonzentration wurde so eingestellt, dass nicht mehr als 15% der verfügbaren Substratmenge während der Inkubationsphase hydrolysiert werden konnten.

[0076] Alle Testverbindungen wurden in Dimethylsulfoxid (Endkonzentration 2,5%) gelöst. Diese Dimethylsulfoxidkonzentration inhibiert die Enzymaktivität ca. um 10%.

Typ IV Phosphodiesterase

Protokoll für die Enzymisolation:

[0077] Die Typ IV-PDE wurde aus bovinen, glatten Muskelzellen der Luftröhre unter Verwendung eines Verfahrens, das ähnlich zu dem früher von Silver P. J. et. al.: *Eur. J. Pharmacol.* 150 : 85, 1988 (1), beschrieben ist, isoliert. Kurz dargestellt, wurden die glatten Muskulaturzellen aus bovinen Luftröhren zerkleinert und mit Hilfe eines Polytron in 10 Volumen eines Extraktionspuffers, der 10 mM Tris-Aceat (pH 7.5), 2 mM Magnesiumchlorid, 1 mM Dithiothreitol und 2.000 Einheiten/ml Aprotinin enthielt, homogenisiert. Alle Verfahrensschritte wurden bei 0–4°C durchgeführt. Das Homogenisat wurde ultraschallbehandelt und dann bei 48.000 g für 30 Minuten zentrifugiert. Der entstehende Überstand wurde auf eine DEAE Trisacryl-M-Säule aufgebracht, die zuvor mit Natriumacetat und Dithiothreitol equilibriert worden war. Nach Aufbringen der Probe wurde die Säule mit Natriumacetat/Dithiothreitol gewaschen und anschließend wurden die verschiedenen PDE-Formen von der Säule mit Hilfe eines linearen Tris-HCl/NaCl-Gradienten eluiert. Fraktionen, die Typ IV-PDE enthielten, wurden gesammelt, dialysiert und auf 14% des Ausgangsvolumens aufkonzentriert. Die konzentrierten Fraktionen wurden auf 50% mit Ethylenglykol verdünnt und bei –20°C gelagert.

Messung der Typ IV PDE-Aktivität:

[0078] Die Enzymaktivität wurde durch Messung der Hydrolyse von [³H]-zyklischem AMP, wie beschrieben durch Thompson W. J. et. al.: Adv. Cyclic Nucleotide Res. 10: 69, 1979, bestimmt. Die für das Nachweisverfahren verwendete zyklische AMP-Konzentration betrug 0,2 mM, was ca. dem K_m-Wert entspricht. Die Proteinkonzentration wurde so eingestellt, dass nicht mehr als 15% der verfügbaren Substratmenge während der Inkubationsphase hydrolysiert wurden.

[0079] Alle Testverbindungen wurden in Dimethylsulfoxid (Endkonzentration 2,5%) gelöst. Diese Dimethylsulfoxidkonzentration inhibiert die Enzymaktivität um ca. 10%.

Messung der Typ V PDE-Aktivität

Protokoll zur Enzymisolation:

[0080] Typ V-PDE wurde unter Verwendung eines Verfahrens isoliert, das dem bereits früher durch Weishaar et. al., Hypertension 15: 528 (1990), beschriebenen ähnlich ist. Kurz dargestellt wurden 1–2 Einheiten von Plättchenzellen in einem gleichen Volumen von Puffer A (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, enthaltend 2 mM Magnesiumacetat, 1 mM Dithiothreitol und 5 mM Na₂EDTA) unter Verwendung eines Polytrons suspendiert. Der Proteinase-Inhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) war ebenfalls im Puffer bei einer Endkonzentration von 200 µM enthalten. Alle Arbeitsschritte wurden bei 0–4°C durchgeführt. Das Homogenisat wurde bei 100.000 rpm (englisch: revolutions per minute) für 60 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und durch 4 Lagen Gaze filtriert und auf eine DEAE Trisacryl-M-Säule aufgebracht. Die Säule wurde mit mehreren Bettvolumen Puffer B (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, enthaltend 2 mM Magnesiumacetat, 1 mM Dithiothreitol und 200 mM PMSF) und mit zwei sukzessiven linearen NaCl-Gradienten (0,05–0,15 M, 300 ml gesamt, 0,15–0,40 M, 200 ml gesamt) eluiert. Es wurden 5 ml Fraktionen gesammelt und hinsichtlich zyklischer AMP- und zyklischer GMP-PDE-Aktivität untersucht. Fraktionen, die PDE V enthielten, wurden gepoolt und über Nacht gegen 41 Puffer C (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, enthaltend 2 mM Magnesiumacetat und Proteinaseinhibitoren) dialysiert. Die dialysierte PDE V wurde dann auf 10% des Ausgangsvolumens aufkonzentriert, auf 50% mit Ethylenglykolmonoethylether verdünnt und bei –20°C gelagert. PDE V kann typischerweise bis zu 4 Wochen mit wenig oder keinem Aktivitätsverlust gelagert werden.

Messung der Typ V PDE-Aktivität:

[0081] Die Enzymaktivität wurde durch Messen der Hydrolyse von [³H]-zyklischem GMP, wie durch Thompson et. al. (Thompson W. J., Teraski W. L., Epstein P. N., Strada S. J.: Adv. Cyclic Nucleotide Res. 10: 69, 1979) beschrieben, bestimmt. Für das Nachweisverfahren wurde eine zyklische GMP-Konzentration von 0,2 µM verwendet, die ca. dem K_m-Wert entspricht. Die Proteinkonzentration wurde so eingestellt, dass nicht mehr als 15% der verfügbaren Substratmenge während der Inkubationsphase hydrolysiert wurden.

[0082] Alle Testverbindungen wurden in Dimethylsulfoxid gelöst (Endkonzentration 2,5%). Diese Dimethylsulfoxid-Konzentration inhibiert die Enzymaktivität um ca. 10%. Der Referenztyp V PDE-Inhibitor Zaprinast wurde ebenfalls mit jedem Ansatz gemessen.

[0083] Die Verbindungen wurden über einen Konzentrationsbereich von 0,1, 1, 10, 100 µM (n = 1) gemessen und IC₅₀-Bestimmungen wurden unter Verwendung von 5 angemessenen Konzentrationen (n = 2) durchgeführt.

[0084] Wie aus dem Vorhergehenden hervorgeht, sind die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung ebenfalls potente Inhibitoren von PDE IV aus Säugetieren. Eine solche Aktivität ist in den medizinischen Wissenschaften nützlich, um die Proliferation von Zellen der glatten Muskulatur zu reduzieren und die pulmonäre Vasodilatation zu erhöhen. Bezüglich bestimmter Aspekte der Erfindung belegen die Verbindungen eine Kombination von selektiver PDE IV und PDE V Inhibition und können bei Krankheiten wie Restenose und verwandten Krankheiten eingesetzt werden. Solche Aspekte schließen natürlich die Verabreichung einer effektiven Menge einer erfindungsgemäßen Verbindung, die besagte Kombination an PDE IV und PDE V inhibitorischen Aktivitäten aufweist, an ein Säugetier, das einer solchen Therapie bedarf, mit ein.

[0085] Unter Anwendung der oben beschriebenen Verfahren wurde die PDE III, PDE IV und PDE V Inhibition für die Verbindungen der Beispiele 1–5 getestet und verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle I gezeigt:

Tabelle I

BEISPIEL	PDE III IC ₅₀ (μM)	PDE IV IC ₅₀ (μM)	PDE V IC ₅₀ (micro M)
1	381	0,82	373
2	257	0,19	30,5
3	>1000	0,25	800
4	>1000	0,59	>1000
5	>1000	2,25	>1000

Patentansprüche

1. Eine Verbindung ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

6-Amino-3-(3-cyclopentyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-isopropyl-3H-purin;
 3-(3-Cyclopentyloxy-4-methoxy-benzyl)-6-ethylamino-8-(1-hydroxy-1-methyl-ethyl)-3H-purin;
 6-Amino-3-(3-cyclopentyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-(1-hydroxy-1-methyl-ethyl)-3H-purin;
 6-Ethylamino-3(3-((1RS,3RS)-3-hydroxycyclopentyloxy-4-methoxy-benzyl)-8-(1-hydroxy-1-methyl-ethyl)-3 H-purin;
 6-Amino-3-(3-((1RS,3RS)-3-hydroxycyclopentyloxy)-4-methoxy-benzyl)-8-(1-hydroxy-1-methyl-ethyl)-3 H-purin;
 6-Ethylamino-3-(3-((1RS,3RS)-3-hydroxycyclopentyloxy)-4-methoxybenzyl)-8-isopropyl-3H-purin;
 6-Amino-3-(3-((1RS,3RS)-3-hydroxycyclopentyloxy)-4-methoxy-benzyl)-8-isopropyl-3H-purin;
 sowie pharmazeutisch verträgliche Salze und stereoisomere Formen der vorgenannten Verbindungen.

2. Verwendung einer Verbindung gemäß Anspruch 1 zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparats zur Behandlung eines Patienten, der an einer Krankheit leidet, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Asthma, Allergien, Entzündungen und Depression.

3. Eine pharmazeutische Zusammensetzung umfassend einen pharmazeutisch verträglichen Träger und eine Verbindung gemäß Anspruch 1.

4. Eine pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 3, die zur oralen Verabreichung geeignet ist.

5. Eine pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 3, die zur Verabreichung durch Inhalieren geeignet ist.

6. Eine pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 3, die zur parenteralen Verabreichung geeignet ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen