



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 323138

(13) B1

(51) Int Cl.

*C07H 19/16 (2006.01)*

*A61K 31/7076 (2006.01)*

*A61P 9/00 (2006.01)*

### Patentstyret

---

(21)	Søknadsnr	20022573	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.11.29 PCT/US00/42396
(22)	Inng.dag	2002.05.30	(85)	Videreføringsdag	2002.05.30
(24)	Løpedag	2000.11.29	(30)	Prioritet	1999.12.03, US, 454485
(41)	Alm.tilgj	2002.05.30			
(45)	Meddelt	2007.01.08			
(73)	Innehaver	CV Therapeutics Inc , 3172 Porter Drive, CA94304 PALO ALTO, US			
(72)	Oppfinner	Prabha N Ibrahim, 3380 Lubich Drive, CA94041 MOUNTAIN VIEW, US Jeff A Zablocki, 580 Sleeper Avenue, CA94040 MOUNTAIN VIEW, US Venkata P Palle, 600 Rainbow Drive, Mountain View, CA 94041, US Luiz Belardinelli, 704 University Drive, CA94025 MENLO PARK, US			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS , Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, NO			

---

(54)	Benevnelse	<b>N<sup>6</sup>-heterosykliske, 8-modifiserte adenosinderivater og farmasøytiske sammensetninger omfattende samme.</b>			
(56)	Anførte publikasjoner	Ingen			
(57)	Sammendrag				

N<sup>6</sup>-heterosykliske, 8-modifiserte adenosinderivater som er selektive, delvise eller fulle adenosin-A<sub>1</sub>-reseptor fulle eller delvise agonister, og er som sådan anvendelige for å modifisere hjerteaktivitet, modifisere adipocytffunksjon, behandle sentralnervesystemforstyrrelser og behandle diabetiske forstyrrelser og fedme hos pattedyr og særlig hos mennesker.

Foreliggende oppfinnelse angår N<sup>6</sup>-heterosykliske, 8-modifiserte adenosinderivater og farmasøytiske sammensetninger omfattende samme. De farmasøytiske sammensetningene ifølge oppfinnelsen er selektive, delvise eller fulle adenosin-A<sub>1</sub>-reseptoragonister, og er som sådan anvendelige for å modifisere hjerteaktivitet, modifisere adipocytffunksjon, behandle sentralnervesystemforstyrrelser og behandle diabetiske forstyrrelser og fedme hos pattedyr, særlig hos mennesker.

Det er minst to undertyper adenosinreseptorer i hjertet: A<sub>1</sub> og A<sub>2A</sub>. Hver undertype påvirker forskjellige fysiologiske funksjoner. A<sub>1</sub>-adenosinreseptoren formidler to forskjellige fysiologiske responser. Inhibering av de kardiostimulerende effektene til katekolamin formidles via inhiberingen av adenylatcyklase, mens de direkte effektene for å sette ned hastigheten på hjertet (HR) eller forlenge impulspropageringen gjennom AV-noden er for en stor del på grunn av aktivering av I<sub>KAdo</sub>. [B. Lerman og L. Balardinelli Circulation, vol. 83 (1991), s. 1499-1509 og J. C. Shryock og L. Belardinelli The Am. J. Cardiology, Vol. 79 (1997) s. 2-10]. Både anti-β-adrenergisk virkning og direkte undertrykkende effekter av SA- og AV-nodal funksjon formidles ved A<sub>1</sub>-reseptoren; det er ingen rolle for A<sub>2A</sub>-reseptoren i denne responsen til adenosin. A<sub>2A</sub>-reseptorene formidler hjertevasodilatasjon forårsaket av adenosin. Stimulering av A<sub>1</sub>-adenosinreseptor følgerlig forkorter varigheten og reduserer amplituden til virkningspotensialet til AV-nodale celler, og således forlenger refraksjonsperioden til den AV-nodale cellen. Konsekvensen av disse effektene er å begrense antallet impulser utført av arterien til ventriklene. Dette danner basis for den kliniske anvendelsen for A<sub>1</sub>-reseptoragonister for behandling av supraventrikulær takykardi, som inkluderer terminering av nodal innadgående takykardi, og kontroll av ventrikulær hastighet i løpet av atrial fibrillering og flimmer.

En klinisk anvendelse av A<sub>1</sub>-agonister er derfor ved behandling av akutte og kroniske forstyrrelser i hjerterytme, særlig de sykdommer som kjennetegnes ved rask hjerte-hastighet hvor hastigheten drives av abnormaliteter i sinoatrial, atria og AV-nodalt vev. Slike forstyrrelser inkluderer, men er ikke begrenset til, atrial fibrillering, supraventrikulær takykardi og atrial flimmer. Eksponering for A<sub>1</sub>-agonister forårsaker en reduksjon i hjertehastigheten og en regularisering av abnormal rytme som dermed forbedrer den kardiovaskulære funksjon.

A<sub>1</sub>-agonister, gjennom deres evne til å inhibere effektene av katekolaminer, reduserer cellulær cAMP og bør således ha fordelaktige effekter ved hjertesvikt hvor økt sympatisk tone øker cellulære cAMP-nivåer. Sist nevnte har vist seg å være assosiert med økt

sannsynlighet for ventrikulære arytmier og plutselig død. Alle konseptene ovenfor er diskutert i oversikter angående effektene av adenosin på hjerteelektrofysiologi [se B. Lerman og L. Balardinelli *Circulation*, vol. 83 (1991), s. 1499-1509 og J. C. Shryock og L. Belardinelli, *Am. J. Cardiology*, Vol. 79 (1997) s. 2-10].

5

Et kontroversielt område innenfor feltet  $A_1$ -adenosinagonisme er at fordelene ved pre-kondisjonering av hjertet før iskemi kan være på grunn av binding av adenosin til  $A_1$ -reseptoren. Bevis for denne hypotesen kommer fra en kanin-iskemimodell hvori 2-klor-N<sup>6</sup>-syklopentyladenosin (CCPA) og R-PIA ble administrert før iskemi som ga beskyttelse med hensyn til infarktstørrelse (J. D. Thornton et al. *Circulation*, Vol. 85 (1992), 659-665).  $A_1$ -agonister som resultat av deres inhiberende virkning på syklisk AMP-generering, har antilipolytiske effekter i adipocytter som fører til en redusert frigivelse av ikke-forestrede fettsyrer (NEFA) [E. A. van Schaick et al., *J. Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, Vol. 25 (1997), s. 673-694 og P. Strong *Clinical Science*, Vol. 84 (1993), s. 663-669]. Ikke-insulinavhengig diabetes mellitus (NIDDM) er kjennetegnet ved en insulinresistens som resulterer i hyperglykemi. Faktorer som bidrar til den observerte hyperglykemien, er mangel på normalt glukoseopptak og aktivering av skjelett-muskelglykogensyntase (GS). Hevede nivåer av NEFA har vist seg å inhibere insulinstimulert glukoseopptak og glykogensyntese [D. Thiebaud et al., *Metab. Clin. Exp.*, Vol. 31 (1982), s. 1128-1136 og G. Boden et al., *J. Clin. Invest.*, Vol. 93 (1994), s. 2438-2446]. Hypotesen vedrørende en glukosefettesyresykel er blitt foreslått av P. J. Randle så tidlig som i 1963 [P. J. Randle et al., *Lancet* (1963), s. 785-789]. Et prinsipp ved denne syntesen er at begrenning av tilførsel av fettsyrer til de perifere vevene bør fremme karbohydratutnyttelse [P. Strong et al., *Clinical Science*, Vol. 84 (1993), s. 663-669].

25

Fordel ved en  $A_1$ -agonist ved sentralnervesystemforstyrrelser har blitt gjennomgått og innholdet er inkludert heri med referanse [L. J. S. Knutsen og T. F. Murray In *Puriner-gic Approaches in Eksperimental Therapeutics*, Eds. K. A. Jacobson og M. F. Jarvis (1997), Wiley-Liss, N. Y., s. 423-470]. Kort fortalt, basert på eksperimentmodeller vedrørende epilepsi, har en blandet  $A_{2A}$ : $A_1$ -agonist, metrifudil, vist seg å være et potent antikonvulsant middel ovenfor slag induisert ved den inverse benzodiazepinagonisten metyl-6,7-dimetoksy-4-etyl-beta-karbolin-3-karboksylat [DMCM, H. Klitgaard *Eur. J. Pharmacol.* (1993), Vol. 224, s. 221-228]. I en annen studie ved anvendelse av CGS 21680, en  $A_{2A}$ -agonist, ble det konkludert at den antikonvulsante aktiviteten var knyttet til aktivering av  $A_1$ -reseptoren [G. Zhang et al., *Eur. J. Pharmacol.*, Vol. 255 (1994), s. 239-243]. Videre har  $A_1$ -adenosinselektive agonister vist seg å ha antikonvulsant

35

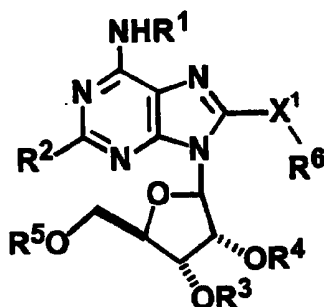
aktivitet i DMCM-modellen (L. J. S. Knutsen In Adenosine and Adenine Nucleotides: From Molecular Biology to Integrative Physiology; eds. L. Belardinelli og A. Pelleg, Kluwer: Boston, 1995, s. 479-487). Et annet område hvor en A<sub>1</sub>-adenosinagonist har en fordel er i dyremodeller av forhjerneiskemi som ble demonstrert av Knutsen et al. [J. Med. Chem., Vol. 42 (1999), s. 3463-3477]. Fordelen ved neurobeskyttelse antas å være delvis på grunn av inhibering av frigivelse av eksitatoriske aminosyrer (ibid.).

Det er et antall fulle A<sub>1</sub>-agonister beskrevet i litteraturen. Imidlertid er agonistene beskrevet generelt i former som ikke er anvendelige for pattedyrkroppen. Fordi anvendelige former av A<sub>1</sub>-agonister ikke alltid er stabile, løselige eller de kan ha andre egenskaper som gjør deres inkorporering til terapeutiske doseringsformer vanskelig, er det ofte nødvendig å identifisere sammensetninger som enklere inkorporeres i terapeutiske doseringsformer for å tilveiebringe en ønsket terapeutisk effekt. I tillegg mislykkes disse agonistene som anvendelige terapeutiske midler på grunn av bivirkninger forårsaket av ikke-selektiv stimulering av A<sub>1</sub>-adenosinreseptoren i at biologisk tilgjengelig vev og desensitivisering av den ønskede responsen som forhindrer deres anvendelse som kroniske midler. Derfor er det et behov for spesifikke og selektive A<sub>1</sub>-agonister, forløpere og/eller prodrug som omdannes i kroppen til anvendelige terapeutiske sammensetninger.

20

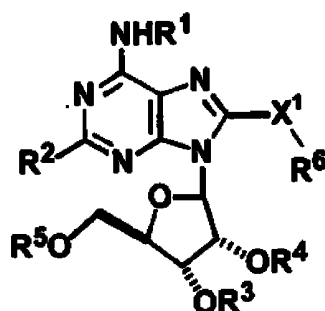
Foreliggende oppfinnelse inkluderer heterosykliske, 8-modifiserte adenosinderivat-sammensetninger som er nødvendige som delvise eller fulle adenosin-A<sub>1</sub>-reseptor-agonister.

25 I en utførelsesform inkluderer foreliggende oppfinnelse heterosykliske, 8-modifiserte adenosinderivater som har formelen:



I en ytterligere utførelsesform angår foreliggende oppfinnelse farmasøytiske sammensetninger som innbefatter minst én sammensetning ifølge oppfinnelsen og én eller flere farmasøytiske eksipienser.

- 5 Foreliggende oppfinnelse inkluderer en klasse heterosykliske, 8-modifiserte adenosin-derivater som har formelen:



hvor

X¹ = O, S eller NR⁷;

10

R¹ er oksolan-3-yl som også navngis tetrahydrofuran-3-yl;

R² er hydrogen;

15

R³, R⁴ og R⁵ er hver individuelt utvalgt fra gruppen som består av hydrogen, -(CO)-R', -(CO)-R'' og -(CO)-R''', hvori R', R'' og R''' hver er individuelt utvalgt fra gruppen som består av C<sub>1-15</sub>-alkyl; og

20

R⁶ og R⁷ er hver individuelt utvalgt fra gruppen som består av hydrogen, C<sub>1-15</sub>-alkyl, C<sub>2-15</sub>-alkenyl og C<sub>2-15</sub>-alkynyl, hvori alkylsubstituenten er substituert med fra 1 til 3 substituenten uavhengig utvalgt fra gruppen som består av aryl.

25

I mer foretrukne forbindelser er X¹ = NR⁷; R² er hydrogen; R³, R⁴ og R⁵ er uavhengig utvalgt fra gruppen som består av hydrogen, -(CO)-R', -(CO)-R'' eller -(CO)-R''', hvori R', R'' og R''' er uavhengig valgt fra gruppen som består av C<sub>1-6</sub>-alkyl, og foretrukket metyl; R⁶ er valgt fra gruppen som består av C<sub>1-3</sub>-alkyl og hydrogen med hydrogen som foretrukket; R⁷ er uavhengig valgt fra gruppen som består av hydrogen, C<sub>1-6</sub>-alkyl, C<sub>2-6</sub>-alkenyl og C<sub>2-6</sub>-alkynyl, hvori alkyl-, alkenyl- og alkynylsubstituentene er eventuelt substituert med 1 substituent uavhengig valgt fra gruppen som består av aryl.

30

I en annen foretrukket gruppe av forbindelser er  $X^1 = NR^7$ ;  $R^2$  er hydrogen;  $R^3, R^4, R^5$  og  $R^6$  er hver hydrogen; og  $R^7$  er  $C_{1-6}$ -alkyl, hvori alkyl er eventuelt substituert med 1 substituent utvalgt fra gruppen som består av alkyl eller aryl, hvori den eventuelle aryl-substituenten er ytterligere eventuelt substituert med halo, alkyl og  $CF_3$ . Mer foretrukket er  $R^7$   $C_{1-4}$ -alkyl som eventuelt er substituert med fenyl.

I en annen foretrukket klasse av forbindelser er  $X^1 = NR^7$ ; er  $R^2, R^3, R^4, R^5$  og  $R^6$  hver hydrogen; og  $R^7$  er  $C_{2-4}$ -alkenyl som eventuelt er substituert med 1 substituent utvalgt fra gruppen som består av alkyl og aryl. Mer foretrukket er  $R^7$   $C_{2-3}$ -alkenyl.

I en ytterligere foretrukket klasse av forbindelser er  $X^1 = NR^7$ ; er  $R^2, R^3, R^4, R^5$  og  $R^6$  hver hydrogen; og  $R^7$  er  $C_{2-4}$ -alkynyl som eventuelt er substituert med 1 substituent utvalgt fra gruppen som består av alkyl eller aryl. Mer foretrukket er  $R^7$   $C_{2-3}$ -alkynyl.

15

Mest foretrukne forbindelser ifølge oppfinnelsen inkluderer:

- 2- $\{6-[\{(3R)oksolan-3-yl\}amino]-8-[(metyletyl)amino]purin-9-yl\}(4S,2R,3R,5R)$ -5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol;
- 2- $\{6-[\{(3R)oksolan-3-yl\}amino]-8-(prop-2-enylamino)purin-9-yl\}(4S,2R,3R,5R)$ -5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol;
- 2- $\{6-[\{(3R)oksolan-3-yl\}amino]-8-(prop-2-ynylamino)purin-9-yl\}(4S,2R,3R,5R)$ -5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol;
- 2- $\{6-[\{(3R)oksolan-3-yl\}amino]-8-(etylamino)purin-9-yl\}(4S,2R,3R,5R)$ -5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol;
- 2- $\{6-[\{(3R)oksolan-3-yl\}amino]-8-(propylamino)purin-9-yl\}(4S,2R,3R,5R)$ -5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol;
- 2- $\{6-[\{(3R)oksolan-3-yl\}amino]-8-(butylamino)purin-9-yl\}(4S,2R,3R,5R)$ -5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol;
- 2- $\{6-[\{(3R)oksolan-3-yl\}amino]-8-[benzylamino]purin-9-yl\}(4S,2R,3R,5R)$ -5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol;
- 2- $\{6-[\{(3R)oksolan-3-yl\}amino]-8-(metylamino)purin-9-yl\}(4S,2R,3R,5R)$ -5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol; og
- (5- $\{6-[\{(3R)oksolan-3-yl\}amino]-8-(etylamino)purin-9-yl\}(2R,3R,4R,5R)$ -3,4-diacetyloksyoksolan-2-yl)metylacetat.

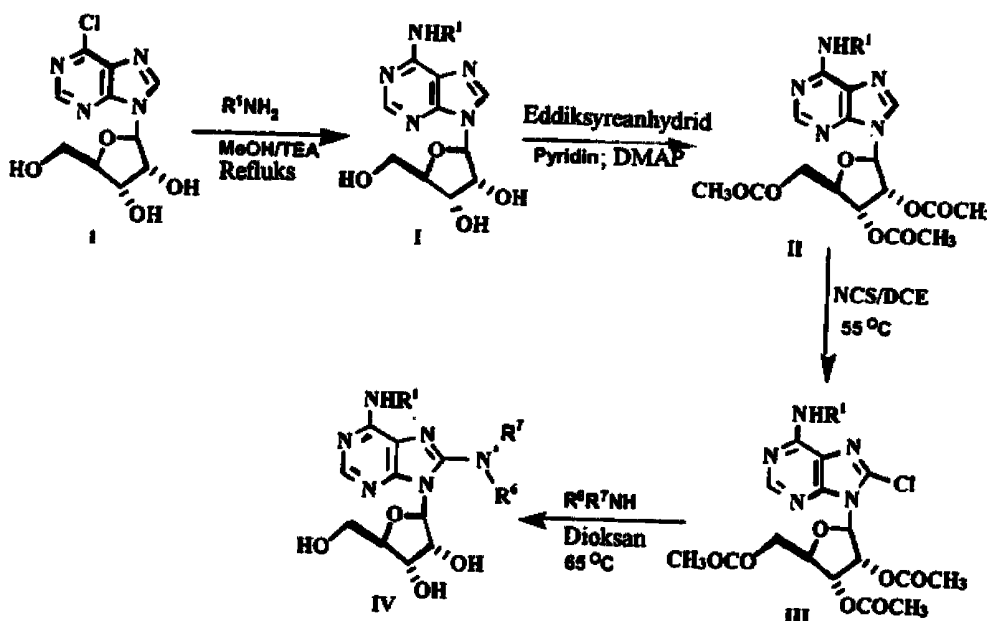
35

"Aryl", alene eller i kombinasjon, betyr fenyl eller naftyl eventuelt karbocyklisk sammensmeltet med et sykloalkyl med foretrukket 5-7, mer foretrukket 5-6, ring-

medlemmer og/eller eventuelt substituert med 1 til 3 grupper eller substituenten av halo, hydroksy, alkoksy, alkyltio, alkylsulfinyl, alkylsulfonyl, acyloksy, aryloksy, heteroaryl-  
 oksy, amino, eventuelt mono- eller disubstituert med alkyl-, aryl- eller heteroaryl-  
 grupper, amidino, urea eventuelt substituert med alkyl-, aryl-, heteroaryl- eller hetero-  
 5 sykiylgrupper, aminosulfonyl eventuelt N-mono- eller N,N-disubstituert med alkyl-,  
 aryl- eller heteroarylgrupper, alkylsulfonylamino, arylsulfonylamino, heteroaryl-  
 sulfonylamino, alkylkarbonylamino, arylkarbonylamino, heteroarylkarbonylamino eller  
 lignende.

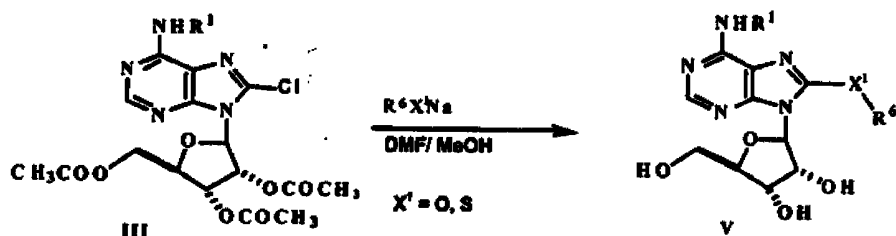
- 10 Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan fremstilles som angitt i skjema 1-4 nedenfor.  
 Forbindelsene som har generell formel IV, kan fremstilles ved reaksjon med den korres-  
 ponderende, primære aminoforbinding,  $R^1NH_2$ , ved oppvarming med kommersielt  
 tilgjengelig 6-kloradenosin i et passende løsningsmiddel (for eksempel n-butanol, di-  
 metylformamid og etanol). Den primære aminoforbinding,  $R^1NH_2$ , er enten kommer-  
 15 sielt tilgjengelig eller kan fremstilles som tidligere beskrevet i US-patent nr. 5 789 416,  
 hvor denne beskrivelsen er innbefattet heri med referanse. Prodrugestere ifølge opp-  
 finnelsen kan fremstilles ved anvendelse av alle kjente fremgangsmåter for ester-  
 dannelse som er inkludert med referanse (se Jerry March Organic synthesis and Richard  
 Larock - Methods of Organic Synthesis), og mer foretrukket slik det er angitt i fore-  
 20 liggende søknad.

### SKJEMA 1



Nøkkelintermediatforbindelse III kan fremstilles ved direkte klorering av 2',3',5'-tri-O-acetyl-N<sup>6</sup>-substituert adenosin (II). Forbindelse II kan oppnås ved å substituere 6-klorpurinribosid med et amin (Fleysher, M. H. J. Med. Chem. 1972, 15, 187-191), fulgt av acetylering av det dannede N<sup>6</sup>-substituerte adenosinet (forbindelse D). Nukleofil erstatning av kloratomet i forbindelse III med forskjellige alkylaminer resulterer i dannelselse av C-8-substituerte forbindelser med simultan deacetylering som gir forbindelse IV (Harlof Roelen et al., J. Med. Chem., 1996, 39, 1463-1471).

### SKJEMA 2

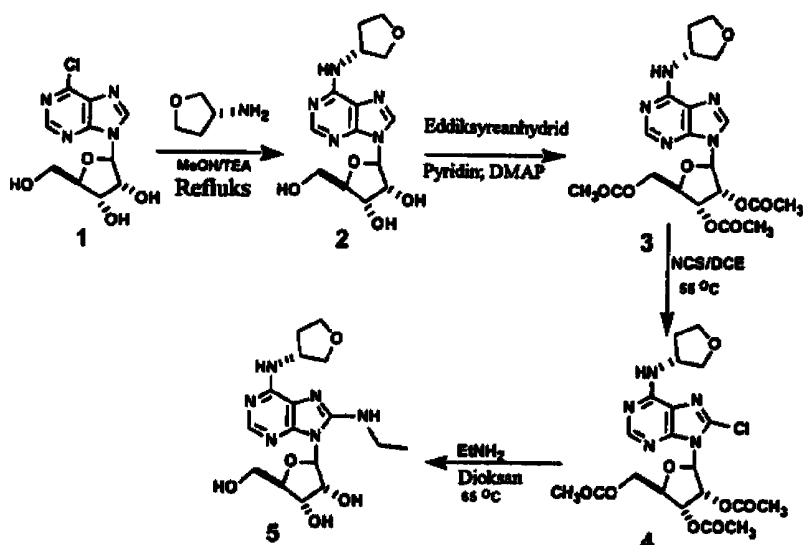


10

Forbindelser med generell struktur V kan fremstilles ved reaksjon mellom forbindelse III eller forbindelse I (skjema 1) med natriumaryloksid, alkoksid, aryltiolat eller alkyltiolat i alkohol eller DMF ved romtemperatur eller refluxbetingelser (G. Buenger og V.

15 Nair, Synthesis, 1990, s. 962-966).

### SKJEMA 3

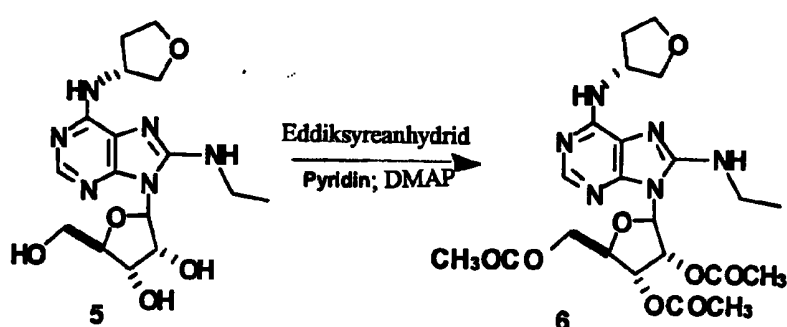




Fremstilling av forbindelse 2 er blitt tidligere beskrevet i US-patent nr. 5 789 416. Forbindelse 4 kan oppnås ved direkte klorering av forbindelse 3 som fremstilles ved acetylering av forbindelse 2. Nukleofil erstatning av kloratomet med etylamin resulterer i dannelsen av forbindelse 5.

5

## SKJEMA 4



Forbindelse 6 kan oppnås ved direkte acetylering av forbindelse 5 (skjema 4).

10

Foreliggende oppfinnelse inkluderer også prodrug av A<sub>1</sub>-agonistsammensetninger ifølge oppfinnelsen. Et prodrug er et legemiddel som er blitt kjemisk modifisert og kan være biologisk ikke-aktivt ved dets virkningssete, men vil bli nedbrutt eller modifisert ved én eller flere enzymatiske eller *in vivo*-prosesser til den bioaktive formen. Prodrug ifølge oppfinnelsen bør ha en forskjellig farmakokinetisk profil i forhold til morforbindelsen som muliggjør forbedret absorpsjon over mukosal epitelium, bedre saltdannelse og/eller løselighet og forbedret systemisk stabilitet. Forbindelser ifølge oppfinnelsen kan foretrukket modifiseres ved én eller flere hydroksylgrupper for å danne prodrug. Modifiseringene kan være (1) ester eller karbamatderivater som kan spalte ved esteraser eller lipaser, for eksempel; (2) peptider som kan være spesifikke eller ikke-spesifikke proteiner; eller (3) derivater som akkumuleres ved virkningssetet gjennom membranseleksjon eller en prodrugform eller modifisert prodrugform eller en hvilken som helst kombinasjon av (1) til (3) ovenfor.

20

Hvis en forbindelse ifølge oppfinnelsen inneholder en basisk gruppe kan det korresponderende syreaddisjonssaltet fremstilles. Syreaddisjonssalter av forbindelser fremstilles på standard måte i et egnet løsemiddel fra morforbindelsen og et overskudd syre, slik som saltsyre, hydrobromsyre, svovelsyre, fosforsyre, eddiksyre, maleinsyre, ravsyre eller metansulfonsyre. Hydrokloridsaltformen er særlig anvendelig. Hvis en forbindelse

ifølge oppfinnelsen inneholder en sur gruppe, kan de korresponderende, kationiske saltene fremstilles. Typisk blir morforbindelsen behandlet med overskudd av et alkalisk middel, slik som hydroksid, karbonat eller alkoksid, som inneholder et passende kation. Kationer, slike som  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  og  $\text{NH}_4^+$ , er eksempler på kationer til stede i farmasøytisk akseptable salter. Visse forbindelser danner innersalter eller zwitterioner som også kan være akseptable.

Sammensetningene ifølge oppfinnelsen er anvendelige for å behandle et antall pattedyrforstyrrelser og foretrukket humane forstyrrelser som er formidlet av en  $\text{A}_1$ -adenosinreseptor. For eksempel er sammensetningene ifølge oppfinnelsen anvendelige for å modifisere hjerteaktivitet hos pattedyr som har koronar elektrisk forstyrrelse som kan behandles ved å stimulere en  $\text{A}_1$ -adenosinreseptor. Eksempler på koronare, elektriske forstyrrelser som kan behandles ved sammensetningene ifølge oppfinnelsen inkluderer supraventrikulær takykardi, atrial fibrillering, atrial flimmer og AV-nodal innadgående takykardi. Videre kan oralt aktive  $\text{A}_1$ -agonister ifølge oppfinnelsen som viser en svært god sikkerhetsprofil ved behandling av supraventrikulære arytmier, også anvendes som et profylaktisk middel for de med høy risiko for myokardisk iskemi.

Sammensetningene ifølge oppfinnelsen er også anvendelige for å modifisere adipocytffunksjon ved å stimulere en  $\text{A}_1$ -adenosinreseptor som fører til redusert frigivelse av NEFA og økt frigivelse av leptin. Sykdomstilstander relatert til adipocytffunksjon som kan modifiseres ved anvendelse av sammensetningene ifølge oppfinnelsen, inkluderer diabetes og fedme.

I skjelettmuskelceller formidler  $\text{A}_1$ -AdoR-agonister en synergistisk stimulering av glukoseopptak og transport av insulin (Vergauwen, L. et al., *J. Clin. Invest.*, 1994, 93, 974-81; Challiss, R.A. et al., *Eur. J. Pharmacol.*, 1992, 226, 121-8). En annen terapeutisk anvendelse av sammensetninger ifølge oppfinnelsen er mer effektiv regulering av glukose og en reduksjon av sirkulasjonsnivåer av insulin hos pasienter som har diabetes.

$\text{A}_1$ -reseptoragonisten, R-PIA, har vist seg å øke leptinfrigivelse fra hvite adipocytter og augment insulinstimulert leptinproduksjon (M. Ozeck Master's Thesis Univ. of Florida 1999 med L. Belardinelli). Det har vist seg at katekolaminer inhiberer produksjon av leptin fra adipocytter ved aktivering av  $\beta$ -adrenergiske reseptorer. Anti- $\beta$ -adrenergiske effekter av  $\text{A}_1$ -agonister på adipocytter antas å spille en rolle ved økt frigivelse av leptin. Den funksjonelle rollen til leptin er flerfacetert som inkluderer redusert appetitt, stimulert energianvendelse og økt fertilitet.

Sammensetningene ifølge oppfinnelsen kan også anvendes for å tilveiebringe sentralnervesystemneurobeskyttelse ved stimulering av en  $A_1$ -adenosinreseptor. Sentralnervesystemforstyrrelser som kan behandles ved anvendelse av sammensetningene ifølge oppfinnelsen, inkluderer epilepsi og slag.

I nyren er det vist seg at stimulering av  $A_1$ -AdoR fremmer natriumretensjon, fremmer utbytting av natrium i urin for kalium og reduserer glomerulær filtreringshastighet idet natriumutskillelse øker (Gellai, M. et al., *JPET*, 1998, 286, 1191-6; Wilcox, C. S. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1999, 10, 714-720). Det antas at disse responsene fremkommer ved kronisk lokal produksjon av adenosin. Det vil si at i nyren er det en tonisk effekt av adenosin for stimulering av  $A_1$ -AdoR. En annen klinisk anvendelse av sammensetninger ifølge oppfinnelsen er derfor selektiv antagonisme av  $A_1$ -AdoR i nyren for å inhibere natriumretensjon, inhibere utbytting av natrium for kalium, og opprettholde nyreglomerulær filtreringshastighet når natriumutskillelse heves for å gi en kaliumfattig diuretisk forbindelse som opprettholder renal funksjon.

Sammensetningene ifølge oppfinnelsen er ytterligere anvendelige for å tilveiebringe kardiomyocytbeskyttelse fra iskemiske hendelser ved å stimulere en  $A_1$ -adenosinreseptor. Iskemiske hendelser som behandles ved anvendelse av sammensetninger ifølge oppfinnelsen, inkluderer stabil angina, ustabil angina, hjertetransplantat og myokardisk infarkt.

Et viktig aspekt ved forbindelser ifølge oppfinnelsen er at hver forbindelse har en iboende effektivitet tilknyttet seg (for diskusjon se T. P. Kenakin Stimulus Response Mechanisms. In *Pharmacological Analysis of Drug-Receptor Interaction*, Ed. Kenakin, T. P. New York: Raven Press, s. 39-68). Den iboende effektiviteten er ikke definert ved dens affinitet for reseptoren, men den er definert som den kvantitative effekten til forbindelsen for å aktivere et gitt effektorsystem (for eksempel cAMP-produksjon) i en gitt celletype. Den iboende effekten for en gitt forbindelse kan variere fra celletype til celletype og/eller fra effektorsystem til effektorsystem. Når en forbindelse har en iboende effekt lavere enn en full agonist (det vil si submaksimal), da blir agonisten kalt en delvis agonist. Således er en delvis agonist et molekyl som bindes til en reseptor og gir en respons som er mindre enn for en full agonist (submaksimal), men også konkurrerende antagonistiserer responsen(e) som fremkommer ved en full agonist. Den toniske virkningen til adenosin med hensyn til nyrefunksjon, er et hovedeksempel hvor en delvis  $A_1$ -agonist antas å virke som antagonist (for eksempel adenosin). Den toniske virk-

ningen til adenosin med hensyn til nyrefunksjon, er et hovedeksempel hvor en delvis  $A_1$ -agonist forventes å oppføre seg som en antagonist. Forbindelsene ifølge oppfinnelsen antas å ha terapeutiske anvendelige affiniteter for adenosin  $A_1$ -reseptoren og de vil ha et antall iboende effektiviteter fra full agonist til delvis agonist. Det vil si noen

5 forbindelser kan være uten effekt med hensyn til et gitt effektorsystem i en gitt celletype, men være en full agonist i en annen celletype og/eller effektorsystem. Grunnen for denne variable, farmakologiske oppførselen skyldes størrelsen på reseptorreserveren for  $A_1$ -adenosinreseptoren i en gitt celletype (for eksempel AV-nodale celler vs. adipocytter) og for en gitt respons. Reseptorreserven (ledig reseptorkapasitet) er totalt antallet

10 reseptorer minus fraksjonen av reseptorer som kreves for å inducere den maksimale responsen ved anvendelse av en full agonist (L. E. Limbird, Cell Surface Receptors: A Short Course on Theory and Methods, Kluwer Acad. Pub., 1996, Boston, Mass). Derfor kan agonisten være en full agonist ved å frembringe en respons, og en delvis agonist for å frembringe en annen agonist i et annet vev eller celler og fremdeles være en antagonist

15 eller mangle aktivitet ovenfor en tredje respons i et annet vev eller celle. Som en konsekvens av dette vil en delvis agonist merket til et utvalgt mål, trolig forårsake færre bivirkninger enn en full agonist. Som en konsekvens av dette frembringer en full agonist alle effektene formidlet ved den respektive reseptoren, mens dette er ikke nødvendig i tilfellet en delvis agonist. Forbindelsene ifølge oppfinnelsen basert på deres affinitet for

20  $A_1$ -reseptoren og deres potens og selektivitet for å frembringe  $A_1$ -reseptorformidlede responser, har potensialet for terapeutisk intervensjon i multiple sykdomstilstander som beskrevet ovenfor.

Delvise  $A_1$ -agonister kan ha en ytterligere fordel ved kronisk behandling på grunn av at

25 de er mindre tilbøyelige til å inducere desensitivisering av  $A_1$ -reseptoren (R. B. Clark, B. J. Knoll, R. Barber TiPS, vol. 20 (1999), s. 279-286) og å forårsake bivirkninger. Kronisk administrering av en full agonist (R-N6-fenylisopropyladenosin, R-PIA) i 7 dager fører til en desensitivisering av  $A_1$ -reseptoren når det gjelder dromotropisk respons hos hamster (bemerk: en økning i reseptortall ble observert - D. M. Dennis, J.

30 C. Shryock, L. Belardinelli JPET, Vol. 272 (1995), s. 1024-1035).  $A_1$ -agonistindusert inhiberingseffekt på produksjon av cAMP ved adenylatsyklase i adipocytter har vist seg å desensitivisere etter kronisk behandling med en  $A_1$ -agonist i tillegg (W. J. Parsons og G. L. Stiles J. Biol. Chem., Vol. 262 (1987), s. 841-847).

35 Sammensetningene ifølge oppfinnelsen kan administreres oralt, intravenøst, gjennom epidermis, bolus, nasalt, ved inhalering eller ved en annen måte kjent i litteraturen for å administrere et terapeutisk middel. Behandlingsfremgangsmåten innbefatter admini-

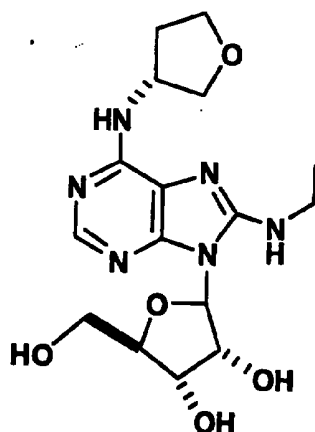
strering av en effektiv mengde av den valgte forbindelse, foretrukket dispergert i en farmasøytisk bærer. Doseringsenheten av aktiv ingrediens blir generelt utvalgt fra området 0,01 til 100 mg/kg, men vil enkelt kunne bestemmes av fagmannen avhengig av administrasjonsrute, alder og tilstand til pasienten.

5

Farmasøytiske sammensetninger som inkluderer forbindelsene ifølge oppfinnelsen og/eller derivater derav, kan formuleres som løsninger eller lyofiliserte pulvere for parenteral administrasjon. Pulvere kan rekonstitusjoneres ved tilsetning av et egnet for-  
tynningsmiddel eller andre farmasøytisk akseptable bærere før anvendelse. Hvis de an-  
vendes i flytende form blir forbindelsene ifølge oppfinnelsen foretrukket inkorporert i  
10 en bufret, isoton, vandig løsning. Eksempler på egnede fortynningsmidler er normale, isotone saltvannsløsninger, standard 5 % dekstrose i vann og bufret natrium- eller ammoniumacetatløsning. Slike flytende formuleringer er egnet for parenteral admini-  
strasjon, men kan også anvendes for oral administrasjon. Det er ønskelig å tilsette ekspi-  
pienser slike som polyvinylpyrrolidon, gelatin, hydroksycellulose, akasie, polyetylen-  
15 glykol, mannitol, natriumklorid, natriumsitrat eller en hvilken som helst annen eksipiens kjent for fagmannen til farmasøytiske sammensetninger som inkluderer forbindelser ifølge oppfinnelsen. Alternativt kan de farmasøytiske forbindelsene innkapsles, tablet-  
teres eller fremstilles i en emulsjon eller sirup for oral administrasjon. Farmasøytisk  
20 akseptable faste eller flytende bærere kan tilsettes for å forbedre eller stabilisere sammensetningen, eller for å lette fremstilling av sammensetningen. Flytende bærere inkluderer sirup, peanøttolje, olivenolje, glyserin, saltvann, alkoholer og vann. Faste bærere inkluderer stivelse, laktose, kalsiumsulfat, dihydrat, teffa alba, magnesiumstearat eller stearinsyre, talkum, pektin, akasie, agar eller gelatin. Bæreren kan også inkludere  
25 et vedvarende frigjøringsmateriale slik som glyserolmonostearat eller glyseroldistearat, alene eller med en voks. Mengden fast bærer varierer, men vil foretrukket være mellom ca. 20 mg og ca. 1 gram pr. doseringsenhet. Farmasøytiske doseringer fremstilles ved anvendelse av vanlige teknikker, slik som maling, blanding, granulering eller sammen-  
pressing, hvis nødvendig, for tablettformer; eller maling, blanding eller fylling for harde  
30 gelatinkapselformer. Når en flytende bærer anvendes, vil preparatet være i form av en sirup, eliksir, emulsjon eller en vandig eller ikke-vandig suspensjon. En slik flytende formulering kan administreres direkte eller fylles i en myk gelatinkapsel.

Eksemplene som følger, vil tjene til å illustrere foreliggende oppfinnelse. Eksemplene er  
35 på ingen måte ment å begrense omfanget av oppfinnelsen, men er tilveiebrakt for å vise hvordan forbindelsene ifølge oppfinnelsen fremstilles og anvendes.

## EKSEMPEL 1



- 5 **2-{6-(((3R)oksolan-3-yl)amino)-8-(etylamino)purin-9-yl}(4S,2R,3R,5R)-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol (Forbindelse 5)**

5- {6-(((3R)oksolan-3-yl)amino)purin-9-yl}(4S,2R,3R,5R)-4-acetoksy-2-(acetoksy-  
metyl)oksolan-3-yl-acetat: 2- {6-(((3R)oksolan-3-yl)amino)purin-9-yl}(4S,2R,3R,5R)-5-  
10 (hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol (2) ble fremstilt fra 6-klorpurinribosid som beskrevet i  
US-patent nr. 5 789 416, hvor beskrivelsen i denne er innbefattet med referanse. Til en  
løsning av forbindelse 2 (1,68 g, 5 mmol) og dimetylaminopyridin (100 mg, 0,82 mmol)  
i pyridin (10 ml) ble det ved 23 °C tilsatt eddiksyreanhydrid (1 ml, 10,6 mmol). Etter  
3 timer ved 23 °C ble reaksjonen konsentrert i vakuum. Residuet ble løst i metylenklorid  
15 (100 ml), vasket med vann (3 x 20 ml) og tørket (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Etter konsentrering i vaku-  
um ble residuet renset med flashkromatografi (metylenklorid:metanol 20:1, fulgt av 9:1)  
som ga forbindelse 3.

Syntese av 5- {6-(((3R)oksolan-3-yl)amino)-8-klorpurin-9-yl}(4S,2R,3R,5R)-4-  
20 acetoksy-2-(acetoksymetyl)oksolan-3-yl-acetat: Til en rørt løsning av forbindelse 3 (1 g,  
2,16 mmol) i 1,2-dikloretan (10 ml) ble det tilsatt N-klorosuksinimid (1 g, 7,5 mmol) og  
reaksjonen ble varmet til 55 °C i 24 timer. Løsemidlet ble fordampet og produktet renset  
ved flashkromatografi (metylenklorid:metanol 100:0, fulgt av 95:5) som ga forbindelse  
4.

25

Til en rørt løsning av forbindelse 4 (100 mg, 0,2 mmol) i dioksan (0,5 ml) ble etylamin  
(75 % vandig løsning, 3 ml) tilsatt og reaksjonsblandingen ble varmet til 65 °C i

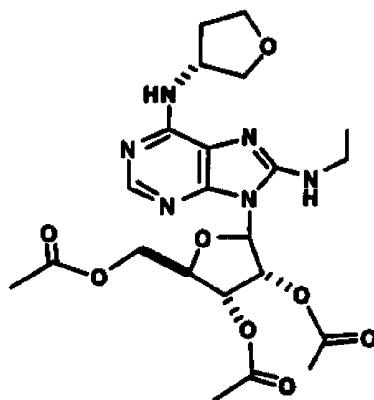
16 timer. Den resulterende blanding ble fordampet til tørrhet og produktet renses ved preparativ TLC ved anvendelse av metylenklorid:metanol (95:5) som løsemiddel som ga forbindelse 5:

- 5  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  1,25 ( $\tau$ , 3H), 1,80-1,90 (m, 1H), 2,30-2,40 (m, 1H), 3,40 (q, 2H), 3,50-3,90 (m, 4H), 3,90-4,00 (m, 2H), 4,10-4,15 (m, 1H), 4,20-4,25 (m, 1H), 4,65-4,80 (m, 2H), 5,95 (d, 1H), 7,95 (s, 1H).

[MS: 381,25 (M+1)].

10

### EKSEMPEL 2



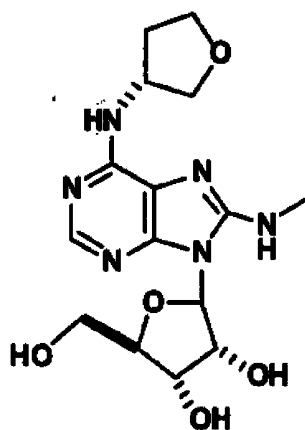
(6)

**(5-{6-(((3R)oksolan-3-yl)amino)-8-(etylamino)purin-9-yl}-(2R,3R,4R,5R)-3,4-diacetyloksyoksolan-2-yl)metylacetat (forbindelse 6)**

15

Forbindelse 6 ble fremstilt (skjema 4) som beskrevet for syntesen av forbindelse 3 i eksempel 1 ovenfor.

- 20  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 1,28 (t, 3H), 1,95 (m, 1H), 1,99 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 2,11 (s, 3H), 2,45 (m, 1H), 3,46 (m, 2H), 3,81 (m, 2H), 3,98 (m, 2H), 4,32 (m, 2H), 5,45 (d, 1H), 5,61 (d, 1H), 5,78 (t, 1H), 6,12 (d, 1H), 8,18 (s, 1H).

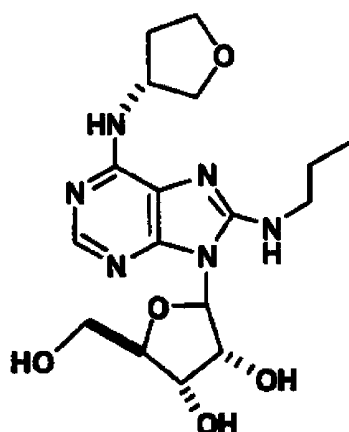


**(2-{6-(((3R)oksolan-3-yl)amino)-8-(metylamino)purin-9-yl}(4S,2R,3R,5R)-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol (forbindelse 7)**

5

Forbindelse 7 ble fremstilt som beskrevet i eksempel 1 ved å anvende etylamin i stedet for metylamin:

$^1\text{H NMR (CDCl}_3\text{)}$   $\delta$  1,75-1,85 (m, 1H), 2,10-2,25 (m, 1H), 2,8 (s, 3H), 3,60-3,70 (m, 2H), 3,70-3,80 (m, 2H), 3,80-3,90 (m, 2H), 4,00-4,05 (m, 1H), 4,10-4,15 (m, 1H), 4,50-4,55 (m, 2H), 5,7 (d, 1H), 6,5-6,5 (m, 1 H), 7,9 (s, 1 H):

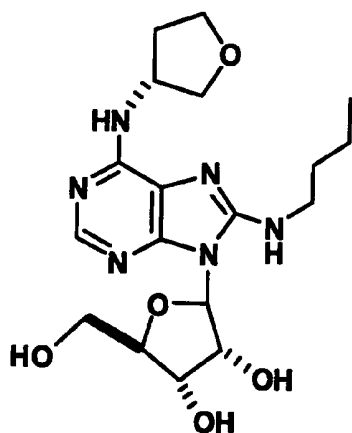


**2-{6-(((3R)oksolan-3-yl)amino)-8-(propylamino)purin-9-yl}(4S,2R,3R,5R)-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol (forbindelse 8)**



Forbindelse 8 ble fremstilt som i eksempel 1 ved å anvende etylamin i stedet for n-propylamin:

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0,85 (t, 3H), 1,50-1,60 (μ, 2H), 1,80-1,90 (m, 1H), 2,20-3,20  
5 (t, 2H), 3,60-3,70 (m, 2H), 3,70-4,00 (m, 4H), 4,05-4,10 (m, 1H), 4,10-4,15 (m, 1H),  
4,50-4,60 (m, 2H), 5,75 (d, 1H), 6,50-6,60 (m, 1H), 7,95 (s, 1H).

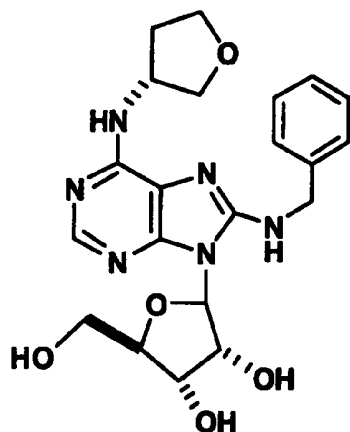


10 **2-{6-[[[(3R)oksolan-3-yl]amino]-8-(butylamino)purin-9-yl]}(4S,2R,3R,5R)-5-**  
**(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol (forbindelse 9)**

Forbindelse 9 ble fremstilt som beskrevet i eksempel 1 ved å anvende etylamin i stedet for n-butylamin:

15

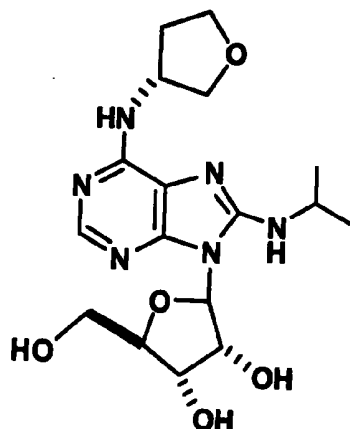
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0,80 (τ, 3H), 1,15-1,40 (m, 4H), 1,90-2,00 (m, 1H), 2,85-2,95 (m,  
2H), 3,70-3,90 (m, 5H), 4,00-4,05 (m, 1H), 4,20-4,25 (m, 1H), 4,60-4,65 (m, 1H), 4,90-  
4,95 (m, 1H), 5,50 (bs, 1H), 5,80 (d, 1H), 6,2 (bs, 2H), 7,95 (s, 1H).



**2-{6-(((3R)oksolan-3-yl)amino)-8-[benzylamino]purin-9-yl};(4S,2R,3R,5R)-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol (forbindelse 10)**

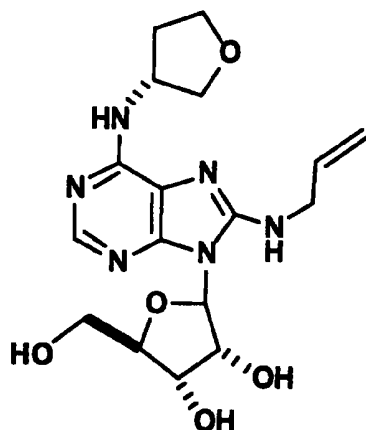
- 5 Forbindelse 10 ble fremstilt som beskrevet i eksempel 1, ved å anvende etylamin i stedet for benzylamin:

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1,80-1,90 (m, 1H), 2,15-2,25 (m, 1H), 3,60-3,70 (m, 2H), 3,70-3,80 (m, 2H), 3,90 (q, 2H), 4,05-4,10 (m, 1H), 4,20-4,30 (m, 1H), 4,30-4,40 (m, 1H), 4,60-4,70 (m, 1H), 4,85-4,95 (m, 1H), 5,80 (d, 1H), 6,05-6,10 (m, 1H), 6,15-6,20 (m, 1H), 6,30-6,50 (m, 1H), 7,15-7,30 (m, 5H), 7,95 (s, 1H).



15 **2-{6-(((3R)oksolan-3-yl)amino)-8-[(metyletyl)amino]purin-9-yl};(4S,2R,3R,5R)-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol (forbindelse 11)**

Forbindelse 11 ble fremstilt som beskrevet i eksempel 1 ved å anvende etylamin i stedet for isopropylamin [MS: 395,30 (M+1)].

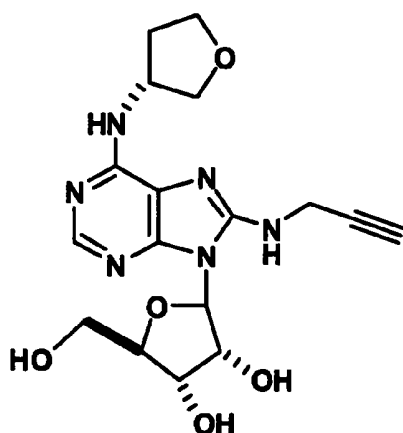


- 5 **2-{6-[[[(3R)oksolan-3-yl]amino]-8-(prop-2-enylamino)purin-9-yl]}(4S,2R,3R,5R)-5-hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol (forbindelse 12)**

Forbindelse 12 ble fremstilt som beskrevet i eksempel 1 ved å anvende etylamin i stedet for allylamin [MS: 393,7 (M+1)].

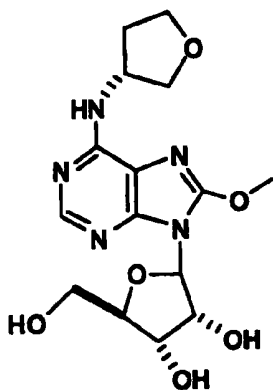
10

### EKSEMPEL 3



- 15 **2-{6-[[[(3R)oksolan-3-yl]amino]-8-(prop-2-ynylamino)purin-9-yl]}(4S,2R,3R,5R)-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol (forbindelse 13)**

Forbindelse 13 ble fremstilt som beskrevet i eksempel 1 ved å anvende etylamin i stedet for propargylamin [MS: 391,37 (M+1)].



- 5 **2-{6-(((3R)oksolan-3-yl)amino)-8-metoksy-purin-9-yl};(4S,2R,3R,5R)-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol (forbindelse 13)**

Til en løsning av forbindelse 4 i 1 ml tørr metanol ble det tilsatt 3 ml 0,5 M løsning av natriummetoksid i metanol. Reaksjonsblandingen ble refluxert i 30 min. TLC (5 %  
10 MeOH: 95 % DCM) viste at reaksjonen var fullstendig. Reaksjonsblandingen ble avkjølt og stoppet med noen dråper iseddiksyre og løsemidlet ble fordampet. Residuet ble tatt opp i metanol og analysert med massespektrometer [MS 368,2 (M+1) og 390,2 (M+23)].

#### 15 **EKSEMPEL 4**

##### **Bindingsundersøkelser - DDT<sub>1</sub>-celler**

##### **Cellekultur**

DDT-celler (hamster vas deferens glattmuskelcellelinje) ble dyrket som monosjikt i  
20 petri-skåler ved anvendelse av Dulbecco's modifiserte Eagle's medium (DMEM) som inneholdt 2,5 µg ml<sup>-1</sup> amfotericin B, 100 U ml<sup>-1</sup> penicillin G, 0,1 mg ml<sup>-1</sup> streptomycinsulfat og 5 % fetalt bovint serum i en fuktig atmosfære med 95 % luft og 5 % CO<sub>2</sub>. Cellene ble subdyrket to ganger pr. uke ved dispergering i Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) uten divalente kationer og som inneholdt 1 mM EDTA. Cellene ble  
25 deretter sådd i dyrkningsmedium med en tetthet på 1,2 x 10<sup>5</sup> celler pr. plate og eksperimenter ble utført 4 dager senere ved ca. én dag prekonfluens.

## Membranfremstillinger

Påfestede celler ble vasket to ganger med HBSS (2 x 10 ml), skrapet fri fra platen ved hjelp av en gummiskrape i 5 ml 50 mM Tris-HCl-buffer, pH 7,4 ved 4 °C og suspensjonen ble homogenisert i 10 s. Suspensjonen ble deretter sentrifugert ved 27 000 x g i 10 min. Pelleten ble resuspendert i homogeniseringsbuffer ved rotering og sentrifugering som beskrevet ovenfor. De endelige pelletene ble resuspendert i 1 vol 50 mM Tris-HCl-buffer, pH 7,4 som inneholdt 5 mM MgCl<sub>2</sub> for A<sub>1</sub>-AdoR-undersøkelse. For [<sup>35</sup>S]GTPγS-bindingsundersøkelsene ble de endelige pelletene resuspendert i 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, som inneholdt 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl og 1 mM ditiotritol. Denne membransuspensjonen ble deretter plassert i flytende nitrogen i 10 min, tint opp og anvendt for undersøkelser. Proteininnholdet ble bestemt med et Bradford™ Assay Kit ved anvendelse av bovineserumalbumin som standard.

## 15 Konkurrerende bindingsundersøkelse

Grisestriatum ble fremstilt ved homogenisering i 50 mM Tris-buffer (5 x volum vevmasse pH = 7,4). Etter sentrifugering ved 19 000 omdr./min i 25 min ved 4 °C, ble supernatanten kastet og fremgangsmåten ble gjentatt to ganger. Sammensetningene ifølge oppfinnelsen ble undersøkt ved å bestemme deres affinitet for A<sub>1</sub>-reseptoren i en grisestriatummembranprep eller en DDT<sub>1</sub>-membranprep. Kort fortalt ble 0,2 mg grisestriatale membraner eller DDT<sub>1</sub>-cellemembraner behandlet med adenosindeaminase og 50 mM Tris-buffer (pH = 7,4), fulgt av sammenblanding. Til grisemembranene ble det tilsatt 2 µl seriske fortynnete DMSO-forrådsløsninger av forbindelsene ifølge oppfinnelsen ved konsentrasjoner som varierte fra 100 µM til 10 nM. Kontrollen mottok 2 µl DMSO alene, deretter antagonisten [<sup>3</sup>H]-8-syklopentylxantin (CPX) for grisestriatum eller agonisten [<sup>3</sup>H]-2-klor-6-syklopentyladenosin (CCPA) for DDT<sub>1</sub>-membranene i Tris-buffer (50 mM, pH 7,4) tilsatt for å oppnå en sluttkonsentrasjon på 2 nM. Etter inkubering ved 23 °C i 2 timer ble deretter løsningene filtrert ved anvendelse av en membranløser ved anvendelse av multiple vaskinger av membranene (3 x). Filterplatene ble telt i scintillasjonscocktail som ga mengden erstatning av tritiert CPX eller ved konkurrerende bindingssammensetninger ifølge oppfinnelsen. Større enn en 5-punktskurve ble anvendt for å generere K<sub>i</sub>'er og antallet eksperimenter er indikert i kolonnen markert i tabell 1, nedenfor:

Tabell 1

Forbindelse #	K <sub>i</sub> -DDT <sub>1</sub> -cellemembraner	K <sub>i</sub> -grisestriatum
5	171 nM	137 nM
7	--	799 nM
8	--	1 040 nM
9	--	2 840 nM
10	--	7 470 nM

## 5 EKSEMPEL 5

### [<sup>35</sup>S]GTPγS-bindingsundersøkelser

A<sub>1</sub>-agoniststimulert [<sup>35</sup>S]GTPγS-binding ble bestemt ved å modifisere fremgangsmåten beskrevet av Gierschik et al. (1991) og Lorenzen et al (1993). Membranprotein (30-50 μg) ble inkubert i et volum på 0,1 ml som inneholdt 50 mM Tris-HCl-buffer, pH 7,4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM ditioneitol, 0,2 enheter ml<sup>-1</sup> adenosindeaminase, 0,5 % BSA, 1 mM EDTA, 10 mM GDP, 0,3 nM [<sup>35</sup>S]GTPγS og med eller uten forskjellige konsentrasjoner av CPA i 90 min ved 30 °C. Ikke-spesifikk binding ble bestemt ved tilsetning av 10 μM GTPγS. Agoniststimulert binding ble bestemt som forskjell mellom total binding under nærvær av CPA og basal binding bestemt ved fravær av CPA.

Tidligere rapporter har vist at agoniststimulert [<sup>35</sup>S]GTPγS-binding var avhengig av tilstedeværelse av GDP (Gierschik et al., 1991; Lorenzen et al., 1993; Traynor & Nahorski, 1995). I innledende eksperimenter ble det funnet at 10 μM GDP ga optimal stimulering av CPA-avhengig [<sup>35</sup>S]GTPγS-binding og denne konsentrasjon ble derfor anvendt i alle studiene. I metningseksperimenter ble 0,5 nM [<sup>35</sup>S]GTPγS inkubert med 0,5-1 000 nM GTPγS. Ved slutten av inkuberingen ble hver suspensjon filtrert og tilbakeholdt radioaktivitet bestemt som beskrevet ovenfor. Resultatene er presentert normalisert til full agonist N-6-syklopentyladenosin, CPA.

Tabell 2

Forbindelse #	GTP $\gamma$ S
CPA	100 %
5	89 %
11	68 %
12	77 %
13	95 %

5

**EKSEMPEL 6****cAMP-undersøkelse**

En scintillasjonsnærhetsundersøkelse (SPA) ved anvendelse av kaninantistoffer rettet på cAMP ved anvendelse av en tilsatt markør av adenosin-3',5'-syklisk fosforsyre 2'-O-suksinyl-3-[<sup>125</sup>I]jodotyrosinmetylester og fluormikrosfærer som inneholdt anti-kaninspesifikke antistoffer som beskrevet av Amersham Pharmacia Biotech (Biotrak cellulære kommunikasjonsundersøkelser). Kort fortalt ble DDT<sub>1</sub>-cellene dyrket i klarbunnede 96-brønns mikrotiterplater med opake brønner ved konsentrasjoner mellom 10<sup>4</sup> og 10<sup>6</sup> celler pr. brønn i 40  $\mu$ l HBSS ved 37 °C (5 % CO<sub>2</sub> og 95 % fuktighet). De delvis eller fulle A<sub>1</sub>-agonister (5  $\mu$ l) ifølge oppfinnelsen ble inkubert ved forskjellige konsentrasjoner med DDT<sub>1</sub>-celler under nærvær av rolipram (50  $\mu$ M) og 5  $\mu$ M forskolin i 10 min ved 37 °C. Cellene ble umiddelbart lysert ved behandling av 5  $\mu$ l 10 % dodecyltrimetylammoniumbromid, fulgt av risting ved anvendelse av en mikrotiterplater. Etter inkubering av platene i 5 min, ble en immunoreagensløsning (150  $\mu$ l som inneholdt like volumer markør, antiserum, og SPA-fluorsfærer) tilsatt til hver brønn, fulgt av forsegling av platen. Etter 15-20 timer ved 23 °C, ble mengden bundet [<sup>125</sup>I]cAMP til fluormikrosfærene bestemt ved å telle i en mikrotiterplatescintillasjonsteller i 2 min. Sammenligning av tellinger med standardkurver generert for cAMP ved anvendelse av tilsvarende protokoll ga cAMP til stede etter cellelyse. Resultatene er presentert normalisert til full agonist N-6-syklopentyladenosin, CPA. Således reduserte full agonist-CPA mengden forskolinindusert cAMP-dannelse tilbake til basisnivåene.

Tabell 3

Forbindelse #	cAMP
CPA	100 %
11	37 %
12	42 %
13	41 %

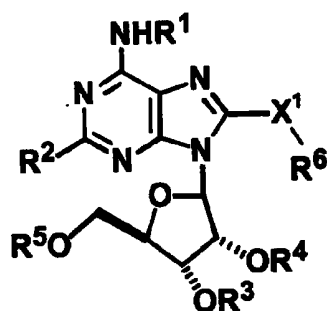


Patentkrav

1.

Forbindelse, k a r a k t e r i s e r t v e d at den har formelen:

5



hvor

X<sup>1</sup> = O, S eller NR<sup>7</sup>;

10

R<sup>1</sup> er oksolan-3-yl som også navngis tetrahydrofuran-3-yl;R<sup>2</sup> er hydrogen;

15 R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> og R<sup>5</sup> er hver individuelt udvalgt fra gruppen som består af hydrogen, -(CO)-R', -(CO)-R'' og -(CO)-R''', hvori R', R'' og R''' hver er individuelt udvalgt fra gruppen som består af C<sub>1-15</sub>-alkyl; og

20 R<sup>6</sup> og R<sup>7</sup> er hver individuelt udvalgt fra gruppen som består af hydrogen, C<sub>1-15</sub>-alkyl, C<sub>2-15</sub>-alkenyl og C<sub>2-15</sub>-alkynyl, hvori alkylsubstituenten er substitueret med fra 1 til 3 substituenten uafhængig udvalgt fra gruppen som består af aryl.

2.

25 Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at

R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> og R<sup>5</sup> hver er individuelt udvalgt fra gruppen som består af hydrogen, -(CO)-R', -(CO)-R'' og -(CO)-R''', hvori R', R'' og R''' hver er individuelt udvalgt fra gruppen som består af C<sub>1-15</sub>-alkyl;

30

R<sup>6</sup> er hydrogen; og

R<sup>7</sup> er utvalgt fra gruppen som består av C<sub>1-15</sub>-alkyl, C<sub>2-15</sub>-alkenyl og C<sub>2-15</sub>-alkynyl, hvori alkylsubstituenten er substituert med fra 1 til 3 substituent uavhengig utvalgt fra gruppen som består av aryl.

3.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t

10 X<sup>1</sup> = NR<sup>7</sup>;

R<sup>2</sup> er hydrogen;

15 R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> og R<sup>5</sup> er hver individuelt utvalgt fra gruppen som består av hydrogen, -(CO)-R', -(CO)-R" og -(CO)-R"', hvori R', R" og R"' er uavhengig utvalgt fra gruppen som består av C<sub>1-10</sub>-alkyl;

R<sup>6</sup> hydrogen; og

20 R<sup>7</sup> er utvalgt fra gruppen som består av C<sub>1-8</sub>-alkyl, C<sub>2-15</sub>-alkenyl og C<sub>2-15</sub>-alkynyl, hvori alkylsubstituenten er substituert med fra 1 til 3 substituent uavhengig utvalgt fra gruppen som består av aryl.

4.

25 Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t

X<sup>1</sup> = NR<sup>7</sup>;

R<sup>2</sup> er hydrogen;

30 R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> og R<sup>5</sup> er hver individuelt utvalgt fra gruppen som består av hydrogen, -(CO)-R', -(CO)-R" og -(CO)-R"', hvori R', R" og R"' er hver uavhengig utvalgt fra gruppen som består av C<sub>1-6</sub>-alkyl;

35 R<sup>6</sup> er hydrogen; og

$R^7$  er utvalgt fra gruppen som består av  $C_{1-6}$ -alkyl,  $C_{2-15}$ -alkenyl,  $C_{2-15}$ -alkynyl, hvori alkylsubstituenten er substituert med fra 1 til 3 substituenten uavhengig utvalgt fra gruppen som består av aryl.

5 5.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t

$X^1$  =  $NR^7$ ;

10  $R^2$  er hydrogen;

$R^3$ ,  $R^4$  og  $R^5$  er hver individuelt utvalgt fra gruppen som består av hydrogen,  $-(CO)-R'$ ,  $-(CO)-R''$  og  $-(CO)-R'''$ , hvori  $R'$ ,  $R''$  og  $R'''$  hver er uavhengig utvalgt fra gruppen som består av  $C_{1-6}$ -alkyl;

15

$R^6$  er hydrogen; og

$R^7$  er utvalgt fra gruppen som består av  $C_{1-6}$ -alkyl substituert med fra 1 til 3 substituenten uavhengig utvalgt fra gruppen som består av aryl,  $C_{2-6}$  alkenyl og  $C_{2-6}$  alkynyl.

20

6.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t

25  $X^1$  =  $NR^7$ ;

$R^2$  er hydrogen;

$R^3$ ,  $R^4$  og  $R^5$  er individuelt utvalgt fra gruppen som består av hydrogen,  $-(CO)-R'$ ,  $-(CO)-R''$  eller  $-(CO)-R'''$ , hvori  $R'$ ,  $R''$  og  $R'''$  er uavhengig utvalgt fra gruppen som består av  $C_{1-6}$ -alkyl;

30

$R^6$  er hydrogen; og

$R^7$  er uavhengig utvalgt fra gruppen som består av  $C_{1-6}$ -alkyl substituert med fra 1 til 3 substituenten uavhengig utvalgt fra gruppen som består av aryl,  $C_{2-6}$  alkenyl og  $C_{2-6}$  alkynyl.

35

7.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t

5  $X^1$  =  $NR^7$ ;

$R^2$  er hydrogen;

10  $R^3, R^4$  og  $R^5$  er uafhængig udvalgt fra gruppen som består af hydrogen,  $-(CO)-R'$ ,  $-(CO)-R''$  eller  $-(CO)-R'''$ , hvori  $R', R''$  og  $R'''$  er uafhængig udvalgt fra gruppen som består af  $C_{1-3}$ -alkyl;

$R^6$  er hydrogen; og

15  $R^7$  er uafhængig udvalgt fra gruppen som består af  $C_{1-6}$ -alkyl substitueret med fra 1 til 3 substituerer uafhængig udvalgt fra gruppen som består af aryl,  $C_{2-6}$  alkenyl og  $C_{2-6}$  alkynyl.

8.

20 Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t

$X^1$  =  $NR^7$ ;

$R^2$  er hydrogen;

25

$R^3, R^4$  og  $R^5$  er hver uafhængig udvalgt fra gruppen som består af hydrogen,  $-(CO)-R'$ ,  $-(CO)-R''$  og  $-(CO)-R'''$ , hvori  $R', R''$  og  $R'''$  er hver metyl;

$R^6$  er hydrogen; og

30

$R^7$  er udvalgt fra gruppen som består af  $C_{1-6}$ -alkyl substitueret med fra 1 til 3 substituerer uafhængig udvalgt fra gruppen som består af aryl,  $C_{2-6}$  alkenyl og  $C_{2-6}$  alkynyl.

35 9.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t

$X^1$  = NR<sup>7</sup>;

R<sup>2</sup> er hydrogen;

5 R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> og R<sup>5</sup> og R<sup>6</sup> er hver hydrogen; og

R<sup>7</sup> er uafhængig udvalgt fra gruppen som består af C<sub>1-6</sub>-alkyl substituert med fra 1 til 3 substituenter udvalgt fra gruppen som består av aryl, C<sub>2-4</sub> alkenyl og C<sub>2-4</sub> alkynyl.

10

10.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t

$X^1$  = NR<sup>7</sup>;

15

R<sup>2</sup> er hydrogen;

R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> og R<sup>6</sup> er hver hydrogen; og

20

R<sup>7</sup> er C<sub>1-6</sub>-alkyl substituert med 1 substituent udvalgt fra gruppen som består av aryl.

11.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t

25

$X^1$  = NR<sup>7</sup>;

R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> og R<sup>6</sup> er hver hydrogen; og

30

R<sup>7</sup> er C<sub>1-4</sub>-alkyl substituert med fenyl.

12.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t

35

$X^1$  = NR<sup>7</sup>;

R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> og R<sup>6</sup> er hver hydrogen; og

$R^7$  er  $C_{2-4}$ -alkenyl.

13.

5 Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t

$X^1$  =  $NR^7$ ;

$R^2, R^3, R^4, R^5$  og  $R^6$  er hver hydrogen; og

10

$R^7$  er  $C_{2-3}$ -alkenyl.

14.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t

15

$X^1$  =  $NR^7$ ;

$R^2, R^3, R^4, R^5$  og  $R^6$  er hver hydrogen; og

20

$R^7$  er  $C_{2-4}$ -alkynyl.

15.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t

25

$X^1$  =  $NR^7$ ;

$R^2, R^3, R^4, R^5$  og  $R^6$  er hver hydrogen; og

30

$R^7$  er  $C_{2-3}$ -alkynyl.

16.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t  
forbindelsen er utvalgt fra gruppen som består av:

35

2-{6-[[((3R)oksolan-3-yl)amino]-8-(prop-2-enylamino)purin-9-yl]}(4S,2R,3R,5R)-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol;

2- $\{6-[\text{((3R)oksolan-3-yl)amino}]-8\text{-}(\text{prop-2-ynylamino})\text{purin-9-yl}\}$ (4S,2R,3R,5R)-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol; og

2- $\{6-[\text{((3R)oksolan-3-yl)amino}]-8\text{-}[\text{benzylamino}]\text{purin-9-yl}\}$ (4S,2R,3R,5R)-5-hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol.

5

17.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er for terapeutisk anvendelse.

10 18.

Forbindelse ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at den terapeutiske anvendelsen er modifisering av hjerteaktivitet hos et pattedyr som opplever en hjerte-elektrisk forstyrrelse som kan behandles ved stimulering av en A<sub>1</sub> adenosinreseptor.

15

19.

Forbindelse ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at den terapeutiske anvendelsen er modifisering av pattedyr adipocytffunksjon ved å stimulere en A<sub>1</sub> adenosinreseptor.

20

20.

Forbindelse ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at den terapeutiske anvendelsen er restitusjon av sensitivitet og effektivitet til insulin hos et pattedyr ved å stimulere en A<sub>1</sub> adenosinreseptor.

25

21.

Forbindelse ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at den terapeutiske anvendelsen er å tilveiebringe et pattedyr med en sentralnervesystem neurobeskyttelse ved å stimulere en A<sub>1</sub> adenosinreseptor.

30

22.

Forbindelse ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at den terapeutiske anvendelsen er å tilveiebringe et pattedyr med kardiomyocytbeskyttelse fra iskemi ved å stimulere en A<sub>1</sub> adenosinreseptor.

35

23.

Forbindelse ifølge et hvilket som helst av kravene 17 til 22, k a r a k -  
t e r i s e r t v e d at den terapeutisk effektive mengden varierer fra 0,01  
til 100 mg/kg vekt av pattedyret.

5

24.

Farmasøytisk sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den  
innbefatter forbindelsen ifølge krav 1 og en eller flere farmasøytiske eksipienter.

10 25.

Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 24, k a r a k t e r i s e r t  
v e d at den farmasøytiske sammensetningen er i form av en løsning.

26.

15 Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 24, k a r a k t e r i s e r t  
v e d at den farmasøytiske sammensetningen er i form av en tablett.